한약재의 생리활성성분의 분리 및 분석연구(금은화, 인동)

Isolation and quantitative analysis of bioactive components from Lonicera Vine and Lonicera Flower

서울대학교

식품의약품안전청

제 출 문

식품의약품안전청장 귀하

이 보고서를 “한약재의 생리활성성분의 분리 및 분석연구(금은화, 인동) (서울대학교/강삼식)”과제의 최종보고서로 제출합니다.

2008. 11. 30

주관연구기관명 : 서울대학교

주관연구책임자 : 강 삼 식

제 1세부과제명 : 금은화 및 인동으로부터 한약재 생리활성성분의 분리
(제1세부연구기관/세부과제책임자): 서울대학교 약학대학/강 삼 식

제 2세부과제명 : 지표물질 동시 정성정량분석법개발 및 패턴분석
(제2세부연구기관/세부과제책임자): 서울대학교 약학대학/신 종 헌

목 차

Ⅰ. 연구개발결과 요약문

(한글) ---------- 5
(영문) ---------- 7

Ⅱ. 총괄연구개발과제 연구결과

제1장 총괄연구개발과제의 최종 연구개발 목표 ---------- 9
제2장 총괄연구개발과제의 최종 연구개발 내용 및 방법 ---------- 13
제3장 총괄연구개발과제의 최종 연구개발 결과 ---------- 19
제4장 총괄연구개발과제의 연구결과 고찰 및 결론 ---------- 23
제5장 총괄연구개발과제의 연구성과 ---------- 41
제6장 기타 주요변경사항 ---------- 43
제7장 참고문헌 ---------- 43
제8장 첨부서류 ---------- 48

Ⅲ. 제1 세부연구개발과제 연구결과

제1장 제1 세부연구개발과제의 최종 연구개발 목표 ---------- 77
제2장 제1 세부연구개발과제의 연구대상 및 방법 ---------- 80
제3장 제1 세부연구개발과제의 최종 연구개발 결과 ---------- 104
제4장 제1 세부연구개발과제의 연구결과 고찰 및 결론 ---------- 107
제5장 제1 세부연구개발과제의 연구성과 ---------- 125
제6장 기타 주요변경사항 ---------- 126
제7장 참고문헌 ---------- 127
제8장 첨부서류 ---------- 131

Ⅳ. 제2 세부연구개발과제 연구결과

제1장 제2 세부연구개발과제의 최종 연구개발 목표 ---------- 135
제2장 제2 세부연구개발과제의 연구대상 및 방법 ---------- 136
제3장 제2 세부연구개발과제의 최종 연구개발 결과 ---------- 136
제4장 제2 세부연구개발과제의 연구결과 고찰 및 결론 ---------- 182
제5장 제2 세부연구개발과제의 연구성과 ---------- 185
제6장 기타 주요변경사항 ---------- 186
제7장 참고문헌 ---------- 186
제8장 첨부서류 ---------- 187

최종보고서 요약문

과 제 명	한약재의 생리활성성분의 분리 및 분석연구(금은화, 인동)		
중심단어	금은화, 인동, 생리활성성분, 동시분석법 개발		
주관연구기관	서울대학교	주관연구책임자	강 삼 식
연구기간	2007년 2월 28일 - 2008년 11월 30일		

인동으로부터 long-chain alcohol성분들과, C_{16}-C_{26}의 지방산을 혼합물 형태로 분리하였으며, polyoxygenated C_{18} 지방산 계열의 화합물들인 pinellic acid와 9,12,13-trihydroxy octadeca-10(*E*),15(*Z*)-dienoic acid, 6종의 triterpene계 성분인 (24*S*)-cycloart-25-en-3β,24-diol, pomolic acid, ursolic acid, euscaphic acid, hederagenin, 23-hydroxytormentic acid, 4α-methyl ergosterol 유도체들인 obtusifoliol, gramisterol 및 citrostadienol, β-sitosterol 및 이의 배당체인 daucosterol, 5종의 phenylpropanoid성분들인 caffeic acid, coniferin, coniferaldehyde, caffeic acid docosanoyl ester 및 coniferylaldehyde 4-*O*-glucoside, 5종의 iridoid 성분들인 loganin, loganic acid, secologanin dimethyl acetal, sweroside 및 demethylsecologanol, 4종의 lignan 성분들인 9α-hydroxypinoresinol, pinoresinol glucoside, (+)-5-demethyl-3-methoxyisolariciresinol, (7*R*,8*R*)-*threo*-4,7,9,3′,9′-pentahydroxy-3-methoxy-8-*O*-4′-neolignan, flavonoid인 linarin, 기타 trilinolein, bis(2-ethylhexyl)phthalate 등 총 34종의 화합물들을 분리 규명하였으며, 이중 lignan성분인 (+)-5-demethyl-3-methoxyisolariciresinol은 처음 분리된 신물질이다.

금은화로부터 hydrocarbon alcohol 및 monopalmitin, flavonoid 성분인 luteolin, luteolin 7-*O*-glucoside, flavoyadorinin-B, isoquercitrin, rhoifolin, rutin 등의 6종, chlorogenic acid, methyl chlorogenate, 3,5-dicaffeoylquinic acid, 3,5-dicaffeoylquinic acid methyl ester, 4,5-dicaffeoylquinic acid, 4,5-dicaffeoylquinic acid methyl ester같은 chlorogenic acid 유도체 6종, 7-ketologanin, secologanin dimethyl acetal, (*E*)-aldosecologanin, epivogeloside같은 iridoid 성분 4종, caffeic acid, vanillic acid 4-*O*-β-D-(6-*O*-benzoylglucopyranoside) 등 2종의 phenylpropanoid 성분들 coumarin 성분인 esculetin, 이외에도 protocatechuic acid, β-sitosterol, daucosterol, dicarboxylic acid계 지방산의 일종인 azelaic acid와 uracil, cerebroside 및 sucrose 등 총 29종의 화합물들을 분리 확인하였으며, 이중 vanillic acid 4-*O*-β-D-(6-*O*-benzoylglucopyranoside)는 처음으로 분리된 신물질이다. 분리된 화합물 가운데 지표물질들을 포함하여 각각 10종씩을 선정하여 식약청에 제출할 예정이다. 금은화와 인동을 HPLC-DAD, LC/MS/MS를 사용하여 동시 정량 및 정성 표준분석법을 개발하였고, 분석법에 대한 validation을 입증하였다. 그리고 시중에 유통되고 있는 금은화와 인동시료들에 대하여 정성 및 정량분석과 패턴분석을 수행하여 개발된 방법의 실효성을 입증하였다.

주관연구책임자 의견	
연구의 범위	인동, 금은화의 활성성분 분리는 목표치인 10종을 초과하여 인동으로부터 34종, 금은화로부터 29종을 분리 구조결정을 하였으므로 화합물 수에 있어서는 계획대비 초과달성 하였다. 그러나 양적인 관계에 있어서는 일부 충분한 양을 확보하지 못한 화합물들이 있으나, 제출용으로 주성분은 충분하다고 사료되었다. 금은화와 인동시료의 품질관리를 위하여 동시표준분석법을 개발에 성공하였다. 금은화와 인동의 HPLC, LC-MS 및 LC-MSMS의 분리조건 확립 및 validation을 입증하였다. 또한 시중에 유통되고 있는 금은화와 인동에 함유된 생약성분의 정성 및 정량분석 그리고 패턴분석을 완료하였다.
연구의 한계점	인동으로부터 분리한 활성성분들은 선행과제로 본 연구이전에 분리된 성분들과 비교하여 차이가 발견되었다. 주성분으로 알려진 iridoid, flavonoid, saponin 및 phenol성 물질들 중 특히 saponin이나, 활성이 좋은 ochnaflavone 등은 본 과제에서는 분리하지 못하였는데 이는 인동 줄기만을 실험재료로 사용하였기 때문으로 사료된다. 2007년말 개정된 대한약전 IX 에서는 잎 및 덩굴성 줄기를 인동으로 규정되어 있으므로 잎의 성분연구가 요청된다. 일부 iridoid성분들은 용액 중 특히 산 또는 알카리성 용액 중에서는 쉽게 분해되므로 취급시 주의가 요망된다.
인용시 주의사항	본 과제에 있어 특별한 주의사항 없음.
주관부서 연락처	식품의약품안전청 위해관리기술연구팀 (☎ 380 ~ 1783)

Summary

Title of Project	Isolation and quantitative analysis of bioactive components from Lonicera Vine and Lonicera Flower		
Key Words	Lonicera Vine, Lonicera Flower, isolation of bioactive components, simultaneous determination		
Institute	Seoul National University	Project Leader	Sam Sik Kang
Project Period	2007. 02. 28 - 2008. 11. 30		

A new lignan, (+)-5-demethyl-3-methoxyisolariciresinol, was isolated from the caulis of *Lonicera japonica* (Caprifoliaceae), along with three long-chain alcohols, two polyoxygenated C_{18} fatty acids, six triterpenoids, three 4α-methyl ergosterol derivatives, five phenyl propanoids, five iridoids, three lignans and various other compounds. Among the 34 compounds, *n*-eicosanol (C_{20}), *n*-docosanol (C_{22}), *n*-tetracosanol (C_{24}), *n*-hexacosanol (C_{26}), pinellic acid, 9,12,13-trihydroxy octadeca-10(*E*),15(*Z*)-dienoic acid, (24*S*)-cycloart-25-en-3β,24-diol, pomolic acid, ursolic acid, euscaphic acid, hederagenin, 23-hydroxytormentic acid, obtusifoliol, gramisterol, citrostadienol, β-sitosterol, daucosterol, coniferin, coniferaldehyde, caffeic acid docosanoyl ester, coniferylaldehyde 4-*O*-glucoside, loganic acid, demethylsecologanol, 9α-hydroxypinoresinol, pinoresinol glucoside, (7*R*,8*R*)-*threo*-4,7,9,3′,9′-pentahydroxy-3-methoxy-8-*O*-4′-neolignan, linarin, trilinolein, and bis(2-ethylhexyl)phthalate were isolated from this plant for the first time.

A new phenolic glycoside, vanillic acid 4-*O*-β-D-(6-*O*-benzoylglucopyranoside), along with six flavonoids, six chlorogenic acid derivatives, four iridoids, a coumarin and others were isolated from the flowers of *Lonicera japonica* (Caprifoliaceae). Among the 29 compounds, *n*-nonacosane, *n*-hexacosanol, monopalmitin, flavoyadorinin-B, rhoifolin, 7-ketologanin, esculetin, azelaic acid, uracil, cerebroside and sucrose were isolated from this plant for the first time. All the structures were established on the basis of chemical and spectroscopic methods. The standard analytical methods for flavonoids, phenolic compounds and iridoids isolated from *Lonicera japonica* flowers and caulis *Lonicera japonica* using HPLC, LC/MS, LC/MS/MS were developed. Validation of flavonoid, phenolic compound and iridoid from *L. japonica* flowers and caulis *L. japonica* were extensively performed. In addition, qualitative analysis, quantitative analysis and pattern analysis of flavonoid, phenolic compound and iridoid from *L. japonica* flowers and caulis *L. japonica* were performed for commercial specimens of folk medicine.

Opinion of Project Manager	
Scope	Thirty four components were isolated from Lonicera caulis. Of these, loganin and its derivatives were the major compounds, while others such as triterpenoids, lignans, and phenolics were the minor ones. Twenty nine components were isolated from Lonicera flowers. Among them, chlorogenic acid and its derivatives and flavonoids were the major compounds, while others such as iridoids and phenylpropanoids were the minor ones. A new HPLC with diode array detector (DAD), LC/MS and LC-MS/MS was established for the simultaneous determination of bioactive compounds in Lonicera caulis and flowers. The developed method provided satisfactory precision and accuracy with overall intra-day and inter-day variations and the overall recoveries. The verified method was successfully applied to quantitative determination of the bioactive components in over 20 commercial samples from different markets in Korea and China.
Limitation	The compounds isolated from Lonicera caulis were different from those of the previous studies on the same plant. Among the major components such as iridoids, flavonoids and saponins, saponins and a flavonoid, ochnaflavone, were not isolated from the plant materials in the present case. In the previous studies, aerial parts including leaves of *Lonicera japonica* have been used. Therefore, studies on the leaf parts should be carried out to obtain the mentioned components.
Direction For Citation	
Supervisory Office	KFDA Risk Management Research Team (☎ 380 ~ 1783)

총괄연구개발과제 연구결과

제1장 총괄연구개발과제의 최종 연구개발 목표

1.1 총괄연구개발과제의 목표

금은화 및 인동으로부터 유효성분 중심의 한약재 관리에 필요한 생리활성 성분의 분리, 확인 및 이들 생리활성 성분을 이용한 HPLC/UV 및 LC-MS(MS)법에 의한 동시분석법을 개발하고 pattern인식법에 의한 기원별, 산지별 한약재 정보를 구축하고자 한다. 분석을 위한 표준품을 제조, 공급하고, 차후 연구를 위한 시료를 확보하여 제공하고자 한다. 이를 위하여 금은화 및 인동으로부터 주성분들을 포함한 활성성분들을 대량 분리하여 분석용 표준품 및 연구용 시료로 제공한다.
금은화 및 인동 활성성분의 효과적인 정성정량 분석법 확립, 순도결정 및 5성분 이상의 지표물질 동시 분석법 개발과 산지 기원에 따른 20품목 이상의 시료에 대한 패턴인식/지문인식법에 의한 한약재 평가 완료한다.

1.2 총괄연구개발과제의 목표달성도

인동의 70% EtOH엑스를 제조하고 분획하여 얻은 이들 분획들에 대하여 크로마토그라피를 반복 실시하여 다음과 같은 물질들을 분리하였다. 즉 hexane분획으로부터 long-chain alcohol성분들인 *n*-docosanol (behenyl alcohol), *n*-tetracosanol (lignoceryl alcohol) 및 *n*-eicosanol을 혼합물 형태로 얻어 확인하였으며, triterpene계 성분인 (24*S*)-cycloart-25-en-3β,24-diol을 분리하였다. CH_2Cl_2분획으로부터 trilinolein, C_{16}-C_{26}의 지방산 혼합물, *n*-hexacosanol같은 hydrocarbon alcohol, obtusifoliol, gramisterol, citrostadienol과 같은 4α-methyl ergosterol 유도체들과, β-sitosterol을 분리하여 확인하였다. 또한 bis(2-ethylhexyl)phthalate 외에 coniferaldehyde 및 caffeic acid docosanoyl ester를 분리하였다. EtOAc분획도 각종 크로마토그라피를 반복 실시하여 triterpene계 화합물들인 pomolic acid, ursolic acid, euscaphic acid, hederagenin, 23-hydroxytormentic acid를 분리 확인하였고, iridoid인 secologanin dimethyl acetal, sweroside를 분리하였다. 이외에도 caffeic acid, coniferylaldehyde 4-*O*-glucoside와, 9α-hydroxypinoresinol, pinoresinol glucoside, (+)-5-demethyl-3-methoxyisolariciresinol, (7*R*,8*R*)-*threo*-4,7,9,3′,9′-pentahydroxy-3-methoxy-8-*O*-4′-neolignan 같은 lignan 성분들을 분리 규명하였으며, pinellic acid와 9,12,13-trihydroxy octadeca-10(*E*),15(*Z*)-dienoic acid같은 polyoxygenated C_{18} 지방산 계열의 화합물들 외에 flavonoid성분인 linarin과 daucosterol를 분리 확인하였다. BuOH분획으로부터는 coniferin과, iridoid인 loganin, loganic acid 및 demethylsecologanol을 분리 확인하여 인동으로부터 총 34종의 화합물들을 분리확인하였다. 분리된 화합물들 중 lignan성분인 (+)-5-demethyl-3-methoxyisolariciresinol은 처음 분리된 신물질이다.
금은화로부터도 인동과같이 분획을 실시하여 TLC pattern이 같은 hexane분획 및 CH_2Cl_2분획으로부터 *n*-nonacosane과 *n*-hexacosanol같은 hydrocarbon alcohol 및 monoacylglycerol계열인

monopalmitin을 분리하였으며, EtOAc 분획으로부터 luteolin, luteolin 7-*O*-glucoside, flavoyadorinin-B, isoquercitrin, rhoifolin, rutin 등의 6종의 flavonoid 성분과, chlorogenic acid, methyl chlorogenate, 3,5-dicaffeoylquinic acid, 3,5-dicaffeoylquinic acid methyl ester, 4,5-dicaffeoylquinic acid, 4,5-dicaffeoylquinic acid methyl ester같은 chlorogenic acid 유도체 6종, 7-ketologanin, secologanin dimethyl acetal 및 (*E*)-aldosecologanin 같은 iridoid 성분들과, protocatechuic acid, caffeic acid, vanillic acid 4-*O*-β-D-(6-*O*-benzoylglucopyranoside) 등의 phenylpropanoid성분들 이외에 coumarin성분인 esculetin, 이외에도 β-sitosterol 및 이의 glucose 배당체인 daucosterol, dicarboxylic acid계 지방산의 일종인 azelaic acid와 uracil 및 cerebroside도 분리하였다. BuOH분획으로부터는 sucrose 이외에 iridoid 성분인 epivogeloside와, chlorogenic acid를 분리하여 규명하였다. 따라서 금은화로부터도 총 29종의 화합물들을 분리 확인하였으며, 이중 vanillic acid 4-*O*-β-D-(6-*O*-benzoylglucopyranoside)는 처음으로 분리된 신물질이다. 따라서 제1세부과제의 목표는 달성되었다.

	인동	금은화	계
분리한 화합물 총수	34	29	63
신물질 수	1	1	2
인동/금은화로부터 처음 분리한 화합물 수	28	11	39
기지 화합물 수	5	17	22

시중에 유통되고 있는 금은화와 인동시료의 품질관리를 위하여 동시표준분석법을 개발에 성공하였다. 금은화와 인동의 HPLC, LC-MS 및 LC-MSMS의 분리조건 확립 및 validation을 입증하였다. 또한 시중에 유통되고 있는 금은화와 인동에 함유된 생약성분의 정성 및 정량분석 그리고 패턴분석을 완료하는 등 당초의 연구목표를 완전히 달성하였다.

1.3 국내·외 기술개발 현황

인동덩굴 (*Lonicera japonica* Thunberg)의 줄기를 인동등 (忍冬藤), 꽃을 금은화 (金銀花)라고 하여 한방에서 사용되고 있는 약재로서, 2007년 12월 28일 개정 공고된 대한민국약전 9개정판에서는 인동덩굴의 꽃봉오리 또는 막 피기 시작한 꽃을 금은화 (Lonicera Flower, Lonicerae Flos, 金銀花), 인동덩굴의 잎 및 덩굴성 줄기를 인동 (Lonicera Leaf and Stem, Lonicerae Folium et Caulis, 忍冬)으로 규정되어 수재되어 있다. 인동의 성분연구는 90년대 초반부터 연구되기 시작하여 현재 많은 성분들이 분리되어 있다. 이들 성분들을 화합물군으로 대별하면 flavonoid, iridoid, saponin 및 기타 phenol성 화합물들로 대별할 수 있다. Flavonoid성분으로는 quercetin, ochnaflavone, ochnaflavone 4'-*O*-methyl ether, astragalin, isoquercitrin, rhoifolin, diosmetin 7-*O*-glucoside, lonicerin 등을 연구자들이 분리하여 구조를 규명하여 보고한 바 있으며,[1,2] Kumar 등[3]도 인동으로부터 luteolin, chrysin, 3'-*O*-methylloniflavone 및 loniflavone 등을 분리 보고한바 있다. Qian 등[4]은 HPLC로 rutin, luteolin 7-*O*-glucoside 등을 확인하여 보고한 바 있다. Iridoid 성분으로는 loganin,

sweroside, secologanin 이외에 secoxyloganin, vogeloside, epivogeloside, L-phenylalanino secologanin, 7-*O*-(4-β-D-glucopyranosyloxy-3-methoxybenzoyl)secologanolic acid, 6'-*O*-(7α-hydroxyswerosyloxy)loganin, (*Z*)-aldosecologanin, (*E*)-aldosecologanin, secologanin dimethyl acetal, 7-*O*-butylsecologanic acid[4-8] 등이 분리되어 보고한 바 있다. Saponin 성분으로는 연구자들이 분리한 loniceroside A, B[9] loniceroside C[10] 외에, 3-*O*-α-L-rhamnopyranosyl(1→2)-α-L-arabinopyranosyl hederagenin 28-*O*-[3-*O*-acetyl-β-D-xylopyranosyl(1→6)-β-D-glucopyranoside, 3-*O*-α-L-rhamnopyranosyl(1→2)-α-L-arabinopyranosyl hederagenin 28-*O*-β-D-xylopyranosyl(1→6)-β-D-glucopyranoside, hederagenin 3-*O*-α-L-arabinopyranoside, hederagenin 3-*O*-β-D-glucopyranosyl(1→2)-α-L-arabinopyranoside, hederagenin 3-*O*-α-L-rhamnopyranosyl(1→2)-α-L-arabinopyranoside, 3-*O*-α-L-arabinopyranosyl hederagenin 28-*O*-β-D-glucopyranosyl (1→6)-β-D-glucopyranoside, 3-*O*-β-D-glucopyranosyl(1→2)-α-L-arabinopyranosyl hederagenin 28-*O*-β-D-glucopyranosyl(1→6)-β-D-glucopyranoside, 3-*O*-α-L-rhamnopyranosyl(1→2)-α-L-arabinopyranosyl hedearagenin 28-*O*-β-D-glucopyranoside, 3-*O*-α-L-rhamnopyranosyl(1→2)-α-L-arabinopyranosyl hederagenin 28-*O*-β-D-glucopyranosyl(1→6)-β-D-glucopyranoside, 3-*O*-α-L-rhamnopyranosyl(1→2)-α-L-arabinopyranosyl hederagenin 28-*O*-[6-*O*-acetyl-β-D-glucopyranosyl](1→6)-β-D-glucopyranoside, 3-*O*-α-L-arabinopyranosyl oleanolic acid 28-*O*-β-D-glucopyranosyl(1→6)-β-D-glucopyranoside, oleanolic acid 3-*O*-β-D-glucopyranosyl(1→2)-α-L-arabinopyranoside, 3-*O*-α-L-rhamnopyranosyl(1→2)-α-L-arabinopyranosyl oleanolic acid 28-*O*-β-D-glucopyranosyl(1→6)-β-D-glucopyranoside, 3-*O*-β-D-glucopyranosyl(1→2)-α-L-arabinopyranosyl oleanolic acid 28-*O*-β-D-glucopyranosyl(1→6)-β-D-glucopyranoside[11,12] 등이 분리되여 구조가 규명되어 보고한 바 있다. 기타 phenol성 성분들로서는 chlorogenic acid와 caffeic acid 등이 분리되여 보고[4]된 바 있으며, flavonolignan계 성분인 hydnocarpin 이 분리되여 보고[1] 된 바 있다.

금은화로부터도 cerebroside 성분들인 lonijaposide A_1 – A_4, B_1, B_2[13] 들과, phenol 성분들인 3,5-di-*O*-caffeoylquinic acid butyl ester, 3-*O*-caffeoylquinic acid, 3-*O*-caffeoylquinic acid methyl ester,[14] 3,5-di-*O*-caffeoylquinic acid,[14,20,33] 3,5-di-*O*-caffeoylquinic acid methyl ester,[14,20] chlorogenin tetraacetate,[18] benzyl alcohol β-D-xylopyranosyl(1˝→6´)-β-D-glucopyranoside,[15] chlorogenic acid,[20,22,23,32,33] protocatechuic acid,[20,26] caffeic acid,[22,26,32,33] methyl caffeate, methyl chlorogenic acid,[20] *p*-hydroxybenzaldehyde, protocatechualdehyde, vanillic acid, methyl quinate,[50] 3,4-di-*O*-caffeoyl quinic acid,[20,32,33] 4,5-di-*O*-caffeoylquinic acid,[32] 4,5-di-*O*-caffeoylquinic acid methyl ester,[50] 3,4-di-*O*-caffeoylquinic acid methyl ester[20] 들이 분리 보고되었다. Flavonoid 성분으로는 rutin,[20,24,30,32,33] luteolin,[20,22,23,26,30] hyperoside,[22,24,30] apigenin,[23] luteolin 7-*O*-galactoside,[24] lonicerin,[24,30,32,33] tricin 7-*O*-glucoside,[30] tricin 7-*O*-neohesperidoside,[24] quercetin,[24,30] chrysoeriol, chrysoeriol 7-*O*-glucoside,[26] quercetin 3-*O*-glucoside,[26,30,32,33,50] isorhamnetin 3-*O*-glucoside, kaempferol 3-*O*-glucoside,[26,50] luteolin 7-*O*-glucoside,[26,30,32,33,50] kaempferol 3-rutinoside,[50] isorhamnetin 3-rutinoside,[50] 들이 분리되었다. Saponin 성분들로서는 macranthoidin A,[17] macranthoidin B,[16,17,30] 3-*O*-α-L-rhamnopyranosyl(1→2)-α-L-arabinopyranosyl hederagenin 28-*O*-α-L-rhamnopyranosyl(1→2)-[β-D-xylopyranosyl(1→6)-β-D-glucopyranoside],[16-19] hederagenin 3-*O*-α-L-arabinopyranoside,[26] hederagenin 3-*O*-α-L-rhamnopyranosyl(1→2)-α-L-arabinopyranoside,[17] 3-*O*-α-L-rhamnopyranosyl(1→2)-α-L-arabinopyranosyl hederagenin 28-*O*-β-D-xylopyranosyl(1→6)-β-D-glucopyranoside,[17-19] dipsacoside B,[17,30,31] 3-*O*-α-L-arabinopyra

nosyl hederagenin 28-*O*-α-L-rhamnopyranosyl(1→2)-[β-D-xylopyranosyl(1→6)-β-D-glucopyranoside],[18,19] oleanolic acid 28-*O*-α-L-rhamnopyranosyl(1→2)-[β-D-xylopyranosyl(1→6)-β-D-glucopyranoside][26] 들이 분리 보고되었다. Iridoid 성분로서는 loganin,[21,27,29,30,32,34] loganic acid,[50] 7-epiloganin,[27] sweroside,[21,27,29,30,32-34] 7-epivogeloside,[21,27,30] secologanin,[29,34] secoxyloganin,[21,27,30,32-34] secologanoside,[50] secologanin dimethyl acetal,[29] dimethylsecologanoside,[21,29,30] centauroside,[21,28,30,32,33] loniceracetalide A, B,[29] lonijaposide A, B, C, kingiside, morroniside, secologanoside[34] 들과, monoterpene glycoside인 (2*E*,6*S*)-8-[α-L-arabinopyranosyl(1″→6′)-β-D-glucopyranosyloxy]-2,6-dimethyloct-2-eno-1,2″-lactone[15]과, 5-hydroxymethyl-2-furfural,[26] adenosine, uridine[50] 및 다수의 휘발성 성분[25] 들도 분리 보고되었다.

금은화의 활성으로 금은화의 EtOAc분획물이 돌연변이원성에 대하여 강한 억제활성이 있음을 보고하였다.[23] 사람의 혈액으로부터 분리한 혈소판을 사용하여 혈소판응집 억제활성을 나타내는 금은화의 활성성분으로는 methyl caffeate, 3,4-di-*O*-caffeoylquinic acid 및 이의 methyl ester임을 밝혔으며, methyl caffeate, methyl 3,4-di-*O*-caffeoylquinate 등은 thromboxane생합성을 강하게 억제함을 보고하였다. 또한 H_2O_2로 유도한 상피세포의 상해에 대하여 억제활성을 나타내는 성분으로는 protocatechuic acid, methyl caffeate, methyl chlorogenate 및 luteolin임을 밝혔다.[20] 금은화의 flavonoid 성분 중 quercetin이 PLA_2에 대하여 강한 저해활성을 나타내며, COX-1 저해활성 성분들로서는 apigenin, luteolin, quercetin이며, COX-2 저해활성 성분들로서는 apigenin과 luteolin임을 밝혔다. 또한, quercetin, isoquercitrin 및 luteolin은 강한 5-LO 저해활성을 나타내었다.[35] 금은화의 물추출물은 I-κBα, NF-κB 활성을 억제하여 iNOS 나 TNF-α 생성억제에 영향을 주어 항염증작용을 나타낸다고 보고하였다.[36] Chlorogenic acid는 calcineurin을 활성화시켜 *in vitro* 또는 *in vivo* 실험에서 대식세포 기능을 항진시킴을 보고하였다.[43] 금은화 추출물이 항angiogenesis, 항염증 및 진통작용이 있음을 보고하였다.[49] 인동의 추출물은 항염 및 진통작용이 있으며, (아)급성독성을 나타내지 않음을 보고하였다.[37,48] 추출물의 BuOH분획은 100-400 mg/kg(po)에서 급·만성염증 model에서 항염증작용을 나타내었으나, 대조약물인 prednisolone보다는 약하였다.[38] 이 인동에서 분리한 flavonoid 성분 중 ochnaflavone은 Con A나 LPS로 유도한 임파구 분화를 억제함을 밝혔으며,[39] 이 성분은 rat에 있어서 대조군에 비하여 3배의 성장호르몬 유발효과를 나타내었다.[40] 인동의 새로운 saponin성분인 loniceroside A는 arachidonic acid 및 croton oil로 유발시킨 mouse 귀부종에 대하여 각 34% 및 31% 억제함을 보고하였다.[41] 인동의 70% MeOH나 70% acetone 엑스에 γ-선을 조사하면 밝은 색을 띠고 tyrosinase, xanthine oxidase 및 NO소거활성이 있어 식품 또는 화장품산업에서 유용할 것으로 보고하였다.[42] 인동의 주성분 가운데 하나인 luteolin이 사람의 직장 상피세포에서 IL-8생성으로 유도한 TNF-α 활성을 억제하며, 이는 MAPK 및 IκB/NF-κB 경로를 차단함에 기인한다고 보고하였다.[44] 또한 luteolin으로 유도한 CH27 cell apoptosis는 뚜렷한 DNA수축과 apoptotic body 생성을 수반하며, 이와 같은 세포사멸은 apoptotic marker 발현을 변환시킬 수 있는 능력에 기인하는 것으로 여겨진다고 보고하였다.[45] Ochnaflavone은 LPS로 유도한 iNOS 발현을 억제하는데 이는 RAW264.7 세포에서 NF-κB 활성을 억제하여 ERK1/2의 활성을 감소시키는 기전으로 보고하였다.[46] 또한 mouse 골수에서 유래한 대식세포에서 COX-2 (IC_{50} = 0.6 μM) 나 5-LO (IC_{50} = 6.56 μM) 활성을 억제한다고 보고하였다.[47] 이와 같이 금은화 및 인동의 추출물 또는 이들에 함유되어 있는 특정성분들은 항염증작용이 있음이 명확하며, 이들의 작용기전도 규명되었다.

제2장 총괄연구개발과제의 최종 연구개발 내용 및 방법

2.1. 인동의 성분 분리 및 구조결정

인동의 70% EtOH엑스를 제조하고 분획하여 얻은 이들 분획들에 대하여 크로마토그라피를 반복 실시하여 다음과 같은 물질들을 분리하였다. 즉 hexane분획으로부터 long-chain alcohol성분들인 *n*-docosanol (behenyl alcohol), *n*-tetracosanol (lignoceryl alcohol) 및 *n*-eicosanol을 혼합물 형태로 얻어 확인하였으며, triterpene계 성분인 (24*S*)-cycloart-25-en-3β,24-diol을 분리하였다. CH_2Cl_2분획으로부터 trilinolein, C_{16}-C_{26}의 지방산 혼합물, *n*-hexacosanol같은 hydrocarbon alcohol, obtusifoliol, gramisterol, citrostadienol과 같은 4α-methyl ergosterol 유도체들과, β-sitosterol을 분리하여 확인하였다. 또한 bis(2-ethylhexyl)phthalate 외에 coniferaldehyde 및 caffeic acid docosanoyl ester를 분리하였다. EtOAc분획도 각종 크로마토그라피를 반복 실시하여 triterpene계 화합물들인 pomolic acid, ursolic acid, euscaphic acid, hederagenin, 23-hydroxytormentic acid를 분리 확인하였고, iridoid인 secologanin dimethyl acetal, sweroside를 분리하였다. 이외에도 caffeic acid, coniferyl aldehyde 4-*O*-glucoside와, 9α-hydroxypinoresinol, pinoresinol glucoside, (+)-5-demethyl-3-methoxyisolariciresinol, (7*R*,8*R*)-*threo*-4,7,9,3′,9′-pentahydroxy-3-methoxy-8-*O*-4′-neolignan 같은 lignan 성분들을 분리 규명하였으며, pinellic acid와 9,12,13-trihydroxyoctadeca-10(*E*),15(*Z*)-dienoic acid같은 polyoxygenated C_{18} 지방산 계열의 화합물들 외에 flavonoid성분인 linarin과 daucosterol를 분리 확인하였다. BuOH분획으로부터는 coniferin과, iridoid인 loganin, loganic acid 및 demethylsecologanol을 분리 확인하여 인동으로부터 총 34종의 화합물들을 분리확인하였다. 분리된 화합물들 중 lignan성분인 (+)-5-demethyl-3-methoxyisolariciresinol은 처음 분리된 신물질이다.

2.2. 금은화의 성분 분리 및 구조결정

금은화로부터도 인동과같이 분획을 실시하여 TLC pattern이 같은 hexane분획 및 CH_2Cl_2분획으로부터 *n*-nonacosane과 *n*-hexacosanol같은 hydrocarbon alcohol 및 monoacylglycerol계열인 monopalmitin을 분리하였으며, EtOAc 분획으로부터 luteolin, luteolin 7-*O*-glucoside, flavoyadorinin-B, isoquercitrin, rhoifolin, rutin 등의 6종의 flavonoid 성분과, chlorogenic acid, methyl chlorogenate, 3,5-dicaffeoylquinic acid, 3,5-dicaffeoylquinic acid methyl ester, 4,5-dicaffeoylquinic acid, 4,5-dicaffeoylquinic acid methyl ester같은 chlorogenic acid 유도체 6종, 7-ketologanin, secologanin dimethyl acetal 및 (*E*)-aldosecologanin 같은 iridoid 성분들과, protocatechuic acid, caffeic acid, vanillic acid 4-*O*-β-D-(6-*O*-benzoylglucopyranoside) 등의 phenylpropanoid성분들 이외에 coumarin성분인 esculetin, 이외에도 β-sitosterol 및 이의 glucose 배당체인 daucosterol, dicarboxylic acid계 지방산의 일종인 azelaic acid와 uracil 및 cerebroside도 분리하였다. BuOH분획으로부터는 sucrose 이외에 iridoid 성분인 epivogeloside와, chlorogenic acid를 분리하여 규명하였다. 따라서 금은화로부터도 총 29종의 화합물들을 분리 확인하였으며, 이중 vanillic acid 4-*O*-β-D-(6-*O*-benzoylglucopyranoside)는 처음으로 분리된 신물질이다. 따라서 제1세부과제의 목표는 달성되었다.

2.3. 인동, 금은화의 산지별 추출물의 제조

2.3.1. 인동

- 잎; 산지별 인동 잎을 건조한 후 잘게 부수고 일정량 (100 g)을 70% EtOH (2 ℓ)로 reflux하여 3시간씩 2회 추출하여 70% EtOH 엑스를 제조 하였다.

- 줄기; 산지별 인동 줄기를 세절하여 분쇄기로 분쇄한 후 일정량 (100 g)을 70% EtOH (1 ℓ)로 reflux하여 3시간씩 2회 추출하여 70% EtOH 엑스를 제조 하였다.

	기원식물 학명		산 지				70% EtOH ext (g)
No. 1	*Lonicera japonica*		국산	경북 봉화	서울시장 수집	줄기	16.0
No. 2	*Lonicera japonica*	야생	국산	경북 경주	2007.8.13 채취	줄기	12.5
No. 3	*Lonicera japonica*	야생	국산	경북 경주	2007.8.13 채취	잎	38.8
No. 4	*Lonicera japonica*	약초원	국산	서울	2007.8.15 채취	줄기	17.6
No. 5	*Lonicera japonica*	약초원	국산	서울	2007.8.15 채취	잎	39.3
No. 6	*Lonicera japonica*		중국	산동	서녕시장 수집	줄기	14.0
No. 7	*Lonicera japonica*		중국	산동	안국시장 수집	줄기	17.7
No. 8	*Lonicera japonica*		국산	영천	영천시장 수집	줄기	13.2

2.3.2. 금은화

- 산지별 금은화를 분쇄기로 분쇄한 후 일정량 (50 g)을 70% EtOH (300 ㎖)로 reflux하여 3시간씩 2회 추출하여 70% EtOH 엑스를 제조 하였다.

	기원식물 학명		산 지			70% EtOH ext (g)
No. 1	*Lonicera japonica*	미개화	중국	밀현	서울시장 수집H	21.6
No. 2	*Lonicera japonica*	거의 개화	국산	경북 안동	서울시장 수집	20.6
No. 3	*Lonicera japonica*	미개화	중국	하남 정주 (온현)	정주시장 수집	21.9
No. 4	*Lonicera japonica*	개화+미개화	중국	산동	서녕시장 수집	20.7
No. 5	*Lonicera japonica*	미개화	중국	하남	안국시장 수집	19.0
No. 6	*Lonicera japonica*	개화	중국	산동	영천시장 수집	19.5

2.4. 제공된 화합물 및 추출물 목록

2.4.1. 제2세부과제에 제공한 추출물 및 화합물

1. 금은화 70% EtOH ex. : 10.0 g
2. 인 동 70% EtOH ex. : 10.1 g
3. 화합물 : 30종 (하기 표 참조)

표. 제2세부 및 효능팀에 제공한 화합물 목록

화합물명	무게 (mg)			
	제2세부과제 제공	효능팀제공	Total	비고
rutin	5.57	1,003.76	**1,009.33**	
chlorogenic acid	2.30	564.36	**566.66**	
caffeic acid	5.36	1,007.51	**1,012.87**	
loniceroside A	2.20	897.78	**899,98**	선행연구
protocatechuic acid	5.42	958.01	**963.43**	
hyperin	5.49	125.05	**130.54**	선행연구
rhoifolin	2.20	466.82	**469.02**	
astragalin	2.30	100.84	**103.14**	선행연구
lonicerin	5.73	17.92	**23.65**	선행연구
luteolin	5.45	218.37	**223.82**	
loganin	12.37	725.01	**737.38**	
ochnaflavone	3.80	242.41	**246.21**	선행연구
quercetin	5.40	156.08	**161.48**	
diosmetin	2.40	-	**2.40**	선행연구
diosmetin 7-*O*-glucoside	-	93.03	**93.03**	선행연구
caffeic acid methyl ester	6.02	142.43	**148.45**	
isoquercitrin	2.40	197.73	**200.13**	
chrysin	2.30	971.32	**973.62**	선행연구
α-hederin	2.10	123.66	**125.76**	선행연구
luteolin 7-*O*-glucoside	12.55	118.94	**131.49**	
β-sitosterol	-	30.21	**30.21**	
daucosterol	-	80.58	**80.58**	
coniferin	2.69	6.51	**9.20**	
loganic acid	1.74	-	**1.74**	

(계속)

화합물명	무게 (mg)			
	제2세부과제 제공	효능팀제공	Total	비고
secologanin dimethyl acetal	4.14	-	**4.14**	
vogeloside	1.50		**1.50**	선행연구
pinoresinol glucoside	0.56	-	**0.56**	
3,5-dicaffeoylquinic acid	11.38	16.55	**27.93**	
methyl 3,5-dicaffeoylquinate	11.43	86.27	**97.70**	
centauroside	0.54	29.03	**29.57**	
linarin	0.55	-	**0.55**	
sweroside	6.40	7.38	**13.78**	
demethylsecologanol	1.1	-	**1.1**	
azelaic acid	-	16.0	**16.0**	
hederagenin	-	10.0	**10.0**	
ursolic acid	-	10.0	**10.0**	

2.4.2. 효능팀에 제공한 추출물 및 화합물

1. 금은화 70% EtOH ex. : 10.0 g
2. 인동 70% EtOH ex. : 10.0 g
3. 상기 **2.3**에서 제조한 인동 8종, 금은화 6종의 70% EtOH엑스 각 1 g (× 2) 씩.
4. 화합물 : 29종 (상기 표 참조)

2.4.3. DNA 분석에 의한 한약재 종감별 연구팀에 제공한 원시료 목록

인동

	기원식물 학명		산 지				제공량 (g)
1	*Lonicera japonica* Thunb.		국산	경북 봉화	서울시장 수집	줄기	102.9
2	*Lonicera japonica* Thunb.	야생	국산	경북 경주	2007.8.13 채취	줄기	31.2
3	*Lonicera japonica* Thunb.	야생	국산	경북 경주	2007.8.13 채취	잎	50.0
4	*Lonicera japonica* Thunb.	약초원	국산	서울	2007.8.15 채취	줄기	106.2
5	*Lonicera japonica* Thunb.	약초원	국산	서울	2007.8.15 채취	잎	105.0
6	*Lonicera japonica* Thunb.		중국	산동	서녕시장 수집	줄기	100.1
7	*Lonicera japonica* Thunb.		중국	산동	안국시장 수집	줄기	101.5
8	*Lonicera japonica* Thunb.		국산	영천	영천시장 수집	줄기	10.5

9		구입			경기, 의정부		82.84
10		구입			강원, 홍천		84.81
11		구입			경기, 군포		80.54
12		구입			경북, 청송		100.17
13		구입			경기, 포천		84.72
14		구입			경북, 영천, 완당동		100.90
15		구입			경북, 영천, 화산면		99.95
16		구입			경기, 양평, 용문		57.25
17		구입			경북, 상주, 모서면		100.2
18		구입			경북, 안동, 와룡면		100.3
19		구입			대전, 유성, 세동		100.54
20		구입			경기, 강화		95.05
21		구입			대전, 동구, 중동		100.06
22		구입			경북, 김천		49.76
23		구입			중국산		100.33

금은화

	기 원 식 물 학 명		산 지			제공량 (g)
1	*Lonicera japonica* Thunb.	미개화	중국	밀현	서울시장 수집H	105.9
2	*Lonicera japonica* Thunb.	거의 개화	국산	경북 안동	서울시장 수집	102.9
3	*Lonicera japonica* Thunb.	미개화	중국	하남 정주 (온현)	정주시장 수집	103.2
4	*Lonicera japonica* Thunb.	개화+미개화	중국	산동	서녕시장 수집	104.9
5	*Lonicera japonica* Thunb.	미개화	중국	하남	안국시장 수집	103.0
6	*Lonicera japonica* Thunb.	개화	중국	산동	영천시장 수집	103.2
7		구입			강원, 홍천, 내면	100.79
8		구입			경북, 안동, 낙문동	100.18
9		구입			전남, 고흥	100.84
10		구입			강원, 양양	100.42
11		구입			경북, 봉화	100.68
12		구입			강원, 강릉, 교이	100.38

13		구입			충남, 부여	100.27
14		구입			강원, 고성, 거진	100.14
15		구입			경북, 의성	70.39
16		구입			설악산	100.23
17		구입			경북, 청송	100.95
18		구입			경북, 군위, 부계	100.32
19		구입			경북, 울진, 읍내	100.03
20		구입			경북, 안동	100.4
21		구입			중국산	100.75

2.5. 인동, 금은화의 동시분석법 개발 및 패턴분석

2.5.1. 연구내용

가. HPLC-DAD를 이용하여 금은화, 인동 유래의 생약성분 특히 flavonoid, phenolic compound 그리고 iridoid 성분의 효과적인 분리, 분석방법의 확립.

나. 금은화, 인동 유래 활성물질의 벨리데이션 완료.

다. LC-MS-MS를 이용한 활성물질들의 동정

라. 금은화, 인동 생약의 규격화를 위하여 활성성분에 대한 다양한 크로마토그래피 조건하에서의 함량분석 기초실험을 완료하고 이를 바탕으로 효율적인 동시 정성 및 정량분석법의 개발 및 이의 실제적인 적용 (5종 이상의 지표성분).

마. 금은화, 인동의 패턴 분석 완료

2.5.2. 연구방법

가. 금은화, 인동의 활성성분의 확보 (생약의 분류전문 연구진인 제 1세부과제에서 제공)

나. 활성분획의 활성성분을 동시에 5종 이상 정성, 정량적으로 검색할 liquid chromatography 조건의 파악

다. 금은화, 인동 유래 활성물질의 동시분석을 위한 직선성, 특이성, 정밀성, 정확성, 완건성 등 벨리데이션 완료

라. HPLC-MS/MS/를 이용한 금은화, 인동시료에 함유된 활성성분의 동정

마. 금은화, 인동 유래 활성성분의 함량분석을 위한 제반 기초실험

아. 상기 나. 과정에서 개발한 검색방법의 실제적 적용 범위 검증 (20종 이상의 시료에 적용)

자. 상기 아. 과정의 분석 자료를 바탕으로 금은화, 인동의 패턴분석 완료

제3장 총괄연구개발과제의 최종 연구개발 결과

인동으로부터 long-chain alcohol성분들인 *n*-eicosanol (C_{20}), *n*-docosanol (C_{22}), *n*-tetracosanol (C_{24}) 및 *n*-hexacosanol (C_{26})과, C_{16}-C_{26}의 지방산을 혼합물 형태로 분리하였으며, polyoxygenated C_{18} 지방산 계열의 화합물들인 pinellic acid와 9,12,13-trihydroxyoctadeca-10(*E*),15(*Z*)-dienoic acid, 6종의 triterpene계 성분인 (24*S*)-cycloart-25-en-3β,24-diol, pomolic acid, ursolic acid, euscaphic acid, hederagenin, 23-hydroxytormentic acid, 4α-methyl ergosterol 유도체들인 obtusifoliol, gramisterol 및 citrostadienol, β-sitosterol 및 이의 배당체인 daucosterol, 5종의 phenylpropanoid성분들인 caffeic acid, coniferin, coniferaldehyde, caffeic acid docosanoyl ester 및 coniferylaldehyde 4-*O*-glucoside, 5종의 iridoid 성분들인 loganin, loganic acid, secologanin dimethyl acetal, sweroside 및 demethylsecologanol, 4종의 lignan 성분들인 9α-hydroxy pinoresinol, pinoresinol glucoside, (+)-5-demethyl-3-methoxyisolariciresinol, (7*R*,8*R*)-*threo*-4,7,9,3′,9′-pentahydroxy-3-methoxy-8-*O*-4′-neolignan, flavonoid인 linarin, 기타 trilinolein, bis(2-ethylhexyl)phthalate 등 총 34종의 화합물들을 분리 규명하였으며, 이중 lignan성분인 (+)-5-demethyl-3-methoxyisolariciresinol은 처음 분리된 신물질이다.

금은화로부터 *n*-nonacosane과 *n*-hexacosanol같은 hydrocarbon alcohol 및 monoglyceride계열인 monopalmitin, flavonoid 성분인 luteolin, luteolin 7-*O*-glucoside, flavoyadorinin-B, isoquercitrin, rhoifolin, rutin 등의 6종, chlorogenic acid, methyl chlorogenate, 3,5-dicaffeoylquinic acid, 3,5-dicaffeoylquinic acid methyl ester, 4,5-dicaffeoylquinic acid, 4,5-dicaffeoylquinic acid methyl ester같은 chlorogenic acid 유도체 6종, 7-ketologanin, secologanin dimethyl acetal, (*E*)-aldosecologanin, epivogeloside같은 iridoid 성분 4종, caffeic acid, vanillic acid 4-*O*-β-D-(6-*O*-benzoylglucopyranoside) 등 2종의 phenylpropanoid성분들 coumarin성분인 esculetin, 이외에도 protocatechuic acid, β-sitosterol, daucosterol, dicarboxylic acid계 지방산의 일종인 azelaic acid와 uracil, cerebroside 및 sucrose 등 총 29종의 화합물들을 분리 확인하였으며, 이중 vanillic acid 4-*O*-β-D-(6-*O*-benzoylglucopyranoside)는 처음으로 분리된 신물질이다 (Table 1, 2 참조).

Table 1. 인동으로부터 분리한 화합물 목록

No.	Compound name	1차년도 (mg)	2차년도 (mg)	**총량** (mg)
1	hydrocarbon alcohol (docosanol + tetracosanol)	-	3	**3**
2	hydrocarbon alcohol (docosanol + tetracosanol + eicosanol)	-	4	**4**
3	24(*S*)-cycloart-25-en-3β,24-diol	-	5	**5**
4	trilinolein	20	-	**20**
5	*n*-hexacosanol	210	2	**212**
6	obtusifoliol	2	-	**2**
7	gramisterol	2	-	**2**
8	citrostadienol	3	-	**3**

9	β-sitosterol	1,124	2	1,126
10	DOP[bis(2-ethylhexyl)phthalate]	30	-	30
11	fatty acids	40	6	46
12	conferaldehyde		10	10
13	caffeic acid docosanoyl ester	-	13	13
14	pomolic acid	8	-	8
15	ursolic acid	20	-	20
16	9α-hydroxypinoresinol	-	5	5
17	euscaphic acid	10	-	10
18	hederagenin	10	-	10
19	secologanin dimethyl acetal	36	220	256
20	daucosterol	56	42	98
21	23-hydroxytormentic acid	16	-	16
22	caffeic acid	-	7	7
23	9,12,13-trihydroxyoctadeca-10(*E*),15(*Z*)-dienoic acid	-	17	17
24	pinellic acid	-	10	10
25	7,8-*threo*-4,7,9,3',9'-pentahydroxy-3-methoxy-8-*O*-4'-neolignan	-	2	2
26	5-demethxyl-3-methoxy isolariciresinol	-	2	2
27	pinoresinol 4-*O*-glucoside	-	105	105
28	sweroside	-	1,232	1,232
29	conferylaldehyde 4-*O*-glucoside	-	4	4
30	linarin	-	2	2
31	coniferin	-	120	120
32	loganin	1,210	5,316	6,526
33	loganic acid	-	304	304
34	demethylsecologanol	-	2	2

Table 2. 금은화로부터 분리한 화합물 목록

No.	Compound name	1차년도 (mg)	2차년도 (mg)	**총량** (mg)
1	*n*-nonacosane	-	44	**44**
2	*n*-hexacosanol	10	70	**80**
3	monopalmitin	-	10	**10**
4	β-sitosterol	42	20	**62**
5	daucosterol	175	2,978	**3,153**
6	luteolin	128	47	**175**
7	esculetin	-	2	**2**
8	protocatechuic acid	10	-	**10**
9	azelaic acid	7	-	**7**
10	caffeic acid	5	-	**5**
11	flavoyadorinin-B	-	16	**16**
12	4,5-dicaffeoylquinic acid	3	-	**3**
13	cerebroside	-	3	**3**
14	4,5-dicaffeoylquinic acid methyl ester	4	-	**4**
15	vanilic acid 4-*O*-β-D-(6-benzoylglucopyranoside)	-	7	**7**
16	7-ketologanin	-	3	**3**
17	secologanin dimethyl acetal	-	118	**118**
18	uracil	-	6	**6**
19	luteolin 7-*O*-glucoside	183	434	**617**
20	rutin	-	10	**10**
21	3,5-dicaffeoylquinic acid methyl ester	-	1,899	**1,899**
22	methyl chlorogenate	-	16	**16**
23	isoquercitrin	-	19	**19**
24	3,5-dicaffeoylquinic acid	-	513	**513**
25	rhoifolin	2	1	**3**
26	centauroside	-	70	**70**
27	sucrose	-	1,068	**1,068**
28	epivogeloside	-	3	**3**
29	chlorogenic acid	-	400	**400**

Table 3. 지표물질로 KFDA에 제출한 화합물 목록

No.	인동의 지표성분 화합물명	무게 (㎎)	순도 (%)	금은화의 지표성분 화합물명	무게 (㎎)	순도 (%)
1	loganin	3,100	99.9	chlorogenic acid	3,030	99.9
2	sweroside	630	99.5	luteolin 7-*O*-glucoside	340	95.8
3	loganic acid	200	99.1	3,5-dicaffeoylquinic acid methyl ester	360	90.5
4	coniferin	120	97.5	3,5-dicaffeoylquinic acid	500	99.9
5	linarin	120	92.5	caffeic acid methyl ester	210	99.8
6	luteolin	100	96.6	caffeic acid	1,020	99.9
7	caffeic acid	1,050	99.9	centauroside	15	94.9
8	coniferylaldehyde	105	99.9	isoquercitrin	440	92.4
9	pinoresinol 4-*O*-glucoside	35	97.6	rutin	1,080	92.1
10	secologanin dimethyl acetal	150	95.3	sweroside	300	99.5

금은화와 인동에 함유된 flavonoid, iridoid 그리고 phenolic compound계 생약성분의 효과적인 분리, 분석방법을 개발하였고, 최적의 조건에 대한 평가로서 validation parameter를 제시하였다. 시중에 유통되고 있는 금은화와 인동 생약시료의 품질관리를 위하여 다양한 크로마토그래피 조건하에서 활성성분의 함량분석 기초실험을 완료하였고 이를 바탕으로 효율적인 동시 정성 및 정량분석법의 개발 하였다. 금은화의 경우, chlorogenic acid, sweroside, luteolin 7-*O*-glucoside, 3,5-dicaffeoylquinic acid 그리고 (*E*)-aldosecologanin 등 지표물질 5종을 선택하였으며, 지표물질에 대한 최적의 분석조건을 제시하였다. 또한 specificity, linearity (correlation coefficient ≧ 0.994), range (1 ~ 20, 4 ~ 30 ㎍/ml), detection limit (0.02 ~ 0.09 ㎍/ml), quantitation limit (0.07 ~ 0.27 ㎍/ml), accuracy (recovery ratio > 97%), precision (RSD 0.05 ~ 1.95%), reproducibility, robustness, stability등 동시분석조건 평가를 위한 validation의 제반 조건을 합리적으로 제시하였다. 확립된 분석법을 통하여 시중에 유통되고 있는 국내·외 21종의 금은화의 활성성분 함량을 비교분석하였으며, 패턴 분석을 통해 주성분분석, 군집분석, 판별분석 그리고 유의성분석등의 실험을 성공적으로 수행하였다.

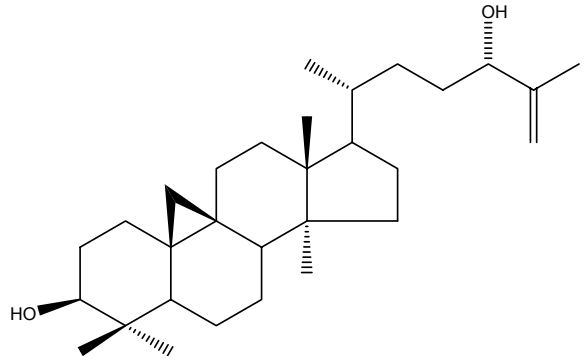
인동의 경우 coniferin, loganic acid, demethylsecologanol, sweroside 그리고 loganin등 지표물질 5종을 선택하였으며, 지표물질에 대한 최적의 분석조건을 제시하였다. 또한 specificity, linearity (correlation coefficient ≧ 0.998), range (1 ~ 20, ㎍/ml), detection limit (0.25 ~ 1.09 ㎍/ml), quantitation limit (0.75 ~ 3.32 ㎍/ml), accuracy (recovery ratio > 99.39%), precision (RSD 0.14 ~ 3.28%), reproducibility, robustness, stability등 동시분석조건 평가를 위한 validation의 제반 조건을 합리적으로 제시하였다. 확립된 분석법을 통하여 시중에 유통되고 있는 국내·외 24종의 인동의 활성성분 함량을 비교분석하였으며, 패턴 분석을 통해 주성분분석, 군집분석, 판별분석 그리고 유의성분석등의 실험을 성공적으로 수행하였다.

개발된 정성 및 정량분석법은 제반 validation parameters의 측정을 통하여 일차적으로 검증되었고 이들을 실제 시판중인 금은화와 인동 시료에 대하여 적용함으로서 그 실용성을 입증하였다.

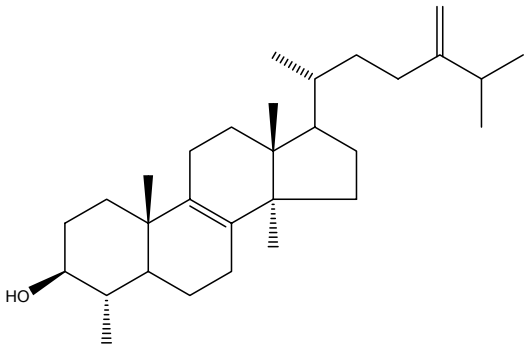
인동의 사용부위가 줄기로부터 줄기 및 잎으로 변경됨에 따라 인동의 줄기 및 잎, 잎 및 줄기에 대하여 각각 표준물질의 패턴을 비교분석하였다.

제4장 총괄연구개발과제의 연구결과 고찰 및 결론

인동덩굴 (*Lonicera japonica* Thunberg)의 줄기를 인동등 (忍冬藤), 꽃을 금은화 (金銀花)라고 하여 한방에서 사용되고 있는 약재로서, 2007년 12월 28일 개정 공고된 대한민국약전 9개정판에서는 인동덩굴의 꽃봉오리 또는 막 피기 시작한 꽃을 금은화 (Lonicera Flower, Lonicerae Flos, 金銀花), 인동덩굴의 잎 및 덩굴성 줄기를 인동 (Lonicera Leaf and Stem, Lonicerae Folium et Caulis, 忍冬)으로 규정되어 수재되어 있다. 인동 및 금은화의 성분연구는 90년대 초반부터 연구되기 시작하여 현재 많은 성분들이 분리되어 있다. 이들 성분들을 화합물 군으로 대별하면 flavonoid, iridoid, saponin 및 기타 phenol성 화합물들로 대별할 수 있다. 또한 지금까지의 이들 성분들의 활성연구 결과를 보면 대부분 항염증활성에 관한 연구가 주류를 이루고 있다. 인동의 hexane분획은 long-chain alcohol같은 비극성물질이 함유되어 있다. 이들을 분리하여 GC/MS를 실시하여 *n*-eicosanol (C_{20}), *n*-docosanol (C_{22}) 및 *n*-tetracosanol (C_{24}) 임을 알았다. 화합물 **3**의 ^{1}H-NMR spectrum을 보면 고



(24*S*)-Cycloart-25-en-3β,24-diol (**3**)



Obtusifoliol (**6**)

자장영역에서 특징적으로 나타나는 2개의 doublet signal들이 나타나고 있는 것으로 보아 cycloartane계열의 triterpene임을 알았다. 이외에도 5개의 singlet CH_3 signal과 하나의 secondary CH_3 signal이 나타나며, tertiary CH_3 signal 중 저자장 (δ 1.72)에서 나타나는 CH_3 signal 및 2개의 exomethylene signal들이 각각 δ 4.84, 4.92에서 broad singlet signal로 나타나고 있는 것으로 보아 isopropenyl group의 존재를 추정할 수 있었다. 또한 δ 3.28에서 전형적인 H-3 (dd, J = 4.5, 11.1 Hz)와 또 하나의 allylic oxymethine proton이 δ 4.02 (t, J = 6.6 Hz)에서 나타나고 있음을 알았다. 이상의 결과는 ^{13}C-NMR에서도 입증할 수 있었다. Side chain에 존재하는 allylic oxymethine carbon 및 주변 탄소의 ^{13}C-NMR data가 24*S* configuration을 갖는 model compound와 일치하므로 화합물 **3**은 (24*S*)-cycloart-25-en-3β,24-diol로 결정하였다.[51-53] 인동의 CH_2Cl_2 분획에서 얻은 hexacosanol (**5**) 외에 화합물 **4**는 2중결합이 존재하는 long-chain 지방산이 결합되어 있는 acylglycerol로 추정되었다. 특히 glycerol 부분의 ^{13}C-NMR chemical shift값이 δ 62.1 (2C)과 68.9에서 나타나고 있는 것으로 보아 triacylglycerol이며, 지방산은 linoleic acid가 ester결합하고 있는 trilinolein 임을 추정하였다. FABMS에서도 특징적인 fragment ion들이 *m/z* 600, 263 등에서 나타나고 있는 것으로 이를 확인하였다.[54] 화합물 **6**, **7** 및 **8**은 ergostadiene으로 각각 1 ppm 부근

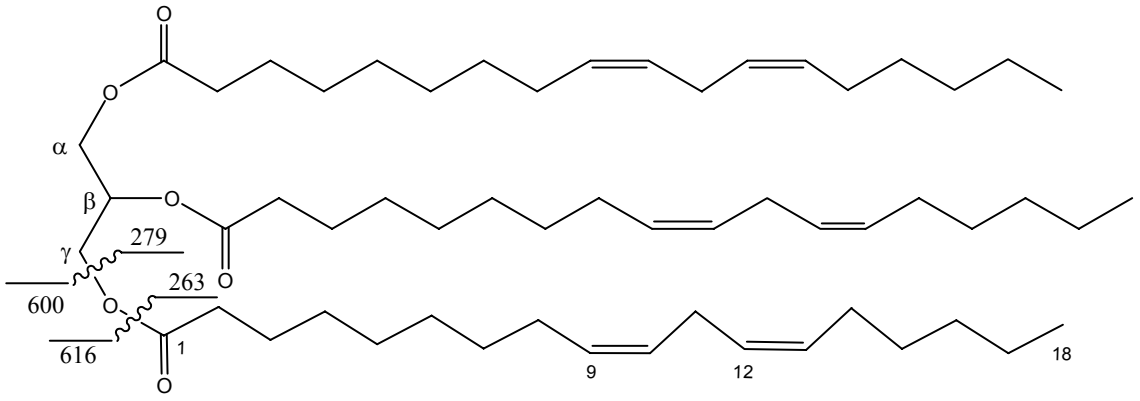
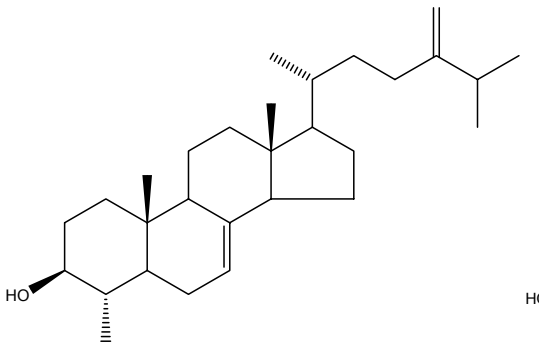
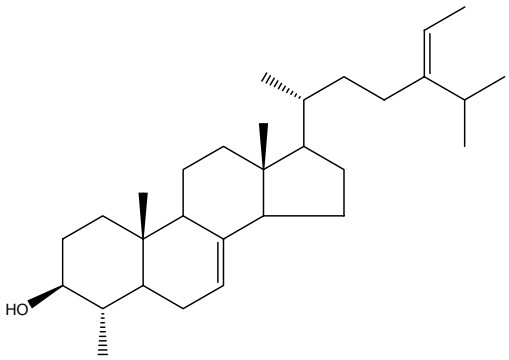


Fig. 1. Key FABMS fragmentation of trilinolein **(4)**

에서 나타나고 있는 secondary CH_3이 존재하고 있는 것으로 보아 4α-CH_3 ergostane계인 obtusifoliol (**6**), gramisterol (**7**) 및 citrostadienol (**8**)[55] 로 결정하였다. 화합물 **9**는 β-sitosterol이고 **10**은 dioctylphthalate (DOP),[56] **11**은 지방산 혼합물로 methylation시켜 GC/MS한 결과 lignoceric acid가 주성분임을 알았다. 화합물 **12**는 ABX type의 splitting pattern이 나타나며 하나의 OCH_3 signal과 *trans* olefinic proton이 각각 δ 7.58 (d, J = 15.6 Hz)과 6.65 (dd, J = 7.8, 15.6 Hz)에서 나타나며, aldehyde H가 δ 9.57 (d, J = 7.8 Hz)에서 나타나는 것으로 보아 coniferaldehyde

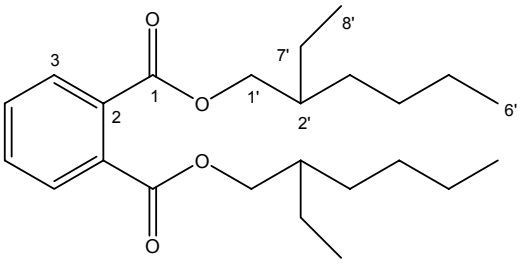


Gramisterol **(7)**

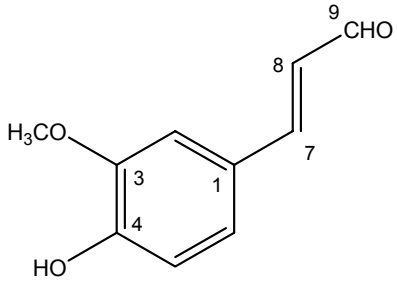


Citrostadienol **(8)**

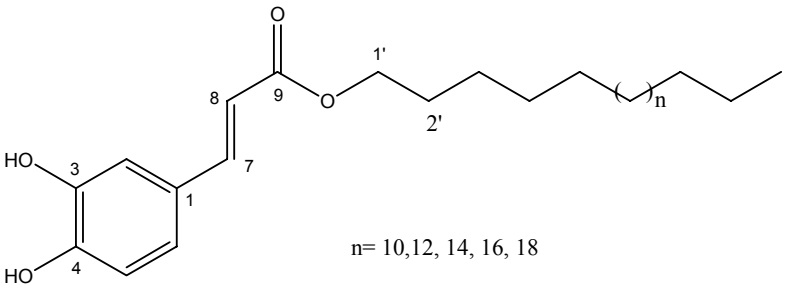
(**12**)로 확인하였다.[57,58] 화합물 **13**은 전형적인 phenylpropanoid에 해당하는 signal들 외에 long-chain alcohol로 추정되는 특징적인 signal들이 나타나고 있는 것으로 보아 caffeic acid의 지방산 ester임을 추정하였다. 이를 alkali분해시켜 얻은 알콜을 GC/MS로 확인한 결과 짝수인 C_{18}부터 C_{26}까지의 *n*-alkanol들을 확인하였으며 이중 C_{22}인 *n*-docosanol이 주성분으로 확인됨에 따라 **13**은 docosanoyl caffeate로 결정하였다.[59,60] 화합물 **14**, **15**, **17**, **18** 및 **21**은 모두 triterpene 계열의 특징적인 spectral data들을 나타내고 있으며 화합물 **15**는 ursolic acid, **18**은 hederagenin임을 바로 확인하였다. 화합물 **14**도 **15**와 매우 유사하나, H-18 이 δ 3.05에서 broad singlet로 나타나고 있고, EIMS에서도 ursolic acid (**15**)의 분자량인 456 amu보다 16 dalton이 더 많은 472 amu에서 나타나



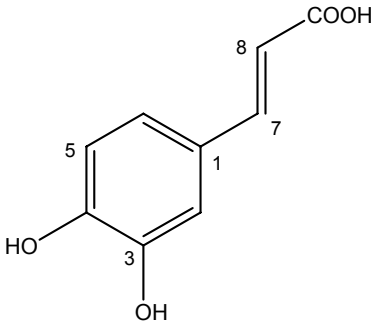
Bis(2-ethylhexyl)phthalate (DOP, **10**)



Coniferaldehyde (**12**)

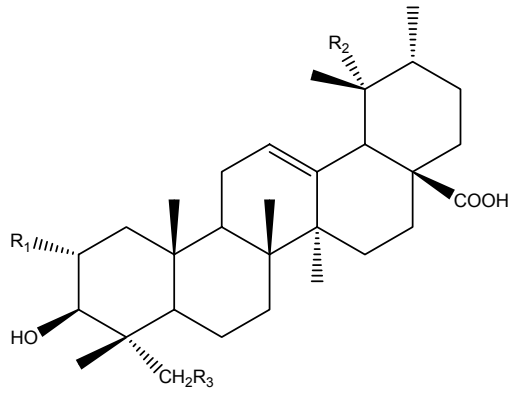


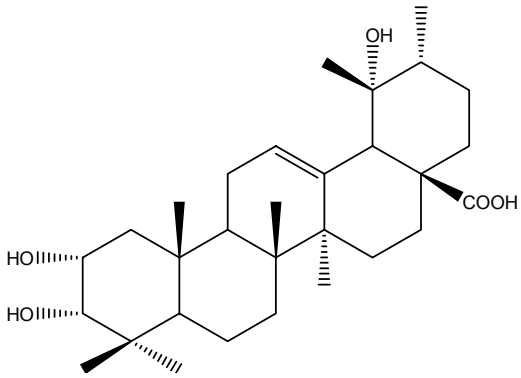
Caffeic acid docosanoyl ester (**13**)



Caffeic acid (**22**)

고 있는 것으로 보아 pomolic acid (**14**)로 결정할 수 있었다. 화합물 **17**도 pomolic acid와 같은 19α-hydroxyursolic acid계열의 화합물이며 분자량이 화합물 **14**보다 16 dalton이 더 크며 A/B ring쪽에 2개의 OH가 존재하는 것으로 이들의 oxygenated methine proton들이 각각 δ 3.75 (d, J = 2.4 Hz)와 4.29 (ddd, J = 2.7, 4.2, 11.6 Hz) 에서 나타나고 있는 것으로 보아 2α,3α-dihydroxy group이 존재함을 알 수 있고 이는 ^{13}C-NMR data에서 δ 66.1과 79.3에서 signal들이 나타나므로 화합물 **17**은 euscaphic acid로 결정하였다. 화합물 **21**도 **14**나 **17**과 같은 19α-hydroxyursane계열이며 2α, 3β,23-trihydroxy group이 존재함을 EIMS 및 NMR data로 확인할 수 있으므로 23-hydroxy tormentic acid로 확정하였다.[61] 화합물 **20**은 β-sitosterol glucoside (daucosterol)로 확인하였고, 화합물 **22**는 화합물 **13**과 ^{1}H-NMR에서 저자장 부문이 거의 유사하며, EIMS에서 분자이온 $[M]^{+}$이 *m/z* 180에서 강하게 나타나고 있는 것으로 보아 caffeic acid로 결정하였다. 화합물 **24**는 3개의 OH와 [δ_H 3.40; δ_C 75.1, δ_H 3.90; δ_C 76.1, δ_H 4.04; δ_C 71.8] 하나의 이중결합 [δ_H 5.65 (1H, dd, J = 5.0, 15.6 Hz; δ_C 136.5), δ_H 5.72 (1H, dd, J = 5.0, 15.6 Hz, δ_C 130.8] 이 존재함을 NMR data로 확인할 수 있었으며, 이의 HMBC spectrum을 보면 Fig. 2 에서와 같이 이중결합을 중심으로 한 부분구조[-CH_2-CH(OH)-CH=CH-CH(OH)-CH(OH)-CH_2-]를 확인할 수 있으며, 이중결합은 앞에서 언급한바와 같이 olefinic proton들의 J 값 (15.6 Hz)으로 *trans* (*E*)임을 알았다. 이와 같은 부분구조는 이의 methyl ester를 TMS로 trimethylsilylation시켜 얻은 유도체의 EIMS spectrum에서도 확인할 수 있었다. 즉 Fig. 3에서와 같이 TMSi group을 가진 두 탄소결합 사이에서 끊어져서 *m/z* 173



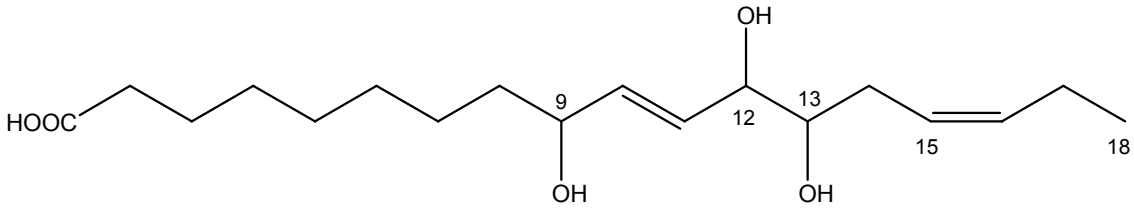


Pomolic acid (14) R_1=R_3= H R_2= OH

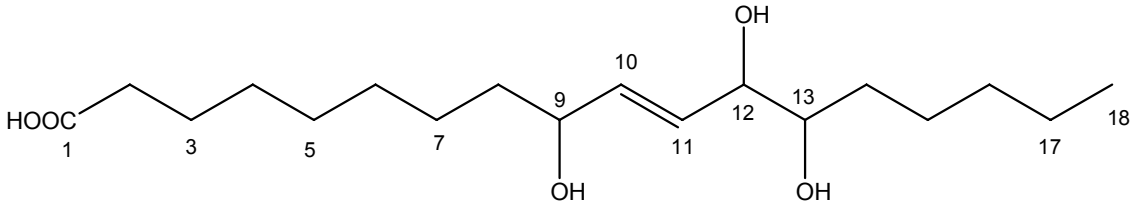
Ursolic acid (15) R_1=R_2=R_3= H

23-Hydroxytormentic acid (21) R_1=R_2=R_3= OH

Euscaphic acid (17)



9,12,13-Trihydroxyoctadeca-10(*E*),15(*Z*)-dienoic acid (23)



Pinellic acid (24)

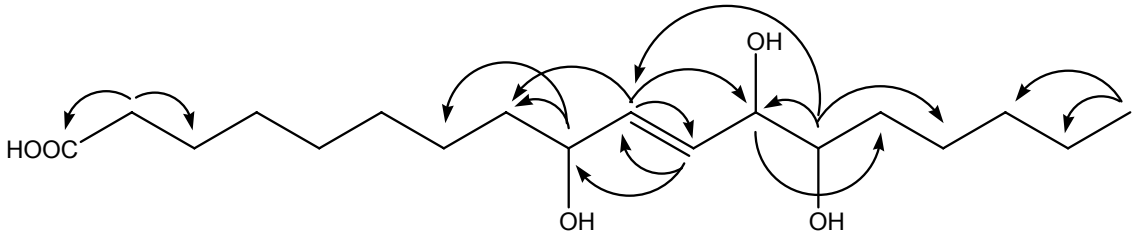


Fig. 2. Key HMBC correlations of pinellic acid (24)

과 387에서 fragment ion들이 나타나고 있으므로 C_{18} 지방산의 12,13-vicinal diTMSi이며 이중결합의 위치는 C_{10}이고, 또 하나의 OH는 *m/z* 259 이온이 나타나고 있는 것으로 보아 C_9에 위치하고 있음을 알았다.[62-64] 즉 화합물 **24**는 9,12,13-trihydroxy-10(*E*)-octadecenoic acid 임을 알았으며, oxygenated carbon의 stereochemistry를 결정하기 위하여 문헌조사 결과 반하 (*Pinellia ternata*)에서 분리한 pinellic acid와[65] 일치하므로 화합물 **24**는 pinellic acid [9(*S*),12(*S*),13(*S*)-trihydroxy-10(*E*)-octadecenoic acid]로 결정하였으며, 이 물질은 시호 (*Bupleurum falcatum*)로부터도 분리 보

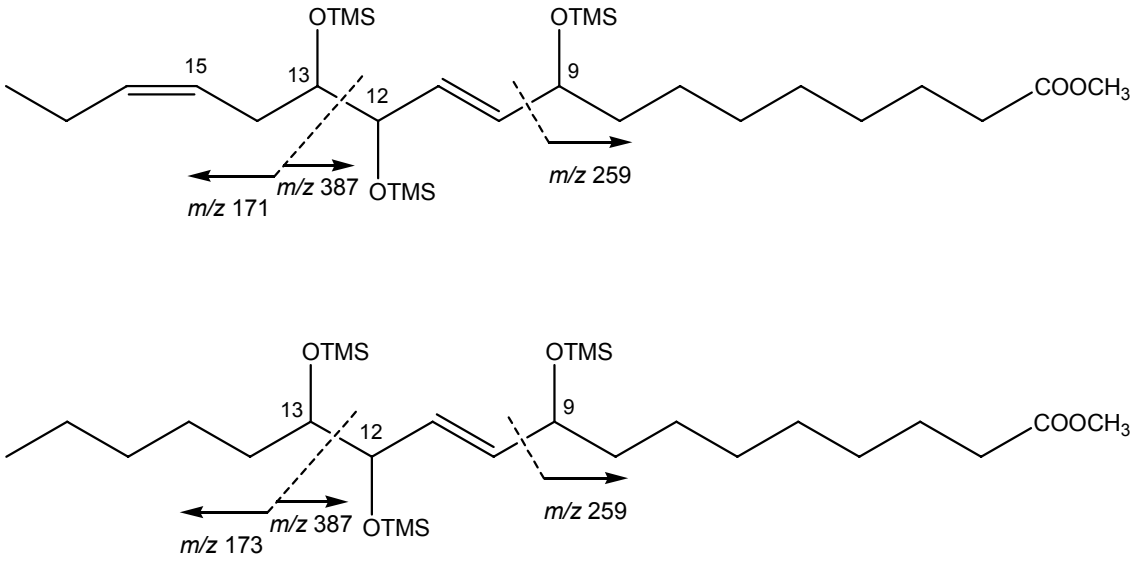
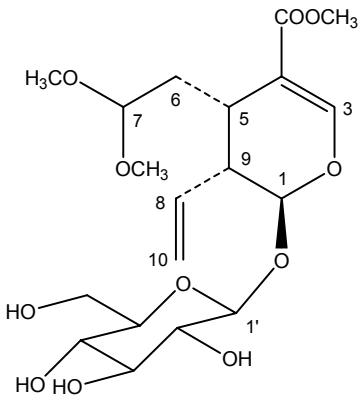


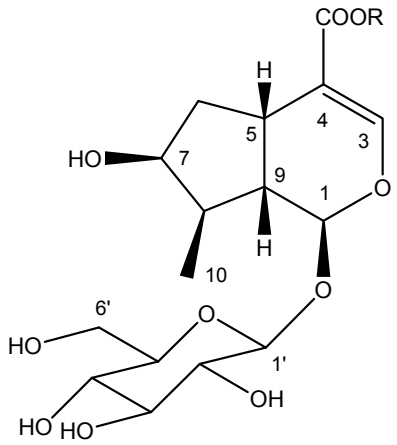
Fig. 3. Key EIMS fragmentation of methyl trimethylsilyl 9,12,13-trihydroxyoctadeca-10(*E*),15(*Z*)-dienoate (**23**, upper part) and methyl trimethylsilyl pinellate (**24**, lower part)

고된 바 있다.[66] 화합물 **23**도 **24**와 매우 유사한 spectrum을 제시하고 있다. 즉 FABMS에서 분자이온이 pinellic acid보다 2 amu 적은 *m/z* 328에서 나타나며, NMR spectrum에서 pinellic acid에 해당하는 signal들 이외에 또 하나의 이중결합 (*cis*)에 기인하는 signal들이 [δ_H 5.45 (2H, m); δ_C 126.4, 134.3] 나타나고 있는 것으로도 화합물 **23**은 9,12,13-trihydroxyoctadeca-10(*E*),X(*Z*)-diene 임을 추정할 수 있었다. 화합물 **24**와같이 **23**의 methyl trisilylate 유도체의 EIMS spectrum을 보면 pinellic acid (**24**)와같이 C_{12}-C_{13}에서 끊어져서 생성된 fragment ion들이 *m/z* 171 (100%)과 387에서 나타나는 것으로 이중결합은 ω-3 위치에 존재함을 추정할 수 있었다.[63] 또한, allylic C-17의 ^{13}C chemical shift값이 δ 21.6에서 나타나고 있는 것으로 보아 이중결합은 C-15에 위치하고 있음을 알았다.[63,67] 이상의 결과를 종합하여 화합물 **23**의 화학구조는 9,12,13-trihydroxyoctadeca-10(*E*),15(*Z*)-dienoic acid로 결정할 수 있었다. C-9, 12, 13 위치의 absolute configuration을 결정하기 위하여 문헌 조사 결과 9*S*,12*S*,13*S*-trihydroxyoctadeca-10(*E*),15(*Z*)-dienoic acid인 fulgidic acid[68]와 9*S*,12*R*,13*S*-trihydroxyoctadeca-10(*E*),15(*Z*)-dienoic acid인 malyngic acid[69]가 보고된 바 있으나 그 이상의 비교는 불가능하였다. 화합물 **32**는 인동의 성분중 주성분으로 잘 알려진

iridoid 성분인 loganin[70,72]으로 결정할 수 있었으며, 화합물 **33**은 loganin과 분광학적 데이터가 거의 일치하나 분자량이 loganin 보다 14 amu 적으며 NMR에서 $COOCH_3$ 대신[δ_H 3.68; δ_C 169.5, 51.5]에 COOH에 기인한 signal [δ_C 170.9]들이 나타나고 있는 것으로 보아 loganic acid[70] 로 결정

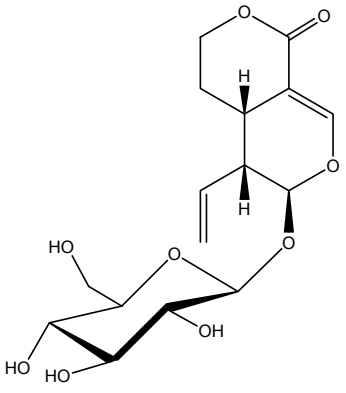


Loganin (**32**) R= CH_3
Loganic acid (**33**) R= H

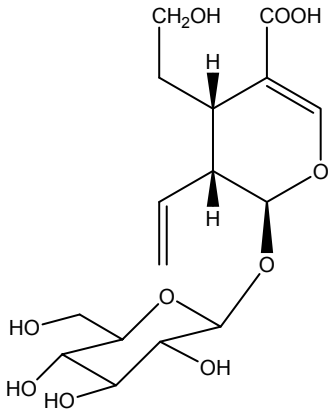


Secologanin dimethyl acetal (**19**)

하였다. 화합물 **19**, **28** 및 **34**는 분광학적 data들이 secologanin type의 특성들이 나타나고 있는 것으로 보아 이 계열의 iridoid 성분들임을 추정할 수 있었다. 화합물 **19**는 acetal에 기인하는 특징적인 signal들 [δ_H 4.48; δ_C 104.5] 및 OCH_3 signal들 [δ_H 3.28, 3.29; δ_C 52.6, 53.9]이 나타나고 있는 것으로 보아 secologanin의 분해산물로 알려지고 있는 secologanin dimethyl acetal[71]로 결정하였다. 화합물 **28**은 lactone ring에 기인하는 흡수band가 1691 cm^{-1} 및 δ_C 168.5 ppm에서 나타나고 있는 것으로 보아 sweroside[72] 임을 쉽게 결정할 수 있었다. 화합물 **34**는 분자식이 $C_{16}H_{24}O_{10}$ 으로 secologanin과 유사하나 일급알콜에 기인하는 signal이 δ_C 61.0 [δ_H 3.55]에서 나타나고 있고, 유리산

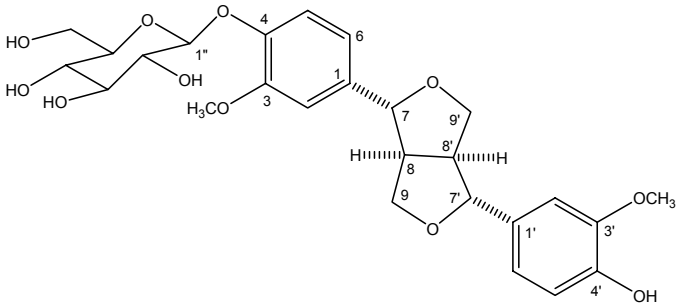


Sweroside (**28**)

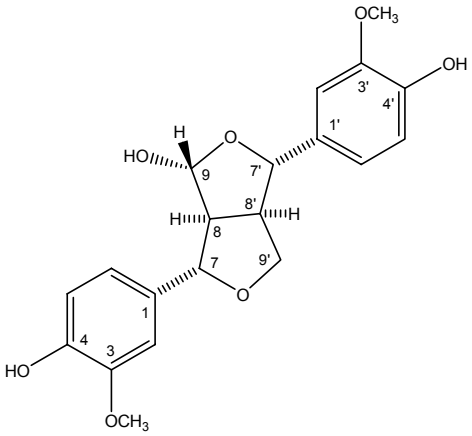


Demethylsecologanol (**34**)

(COOH)에 기인하는 signal은 보이지 않으나 다른 carbon chemical shift값이 demethysecologanol[73] 의 그것과 일치하는 것으로 보아 demethylsecologanol으로 결정하였다. 화합물 **27**은 phenol성 배당체로 당은 glucose이고 aglycon은 전형적인 furofuran lignan인 pinoresinol[61,74]임을 알았다. 따라서

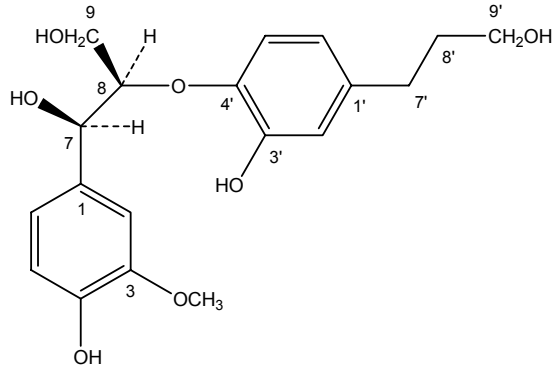


Pinoresinol glucoside (**27**)



9α-Hydroxypinoresinol (**16**)

화합물 **27**은 pinoresinol glucoside[75]로 결정하였다. 화합물 **16**은 2개의 vanillyl group이 존재하며, δ 5.47[δ_C 103.5]에서 hemiacetal의 특징적인 signal이 나타나고 EIMS에서 $[M - H_2O]^+$이 *m/z* 356에서 나타나며 이외에도 전형적인 furofuran lignan의 특징적인 fragment ion들이 *m/z* 163, 152, 151 등에서 강하게 나타나고 있는 것으로 보아 pinoresinol의 C-9에 OH기가 결합되어 있는 것으로 추정할 수 있었다. 따라서 문헌의 9α-pinoresinol[76,77]과 직접적으로 비교한바 일치하므로 화합물 **16**은 9α-pinoresinol로 결정하였다. 화합물 **25**는 2개의 phenyl propanol이 ether결합하고 있는 neolignan계 화합물로 추정되었다. 즉 전형적인 guaiacylglycerol과 3,4-dihydroxyhydro cinnamyl alcohol이 8-*O*-4′ ether형태로 결합하고 있음을 Fig. 4의 HMBC 와 Fig. 5의 NOESY spectrum을 해석하여 증명할 수 있었으며, δ 4.89에서 H-7의 *J* 값이 6.3 Hz의 doublet로 나타나고



7,8-*threo*-4,7,9,3′,9′-Pentahydroxy-3-methoxy-8-*O*-4′-neolignan (**25**)

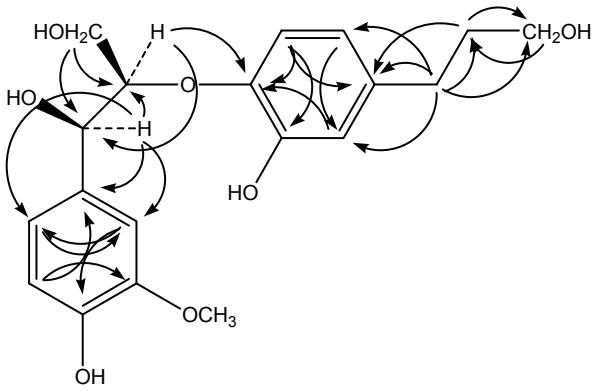


Fig. 4. Key HMBC correlations of **25**

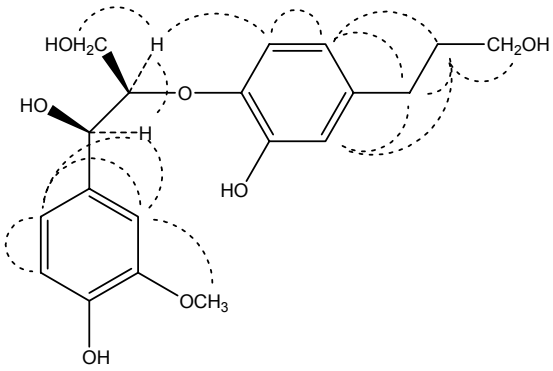
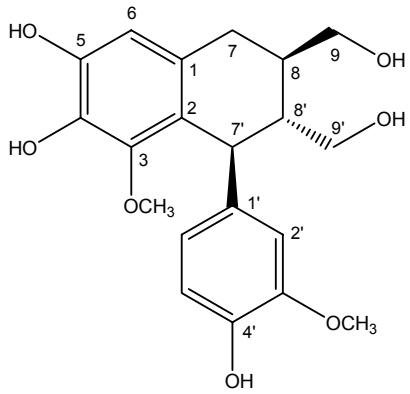


Fig. 5. Key NOEs observed for **25**



(+)-5-Demethyl-3-methoxy-isolariciresinol (**26**)

있으므로 *threo* type임을 알았다. 따라서 화합물 **25**는 *threo*-4,7,9,3′,9′-pentahydroxy-3-methoxy-8-*O*-4′-neolignan임을 알았으며, 절대배치는 이 화합물의 CD spectrum이 234 (-10,692), 283 (-1,050) nm 에서 negative Cotton effect를 나타내므로 7*R*,8*R* 로 결정하였다.[78] 이상의 결과를 종합하여 화합물 **25**는 (7*R*,8*R*)-*threo*-4,7,9,3′,9′-pentahydroxy-3-methoxy-8-*O*-4′-neolignan으로 결정하였다. 이 물질은 동속식물인 *L. gracilipes* var. *glandulosa*의 잎에서 배당체 형태로 분리 보고된 바 있다.[79] 화합물 **26**의 분자식은 고분해능 EIMS를 측정하여 $C_{20}H_{24}O_7$ 임을 알았으며 이는 ^{13}C-NMR에서 18개의 carbon signal과 2개의 OCH_3 (δ_H 3.36, 3.74)에 기인하는 signal들이 나타나며, 이중 12개의 탄소는 2개의 aromatic ring에 기인하고, 2개의 hydroxymethyl [δ_H 3.42, 3.54, δ_C 67.0; δ_H 3.46, δ_C 64.5] 외에 하나의 CH_2, 3개의 CH에 기인하는 signal들이 존재하고 있는 것으로 보아 aryltetralin type lignan으로 추정되었으며, 이 계열의 화합물 중에서 잘 알려진 isolarciresinol 및 lyoniresinol[80]과 매우 유사함을 확인하였다. 또한 ^{1}H-NMR에서 1,2,3,4,5- 및 1,3,4-substituted aromatic ring이 존재하며 이는 Scheme 1에 제시한 바와 같이 EIMS에서 이 계열의 특징적인 fragment ion이 외에 2개의 benzylic ion들이 각각 *m/z* 153

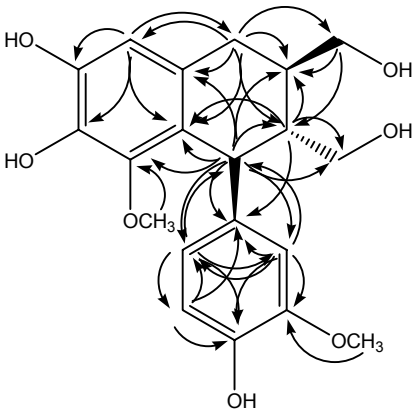


Fig. 6. Key HMBC correlations of **26**

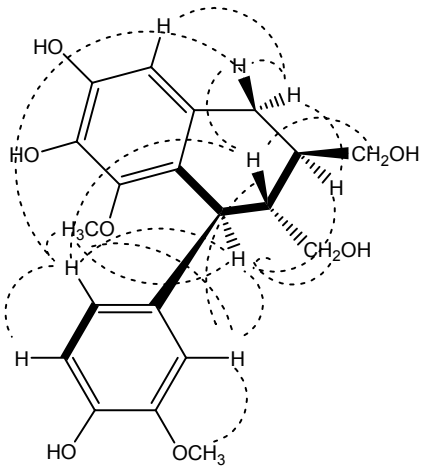
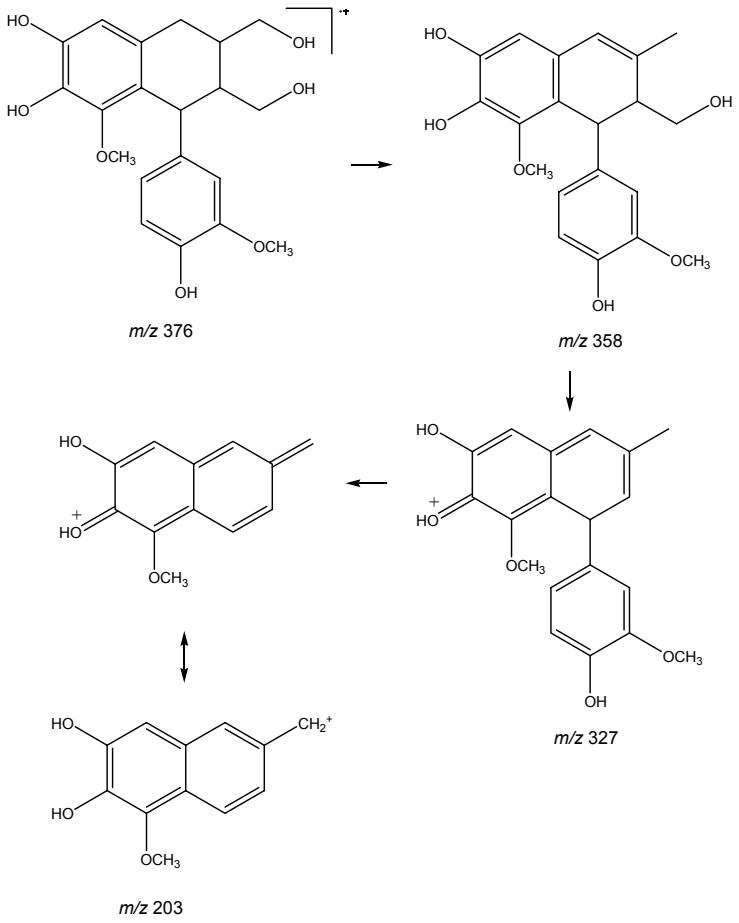
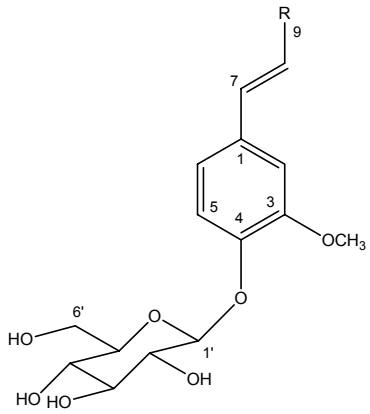


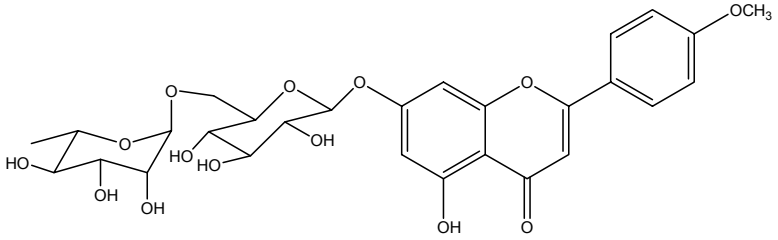
Fig. 7. Key NOEs observed for **26**



Scheme 1. Key fragmentation of **26**

과 137에서 나타나고 있는 것으로도 확인할 수 있었다.[81] Fig. 6에 나타낸 바와 같이 이 화합물의 HMBC spectrum을 통하여 3-methoxy-4,5-dihydroxy 및 3-methoxy-4-hydroxy type의 aryl group을 가지고 있음을 확인할 수 있었다. 또한 서로 인접하는 3개의 methine proton (H-7′과 H-8′, H-8′과 H-8) 사이의 상대적인 배치는 이들 사이의 J 값 (5.2 Hz) 및 $W_{1/2}$ 값 (26 Hz, 15 Hz) 을 통하여 *trans*,*trans*-configuration 임을 확인할 수 있었으며,[82,83] 이는 Fig. 7에 나타낸 바와 같이 NOESY spectrum에 의하여서도 확인할 수 있었다. 화합물 **26**의 절대배치는 CD spectrum을 통하여 결정할 수 있었다. 즉 negative (-) B-absorption이 나타나고 있으므로 C-7′는 *S*임을 알았다.[106,107] 이상의 결과를 종합하여 화합물 **26**은 (+)-5-demethyl-3-methoxy-isolariciresinol 로 결정하였으며 지금까지 보고된 바 없는 신물질임을 알았다. 화합물 **29**와 **30**은 coniferaldehyde (**12**) 나 caffeic acid (**22**)와 매우 유사한 분광학적 특성을 나타내고 있으며 glucose가 결합하고 있는 배당체들이다. 화합물 **29**는 aldehyde기가 존재함을 ^{1}H-NMR에서 특징적으로 δ 9.61 (d, J = 7.8 Hz)에서 나타나는 signal로 확인할 수 있으며, δ 3.90에서 나타나는 하나의 OCH_3 signal이 존재하는 것으로 보아 coniferylaldehyde 4-*O*-glucoside[84]임을 알았으며, **30**은 **29**와 매우 유사하나 CHO 대신에 CH_2OH [δ_H 4.20; δ_C 63.8]가 존재함을 확인할 수 있어 식물에서 쉽게 확인할 수 있는 coniferin[85,86]으로 결정하였다. 화합물 **30**은 전형적인 flavonoid의 spectral data들을 제시하고 있고 당 (glucose, rhamnose)이 존재하는 것을 확인할 수 있으므로 flavonoid glycoside로 추정하였다.





Coniferyl aldehyde 4-*O*-glucoside (**29**)

Linarin (**30**)

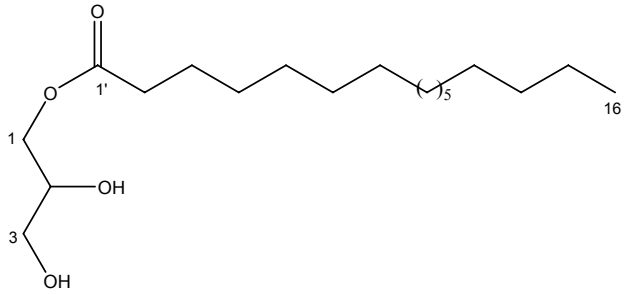
R= CHO

Coniferin (**31**) R= CH_2OH

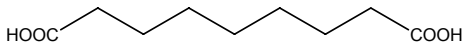
NMR data에서 flavone 골격을 나타내고 하나의 OCH_3 signal이 C-4′에 존재하는 것으로 보아 aglycon은 apigenin 4′-*O*-methyl ether로 결정하였다. 말단당은 rhamnose이고 glucose의 C-6가 66.3 ppm에서 나타나 저자장이동하고 있으므로 당은 rutinose이며, NaOAc를 가하여 UV를 측정하였을 때 나타나는 band II가 268 nm에서 나타나 MeOH에서 얻은 값과 변화가 없으므로 rutinose는 apigenin 4′-*O*-methyl ether의 C-7 위치에 결합되어 있음을 밝혔다. 따라서 화합물 **30**은 linarin[87] 으로 결정하였다. 이상의 결과를 종합하여 인동으로부터 얻은 34종의 화합물들은 1종의 flavonoid, 5종의 phenylpropanoid, 4종의 lignan, 6종의 triterpenoid, 5종의 steroid, 4종의 iridoid, 3종의 지방산 계열 및 기타 6종으로 분류할 수 있으며, 이중 신물질인 (+)-5-demethyl-3-methoxy-isolariciresinol을 포함하여 *n*-eicosanol (C_{20}), *n*-docosanol (C_{22}), *n*-tetracosanol (C_{24}), *n*-hexacosanol (C_{26}), pinellic acid, 9,12,13-trihydroxyoctadeca-10(*E*),15(*Z*)-dienoic acid, (24*S*)-cycloart-25-en-3β,24-diol, pomolic acid, ursolic acid, euscaphic acid, hederagenin, 23-hydroxytormentic acid, obtusifoliol, gramisterol, citrostadienol, β-sitosterol, daucosterol, coniferin, coniferaldehyde, caffeic acid docosanoyl ester, coniferyl aldehyde 4-*O*-glucoside, loganic acid, demethylsecologanol, 9α-hydroxypinoresinol, pinoresinol 4-*O*-glucoside, (7*R*,8*R*)-*threo*-4,7,9,3′,9′-pentahydroxy-3-methoxy-8-*O*-4′-neolignan, linarin, trilinolein 및 bis(2-ethylhexyl)phthalate 등은 인동으로부터 처음으로 분리된 화합물들임을 알았다.

금은화의 hexane 및 CH_2Cl_2 분획은 TLC pattern이 동일하므로 CH_2Cl_2 분획을 chromatography를 반복 실시하여 화합물 **1**은 *n*-alkane 인 *n*-nonacosane으로, 화합물 **2**는 인동에서 분리된 *n*-hexacosanol임을 밝혔다. 화합물 **3**은 인동으로부터 분리한 trilinolein과 유사한 acylglycerol로 NMR에 의해 monoacyl glycerol로 확인하였으며, palmitic acid가 ester결합하고 있는 monopalmitin[61,88]으로 확인하였다. EtOAc분획으로부터 β-sitosterol (**4**) 및 이의 glucoside인 daucosterol (**5**)을 분리 확인하였으며, 화합물 **6**은 식물에서 흔히 분리되는 flavone성분인 luteolin[1] 임을 확인하였으며, 화합물 **7**은 δ 6.17 과 7.77에서 각각 doublet (*J* = 9.4 Hz)로 나타나는 전형적인 coumarin의 H-3 및 4의 signal들이 나타나며, 2개의 aromatic proton들이 각각 singlet로 나타나고 있으므로 esculetin[89]으로 결정할 수 있었다. 화합물 **8**은 simple phenolic acid인 protocatechuic acid (**8**)[90] 임을 알았으며, 화합물 **9**는 ^{13}C-NMR에서

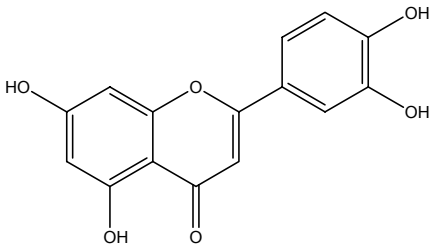
δ 26.0, 30.1, 34.9 및 177.7에서 signal들이 나타나고 있으나, EIMS에서는 *m/z* 171 $[M - OH]^+$이 나타나고 있는 것으로 보아 탄소 9개로 구성된 diacid로 추정하였으며 문헌조사 결과 azelaic acid (**9**)[91] 로 결정하였다.



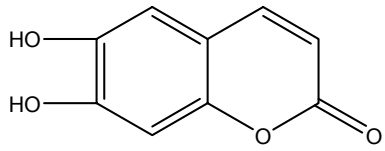
Monopalmitin (**3**)



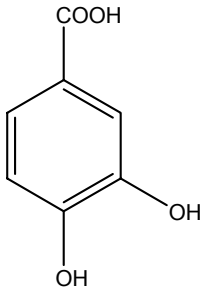
Azelaic acid (**9**)



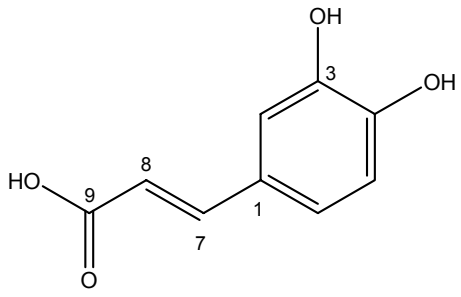
Luteolin (**6**)



Esculetin (**7**)



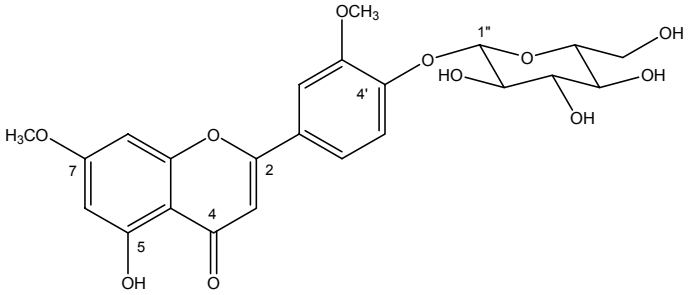
Protocatechuic acid (**8**)



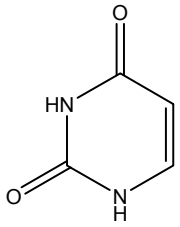
Caffeic acid (**10**)

화합물 **10**은 caffeic acid로 결정하였다. 화합물 **11**은 flavonoid정색반응에서 양성이며 269 (4.30)와 335 (4.30) nm에서 각각 band II와 I이 나타나는 것으로 보아 flavone glycoside로 추정되었다. NaOAc를 가하여 측정하였을 때도 MeOH용액과 같은 spectrum을 나타내고 있으므로 C-7에는 OH

는 없고, 5-OH가 존재하는 것으로 확인되었다. ^{1}H-NMR을 보면 δ 3.87과 3.90에서 2개의 OCH_3 과 C-5, 7, 3′ 및 4′가 치환되어 있음을 확인할 수 있었다. Anomeric H이 δ 5.07에서 J = 6.9 Hz의 doublet 로 나타나고 있음으로 glucose는 β 결합하고 있음을 알았다. FABMS에서 *m/z* 499와 477에서 각각 $[M + Na]^+$와 $[M + H]^+$이 나타나고, EIMS에서 aglycon에 해당하는 이온이 *m/z* 314에서 base peak로 나타나고 있으며 rDA분해에 의한 $[A_1 + H]^+$과 $[B_2]^+$, $[B_1]^+$ 등의 fragment ion들이 각각 *m/z* 167, 151 및 148에서 나타나고 있으므로 A, B ring에 각각 하나의 OCH_3 group이 존재함을 알았다. ^{13}C-NMR data를 해석하여 이 화합물 **11**은 5,4′-dihydroxy-7,3′-dimethoxyflavone 4′-glucoside 인 flavoyadorinin-B[92,93]임을 확인하였다. 화합물 **19**, **20**, **23** 및 **25**도 flavonoid 배당체

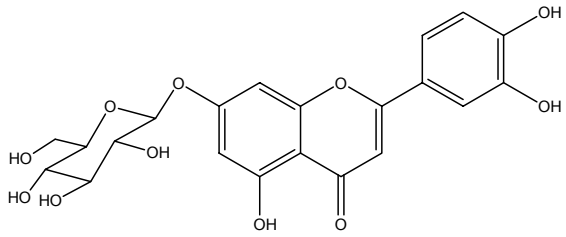


Flavoyadorinin-B (**11**)

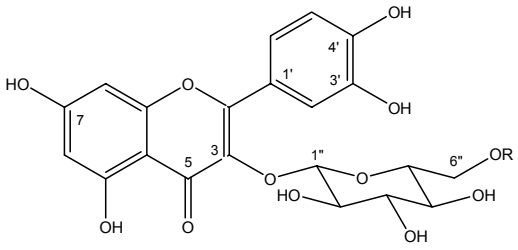


Uracil (**18**)

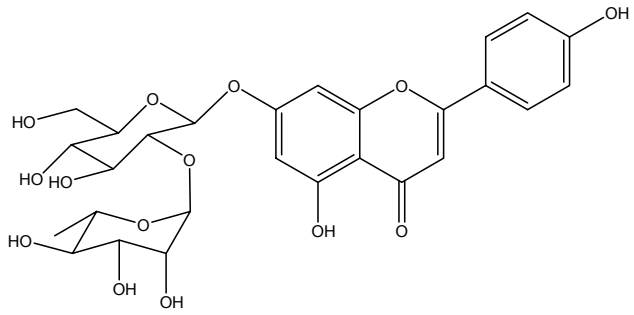
들임을 알았다. 화합물 **19**는 254, 349 nm에서 각각 band II 및 I이 나타나므로 flavone 골격임을 추정하였으며, shift reagent에 의한 흡수밴드들의 변화를 검토하여 C-5, 3′, 4′ 위치에 유리 OH가 존재함을 알았다. FABMS에서 *m/z* 449에서 $[M + H]^+$와 glucose가 떨어져서 생성된 $[(M + H) - 162]^+$이 *m/z* 287에서 나타나고 있다. 따라서 이 화합물은 luteolin 7-*O*-glucoside[1] 임을 추정하였으며, NMR data로도 이를 확인하였다. 화합물 **25**도 268, 338 nm에서 각각 band II 및 I이 나타나므로 flavone 골격임을 추정하였으며, shift reagent에 의한 흡수밴드들의 변화를 검토하여 C-5, 4′ 위치에 유리 OH가 존재함을 알았다. FABMS에서 *m/z* 601와 579에서 각각 $[M + Na]^+$ 와 $[M + H]^+$이 나타나고, *m/z* 271에서 rhamnose 및 glucose가 떨어져서 생성된 $[(M + H) - 146 - 162]^+$이 나타나고 있다. ^{13}C-NMR spectrum을 보면 말단당에 기인하는 rhamnose signal 들이 각각 δ 101.0 (C-1), 71.4 (C-2), 72.2 (C-3), 74.0 (C-4), 70.0 (C-5), 18.3 (C-6)에서 나타나며, glucose에 해당하는 signal들이 δ 99.8 (C-1), 79.1 (C-2), 78.3 (C-3), 72.2 (C-4), 79.1 (C-5), 62.4 (C-6) 등에서 나타나고 있다. Glucose의 anomeric carbon signal이 δ 99.8에서 나타나 고자장 이동하였으며, glucose의 C-2 signal이 δ 79.1에서 나타나 저자장 이동하였으므로 말단당인 rhamnose가 glucose의 C-2 OH에 결합되어 있는 neohesperidose임을 알았으며 이 neohesperidose가 apigenin의 C-7 OH에 결합되어 있음을 알았으므로 이 화합물은 apigenin 7-neohesperidoside 즉 rhoifolin[1] 으로 결정하였다. 화합물 **20**과 **23**은 UV data 및 shift reagent에 의한 흡수밴드들의 변화를 검토하여 aglycon이 quercetin이고 이의 C-3 OH에 glucose + rhamnose 및 glucose가 결합되어 있는 것으로 추정되었다. 화합물 **20**은 식물에서 흔히 그 존재가 확인되는 rutin이며, 화합물 **23**은 quercetin 3-*O*-glucoside 즉 isoquercitrin[1] 임을 알았다.



Luteolin 7-*O*-glucoside **(19)**

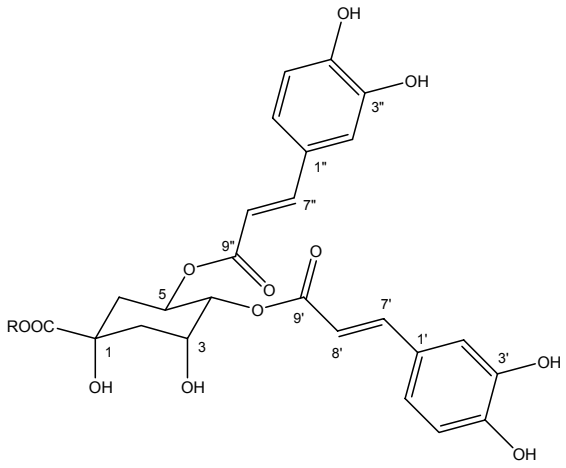


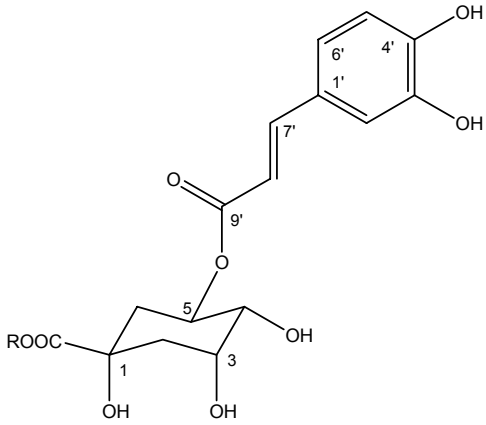
Rutin **(20)** R= Rhamnose
Isoquercitrin **(23)** R= H



Rhoifolin **(25)**

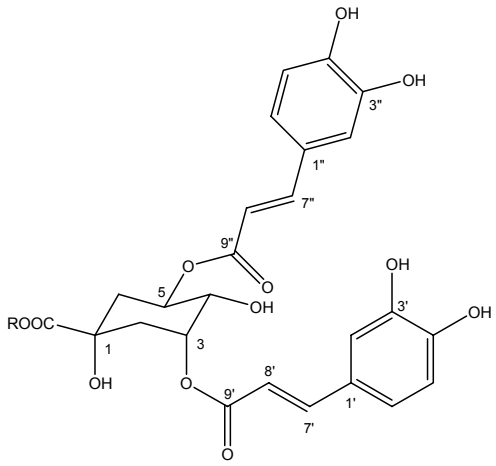
화합물 **12**, **14**, **21**, **22**, **24** 및 **29** 등 6종의 화합물들은 chlorogenic acid 및 이의 dicaffeoyl ester 들임을 추정할 수 있었으며, 특히 화합물 **14**, **21** 및 **22** 등은 대략 δ_H 3.70 및 δ_C 53.0에서 나타나고 있는 methyl ester signal의 확인으로 쉽게 **12**, **24** 및 **29**의 methyl ester임을 알았다. 특히 금은화 성분중 주 성분으로 알려진 chlorogenic acid (**29**)[94,95] 및 이의 methyl ester (**22**)[96]는 쉽게 확인이 되었으며,



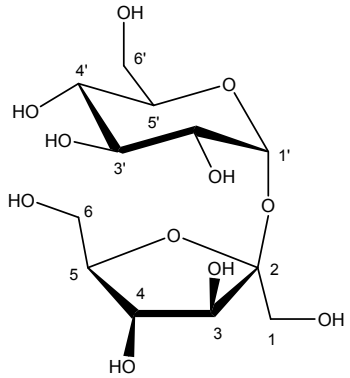


4,5-Dicaffeoylquinic acid **(12)** R= H
4,5-Dicaffeoylquinic acid methyl ester **(14)** R= CH_3

Methyl chlorogenate **(22)** R= CH_3
Chlorogenic acid **(29)** R= H

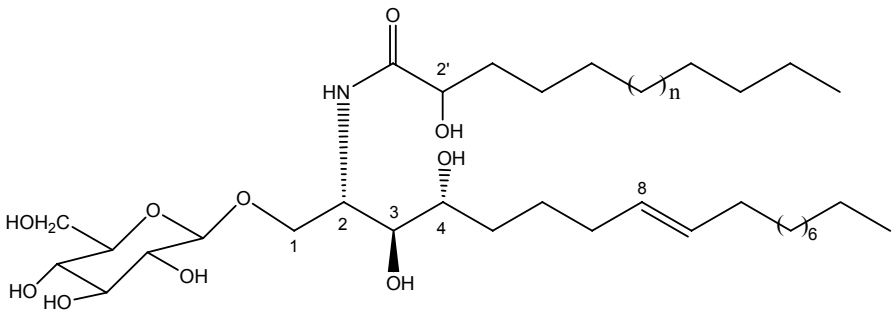


3,5-Dicaffeoylquinic acid
methyl ester **(21)** R= CH_3
3,5-Dicaffeoylquinic acid **(24)** R= H



Sucrose **(27)**

dicaffeoyl ester들은 결합위치에 있는 proton 및 carbon chemical shift 값 및 coupling constant (*J*) 값으로 으로 결합위치를 결정할 수 있었다. 그 결과 4,5-dicaffeoylquinic acid **(12)**[97] 및 이의 methyl ester (**14**)[50], 3,5-dicaffeoylquinic acid **(24)**[97] 및 이의 methyl ester (**21**)를 각각 확인할 수 있었다. 화합물 **13**은 ^{1}H-NMR spectrum상의 고자장에서 나타나고 있는 long-chain에 기인하는 signal들과 중간영역에서 나타나고 있는 당 및 oxygenated methine signal, 저자장 (δ_H 8.60)에서 doublet (J = 9.2 Hz)로 특징적으로 나타나는 amide proton등이 나타나는 것으로 보아 phytosphingosine type의 cerebroside 임을 알 수 있었으며, FABMS data와 가수분해로 얻어지는 glucose 및 지방산들이 확인되므로 long-chain base의 구조는 (2*S*,3*S*,4*R*,8*E*)-2-amino]-8-octadecene-1,3,4-triol이며 이의 C-1에 glucose, 2-hydroxy fatty acid들인 docosanoic acid (C_{22}), tricosanoic (C_{23}), tetracosanoic (C_{24}), pentacosanoic (C_{26}) 등이 amino group에 amide 형태로 결합되어 있음을 알았다. 따라서 화합물 **13**은 1-*O*-β-D-glucopyranosyl-(2*S*,3*S*,4*R*,8*E*)-2-[(2*R*)-2-hydroxy(tricosanoyl, tetracosanoyl, pentacosanoyl, docosanoyl)amino]-8-octadecene-1,3,4-triol[98] 로 결정하였다. Kumar 등[13]은

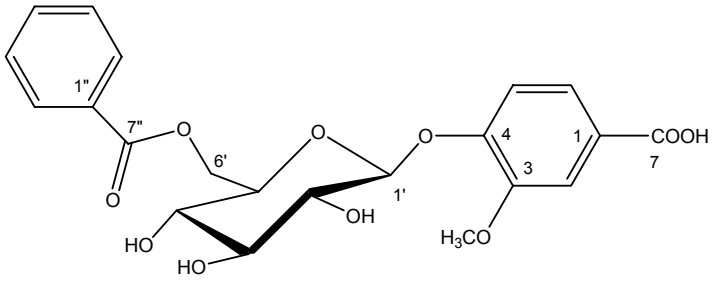


n= 13 - 16

Cerebroside **(13)**

금은화로부터 4종의 ceramide와 2종의 cerebroside를 분리하여 보고한 바 있다. 이들 화합물들의 long-chain base는 모두 1,3,5,6-tetrahydroxy-2-amino-9(*E*)-hexacosene (octacosene, tetracosene) 들로 화합물 **13**과는 상이한 화합물들임을 알았다.

화합물 **15**의 분자식은 $C_{21}H_{22}O_{10}$ 임을 HR-FABMS를 측정하여 결정하였으며, IR spectrum을 보면 3333 (OH), 1706, 1281 (ester C=O) 및 1070 (glycosidic C-O) cm^{-1}에 흡수band들이 나타나므로 phenolic 배당체임을 추정할 수 있어 가수분해하여 glucose를 확인하였다. ^{1}H-NMR을 보면 하나의 OCH_3 에 기인하는 signal이 δ 3.87에서 나타나며 δ 7.42 (1H, dd, *J* = 1.8, 8.4 Hz, H-6), 7.57 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, H-2) 및 7.13 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-5)에서 ABX type의 aromatic proton들이 나타나고, benzoyl group에 해당하는 signal들이 δ 7.47 (2H, tt, *J* = 1.5, 7.5 Hz, H-3, 5), 7.61 (1H, tt, *J* = 1.8, 7.2 Hz, H-4) 및 7.99 (2H, tt, *J* = 1.5, 7.2 Hz, H-2, 6)에서 나타나며 glucose의 anomeric H가 δ 5.06에서 *J* = 7.8 Hz의 doublet로 나타나고 있으므로 glucose는 β결합하고 있음을 알았다. 또한 glucose의 H-6가 δ 4.39 (1H, dd, *J* = 7.5, 11.7 Hz)와 4.71 (1H, dd, *J* = 2.1, 11.7 Hz)에서 나타나 저자장 이동하였으므로 이 위치에 acyl group이 있음을 알았다. 두 개의



Vanillic acid 4-*O*-β-D-(6-*O*-benzoylglucopyranoside) **(15)**

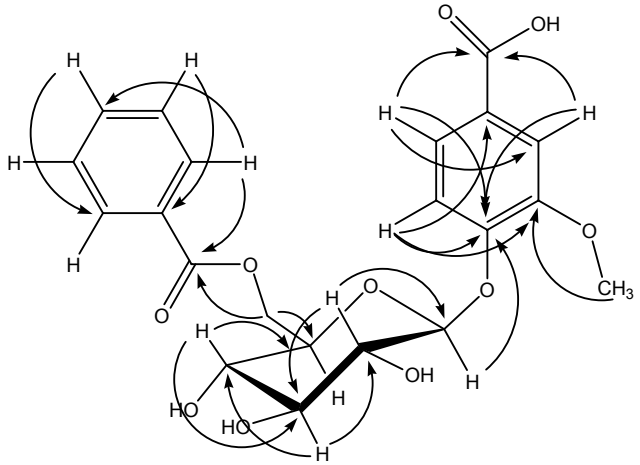
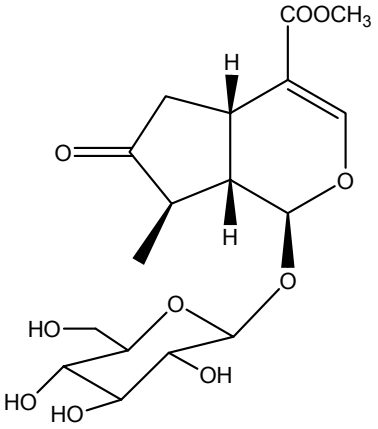


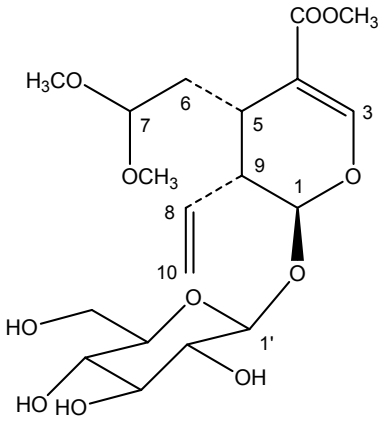
Fig. 8. Key HMBC correlations of vanillic acid 4-*O*-β-D-(6-*O*-benzoylglucopyranoside) **(15)**

acyl group은 benzoic acid와 vanillic acid임을 확인하였다. 이와 같은 사실은 ^{13}C-NMR 및 FABMS로도 확인이 되었으므로 이 화합물은 glucose의 C-1 및 C-6에 benzoic acid와 vanillic acid가

ester결합 또는 ether결합하고 있음을 알고 결합위치를 결정하기 위하여 HMBC data를 이용하였다. 즉 Fig. 8에서 볼 수 있는 바와 같이 glucose의 anomeric 및 H-6 proton들이 각각 vanillic acid의 C-4 및 benzoic acid의 C=O와 correlation하고 있으므로 화합물 **15**는 vanillic acid 4-*O*-β-D-(6-*O*-benzoylglucopyranoside)[99-101] 로 결정하였다. 이 화합물은 지금까지 보고된 바 없는 신물질임을 알았다. 화합물 **16**, **17**, **26** 및 **28**은 모두 iridoid계열의 추정되었다. 즉 인동으로부터 얻은 loganin과 매우 유사한 분광학적 특성을 보여 주고 있다. 화합물 **16**은 FABMS에서 *m/z* 411 $[M + Na]^+$, 389 $[M + H]^+$ 및 227 $[(M + H) - 162]^+$에서 fragment ion들이 나타나며, δ 217.5에서 C=O의 특징적인 signal이 나타나고 있는 것으로 7-ketologanin 으로 추정할 수 있다. 이 화합물의 HMBC spectrum을 해석하여 Fig. 9에 나타낸 바와 같이 C-7에 C=O가 결합되어 있음을 확인하여



7-Ketologanin (**16**)



Secologanin dimethyl acetal (**17**)

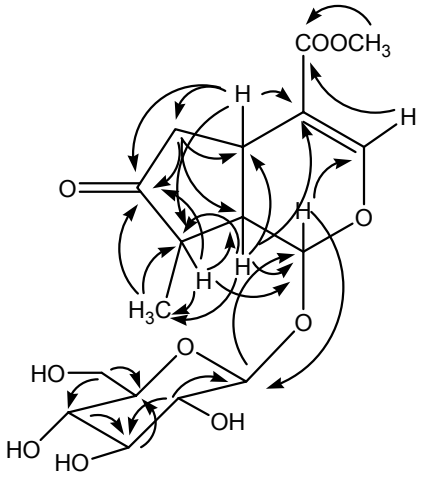
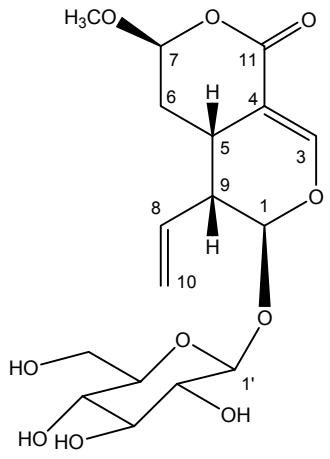


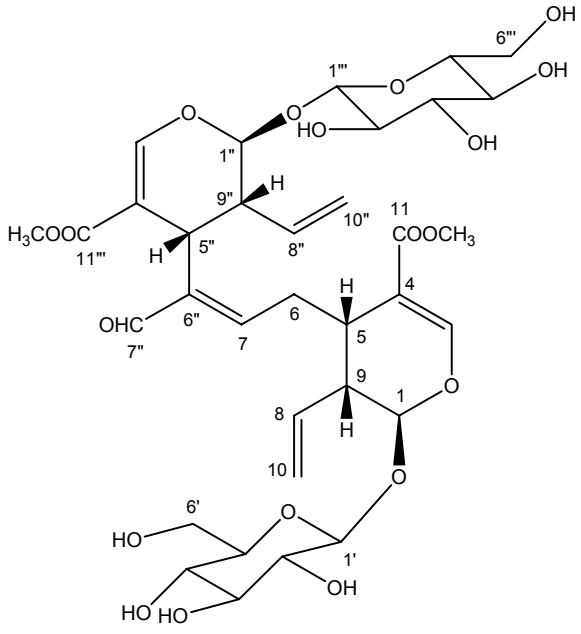
Fig. 9. Key HMBC correlations of **16**



Epivogeloside (**28**)

화합물 **16**은 7-ketologanin[96]으로 결정하였다. 화합물 **17**은 인동에서 분리한 secologanin dimethyl acetal 임을 직접적으로 대조하여 확인하였으며, 화합물 **28**은 δ_C 167.5에서 lactone C=O의 특징적

인 signal이 나타나고 하나의 acetal proton이 δ_H 5.33에서, acetal carbon이 δ_C 103.3에서 나타나며 OCH_3 [δ_H 3.51; δ_C 57.0] signal이 나타나는 것 등으로 epivogeloside[96]로 결정할 수 있었다. 화합물 **26**은 FABMS에서 $[M + Na]^+$ 및 $[M + H]^+$이 각각 *m/z* 781과 759에서 나타나며 이로부터 하나의 glucose가 탈리되어 생성된 이온들이 각각 *m/z* 619 $[(M + Na) - 162]^+$과 597 $[(M + H) - 162]^+$에서 2 mole의 glucose가 탈리되어 *m/z* 435 $[(M + H) - (2 \times 162)]^+$에서 fragment ion들이 나타나고 있어 secoiridoid 2 unit가 결합되어 있는 iridoid로 추정할 수 있다. NMR spectrum에서도 secoiridoid의 특징적인 signal들이 2 set씩 나타나고 있는 것을 확인할 수 있었으며 두 unit의 결합은 Fig. 10에 나타낸 바와 같이 HMBC spectrum을 해석하여 확정하였다. 이상의 결과를 종합하여 이 물질은 (*E*)-aldosecologanin[102,103]으로 확정하였다. 이 물질은 금은화 이외에 *Erythreea centaurium*으로부터 처음으로 분리 보고[104]된 바 있으며, 최근에는 *Kissenia capensis*[105] 로부터도 확인 되었다. 이 외에도 화합물 **18**은 uracil, 화합물 **27**은 sucrose로 확인하였다. 이상에서 기술한 바와 같이 금은화의 성분으로 총 29종의 화합물들을 단리하여 구조를 구명하였으며, 이들을 화합물군으로 대별하면 6종씩의 flavonoid 및 chlorogenic acid, 4종의 iridoid, 1종의 coumarin 및 기타 성분으로 분류할 수 있었다. 금은화로부터 분리한 29종의 화합물중 신물질인 vanillic acid 4-*O*-β-D-(6-*O*-benzoylglucopyranoside)을 포함하여 *n*-nonacosane, *n*-hexacosanol, monopalmitin, flavoyadorinin-B, rhoifolin, 7-ketologanin, esculetin, azelaic acid, uracil, cerebroside 및 sucrose 등은 처음으로 분리된 화합물들임을 확인하였다.



(*E*)-Aldosecologanin (**26**)

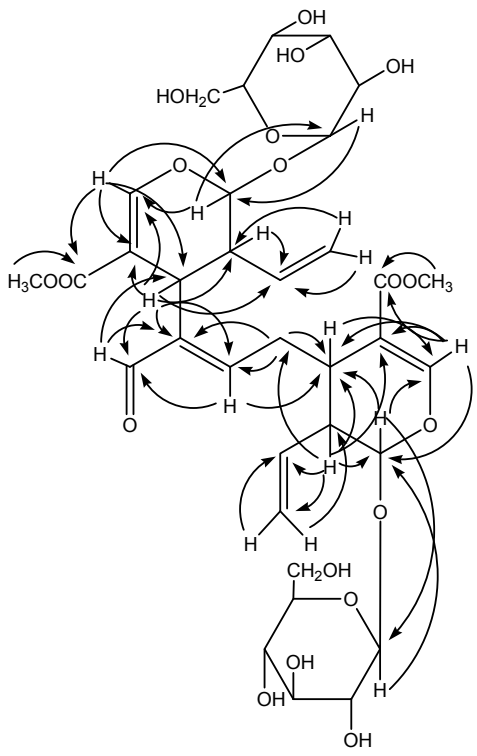


Fig. 10. Key HMBC correlations of **26**

금은화와 인동에 함유된 flavonoid, iridoid 그리고 phenolic compound계 생약성분의 효과적인 분리, 분석방법을 개발하였고, 최적의 조건에 대한 평가로서 validation parameter를 제시하였다. 시중에 유통되고 있는 금은화와 인동 생약시료의 품질관리를 위하여 다양한 크로마토그래피 조건하에서 활성성분의 함량분석 기초실험을 완료하였고 이를 바탕으로 효율적인 동시 정성 및 정량분석법의 개발 하였다.

금은화의 경우, chlorogenic acid, sweroside, luteolin-7-*O*-glucoside, 3,5-dicaffeoylquinic acid 그리고 (*E*)-aldosecologanin 등 지표물질 5종을 선택하였으며, 지표물질에 대한 최적의 분석조건을 제시하였다. 또한 specificity, linearity (correlation coefficient ≧ 0.994), range (1 ~ 20, 4 ~ 30 ㎍/ml), detection limit (0.02 ~ 0.09 ㎍/ml), quantitation limit (0.07 ~ 0.27 ㎍/ml), accuracy (recovery ratio > 97%), precision (RSD 0.05 ~ 1.95%), reproducibility, robustness, stability등 동시분석조건 평가를 위한 validation의 제반 조건을 합리적으로 제시하였다. 확립된 분석법을 통하여 시중에 유통되고 있는 국내·외 21종의 금은화의 활성성분 함량을 비교분석하였으며, 패턴 분석을 통해 주성분분석, 군집분석, 판별분석 그리고 유의성분석등의 실험을 성공적으로 수행하였다.

인동의 경우 loganin, loganic acid, demethylsecologanol, sweroside 그리고 coniferin 등 지표물질 5종을 선택하였으며, 지표물질에 대한 최적의 분석조건을 제시하였다. 또한 specificity, linearity (correlation coefficient ≧ 0.998), range (1 ~ 20, ㎍/ml), detection limit (0.25 ~ 1.09 ㎍/ml), quantitation limit (0.75 ~ 3.32 ㎍/ml), accuracy (recovery ratio > 99.39%), precision (RSD 0.14 ~ 3.28%), reproducibility, robustness, stability등 동시분석조건 평가를 위한 validation의 제반 조건을 합리적으로 제시하였다. 확립된 분석법을 통하여 시중에 유통되고 있는 국내·외 24종의 인동의 활성성분 함량을 비교분석하였으며, 패턴 분석을 통해 주성분분석, 군집분석, 판별분석 그리고 유의성분석 등의 실험을 성공적으로 수행하였다. 또한 인동의 사용부위가 줄기로부터 줄기 및 잎으로 변경됨에 따라 인동의 줄기 및 잎, 잎 및 줄기에 대하여 각각 표준물질의 패턴을 비교분석하였다.

개발된 정성 및 정량분석법은 제반 validation parameters의 측정을 통하여 일차적으로 검증되었고 이들을 실제 시판중인 금은화와 인동 시료에 대하여 적용함으로서 그 실용성을 입증하였다. 이로서 금은화와 인동에 함유된 활성성분에 대한 동시 정성, 정량분석법의 개발이라는 당초의 목표를 완전히 달성한 것으로 사료된다.

제5장 총괄연구개발과제의 연구성과

5.1 활용성과

총괄과제명	한약재의 생리활성성분의 분리 및 분석연구(금은화, 인동)
총괄과제책임자	강삼식 / 서울대학교 / 천연물화학

가. 연구논문

번호	논문제목	저자명	저널명	집(권)	페이지	Impact factor	국내/국외	SCI여부
1	HPLC-DAD-MS/MS를 이용한 금은화 생리활성 물질의 동시분석	유성광, 전주은, 강경원, 강삼식, 신종헌	약학회지	52 (6)	446-451		국내	

나. 학술발표

번호	발표제목	발표형태	발표자	학회명	연월일	발표지	국내/국제
1	Simultaneous analysis of bioactive metabolites from caulis *Lonicera japonica* by HPLC-DAD-MS/MS	포스터	신종헌, 강경원	대한약학회	2008. 10. 24	2008년 대한약학회 추계학술발표 초록집	국내
2	Inhibitory Effects of Ochnaflavone on the Proliferation of HCT-15 Human Colon Cancer Cells	포스터	Kang You-Jin, Kim Yeong Shik, Kang Sam Sik, Lee Sang Kook	대한약학회	2008. 10. 23-24	대한약학회 총회 및 학술대회 프로시딩	국내
3	Induction of cell cycle arrest and apoptosis mediated by ochnaflavone in human colon cancer cells	포스터	강유진, 김영식, 강삼식, 이상국	한국생약학회	2008. 6. 18-20	The 4th KSP-JSP-CCTCNM Joint Symposium on Pharmacognosy	국내
4	Growth inhibition and S phase cell cycle arrest mediated by methyl caffeate isolated from the extract of *Lonicera japonica* in human hepatocellular carcinoma cells	포스터	홍지영, 민혜영, 김영식, 강삼식, 이상국	한국생약학회	2008. 6. 18-20	The 4th KSP-JSP-CCTCNM Joint Symposium on Pharmacognosy	국내
5	Constituents from the Vines of *Lonicera japonica*	포스터	연민혜, 김주선 강삼식	대한약학회	2008. 4.30-5.3	Proceedings of the Spring International Convention	국내
6	Constituents from the Flowers of *Lonicera japonica*	포스터	이은주, 김주선, 강삼식	대한약학회	2008. 4.30-5.3	Proceedings of the Spring International Convention	국내

번호	발표제목	발표형태	발표자	학회명	연월일	발표지	국내/국제
7	Studies of the Constituents from the Flower Buds of *Lonicera japonica*	포스터	이은주, 김주선, 강삼식	1st Euro-Mediterranean Conference on Marine Natural Products	2008. 10. 31-11. 4	Proceedings of the 1st Euro-Mediterranean Conference on Marine Natural Products	국제
8	A New Arylnaphthalene Lignan Isolated from the Vines of *Lonicera japonica*	포스터	연민혜, 김주선 강삼식	1st Euro-Mediterranean Conference on Marine Natural Products	2008. 10. 31-11. 4	Proceedings of the 1st Euro-Mediterranean Conference on Marine Natural Products	국제
9	Constituents from the Aerial Parts of *Lonicera japonica*	포스터	이은주, 연민혜, 김주선, 강삼식	대한약학회	2007. 11. 8	Proceedings of the Convention of the Pharmaceutical Society of Korea	국내
10	Simultaneous analysis of bioactive metabolites from *Lonicera japonica* flower buds by HPLC-DAD-MS/MS	포스터	신종헌, 강경원	대한약학회	2007. 11. 8	2007년 대한약학회 추계학술발표 초록집	국내

다. 지식재산권

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

라. 정책활용

인동, 금은화의 품질평가를 위한 기초자료 제공으로 대한약전 등 개정시 기준시험법 등에 반영

마. 타연구/차기연구에 활용

· 제1세부과제에서 분리한 성분들을 제2세부과제와 효능분석팀에 제공하여 연구에 활용하였음.
· 약효, 독성, 임상 등 관련 학문분야의 실험을 위한 기초자료로 활용
· 한약재의 활성성분에 대한 high throughput screening을 위한 기반기술 확보
· 한약재의 dereplication을 위한 기반기술 확보

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

없음

제7장 참고문헌

1. Kun Ho Son, Jung Ok Park, Kyu Charn Chung, Hyeun Wook Chang, Hyun Pyo Kim, Ju Sun Kim, Sam Sik Kang: *Arch. Pharm. Res.*, **15**, 365-370 (1992)
2. Kun Ho Son, Ju Sun Kim, Sam Sik Kang, Hyun Pyo Kim, Hyeun Wook Chang: *Kor. J. Pharmacogn.*, **25**, 24-27 (1994)
3. Neeraj Kumar, Bikram Singh, Pamita Bhandari, Ajai P. Gupta, Sanjay K. Uniyal, Vijay K. Kaul: *Phytochemistry*, **66**, 2740-2744 (2005)
4. Zheng-Ming Qian, Hui-Jun Li, Ping Li, Jun Chen, Dan Tang: *Biomed. Chromatogr.*, **21**, 649-654 (2007)
5. Song Jin Lee, Eun Joo Shin, Kun Ho Son, Hyeun Wook Chang, Sam Sik Kang, Hyun Pyo Kim: *Arch. Pharm. Res.*, **18**, 133-135 (1995)
6. Hideaki Kawai, Masanori Kuroyanagi, Akira Ueno: *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 3664-3666 (1988)
7. Lamberto Tomassini, M. Francesca Cometa, Mauro Serafini, Marcello Nicoletti: *J. Nat. Prod.,* **58**, 1756-1758 (1995)
8. Koichi Machida, Hiromi Sakaki, Takeyoshi Iijima, Masao Kikuchi: *Chem. Pharm. Bull.*, **50**, 1041-1044 (2002)
9. Kun Ho Son, Keun Young Jung, Hyeun Wook Chang, Hyun Pyo Kim, Sam Sik Kang: *Phytochemistry*, **35**, 1005-1008 (1994)
10. Wie Jong Kwak, Chang Kyun Han, Hyeun Wook Chang, Hyun Pyo Kim, Sam Sik Kang, Kun Ho Son: *Chem. Pharm. Bull.*, **51**, 333-335 (2003)
11. Shoji Yahara, Naomi Kobayashi, Toshihiro Nohara: *Shoyakugaku Zasshi*, **44**, 339-342 (1990)
12. Hideaki Kawai, Masanori Kuroyanagi, Kaoru Umehara, Akira Ueno, Motoyoshi Satake: *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 4769-4775 (1988)

13. Neeraj Kumar, Bikram Singh, Ajai P. Gupta, Vijay K. Kaul: *Tetrahedron*, **62**, 4317-4322 (2006)
14. Li-Yan Peng, Shuang-Xi Mei, Bei Jiang, Hong Zhou, Han-Dong Sun: *Fitoterapia*, **71**, 713-715 (2000)
15. Rie Kakuda, Mio Imai, Koichi Machida, Yasunori Yaoita, Masao Kikuchi: *Nat. Med.*, **54**, 314-317 (2000)
16. Rong Wei Teng, De Zu Wang, Chang Xiang Chen: *Chin. Chem. Lett.*, **11**, 337-340 (2000)
17. Chang Xiang Chen, Wang Wei-Wei, Ni Wei, Chen Neng-Yu, Zhou Jun: *Acta Bot. Yun.*, **22**, 201-208 (2000)
18. Lou Hong Xiang, Lang Wei Jun, Lu Mu Jiam: *Zhongcaoyao*, **27**, 195-199 (1996)
19. Lou Hong Xiang, Tian Jinuo, Yuan Huiqing, Ji Mei: *Chin. J. Med. Chem.*, **5**, 208-210 (1995)
20. W.-C. Chang, F.-L. Hsu: *Prostagalandins Leuko. Essent. Fatty Acids*, **45**, 307-312 (1992)
21. Yue Song, Song-Lin Li, Meng-Hua Wu, Hui-Jun Li, Ping Li: *Anal. Chim. Acta*, **564**, 211-218 (2006)
22. Youyuan Peng, Fanghua Liu, Jiannong Ye: *Electroanalysis*, **17**, 356-362 (2005)
23. 정규찬, 권동렬, 백석환, 김상환, 장현욱: 약학회지, **32**, 328-333 (1988)
24. Huang Xiong, Li Song-Lin, Li Ping, Li Hui-Jun, Chai Xing-Yun, Song Yue: *Acta Pharm. Sin.*, **40**, 285-288 (2005)
25. Nobuo Ikeda, Masakazu Ishihara, Tomoyuki Tsuneya, Masayuki Kawakita, Masaaki Yoshihara: *Flavour & Fragrance J.*, **9**, 325-331 (1994)
26. Chun-Whan Choi, Hyun Ah Jung, Sam Sik Kang, Jae Sue Choi: *Arch. Pharm. Res.*, **30**, 1-7 (2007)
27. Hui-Jun Li, Ping Ki, Wen-Cai Ye: *J. Chromatogr.* A, **1008**, 167-172 (2003)
28. Hui-Jun Li, Ping Li: *Chin. Pharm. J.*, **41**, 818-819 (2006)
29. Rie Kakuda, Mio Imai, Yasunori Yaoita, Koichi Machida, Masao Kikuchi: *Phytochemistry*, **55**, 879-881 (2000)
30. Jun Chen, Yue Song, Ping Li: *J. Chromatgr.* A, **1157**, 217-226 (2007)
31. Xing-Yun Chai, Song-Lin Li, Ping Li: *J. Chromatogr.* A, **1070**, 43 (2005)
32. Zheng-Ming Qian, Hui-Jun Li, Ping Li, Mei-Ting Ren, Dan Tang: *Chem. Pharm. Bull.*, **55**, 1073-1076 (2007)
33. Zheng-Ming Qian, Su-Juan Qin, Hui-Jun Li, Ping Li, Xiao-Dong Wen: *Biomed. Chromatogr.*, **22**, 202-206 (2008)
34. Weixia Song, Shuai Li, Sujuan Wang, Yan Wu, Jiachen Zi, Maoluo Gan, Yanking Zhang, Mingtao Liu, Sheng Lin, Yongchun Yang, Jiangong Shi: *J. Nat. Prod.*, **71**, 922-925 (2008)
35. 문태철, 박정옥, 정광원, 손건호, 김현표, 강삼식, 장현욱, 정규찬: 약학회지, **43**, 117-123 (1999)
36. Jun Hyuk Lee, Woo Shin Ko, Young Hee Kim, Ho Sung Kang, Han Do Kim, Byung Tae Choi: *Int. J. Mole. Med.*, **7**, 79-83 (2001)
37. Song Jin Lee, Kun Ho Son, Hyeun Wook Chang, Sam Sik Kang, Pyeong-uk Park, Wie-jong Kwak, Chang-kyun Han, Hyun Pyo Kim: *Kor. J. Pharmacogn.*, **25**, 363-367 (1994)
38. S. J. Lee, K. H. Son, H. W. Chang, S. S. Kang, H. P. Kim: *Phytother. Res.*, **12**, 445-447

(1998)
39. S. J. Lee, J. H. Choi, K. H. Son, H. W. Chang, S. S. Kang, H. P. Kim: *Life Sci.*, **57**, 551-558 (1995)
40. 정대영, 이호영, 하혜경, 정다영, 강삼식, 김정숙: 생약학회지, **34**, 256-262 (2003)
41. Sung Yong Kim, Kun Ho Son, Hyeun Wook Chang, Sam Sik Kang, Hyun Pyo Kim: *Arch. Pharm. Res.*, **22**, 313-316 (1999)
42. Myung Woo Byun, Cheorun Jo, Tae Woong Jeon, Cheul Hee Hong: *Lebens.-Wiss. u.-Technol.*, **37**, 29-33 (2004)
43. He-Zhen Wu, Jing Luo, Yan-Xia Yin, Qun Wei: *Acta Pharmacol. Sin.*, **25**, 1685-1689 (2004)
44. Jin-A Kim, Dae-Ki Kim, Ok-Hwa Kang, Yeon-A Choi, Hye-Jung Park, Suck-Chei Choi, Tae-Hyun Kim, Ki-Jung Yun, Yong-Ho Nah, Young-Mi Lee: *Int. Immunopharmacol.*, **5**, 209-217 (2005)
45. Henry Wing-Cheung Leung, Chun-Hsiung Wu, Chia-Hsien Lin, Hong-Zin Lee: *Eur. J. Pharmacol.*, **508**, 77-83 (2005)
46. Seok-Jong Suh, Tae-Wook Chung, Min-Jung Son, Sung-Hoon Kim, Tae-Chul Moon, Kun-Ho Son, Hyun Pyo Kim, Hyeun Wook Chang, Cheorl-Ho Kim: *Arch. Biochem. Biophys.*, **447**, 136-146 (2006)
47. Min-Jung Son, Tae-Chul Moon, Eun-Kyung Lee, Kun-Ho Son, Hyun Pyo Kim, Sam Sik Kang, Jong Keun Son, Seung Ho Lee, Hyeun Wook Chang: *Arch. Pharm. Res.*, **29**, 282-286 (2006)
48. S. Thanabhorn, K. Jaijoy, S. Thamaree, K. Ingkaninan, A. Panthong: *J. Ethnopharmacol.*, **107**, 370-373 (2006)
49. Hye-Jung Yoo, Hyun-Jung Kang, Yun Seon Song, Eun-Hee Park, Chang-Jin Lim: *J. Pharm. Pharmacol.*, **60**, 779-786 (2008)
50. Rie Kakuda, Yasunori Yaoita, Koichi Machida, Masao Kikuchi: *J. Tohoku Pharm. Univers.*, **47**, 55-60 (2000)
51. Hong-Feng Luo, Qinglin Li, Shanggong Yu, Thomas M. Badger, Nianbai Fang: *J. Nat. Prod.*, **68**, 94-97 (2005)
52. Junichi Kitajima, Kaoru Kimizuka, Yasuko Tanaka: *Chem. Pharm. Bull.*, **46**, 1408-1411 (1998)
53. James P. Kutney, Günter Eigendorf, Brian R. Worth, John W. Rowe, Anthony H. Conner, Bhimsen A. Nagasampagi: *Helv. Chim. Acta*, **64**, 1183-1207 (1981)
54. G. Falsone, F. Cateni, E. Vrech, L. Birkofer, V. Lucchini, H. Wagner, O. Seligmann, L. Coassini Lokar: *Z. Naturforsch.*, **49B**, 1297-1304 (1994)
55. L. John Goad, Toshihiro Akihisa: "Analysis of Sterols", Blackie Academic & Professional, London, pp. 396, 397, 398 (1997)
56. Ju Sun Kim, Yoon Jung Kim, Joo Young Lee, Sam Slk Kang: *Kor. J. Pharmacogn.*, **39**, 28-36 (2008)
57. Lai-King Sy, Geoffrey D. Brown: *Phytochemistry*, **50**, 781-785 (1999)
58. H. M. T. B. Herath, R. S. Dassanayake, A. M. A. Priyadarshani, Susila de Silva, G. P. Wannigama, Joanne Jamie: *Phytochemistry*, **47**, 117-119 (1998)

59. Sam Sik Kang, Chang Min Kim: *Arch. Pharm. Res.*, **10**, 67-68 (1987)
60. Simon Gibbonsa, K. T. Mathewb, Alexander I. Gray: *Phytochemistry*, **51**, 465-467 (1999)
61. 강삼식, 손건호: 천연물성분 구조결정법, 서울대학교 출판부, 서울 (2000)
62. G. Eglinton, D. H. Hunneman, A. McCormick: *Org. Mass Spectrom.*, **1**, 593-611 (1968)
63. M. Habib Oueslati, Hichem Ben Jannet, Zine Mighri, J. Chriaa, Pedro M. Abreu: *J. Nat. Prod.*, **69**, 1366-1369 (2006)
64. Mitsuo Takasugi, Masaki Anetai, Tadashi Masamune: *Chem. Lett.*, 947-950 (1974)
65. Takayuki Nagai, Hiroaki Kiyohara, Kaori Munakata, Tstsuya Shirahata, Toshiaki Sunazuka, Yoshihiro Harigaya, Haruki Yamada: *Int. Immunopharmacol.*, **2**, 1183-1193 (2002)
66. Masaru Kobayashi, Tomoka Tawara, Takashi Tsuchida, Hiroshi Mitsuhashi: *Chem. Pharm. Bull.*, **3**8, 3169-3171 (1990)
67. Renzo Rossi, Adriano Caprita, Maria G. Quirici, Carlo Alberto Veracini: *Tetrahedron*, **38**, 639-644 (1982)
68. Werner Herz, Palaniappan Kulanthaivel: *Phytochemistry*, **24**, 89-91 (1985)
69. John H. Cardellina, II, Richard E. Moore: *Tetrahedron*, **36**, 993-996 (1980)
70. Ihsan Calis, Mohamed F. Lahloub, Otto Sticher: *Helv. Chim. Acta*, **67**, 160-165 (1984)
71. Hideaki Kawai, Masanori Kuroyanagi, Akira Ueno: *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 3664-3666 (1988)
72. Noriko Matsuda, Masao Kikuchi: *Tohoku Yakka Daigaku Kenkyu Nempo*, **42**, 109-112 (1995)
73. Mariko Kitajima, Norie Fujii, Fumie Yoshino, Hiroshi Sudo, Kazuki Saito, Norio Aimi, Hiromitsu Takayama: *Chem. Pharm. Bull.*, **53**, 1355-1358 (2005)
74. Hosup Yeo, Young-Won Chin, Shin-Young Park, Jinwoong Kim: *Arch. Pharm. Res.*, **27**, 287-290 (2004)
75. Adriana C. Casabuono, Alicia B. Pomilio: *Phytochemistry*, **35**, 479-483 (1994)
76. Fumiko Abe, Tatsuo Yamauchi: *Phytochemistry*, **27**, 575-577 (1988)
77. Byung-Sun Min, Hui Song Cui, Hyeong-Kyu Lee, Dai-Eun Sok, Mee Ree Kim: *Arch. Pharm. Res.*, **28**, 1023-1026 (2005)
78. Changhong Huo, Hong Liang, Yuying Zhao, Bin Wang, Qingying Zhang: *Phytochemistry*, **69**, 788-795 (2008)
79. Noriko Matsuda, Masao Kikuchi: *Chem. Pharm. Bull.*, **44**, 1676-1679 (1996)
80. Rui-Rui Wang, Qiong Gu, Yun-Hua Wang, Xue-Mei Zhang, Liu-Meng Yang, Jun Zhou, Ji-Jun Chen, Yong-Tang Zheng: *J. Ethnopharmacol.*, **117**, 249-256 (2008)
81. Yu-Liang Yang, Fang-Rong Chang, Yang-Chang Wu: *Helv. Chim. Acta*, **88**, 2731-2737 (2005)
82. Ming-An Ouyang, Yung-Shung Wein, Ren-Kuan Su, Yueh-Hsiung Kuo: *Chem. Pharm. Bull.*, **55**, 804-807 (2007)
83. D. C. Ayres, J. D. Loike: Lignans. Chemical, biological and clinical properties, Cambridge University Press, Cambridge, pp. 216-219 (1990)
84. Valerie Steeves, Hartmut Forster, Ulrich Pommer, Rodney Savidge: *Phytochemistry*, **57**, 1085-1093 (2001)
85. Masataka Sugiyama, Eiko Nagayama, Masao Kikuchi: *Phytochemistry*, **33**, 1215-1219

(1993)
86. Marina Della Greca, Maria Ferara, Antonio Fiorentino, Pietro Monaco, Lucio Previtera: *Phytochemistry*, **49**, 1299-1304 (1998)
87. Jerome Quintin, Guy Lewin: *J. Nat. Prod.*, **67**, 1624-1627 (2004)
88. Dae Sik Jang, Muriel Cuendet, Harry H. S. Fong, John M. Pezzuto, A. Douglas Kinghorn: *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 2218-2222 (2004)
89. T. K. Razdan, B. Qadri, S. Harkar, E. S. Waicht: *Phytochemistry*, **26**, 2063-2069 (1987)
90. Kazuko Sano, Shuichi Sanada, Yoshiteru Ida, Junzo Shoji: *Chem. Pharm. Bull.*, **39**, 865-870 (1991)
91. C. J. Pouchert, J. Behnke: The Aldrich Library of ^{13}C and ^{1}H FT NMR Spectra (Ed. 1), Vol. 1, Aldrich Chemical Company, Inc., p. 772 (1993)
92. Naokazu Ohta, Kazuyoshi Yagishita: *Agric. Biol. Chem.*, **34**, 900-907 (1970)
93. Xiao-Zhong Gao, Chang-Xin Zhou, Shui-Li Zhang, Wei Yao, Yu Zhao: *China J Chin. Mat. Med.*, **30**, 126-128 (2005)
94. Guido F. Pauli, Ulrich Kuczkowiak, Adolf Nahrstedt: *Magn. Reson. Chem.*, **37**, 827-836 (1999)
95. G. F. Pauli, F. Poetsch, A. Nahrstedt: *Phytochem. Anal.*, **9**, 177-185 (1998)
96. Koichi Machida, Junko Asano, Noriko Machida, Masao Kikuchi: *Tohoku Yakka Daigaku Kenkyu Nempo*, **40**, 105-110 (1993)
97. Toshio Satake, Kohei Kamiya, Yin An, Tomomi Oishi, Junichiro Yamamoto: *Biol.. Pharm. Bull.*, **30**, 935-940 (2007)
98. Yoon Jung Kim, Min Hye Yean, Eun Ju Lee, Ju Sun Kim, Je-Hyun Lee, Sam Sik Kang: *Nat. Prod. Sci.*, **14**, 161-166 (2008)
99. Cheng-Bin Cui, Yasuhiro Tezuka, Hiroko Yamashita, Tohru Kikuchi, Hirofumi Nakano, Tatsuya Tamaoki, Jong-Hee Park: *Chem. Pharm. Bull.*, **41**, 1491-1497 (1993)
100. Jurgen Conrad, Bernhard Vogler, Iris Klaiber, Sabine Reeb, Jan-Hirich Guse, Gudrun Roos, Wolfgang Kraus: *Nat. Prod. Lett.*, **15**, 35-42 (2001)
101. X. Yang, Y. Ding, Z.-H. Sun, D.-M. Zhang: *J. Asian Nat. Prod. Res.*, **8**, 505-510 (2006)
102. Koichi Machida, Hiromi Sasaki, Takeyoshi Iijima, Masao Kikuchi: *Chem. Pharm. Bull.*, **50**, 1041-1044 (2002)
103. Hui-Jun Li, Ping Li: *Chin. Pharm. J.*, **41**, 818-819 (2006)
104. Shuzo Takagi, Masae Yamaki, Eizaburo Yumioko, Tadashi Nishimura, Kiyoshi Sakina: *Yakugaku Zasshi*, **102**, 313-317 (1982)
105. Christian Zidorn, Ernst P. Ellmerer, Angela Ziller, Hermann Stuppner: *Biochem. System. Ecol.*, **32**, 761-763 (2004)
106. Kazuyoshi Ohashi, Hisashi Watanabe, Yasuaki Okumura, Tahan Uji, Isao Kitagawa: *Chem. Pharm. Bull.*, **42**, 1924-1926 (1994)
107. Jinsaku Sakakibara, Hiroji Ina, Masaiti Yasue: *Yakugaku Zasshi*, **94**, 1377-1383 (1974)

제8장 첨부서류

약학회지 제 52 권 제 6 호 446~451 (2008)
Yakhak Hoeji Vol. 52, No. 6

藥學會誌

HPLC-DAD-MS/MS를 이용한 금은화 생리활성 물질의 동시분석

유성광 · 전주은 · 강경원 · 강삼식 · 신종헌#
서울대학교 약학대학 천연물과학연구소
(Received September 16, 2008; Revised November 7, 2008)

Simultaneous Analysis of Bioactive Metabolites from *Lonicera japonica* Flower Buds by HPLC-DAD-MS/MS

Sungkwang Ryu, Ju-eun Jeon, Gyoung Won Kang, Sam Sik Kang and Jongheon Shin#
Natural Products Research Institute, College of Pharmacy, Seoul National University, San 56-1, Shillim, Kwanak, Seoul 151-742, Korea

Abstract — A high-performance liquid chromatography (HPLC) with diode array detector (DAD) and electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) was established for the simultaneous determination of chlorogenic acid (**1**), sweroside (**2**), luteolin-7-*O*-glucoside (**3**), (*E*)-aldosecologanin (**4**) and 3,5-dicaffeoylquinic acid (**5**) from *Lonicera joponica* flower buds. The optimal chromatographic conditions were obtained on an ODS column (5 μm, 4.6×150 mm) with the column temperature 25°C. The mobile phase was composed of (A) water with 0.1% formic acid and (B) acetonitrile with 0.1% formic acid using a gradient elution, the flow rate was 0.3 ml/min. Detection wavelength was set at 250 nm. All calibration curves showed good linear regression (r^2>0.994) within test ranges. The developed method provided satisfactory precision and accuracy with overall intra-day and inter-day variations of 0.05~1.95% and 0.15~2.26%, respectively, and the overall recoveries of 97.71~103.65% for the five compounds analyzed. The verified method was successfully applied to quantitative determination of the three types (phenolic compounds, iridoids and flavonoids) of bioactive compounds in 21 commercial *L. japonica* flower buds samples from different markets in Korea and China. The analytical results demonstrated that the contents of the five analytes vary significantly with sources.

Keywords □ HPLC-DAD, *Lonicera japonica* flower buds, iridoids, phenolic compounds, flavonoids

한방생약의 오랜 활용 경험이 축적되어 있는 우리나라에서는 약품시장에서 생약이 양약에 버금가는 비중을 차지하고 있으며, 천연물신약 연구개발에 있어서도 전통 생약의 중요성이 지속적으로 증가하고 있다. 그러나 생약 특유의 생산 및 유통공정에 기인한 비 규격화와 질적 가치의 비 영속화, 산지별 함량 편차 및 생물학적 동질성의 미확인 등의 문제들은 한약재의 평가 및 신약개발에 있어 가장 큰 저해 요인으로 작용하고 있다. 그러므로 합리적인 생약 사용 기준과 나아가 현대적인 개념의 천연물 신약개발을 위해서 활성물질의 정성적, 정량적 분석에 기초를 둔 규격화가 시급히 요구된다.

금은화는 인동과(Caprifoliaceae)에 속하는 인동덩굴 (*Lonicerae flos* Thunb.)의 꽃으로,[1] 한방에서는 두통, 인두통, 호흡기 감염, 화농증, 전염병, 종양의 치료제 및 해열, 이뇨, 해독 등의 목적으로 사용되어 왔으며,[2,3] 천연물 연구를 통하여 항생, 소염, 항미생물, 항산화, 항바이러스, 세포보호, 간보호 등 다양한 생리활성이 규명되었다.[4-8]

현재까지 연구된 금은화의 주요 활성 물질로 다양한 작용기를 가진 phenolic compounds, iridoids 그리고 flavonoids가 알려져 있다.[5] 천연물 함량에 대한 사전 탐색연구를 바탕으로 수행된 본 연구에서는 금은화에 함유된 천연물 중에서 생리활성과 함량이 우수한 물질로 phenolic compounds 중에서 chlorogenic acid (**1**)[6,9,10]와 3,5-dicaffeoylquinic acid(**5**),[6,11] iridoids로서 sweroside (**2**)[12]와 (*E*)-aldosecologanin(**4**),[13] 그리고 flavonoids[14]의 luteolin-7-*O*-glucoside(**3**),[15] 등 5종의 화합물을(Fig. 1) 표준물질로 선정하여 금은화에 함유된 각 물질의 함량을 HPLC-DAD와 LC-MS/MS를 이용하여 동시 정량 · 정성 분석하는 최적의 분석법을 개발하였으며, 이를 활용하여 21종의 국내 · 외 지역에서 산출된 금은화 활성 물질의 함량을 분석 비교하였다.

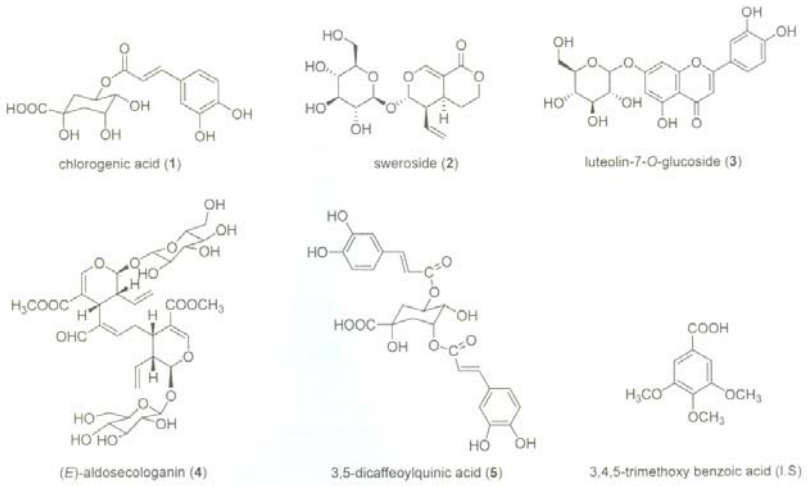


Fig. 1 – Chemical structures of five compounds in *Lonicera japonica* flower buds.

실험 방법

시료 및 시약

표준시료로 사용한 chlorogenic acid(**1**), sweroside (**2**), luteolin-7-*O*-glucoside(**3**), (*E*)-aldosecologanin(**4**) 그리고 3,5-dicaffeoylquinic acid(**5**)는 본 연구팀에 의해 금은화로부터 추출, 분리, 정제하여 UV, IR, MS, ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR 등을 통해 구조 동정되었으며 HPLC-DAD를 이용한 순도 실험 결과 95% 이상의 순수 물질임을 확인하였고 내부표준물질로 3,4,5-trimethoxy benzoic acid(Sigma-Aldrich, USA)를 사용하였다.

각 소재별 활성물질의 함량을 비교분석하기위해 사용된 국내산, 중국산의 21종 중 15종의 금은화 시료는 서울 경동시장, 대구 약령시, 대전 약전거리, 전라남도에서 각각 원산지별로 구입하였으며, 나머지 6종은 식약청에서 제공받았다. 각 시료는 자연건조시킨 후 분말형태로 마쇄하여 분석시료로 사용하였다.

용매로서 아세토니트릴(J. T. Baker, USA), 3차 증류수(J. T. Baker, USA)와 증류된 에탄올(Duksan, Korea)을 사용하였으며 이동상에 포름산(Wako, Japan)을 첨가하였다.

HPLC system 및 condition

시료 분석을 위한 HPLC는 Agilent 1200 series로서 auto-sampler, column oven, binary pump, DAD detector(Agilent Technologies, Waldbronn, Germany), degasser(Agilent Technologies, Tokyo, Japan)를 사용하였으며, software는 Agilent 사의 Chemstation software(Agilent Technologies, Avondale, CA, USA)를 사용하였다. HPLC 조건으로 컬럼 오븐의 온도는 25°C, 분석파장은 250 nm, 유속은 0.3 ml/min를 사용하였고, 컬럼은 Shiseido사의 Capcell Pak ODS UG120(5 μm, 4.6 mm×150 mm)를 사용하였다. 이동상은 A 용매로 100% 3차 증류수와 B 용매 100% 아세토니트릴로 각각 0.1% 포름산을 첨가하여 사용하였으며 용매계는 용매기울기 용리로서 Table I에 나타내었다.

Table I – Solvent gradient condition for HPLC-DAD

Final time (min)	Flow rate (ml/min)	A[a]	B[b]
0	0.3	85	15
10	0.3	80	20
30	0.3	65	35
35	0.3	65	35
40	0.3	85	15

[a]Water with 0.1% formic acid.
[b]Acetonitrile with 0.1% formic acid.

HPLC-MS system 및 condition

질량분석기는 HPLC(Agilent 1200 series)를 inlet으로 사용하였으며, *m/z*비 2000까지의 범위를 수용할 수 있는 Finnigan electrospray source가 결합된 Finnigan MAT LCQ ion-trap mass spectrometer(San Jose, CA, USA)를 사용하여 분석하였고 software는 Xcalibur(Finnigan MAT)를 사용하였다. 질량분석의 조건은 각 표준물질의 최적의 감도를 고려해 물질별로 나누어 설정하였다(Table II).

시료의 준비

표준시료는 검량선을 작성하기 위해 각각 메탄올로 희석하여 화합물 **1**, **5**는 4, 8, 15, 20, 25, 30 μg/ml, **2**~**4**는 1, 2, 4, 8, 15, 20 μg/ml으로 각 농도별 혼합 시료를 준비하였다.

금은화 원시료는 자연건조 시켰다가 분말 형태로 마쇄한 후

Table II – Analytical parameters for HPLC-MS/MS

<ESI source>	Method 1	Method 2	Method 3	Method 4	Method 5	Method 6
Sheath gas flow rate (arb)	80.00	80.00	80.00	80.00	80.00	80.00
Aux gas flow rate (arb)	20.00	20.00	20.00	20.00	20.00	20.00
Spray voltage (kV)	4.50	7.00	4.50	7.00	4.50	4.50
Capillary temp (°C)	250.00	250.00	250.00	250.00	250.00	250.00
Capillary voltage (V)	-2.00	24.00	-47.00	1.50	9.50	-47.00
Tube lens offest (V)	55.00	6.00	-25.00	-17.00	-15.00	35.00
<Ion optics>						
Compounds	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**IS**
Octapole 1 offset (V)	4.50	-2.00	3.00	-2.75	-1.75	4.50
Lens voltage (V)	22.00	-34.00	20.00	-18.00	-22.00	70.00
Octapole 2 offset (V)	9.50	-4.50	6.50	-4.50	-5.00	6.50
Octapole RF amplitude (V p-p)	400.00	400.00	400.00	400.00	400.00	400.00

Table III – Comparison of effectiveness by extraction solvent (μg/g, n=3)

Compound	100% Methanol	70% Methanol	100% Ethanol	70% Ethanol
1	69488.93±307.60	69525.45±106.27	19857.91±90.08	77510.59±354.62
2	3615.87±22.01	3581.86±6.44	2889.23±5.95	3597.65±5.19
3	1460.84±8.65	1270.94±2.34	263.77±3.14	1450.35±3.52
4	2321.43±11.32	2375.71±3.40	1706.46±5.20	2622.68±2.41
5	35714.24±163.02	23862.10±51.04	13408.34±25.03	34990.49±53.44

Table IV – Comparison of effectiveness by extraction time (μg/g, n=3)

Compound	10 min	20 min	30 min	60 min	90 min
1	73889.98±133.69	71645.51±193.94	74305.82±156.66	72021.47±133.77	74792.45±65.41
2	3457.85±7.72	3271.61±9.73	3355.39±7.31	3391.05±6.65	3517.58±1.97
3	1544.64±4.51	1427.27±5.82	1566.15±4.38	1913.11±3.96	1189.94±2.48
4	2334.98±5.64	2248.30±6.99	2332.22±6.79	2575.35±4.49	2360.86±5.60
5	33210.09±68.46	30797.87±86.79	32691.63±65.61	33058.63±62.95	33654.07±36.77

Table V – Comparison of effectiveness by extraction method (μg/g, n=3)

Compound	Ultrasonication	Vortex	Reflux
1	152216.64±231.54	147877.99±114.27	150993.09±361.54
2	3598.10±3.97	3533.19±6.05	3558.71±8.81
3	1339.12±2.08	1231.14±2.03	2340.25±3.16
4	2668.40±2.66	2332.75±2.41	2360.06±7.05
5	34213.34±9.46	32908.29±33.11	29670.60±63.41

사용하였다. 최적의 추출 방법을 확립하기 위해 70%, 100% 에탄올, 70%, 100% 메탄올을 사용하여 추출 · 분석함으로써 용매별 추출 효율을(Table III), 10, 20, 30, 60, 90분 각각 추출 · 분석함으로써 추출 시간별 추출 효율을(Table IV), sonication, reflux, vortex법으로 각 시료를 추출 · 분석함으로써 추출 방법별 추출 효율을 비교하였다(Table V). 그 결과 얻어진 최상의 추출방법이 용매 70% 에탄올, 추출시간 60분, 그리고 sonication임을 확인하였다. 그리하여 마쇄한 시료 200 mg에 70% 에탄올 10 ml을 넣은 후 60분간 sonication하여 추출한 뒤 이를 0.2 μm membrane filter로 여과, 내부표준물질 10 μg 첨가한 후 HPLC 분석에 사용하였다.

실험결과 및 고찰

최적의 HPLC-DAD 조건의 탐색

서로 다른 3 종류의 생리활성물질을 동시에 분리하기 위해 여러 용매조건들을 시도한 결과 Shiseido사의 Capcell Pak C18 UG120(5 μm, 4.6 mm×150 mm)를 사용 시 이동상은 A 용매

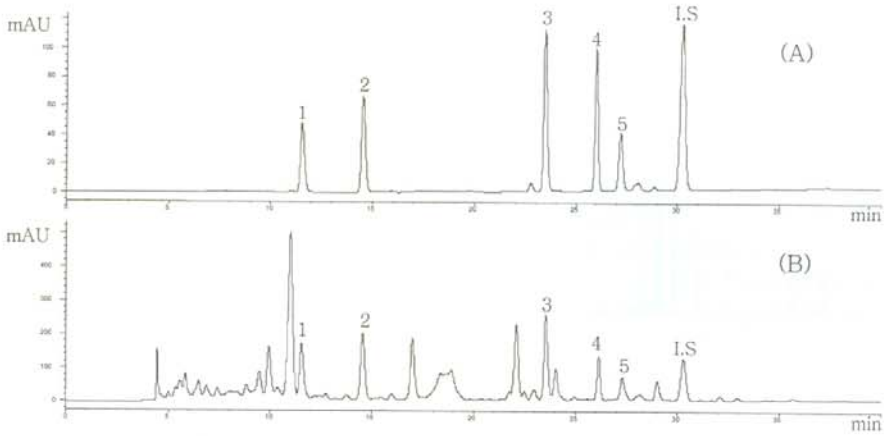


Fig. 2 – HPLC chromatograms of standard solution mixture (A) and extract of *Lonicera japonica* flower buds (B).

Table VI – Calibration curves, LODs and LOQs of five standard compounds

Compounds	Range (μg/ml)	Conversion equation[a)]	r^2	LOD[b)] (μg/ml)	LOQ[c)] (μg/ml)
1	4~30	y=0.01226x-0.01638	0.997	0.06	0.17
2	1~20	y=0.07545x+0.01128	1.000	0.03	0.09
3	1~20	y=0.05220x-0.00121	0.997	0.03	0.10
4	1~20	y=0.08436x-0.02008	0.999	0.02	0.07
5	4~30	y=0.01261x-0.02576	0.994	0.09	0.27

[a)]y: peak area, x: concentration of the analyte (μg/ml).
[b)]LOD, limit of detection. c) LOQ, limit of quantification.

100% 3차 증류수, B 용매 100% 아세토니트릴로 각각 0.1% 포름산을 첨가하여 사용하며, 컬럼 오븐의 온도를 25°C로 분석하였을 때 분석 시간 35분 이내에 모든 표준물질의 peak들이 분리되었다. 또한 각 compound들이 적절한 흡광도를 갖는 분석 파장을 탐색한 결과 250 nm에서 모든 표준물질의 peak들이 최적의 감도를 갖는 것을 알 수 있었다. Fig. 2에 혼합한 표준물질들의 chromatogram과 금은화 원시료에 대한 chromatogram을 제시하였다.

직선성, 범위, 검출한계와 정량한계

정량분석을 위한 검량선으로 각 표준물질을 단계별 농도로 희석한 혼합용액을 반복분석하여 Table VI과 같은 결과를 얻었다. 분석 파장인 250 nm에서 각 표준물질의 흡광도에 따라 **1**, **5**의 경우 4~30 μg/ml 농도의 범위를 정하였으며, **2**, **3**, **4**의 경우 1~20 μg/ml의 농도 범위를 정하였다. 분석결과 각 표준물질은 상관계수 0.994에서 1.000의 값의 높은 직선성을 나타내었으며, 검출한계와 정량한계는 시그널 대 노이즈비 3 : 1과 10 : 1로서 각각 0.02~0.09(μg/ml), 0.07~0.27(μg/ml)의 높은 감도를 나타내었다.

정확성과 정밀성

금은화 시료에 단계별 기지농도의 표준물질을 넣은 후 일간, 일내 반복 실험하여 표준물질의 회수율과 실험의 정밀성을 측정하였을 때 회수율은 최소 97.71%에서 최대 103.65%로서 높은 정확성을 나타냈으며 상대표준편차(RSD)는 최소 0.05%에서 최대 1.95%로서 우수한 정밀성을 나타내었다(Table VII).

Table VII – Precision and accuracy of the five standard compounds

Compounds	Spiked amount (μg)	Intra-day (n=5)		Inter-day (n=5)	
		Recovery (%)	RSD (%)	Recovery (%)	RSD (%)
1	4	100.05	1.15	102.68	1.49
	8	99.97	0.86	99.91	0.56
	12	101.69	0.69	101.24	0.76
2	2	103.65	0.66	101.45	0.94
	4	101.31	1.05	100.64	0.61
	8	99.58	0.05	99.55	0.15
3	2	101.99	0.51	99.79	0.92
	4	98.81	1.19	97.71	2.26
	8	98.89	0.29	99.52	0.29
4	2	99.73	0.27	100.47	0.31
	4	100.16	0.54	100.68	1.84
	8	98.41	0.21	99.33	0.16
5	4	98.71	1.95	99.36	1.36
	8	99.64	1.62	99.97	1.16
	12	101.49	0.32	101.36	0.40

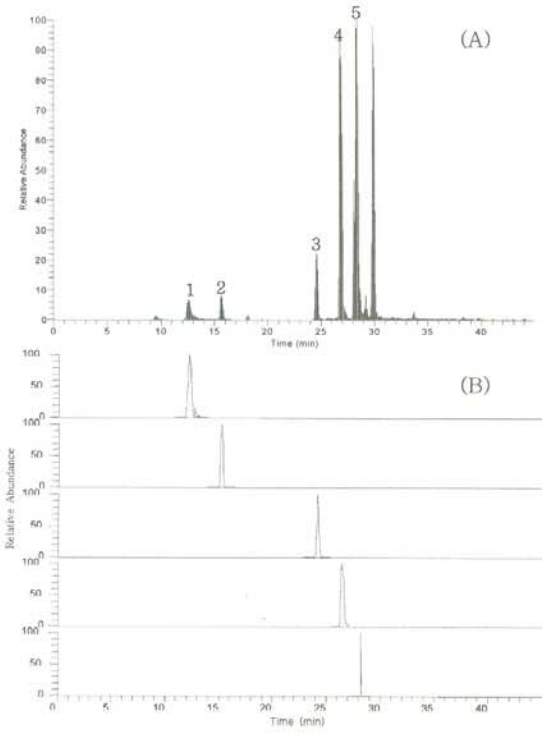


Fig. 3 – Total ion chromatograms of *Lonicera japonica* flower buds in SIM mode (A) and SRM mode (B).

HPLC-DAD-MS/MS를 이용한 표준물질의 동정

금은화에 함유된 표준물질의 동정에 있어 HPLC-DAD를 통해서는 머무름 시간의 일치를 통한 chromatogram상의 시각적인 정보만을 얻을 수 있다. 그래서 HPLC-DAD-MS/MS를 통해 금은화 시료에 함유된 표준물질의 머무름 시간과 m/z값 및 fragment의 패턴을 확인함으로써 시료내의 표준물질을 동정하였다(Fig. 3). Table VIII에 각 peak에 대한 분석결과를 나타내었다.

산지별 생리활성 물질 함량 비교

국내에서 현재 유통되고 있는 금은화는 대부분 중국산과 국내산이며, 산지별 생리활성물질의 함량이 차이가 있음에도 불구하고 이를 비교분석할 만한 신뢰성 있는 자료가 부족하다. 그러므로 본 실험에서 확립한 최적의 분석법을 토대로 산지별 21종의 생리활성 물질을 분석하였다(Table IX).

Table IX – Content of five compounds in samples of twenty-one commercial products from diverse sources (μg/g)

Samples	1	2	3	4	5
An-dong 1	3456.77	926.17	614.99	175.73	2885.57
An-dong 2	7989.60	1157.86	1023.19	257.97	5566.93
Bong-hwa	3601.50	804.81	949.01	-	4292.22
Bu-yeo	4909.73	1071.91	874.65	187.30	3681.06
Cheong-song	10126.69	1438.64	1228.70	323.25	7447.40
Geo-jin	3542.25	866.89	619.49	161.65	4042.88
Go-heung	2881.87	534.02	949.01	-	4292.22
Goon-wi	4230.96	659.26	1366.43	132.24	3929.51
Hong-cheon	5924.49	1156.15	674.24	325.16	4870.20
Yang-yang	2221.00	457.22	633.02	133.30	3238.51
Kyo-yi	6475.80	1011.85	822.01	320.28	5442.21
Mt. seolak	5851.42	668.13	748.63	226.91	6665.29
Nak-moon	2941.07	834.07	740.00	172.01	2613.17
Ui-seong	6637.39	1154.31	1185.49	293.86	5306.25
Ul-jin	2866.85	589.57	471.12	80.10	3274.00
China (unidentified)	3144.18	1532.69	807.89	401.76	3611.50
Hanam 1 (China)	2815.78	788.32	521.13	120.07	2335.76
Hanam 2 (China)	64247.89	3120.63	750.17	2562.84	29177.90
Mil-hyun (China)	62441.82	3297.94	705.81	2523.07	27465.54
Sandong 1 (China)	43840.90	1559.03	1560.76	606.95	29747.88
Sandong 2 (China)	59194.80	2635.71	908.53	2639.58	26975.64

1: chlorogenic acid, **2**: sweroside, **3**: luteolin-7-*O*-glucoside, **4**: (*E*)-aldosecologanin, **5**: 3,5-dicaffeoylquinic acid.

분석결과 21종의 금은화에 함유된 생리활성 물질의 함량은 대체적으로 불규칙적이었으며, 대체적으로 sweroside(**2**), luteolin-7-*O*-glucoside(**3**), (*E*)-aldosecologanin(**4**)은 낮은 함량을 가졌고 chlorogenic acid(**1**)와 3,5-dicaffeoylquinic acid(**5**)은 높은 함량을 가졌다. 또한 전반적인 활성 물질의 함량을 볼 때 중국 하남산과 산동산이 가장 높았다.

대부분의 한약재와 마찬가지로 금은화 또한 함량이 높은 활성물질 하나로는 금은화가 가지 고 있는 전반적인 약효를 나타내지 못하며 여러 개의 활성물질이 같이 존재할 때 시너지 효과를 발휘한다고 알려져 있다.[16] 그러므로 단일 활성 성분만을 분석하여 생약재의 질을 판단하기 보다는 보다 체계적인 활성검색에 의하여 시너지 효과가 규명된 활성 물질에 대한 동시 분석법이

Table VIII – HPLC-DAD-MS/MS Data of the five bioactive compounds in *Lonicera japonica* flower buds

Peak No.	MW[a]	MS (m/z)	MS/MS (m/z)	C.E[b]	Ion mode	Identification
1	354	353	191	26	Negative	chlorogenic acid
2	358	381	219	40	Positive	sweroside
3	448	447	285	34	Negative	luteolin-7-*O*-glucoside
4	758	781	549	58	Positive	(*E*)-aldosecologanin
5	516	517	501	25	Positive	3,5-dicaffeoylquinic acid

[a]Molecular weight.
[b]Collision energy.

한약제 평가를 위한 적절한 접근방법으로 사료된다.

결 론

본 실험은 HPLC-DAD-MS/MS를 이용하여 금은화에 함유된 3 종류의 생리활성물질의 동시분석법을 개발하였으며, 최적의 조건에 대한 평가로서 직선성, 범위, 검출한계, 정량한계, 정밀성과 정확성 등 여러 validation parameter들을 제시하였다. 또한 각 표준물질들의 정확한 동정을 위하여 HPLC-DAD-MS/MS를 이용하여 이를 확인하였고 이와 같이 확립한 최적의 분석법을 통하여 국내에 유통되고 있는 금은화 21종의 활성성분 함량을 비교분석하였다.

감사의 말씀

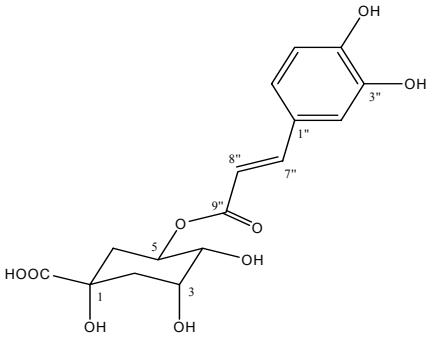
본 연구는 한국 식품의약품안전청(KFDA) 주관아래 수행된 한약재 과학화사업(과제번호: 07092 한약제 321)으로서 연구비 지원에 감사드립니다.

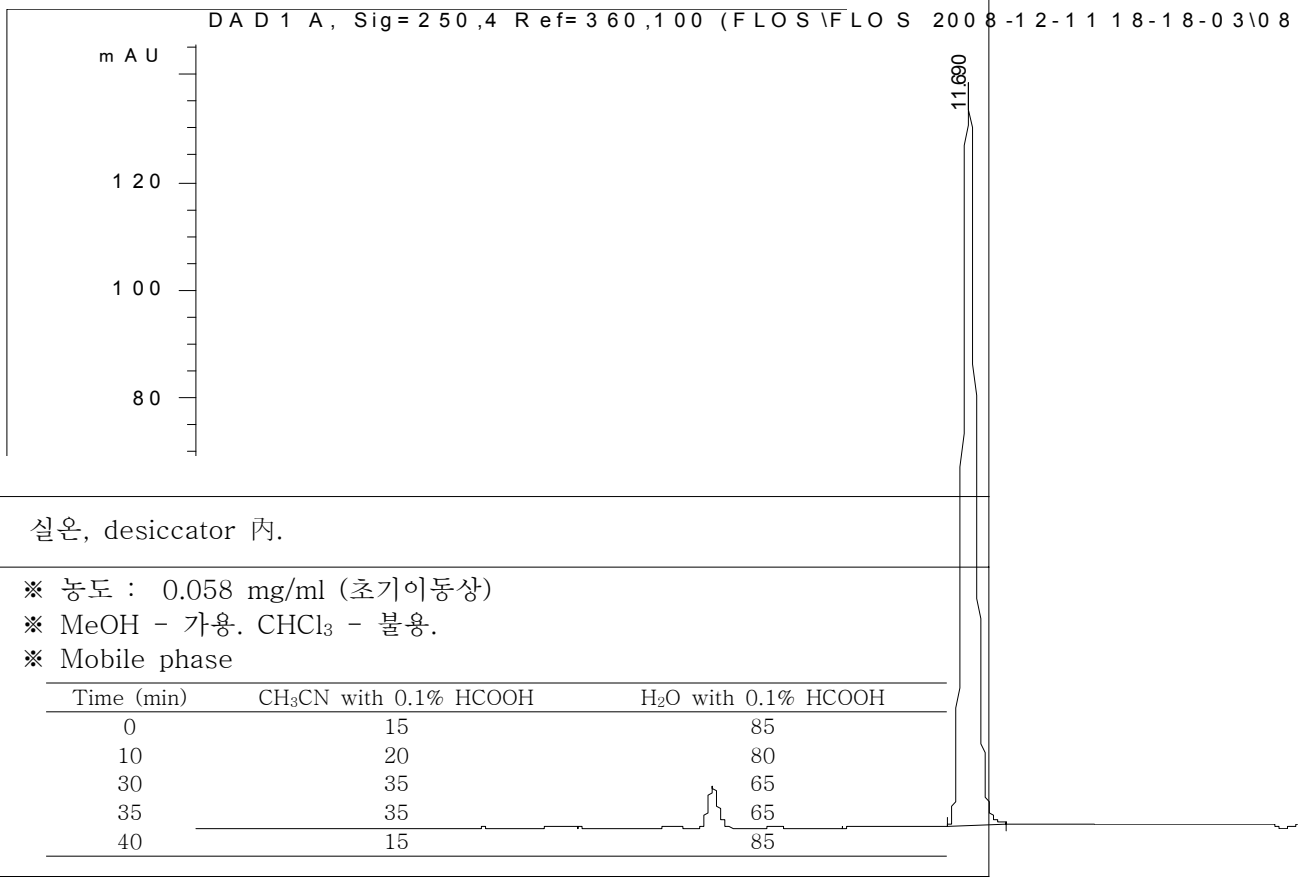
참고문헌

1) 정보섭, 김일혁, 김재가 : 원색 천연물대사전 상권, 남산당, p. 12 (1984).
2) 진재인 : 도설한방의학대사전(중국약학대전) I, 강담사, p. 160 (1982).
3) Pharmacopoeia of the people's republic of China, Chemical Industry Press, Peking, p. 152 (2005).
4) Chang, C.-W., Lin, M.-T., Lee, S.-S., Liu, K. C. S. C., Hsu, F.-L. and Lin, J.-Y. : Differential inhibition of reverse transcriptase and cellular DNA polymerase-a activities by lignans isolated from Chinese herbs, Phyllanthus myrtifolius Moon, and tannins from Lonicera japonica Thunb and Castanopsis hystrix. *Antiviral Res.* **27**, 367 (1995).
5) Xiang, T., Xiong, Q. B., Ketut, A. I., Tezuka, Y., Nagaoka, T., Wu, L. J. and Kadota, S. : Studies on the hepatocyte protective activity and the structure-activity relationships of quinic acid and caffeic acid derivatives from the flower buds of Lonicera bournei. *Planta Medica* **67**, 322 (2001).
6) Chang, W.-C. and Hsu, F.-L. : Inhibition of platelet activation and endothelial cell injury by polyphenolic compounds isolated from Lonicera japonica Thunb. *Prost. Leuk. Essen. Fatty Acids* **45**, 307 (1992).
7) Leung, H. W.-C., Kuo, C.-L., Yang, W.-H., Lin, C.-H. and Lee, H.-Z. : Antioxidant enzymes activity involvement in luteolin-induced human lung squamous carcinoma CH27 cell apoptosis. *Eur. J. Pharmacol.* **534**, 12 (2006).
8) Lee, S. J., Choi, J. H., Chang, H. W., Kang, S. S. and Kim, H. P. : Suppression of mouse lymphocyte proliferation *in vitro* by naturally-occurring biflavonoids. *Life Sci.* **57**, 551 (1995).
9) Peng, Y., Liu, F. and Ye, J. : Determination of phenolic acids and flavones in lonicera japonica thumb. by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Electroanal.* **17**, 356 (2005).
10) 정규찬, 권동렬, 백석환, 김성환, 장현욱 : 금은화 (Lonicerae Flos)의 ethyl acetate 분획이 돌연변이원성에 미치는 영향 (Effects of Lonicerae Flos' ethyl acetate fraction on mutagenicity). 약학회지 **32**, 328 (1988).
11) Peng, L.-Y., Mei, S.-X., Jiang, B., Zhou, H. and Sun, H.-D. : Constituents from Lonicera japonica. *Fitoterapia* **71**, 713 (2000).
12) Song, Y., Li, S.-L., Wu, M.-H., Li, H.-J. and Li, P. : Qualitative and quantitative analysis of iridoid glycosides in the flower buds of Lonicera species by capillary high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometric detector. *Anal. Chim. Acta* **564**, 211 (2006).
13) Machida, K., Sasaki, H., Iijima, T. and Kikuchi, M. : Studies on the constituents of Lonicera species. XVII. New iridoid glycosides of the stems and leaves of *Lonicera japonica* THUNB. *Chem. Pharm. Bull.* **50**, 1041 (2002).
14) Xing, J. and Li, P. : Research on chemical constituents of Lonicera : A review and prospects. *J. Chin. Med. Mater.* **22**, 366 (1999).
15) Rahimuddin, S. A., Khoja, S. M., Zuhair, M. M., Howell, N. K. and Brown, J. E. : Inhibition of lipid peroxidation in UVA-treated skin fibroblasts by luteolin and its glucosides. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **109**, 647 (2007).
16) Qian, Z.-M., Li, H.-J., Li, P., Ren, M.-T. and Tang, D. : Simultaneous qualitation and quantification of thirteen bioactive compounds in Flos Lonicerae by high-performance liquid chromatography with diode array detector and mass spectrometry. *Chem. Pharm. Bull.* **55**, 1073 (2007).

Korea Food & Drug Administration

순 도 성 적 서

화합물명	Chlorogenic acid		한약재명	금은화 (*Lonicera japonica*, Flower)		
			화학식	$C_{16}H_{18}O_9$	분자량	354
순 도	99.9%	제조년월일	2008. 12.			
분석조건	**Column**; Shiseido CAPCELL PAK C18 UG120 (5㎛, 4.6 x 150 ㎜) **Mobile phase**; CH_3CN with 0.1% HCOOH-H_2O with 0.1% HCOOH gradient.(참고사항참조) **Flow rate**; 0.3 ㎖/min **Detector**; UV(250 ㎚)	구조식				



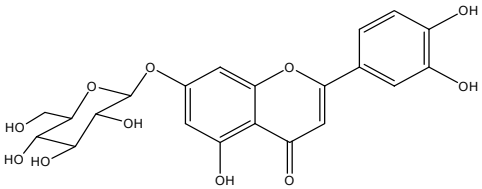
보관조건 ; 실온, desiccator 內.

참고사항
※ 농도 : 0.058 mg/ml (초기이동상)
※ MeOH - 가용. $CHCl_3$ - 불용.
※ Mobile phase

Time (min)	CH_3CN with 0.1% HCOOH	H_2O with 0.1% HCOOH
0	15	85
10	20	80
30	35	65
35	35	65
40	15	85

Korea Food & Drug Administration

순 도 성 적 서

화합물명	Luteolin 7-*O*-glucoside		한약재명	금은화 (*Lonicera japonica*, Flower)		
			화학식	$C_{15}H_{16}O_{10}$	분자량	356
순 도	95.8%	제조년월일	2008. 9.			
분석조건	**Column**; Shiseido CAPCELL PAK C18 UG120 (5㎛, 4.6 x 150 ㎜) **Mobile phase**; CH_3CN with 0.1% HCOOH-H_2O with 0.1% HCOOH gradient.(참고사항참조) **Flow rate**; 0.3 ㎖/min **Detector**; UV(300 ㎚)	구조식				

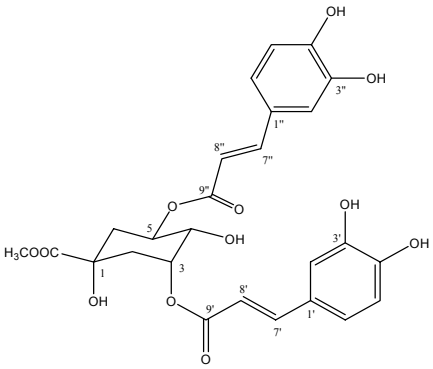
보관조건 ; 실온, desiccator 內.

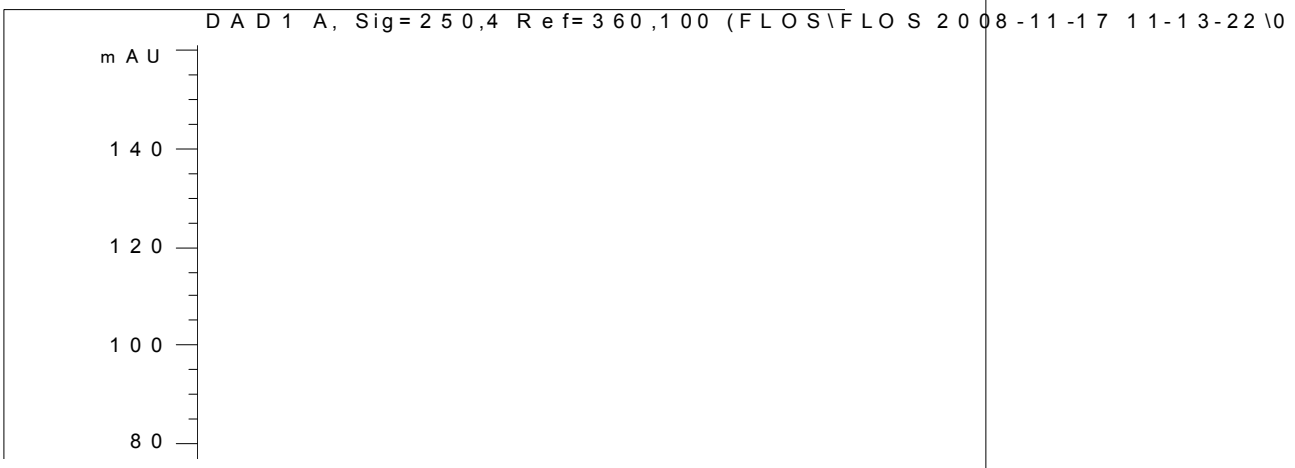
참고사항
※ 농도 : 0.056 mg/ml (pyridine)
※ Pyridine, DMSO - 가용.
※ Mobile phase

Time (min)	CH_3CN with 0.1% HCOOH	H_2O with 0.1% HCOOH
0	15	85
10	20	80
30	35	65
35	35	65
40	15	85

Korea Food & Drug Administration

순 도 성 적 서

화합물명	3,5-Dicaffeoylquinic acid methyl ester		한약재명	금은화 (*Lonicera japonica*, Flower)		
			화학식	$C_{26}H_{26}O_{12}$	분자량	530
순 도	90.5%	제조년월일	2008. 11.			
분석조건	**Column**; Shiseido CAPCELL PAK C18 UG120 (5㎛, 4.6 x 150 ㎜) **Mobile phase**; CH_3CN with 0.1% HCOOH-H_2O with 0.1% HCOOH gradient.(참고사항참조) **Flow rate**; 0.3 ㎖/min **Detector**; UV(250 ㎚)	구조식				



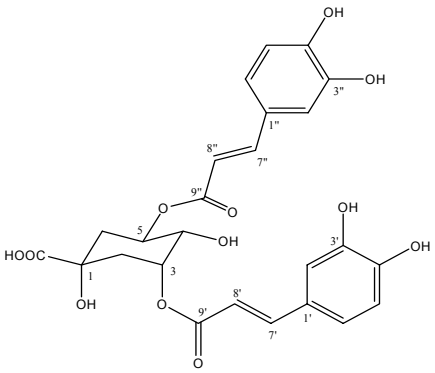
보관조건 ; 실온, desiccator 內.

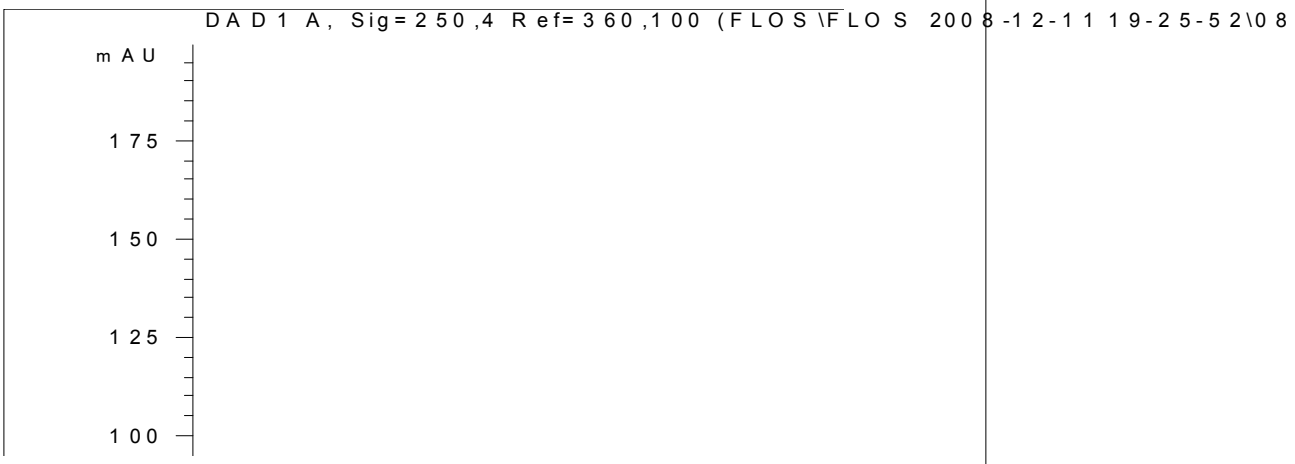
참고사항
※ 농도 : 0.117 mg/ml (초기이동상)
※ MeOH - 가용. $CHCl_3$ - 불용.
※ Mobile phase

Time (min)	CH_3CN with 0.1% HCOOH	H_2O with 0.1% HCOOH
0	15	85
10	20	80
30	35	65
35	35	65
40	15	85

Korea Food & Drug Administration

순 도 성 적 서

화합물명	3,5-Dicaffeoylquinic acid		한약재명	금은화 (*Lonicera japonica*, Flower)		
			화학식	$C_{25}H_{24}O_{12}$	분자량	516
순 도	99.9%	제조년월일	2008. 12.			
분석조건	**Column**; Shiseido CAPCELL PAK C18 UG120 (5㎛, 4.6 x 150 ㎜) **Mobile phase**; CH_3CN with 0.1% HCOOH-H_2O with 0.1% HCOOH gradient.(참고사항참조) **Flow rate**; 0.3 ㎖/min **Detector**; UV(250 ㎚)	구조식				



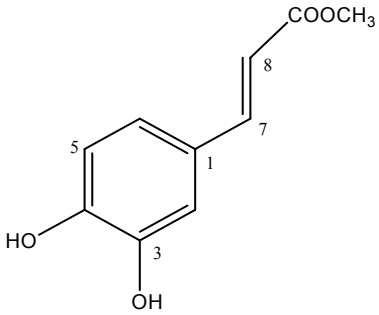
보관조건 ; 실온, desiccator 內.

참고사항
※ 농도 : 0.055 mg/ml (초기이동상)
※ MeOH - 가용. $CHCl_3$ - 불용.
※ Mobile phase

Time (min)	CH_3CN with 0.1% HCOOH	H_2O with 0.1% HCOOH
0	15	85
10	20	80
30	35	65
35	35	65
40	15	85

Korea Food & Drug Administration

순 도 성 적 서

화합물명	Caffeic acid methyl ester		한약재명	금은화 (*Lonicera japonica*, Flower)		
			화학식	$C_{10}H_{10}O_4$	분자량	194
순 도	99.8%	제조년월일	2008. 9.			
분석조건	**Column**; Shiseido CAPCELL PAK C18 UG120 (5㎛, 4.6 x 150 ㎜) **Mobile phase**; CH_3CN with 0.1% HCOOH-H_2O with 0.1% HCOOH gradient.(참고사항참조) **Flow rate**; 0.3 ㎖/min **Detector**; UV(300 ㎚)	구조식				

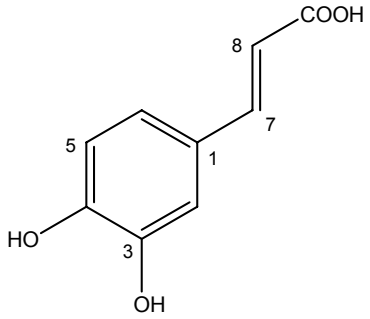
보관조건 ; 실온, desiccator 內.

참고사항
※ 농도 : 0.052 mg/ml (초기이동상)
※ MeOH - 가용. H_2O, $CHCl_3$ - 불용.
※ Mobile phase

Time (min)	CH_3CN with 0.1% HCOOH	H_2O with 0.1% HCOOH
0	15	85
10	20	80
30	35	65
35	35	65
40	15	85

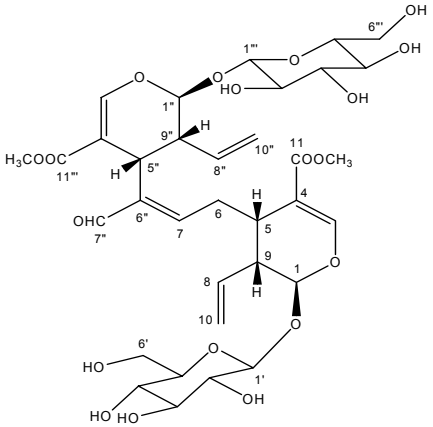
Korea Food & Drug Administration

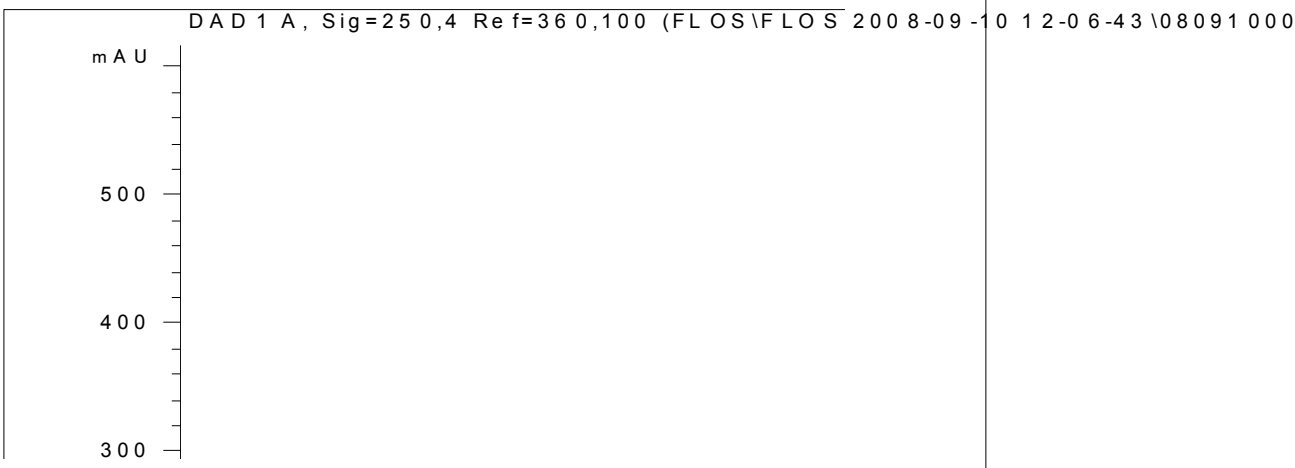
순 도 성 적 서

<table>
<tr><td>화합물명</td><td colspan="2">Caffeic acid</td><td>한약재명</td><td colspan="3">금은화
(Lonicera japonica, Flower)</td></tr>
<tr><td></td><td colspan="2"></td><td>화학식</td><td>$C_9H_8O_4$</td><td>분자량</td><td>180</td></tr>
<tr><td>순 도</td><td>99.9%</td><td>제조년월일</td><td colspan="3">2008. 12.</td></tr>
<tr><td>분석조건</td><td colspan="2">Column; Shiseido CAPCELL PAK C18 UG120 (5㎛, 4.6 x 150 ㎜)
Mobile phase; MeOH with 0.1% HCOOH-H_2O with 0.1% HCOOH gradient.(참고사항참조)
Flow rate; 0.3 ㎖/min
Detector; UV(300 ㎚)</td><td>구조식</td><td colspan="3"> 
</td></tr>
<tr><td colspan="7">
</td></tr>
<tr><td colspan="7">보관조건 ; 실온, desiccator 內.</td></tr>
<tr><td colspan="7">참고사항 ※ 농도 : 0.053 mg/ml (초기이동상)
※ MeOH, H_2O - 가용.
※ Mobile phase
<table>
<tr><th>Time (min)</th><th>MeOH with 0.1% HCOOH</th><th>H_2O with 0.1% HCOOH</th></tr>
<tr><td>0</td><td>20</td><td>80</td></tr>
<tr><td>15</td><td>35</td><td>65</td></tr>
<tr><td>25</td><td>65</td><td>35</td></tr>
<tr><td>30</td><td>65</td><td>35</td></tr>
<tr><td>35</td><td>20</td><td>80</td></tr>
</table></td></tr>
</table>

Korea Food & Drug Administration

순 도 성 적 서

화합물명	Centauroside		한약재명	금은화 (*Lonicera japonica*, Flower)		
			화학식	$C_{34}H_{46}O_{19}$	분자량	758
순 도	94.9%	제조년월일	2008. 9.			
분석조건	**Column**; Shiseido CAPCELL PAK C18 UG120 (5㎛, 4.6 x 150 ㎜) **Mobile phase**; CH_3CN with 0.1% HCOOH-H_2O with 0.1% HCOOH gradient.(참고사항참조) **Flow rate**; 0.3 ㎖/min **Detector**; UV(250 ㎚)	구조식				



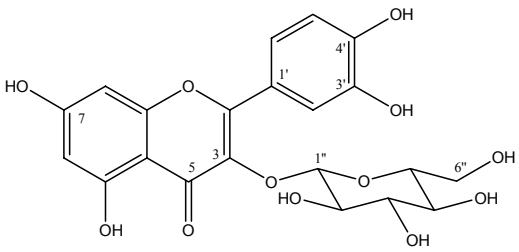
보관조건 ; 실온, desiccator 內.

참고사항
※ 농도 : 0.054 mg/ml (초기이동상)
※ MeOH - 가용. $CHCl_3$ - 불용.
※ Mobile phase

Time (min)	CH_3CN with 0.1% HCOOH	H_2O with 0.1% HCOOH
0	15	85
10	20	80
30	35	65
35	35	65
40	15	85

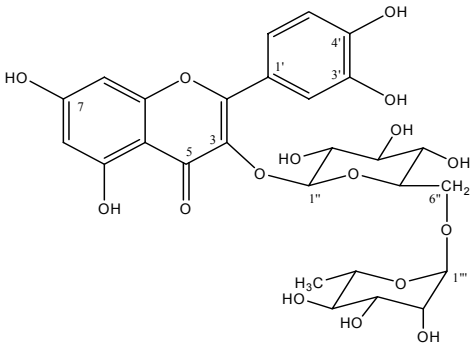
Korea Food & Drug Administration

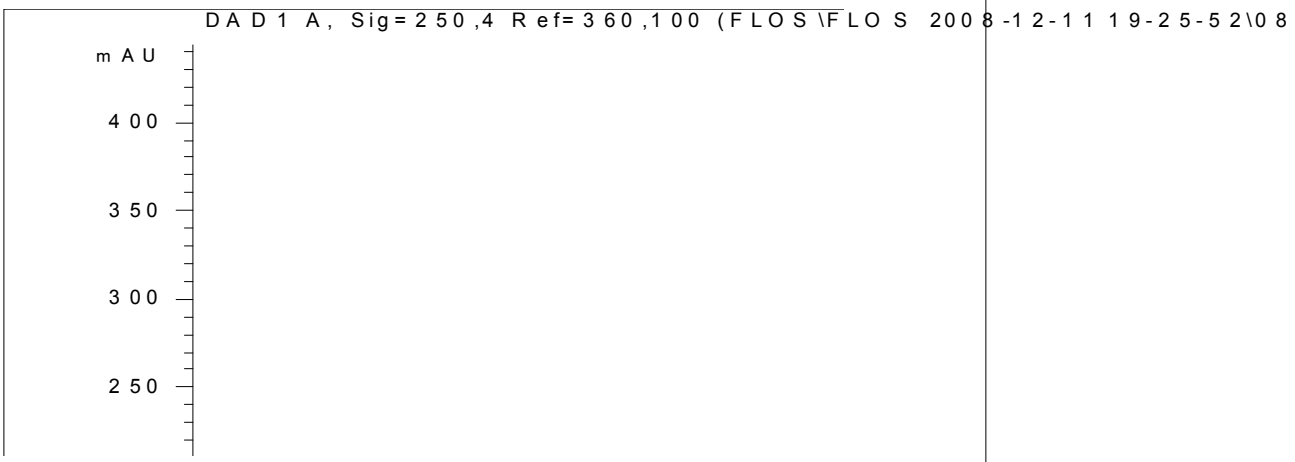
순 도 성 적 서

<table>
<tr><td rowspan="2">화합물명</td><td rowspan="2" colspan="2">Isoquercitrin</td><td>한약재명</td><td colspan="3">금은화
(Lonicera japonica, Flower)</td></tr>
<tr><td>화학식</td><td>$C_{21}H_{20}O_{12}$</td><td>분자량</td><td>464</td></tr>
<tr><td>순 도</td><td>92.4%</td><td>제조년월일</td><td colspan="3">2008. 12.</td></tr>
<tr><td>분석조건</td><td colspan="2">Column; Shiseido CAPCELL PAK C18 UG120 (5㎛, 4.6 x 150 ㎜)
Mobile phase; CH_3CN with 0.1% HCOOH-H_2O with 0.1% HCOOH gradient.(참고사항참조)
Flow rate; 0.3 ㎖/min
Detector; UV(360 ㎚)</td><td>구조식</td><td colspan="3">  </td></tr>
<tr><td colspan="6">
</td></tr>
<tr><td colspan="6">보관조건 ; 실온, desiccator 內.</td></tr>
<tr><td>참고사항</td><td colspan="5">※ 농도 : 1.16 mg/ml (pyridine)
※ Pyridine, DMSO, MeOH - 가용. $CHCl_3$ - 불용.
※ Mobile phase
<table>
<tr><th>Time (min)</th><th>CH_3CN with 0.1% HCOOH</th><th>H_2O with 0.1% HCOOH</th></tr>
<tr><td>0</td><td>15</td><td>85</td></tr>
<tr><td>10</td><td>20</td><td>80</td></tr>
<tr><td>30</td><td>60</td><td>40</td></tr>
<tr><td>35</td><td>60</td><td>40</td></tr>
<tr><td>40</td><td>15</td><td>85</td></tr>
</table></td></tr>
</table>

Korea Food & Drug Administration

순 도 성 적 서

화합물명	Rutin		한약재명	금은화 (*Lonicera japonica*, Flower)		
			화학식	$C_{27}H_{30}O_{16}$	분자량	610
순 도	92.1%	제조년월일	2008. 12.			
분석조건	**Column**; Shiseido CAPCELL PAK C18 UG120 (5㎛, 4.6 x 150 ㎜) **Mobile phase**; CH_3CN with 0.1% HCOOH-H_2O with 0.1% HCOOH gradient.(참고사항참조) **Flow rate**; 0.3 ㎖/min **Detector**; UV(250 ㎚)	구조식				



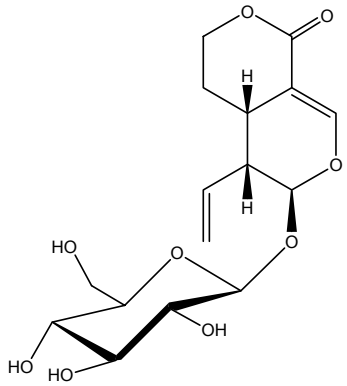
보관조건 ; 실온, desiccator 內.

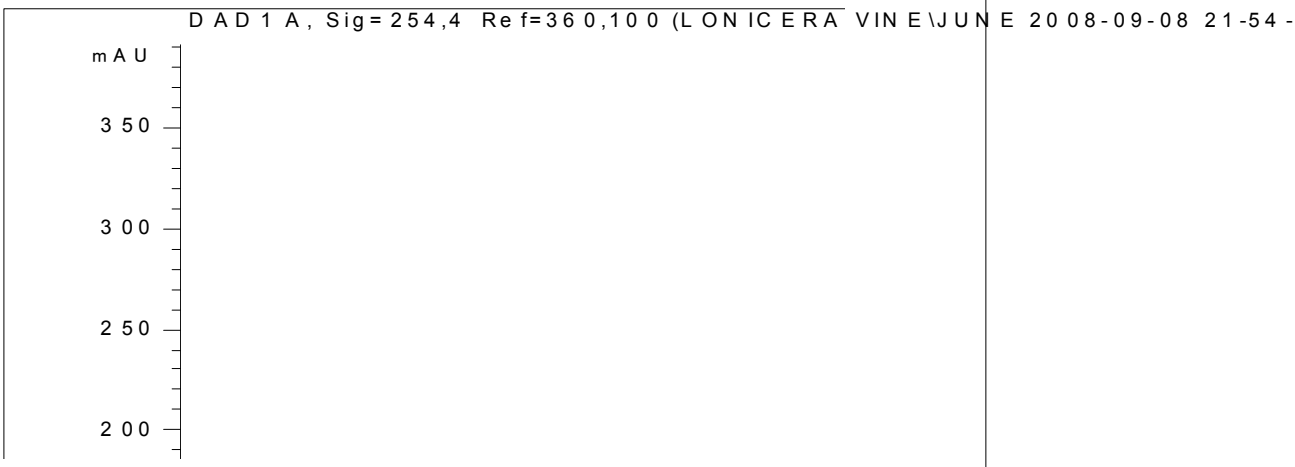
참고사항
※ 농도 : 1.10 mg/ml (pyridine)
※ Pyridine, DMSO, MeOH - 가용. $CHCl_3$ - 불용.
※ Mobile phase

Time (min)	CH_3CN with 0.1% HCOOH	H_2O with 0.1% HCOOH
0	15	85
10	20	80
30	60	40
35	60	40
40	15	85

Korea Food & Drug Administration

순 도 성 적 서

화합물명	Sweroside		한약재명	금은화 (*Lonicera japonica*, Flower)		
			화학식	$C_{16}H_{22}O_9$	분자량	358
순 도	99.5%	제조년월일	2008. 9.			
분석조건	**Column**; Shiseido CAPCELL PAK C18 UG120 (5㎛, 4.6 x 150 ㎜) **Mobile phase**; MeOH with 0.1% HCOOH-H_2O with 0.1% HCOOH gradient.(참고사항참조) **Flow rate**; 0.3 ㎖/min **Detector**; UV(254 ㎚)	구조식				



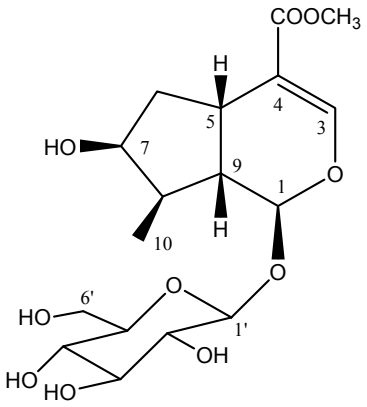
보관조건 ; 실온, desiccator 內.

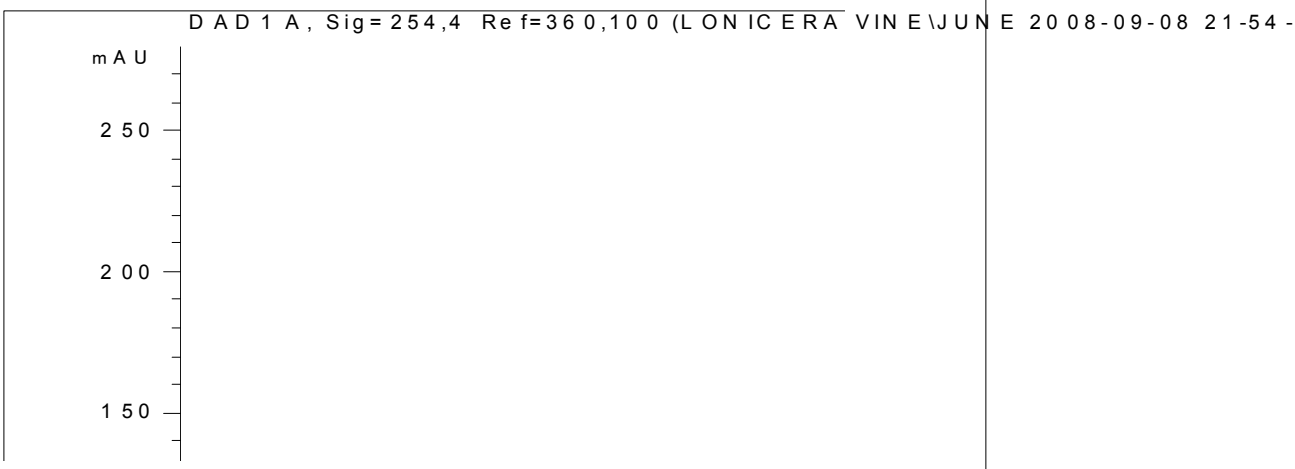
참고사항 ※ 농도 : 0.055 mg/ml (초기이동상)
※ H_2O, MeOH - 가용. $CHCl_3$ - 불용.
※ Mobile phase

Time (min)	MeOH with 0.1% HCOOH	H_2O with 0.1% HCOOH
0	20	80
15	35	65
25	65	35
30	65	35
35	20	80

Korea Food & Drug Administration

순 도 성 적 서

화합물명	Loganin		한약재명	인동 (*Lonicera japonica*, Vine)		
			화학식	$C_{17}H_{26}O_{10}$	분자량	390
순 도	99.9%	제조년월일	2008. 9.			
분석조건	**Column**; Shiseido CAPCELL PAK C18 UG120 (5㎛, 4.6 x 150 ㎜) **Mobile phase**; MeOH with 0.1% HCOOH-H_2O with 0.1% HCOOH gradient.(참고사항참조) **Flow rate**; 0.3 ㎖/min **Detector**; UV(254 ㎚)	구조식				



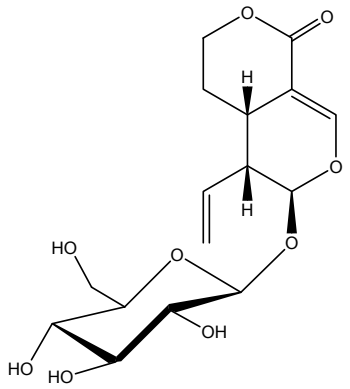
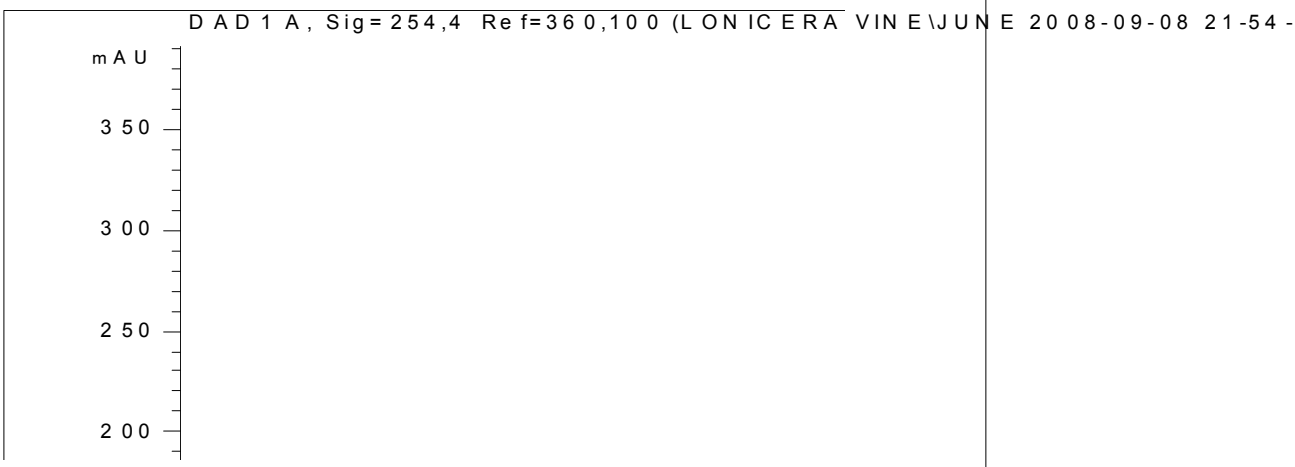
보관조건 ; 실온, desiccator 內.

참고사항
※ 농도 : 0.057 mg/ml (초기이동상)
※ H_2O, MeOH - 가용. $CHCl_3$ - 불용.
※ Mobile phase

Time (min)	MeOH with 0.1% HCOOH	H_2O with 0.1% HCOOH
0	20	80
15	35	65
25	65	35
30	65	35
35	20	80

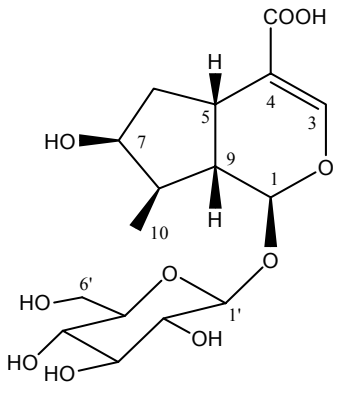
Korea Food & Drug Administration

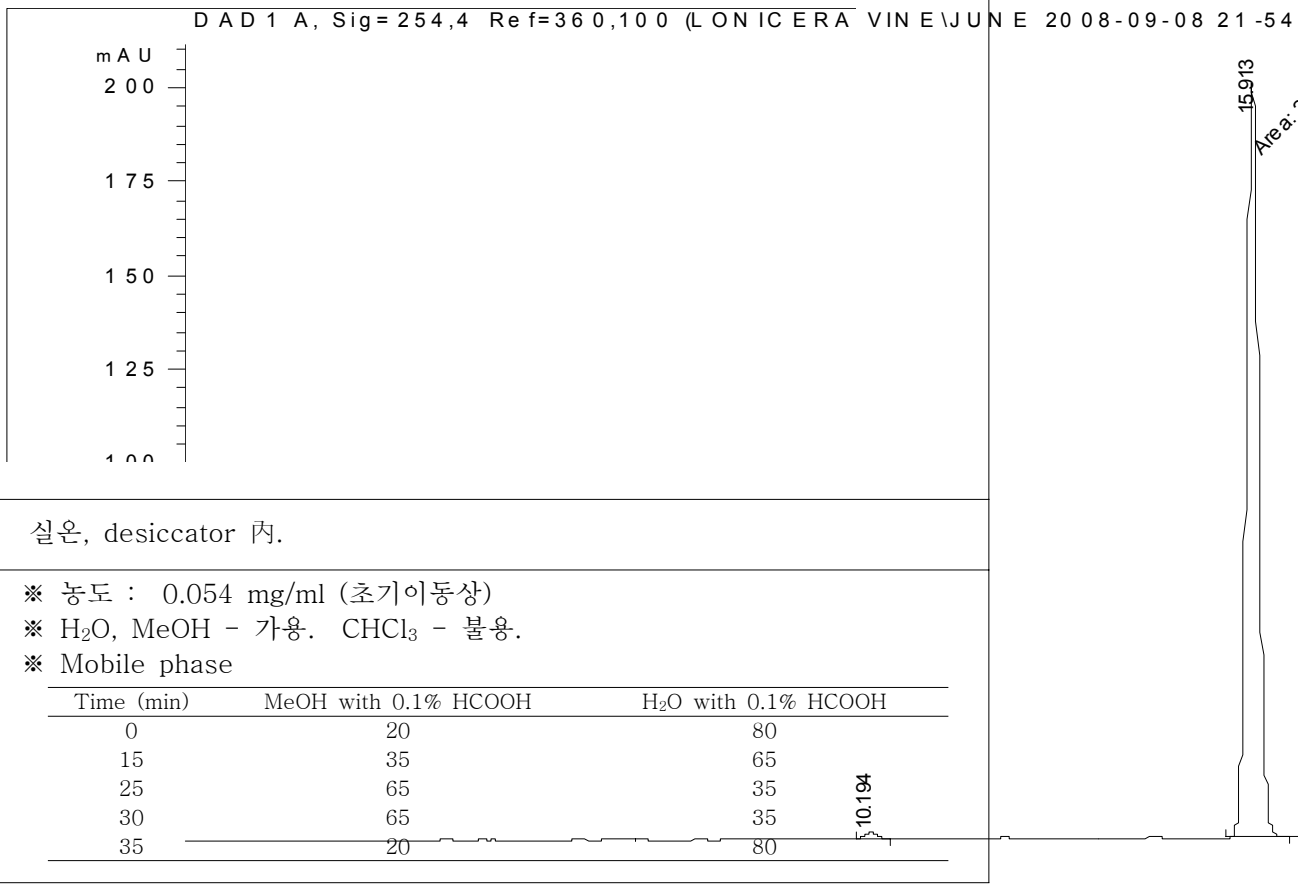
순 도 성 적 서

<table>
<tr><td rowspan="2">화합물명</td><td colspan="2" rowspan="2">Sweroside</td><td>한약재명</td><td colspan="3">인동 (Lonicera japonica, Vine)</td></tr>
<tr><td>화학식</td><td>$C_{16}H_{22}O_9$</td><td>분자량</td><td>358</td></tr>
<tr><td>순 도</td><td>99.5%</td><td>제조년월일</td><td colspan="3">2008. 9.</td></tr>
<tr><td>분석조건</td><td colspan="2">Column; Shiseido CAPCELL PAK C18 UG120 (5㎛, 4.6 x 150 ㎜)
Mobile phase; MeOH with 0.1% HCOOH-H_2O with 0.1% HCOOH gradient.(참고사항참조)
Flow rate; 0.3 ㎖/min
Detector; UV(254 ㎚)</td><td>구조식</td><td colspan="3">  </td></tr>
<tr><td colspan="6"> 
</td></tr>
<tr><td colspan="6">보관조건 ; 실온, desiccator 內.</td></tr>
<tr><td>참고사항</td><td colspan="5">※ 농도 : 0.055 mg/ml (초기이동상)
※ H_2O, MeOH - 가용. $CHCl_3$ - 불용.
※ Mobile phase
<table>
<tr><th>Time (min)</th><th>MeOH with 0.1% HCOOH</th><th>H_2O with 0.1% HCOOH</th></tr>
<tr><td>0</td><td>20</td><td>80</td></tr>
<tr><td>15</td><td>35</td><td>65</td></tr>
<tr><td>25</td><td>65</td><td>35</td></tr>
<tr><td>30</td><td>65</td><td>35</td></tr>
<tr><td>35</td><td>20</td><td>80</td></tr>
</table></td></tr>
</table>

Korea Food & Drug Administration

순 도 성 적 서

화합물명	Loganic acid		한약재명	인동 (*Lonicera japonica*, Vine)		
			화학식	$C_{16}H_{24}O_{10}$	분자량	376
순 도	99.1%	제조년월일	2008. 9.			
분석조건	**Column**; Shiseido CAPCELL PAK C18 UG120 (5㎛, 4.6 x 150 ㎜) **Mobile phase**; MeOH with 0.1% HCOOH-H_2O with 0.1% HCOOH gradient.(참고사항참조) **Flow rate**; 0.3 ㎖/min **Detector**; UV(254 ㎚)	구조식				



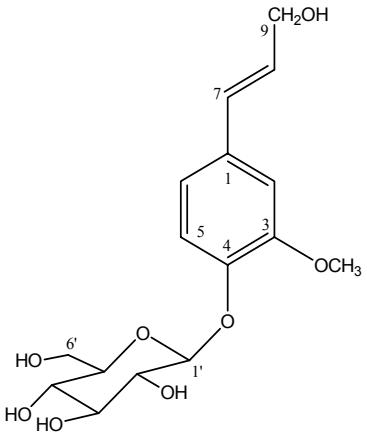
보관조건 ; 실온, desiccator 內.

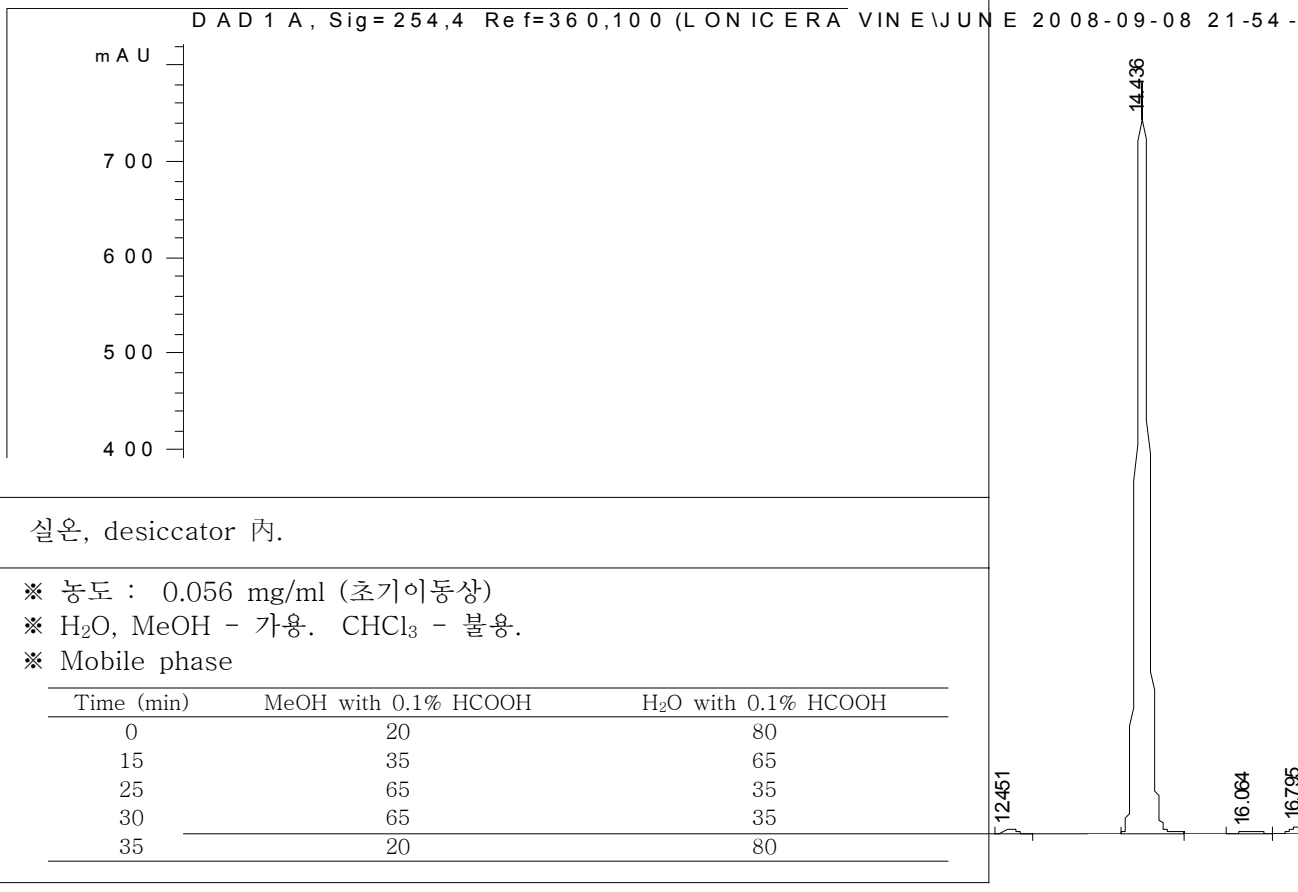
참고사항
※ 농도 : 0.054 mg/ml (초기이동상)
※ H_2O, MeOH - 가용. $CHCl_3$ - 불용.
※ Mobile phase

Time (min)	MeOH with 0.1% HCOOH	H_2O with 0.1% HCOOH
0	20	80
15	35	65
25	65	35
30	65	35
35	20	80

Korea Food & Drug Administration

순 도 성 적 서

화합물명	Coniferin		한약재명	인동 (*Lonicera japonica*, Vine)		
			화학식	$C_{16}H_{22}O_8$	분자량	342
순 도	97.5%	제조년월일	2008. 9.			
분석조건	**Column**; Shiseido CAPCELL PAK C18 UG120 (5㎛, 4.6 x 150 ㎜) **Mobile phase**; MeOH with 0.1% HCOOH-H_2O with 0.1% HCOOH gradient.(참고사항참조) **Flow rate**; 0.3 ㎖/min **Detector**; UV(254 ㎚)	구조식				



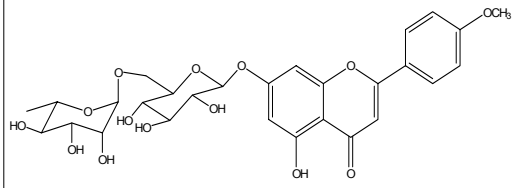
보관조건 ; 실온, desiccator 內.

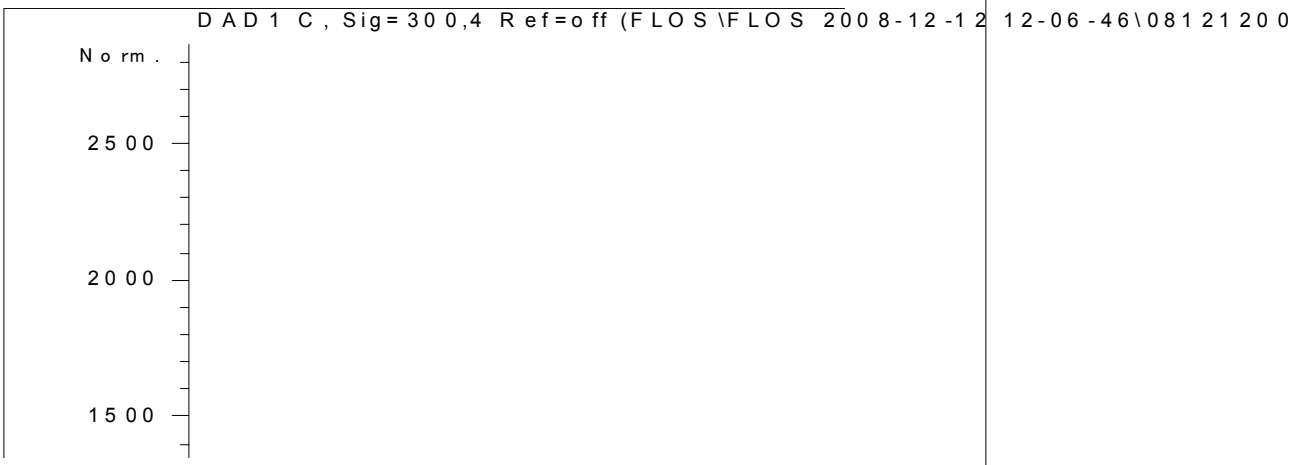
참고사항
※ 농도 : 0.056 mg/ml (초기이동상)
※ H_2O, MeOH - 가용. $CHCl_3$ - 불용.
※ Mobile phase

Time (min)	MeOH with 0.1% HCOOH	H_2O with 0.1% HCOOH
0	20	80
15	35	65
25	65	35
30	65	35
35	20	80

Korea Food & Drug Administration

순 도 성 적 서

화합물명	Linarin		한약재명	인동 (*Lonicera japonica*, Vine)		
			화학식	$C_{28}H_{32}O_{14}$	분자량	592
순 도	92.5%	제조년월일	2008. 12.			
분석조건	**Column**; Shiseido CAPCELL PAK C18 UG120 (5㎛, 4.6 x 150 ㎜) **Mobile phase**; CH_3CN with 0.1% HCOOH-H_2O with 0.1% HCOOH gradient.(참고사항참조) **Flow rate**; 0.3 ㎖/min **Detector**; UV(300 ㎚)	구조식				



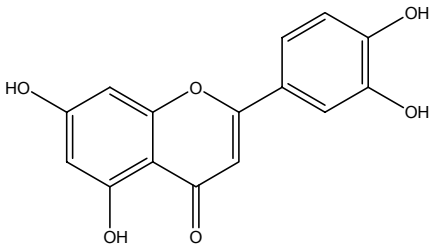
보관조건 ; 실온, desiccator 內.

참고사항
※ 농도 : 1.04 mg/ml (pyridine)
※ Pyridine, DMSO - 가용. MeOH - 난용. H_2O, $CHCl_3$ - 불용.
※ Mobile phase

Time (min)	CH_3CN with 0.1% HCOOH	H_2O with 0.1% HCOOH
0	15	85
10	20	80
30	60	40
35	60	40
40	15	85

Korea Food & Drug Administration

순 도 성 적 서

화합물명	Luteolin		한약재명	인동 (*Lonicera japonica*, Vine)		
			화학식	$C_{15}H_{10}O_6$	분자량	286
순 도	96.6%	제조년월일	2008. 12.			
분석조건	**Column**; Shiseido CAPCELL PAK C18 UG120 (5㎛, 4.6 x 150 ㎜) **Mobile phase**; CH_3CN with 0.1% HCOOH-H_2O with 0.1% HCOOH gradient.(참고사항참조) **Flow rate**; 0.3 ㎖/min **Detector**; UV(360 ㎚)	구조식				

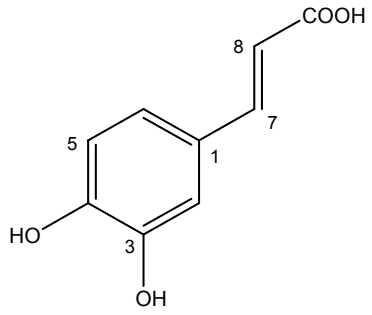
보관조건 ; 실온, desiccator 內.

참고사항 ※ 농도 : 1.14 mg/ml (pyridine)
※ pyridine, DMSO, MeOH - 가용. H_2O, $CHCl_3$ - 불용.
※ Mobile phase

Time (min)	CH_3CN with 0.1% HCOOH	H_2O with 0.1% HCOOH
0	15	85
10	20	80
30	60	40
35	60	40
40	15	85

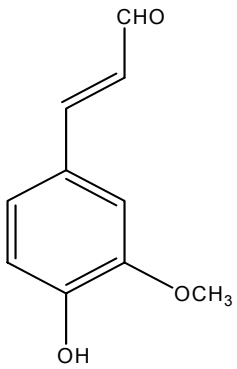
Korea Food & Drug Administration

순 도 성 적 서

<table>
<tr><td rowspan="2">화합물명</td><td rowspan="2" colspan="2">Caffeic acid</td><td>한약재명</td><td colspan="3">인동 (Lonicera japonica, Vine)</td></tr>
<tr><td>화학식</td><td>$C_9H_8O_4$</td><td>분자량</td><td>180</td></tr>
<tr><td>순 도</td><td>99.9%</td><td>제조년월일</td><td colspan="3">2008. 12.</td></tr>
<tr><td>분석조건</td><td colspan="2">Column; Shiseido CAPCELL PAK C18 UG120 (5㎛, 4.6 x 150 ㎜)
Mobile phase; MeOH with 0.1% HCOOH-H_2O with 0.1% HCOOH gradient.(참고사항참조)
Flow rate; 0.3 ㎖/min
Detector; UV(300 ㎚)</td><td>구조식</td><td colspan="3"> 
</td></tr>
<tr><td colspan="6">
</td></tr>
<tr><td colspan="6">보관조건 ; 실온, desiccator 內.</td></tr>
<tr><td>참고사항</td><td colspan="5">※ 농도 : 0.053 mg/ml (초기이동상)
※ MeOH, H_2O - 가용.
※ Mobile phase
<table>
<tr><th>Time (min)</th><th>MeOH with 0.1% HCOOH</th><th>H_2O with 0.1% HCOOH</th></tr>
<tr><td>0</td><td>20</td><td>80</td></tr>
<tr><td>15</td><td>35</td><td>65</td></tr>
<tr><td>25</td><td>65</td><td>35</td></tr>
<tr><td>30</td><td>65</td><td>35</td></tr>
<tr><td>35</td><td>20</td><td>80</td></tr>
</table></td></tr>
</table>

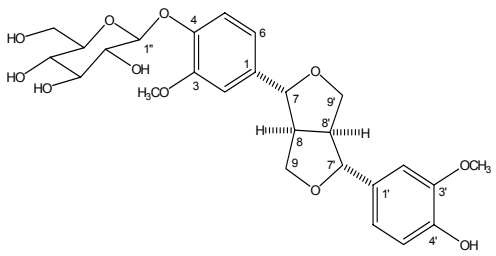
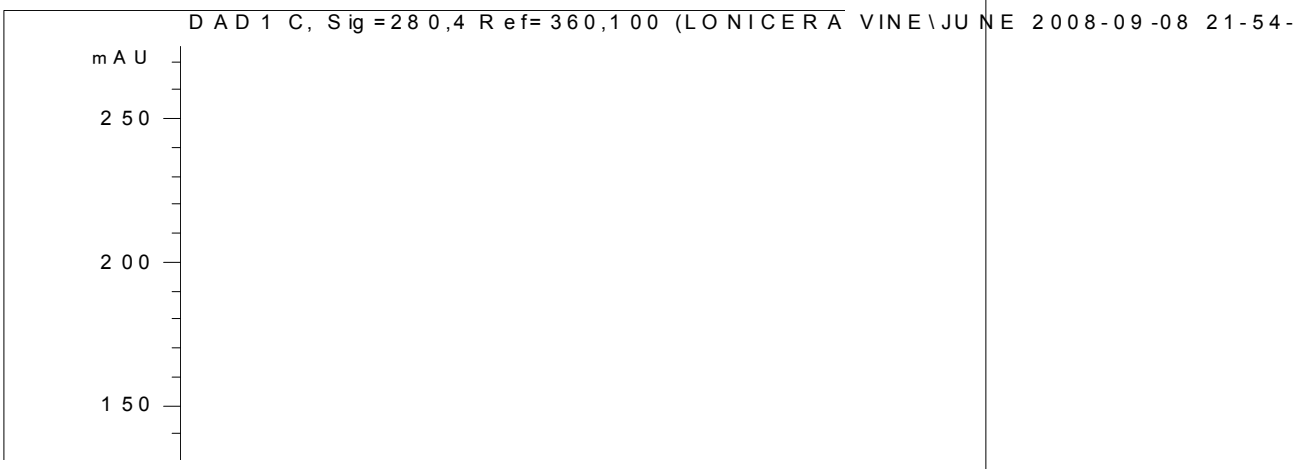
Korea Food & Drug Administration

순 도 성 적 서

<table>
<tr><td rowspan="2">화합물명</td><td rowspan="2" colspan="2">Coniferylaldehyde</td><td>한약재명</td><td colspan="3">인동 (Lonicera japonica, Vine)</td></tr>
<tr><td>화학식</td><td>$C_{10}H_{10}O_8$</td><td>분자량</td><td>178</td></tr>
<tr><td>순 도</td><td>99.9%</td><td>제조년월일</td><td colspan="3">2008. 12.</td></tr>
<tr><td>분석조건</td><td colspan="2">Column; Shiseido CAPCELL PAK C18 UG120 (5㎛, 4.6 x 150 ㎜)
Mobile phase; MeOH with 0.1% HCOOH-H_2O with 0.1% HCOOH gradient.(참고사항참조)
Flow rate; 0.3 ㎖/min
Detector; UV(300 ㎚)</td><td>구조식</td><td colspan="3"> 
</td></tr>
<tr><td colspan="6">
</td></tr>
<tr><td colspan="6">보관조건 ; 실온, desiccator 內.</td></tr>
<tr><td colspan="6">참고사항 ※ 농도 : 0.056 mg/ml (초기이동상)
※ $CHCl_3$, MeOH - 가용.
※ Mobile phase
<table>
<tr><th>Time (min)</th><th>MeOH with 0.1% HCOOH</th><th>H_2O with 0.1% HCOOH</th></tr>
<tr><td>0</td><td>20</td><td>80</td></tr>
<tr><td>15</td><td>35</td><td>65</td></tr>
<tr><td>25</td><td>65</td><td>35</td></tr>
<tr><td>30</td><td>65</td><td>35</td></tr>
<tr><td>35</td><td>20</td><td>80</td></tr>
</table></td></tr>
</table>

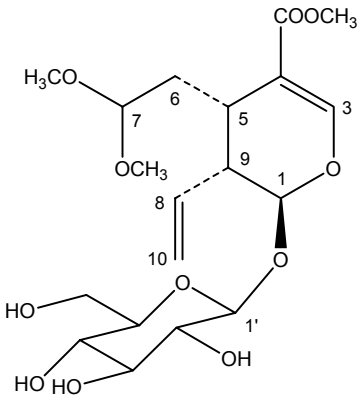
Korea Food & Drug Administration

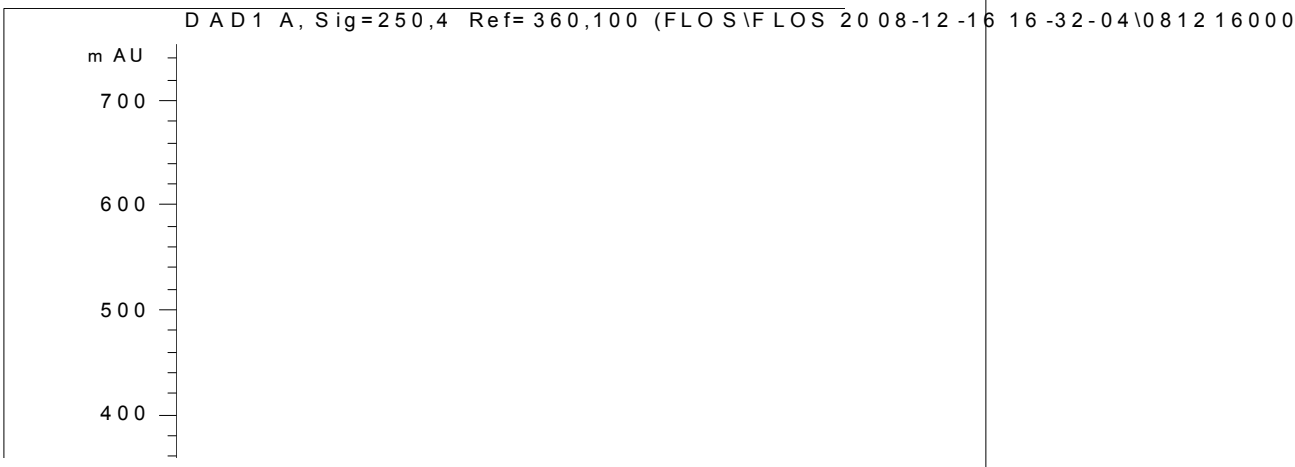
순 도 성 적 서

<table>
<tr><td rowspan="2">화합물명</td><td colspan="2" rowspan="2">Pinoresinol 4-O-glucoside</td><td>한약재명</td><td colspan="3">인동 (Lonicera japonica, Vine)</td></tr>
<tr><td>화학식</td><td>$C_{26}H_{32}O_{11}$</td><td>분자량</td><td>520</td></tr>
<tr><td>순 도</td><td>97.6%</td><td>제조년월일</td><td colspan="3">2008. 9.</td></tr>
<tr><td>분석조건</td><td>Column; Shiseido CAPCELL PAK C18 UG120 (5㎛, 4.6 x 150 ㎜)
Mobile phase; MeOH with 0.1% HCOOH-H_2O with 0.1% HCOOH gradient.(참고사항참조)
Flow rate; 0.3 ㎖/min
Detector; UV(280 ㎚)</td><td>구조식</td><td colspan="3">  </td></tr>
<tr><td colspan="4"> 
</td></tr>
<tr><td colspan="4">보관조건 ; 실온, desiccator 內.</td></tr>
<tr><td>참고사항</td><td colspan="3">※ 농도 : 0.056 mg/ml (초기이동상)
※ MeOH, H_2O - 가용. $CHCl_3$ - 불용.
※ Mobile phase
<table>
<tr><th>Time (min)</th><th>MeOH with 0.1% HCOOH</th><th>H_2O with 0.1% HCOOH</th></tr>
<tr><td>0</td><td>20</td><td>80</td></tr>
<tr><td>15</td><td>35</td><td>65</td></tr>
<tr><td>25</td><td>65</td><td>35</td></tr>
<tr><td>30</td><td>65</td><td>35</td></tr>
<tr><td>35</td><td>20</td><td>80</td></tr>
</table></td></tr>
</table>

Korea Food & Drug Administration

순 도 성 적 서

화합물명	Secologanin dimethyl acetal		한약재명	인동 (*Lonicera japonica*, Vine)		
			화학식	$C_{19}H_{30}O_{11}$	분자량	434
순 도	95.3%	제조년월일	2008. 12.			
분석조건	**Column**; Shiseido CAPCELL PAK C18 UG120 (5㎛, 4.6 x 150 ㎜) **Mobile phase**; MeOH with 0.1% HCOOH-H_2O with 0.1% HCOOH gradient.(참고사항참조) **Flow rate**; 0.3 ㎖/min **Detector**; UV(250 ㎚)	구조식				



보관조건 ; 실온, desiccator 內. ※ 산성의 용매에서 분해하므로 주의요망.

참고사항
※ 농도 : 0.054 mg/ml (초기이동상)
※ MeOH, H_2O - 가용.
※ Mobile phase

Time (min)	MeOH with 0.1% HCOOH	H_2O with 0.1% HCOOH
0	20	80
15	35	65
25	65	35
30	65	35
35	20	80

제1세부연구개발과제 연구결과

세부과제명 : 금은화 및 인동으로부터 한약재 생리활성성분의 분리

세부과제책임자 : 강삼식/서울대학교

제1장 세부연구개발과제의 최종 연구개발 목표

1.1 세부연구개발과제의 목표

인동의 주성분이며 다양한 생리활성이 보고 된 loganin, sweroside, loganic acid를 비롯한 iridoid성분, flavonoid성분들인 linarin, luteolin과 caffeic acid 같은 phenol성 화합물들을 크로마토그라피를 실시하여 분리한다. 또한 금은화의 주성분이며 다양한 생리활성이 보고 된 chlorogenic acid를 비롯한 chlorogenic acid 유도체들과, iridoid 및 기타 성분들을 크로마토그라피를 실시하여 분리한다. 분리한 화합물들에 대하여서는 화학적 및 분광학적 방법을 이용하여 각각의 화학구조를 구명한 후 생리활성 검색을 위한 시료와 인동/금은화의 동시분석법 개발을 위한 시료로 제공하며, 유효성분들에 대하여 제출용 시료를 확보하고자 한다.

1.2 세부연구개발과제의 목표달성도

인동의 70% EtOH엑스를 제조하고 분획하여 얻은 이들 분획들에 대하여 크로마토그라피를 반복 실시하여 다음과 같은 물질들을 분리하였다. 즉 hexane분획으로부터 long-chain alcohol성분들인 *n*-docosanol (behenyl alcohol), *n*-tetracosanol (lignoceryl alcohol) 및 *n*-eicosanol을 혼합물 형태로 얻어 확인하였으며, triterpene계 성분인 (24*S*)-cycloart-25-en-3β,24-diol을 분리하였다. CH_2Cl_2분획으로부터 trilinolein, C_{16}-C_{26}의 지방산 혼합물, *n*-hexacosanol같은 hydrocarbon alcohol, obtusifoliol, gramisterol, citrostadienol과 같은 4α-methyl ergosterol 유도체들과, β-sitosterol을 분리하여 확인하였다. 또한 bis(2-ethylhexyl)phthalate 외에 coniferaldehyde 및 caffeic acid docosanoyl ester를 분리하였다. EtOAc분획도 각종 크로마토그라피를 반복 실시하여 triterpene계 화합물들인 pomolic acid, ursolic acid, euscaphic acid, hederagenin, 23-hydroxytormentic acid를 분리 확인하였고, iridoid인 secologanin dimethyl acetal, sweroside를 분리하였다. 이외에도 caffeic acid, coniferyl aldehyde 4-*O*-glucoside와, 9α-hydroxypinoresinol, pinoresinol glucoside, (+)-5-demethyl-3-methoxyisolariciresinol, (7*R*,8*R*)-*threo*-4,7,9,3′,9′-pentahydroxy-3-methoxy-8-*O*-4′-neolignan 같은 lignan 성분들을 분리 규명하였으며, pinellic acid와 9,12,13-trihydroxyoctadeca-10(*E*),15(*Z*)-dienoic acid같은 polyoxygenated C_{18} 지방산 계열의 화합물들 외에 flavonoid성분인 linarin과 daucosterol를 분리 확인하였다. BuOH분획으로부터는 coniferin과, iridoid인 loganin, loganic acid 및 demethylsecologanol을 분리 확인하여 인동으로부터 총 34종의 화합물들을 분리확인하였다. 분리된 화합물들 중 lignan성분인 (+)-5-demethyl-3-methoxyisolariciresinol은 처음 분리된 신물질이다.

금은화로부터도 인동과같이 분획을 실시하여 TLC pattern이 같은 hexane분획 및 CH_2Cl_2분획으로부터 *n*-nonacosane과 *n*-hexacosanol같은 hydrocarbon alcohol 및 monoacylglycerol계열인 monopalmitin을 분리하였으며, EtOAc분획으로부터 luteolin, luteolin 7-*O*-glucoside, flavoyadorinin-B, isoquercitrin, rhoifolin, rutin 등의 6종의 flavonoid 성분과, chlorogenic acid, methyl chlorogenate, 3,5-dicaffeoylquinic acid, 3,5-dicaffeoylquinic acid methyl ester, 4,5-dicaffeoylquinic acid, 4,5-dicaffeoylquinic acid methyl ester같은 chlorogenic acid 유도체 6종, 7-ketologanin, secologanin dimethyl acetal 및 (*E*)-aldosecologanin 같은 iridoid 성분들과, protocatechuic acid, caffeic acid, vanillic acid 4-*O*-β-D-(6-*O*-benzoylglucopyranoside) 등의 phenylpropanoid성분들 이외에 coumarin성분인 esculetin, 이외에도 β-sitosterol 및 이의 glucose 배당체인 daucosterol, dicarboxylic acid계 지방산의 일종인 azelaic acid와 uracil 및 cerebroside

도 분리하였다. BuOH분획으로부터는 sucrose 이외에 iridoid 성분인 epivogeloside와, chlorogenic acid를 분리하여 규명하였다. 따라서 금은화로부터도 총 29종의 화합물들을 분리 확인하였으며, 이중 vanillic acid 4-*O*-β-D-(6-*O*-benzoylglucopyranoside)는 처음으로 분리된 신물질이다.

1.3 국내·외 기술개발 현황

인동덩굴 (*Lonicera japonica*)의 줄기를 인동등 (忍冬藤), 꽃을 금은화 (金銀花)라고 하여 한방에서 사용되고 있는 약재로서, 대한민국약전 9개정 수재품목 (173품목)의 개정안에는 인동덩굴의 꽃봉오리 또는 막 피기 시작한 꽃으로 규정한 금은화 (Lonicera Flower, 金銀花) 와, 인동덩굴의 잎 및 덩굴성 줄기로 규정한 인동 (Lonicera Caulis, 忍冬)의 두 품목이 규정되어 있다. 인동의 성분연구는 90년대 초반부터 연구되기 시작하여 현재 많은 성분들이 분리되어 있다. 이들 성분들을 화합물군으로 대별하면 flavonoid, iridoid, saponin 및 기타 phenol성 화합물들로 대별할 수 있다. Flavonoid성분으로는 quercetin, ochnaflavone, ochnaflavone 4'-*O*-methyl ether, astragalin, isoquercitrin, rhoifolin, diosmetin 7-*O*-glucoside, lonicerin 등을 연구자들이 분리하여 구조를 규명하여 보고한 바 있으며,[1,2] Kumar 등[3]도 인동으로부터 luteolin, chrysin, 3'-*O*-methylloniflavone 및 loniflavone 등을 분리 보고한바 있다. Qian 등[4]은 HPLC로 rutin, luteolin 7-*O*-glucoside 등을 확인하여 보고한 바 있다. Iridoid 성분으로는 loganin, sweroside, secologanin 이외에 secoxyloganin, vogeloside, epivogeloside, L-phenylalaninosecologanin, 7-*O*-(4-β-D-glucopyranosyloxy-3-methoxybenzoyl)secologanolic acid, 6'-*O*-(7α-hydroxyswerosyloxy)loganin, (*Z*)-aldosecologanin, (*E*)-aldo secologanin, secologanin dimethylacetal, 7-*O*-butylsecologanic acid[4-8] 등이 분리되어 보고한 바 있다. Saponin 성분으로는 연구자들이 분리한 loniceroside A, B[9] loniceroside C[10] 외에, 3-*O*-α-L-rhamnopyranosyl(1→2)-α-L-arabinopyranosyl hederagenin 28-*O*-[3-*O*-acetyl-β-D-xylopyranosyl(1→6)-β-D-glucopyranoside, 3-*O*-α-L-rhamnopyranosyl(1→2)-α-L-arabinopyranosyl hederagenin 28-*O*-β-D-xylopyranosyl(1→6)-β-D-glucopyranoside, hederagenin 3-*O*-α-L-arabinopyranoside, hederagenin 3-*O*-β-D-glucopyranosyl(1→2)-α-L-arabinopyranoside, hederagenin 3-*O*-α-L-rhamnopyranosyl(1→2)-α-L-arabinopyranoside, 3-*O*-α-L-arabinopyranosyl hederagenin 28-*O*-β-D-glucopyranosyl (1→6)-β-D-glucopyranoside, 3-*O*-β-D-glucopyranosyl(1→2)-α-L-arabinopyranosyl hederagenin 28-*O*-β-D-glucopyranosyl(1→6)-β-D-glucopyranoside, 3-*O*-α-L-rhamnopyranosyl(1→2)-α-L-arabinopyranosyl hedearagenin 28-*O*-β-D-glucopyranoside, 3-*O*-α-L-rhamnopyranosyl(1→2)-α-L-arabinopyranosyl hederagenin 28-*O*-β-D-glucopyranosyl(1→6)-β-D-glucopyranoside, 3-*O*-α-L-rhamnopyranosyl(1→2)-α-L-arabinopyranosyl hederagenin 28-*O*-[6-*O*-acetyl-β-D-glucopyranosyl](1→6)-β-D-glucopyranoside, 3-*O*-α-L-arabinopyranosyl oleanolic acid 28-*O*-β-D-glucopyranosyl(1→6)-β-D-glucopyranoside, oleanolic acid 3-*O*-β-D-glucopyranosyl(1→2)-α-L-arabinopyranoside, 3-*O*-α-L-rhamnopyranosyl(1→2)-α-L-arabinopyranosyl oleanolic acid 28-*O*-β-D-glucopyranosyl(1→6)-β-D-glucopyranoside, 3-*O*-β-D-glucopyranosyl(1→2)-α-L-arabinopyranosyl oleanolic acid 28-*O*-β-D-glucopyranosyl(1→6)-β-D-glucopyranoside[11,12] 등이 분리되어 구조가 규명되어 보고한 바 있다. 기타 phenol성 성분들로서는 chlorogenic acid와 caffeic acid 등이 분리되여 보고[4]된 바 있으며, flavonolignan계 성분인 hydnocarpin 이 분리되여 보고[1] 된 바 있다.

금은화로부터도 cerebroside 성분들인 lonijaposide A_1 – A_4, B_1, B_2[13] 들과, phenol 성분들인 3,5-di-*O*-caffeoylquinic acid butyl ester, 3-*O*-caffeoylquinic acid, 3-*O*-caffeoylquinic acid methyl ester,[14] 3,5-di-*O*-caffeoylquinic acid,[14,20,33] 3,5-di-*O*-caffeoylquinic acid methyl

ester,[14,20] chlorogenin tetraacetate,[18] benzyl alcohol β-D-xylopyranosyl(1″→6′)-β-D-glucopyranoside,[15] chlorogenic acid,[20,22,23,32,33] protocatechuic acid,[20,26] caffeic acid,[22,26,32,33] methyl caffeate, methyl chlorogenic acid,[20] *p*-hydroxybenzaldehyde, protocatechualdehyde, vanillic acid, methyl quinate,[50] 3,4-di-*O*-caffeoyl quinic acid,[20,32,33] 4,5-di-*O*-caffeoylquinic acid,[32] 4,5-di-*O*-caffeoylquinic acid methyl ester,[50] 3,4-di-*O*-caffeoylquinic acid methyl ester[20] 들이 분리 보고되었다. Flavonoid 성분으로는 rutin,[20,24,30,32,33] luteolin,[20,22,23,26,30] hyperoside,[22,24,30] apigenin,[23] luteolin 7-*O*-galactoside,[24] lonicerin,[24,30,32,33] tricin 7-*O*-glucoside,[30] tricin 7-*O*-neohesperidoside,[24] quercetin,[24,30] chrysoeriol, chrysoeriol 7-*O*-glucoside,[26] quercetin 3-*O*-glucoside,[26,30,32,33,50] isorhamnetin 3-*O*-glucoside, kaempferol 3-*O*-glucoside,[26,50] luteolin 7-*O*-glucoside,[26,30,32,33,50] kaempferol 3-rutinoside,[50] isorhamnetin 3-rutinoside,[50] 들이 분리되었다. Saponin 성분들로서는 macranthoidin A,[17] macranthoidin B,[16,17,30] 3-*O*-α-L-rhamnopyranosyl(1→2)-α-L-arabinopyranosyl hederagenin 28-*O*-α-L-rhamnopyranosyl(1→2)-[β-D-xylopyranosyl(1→6)-β-D-glucopyranoside],[16-19] hederagenin 3-*O*-α-L-arabinopyranoside,[26] hederagenin 3-*O*-α-L-rhamnopyranosyl(1→2)-α-L-arabinopyranoside,[17] 3-*O*-α-L-rhamnopyranosyl(1→2)-α-L-arabinopyranosyl hederagenin 28-*O*-β-D-xylopyranosyl(1→6)-β-D-glucopyranoside,[17-19] dipsacoside B,[17,30,31] 3-*O*-α-L-arabinopyranosyl hederagenin 28-*O*-α-L-rhamnopyranosyl(1→2)-[β-D-xylopyranosyl(1→6)-β-D-glucopyranoside],[18,19] oleanolic acid 28-*O*-α-L-rhamnopyranosyl(1→2)-[β-D-xylopyranosyl(1→6)-β-D-glucopyranoside][26] 들이 분리 보고되었다. Iridoid 성분로서는 loganin,[21,27,29,30,32,34] loganic acid,[50] 7-epiloganin,[27] sweroside,[21,27,29,30,32-34] 7-epivogeloside,[21,27,30] secologanin,[29,34] secoxyloganin,[21,27,30,32-34] secologanoside,[50] secologanin dimethyl acetal,[29] dimethylsecologanoside,[21,29,30] centauroside,[21,28,30,32,33] loniceracetalide A, B,[29] lonijaposide A, B, C, kingiside, morroniside, secologanoside[34] 들과, monoterpene glycoside인 (2*E*,6*S*)-8-[α-L-arabinopyranosyl(1″→6′)-β-D-glucopyranosyloxy]-2,6-dimethyloct-2-eno-1,2″-lactone[15]과, 5-hydroxymethyl-2-furfural,[26] adenosine, uridine[50] 및 다수의 휘발성 성분[25] 들도 분리 보고되었다.

금은화의 활성으로 금은화의 EtOAc분획물이 돌연변이원성에 대하여 강한 억제활성이 있음을 보고하였다.[23] 사람의 혈액으로부터 분리한 혈소판을 사용하여 혈소판응집 억제활성을 나타내는 금은화의 활성성분으로는 methyl caffeate, 3,4-di-*O*-caffeoylquinic acid 및 이의 methyl ester임을 밝혔으며, methyl caffeate, methyl 3,4-di-*O*-caffeoylquinate 등은 thromboxane생합성을 강하게 억제함을 보고하였다. 또한 H_2O_2로 유도한 상피세포의 상해에 대하여 억제활성을 나타내는 성분으로는 protocatechuic acid, methyl caffeate, methyl chlorogenate 및 luteolin임을 밝혔다.[20] 금은화의 flavonoid 성분 중 quercetin이 PLA_2에 대하여 강한 저해활성을 나타내며, COX-1 저해활성 성분들로서는 apigenin, luteolin, quercetin이며, COX-2 저해활성 성분들로서는 apigenin과 luteolin임을 밝혔다. 또한, quercetin, isoquercitrin 및 luteolin은 강한 5-LO 저해활성을 나타내었다.[35] 금은화의 물추출물은 I-κBα, NF-κB 활성을 억제하여 iNOS 나 TNF-α 생성억제에 영향을 주어 항염증작용을 나타낸다고 보고하였다.[36] Chlorogenic acid는 calcineurin을 활성화시켜 *in vitro* 또는 *in vivo* 실험에서 대식세포 기능을 항진시킴을 보고하였다.[43] 금은화 추출물이 항angiogenesis, 항염증 및 진통작용이 있음을 보고하였다.[49] 인동의 추출물은 항염 및 진통작용이 있으며, (아)급성독성을 나타내지 않음을 보고하였다.[37,48] 추출물의 BuOH분획은 100-400 mg/kg(po)에서 급·만성염증 model에서 항염증작용을 나타내었으나, 대조약물인 prednisolone보다는 약하였다.[38] 이 인동에서 분리한 flavonoid 성분 중 ochnaflavone은 Con A나 LPS로 유도한 임파구 분화를 억제함을 밝혔으며,[39] 이

성분은 rat에 있어서 대조군에 비하여 3배의 성장호르몬 유발효과를 나타내었다.[40] 인동의 새로운 saponin성분인 loniceroside A는 arachidonic acid 및 croton oil로 유발시킨 mouse 귀부종에 대하여 각 34% 및 31% 억제함을 보고하였다.[41] 인동의 70% MeOH나 70% acetone 엑스에 γ-선을 조사하면 밝은 색을 띠고 tyrosinase, xanthine oxidase 및 NO소거활성이 있어 식품 또는 화장품산업에서 유용할 것으로 보고하였다.[42] 인동의 주성분 가운데 하나인 luteolin이 사람의 직장 상피세포에서 IL-8생성으로 유도한 TNF-α 활성을 억제하며, 이는 MAPK 및 IκB/NF-κB 경로를 차단함에 기인한다고 보고하였다.[44] 또한 luteolin으로 유도한 CH27 cell apoptosis는 뚜렷한 DNA수축과 apoptotic body 생성을 수반하며, 이와 같은 세포사멸은 apoptotic marker 발현을 변환시킬 수 있는 능력에 기인하는 것으로 여겨진다고 보고하였다.[45] Ochnaflavone은 LPS로 유도한 iNOS 발현을 억제하는데 이는 RAW264.7 세포에서 NF-κB 활성을 억제하여 ERK1/2의 활성을 감소시키는 기전으로 보고하였다.[46] 또한 mouse 골수에서 유래한 대식세포에서 COX-2 (IC_{50} = 0.6 μM) 나 5-LO (IC_{50} = 6.56 μM) 활성을 억제한다고 보고하였다.[47] 이와 같이 금은화 및 인동의 추출물 또는 이들에 함유되어 있는 특정성분들은 항염증작용이 있음이 명확하며, 이들의 작용기전도 규명되었다.

제2장 세부연구개발과제의 최종 연구개발 내용 및 방법

2.1 인동 (*Lonicera japonica*, Vine) 으로부터 활성성분의 분리

실험재료 - 동국대 이제현 교수가 제공한 검체 (경북 봉화산, 약 17 kg, 2007년 3월 인수)를 사용하였다.

추출 및 분획 - 인동 15.6 kg을 세절한 후 70% EtOH을 가한 후 3시간씩 reflux하여(5회) 얻은 추출물을 감압농축하여 70% EtOH 엑스를 얻었다. 70% EtOH 엑스에 H_2O을 가하여 현탁시킨 후 거의 동량의 hexane을 가하여 진탕 방치하여 hexane 분획 (81.3 g)을 얻었다. 같은 방법으로 수층에 거의 동량의 CH_2Cl_2을 가하여 진탕 방치하여 CH_2Cl_2 분획 (97.8g)을 얻었으며, 수층을 같은 방법으로 처리하여 EtOAc 분획 (127.2 g) 및 BuOH 분획 (491.5 g)을 각각 얻었다. 나머지 수층을 감압 농축하여 H_2O 분획을 얻었다.

분리 및 정제 - 인동의 hexane 분획 (81.3 g)에 대하여 hexane/EtOAc (gradient)의 용출용매로 silica gel (Merck no. 7734) column chromatography를 실시하여 32개의 소분획들을 얻었다. 이중 H-8을 재결정을 반복하여 화합물 **1** (3 mg)을 얻었다. 소분획 H-18 (0.473 g)에 대하여 hexane/EtOAc (gradient)의 용출용매로 silica gel (Merck no. 7729) column chromatography를 실시하여 얻은 H-18-1로부터 화합물 **2** (4 mg)을, H-18-3을 CH_2Cl_2/MeOH 혼합용매로 재결정을 반복하여 화합물 **3** (5 mg)을 얻었다.

인동의 CH_2Cl_2 분획 (96.8 g)에 대하여 hexane, hexane/CH_2Cl_2 (1:1), CH_2Cl_2/MeOH (gradient)의 용출용매로 silica gel (Merck no. 7734) column chromatography를 실시하여 35개의 소분획들을 얻었다. 이들 소분획들 가운데 C-1319 (0.8 g)에 대하여 hexane/EtOAc (gradient)의 용출용매로 silica gel (Merck no. 7729) column chromatography를 실시하여 소분획 C-1319-1012 (0.36 g)를 얻고 이를 다시 benzene을 용출용매로 silica gel (Merck no. 7729) column chromatography를 실시하여 얻은 소분획 C-1319-1012-2로부터 화합물 **4** (20 mg)를 얻었으며, 소분획 C-1319-1012-0918 (0.25 g)을 silica gel (Merck no. 7729) column에 걸고 $CHCl_3$으로 용출시켜 얻은 소분획 C-1319-1012-0918-0420으로부터 화합물 **5** (212 mg)를 얻었다. 다음 소분획 C-2225 (0.2 g)에 대하여 hexane, hexane/EtOAc (gradient)의 용출용매로 silica gel (Merck no. 7729) column

chromatography를 실시하여 얻은 소분획 C-2225-3544 (11 mg)을 다시 RP-18 column에 걸고 MeOH로 용출시켜 얻은 소분획 C-2225-3544-2627로부터 화합물 **6** (2 mg)을, 소분획 C-2225-3544-3132로부터 화합물 **7** (2 mg)을, 소분획 C-2225-3544-3840으로부터 화합물 **8** (3 mg)을 각각 얻었다. 소분획 C-2631을 CH_2Cl_2/MeOH 혼합용매로 재결정을 반복하여 화합물 **9** (1.126 g)를 얻었다. 소분획 C-3337 (6.0 g)에 대하여 hexane, hexane/EtOAc (gradient)의 용출용매로 silica gel (Merck no. 7729) column chromatography를 실시하여 얻어진 소분획 C-3337-2로부터 화합물 **10** (30 mg)을, 소분획 C-3337-14를 CH_2Cl_2/MeOH 혼합용매로 재결정을 반복하여 화합물 **11** (40 mg)을 각각 얻었으며, 소분획 C-3337-4856 (0.5 g)에 대하여 CH_2Cl_2로 silica gel (Merck no. 7729) column chromatography를 실시하여 얻어진 소분획 C-3337-4856-1020 (90 ㎎)에 대하여 다시 hexane, hexane-EtOAc (10:1, 10:2)의 용출용매로 silica gel (Merck no. 7729) column chromatography를 실시하여 소분획 C-3337-4856-1020-2534로부터 화합물 **12** (3 ㎎)을 얻었다. 소분획 C-3340 (2.0 g)에 대하여 hexane, hexane/EtOAc (gradient)의 용출용매로 silica gel (Merck no. 7729) column chromatography를 실시하여 얻어진 소분획 C-3940-5를 CH_2Cl_2/MeOH 혼합용매로 재결정을 반복하여 화합물 **11** (6 mg)을 얻었다. 소분획 C-3940-2226 (50 mg)에 대하여 CH_2Cl_2/MeOH/H_2O = 7 : 0.1 : 0.5의 용출용매로 silica gel (Merck no. 7729) column chromatography를 실시하여 얻어진 소분획 C-3940-2226-6을 CH_2Cl_2/MeOH 혼합용매로 재결정을 반복하여 화합물 **13** (13 mg)를 얻었다. 다음 소분획 C-6670 (3.8 g)을 silica gel (Merck no. 7734) column에 걸고 hexane/EtOAc (gradient)의 혼합용매로 용출시켜 chromatography를 진행 중에 있다.

EtOAc 분획 126.2 g을 silica gel (Merck no. 7729) column에 걸고 CH_2Cl_2/MeOH (gradient)의 용매로 용출시켜 소분획들을 얻었다. 이 중 E-7290 (5.0 g)을 silica gel (Merck no. 7734) column에 걸고 hexane, hexane/EtOAc (gradient)의 용출용매로 용출시켜 얻은 소분획 E-7290-2 (0.2 g)를 재차 silica gel (Merck no. 7729) column에 걸고 CH_2Cl_2/MeOH/H_2O = 7 : 0.1 : 0.5 → 7 : 3 : 1의 용매로 용출시켰다. 여기서 얻은 소분획 E-7290-2-1 (0.1 g)을 RP-18 column에 걸고 MeOH/H_2O = 95 : 5로 용출시켜 2개의 소분획 E-7290-2-1-A와 E-7290-2-1-B를 얻었으며 전자로부터 화합물 **14** (8 mg)을, 후자로부터 화합물 **15** (20 mg)를 각각 얻었다. 소분획 E-102149 (6.05 g)을 hexane/EtOAc (gradient)의 용출용매로 silica gel (Merck no. 7734) column chromatography를 실시하여 얻은 소분획 E-102149-3을 CH_2Cl_2/MeOH 혼합용매로 재결정을 반복하여 화합물 **16** (5 mg)를 얻었다. E-102149-16-25를 MeOH/H_2O = 8 : 2의 용출용매로 RP-18 column chromatography를 실시하여 화합물 **17** (10 mg)을 얻었다. 소분획 E-102149-4670 (0.87 g)을 silica gel (Merck no. 7734) column에 걸고 CH_2Cl_2/MeOH/H_2O = 7 : 0.1 : 0.5 → 7 : 0.5 : 0.5 → 7 : 2 : 0.5의 용매로 용출시켜 화합물 **18** (6 mg)과 **19** (256 mg)을 얻었다. 소분획 E-267312 (8.14 g)를 silica gel (Merck no. 7734) column에 걸어 hexane/EtOAc (gradient)로 용출시켜 얻은 소분획 E-267912-1921 (800 mg)을 다시 silica gel (Merck no. 7729) column에 걸고 CH_2Cl_2/MeOH/H_2O = 7 : 0.5 : 0.5로 용출시켜 얻은 소분획 E-267312-1921-A를 CH_2Cl_2/MeOH 혼합용매로 재결정을 반복하여 화합물 **20** (56 mg)을 얻었으며, 그 모액 (53 mg)을 다시 RP-18 column에 걸고 MeOH/H_2O = 65 : 35로 용출시켜 화합물 **21** (16 mg)를 얻었다. 소분획 E-150257-4를CH_2Cl_2/MeOH 혼합용매로 재결정을 반복하여 화합물 **22** (7 mg)을 얻었다. 다음 소분획 E-313319 (7.0 g)을 silica gel (Merck no. 7734) column에 걸고 hexane/EtOAc (gradient)로 용출시켜 얻은 소분획 E-313319-911 (800 mg)을 다시 silica gel (Merck no. 7729) column에 걸고 CH_2Cl_2/MeOH/H_2O = 7 : 0.1 : 0.5 → 7 : 0.5 : 0.5 → 7 : 2 : 0.5의 용매로 용출시켜 소분획을 얻었다. 이중 소분획 E-313319-911-13 (20 mg)을 silica gel (Merck no. 7729)

column에 다시 걸어 물포화EtOAc/MeOH (gradient)로 용출시켜 화합물 **23** (17 mg)을 얻었다. 소분획 E-313319-911-14 (38 mg)도 silica gel (Merck no. 7729) column에 걸어 CH_2Cl_2/MeOH/H_2O = 7 : 1 : 0.5 → 7 : 1.5 : 0.5 → 7 : 2 : 0.5 용출용매로 재칼람을 실시하여 얻은 소분획 E-313319-911-14-1로부터 화합물 **24** (10 mg)을 얻었다. 또한 소분획 E-313319-911-1526 (48mg)을 silica gel (Merck no. 7729) column에 걸고 물포화EtOAc/MeOH (gradient)로 용출시켜 화합물 **25** (2 mg)을 얻었다. 소분획 E-313319-911-2740 (34 mg)을 RP-18 column에 걸고 MeOH/H_2O = 6 : 4로 용출시켜 화합물 **26** (2 mg)를 얻었다. 소분획 E-313319-1731 (1.59 g)을 silica gel (Merck no. 9385) column에 걸고 CH_2Cl_2/MeOH/H_2O = 7 : 1 : 0.5 → 7 : 1.5 : 0.5 → 7 : 2 : 0.5 용매로 용출시켜 얻은 소분획 E-313319-1731-711 (24 mg)을 다시 silica gel (Merck no. 7729) column에 걸어 CH_2Cl_2/MeOH/H_2O = 7 : 1 : 0.5 → 7 : 1.5 : 0.5 → 7 : 2 : 0.5의 혼합용매로 용출시켜 화합물 **27** (105 mg)를 얻었다. 소분획 E-329346 (12.0 g)을 silica gel (Merck no. 7734) column에 걸고 hexane/EtOAc (gradient)로 용출시켜 소분획 E-329346-2031 (3.0 g)을 얻고 이를 다시 silica gel (Merck no. 9385) column에 걸어 CH_2Cl_2/MeOH/H_2O = 7 : 1 : 0.5 → 7 : 1.5 : 0.5 → 7 : 2 : 0.5 용출용매로 chromatography를 실시하여 소분획 E-329346-2031-120 (1.74 g)을 얻었다. 이 소분획을 Sephadex LH-20 column에 걸어 $CHCl_3$/MeOH = 1 : 1로 용출시켜 얻은 소분획 E-329346-2031-120-2 (23 mg)을 다시 RP-18 column에 걸고 MeOH/H_2O = 4 : 6 의 용출용매로 용출시켜 화합물 **28** (140 mg)을 얻었다. 소분획 E-329346-4613 (3.0 g)을 silica gel (Merck no. 9385) column에 걸고 CH_2Cl_2/MeOH/H_2O = 7 : 1 : 0.5 → 7 : 1.5 : 0.5 → 7 : 2 : 0.5의 용출용매로 chromatography를 실시하여 얻어진 소분획 E-329346-4613-1521 (10 mg)을 RP-18 column에 걸어 MeOH/H_2O = 6 : 4의 용출용매로 용출시켜 화합물 **29** (4mg)을 얻었다. 소분획 E-329346-4613-22 (14 mg)을 silica gel (Merck no. 7729) column에 걸고 CH_2Cl_2/MeOH/H_2O = 7 : 1 : 0.5 → 7 : 1.5 : 0.5 → 7 : 2 : 0.5의 혼합용매로 용출시켜 얻은 소분획 E-329346-4613-22-5055를 재결정을 반복하여 화합물 **30** (2 mg)을 얻었다.

BuOH 분획 150.0 g을 silica gel (Merck no. 7734) column에 걸고 CH_2Cl_2/MeOH/H_2O = 7 : 1 : 0.5 → 7 : 1.5 : 0.5 → 7 : 2 : 0.5의 혼합용매로 용출시켜 얻은 소분획 B-4046 (9.0 g)을 다시 silica gel (Merck no. 7729) column에 걸어 EtOAc, EtOAc/H_2O = 100 : 1의 용출용매로 chromatography를 실시하여 소분획 B-4046-1721을 얻었다. 이를 다시 RP-18 column에 걸고 MeOH/H_2O = 6 : 4의 용매로 용출시켜 얻은 소분획 B-4046-1721-6으로부터 화합물 **31** (56 mg)를 얻었다. 소분획 B-4243을 CH_2Cl_2/MeOH 혼합용매로 재결정을 반복하여 화합물 **32** (6.526 g)을 얻었다. 다음 소분획 B-91 (0.2 g)을 RP-18 column에 걸고 MeOH/H_2O = 1 : 9로 용출시켜 소분획 B-91-1417 (40 mg)을 얻었다. 이를 다시 RP-18 column에 걸고 MeOH/H_2O = 0.5 : 9.5의 용매로 용출시켜 얻은 소분획 B-91-1417-1218 (20 mg)에 대하여 재차 RP-18 column에 걸어 MeOH/H_2O = 4 : 6로 용출시켜 얻은 소분획 B-91-1417-1218-0916 (10 mg)을 silica gel (Merck no. 7729) column에 걸고 EtOAc/MeOH/H_2O = 100 : 16.5 : 13.5의 혼합용매로 용출시켜 얻은 소분획 B-91-1417-1218-0916-4674로부터 화합물 **33** (304 mg)을 분리하였다. 소분획 B-8485 (0.3 g)도 RP-18 column에 걸어 MeOH/H_2O = 4 : 6로 용출시켜 얻은 소분획 B-8485-0114 150 mg을 다시 Sephadex LH-20 column에 걸고 H_2O의 용출시켜 소분획 B-8485-0114(sp)-6 (45 mg)을 얻었다. 이를 다시 silica gel (Merck no. 7729) column에 걸어 EtOAc/MeOH/H_2O = 100 : 16.5 : 13.5의 혼합용매로 용출시켜 얻은 소분획 B-8485-0114(sp)-6-2163 (20 mg)을 RP-18 column에 걸어 MeOH/H_2O = 3 : 7의 용출용매로 chromatography를 실시하여 얻은 소분획 B-8485-0114(sp)-6-2163-1928로부터 화합물 **34** (2 mg)을 분리하였다.

Hydrocarbon alcohols [*n*-docosanol (behenyl alcohol) & *n*-tetracosanol (lignoceryl alcohol), **1**] – 백색 무정형분말. ^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ: 0.86 (3H, t, *J* = 6.5 Hz, CH_3), 1.23 (CH_2), 1.53 (2H, m, $HOCH_2C\underline{H}_2$), 3.62 (2H, t, *J* = 6.6 Hz, $HOC\underline{H}_2$). ^{13}C-NMR (75.5 MHz, $CDCl_3$) δ: 14.1 (CH_3), 22.7 ($\underline{C}H_2CH_3$), 25.7 ($HOCH_2CH_2C\underline{H}_2$), 29.3, 29.4, 29.6, 29.7, 31.9 ($\underline{C}H_2CH_2CH_3$), 32.8 ($HOCH_2C\underline{H}_2$), 63.1 ($HOC\underline{H}_2$). EIMS *m/z* 364 $[M - H_2O]^+$, 111, 97, 83. EIMS docosanol *m/z* 308 $[M - H_2O]^+$, 280, 139, 125, 111, 97, 83, 69; tetracosanol 336 $[M - H_2O]^+$, 308, 125, 111, 97, 83.

Hydrocarbon alcohols [*n*-docosanol, *n*-tetracosanol & *n*-eicosanol, **2**]– 백색 무정형분말. ^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 0.88 (3H, t, *J* = 6.9 Hz, CH_3), 1.25 (CH_2), 1.56 (2H, m, $HOCH_2C\underline{H}_2$), 3.64 (2H, t, *J* = 6.6 Hz, $HOC\underline{H}_2$). ^{13}C-NMR (75.5 MHz, $CDCl_3$) δ: 14.1 (CH_3), 22.7 ($\underline{C}H_2CH_3$), 25.7 ($HOCH_2CH_2C\underline{H}_2$), 29.3, 29.4, 29.6, 29.7, 31.9 ($\underline{C}H_2CH_2CH_3$), 32.8 ($HOCH_2C\underline{H}_2$), 63.1 ($HOC\underline{H}_2$). EIMS eicosanol *m/z* 280 $[M - H_2O]^+$, 252, 139, 111, 97, 83, 69; docosanol *m/z* 308 $[M - H_2O]^+$, 280, 139, 125, 111, 97, 83, 69; tetracosanol 336 $[M - H_2O]^+$, 308, 125, 111, 97, 83.

(24*S*)-Cycloart-25-en-3β,24-diol [(3β,24*S*)-9,19-cyclolanost-25-ene-3,24-diol, **3**] – 미백색 분말. $[\alpha]_D^{23}$ = +48.4° (*c* = 0.25, MeOH). IR υ_{max} 3388 (OH), 1649 (C=C), 1451 (CH_2), 1375 (CH_3), 1024, 899 (C=CH_2), 757 cm^{-1}. ^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 0.33 (1H, d, *J* = 4.2 Hz, H-19a), 0.55 (1H, d, *J* = 3.9 Hz, H-19b), 0.81 (3H, s, 30-CH_3), 0.88 (3H, d, *J* = 5.1 Hz, 21-CH_3), 0.89 (3H, s, 28-CH_3), 0.96 (6H, s, 18, 29-CH_3), 1.72 (3H, s, 27-CH_3), 3.28 (1H, dd, *J* = 4.5, 11.1 Hz, H-3), 4.02 (1H, t, *J* = 6.6 Hz, H-24), 4.84 (1H, br s, H-26a), 4.92 (1H, br s, H-26b). ^{13}C-NMR (75.5 MHz, $CDCl_3$) δ: 31.9 (C-1), 30.3 (C-2), 78.8 (C-3), 40.4 (C-4), 47.1 (C-5), 21.1 (C-6), 26.0 (C-7), 48.0 (C-8), 19.9 (C-9), 26.0 (C-10), 26.4 (C-11), 32.8 (C-12), 45.2 (C-13), 48.8 (C-14), 35.5 (C-15), 28.1 (C-16), 52.1 (C-17), 18.0 (C-18), 29.9 (C-19), 35.9 (C-20), 18.3 (C-21), 31.8 (C-22), 31.4 (C-23), 147.5 (C-25), 111.5 (C-26), 17.2 (C-27), 25.4 (C-28), 14.0 (C-29), 19.3 (C-30). EIMS *m/z* 442 $[M]^+$ (0.8), 424 $[M-H_2O]^+$ (3.3), 409 $[M - H_2O - CH_3]^+$ (3.4), 391 $[M - 2H_2O - CH_3]^+$ (0.8), 381 $[M - H_2O - C_3H_7]^+$ (3), 315 [M - side-chain]$^+$ (1.7), 302 [a species]$^+$ (6.7), 297 [M - side-chain - $H_2O]^+$ (2). 203 (6.7), 175 (15), 95 (54), 71 (100), 55 (63).

Trilinolein [glycerol trilinoleate, glycerol tri-9,12-octadecadienoate, **4**] – 백색의 oil. ^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 0.85-0.91 (9H, m, 3 × CH_3), 1.30 (CH_2), 1.61 (6H, m, 3 × 3-CH_2), 2.04 (12H, q, *J* = 6.3 Hz, 3 × 8-CH_2, 3 × 14-CH_2), 2.31 (6H, t, *J* = 7.5 Hz, 3 × $COCH_2$), 2.77 (6H, t, *J* = 6.3 Hz, 3 × 11-CH_2), 4.14 (2H, dd, *J* = 6.0, 12.0 Hz, α,ɣ-CH_2), 4.29 (2H, dd, *J* = 4.5, 12.0 Hz, α,ɣ-CH_2), 5.24-5.42 (13H, m, β-CH, 12 × CH=CH). ^{13}C-NMR (75.5 MHz, $CDCl_3$) δ: 14.0, 14.1 (CH_3), 22.5, 22.7 (C-17), 24.8, 24.9 (C-3), 25.6 (C-11), 27.2 (C-8, 14), 29.1-29.7 (CH_2), 29.2 (C-6), 29.3 (C-15), 29.6 (C-7), 31.5 (C-16), 34.0, 34.2 (C-2), 62.1 (C-α,ɣ), 68.9 (C-β), 127.9 (C-12), 128.1 (C-10), 129.9 (C-9), 130.2 (C-13), 172.8, 173.2 (CO). FABMS *m/z* 879 $[M + H]^+$, 600 $[(M + H) - 279]^+$, 337 $[(M + H) - 279 - 263]^+$, 263.

Hexacosanol [$CH_3(CH_2)_{23}CH_2CH_2OH$, ceryl alcohol, **5**] – 백색 무정형분말. ^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 0.88 (3H, t, *J* = 7.2 Hz, CH_3), 1.25 (CH_2), 1.56 (2H, m, $HOCH_2C\underline{H}_2$), 3.64 (2H, t, *J* = 6.6 Hz, $HOC\underline{H}_2$). EIMS *m/z* 364 $[M - H_2O]^+$, 111, 97, 83.

Obtusifoliol [4α,14α-dimethyl-5α-ergosta-8,24(24^1)-dien-3β-ol, **6**] – 백색 무정형분말.

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 0.71 (3H, s, 18-CH_3), 0.89 (3H, s, 14-CH_3), 0.93 (3H, d, *J* = 6.3 Hz, 21-CH_3), 0.97 (3H, s, 19-CH_3), 1.00 (3H, d, *J* = 6.3 Hz, 4-CH_3), 1.02 (3H, d, *J* = 6.9 Hz, 26-CH_3), 1.03 (3H, d, *J* = 6.9 Hz, 27-CH_3), 3.09 (1H, m, H-3), 4.66 (1H, d, *J* = 1.5 Hz, C=CH_2), 4.72 (1H, br s, C=CH_2). EIMS *m/z* 426 $[M]^+$ (12), 411 $[M - CH_3]^+$ (28), 393 $[M - CH_3 - H_2O]^+$ (8), 383 (7), 327 (10), 245 (24), 105 (88), 55 (100).

Gramisterol [24-methylenelophenol, 4α-methyl-5α-ergosta-7,24(24^{1})-dien-3β-ol, **7**] – 백색 무정형분말. ^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 0.54 (3H, s, 18-CH_3), 0.83 (3H, s, 19-CH_3), 0.95 (3H, d, *J* = 6.3 Hz, 21-CH_3), 0.99 (3H, d, *J* = 6.3 Hz, 4-CH_3), 1.02 (3H, d, *J* = 6.9 Hz, 26-CH_3), 1.03 (3H, d, *J* = 6.9 Hz, 27-CH_3), 3.13 (1H, m, H-3), 4.66 (1H, d, *J* = 1.2 Hz, C=CH_2), 4.71 (1H, br s, C=CH_2), 5.18 (1H, m, H-7). ^{13}C-NMR (75.5 MHz, $CDCl_3$) δ: 37.0 (C-1), 31.1 (C-2), 76.2 (C-3), 40.3 (C-4), 46.7 (C-5), 26.6 (C-6), 117.5 (C-7), 139.1 (C-8), 49.6 (C-9), 34.6 (C-10), 21.4 (C-11), 39.6 (C-12), 43.4 (C-13), 55.0 (C-14), 22.9 (C-15), 27.9 (C-16), 56.0 (C-17), 11.8 (C-18), 14.1 (C-19), 36.2 (C-20), 18.8 (C-21), 34.8 (C-22), 29.7 (C-23), 156.9 (C-24), 33.8 (C-25), 21.9 (C-26), 22.0 (C-27), 15.1 (4-CH_3), 105.9 (C=$\underline{C}H_2$). EIMS *m/z* 412 $[M]^+$ (6), 397 $[M - CH_3]^+$ (7), 379 $[M - CH_3 - H_2O]^+$ (3), 328 (19), 313 (7), 285 (100), 241 (11).

Citrostadienol [24-ethylidenelophenol, (24*Z*)-4α-methyl-5α-stigmasta-7,24(24^{1})-dien-3β-ol, **8**] – 미백색 분말. ^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 0.54 (3H, s, 18-CH_3), 0.83 (3H, s, 19-CH_3), 0.95 (3H, d, *J* = 6.3 Hz, 21-CH_3), 0.98 (6H, d, *J* = 6.9 Hz, 26, 27-CH_3), 0.99 (3H, d, *J* = 6.6 Hz, 4-CH_3), 1.59 (3H, dt, *J* = 1.2, 6.6 Hz, 29-CH_3), 2.83 (1H, septet, *J* = 6.9 Hz, H-25), 3.12 (1H, dt, *J* = 3.3, 11.1 Hz, H-3), 5.11 (1H, q, *J* = 6.6 Hz, H-28), 5.18 (1H, dd, *J* = 1.5, 6.0 Hz, H-7). ^{13}C-NMR (75.5 MHz, $CDCl_3$) δ: 37.0 (C-1), 31.0 (C-2), 76.2 (C-3), 40.3 (C-4), 46.7 (C-5), 26.6 (C-6), 117.5 (C-7), 139.1 (C-8), 49.7 (C-9), 34.8 (C-10), 21.4 (C-11), 39.5 (C-12), 43.4 (C-13), 55.0 (C-14), 22.9 (C-15), 28.0 (C-16), 56.0 (C-17), 11.8 (C-18), 14.1 (C-19), 36.6 (C-20), 18.9 (C-21), 35.9 (C-22), 28.0 (C-23), 145.8 (C-24), 28.6 (C-25), 21.0 (C-26), 21.1 (C-27), 15.1 (4-CH_3), 116.5 (C-28), 12.7 (C-29). EIMS *m/z* 426 $[M]^+$ (1), 411 $[M - CH_3]^+$ (1), 408 $[M - H_2O]^+$ (1), 328 (33), 313 (6), 285 (100), 267 (6). 245 (5), 227 (8).

β-Sitosterol [stigmast-5-en-3β-ol, **9**] – 백색 침상결정. ^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 0.68 (3H, s, CH_3-18), 0.81 (3H, d, *J* = 6.6 Hz, CH_3-26), 0.83 (3H, d, *J* = 6.3 Hz, CH_3-27), 0.84 (3H, t, *J* = 7.2 Hz, CH_3-29), 0.92 (3H, d, *J* = 6.6 Hz, CH_3-21), 1.01 (3H, s, CH_3-19), 3.52 (1H, m, H-3), 5.35 (1H, d, *J* = 5.1 Hz, H-6). ^{13}C-NMR (75.5 MHz, $CDCl_3$) δ: 37.3 (C-1), 31.7 (C-2), 71.8 (C-3), 42.3 (C-4), 140.8 (C-5), 121.7 (C-6), 31.9 (C-7), 31.9 (C-8), 50.1 (C-9), 36.5 (C-10), 21.1 (C-11), 39.8 (C-12), 42.3 (C-13), 56.8 (C-14), 24.3 (C-15), 28.2 (C-16), 56.1 (C-17), 11.9 (C-18), 19.4 (C-19), 36.1 (C-20), 18.8 (C-21), 34.0 (C-22), 26.1 (C-23), 45.8 (C-24), 29.2 (C-25), 19.0 (C-26), 19.8 (C-27), 23.1 (C-28), 12.0 (C-29).

Bis(2-ethylhexyl)phthalate [1,2-benzenedicarboxylic acid bis(2-ethylhexyl) ester, DEHP, dioctylphthalate, DOP, **10**] – 미황색의 oil. $[\alpha]_D^{19}$ = +3.8° (*c* = 0.4, $CHCl_3$). IR υ_{max} (CCl_4) 2959-2862 (CH), 1729 (C=O), 1462 (CH_2), 1381 (CH_3), 1280, 1125 (ester), 743 cm^{-1} (*O*-substituted phenyl). ^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ: 7.67 (2H, dd, *J* = 2.3, 6.5 Hz, H-3), 7.51 (2H, *J* = 3.3, 5.7 Hz, H-4), 4.15-4.23 (4H, m, H-1′a, 1′b), 1.66 (2H, m, H-2′), 1.23-1.45 (16H, m, H-3′, 4′, 5′, 7′), 0.83-0.91 (12H, m, H-6′, 8′). ^{13}C-NMR (100 MHz,

$CDCl_3$) δ: 167.7 (C-1), 132.4 (C-2), 130.8 (C-4), 128.8 (C-3), 68.1 (C-1′), 38.7 (C-2′), 30.3 (C-3′), 28.9 (C-7′), 23.7 (C-4′), 22.9 (C-5′), 14.0 (C-6′), 10.9 (C-8′). EIMS *m/z* 390 $[M]^+$ (1), 279 $[M - C_8H_{15}]^+$ (40), 167 $[M - C_{16}H_{31}]^+$ (61), 149 $[M - C_{16}H_{33}O]^+$ (100).

Fatty acids [C_{16} - C_{26} fatty acids, **11**] - 백색 무정형분말. ^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 0.88 (3H, t, *J* = 6.6 Hz, CH_3), 1.25 (CH_2), 1.63 (2H, m, $COCH_2C\underline{H}_2$), 2.34 (2H, t, *J* = 7.5 Hz, $COCH_2$).^{13}C-NMR (75.5 MHz, $CDCl_3$) δ: 14.1 (CH_3), 22.7, 24.7, 29.1, 29.2, 29.4, 29.6, 29.7, 31.9, 34.0, 179.9 (CO). GC/MS t_R 19.5: *m/z* 270 $[M]^+$, 227, 143, 87, 74 (palmitic acid methyl ester, 4.8%). t_R 20.5: *m/z* 284 $[M]^+$, 241, 143, 87, 74 (heptadecanoic acid methyl ester, 1.2%). t_R 21.5: *m/z* 298 $[M]^+$, 255, 199, 143, 87, 74 (stearic acid methyl ester, 5.8%). t_R 22.4: *m/z* 312 $[M]^+$, 269, 143, 87, 74 (nonadecanoic acid methyl ester, 0.9%). t_R 23.3: *m/z* 326 $[M]^+$, 283, 199, 143, 87, 74 (arachidonic acid methyl ester, 10%). t_R 24.3: *m/z* 340 $[M]^+$, 297, 241, 143, 87, 74 (heneicosanoic acid methyl ester, 4.0%). t_R 25.5: *m/z* 354 $[M]^+$, 311, 255, 199, 143, 87, 74 (behenic acid methyl ester, 28.3%). t_R 26.9: *m/z* 368 $[M]^+$, 325, 269, 199, 143, 87, 74 (tricosanoic acid methyl ester, 7.8%). t_R 28.8: *m/z* 382 $[M]^+$, 339, 283, 199, 143, 87, 74 (lignoceric acid methyl ester, 30.3%). t_R 30.9: *m/z* 396 $[M]^+$, 353, 297, 199, 143, 87, 74 (pentacosanoic acid methyl ester, 3%). t_R 33.9: *m/z* 410 $[M]^+$, 367, 311, 255, 199, 143, 87, 74 (cerotic acid methyl ester, 3.1%).

Coniferaldehyde [Coniferylaldehyde, ferulaldehyde, 3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-propenal, 4-hydroxy-3-methoxycinnamaldehyde, **12**] - 백색 무정형분말. IR υ_{max} (KBr) 3420 (OH), 1672 (α,β-unsat. C=O), 1644, 1597, 1513 (aromat. C=C), 1287, 1135, 1027, 940, 814 cm^{-1}. UV λ_{max} (log ε) (MeOH) 222 (4.00), 240 (4.04), 339 (4.37) nm. ^{1}H-NMR (300 MHz, CD_3OD) δ: 3.90 (3H, s, OCH_3), 6.65 (1H, dd, *J* = 7.8, 15.6 Hz, H-8), 6.84 (1H, d, *J* = 8.1 Hz, H-5), 7.17 (1H, dd, *J* = 1.8, 8.1 Hz, H-6), 7.26 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, H-2), 7.58 (1H, d, *J* = 15.6 Hz, H-7), 9.57 (1H, d, *J* = 7.8 Hz, H-9). ^{13}C-NMR (75.5 MHz, CD_3OD) δ: 127.6 (C-1), 112.1 (C-2), 149.5 (C-3), 151.7 (C-4), 116.6 (C-5), 125.2 (C-6), 156.3 (C-7), 126.7 (C-8), 196.2 (C-9), 56.4 (OCH_3). EIMS *m/z* 178 $[M]^+$(100), 177 $[M - H]^+$ (24), 161 $[M - OH]^+$ (28), 147 (41), 135 (50),118 (25),107 (45), 89 (26), 77 (46).

Caffeic acid docosanoyl ester [docosanoyl caffeate, **13**] - 백색 무정형분말. ^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 0.88 (3H, t, *J* = 6.9 Hz, CH_3), 1.25 [br s, $(CH_2)_n$], 1.69 (2H, m, H-2′), 4.19 (2H, t, *J* = 6.9 Hz, H-1′), 6.26 (1H, d, *J* = 15.9 Hz, H-8), 6.87 (1H, *J* = 8.1 Hz, H-5), 7.01 (1H, dd, *J* = 2.1, 8.1 Hz, H-6), 7.09 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-2), 7.57 (1H, d, *J* = 15.9 Hz, H-7). ^{13}C-NMR (75.5 MHz, CD_3OD + $CDCl_3$) δ: 14.3 (CH_3), 23.2 ($CH_3\underline{C}H_2$-), 26.5 (C-3′), 29.3 ($CH_3CH_2CH_2\underline{C}H_2$-), 29.8 ($CH_2$), 29.9 ($CH_2$), 30.1 ($CH_2$), 30.2 ($CH_2$), 32.5 (C-2′), 65.2 (C-1′), 114.7 (C-8), 114.9 (C-2), 115.9 (C-5), 122.4 (C-6), 127.2 (C-1), 145.9 (C-3), 146.2 (C-7), 148.6 (C-4), 169.0 (C-9). EIMS *m/z* (rel. int., %) 572 [M^+, caffeic acid octacosanol ester] (6), 544 [M^+, caffeic acid hexacosanoyl ester] (10), 516 [M^+, caffeic acid tetracosanoyl ester] (43), 488 [M^+, caffeic acid docosanoyl ester] (63), 460 [M^+, caffeic acid eicosanoyl ester] (11), 432 [M^+, caffeic acid octadecanoyl ester] (3), 180 [caffeic acid]$^+$ (100), 163 $[(HO)_2C_6H_5CH{=}CH{-}C{\equiv}O^+]$ (95), 136 [caffeic acid - CO_2]$^+$(29).

Pomolic acid [19α-hydroxyursolic acid, benthamic acid, 3β,19α-dihydroxyurs-12-en-28-oic acid, **14**] - 백색 무정형분말. $[\alpha]_D^{22}$ = +22.2° (*c* = 0.15, MeOH). IR υ_{max} 3420 (OH), 1688 (COOH), 1460, 1387, 1030 cm^{-1}. ^{1}H-NMR (500 MHz, pyridine-d_5) δ : 0.90, (3H, s, 25-CH_3),

1.01 (3H, s, 23-CH_3), 1.10 (3H, s, 26-CH_3), 1.22 (3H, s, 24-CH_3), 1.44 (3H, s, 29-CH_3), 1.71 (3H, s, 27-CH_3), 1.10 (3H, d, *J* = 6.6 Hz, 30-CH_3), 2.33 (1H, ddd, *J* = 4.5, 13.6, 13.6 Hz, H-15β), 3.05 (1H, br s, H-18), 3.12 (1H, *J* = 4.0, 12.9, 12.9 Hz, H-16α), 3.42 (1H, dd, *J* = 5.2, 10.9 Hz, H-3), 5.60 (1H, br s, H-12). ^{13}C-NMR (125.8 MHz, pyridine-d_5) δ: 39.0 (C-1), 28.1 (C-2), 78.2 (C-3), 39.3 (C-4), 55.8 (C-5), 18.9 (C-6), 33.6 (C-7), 40.3 (C-8), 47.7 (C-9), 37.3 (C-10), 24.0 (C-11), 128.0 (C-12), 139.9 (C-13), 42.1 (C-14), 29.3 (C-15), 26.4 (C-16), 48.3 (C-17), 54.6 (C-18), 72.7 (C-19), 42.3 (C-20), 27.1 (C-21), 38.5 (C-22), 28.7 (C-23), 16.7 (C-24), 15.5 (C-25), 17.2 (C-26), 24.6 (C-27), 180.7 (C-28), 26.9 (C-29), 16.5 (C-30). EIMS *m/z* 472 $[M]^+$ (2), 454 $[M - H_2O]^+$ (5), 439 $[M - CH_3 - H_2O]^+$ (2), 426 $[M - (COOH + H)]^+$ (18), 354 (10), 264 (14), 246 (23), 220 (24), 207 (35), 201 (34), 190 (50), 146 (100).

Ursolic acid [3β-hydroxyurs-12-en-28-oic acid, **15**] – 백색 무정형분말. $[\alpha]_D^{23}$ = -51.9° (*c* = 0.2, MeOH). IR υ_{max} 1692 (COOH), 1458, 1387, 1032, 829, 828 cm^{-1}. ^{1}H-NMR (400 MHz, pyridine-d_5) δ : 0.87 (3H, s, 25-CH_3), 1.22 (3H, s, 23-CH_3), 1.00 (3H, s, 26-CH_3), 1.02 (3H, s, 24-CH_3), 0.98 (3H, d, *J* = 6.8 Hz, 29-CH_3), 1.21 (3H, s, 27-CH_3), 0.93 (3H, d, *J* = 5.8 Hz, 30-CH_3), 2.09 (1H, dt, *J* = 4.0, 13.1 Hz, H-16α), 2.30 (1H, dt, *J* = 4.8, 13.4 Hz, H-15β), 2.61 (1H, br d, *J* = 11.2 Hz, H-18), 3.44 (1H, t, *J* = 8.8 Hz, H-3), 5.46 (1H, br s, H-12). ^{13}C-NMR (100 MHz, pyridine-d_5) δ: 39.0 (C-1), 28.0 (C-2), 78.1 (C-3), 39.3 (C-4), 55.8 (C-5), 18.7 (C-6), 34.2 (C-7), 39.9 (C-8), 48.0 (C-9), 37.2 (C-10), 23.6 (C-11), 125.5 (C-12), 139.2 (C-13), 42.2 (C-14), 28.6 (C-15), 24.8 (C-16), 48.0 (C-17), 53.5 (C-18), 39.4 (C-19), 39.3 (C-20), 31.0 (C-21), 37.4 (C-22), 28.7 (C-23), 16.5 (C-24), 15.6 (C-25), 17.5 (C-26), 23.8 (C-27), 180.0 (C-28), 17.4 (C-29), 21.4 (C-30). EIMS *m/z* 456 $[M]^+$ (2), 438 $[M - H_2O]^+$ (1), 423 $[M - CH_3 - H_2O]^+$ (1), 248 [D/E ring (a)]$^+$ (100), 207 [A/B ring (b)]$^+$ (26), 203 [a – (COOH + H)]$^+$ (44), 133 (32). (+)-FABMS *m/z* 479 $[M + Na]^+$, 439 $[(M + H) - H_2O]^+$, 248, 203. (-)-FABMS *m/z* 455 $[M - H]^-$.

9α-Hydroxypinoresinol [tetrahydro-3,6-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1*H*,3*H*-furo[3,4-c] furan-1-ol, **16**] – 백색 무정형분말. ^{1}H-NMR (300 MHz, CD_3OD) δ: 2.88 (1H, ddd, *J* = 0.8, 7.2, 7.4 Hz, H-8), 3.13 (1H, m, H-8′), 3.84, 3.85 (3H each, s, 2 × OCH_3), 3.99 (1H, dd, *J* = 2.2, 9.0 Hz, H-9′eq), 4.19 (1H, dd, *J* = 6.0, 9.0 Hz, H-9′αx), 4.82 (1H, d, *J* = 6.9 Hz, H-7), 4.86 (1H, d, *J* = 7.0 Hz, H-7′), 5.47 (1H, d, *J* = 0.8 Hz, H-9), 6.74 (1H, d, *J* = 8.1 Hz, H-5′), 6.77 (1H, d, *J* = 8.2 Hz, H-5), 6.80 (1H, dd, *J* = 1.5, 8.2 Hz, H-6), 6.86 (1H, dd, *J* = 1.8, 8.1 Hz, H-6′), 6.93 (1H, d, *J* = 1.5 Hz, H-2), 7.16 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, H-2′). ^{13}C-NMR (75.5 MHz, CD_3OD) δ: 135.1, 136.2 (C-1, 1′), 111.4, 111.9 (C-2, 2′), 147.9, 148.1 (C-3, 3′), 149.9, 150.0 (C-4, 4′), 116.6, 116.9 (C-5, 5′), 120.6, 121.0 (C-6, 6′), 85.8 (C-7), 89.6 (C-7′), 64.2 (C-8), 55.7 (C-8′), 103.5 (C-9), 73.7 (C-9′), 57.1, 57.2 (OCH_3 × 2). EIMS *m/z* 374 $[M]^+$ (32), 356 $[M - H_2O]^+$(8), 327 $[M - H_2O - CHO]^+$(19), 298 $[M - H_2O - 2CHO]^+$(19), 222 (9), 205 (10), 191 (26), 178 (20), 163 $[CH_3(OH)C_6H_3C^+H{=}CH{-}CH_2]$ (36), 153 (95), 152 $[CH_3(OH)C_6H_3CHO]^+$ (42), 151 $[CH_3(OH)C_6H_3C{\equiv}O^+]$ (100), 137 $[CH_3(OH)C_6H_3CH_2]^+$ (78), 131 (58), 124 (23), 93 (37).

Euscaphic acid [acuminatic acid, jacarandic acid, 2α,3α,19α-trihydroxyurs-12-en-28-oic acid, **17**] – 백색 무정형분말. $[\alpha]_D^{24}$ = +12.0° (*c* = 0.2, MeOH). IR υ_{max} 3436 (OH), 1690 (COOH), 1458, 1379, 1040, 939, 768 cm^{-1}. ^{1}H-NMR (300 MHz, pyridine-d_5) δ: 0.89 (3H, s, 23-CH_3),

0.97 (3H, s, 25-CH_3), 1.09 (3H, s, 26-CH_3), 1.10 (3H, d, *J* = 6.3 Hz, 30-CH_3), 1.25 (3H, s, 24-CH_3), 1.40 (3H, s, 29-CH_3), 1.63 (3H, s, 27-CH_3), 1.74 (1H, t, *J* = 11.7 Hz, H-1α), 1.88 (1H, dd, *J* = 4.5, 12.0 Hz, H-1β), 2.32 (1H, ddd, *J* = 4.2, 13.2, 13.2 Hz, H-15β), 3.03 (1H, br s, H-18), 3.10 (1H, ddd, *J* = 4.5, 12.9, 13.2 Hz, H-16α), 3.75 (1H, d, *J* = 2.4 Hz, H-3β), 4.29 (1H, ddd, *J* = 2.7, 4.2, 11.6 Hz, H-2β), 5.57 (1H, br s, H-12). ^{13}C-NMR (75.5 MHz, pyridine-d_5) δ: 42.4 (C-1), 66.1 (C-2), 79.3 (C-3), 38.8 (C-4), 48.8 (C-5), 18.6 (C-6), 33.5 (C-7), 40.6 (C-8), 47.6 (C-9), 38.7 (C-10), 24.1 (C-11), 128.0 (C-12), 140.0 (C-13), 42.9 (C-14), 29.2 (C-15), 26.4 (C-16), 48.3 (C-17), 54.6 (C-18), 72.7 (C-19), 42.2 (C-20), 26.9 (C-21), 38.5 (C-22), 29.4 (C-23), 22.3 (C-24), 16.8 (C-25), 17.3 (C-26), 24.6 (C-27), 180.7 (C-28), 27.1 (C-29), 16.6 (C-30). EIMS *m/z* 488 $[M]^+$ (6), 470 $[M - H_2O]^+$ (5), 455 $[M - H_2O - CH_3]^+$ (9), 452 $[M - (2 \times H_2O)]^+$ (7), 442 $[M - (COOH + H)]^+$ (38), 424 (11), 409 (8), 370 (15), 264 [D/E ring (a)]$^+$ (29), 246 (77), 223 (44), 218 (69), 201 (99), 146 (100).

Hederagenin [3β,23-dihydroxyolean-12-en-28-oic acid, **18**] – 백색 무정형분말. $[\alpha]_D^{24}$ = +12.0° (*c* = 0.2, MeOH). ^{1}H-NMR (300 MHz, pyridine-d_5) δ: 0.92, 0.96, 0.99, 1.04, 1.05, 1.23 (3H each, s, 6 × CH_3), 3.30 (1H, dd, *J* = 3.3, 13.5 Hz, H-18), 3.72 4.18 (1H each, d, *J* = 10.2 Hz, H-23), 4.19 (1H, t, *J* = 8.7 Hz, H-3α), 5.49 (1H, t, *J* = 3.3 Hz, H-12). ^{1}H-NMR (300 MHz, CD_3OD) δ: 0.69, 0.81, 0.90, 0.93, 0.97, 1.16 (3H each, s, 6 × CH_3), 2.84 (1H, br dd, *J* = 4.5, 14.1 Hz, H-18), 3.28 3.52 (1H each, d, *J* = 11.1 Hz, H-23), 3.60 (1H, dd, *J* = 5.1, 10.8 Hz, H-3α), 5.23 (1H, t, *J* = 3.6 Hz, H-12). EIMS *m/z* 472 $[M]^+$ (0.1), 454 $[M - H_2O]^+$ (0.1), 248 [D/E ring (a)]$^+$, (100), 203 [a – COOH]$^+$ (75), 175 (20), 133 (34).

Secologanin dimethyl acetal [4-(2,2-dimethoxyethyl)-3-ethenyl-2-(β-D-glucopyranosyloxy)-3,4-dihydro-2*H*-pyran-5-carboxylic acid methyl ester, secologanin acetal, **19**] – 미백색 분말. $[\alpha]_D^{24}$ = -127.5° (*c* = 0.12, MeOH). IR υ_{max} (KBr) 3409 (OH), 1705 (ester), 1631 (α,β-unsat. C=O), 1439 (CH_2), 1388 (CH_3), 1286 (ester), 1075 (glycosidic C-O), 871, 768 cm^{-1}. UV λ_{max} (log ε) (MeOH) 230 (3.91) nm. ^{1}H-NMR (300 MHz, CD_3OD) δ: 1.63 (1H, ddd, *J* = 4.5, 8.1, 13.8 Hz, H-6a), 2.05 (1H, dt, *J* = 6.9, 13.8 Hz, H-6b), 2.66 (1H, dt, *J* = 5.4, 8.7 Hz, H-9), 2.90 (1H, br dd, *J* = 6.6, 12.3 Hz, H-5), 3.28, 3.29 (3H each, s, 2 × CH_3O), 3.69 (3H, s, $COOCH_3$), 4.48 (1H, dd, *J* = 4.5, 6.9 Hz, H-7), 5.25 (1H, dd, *J* = 1.8, 10.5 Hz, H-10a), 5.29 (1H, dd, *J* = 1.8, 17.4 Hz, H-10b), 5.50 (1H, d, *J* = 5.4 Hz, H-1), 5.72 (1H, ddd, *J* = 8.7, 10.2, 17.4 Hz, H-8), 7.42 (1H, d, *J* = 1.2 Hz, H-3), 4.66 (1H, d, *J* = 7.8 Hz, H-1′), 3.65 (1H, dd, *J* = 5.7, 12.0 Hz, H-6′a), 3.89 (1H, dd, *J* = 2.4, 12.0 Hz, H-6′b). ^{13}C-NMR (75.5 MHz, CD_3OD) δ: 97.8 (C-1), 153.2 (C-3), 111.7 (C-4), 29.4 (C-5), 33.2 (C-6), 104.5 (C-7), 135.8 (C-8), 45.3 (C-9), 119.8 (C-10), 100.1 (C-1′), 74.6 (C-2′), 78.0 (C-3′), 71.5 (C-4′), 78.4 (C-5′), 62.7 (C-6′), 169.2 ($\underline{C}OOCH_3$), 51.7 ($COO\underline{C}H_3$), 52.6, 53.9 (OCH_3). FABMS *m/z* 457 $[M + Na]^+$, 403 $[(M + H) - CH_3OH]^+$, 241 $[(M + H) - (CH_3OH + 162)]^+$.

β-Sitosterol 3-*O*-β-D-glucoside [daucosterol, **20**] – 백색 무정형분말. ^{1}H-NMR (300 MHz, pyridine-d_5) δ: 0.65 (3H, s, CH_3-18), 0.85 (3H, d, *J* = 6.3 Hz, CH_3-26), 0.87 (3H, d, *J* = 6.6 Hz, CH_3-27), 0.88 (3H, t, *J* = 7.8 Hz, CH_3-29), 0.98 (3H, d, *J* = 6.3 Hz, CH_3-21), 0.93 (3H, s, CH_3-19), 3.96 (1H, m, H-5′), 3.98 (1H, m, H-3), 4.05 (1H, t, *J* = 8.7 Hz, H-2′), 4.27 (1H, t, *J* = 8.7 Hz, H-3′), 4.30 (1H, t, *J* = 8.4 Hz, H-4′), 4.41 (1H, dd, *J* = 5.1, 11.7 Hz, H-6′a), 4.56 (1H, dd, *J* = 2.1, 11.7 Hz, H-6′b), 5.05 (1H, d, *J* = 7.5 Hz, H-1′), 5.34 (1H, d, *J* = 4.8

Hz, H-6). ^{13}C-NMR (75.5 MHz, pyridine-d_5) δ: 37.6 (C-1), 30.4 (C-2), 78.7 (C-3), 39.6 (C-4), 140.2 (C-5), 122.0 (C-6), 32.4 (C-7), 32.3 (C-8), 50.6 (C-9), 37.1 (C-10), 21.5 (C-11), 40.1 (C-12), 42.7 (C-13), 57.0 (C-14), 24.7 (C-15), 28.7 (C-16), 56.5 (C-17), 12.1 (C-18), 19.4 (C-19), 36.5 (C-20), 19.2 (C-21), 34.4 (C-22), 26.7 (C-23), 46.3 (C-24), 29.7 (C-25), 19.5 (C-26), 20.1 (C-27), 23.6 (C-28), 12.3 (C-29), 102.7 (C-1′), 75.5 (C-2′), 78.6 (C-3′), 71.7 (C-4′), 78.4 (C-5′), 63.1 (C-6′).

23-Hydroxytormentic acid [19α-hydroxyasiatic acid, 2α,3β,19α,23-tetrahydroxyurs-12-en-28-oic acid, **21**] – 백색 무정형분말. $[\alpha]_D^{23}$ = -6.4° (*c* = 0.1, pyridine). IR υ_{max} 3420 (OH), 1690 (COOH), 1458, 1377, 1049 cm^{-1}. ^{1}H-NMR (300 MHz, pyridine-d_5) δ: 1.06, 1.08, 1.11, 1.40, 1.64 (3H each, s, 5 × CH_3), 1.09 (3H, d, *J* = 6.6 Hz, 30-CH_3), 2.33 (1H, ddd, *J* = 3.9, 11.4, 11.4 Hz, H-15β), 3.04 (1H, br s, H-18), 3.08 (1H, ddd, *J* = 4.2, 13.5, 13.5 Hz, H-16α), 3.71 (1H, d, *J* = 10.2 Hz, H-23a), 4.18 (1H, d, *J* = 9.0 Hz, H-3α), 4.25 (1H, ddd, *J* = 3.6, 9.3, 9.3 Hz, H-2β), 4.19 (1H, d, *J* = 10.2 Hz, H-23b), 5.57 (1H, br s, H-12). ^{1}H-NMR (300 MHz, pyridine-d_5 + D_2O) δ: 1.00, 1.01, 1.05, 1.38, 1.59 (3H each, s, 5 × CH_3), 1.07 (3H, d, *J* = 6.9 Hz, 30-CH_3), 2.27 (1H, ddd, *J* = 3.9, 12.0, 12.0 Hz, H-15β), 2.98 (1H, br s, H-18), 3.02 (1H, ddd, *J* = 3.6, 13.0, 13.0 Hz, H-16α), 3.66 (1H, d, *J* = 10.2 Hz, H-23a), 4.15 (1H, d, *J* = 9.3 Hz, H-3α), 4.22 (1H, ddd, *J* = 4.2, 9.9, 10.1 Hz, H-2β), 4.13 (1H, d, *J* = 10.2 Hz, H-23b), 5.52 (1H, br s, H-12). ^{13}C-NMR (125.8 MHz, pyridine-d_5) δ: 47.7 (C-1), 68.8 (C-2), 78.3 (C-3), 43.6 (C-4), 47.9 (C-5), 18.6 (C-6), 33.1 (C-7), 40.4 (C-8), 47.7 (C-9), 38.3 (C-10), 24.1 (C-11), 127.8 (C-12), 139.9 (C-13), 42.1 (C-14), 29.3 (C-15), 26.3 (C-16), 48.2 (C-17), 54.5 (C-18), 72.6 (C-19), 42.3 (C-20), 26.9 (C-21), 38.4 (C-22), 66.5 (C-23), 14.2 (C-24), 17.3 (C-25), 17.3 (C-26), 24.6 (C-27), 180.8 (C-28), 27.0 (C-29), 16.7 (C-30). FABMS *m/z* 527 $[M + Na]^+$. EIMS *m/z* 504 $[M]^+$ (8), 486 $[M - H_2O]^+$ (5), 468 $[M - (2 \times H_2O)]^+$ (7), 458 $[M - (COOH + H)]^+$ (35), 386 (12), 264 [D/E ring]$^+$ (16), 246 (25), 218 (23), 201 (33), 146 (69), 72 (100).

Caffeic acid [3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-propenoic acid, 3,4-dihydroxycinnamic acid, **22**] – 미백색 분말. IR υ_{max} (KBr) 3137 (OH), 1650 (α,β-unsat. C=O), 1610, 1512, 1434 (aromat. C=C), 1279, 1221, 1162, 1117, 975 (*trans* CH=CH), 903, 856, 797 cm^{-1}. UV λ_{max} (log ε) (MeOH) 216 (4.28), 241 (4.10), 296 (4.20), 323 (4.31) nm. ^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ: 6.16 (1H, d, *J* = 15.8 Hz, H-8), 6.75 (1H, d, *J* = 8.2 Hz, H-5), 6.96 (1H, dd, *J* = 1.8, 8.2 Hz, H-6), 7.02 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, H-2), 7.40 (1H, d, *J* = 15.8 Hz, H-7), 9.16, 9.56 (1H each, br s, OH), 12.1 (1H, br s, COOH). ^{13}C-NMR (75.5 MHz, CD_3OD) δ: 127.8 (C-1), 115.6 (C-2), 146.8 (C-3), 149.5 (C-4), 116.5 (C-5), 122.8 (C-6), 147.0 (C-7), 114.1 (C-8), 171.1 (C-9). EIMS *m/z* 180 $[M]^+$ (100), 163 $[M - HO]^+$ (24), 136 $[M - CO_2]^+$ (83), 135 $[M - CO_2H]^+$ (28), 134 $[M - (CO_2H + H)]^+$ (56), 117 (18), 107 (17), 89 $[C_7H_5]^+$ (64).

9,12,13-Trihydroxyoctadeca-10(*E*),15(*Z*)-dienoic acid (23) – 백색 무정형분말. $[\alpha]_D^{22}$ = -30.4° (*c* = 0.1, MeOH). IR υ_{max} (KBr) 3544, 3355 (OH), 2926, 2849 (CH), 1696 (acid), 1462 (CH_2), 1311 (CH_3), 1071 (C-O), 974 (*trans* CH=CH), 860, 725 cm^{-1}. ^{1}H-NMR (300 MHz, CD_3OD) δ: 0.96 (3H, t, *J* = 7.5 Hz, 18-CH_3), 1.33 (CH_2), 1.52 (1H, m, H-8), 1.61 (2H, m, H-3), 2.01-2.15 (3H, m, H-17, 14b), 2.26 (2H, t, *J* = 7.3 Hz, H-2), 2.34 (1H, m, H-14a), 3.42-3.48 (1H, m, H-13), 3.95 (1H, t, *J* = 5.3 Hz, H-12), 4.04 (1H, m, H-9), 5.45 (2H, m, H-15, 16), 5.68 (1H, dd, *J* = 2.6, 15.6 Hz, H-11), 5.74 (1H, dd, *J* = 2.4, 15.6 Hz, H-10).

^{13}C-NMR (75.5 MHz, CD_3OD) δ: 14.6 (C-18), 21.7 (C-17), 26.2 (C-3), 26.5 (C-7), 30.2, 30.4, 30.5 (C-4, 5, 6), 31.5 (C-14), 36.6 (C-2), 38.3 (C-8), 73.0 (C-9), 75.8 (C-13), 75.9 (C-12), 126.4 (C-15), 131.1 (C-10), 134.3 (C-16), 136.5 (C-11). FABMS *m/z* 367 $[M + K]^+$, 351 $[M + Na]^+$, 329 $[M + H]^+$. Methyl trimethylsilyl 9,12,13-trihydroxyoctadeca-10(*E*),15(*Z*)-dienoate – EIMS *m/z* (rel. int., %) 518 (4), 460 (5), 317 (8), 293 (19), 259 (16), 171 (100), 81 (22), 73 (88).

Pinellic acid [9(*S*),12(*S*),13(*S*)-trihydroxy-10(*E*)-octadecenoic acid, **24**] – 백색 무정형분말. $[\alpha]_D^{23}$ = -1.3° (*c* = 0.15, MeOH). IR υ_{max} (KBr) 3544, 3356 (OH), 2932, 2849 (CH), 1696 (acid), 1462 (CH_2), 1314 (CH_3), 1073 (C-O), 974 (*trans* CH=CH), 727 cm^{-1}. ^{1}H-NMR (300 MHz, CD_3OD) δ: 0.90 (3H, t, *J* = 6.9 Hz, 18-CH_3), 1.33 (CH_2), 2.26 (2H, t, *J* = 7.2 Hz, H-2), 3.40 (1H, m, H-13), 3.90 (1H, t, *J* = 5.7 Hz, H-12), 4.04 (1H, dd, *J* = 6.0, 11.7 Hz, H-9), 5.65 (1H, dd, *J* = 5.0, 15.6 Hz, H-11), 5.72 (1H, dd, *J* = 5.0, 15.6 Hz, H-10). ^{1}H-NMR (500 MHz, pyridine-d_5) δ: 0.78 (3H, t, *J* = 6.8 Hz, 18-CH_3), 1.27 (CH_2), 2.45 (2H, t, *J* = 7.3 Hz, H-2), 3.91 (1H, m, H-13), 4.47 (2H, m, H-9, 12), 6.29 (1H, dd, *J* = 5.5, 15.6 Hz, H-11), 6.35 (1H, dd, *J* = 5.7, 15.6 Hz, H-10). ^{13}C-NMR (75.5 MHz, CD_3OD) δ: 14.4 (C-18), 23.7 (C-17), 26.2 (C-3), 26.4 (C-7), 26.6 (C-15), 30.2, 30.4, 30.5 (C-4, 5, 6), 33.1 (C-16), 33.6 (C-14), 35.2 (C-2), 38.3 (C-8), 73.0 (C-9), 75.8 (C-13), 76.5 (C-12), 131.1 (C-10), 136.6 (C-11). ^{13}C-NMR (125.8 MHz, pyridine-d_5) δ: 14.2 (C-18), 22.9 (C-17), 25.6 (C-3), 26.0 (C-7), 26.1 (C-15), 29.5, 29.7, 29.9 (C-4, 5, 6), 32.2 (C-16), 33.5 (C-14), 35.0 (C-2), 38.4 (C-8), 71.8 (C-9), 75.1 (C-13), 76.1 (C-12), 130.8 (C-10), 136.5 (C-11), 176.5 (C-1). FABMS *m/z* 369 $[M + K]^+$, 353 $[M + Na]^+$. Pinellic acid methyl ester – ^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 0.89 (3H, t, *J* = 6.6 Hz, 18-CH_3), 1.31 (CH_2), 2.30 (2H, t, *J* = 7.2 Hz, H-2), 3.47 (1H, m, H-13), 3.66 (3H, s, $COOCH_3$), 3.95 (1H, m, H-12), 4.15 (1H, m, H-9), 5.70 (1H, dd, *J* = 6.0, 15.6 Hz, H-11), 5.82 (1H, dd, *J* = 6.3, 15.6 Hz, H-10). EIMS *m/z* (rel. int., %) 309 $[M - H_2O - OH]^+$, 277, 226 (24), 211 (9), 194 (100), 176 (10), 166 (13), 155 (35), 109 (14), 95 (29), 83 (44), 74 (8). Methyl trimethylsilyl pinellate – EIMS *m/z* (rel. int., %) 460 (3), 387 (1), 298 (4), 259 (17), 173 (100), 129 (4), 103 (10), 73 (56).

(7*R*,8*R*)-*threo*-4,7,9,3′,9′-Pentahydroxy-3-methoxy-8-*O*-4′-neolignan (25) – 백색 무정형분말. $[\alpha]_D^{22}$ = -14.5° (*c* = 0.04, MeOH). IR υ_{max} (KBr) 3364 (OH), 1604, 1510, 1434 (aromat. C=C), 1275, 1127, 1032, 818 cm^{-1}. UV λ_{max} (log ε) (MeOH) 208 (4.29), 230 (sh, 4.01), 280 (3.69) nm. CD (c, 0.2 g/L, MeOH) [Θ] 234 (-10,692), 283 (-1,050) nm. ^{1}H-NMR (300 MHz, CD_3OD) δ: 1.72-1.82 (2H, m, H-8′), 2.54 (2H, t, *J* = 7.5 Hz, H-7′), 3.46 (1H, dd, *J* = 5.4, 11.4 Hz, H-9a), 3.53 (2H, t, *J* = 6.3 Hz, H-9′), 3.72 (1H, dd, *J* = 4.2, 11.4 Hz, H-9b), 3.81 (3H, s, OCH_3), 4.06 (1H, dt, *J* = 5.1, 5.7 Hz, H-8), 4.89 (1H, d, *J* = 6.3 Hz, H-7), 6.55 (1H, dd, *J* = 2.1, 8.4 Hz, H-6′), 6.68 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-2′), 6.74 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-5), 6.84 (1H, dd, *J* = 1.8, 8.4 Hz, H-6), 6.90 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-5′), 7.00 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, H-2). ^{1}H-NMR (500 MHz, CD_3OD) δ: 1.74-1.80 (2H, m, H-8′), 2.54 (2H, t, *J* = 7.3 Hz, H-7′), 3.46 (1H, dd, *J* = 5.0, 11.8 Hz, H-9a), 3.53 (2H, t, *J* = 6.5 Hz, H-9′), 3.72 (1H, dd, *J* = 4.2, 11.8 Hz, H-9b), 3.81 (3H, s, OCH_3), 4.06 (1H, dt, *J* = 4.8, 5.8 Hz, H-8), 4.89 (1H, d, *J* = 6.2 Hz, H-7), 6.55 (1H, dd, *J* = 2.1, 8.2 Hz, H-6′), 6.68 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-2′), 6.74 (1H, d, *J* = 8.2 Hz, H-5), 6.84 (1H, dd, *J* = 1.9, 8.1 Hz, H-6), 6.90 (1H, d, *J* = 8.2 Hz, H-5′), 7.00 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, H-2). ^{13}C-NMR (75.5 MHz, CD_3OD) δ: 134.0 (C-1), 111.5

(C-2), 148.9 (C-3), 147.3 (C-4), 115.9 (C-5), 120.7 (C-6), 74.2 (C-7), 87.8 (C-8), 61.7 (C-9), 138.6 (C-1′), 119.6 (C-2′), 149.4 (C-3′), 146.0 (C-4′), 117.2 (C-5′), 120.5 (C-6′), 32.5 (C-7′), 35.5 (C-8′), 61.6 (C-9′), 56.2 (OCH_3). EIMS *m/z* 364 $[M]^+$ (3), 346 $[M - H_2O]^+$ (76), 328 $[M - 2H_2O]^+$ (36), 288 (4), 269 (12), 241 (11), 209 (13), 194 (39), 180 $[HO(CH_3O)C_6H_3CH=CH-CH_2OH$ (coniferyl alcohol)$]^+$ (74), 162 $[180 - H_2O]^+$ (85), 150 (46), 137 $[HO(CH_3O)C_6H_3CH_2]^+$ (100), 124 $[HO(CH_3O)C_6H_3]^+$ (86), 123 $[(HO)_2C_6H_3CH_2]^+$ (30), 91 $[C_7H_7]^+$ (53), 77 $[C_6H_5]^+$ (41).

(+)-5-Demethyl-3-methoxyisolariciresinol (26) – 백색 무정형분말. $[\alpha]_D^{22}$ = +20.5° (*c* = 0.04, MeOH). IR υ_{max} (KBr) 3377 (OH), 1609, 1514, 1462 (aromat. C=C), 1275, 1228, 1048, 938 cm^{-1}. UV λ_{max} (log ε) (MeOH) 282 (3.92) nm. CD (c, 0.1 g/L, MeOH) [Θ] 241 (+35,789), 277 (+15,395), 293 (-3,365) nm. ^{1}H-NMR (500 MHz, CD_3OD) δ: 1.58 (1H, m, $W_{1/2} \geq 26$ Hz, H-8), 1.94 (1H, m, $W_{1/2} \geq 15$ Hz, H-8′), 2.46 (1H, dd, *J* = 11.7, 14.8 Hz, H-7a), 2.59 (1H, dd, *J* = 4.8, 14.8 Hz, H-7b), 3.36 (3H, s, 3-OCH_3), 3.42 (1H, dd, *J* = 6.9, 10.8 Hz, H-9a), 3.46 (2H, d, *J* = 5.5 Hz, H-9′), 3.54 (1H, dd, *J* = 5.2, 10.8 Hz, H-9b), 3.74 (3H, s, 3′-OCH_3), 4.28 (1H, d, *J* = 5.2 Hz, H-7′), 6.44 (1H, br s, H-6), 6.48 (1H, dd, *J* = 1.8, 8.2 Hz, H-6′) 6.64 (1H, d, *J* = 8.2 Hz, H-5′), 6.68 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, H-2′). ^{13}C-NMR (125.8 MHz, CD_3OD) δ: 130.5 (C-1), 124.8 (C-2), 148.2 (C-3), 145.9 (C-4), 137.8 (C-5), 111.3 (C-6), 33.3 (C-7), 41.1 (C-8), 67.0 (C-9), 140.1 (C-1′), 113.3 (C-2′), 148.7 (C-3′), 145.3 (C-4′), 115.7 (C-5′), 121.7 (C-6′), 41.7 (C-7′), 49.1 (C-8′), 64.5 (C-9′), 56.4 (3′-OCH_3), 60.3 (3-OCH_3). HR-EIMS *m/z* 376.1513, Calcd for $C_{20}H_{24}O_7$ 376.1522. EIMS *m/z* (rel. int., %) 376 $[M]^+$ (52), 358 $[M - H_2O]^+$ (7), 327 (21), 313 (7), 295 (19), 281 (15), 263 (21), 234 (100), 203 (55), 191 (36), 159 (23), 153 $[CH_3O(OH)_2C_6H_2CH_2]^+$ (21), 137 $[CH_3O(OH)C_6H_2CH_2]^+$ (50), 57 (48).

Pinoresinol glucoside [pinoresinol 4'-*O*-β-D-monoglucoside, (1*R*,3a*S*,4*R*,6a*S*)-2-methoxy-4-[tetrahydro-4-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1*H*,3*H*-furo[3,4-c]furan-1-yl]phenyl β-D-gluco pyranoside, **27**] – 백색 무정형분말. $[\alpha]_D^{23}$ = -77.2° (*c* = 0.13, MeOH). IR υ_{max} (KBr) 3420 (OH), 1605, 1515, 1458 (aromat. C=C), 1271, 1227, 1073 (glycosidic C-O), 819 cm^{-1}. UV λ_{max} (log ε) (MeOH) 209 (4.27), 225 (4.21), 279 (3.79) nm. ^{1}H-NMR (300 MHz, CD_3OD) δ: 3.18 (2H, m, H-8, 8′), 3.84, 3.86 (3H each, s, 2 × OCH_3), 3.87 (2H, overlap, H-9ax, 9′ax), 4.21 (1H, t, *J* = 6.6 Hz, H-9eq), 4.24 (1H, t, *J* = 6.6 Hz, H-9′eq), 4.69 (1H, d, *J* = 4.5 Hz, H-7), 4.75 (1H, d, *J* = 3.9 Hz, H-7′), 4.88 (1H, d, *J* = 7.8 Hz, H-1″), 6.76 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-5′), 6.80 (1H, dd, *J* = 1.8, 8.4 Hz, H-6′), 6.94 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, H-2′), 6.90 (1H, dd, *J* = 1.8, 8.1 Hz, H-6), 7.02 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, H-2), 7.13 (1H, d, *J* = 8.1 Hz, H-5). ^{13}C-NMR (75.5 MHz, CD_3OD) δ: 137.4 (C-1), 111.0 (C-2), 151.0 (C-3), 147.5 (C-4), 118.0 (C-5), 119.8 (C-6), 87.1 (C-7′), 87.5 (C-7), 55.3, 55.5 (C-8, 8′), 72.7 (C-9, 9′), 133.7 (C-1′), 111.6 (C-2′), 149.1 (C-3′), 147.3 (C-4′), 116.1 (C-5′), 120.0 (C-6′), 56.4 (OCH_3), 56.7 (OCH_3), 102.8 (C-1″), 74.9 (C-2″), 77.8 (C-3″), 71.3 (C-4″), 78.2 (C-5″), 62.5 (C-6″). FABMS *m/z* 543 $[M + Na]^+$, 520 $[M]^+$, 358 $[M - 162]^+$.

Sweroside [5-ethenyl-6-(β-D-glucopyranosyloxy)-4,4a,5,6-tetrahydro-1*H*,3*H*-pyrano[3,4-c] pyran-1-one, **28**] – 백색 무정형분말. $[\alpha]_D^{24}$ = -234.6° (*c* = 0.13, H_2O). IR υ_{max} (KBr) 3408 (OH), 1691 (lactone), 1614 (α,β-unsat. C=O), 1408 (CH_2), 1278 (ester), 1203, 1072 (glycosidic C-O), 988, 901, 839 cm^{-1}. UV λ_{max} (log ε) (MeOH) 240 (3.95) nm. ^{1}H-NMR (300

MHz, CD_3OD) δ: 1.69 (1H, ddd, *J* = 4.5, 13.8, 25.1 Hz, H-6a), 1.76 (1H, m, H-6b), 2.70 (1H, ddd, *J* = 1.5, 5.4, 9.5 Hz, H-9), 3.14 (1H, ddd, *J* = 2.7, 5.4, 11.6 Hz, H-5), 3.18 (1H, dd, *J* = 8.1, 9.0 Hz, H-2′), 3.27 (1H, t, *J* = 9.3 Hz, H-4′), 3.37 (1H, t, *J* = 8.7 Hz, H-3′), 3.66 (1H, dd, *J* = 5.4, 11.7 Hz, H-6′a), 3.89 (1H, dd, *J* = 2.4, 11.7 Hz, H-6′b), 4.36 (1H, ddd, *J* = 3.3, 11.1, 11.3 Hz, H-7a), 4.45 (1H, ddd, *J* = 2.1, 4.8, 11.4 Hz, H-7b), 4.68 (1H, d, *J* = 7.8 Hz, H-1′), 5.26 (1H, dd, *J* = 1.8, 7.5 Hz, H-10a), 5.31 (1H, dd, *J* = 1.8, 14.7 Hz, H-10b), 5.54 (1H, d, *J* = 1.5 Hz, H-1), 5.55 (1H, dt, *J* = 9.6, 10.2, 17.1 Hz, H-8), 7.59 (1H, d, *J* = 2.4 Hz, H-3). ^{13}C-NMR (75.5 MHz, CD_3OD) δ: 98.0 (C-1), 153.9 (C-3), 106.0 (C-4), 28.4 (C-5), 25.9 (C-6), 69.7 (C-7), 133.3 (C-8), 43.8 (C-9), 120.8 (C-10), 168.5 (C-11), 99.7 (C-1′), 74.7 (C-2′), 78.4 (C-3′), 71.5 (C-4′), 77.9 (C-5′), 62.7 (C-6′). FABMS *m/z* 381 $[M + Na]^+$, 359 $[M + H]^+$, 197 $[(M + H) - 162]^+$.

Coniferyl aldehyde 4-*O*-glucoside [kalopanaxin A, 3-[(4-β-D-glucopyranosyloxy)-3-methoxyphenyl]-2-propenal, **29**] – 백색 무정형분말. $[\alpha]_D^{22}$ = -15.9° (*c* = 0.2, MeOH). IR υ_{max} (KBr) 3363 (OH), 1664 (α,β-unsat. C=O), 1600, 1510 (aromat. C=C), 1273, 1077, 1021 (glycosidic C-O), 900, 808 cm^{-1}. UV λ_{max} (log ε) (MeOH) 215 (sh, 4.03), 234 (3.96), 306 (4.13), 326 (4.17) nm. ^{1}H-NMR (500 MHz, CD_3OD) δ: 3.82 (1H, dd, *J* = 5.1, 12.3 Hz, H-6′a), 3.88 (1H, dd, *J* = 2.1, 12.3 Hz, H-6′b), 3.90 (3H, s, OCH_3), 5.00 (1H, d, *J* = 7.5 Hz, H-1′), 6.71 (1H, dd, *J* = 7.8, 15.6 Hz, H-8), 7.21 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-5), 7.26 (1H, dd, *J* = 1.8, 8.4 Hz, H-6), 7.32 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, H-2), 7.61 (1H, d, *J* = 15.6 Hz, H-7), 9.61 (1H, d, *J* = 7.8 Hz, H-9). ^{13}C-NMR (125.8 MHz, CD_3OD) δ: 131.1 (C-1), 113.6 (C-2), 151.9 (C-3), 151.7 (C-4), 118.1 (C-5), 125.2 (C-6), 156.0 (C-7), 129.0 (C-8), 196.9 (C-9), 102.8 (C-1′), 75.6 (C-2′), 78.7 (C-3′), 72.1 (C-4′), 79.1 (C-5′), 63.2 (C-6′), 57.6 (OCH_3). FABMS *m/z* 363 $[M + Na]^+$, 341 $[M + H]^+$, 179 $[(M + H) - 162]^+$.

Linarin [acaciin, acacetin 7-rutinoside, 5,7-dihydroxy-4′-methoxyflavone 7-rutinoside, apigenin 4′-methyl ether 7-rhamnosyl-(1→6)-glucoside, **30**] – 백색 무정형분말. $[\alpha]_D^{24}$ = +12.0° (*c* = 0.2, MeOH). IR υ_{max} (KBr) 3467 (OH), 1659 (α,β-unsat. C=O), 1608, 1582, 1503 (aromat. C=C), 1300, 1245, 1184, 1070 (glycosidic C-O), 844, 806 cm^{-1}. UV λ_{max} (log ε) (MeOH) 268 (4.29), 326 (4.33); (MeONa) 287 (4.22), 363 (4.01); (NaOAc) 268 (4.30), 324 (4.32); (NaOAc + H_3BO_3) 268 (4.31), 328 (4.35); ($AlCl_3$) 275 (4.25), 301 (4.20), 344 (4.36), 384 (4.24); ($AlCl_3$ + HCl) 277 (4.26), 301 (4.22), 341 (4.36), 383 (4.19). ^{1}H-NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ: 1.07 (1H, d, *J* = 6.0 Hz, Rha CH_3), 3.86 (3H, s, OCH_3), 4.54 (1H, d, *J* = 1.2 Hz, H-1‴), 5.05 (1H, d, *J* = 6.9 Hz, H-1′), 6.44 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-6), 6.79 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-8), 6.94 (1H, s, H-3), 7.15 (2H, d, *J* = 9.0 Hz, H-3′, 5′), 8.05 (2H, d, *J* = 9.0 Hz, H-2′, 6′), 12.90 (1H, br s, HO-5). ^{13}C-NMR (75.5 MHz, DMSO-d_6) δ: 164.2 (C-2), 104.0 (C-3), 182.2 (C-4), 161.3 (C-5), 95.0 (C-6), 163.2 (C-7), 99.9 (C-8), 157.2 (C-9), 105.7 (C-10), 55.8 (OCH_3), 122.9 (C-1′), 128.7 (C-2′, 6′), 114.9 (C-3′, 5′), 162.6 (C-4′), 100.2 (C-1″), 73.3 (C-2″), 76.4 (C-3″), 69.8 (C-4″), 75.9 (C-5″), 66.3 (C-6″), 100.7 (C-1‴), 70.5 (C-2‴), 70.9 (C-3‴), 72.3 (C-4‴), 68.5 (C-5‴), 18.0 (C-6‴). FABMS *m/z* 615 $[M + Na]^+$, 593 $[M + H]^+$, 447 $[(M + H) - 146]^+$, 285 $[(M + H) - 146 - 162]^+$.

Coniferin [3-[(4-β-D-glucopyranosyloxy)-3-methoxyphenyl]-2-propenol, 4-hydroxy-3-methoxy-1-(γ-hydroxypropenyl)benzene-4-D-glucoside, **31**) – 백색 무정형분말. $[\alpha]_D^{22}$ = -48.1° (*c* = 0.2, MeOH). IR υ_{max} (KBr) 3388 (OH), 1650, 1594, 1512, 1455 (aromat. C=C),

1266, 1075, 1043 (glycosidic C-O), 809 cm^{-1}. UV λ_{max} (log ε) (MeOH) 212 (sh, 3.45), 258 (3.26), 265 (sh, 3.23) nm. ^{1}H-NMR (400 MHz, CD_3OD) δ: 3.86 (3H, s, OCH_3), 3.87 (1H, dd, *J* = 2.1, 12.6 Hz, H-6′b), 4.20 (2H, dd, *J* = 1.2, 5.7 Hz, H-9), 4.88 (1H, d, *J* = 7.8 Hz, H-1′), 6.27 (1H, dt, *J* = 5.7, 15.9 Hz, H-8), 6.54 (1H, d, *J* = 15.9 Hz, H-7), 6.94 (1H, dd, *J* = 1.8, 8.4 Hz, H-6), 7.06 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, H-2), 7.10 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-5). ^{13}C-NMR (100 MHz, CD_3OD) δ: 133.7 (C-1), 111.4 (C-2), 150.9 (C-3), 147.6 (C-4), 118.0 (C-5), 120.7 (C-6), 131.4 (C-7), 129.0 (C-8), 63.8 (C-9), 102.7 (C-1′), 75.0 (C-2′), 78.2 (C-3′), 71.3 (C-4′), 77.9 (C-5′), 62.5 (C-6′), 57.5 (OCH_3). FABMS *m/z* 365 $[M + Na]^+$.

Loganin [1-(β-D-glucopyranosyloxy)-1,4a,5,6,7,7a-hexahydro-6-hydroxy-7-methylcyclopenta[*c*]pyran-4-carboxylic acid methyl ester, 7-hydroxy-6-desoxy-vernalin, **32**] – 백색 무정형분말. $[\alpha]_D^{24}$ = -103.5° (*c* = 0.14, H_2O). IR υ_{max} (KBr) 3551, 3511, 3298 (OH), 1713 (ester), 1649 (α,β-unsat. C=O), 1443 (CH_2), 1300, 1275 (ester), 1073, 1038 (glycosidic C-O), 901, 862 cm^{-1}. ^{1}H-NMR (300 MHz, pyridine-d_5) δ: 1.18 (3H, d, *J* = 7.2 Hz, 10-CH_3), 1.73 (1H, ddd, *J* = 4.5, 7.5, 13.8 Hz, H-6eq), 2.01 (1H, m, H-8), 2.43 (1H, ddd, *J* = 4.5, 9.3, 9.3 Hz, H-9), 2.62 (1H, ddd, *J* = 1.2, 7.8, 13.8 Hz, H-6), 3.50 (1H, dd, *J* = 8.1, 16.2 Hz, H-5), 3.55 (3H, s, $COOCH_3$), 4.37 (1H, dd, *J* = 5.4, 12.0 Hz, H-6′a), 4.54 (1H, dd, *J* = 2.1 12.0 Hz, H-6′b), 5.39 (1H, d, *J* = 7.8 Hz, H-1′), 5.67 (1H, d, *J* = 4.5 Hz, H-1), 7.68 (1H, d, *J* = 1.2 Hz, H-3). ^{1}H-NMR (300 MHz, CD_3OD) δ: 1.08 (3H, d, *J* = 6.9 Hz, 10-CH_3), 1.61 (1H, ddd, *J* = 4.8, 7.5, 14.0 Hz, H-6b), 1.83-1.90 (1H, m, H-8), 2.02 (1H, dt, *J* = 4.5, 13.8 Hz, H-9), 2.22 (1H, ddd, *J* = 1.5, 8.0, 14.0 Hz, H-6a), 3.10 (1H, br q, *J* = 7.8 Hz, H-5), 3.65 (1H, dd, *J* = 5.7, 12.0 Hz, H-6′a), 3.68 (3H, s, $COOCH_3$), 3.88 (1H, dd, *J* = 2.1, 12.0 Hz, H-6′b), 4.03 (1H, br t, *J* = 4.5 Hz, H-7), 4.64 (1H, d, *J* = 8.1 Hz, H-1′), 5.26 (1H, d, *J* = 4.5 Hz, H-1), 7.38 (1H, d, *J* = 1.2 Hz, H-3). ^{13}C-NMR (75.5 MHz, CD_3OD) δ: 97.7 (C-1), 152.1 (C-3), 114.0 (C-4), 32.1 (C-5), 42.7 (C-6), 75.0 (C-7), 42.1 (C-8), 46.5 (C-9), 13.4 (C-10), 100.1 (C-1′), 74.7 (C-2′), 78.3 (C-3′), 71.6 (C-4′), 78.0 (C-5′), 62.8 (C-6′), 169.5 ($\underline{C}OOCH_3$), 51.6 ($COO\underline{C}H_3$). FABMS *m/z* 413 $[M + Na]^+$, 391 $[M + H]^+$, 359 $[(M + H) - CH_3OH]^+$, 229 $[(M + H) - 162)]^+$.

Loganic acid [1-(β-D-glucopyranosyloxy)-1,4a,5,6,7,7a-hexahydro-6-hydroxy-7-methylcyclopenta[*c*]pyran-4-carboxylic acid, **33**] – 백색 무정형분말. $[\alpha]_D^{29}$ = -54.4° (*c* = 0.2, MeOH). IR υ_{max} (KBr) 3377 (OH), 1683, 1637 (α,β-unsat. C=O), 1279, 1076, 1021 (glycosidic C-O), 999, 900, 866 cm^{-1}. UV λ_{max} (log ε) (MeOH) 232 (4.17) nm. ^{1}H-NMR (400 MHz, CD_3OD) δ: 1.09 (3H, d, *J* = 6.9 Hz, 10-CH_3), 1.65 (1H, ddd, *J* = 5.1, 7.5, 14.1 Hz, H-6β), 1.87 (1H, m H-8), 2.02 (1H, ddd, *J* = 4.4, 7.2, 9.1 Hz, H-9), 2.23 (1H, ddd, *J* = 1.0, 6.2, 14.1 Hz, H-6 α), 3.09 (1H, br q, *J* = 8.0 Hz, H-5), 3.19 (1H, t, *J* = 9.0 Hz, H-2′), 3.26 (1H, t, *J* = 9.0 Hz, H-4′), 3.36 (1H, t, *J* = 9.0 Hz, H-3′), 3.65 (1H, dd, *J* = 5.6, 12.1 Hz, H-6′a), 3.89 (1H, dd, *J* = 1.5, 12.1 Hz, H-6′b), 4.03 (1H, br t, *J* = 4.3 Hz, H-7), 4.65 (1H, d, *J* = 7.9 Hz, H-1′), 5.27 (1H, d, *J* = 4.4 Hz, H-1), 7.39 (1H, s, H-3). ^{13}C-NMR (100 MHz, CD_3OD) δ: 97.6 (C-1), 152.1 (C-3), 114.1 (C-4), 32.1 (C-5), 42.7 (C-6), 75.1 (C-7), 42.1 (C-8), 46.5 (C-9), 13.5 (C-10), 170.9 (C-11), 100.0 (C-1′), 74.7 (C-2′), 78.3 (C-3′), 71.6 (C-4′), 78.0 (C-5′), 62.7 (C-6′). FABMS *m/z* 399 $[M + Na]^+$. (-)-FABMS *m/z* 375 $[M - H]^-$, 213 $[(M - H) - 162]^-$. HR-(-)-FABMS *m/z* 375.1288, Calcd for $C_{16}H_{23}O_{10}$ 375.1291.

Demethylsecologanol [3-ethenyl-2-(β-D-glucopyranosyloxy)-3,4-dihydro-4-(2-hydroxyethyl)

-2*H*-pyran-5-carboxylic acid, **34**] – 백색 무정형분말. $[\alpha]_D^{29}$ = -72.0° (*c* = 0.1, MeOH). IR υ_{max} (KBr) 3388 (OH), 1642 (α,β-unsat. C=O), 1538, 1399, 1075 (glycosidic C-O), 931 cm^{-1}. UV λ_{max} (log ε) (MeOH) 230 (4.15) nm. ^{1}H-NMR (500 MHz, CD_3OD) δ: 1.70-1.80 (2H, m, H-6), 2.60 (1H, m, H-9), 2.86 (1H, m, H-5), 3.19 (1H, t, *J* = 8.0 Hz, H-2′), 3.24-3.34 (2H, overlap with solvent, H-4′, 5′), 3.36 (1H, t, *J* = 8.8 Hz, H-3′), 3.55 (2H, m, H-7), 3.65 (1H, dd, *J* = 5.7, 12.0 Hz, H-6′a), 3.88 (1H, dd, *J* = 1.9, 12.0 Hz, H-6′b), 4.68 (1H, d, *J* = 7.9 Hz, H-1′), 5.21 (1H, br d, *J* = 10.4 Hz, H-10a), 5.25 (1H, 1H, br d, *J* = 17.3 Hz, H-10b), 5.48 (1H, d, *J* = 6.5 Hz, H-1), 5.80 (1H, ddd, *J* = 8.8, 10.4, 17.3 Hz, H-8), 7.32 (1H, s, H-3). ^{13}C-NMR (125.8 MHz, CD_3OD) δ: 97.4 (C-1), 151.1 (C-3), 31.4 (C-5), 33.9 (C-6), 61.0 (C-7), 136.4 (C-8), 45.7 (C-9), 118.8 (C-10), 100.0 (C-1′), 74.7 (C-2′), 77.9 (C-3′), 71.6 (C-4′), 78.4 (C-5′), 62.8 (C-6′). FABMS *m/z* 375 $[M - H]^-$. HR-FABMS *m/z* 375.1290, Calcd for $C_{16}H_{23}O_{10}$ 375.1291.

2.2 금은화 (*Lonicera japonica*, Flower)로부터 생리활성 성분분리

실험재료 – 이제현 교수가 제공한 검체 (중국산, 약 22.4 kg, 2007년 4월 인수)를 사용하였다.

추출 및 분획 – 금은화 19.4 kg을 쇠절구로 빻은 후 70% EtOH로 reflux하여 3시간씩 5회 추출하여 70% EtOH 엑스를 얻고, Hexane (389.6 g), CH_2Cl_2 (271.1 g), EtOAc (375.7 g), BuOH (1767.5 g)로 순차적으로 분획하였고, 수층을 농축하여 H_2O 분획을 얻었다.

분리 및 정제 – 금은화 CH_2Cl_2분획 271.1 g 중 (114.8 g)에 대하여 CH_2Cl_2/MeOH (gradient)의 용출용매로 silica gel (Merck no. 7734) column chromatography를 실시하여 18개의 소분획을 얻었다. 얻어진 소분획 C-2로부터 CH_2Cl_2로 재결정을 반복하여 화합물 **1** (44 mg)을 얻었다. 소분획 C-7 (9.0 g)에 대하여 hexane/EtOAc 및 EtOAc/MeOH (gradient)의 용출용매로 silica gel (Merck no. 7734) column chromatography를 실시하여 얻어진 소분획 C-7-1325-2526을 CH_2Cl_2로 재결정을 반복하여 화합물 **2** (80 mg)를 얻었다. 소분획 C-11 (4.2 g)에 대하여 hexane/EtOAc 및 EtOAc/MeOH (gradient)의 용출용매로 silica gel (Merck no. 7734) column chromatography를 실시하여 얻어진 소분획 C-11-112122-5254를 CH_2Cl_2로 재결정을 반복하여 화합물 **3** (10 mg)을 얻었다.

EtOAc분획 (187.6 g)에 대하여 CH_2Cl_2/MeOH/H_2O = 7 : 0.8 : 0.5 → 13 : 7 : 2의 용출용매로 silica gel (Merck no. 7734) column chromatography를 실시하여 16개의 소분획을 얻었다. 얻어진 소분획 E-2로부터 CH_2Cl_2로 재결정을 반복하여 화합물 **4** (42 mg)를, 소분획 E-6으로부터 CH_2Cl_2/MeOH의 혼합용매로 재결정을 반복하여 화합물 **5** (3,153 mg)를 각각 얻었다. 다음 소분획 E-5 (4.6 g)에 대하여 hexane/EtOAc 및 EtOAc/MeOH (gradient)의 용출용매로 silica gel (Merck no. 7734) column chromatography를 실시하여 소분획 E-5-2132로부터 MeOH로 재결정을 반복하여 화합물 **6** (175 mg)을 각각 얻었으며, 소분획 E-5-0614 (954 mg)에 대하여 CH_3Cl/MeOH/H_2O = 7 : 0.3 : 0.5 → 7 : 1 : 0.5의 용출용매로 silica gel (Merck no. 7729) column chromatography를 실시하여 얻어진 소분획 E-5-0614-0922 (538 mg)에 대하여 CH_2Cl_2/MeOH/H_2O = 7 : 0.5 : 0.5 → 7 : 2 : 0.5의 용출용매로 silica gel (Merck no. 7729) column chromatography를 실시하였다. 소분획 E-5-0614-0922-0925 (285 mg)에 대하여 CH_2Cl_2/MeOH/H_2O = 7 : 0.5 : 0.5의 용출용매로 silica gel (Merck no. 7729) column chromatography를 실시하여 얻어진 E-5-0614-0922-0925-1557 (150 mg)에 대하여 CH_2Cl_2/MeOH/H_2O = 7 : 0.5 : 0.5의 용출용매로 silica gel (Merck no. 7729) column

chromatography를 실시하였다. 소분획 E-5-0614-0922-0925-1557-0516 (100 mg)에 대하여 $CH_3Cl/MeOH/H_2O$ = 7 : 0.5 : 0.5 → 7 : 1 : 0.5의 용출용매로 silica gel (Merck no. 7729) column chromatography를 실시하여 얻어진 소분획 E-5-0614-0922-0925-1557- 0516-0406으로부터 화합물 **7** (2 mg)을 얻었다. 소분획 E-5-1516 (126 mg)에 대하여 $MeOH/H_2O$ = 1 : 1의 용출용매로 RP-18 column chromatography를 실시하여 얻어진 소분획 E-5-1516-34로부터 화합물 **8** (10 mg)을, E-5-1516-1418로부터 화합물 **9** (7 mg)를 얻었다. 또한 소분획 E-8 (11.8 g)에 대하여 hexane/EtOAc 및 EtOAc/MeOH (gradient)의 용출용매로 silica gel (Merck no. 7734) column chromatography를 실시하여 소분획 E-8-7로부터 CH_2Cl_2/MeOH 혼합용매로 재결정을 반복하여 화합물 **10** (5 mg)과 화합물 **11** (16 mg)을 얻었다. 소분획 E-8-1521A (3.6 g)에 대하여 $CH_2Cl_2/MeOH/H_2O$= 7:0.5:0.5 → 7:3:0.8의 용출용매로 silica gel (Merck no. 7734) column chromatography를 실시하였고 CH_2Cl_2/MeOH 혼합용매로 재결정을 반복하여 화합물 **12** (3 mg)를 얻었다. 소분획 E-9 (29.3 g)에 대하여 hexane/EtOAc 및 EtOAc/MeOH (gradient)의 용출용매로 silica gel (Merck no. 7734) column chromatography를 실시하여 소분획 E-9-38로부터 CH_2Cl_2/MeOH로 재결정을 반복하여 화합물 **13** (3 mg)을 얻었다. 소분획 E-9-2123 (617 mg)에 대하여 $MeOH/H_2O$=3:2의 용출용매로 RP-18 column chromatography를 실시하여 얻어진 소분획 E-9-2123-1627 (399 mg)에 대하여 다시 $MeOH/H_2O$=3:2의 용출용매로 RP-18 column chromatography를 실시하여 얻어진 소분획 E-9-2123- 1627-1718로부터 화합물 **14** (4 mg)를 얻었다. 소분획 E-9-2230 (1.51 g)에 대하여 $CH_2Cl_2/MeOH/H_2O$=7:1:0.5 → 7:3:1의 용출용매로 silica gel (Merck no. 7729) column chromatography를 실시하여 얻어진 소분획 E-9-2230-2324로부터 화합물 **15** (7 mg)를 얻었고 소분획 E-9-3435 (8.09 g)에 대하여 hexane/EtOAc (5:8 → 3:10 → 1:10) 및 물포화 EtOAc/MeOH (gradient)의 용출용매로 silica gel (Merck no. 7734) column chromatography를 실시하여 얻어진 소분획 E-9-3435-1539 (7.98 g)에 대하여 $CH_2Cl_2/MeOH/H_2O$=7:0.5:0.5 → 7:1:0.5의 용출용매로 silica gel (Merck no. 7734) column chromatography를 실시하였다. 이로부터 얻어진 소분획 E-9-3435-1539-1218 (4.5 g)에 대하여 물포화 EtOAc/MeOH (gradient)의 용출용매로 silica gel (Merck no. 7734) column chromatography를 실시하여 얻어진 소분획 E-9-3435-1539-1218-0204 (289 mg)에 대하여 물포화 EtOAc의 용출용매로 silica gel (Merck no. 7729) column chromatography를 실시하여 얻어진 E-9-3435-1539-1218-0204-3로부터 화합물 **16** (3 mg)을 분리하였다. 소분획 E-9-3435-1539-1218-0520 (2.58 g)에 대하여 $CH_2Cl_2/MeOH/H_2O$=7:1:0.5 → 7:2:1의 용출용매로 silica gel (Merck no. 7734) column chromatography를 실시하여 얻어진 소분획 E-9-3435-1539- 1218-0520-7로부터 화합물 **17** (118 mg)을 얻었다. 소분획 E-9-5254 (1.37 g)에 대하여 $CH_2Cl_2/MeOH/H_2O$=7:1:0.5 → 7:2:0.5의 용출용매로 silica gel (Merck no. 7729) column chromatography를 실시하여 얻어진 소분획 E-9-5254-1213로부터 화합물 **18** (6 mg)을 얻었다. 소분획 E-12 (37.2 g)에 대하여 EtOAc/MeOH/H_2O의 용출용매로 silica gel (Merck no. 7734) column chromatography를 실시하여 얻어진 소분획 E-12-5로부터 MeOH로 재결정을 반복하여 화합물 **19** (617 mg)와 화합물 **20** (500 mg)를 얻었다. 소분획 E-12-2 (7.72 g)에 대하여 $CH_2Cl_2/MeOH/H_2O$=7:1.5:0.5→7:3:1의 용출용매로 silica gel (Merck no. 7729) column chromatography를 실시하여 얻어진 소분획 E-12-2-0409로부터 화합물 **21** (1,899 mg)을 얻었다. 소분획 E-12-3 (3.72 g)에 대하여$CH_2Cl_2/MeOH/H_2O$=7:1:0.5→7:3:1의 용출용매로 silica gel (Merck no. 7734) column chromatography를 실시하여 얻어진 소분획 E-12-3-6로부터 화합물 **22** (16 mg)을 분리하였고, 소분획 E-12-3-1722 (850 mg)에 대하여 EtOAc/MeOH/H_2O=100;4:3→ 100:8:6의 용출용매로 silica gel (Merck no. 7729) column chromatography를 실시하여 얻어진

E-12-3-1722-4로부터 화합물 **23** (19 mg)를 얻었다. 또한 소분획 E-12-3-2326 (1.65 g)에 대하여 EtOAc/MeOH/ H_2O=100;4:3 → 100:8:6의 용출용매로 silica gel (Merck no. 7729) column chromatography를 실시하여 얻어진 소분획 E-12-3-2326-0509로부터 화합물 **24** (339 mg)을 얻었다. 소분획 E-12-1525 (4.9 g)에 대하여 CH_2Cl_2/MeOH/H_2O =7:1:0.5 → 7:3:1의 용출용매로 silica gel (Merck no. 7734) column chromatography를 실시하여 얻어진 소분획 E-12-1525-1315 (2.04 g)에 대하여 물포화 EtOAc/MeOH=100:0 → 96:4의 용출용매로 silica gel (Merck no. 7729) column chromatography를 실시하여 얻어진 소분획 E-12-1525-1315-9로부터 화합물 **25** (3 mg)를 얻었다. 소분획 E-12-2631 (4.94 g)에 대하여 EtOAc/MeOH /H_2O=100:8:6 → 100:16.5:13.5의 용출용매로 silica gel (Merck no. 7734) column chromatography를 실시하여 얻어진 소분획 E-12-2631-2 (2.77 g)에 대하여 물포화 EtOAc/MeOH=100:0 → 93:7의 용출용매로 silica gel (Merck no. 7729) column chromatography를 실시하였다. 이 중 소분획 E-12-2631-2-22 (0.9 g)에 대하여 CH_2Cl_2/MeOH/H_2O=7:1.5:0.5 → 7:2:0.5의 용출용매로 column chromatography를 실시하여 얻어진 소분획 E-12-2631-2-22-0712 (148 mg)에 대하여 MeOH/H_2O=1:1의 용출용매로 RP-18 column chromatography를 실시하여 얻어진 소분획 E-12-2631-2-22-0712-0607로부터 화합물 **26** (70 mg)를 얻었다.

BuOH분획 1,767.5 g 중 (612.2 g) 에 대하여 CH_2Cl_2/MeOH (gradient)의 용출용매로 silica gel (Merck no. 7734) column chromatography를 실시하여 20개의 소분획을 얻었다. 얻어진 소분획 B-18로부터 CH_2Cl_2/MeOH로 재결정을 반복하여 화합물 **27** (1,068 mg)을 얻었다. 소분획 B-14 (28.5 g)에 대하여 CH_2Cl_2/MeOH /H_2O=7:0.5:0.5 → 7:3:1의 용출용매로 silica gel (Merck no. 7734) column chromatography를 실시하여 얻어진 소분획 B-14-2832 (1.24 g)에 대하여 hexane/EtOAc=5:8 → 3:10의 용출용매로 silica gel (Merck no. 7729) column chromatography를 실시하여 얻어진 소분획 B-14-2832-2130 (150 mg)에 대하여 hexane/EtOAc=1:10의 용출용매로 silica gel (Merck no. 7729) column chromatography를 실시하여 얻어진 소분획 B-14-2832-2130-49로부터 화합물 **28** (3 mg)을 얻었다. 소분획 B-14-4748 (3 g)에 대하여 물포화 EtOAc/MeOH=100:0→93:7의 용출용매로 silica gel (Merck no. 7734) column chromatography를 실시하여 소분획 B-14-4748-3845 (1430 mg) 얻었다. 이를 다시 EtOAc/MeOH/H_2O=100:16.5:13.5의 용출용매로 silica gel (Merck no. 7729) column chromatography를 실시하여 얻어진 소분획 B-14-4748-3845-2325로부터 화합물 **29** (400 mg)를 얻었다.

***n*-Nonacosane** [$C_{29}H_{60}$, **1**] – 백색 분말. ^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 0.88 (3H, t, *J* = 6.9 Hz, CH_3), 1.25 (CH_2). ^{13}C-NMR (75.5 MHz, $CDCl_3$) δ: 14.1 (CH_3), 22.7 (C-17), 29.4, 29.7, 31.9. EIMS *m/z* 408 $[M]^+$, 337, 141, 127, 113, 99, 85, 71, 57 (100).

***n*-Hexacosanol** [ceryl alcohol, **2**]– 백색 무정형분말. ^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 0.88 (3H, t, *J* = 7.2 Hz, CH_3), 1.25 (CH_2), 1.56 (2H, m, $HOCH_2C\underline{H}_2$), 3.64 (2H, t, *J* = 6.6 Hz, $HOC\underline{H}_2$). ^{13}C-NMR (75.5 MHz, $CDCl_3$) δ: 14.1 (CH_3), 22.7 (25-CH_2), 25.7 (3-CH_2), 29.4 (23-CH_2), 29.7 (CH_2), 31.9 (24-CH_2), 32.8 (2-CH_2), 63.1 (1-CH_2). GC/MS t_R 40.6: *m/z* 392 $[M - H_2O]^+$(1), 364, 139, 125, 111, 97 (100), 83, 69, 57 (*n*-octacosanol, 18.4%). t_R 32.8: *m/z* 364 $[M - H_2O]^+$(1), 336, 139, 125, 111, 97, 83, 69, 57 (100) (*n*-hexacosanol, 28.5%). t_R 27.8: *m/z* 336 $[M - H_2O]^+$(1), 308, 139, 125, 111, 97, 83, 69, 57 (100) (*n*-tetracosanol, 12.1%).

Monopalmitin [glyceryl 1-monohexacosanoate, **3**] – 백색 무정형 분말. ^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 0.88 (3H, t, *J* = 6.9 Hz, CH_3), 1.25 (CH_2), 1.62 (2H, m, H-3′), 2.35 (2H, t, *J* = 7.5 Hz, H-2′), 3.60 (1H, dd, *J* = 5.7, 11.7 Hz, H-3a), 3.70 (1H, dd, *J* = 3.9, 11.7 Hz, H-3b),

3.93 (1H, m, H-2), 4.14 (1H, dd, *J* = 6.0, 11.7 Hz, H-1a), 4.20 (1H, dd, *J* = 5.4, 11.7 Hz, H-1b). ^{13}C-NMR (75.5 MHz, $CDCl_3$) δ: 14.1 (CH_3), 22.7 (C-15′), 24.9 (C-3′), 29.1, 29.2, 29.3, 29.4, 29.6, 29.7 (CH_2), 31.9 (C-14′), 34.1 (C-2′), 63.3 (C-3), 65.1 (C-1), 70.3 (C-2), 174.4 (C-1′). FABMS *m/z* 353 $[M + Na]^+$.

β-Sitosterol [stigmast-5-en-3β-ol, **4**] – 백색 침상결정. ^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 0.68 (3H, s, CH_3-18), 0.81 (3H, d, *J* = 6.6 Hz, CH_3-26), 0.83 (3H, d, *J* = 6.3 Hz, CH_3-27), 0.84 (3H, t, *J* = 7.2 Hz, CH_3-29), 0.92 (3H, d, *J* = 6.6 Hz, CH_3-21), 1.01 (3H, s, CH_3-19), 3.52 (1H, m, H-3), 5.35 (1H, d, *J* = 5.1 Hz, H-6). ^{13}C-NMR (75.5 MHz, $CDCl_3$) δ: 37.3 (C-1), 31.7 (C-2), 71.8 (C-3), 42.3 (C-4), 140.8 (C-5), 121.7 (C-6), 31.9 (C-7), 31.9 (C-8), 50.1 (C-9), 36.5 (C-10), 21.1 (C-11), 39.8 (C-12), 42.3 (C-13), 56.8 (C-14), 24.3 (C-15), 28.2 (C-16), 56.1 (C-17), 11.9 (C-18), 19.4 (C-19), 36.1 (C-20), 18.8 (C-21), 34.0 (C-22), 26.1 (C-23), 45.8 (C-24), 29.2 (C-25), 19.0 (C-26), 19.8 (C-27), 23.1 (C-28), 12.0 (C-29).

Daucosterol [β-sitosterol 3-*O*-β-D-glucoside, **5**] – 백색 무정형분말. ^{1}H-NMR (300 MHz, pyridine-d_5) δ: 0.65 (3H, s, CH_3-18), 0.85 (3H, d, *J* = 6.3 Hz, CH_3-26), 0.87 (3H, d, *J* = 6.6 Hz, CH_3-27), 0.88 (3H, t, *J* = 7.8 Hz, CH_3-29), 0.98 (3H, d, *J* = 6.3 Hz, CH_3-21), 0.93 (3H, s, CH_3-19), 3.96 (1H, m, H-5′), 3.98 (1H, m, H-3), 4.05 (1H, t, *J* = 8.7 Hz, H-2′), 4.27 (1H, t, *J* = 8.7 Hz, H-3′), 4.30 (1H, t, *J* = 8.4 Hz, H-4′), 4.41 (1H, dd, *J* = 5.1, 11.7 Hz, H-6′a), 4.56 (1H, dd, *J* = 2.1, 11.7 Hz, H-6′b), 5.05 (1H, d, *J* = 7.5 Hz, H-1′), 5.34 (1H, d, *J* = 4.8 Hz, H-6). ^{13}C-NMR (75.5 MHz, pyridine-d_5) δ: 37.6 (C-1), 30.4 (C-2), 78.7 (C-3), 39.6 (C-4), 140.2 (C-5), 122.0 (C-6), 32.4 (C-7), 32.3 (C-8), 50.6 (C-9), 37.1 (C-10), 21.5 (C-11), 40.1 (C-12), 42.7 (C-13), 57.0 (C-14), 24.7 (C-15), 28.7 (C-16), 56.5 (C-17), 12.1 (C-18), 19.4 (C-19), 36.5 (C-20), 19.2 (C-21), 34.4 (C-22), 26.7 (C-23), 46.3 (C-24), 29.7 (C-25), 19.5 (C-26), 20.1 (C-27), 23.6 (C-28), 12.3 (C-29), 102.7 (C-1′), 75.5 (C-2′), 78.6 (C-3′), 71.7 (C-4′), 78.4 (C-5′), 63.1 (C-6′).

Luteolin [5,7,3′,4′-tetrahydroxyflavone, digitoflavone, daphneflavonol, **6**] – 미황색 분말. UV λ_{max} (log ε) (MeOH) 253 (4.75), 267 (sh, 4.72), 348 (4.81); (MeONa) 265 (4.84), 400 (4.92); (NaOAc) 267 (4.79), 366 (4.66); (NaOAc + H_3BO_3) 261 (4.82), 374 (4.79); ($AlCl_3$) 272 (4.85), 300 (sh, 4.45), 331 (4.28), 425 (4.96); ($AlCl_3$ + HCl) 274 (4.72), 295 (sh, 4.55), 361 (4.71), 388 (4.74). ^{1}H-NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ: 6.18 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-6), 6.43 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-8), 6.66 (1H, s, H-3), 6.88 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-5′), 7.38 (1H, d, *J* = 2.4 Hz, H-2′), 7.40 (1H, dd, *J* = 2.4, 8.4 Hz, H-6′), 13.0 (1H, s, 5-OH). ^{13}C-NMR (75.5 MHz, DMSO-d_6) δ: 164.1 (C-2), 103.0 (C-3), 181.8 (C-4), 161.7 (C-5), 99.0 (C-6), 164.3 (C-7), 94.0 (C-8), 157.5 (C-9), 103.9 (C-10), 121.7 (C-1′), 113.5 (C-2′), 145.9 (C-3′), 149.9 (C-4′), 116.2 (C-5′), 119.2 (C-6′). FABMS *m/z* 287 $[M + H]^+$.

Esculetin [6,7-dihydroxycoumarin, 6,7-dihydroxy-2*H*-1-benzopyran-2-one, cichorigenin, **7**] – 백색 분말. IR ν_{max} (KBr) 3200, 1677, 1658, 1608, 1568, 1408, 1289, 1150, 1098, 943, 857 cm^{-1}; UV λ_{max} (logε) (MeOH) 256 (3.54), 264 (sh, 3.51), 299 (3.55), 350 (3.79) nm; ^{1}H-NMR (400 MHz, CD_3OD) δ: 6.17 (1H, d, *J* = 9.4 Hz, H-3), 6.74 (1H, s, H-8), 6.92 (1H, s, H-5), 7.77 (1H, d, *J* = 9.4 Hz, H-4). ^{13}C-NMR (100 MHz, CD_3OD) δ: 164.3 (C-2), 112.5 (C-3), 146.1 (C-4), 113.0 (C-5), 144.6 (C-6), 152.0 (C-7), 103.6 (C-8), 112.8 (C-4a), 150.5 (C-8a). EIMS *m/z* 178 $[M]^+$ (100), 177 $[M - H]^+$ (9.0), 150 $[M - CO]^+$ (72.1), 132 $[M - CO - H_2O]^+$ (4.1), 121 $[M - CO - CHO]^+$ (6.1), 104 (5.7), 94 (10.0), 76 (9.0), 69 (10.0).

Protocatechuic acid [3,4-dihydroxybenzoic acid, **8**] – 백색 분말. IR ν_{max} (KBr) 3289 (OH), 1674 (COOH), 1602, 1528, 1470 (arom. C=C), 1296, 1098, 943, 766 cm^{-1}. UV λ_{max} (log ε) (MeOH) 258 (4.08), 294 (3.83) nm. ^{1}H-NMR (300 MHz, CD_3OD) δ: 6.74 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-5), 7.38 (1H, dd, *J* = 2.1, 8.4 Hz, H-6), 7.42 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-2). ^{13}C-NMR (75.5 MHz, CD_3OD) δ: 127.5 (C-1), 117.8 (C-2), 145.6 (C-3), 150.0 (C-4), 115.4 (C-5), 123.4 (C-6), 173.4 (C-7). EIMS *m/z* 154 $[M]^+$ (48), 137 $[M - OH]^+$ (73), 114 (12), 109 $[M - COOH]^+$ (28), 101 (58), 55 (100).

Azelaic acid [nonanedioic acid, **9**] – 백색 분말. IR ν_{max} (KBr) 3434 (OH), 1698 (COOH), 1410, 1254 cm^{-1}. H-NMR (300 MHz, CD_3OD) δ: 1.34 (6H, br s, 3 × CH_2), 1.60 (4H, m, 2 × $C\underline{H}_2CH_2COOH$), 2.27 (4H, t, *J* = 7.5 Hz, 2 × $C\underline{H}_2COOH$). ^{13}C-NMR (75.5 MHz, CD_3OD) δ: 26.0, 30.1, 34.9, 177.7. EIMS *m/z* 171 $[M - OH]^+$ (2), 152 (31), 124 (23), 111 (23), 98 (25), 84 (66), 69 (39), 60 (36), 55 (100).

Caffeic acid [3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-propenoic acid, 3,4-dihydroxycinnamic acid, **10**] – 미백색 분말. IR ν_{max} (KBr) 3434 (OH), 1647 (α,β-unsat. CO), 1603, 1451 (arom. C=C), 1281, 1217, 1121, 974 (*trans* CH=CH) cm^{-1}. UV λ_{max} (log ε) (MeOH) 292 (3.90), 321 (3.89) nm. ^{1}H-NMR (300 MHz, CD_3OD) δ: 6.20 (1H, d, *J* = 15.9 Hz, H-8), 6.77 (1H, d, *J* = 8.1 Hz, H-5), 6.92 (1H, dd, *J* = 2.1, 8.4 Hz, H-6), 7.02 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-2), 7.52 (1H, d, *J* = 15.9 Hz, H-7). ^{13}C-NMR (75.5 MHz, CD_3OD) δ: 127.8 (C-1), 115.6 (C-2), 146.8 (C-3), 149.5 (C-4), 116.5 (C-5), 122.8 (C-6), 147.0 (C-7), 115.1 (C-8), 171.1 (C-9). EIMS *m/z* 180 $[M]^+$ (100), 163 $[M - OH]^+$ (24), 136 $[M - CO_2]^+$ (83), 135 $[M - CO_2H]^+$ (28), 134 $[M - (CO_2H + H)]^+$ (56), 117 (18), 107 $[M - (CO_2H + CO)]^+$ (17), 89 $[C_7H_5]^+$ (64).

Flavoyadorinin-B [luteolin 7,3′-dimethyl ether 4′-glucoside, 5,4′-dihydroxy-7,3′-dimethoxy flavone 4′-glucoside, **11**] – 미황색 분말. $[\alpha]_D^{28}$ = -40.0° (*c* = 0.09, pyridine). IR ν_{max} (KBr) 3486, 3407 (OH), 1657 (α,β-unsat. CO), 1591, 1503 (arom. C=C), 1262, 1158, 1083, 1038 (glycosidic C-O), 848, 806 cm^{-1}. UV λ_{max} (log ε) (MeOH) 269 (4.30), 335 (4.30) nm; (MeONa) 285 (4.40), 370 (4.00) nm; (NaOAc) 269 (4.40), 335 (4.40) nm; (NaOAc + H_3BO_3) 269 (4.40), 335 (4.40) nm; ($AlCl_3$) 259 (sh, 4.40), 278 (4.30), 297 (sh, 4.20), 353 (4.30), 390 (4.20) nm; ($AlCl_3$ + HCl) 256 (4.20), 280 (4.30), 298 (4.20), 346 (4.30), 387 (4.10) nm. ^{1}H-NMR (300 MHz, pyridine-d_5) δ: 3.75 (3H, s, OCH_3), 3.81 (3H, s, OCH_3), 4.61 (1H, dd, *J* = 1.5, 11.4 Hz, H-6″), 5.84 (1H, d, *J* = 7.5 Hz, H-1″), 6.62 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-6), 6.85 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-8), 6.98 (1H, s, H-3), 7.60 (1H, dd, *J* = 2.1, 7.2 Hz, H-6′), 7.61 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-2′), 7.70 (1H, d, *J* = 8.7 Hz, H-5′). ^{1}H-NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ: 3.87 (3H, s, OCH_3), 3.90 (3H, s, OCH_3), 5.07 (1H, d, *J* = 6.9 Hz, H-1″), 6.38 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-6), 6.85 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-8), 7.07 (1H, s, H-3), 7.24 (1H, d, *J* = 8.7 Hz, H-5′), 7.63 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-2′), 7.69 (1H, dd, *J* = 2.1, 8.7 Hz, H-6′), 12.90 (1H, s, 5-OH). ^{13}C-NMR (75.5 MHz, pyridine-d_5) δ: 165.9 (C-2), 105.1 (C-3), 182.8 (C-4), 162.6 (C-5), 98.7 (C-6), 164.2 (C-7), 92.9 (C-8), 158.1 (C-9), 105.9 (C-10), 125.0 (C-1′), 110.5 (C-2′), 151.1 (C-4′), 115.8 (C-5′), 120.6 (C-6′), 101.6 (C-1″), 74.7 (C-2″), 78.5 (C-3″), 71.2 (C-4″), 79.2 (C-5″), 62.4 (C-6″), 55.9, 56.0 (OCH_3). (75.5 MHz, DMSO-d_6) δ: 163.3 (C-2), 104.2 (C-3), 182.0 (C-4), 161.0 (C-5), 98.0 (C-6), 165.1 (C-7), 92.8 (C-8), 157.2 (C-9), 104.7 (C-10), 123.8 (C-1′), 110.0 (C-2′), 149.1 (C-3′), 149.7 (C-4′), 114.9 (C-5′), 119.8 (C-6′), 99.8 (C-1″), 73.0 (C-2″), 76.7 (C-3″), 69.5 (C-4″), 77.1 (C-5″), 60.5 (C-6″), 55.9, 56.0 (OCH_3).

FABMS *m/z* 499 $[M + Na]^+$, 477 $[M + H]^+$. EIMS *m/z* 314 [genin]$^+$ (100), 285 $[M - HCO]^+$ (38), 271 $[M - (CO + CH_3)]^+$ (15), 256 $[M - (CO + 2CH_3)]^+$ (3), 243 $[M - (2CO + CH_3)]^+$ (7.5), 228 $[M - (2CO + 2CH_3)]^+$ (5), 167 $[A_1 + H]^+$ (18), 151 $[B_2]^+$ (4), 148 $[B_1]^+$ (7), 133 $[B_1 - CH_3]^+$ (8).

4,5-Dicaffeoylquinic acid [isochlorogenic acid c, quinic acid 4,5-dicaffeic ester, 4,5-bis(3,4-dihydroxycinnamoyl)quinic acid, **12**] – 백색 분말. $[\alpha]_D^{24}$ = -236.0° (*c* = 0.13, MeOH). IR ν_{max} (KBr) 3370 (OH), 1698 (α,β-unsat. CO), 1599, 1526, 1449 (arom. C=C), 1159, 976 (*trans* CH=CH), 849, 812 cm^{-1}. UV λ_{max} (log ε) (MeOH) 247 (sh, 4.03), 293 (4.04), 328 (4.10). ^{1}H-NMR (300 MHz, pyridine-d_5 + D_2O) δ: 2.33 (1H, br d, *J* = 14.1 Hz, H-2ax), 2.55 (1H, br d, *J* = 2.7, 12.9 Hz, H-6eq), 2.66 (1H, dd, *J* = 11.4, 12.9 Hz, H-6ax), 2.70 (1H, dd, *J* = 3.0, 14.7 Hz, H-2eq), 4.62 (1H, br dt, *J* = 3.0, 3.0 Hz, H-3), 5.55 (1H, dd, *J* = 3.0, 10.2 Hz, H-4), 6.22 (1H, ddd, *J* = 4.8, 10.5, 10.5 Hz, H-5), 6.29, 6.42 (1H each, *J* = 15.9 Hz, H-8′, 8″), 6.83 (1H, dd, *J* = 1.8, 8.1 Hz, H-6′), 6.89 (1H, dd, *J* = 2.1, 8.1 Hz, H-6″), 7.09 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-5′), 7.13 (1H, d, *J* = 8.1 Hz, H-5″), 7.37 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-2′), 7.41 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, H-2″), 7.75, 7.82 (1H each, d, *J* = 15.9 Hz, H-7′, 7″). ^{1}H-NMR (400 MHz, CD_3OD) δ: 1.98-2.30 (4H, m, H-2, 6), 4.33 (1H, brs, H-3), 5.10 (1H, dd, *J* = 2.6, 9.5 Hz, H-4), 5.65 (1H, m, H-5), 6.19, 6.27 (1H each, d, *J* = 15.9 Hz, H-8′, 8″), 6.72, 6.73 (1H each, d, *J* = 8.2 Hz, H-5′, 5″), 6.88, 6.90 (1H each, dd, *J* = 1.8, 8.2 Hz, H-6′, 6″), 6.99, 7.01 (1H each, d, *J* = 1.8 Hz, H-2′, 2″), 7.50, 7.58 (1H each, d, *J* = 15.9 Hz, H-7′, 7″). ^{13}C-NMR (100 MHz, CD_3OD) δ: 76.1 (C-1), 38.3 (C-2), 69.8 (C-3), 74.8 (C-4), 69.0 (C-5), 39.8 (C-6), 127.3, 127.4 (C-1′, 1″), 114.7 (C-2′, 2″), 146.5 (C-3′, 3″), 149.4 (C-4′, 4″), 116.1 (C-5′, 5″), 122.9 (C-6′, 6″), 147.2, 147.3 (C-7′, 7″), 114.4 (C-8′, 8″), 168.1, 168.3 (C-9′, 9″), 178.3 ($COOCH_3$). FABMS *m/z* 539 $[M + Na]^+$, 517 $[M + H]^+$.

Cerebroside [1-*O*-β-D-glucopyranosyl-(2*S*,3*S*,4*R*,8*E*)-2-[(2*R*)-2-hydroxy(tricosanoyl, tetra cosanoyl, pentacosanoyl, docosanoyl)amino]-8-octadecene-1,3,4-triol, **13**] – 백색 분말. ^{1}H-NMR (500 MHz, pyridine-d_5) δ: 0.83 (6H, m 2 × CH_3), 1.20 - 1.27 [br. s $(CH_2)_n$], 3.85 (1H, m, H-5″), 4.01 (1H, t, *J* = 8.0 Hz, H-2″), 4.19 (1H, t, *J* = 8.7 Hz, H-4), 4.21 (1H, t, *J* = 8.8 Hz, H-4″), 4.22 (1H, t, *J* = 8.8 Hz, H-3″), 4.29 (1H, dd, *J* = 5.1, 10.4 Hz, H-3), 4.34 (1H, dd, *J* = 5.1, 11.0 Hz, H-6″a), 4.48 (1H, br d, *J* = 11.0 Hz, H-6″b), 4.51 (1H, dd, *J* = 4.1, 11.5 Hz, H-1a), 4.57 (1H, m, H-2′), 4.72 (1H, dd, *J* = 6.9, 11.5 Hz, H-1b), 4.94 (1H, d, *J* = 7.7 Hz, H-1″), 5.31 (1H, m, H-2), 5.40 - 5.53 (2H, m, H-8, 9), 8.60 (1H, d, *J* = 9.2 Hz, NHCO). ^{13}C-NMR (125 MHz, pyridine-d_5) δ: 70.4 (C-1), 51.6 (C-2), 75.8 (C-3), 72.3 (C-4), 130.3, 130.1, 130.7, 130.7 (CH=CH), 175.6 (C-1′), 72.3 (C-2′), 35.5 (C-3′), 105.5 (C-1″), 75.1 (C-2″), 78.5 (C-3″), 71.2 (C-4″), 78.3 (C-5″), 62.4 (C-6″), 14.2 (CH_3), 22.9, 25.8, 26.6, 26.7, 26.9, 27.5, 27.8, 29.5, 29.6, 29.9, 30.0, 30.3, 32.1, 32.9, 33.3, 33.8, 33.9. FABMS *m/z* 838 $[M + Na]^+$ (2-hydroxybehenic acid), 852 $[M + Na]^+$ (2-hydroxytricosanoic acid), 866 $[M + Na]^+$ (2-hydroxylignoceric acid), 880 $[M + Na]^+$ (2-hydroxypentacosanoic acid).

4,5-Dicaffeoylquinic acid methyl ester [4,5-bis(3,4-dihydroxycinnamoyl)quinic acid methyl ester, **14**] – 미백색 분말. $[\alpha]_D^{24}$ = -195.6° (*c* = 0.10, MeOH). IR ν_{max} (KBr) 3399 (OH), 1696 (α,β-unsat. CO), 1603, 1518, 1447 (arom. C=C), 1271, 980 (*trans* CH=CH), 855, 814 cm^{-1}. UV λ_{max} (log ε) (MeOH) 245 (sh, 4.16), 295 (4.20), 330 (4.33). ^{1}H-NMR (300 MHz, CD_3OD) δ: 2.08 (1H, dd, *J* = 6.3, 14.1 Hz, H-6a), 2.24 (2H, m, H-2b, 6b), 2.32 (1H, dd, *J* = 3.3, 13.8

Hz, H-2a), 3.71 (3H, s, $COOCH_3$), 4.34 (1H, quintet, *J* = 3.3 Hz, H-3), 5.10 (1H, dd, *J* = 3.0, 7.8 Hz, H-4), 5.53 (1H, ddd, *J* = 5.4, 7.5, 7.7 Hz, H-5), 6.16, 6.29 (1H each, d, *J* = 15.6 Hz, H-8′, 8″), 6.75 (2H, d, *J* = 8.1 Hz, H-5′, 5″), 6.91 (1H, dd, *J* = 1.8, 8.4 Hz, H-6′), 6.92 (1H, dd, *J* = 2.1, 8.1 Hz, H-6″), 7.00 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, H-2′), 7.02 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-2″), 7.50, 7.59 (1H each, d, *J* = 15.6 Hz, H-7′, 7″). ^{13}C-NMR (75.5 MHz, CD_3OD) δ: 75.8 (C-1), 38.4 (C-2), 68.6 (C-3), 74.9 (C-4), 69.1 (C-5), 38.5 (C-6), 127.5, 127.7 (C-1′, 1″), 115.2, 115.4 (C-2′, 2″), 147.7 (C-3′, 3″), 149.7, 149.8 (C-4′, 4″), 116.5 (C-5′, 5″), 123.1 (C-6′, 6″), 146.7, 146.8 (C-7′, 7″), 114.6, 114.7 (C-8′, 8″), 167.9 168.5 (C-9′, 9″), 175.2 ($\underline{C}OOCH_3$), 53.1 ($COO\underline{C}H_3$). FABMS *m/z* 553 $[M + Na]^+$, 531 $[M + H]^+$.

Vanillic acid 4-*O*-β-D-(6-*O*-benzoylglucopyranoside) (15) – 백색 분말. $[\alpha]_D^{28}$ = -58.0° (*c* = 0.13, MeOH). IR υ_{max} (KBr) 3333 (OH), 1706 (C=O), 1624, (arom. C=C), 1281 (ester), 1070 (glycosidic C-O), 762 cm^{-1}. UV λ_{max} (log ε) (MeOH) 237 (sh, 4.30), 252 (sh, 4.10), 282 (3.80) nm. ^{1}H-NMR (300 MHz, CD_3OD) δ: 3.44 (1H, d, *J* = 8.7 Hz, H-4′), 3.53 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-3′), 3.58 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-2′), 3.83 (1H, ddd, *J* = 2.1, 7.8, 9.9 Hz, H-5′), 3.87 (3H, s, OCH_3), 4.39 (1H, dd, *J* = 7.5, 11.7 Hz, H-6′a), 4.71 (1H, dd, *J* = 2.1, 11.7 Hz, H-6′b), 5.06 (1H, d, *J* = 7.8 Hz, H-1′), 7.13 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-5), 7.42 (1H, dd, *J* = 1.8, 8.4 Hz, H-6), 7.47 (2H, tt, *J* = 1.5, 7.5 Hz, H-3″, 5″), 7.57 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, H-2), 7.61 (1H, tt, *J* = 1.8, 7.2 Hz, H-4″), 7.99 (2H, tt, *J* = 1.5, 7.2 Hz, H-2″, 6″). ^{13}C-NMR (75.5 MHz, CD_3OD) δ: 126.2 (C-1), 114.3 (C-2), 150.4 (C-3), 151.6 (C-4), 116.5 (C-5), 124.6 (C-6), 169.5 (C-7), 56.6 (OCH_3), 101.6 (C-1′), 74.7 (C-2′), 77.8 (C-3′), 72.0 (C-4′), 75.6 (C-5′), 65.3 (C-6′), 131.2 (C-1″), 130.6 (C-2″, 6″), 129.6 (C-3″, 5″), 134.4 (C-4″), 167.7 (C-7″). FABMS *m/z* 457 $[M + Na]^+$, 435 $[M + H]^+$, 289 $[(M + Na) - (\text{vanillic acid, } C_8H_8O_4)]^+$, 267 $[(M + H) - (\text{vanillic acid, } C_8H_8O_4)]^+$; HR-FABMS *m/z* 435.1273, Calcd for $C_{21}H_{23}O_{10}$ 435.1291 $[M + H]^+$.

7-Ketologanin [7-dehydrologanin, 1-(β-D-glucopyranosyloxy)-1,4a,5,6,7,7a-hexahydro-7-methyl-6-oxo-cyclopenta[*c*]pyran-4-carboxylic acid methyl ester, **16**] – 백색 분말. $[\alpha]_D^{26}$ = -145.4° (*c* = 0.13, MeOH). IR υ_{max} (KBr) 3432 (OH), 1748 (5-membered ring C=O), 1684, 1643 (α,β-unsat. C=O), 1451, 1299 (ester), 1076 (glycosidic C-O), 889, 843 cm^{-1}. UV λ_{max} (log ε) (MeOH) 236 (sh, 4.20) nm. ^{1}H-NMR (400 MHz, pyridine-d_5) δ: 0.93 (3H, d, *J* = 7.0 Hz, 10-CH_3), 2.16 (1H, dq, *J* = 7.1, 10.5 Hz, H-8), 2.38 (1H, ddd, *J* = 2.7, 7.3, 10.5 Hz, H-9), 2.64 (1H, dd, *J* = 8.3, 18.9 Hz, H-6b), 2.77 (1H, br d, *J* = 18.9 Hz, H-6a), 3.37 (1H, br t, *J* = 7.2 Hz, H-5), 3.49 (3H, s, $COOCH_3$), 4.00 (1H, t, *J* = 7.8 Hz, H-5′), 4.07 (1H, t, *J* = 8.0 Hz, H-2′), 4.26-4.29 (2H, m, H-3′, 4′), 4.36 (1H, dd, *J* = 5.3, 11.8 Hz, H-6′a), 4.54 (1H, br d, *J* = 11.8 Hz, H-6′b), 5.37 (1H, d, *J* = 7.4 Hz, H-1′), 5.92 (1H, d, *J* = 2.6 Hz, H-1), 7.69 (1H, s, H-3). ^{13}C-NMR (100.5 MHz, pyridine-d_5) δ: 94.7 (C-1), 152.4 (C-3), 109.8 (C-4), 27.3 (C-5), 42.6 (C-6), 217.5 (C-7), 43.5 (C-8), 45.6 (C-9), 13.2 (C-10), 167.0 (C-11), 50.9 ($COOCH_3$), 101.0 (C-1′), 74.6 (C-2′), 78.4 (C-3′), 71.1 (C-4′), 78.9 (C-5′), 62.4 (C-6′). FABMS *m/z* 411 $[M + Na]^+$, 389 $[M + H]^+$, 227 $[(M + H) - 162]^+$.

Secologanin dimethyl acetal [4-(2,2-dimethoxyethyl)-3-ethenyl-2-(β-D-glucopyranosyloxy)-3,4-dihydro-2*H*-pyran-5-carboxylic acid methyl ester, secologanin acetal, **17**] – 미백색 분말. $[\alpha]_D^{28}$ = -102.7° (*c* = 0.45, MeOH). IR υ_{max} (KBr) 3408 (OH), 1705 (ester), 1631 (α,β-unsat. C=O), 1439 (CH_2), 1389 (CH_3), 1287 (ester), 1076 (glycosidic C-O), 872, 768 cm^{-1}.

UV λ_{max} (log ε) (MeOH) 232 (4.10) nm. ^{1}H-NMR (500 MHz, CD_3OD) δ: 1.61 (1H, ddd, *J* = 4.6, 8.1, 14.0 Hz, H-6a), 2.07 (1H, dt, *J* = 6.6, 14.0 Hz, H-6b), 2.66 (1H, dt, *J* = 5.4, 8.8 Hz, H-9), 2.90 (1H, br dd, *J* = 6.0, 12.7 Hz, H-5), 3.28, 3.29 (3H each, s, 2 × OCH_3), 3.69 (3H, s, $COOCH_3$), 4.48 (1H, dd, *J* = 4.5, 7.1 Hz, H-7), 5.26 (1H, d, *J* = 10.5 Hz, H-10a), 5.30 (1H, d, *J* = 17.3 Hz, H-10b), 5.50 (1H, d, *J* = 7.3 Hz, H-1), 5.72 (1H, ddd, *J* = 9.1, 10.2, 17.3 Hz, H-8), 7.42 (1H, s, H-3), 4.66 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-1′), 3.65 (1H, dd, *J* = 5.8, 11.9 Hz, H-6′a), 3.89 (1H, dd, *J* = 1.8, 11.9 Hz, H-6′b). ^{13}C-NMR (75.5 MHz, CD_3OD) δ: 97.8 (C-1), 153.2 (C-3), 111.7 (C-4), 29.4 (C-5), 33.2 (C-6), 104.5 (C-7), 135.8 (C-8), 45.3 (C-9), 119.8 (C-10), 100.1 (C-1′), 74.6 (C-2′), 78.0 (C-3′), 71.5 (C-4′), 78.4 (C-5′), 62.7 (C-6′), 169.2 ($\underline{C}OOCH_3$), 51.7 ($COO\underline{C}H_3$), 52.6, 53.9 (OCH_3). FABMS *m/z* 457 $[M + Na]^+$, 403 $[(M + H) - CH_3OH]^+$, 241 $[(M + H) - (CH_3OH + 162)]^+$.

Uracil [2,4-dioxopyrimidine, 2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidinedione, **18**] – 백색 분말. IR ν_{max} (KBr) 1715 (CO), 1650 (CONH), 1451, 1418, 1233 (C-N), 821 cm^{-1}. UV λ_{max} (log ε) (MeOH) 258 (3.50) nm. ^{1}H-NMR (300 MHz, pyridine-d_5) δ: 5.80 (1H, d, *J* = 7.5 Hz, H-5), 7.50 (1H, d, *J* = 7.5 Hz, H-6). ^{13}C-NMR (75.5 MHz, pyridine-d_5) δ: 153.2 (C-2), 165.7 (C-4), 101.2 (C-5), 142.1 (C-6). EIMS *m/z* 112 $[M]^+$ (100), 69 (47).

Luteolin 7-*O*-glucoside [cynaroside, luteoloside, 5,7,3′,4′-tetrahydroxyflavone 7-glucoside, **19**] – 미황색 분말. $[\alpha]_D^{26}$ = -86.0° (*c* = 0.03, MeOH). UV λ_{max} (log ε) (MeOH) 254 (4.64), 349 (4.63); (MeONa) 261 (4.64), 403 (4.70); (NaOAc) 258 (4.68), 372 (4.59); (NaOAc + H_3BO_3) 259 (4.72), 373 (4.66); ($AlCl_3$) 272 (4.71), 297 (sh, 4.38), 331 (4.218), 429 (4.77); ($AlCl_3$ + HCl) 267 (4.60), 296 (sh, 4.38), 362 (4.53), 388 (4.55). ^{1}H-NMR (300 MHz, pyridine-d_5) δ: 4.55 (1H, dd, *J* = 2.4, 12.0 Hz, H-6′a), 5.80 (1H, d, *J* = 7.5 Hz, H-1′), 6.83 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-6), 6.91 (1H, s, H-3), 6.98 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-8), 7.26 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-5′), 7.50 (1H, dd, *J* = 2.4, 8.4 Hz, H-6′), 7.87 (1H, d, *J* = 2.4 Hz, H-2′), 13.6 (1H, s, 5-OH). ^{1}H-NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ: 5.06 (1H, d, *J* = 6.9 Hz, H-1′), 6.43 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-6), 6.74 (1H, s, H-3), 6.78 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-8), 6.89 (1H, d, *J* = 8.1 Hz, H-5′), 7.41 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-2′), 7.44 (1H, dd, *J* = 2.1, 8.1 Hz, H-6′), 13.0 (1H, s, 5-OH). ^{13}C-NMR (75.5 MHz, DMSO-d_6) δ: 164.7 (C-2), 103.4 (C-3), 182.1 (C-4), 161.3 (C-5), 99.8 (C-6), 163.2 (C-7), 95.0 (C-8), 157.2 (C-9), 105.6 (C-10), 121.6 (C-1′), 113.8 (C-2′), 146.0 (C-3′), 150.2 (C-4′), 116.2 (C-5′), 119.4 (C-6′). 100.1 (C-1″), 73.3 (C-2″), 77.4 (C-3″), 69.8 (C-4″), 76.6 (C-5″), 60.8 (C-6″). FABMS *m/z* 449 $[M + H]^+$, 287 $[(M + H) - 162]^+$.

Rutin (quercetin 3-rutinoside, 3,5,7,3′,4′-pentahydroxyflavone 3-rhamnosyl-(1→6)-glucoside, **20**) – 미황색 분말. $[\alpha]_D^{27}$ = +14.3° (*c* = 1.0, MeOH). IR V_{max} 3421 (OH), 1653 (α,β-unsat. C=O), 1601, 1506, 1457 (arom. C=C), 1125, 1062 (glycosidic C-O) cm^{-1}. UV λ_{max} (MeOH) 207, 257, 300 (sh), 357 ㎚. ^{1}H-NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ: 1.00 (3H, d, *J* = 6.0 Hz, 6‴-CH_3), 3.04 – 3.72 (10H, m, sugar H), 4.39 (1H, s, H-1‴), 5.34 (1H, d, *J* = 7.5 Hz, H-1″), 6.20 (1H, d *J* = 1.2 Hz, H-6), 6.39 (1H, d, *J* = 1.2 Hz, H-8), 6.84 (1H, d, *J* = 8.5 Hz, H-5′), 7.53 (1H, d, *J* = 2.5 Hz, H-2′), 7.55 (1H, dd, *J* = 2.5, 8.5 Hz, H-6′), 12.59 (1H, s, 5-OH). ^{13}C-NMR (125 MHz, DMSO-d_6) δ: 156.6 (C-2), 133.3 (C-3), 177.3 (C-4), 161.2 (C-5), 98.7 (C-6), 164.2 (C-7), 93.6 (C-8), 156.4 (C-9), 104.1 (C-10), 121.6 (C-1′), 115.3 (C-2′), 144.7 (C-3′), 148.4 (C-4′), 116.3 (C-5′), 121.2 (C-6′), 101.2 (C-1″), 74.1 (C-2″), 76.5 (C-3″), 70.6 (C-4″), 75.9 (C-5″), 67.0 (C-6″), 100.7 (C-1‴), 70.4 (C-2‴), 70.0 (C-3‴), 71.9 (C-4‴), 68.2

(C-5″), 17.7 (C-6″).

3,5-Dicaffeoylquinic acid methyl ester [macroantoin G, 3,5-bis(3,4-dihydroxycinnamoyl) quinic acid methyl ester, **21**] – 미황색 분말. $[\alpha]_D^{28}$ = -157.1° (*c* = 0.14, MeOH). IR ν_{max} (KBr) 3416 (OH), 1686 (α,β-unsat. CO), 1605, 1518 (arom. C=C), 1265, 976 (*trans* CH=CH), 812 cm^{-1}. UV λ_{max} (MeOH) 218 (log ε, sh, 4.70), 247 (sh, 4.40), 296 (sh, 4.50), 331 (4.60) nm. ^{1}H-NMR (300 MHz, CD_3OD) δ: 2.14 (1H, dd, *J* = 8.1, 13.2 Hz, H-2ax), 2.18 (1H, dd, *J* = 3.9, 13.8 Hz, H-6eq), 2.31 (1H, dd, *J* = 6.6, 13.8 Hz, H-6ax), 2.33 (1H, dd, *J* = 3.2, 13.2 Hz, H-2eq), 3.68 (3H, s, $COOCH_3$), 3.97 (1H, dd, *J* = 3.3, 6.6 Hz, H-4), 5.30 (1H, m, H-3), 5.39 (1H, dd, *J* = 3.9, 7.5 Hz, H-5), 6.21, 6.33 (1H each, *J* = 15.9 Hz, H-8′, 8″), 6.78 (2H, dd, *J* = 2.7, 8.1 Hz, H-6′, 6″), 6.96 (2H, d, *J* = 8.4 Hz, H-5′, 5″), 7.05, 7.06 (1H each, d, *J* = 1.8 Hz, H-2′, 2″), 7.54, 7.61 (1H each, d, *J* = 15.9 Hz, H-7′, 7″). ^{13}C-NMR (75.5 MHz, CD_3OD) δ: 74.6 (C-1), 35.6 (C-2), 72.0 (C-3), 69.8 (C-4), 72.1 (C-5), 36.7 (C-6), 127.6, 127.8 (C-1′, 1″), 115.1 (C-2′, 2″), 146.7, 146.8 (C-3′, 3″), 149.5, 149.7 (C-4′, 4″), 116.4, 116.5 (C-5′, 5″), 123.0, 123.1 (C-6′, 6″), 147.1, 147.4 (C-7′, 7″), 114.8, 115.4 (C-8′, 8″), 168.0, 168.7 (C-9′, 9″), 175.6 ($COOCH_3$), 53.0 ($COOCH_3$). FABMS *m/z* 553 $[M + Na]^+$, 531 $[M + H]^+$, 513 $[(M + H) - H_2O]^+$.

Methyl chlorogenate [5-(3,4-dihydroxycinnamoyl)quinic acid methyl ester, **22**] – 백색 분말. $[\alpha]_D^{28}$ = -31.7° (*c* = 0.12, MeOH). IR ν_{max} (KBr) 3409 (OH), 1733 (ester), 1692 (α,β-unsat. CO), 1631, 1604, 1518 (arom. C=C), 1275, 1179, 1119, 1082, 981 (*trans* CH=CH), 814 cm^{-1}. UV λ_{max} (log ε) (MeOH) 218 (sh, 4.20), 244 (4.00), 297 (sh, 4.00), 330 (4.10) nm. ^{1}H-NMR (300 MHz, CD_3OD) δ: 1.96 - 2.24 (4H, m, H-2, 6), 3.68 (3H, s, $COOCH_3$), 3.72 (1H, dd, *J* = 3.0, 7.5 Hz, H-4), 4.12 (1H, quintet, *J* = 3.3 Hz, H-3), 5.26 (1H, ddd, *J* = 4.8, 7.5, 7.2 Hz, H-5), 6.20 (1H, d, *J* = 15.9 Hz, H-8′), 6.77 (1H, d, *J* = 8.1 Hz, H-5′), 6.94 (1H, dd, *J* = 2.1, 8.1 Hz, H-6′), 7.03 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-2′), 7.51 (1H, d, *J* = 15.9 Hz, H-7′). ^{13}C-NMR (75.5 MHz, CD_3OD) δ: 75.8 (C-1), 38.0 (C-2), 70.3 (C-3), 72.5 (C-4), 72.1 (C-5), 37.7 (C-6), 127.6 (C-1′), 115.1 (C-2′), 146.9 (C-3′), 149.7 (C-4′), 116.5 (C-5′), 123.0 (C-6′), 147.2 (C-7′), 115.0 (C-8′), 168.2 (C-9′), 175.4 ($\underline{C}OOCH_3$), 53.0 ($COO\underline{C}H_3$). FABMS *m/z* 391 $[M + Na]^+$, 369 $[M + H]^+$.

Isoquercitrin [quercetin 3-glucoside, 3,5,7,3′,4′-pentahydroxyflavone 3-glucoside, **23**] – 미황색 분말. $[\alpha]_D^{26}$ = -22.4° (*c* = 0.23, MeOH). IR ν_{max} (KBr) 3376 (OH), 1654 (α,β-unsat. CO), 1604, 1500, 1442 (arom. C=C), 1360, 1302, 1197, 1062, 1012 (glycosidic C-O), 800 cm^{-1}. UV λ_{max} (log ε) (MeOH) 256 (4.41), 268 (sh, 4.30), 353 (4.20) nm; (MeONa) 271 (4.40), 330 (4.06), 404 (4.40) nm; (NaOAc) 272 (4.40), 381 (4.20) nm; (NaOAc + H_3BO_3) 261 (4.40), 376 (4.30) nm; ($AlCl_3$) 274 (4.40), 435 (4.30) nm; ($AlCl_3$ + HCl) 269 (4.40), 300 (4.10), 356 (sh, 4.20), 401 (4.20) nm. ^{1}H-NMR (300 MHz, CD_3OD) δ: 5.25 (1H, d, *J* = 7.8 Hz, H-1″), 6.20 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-6), 6.39 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-8), 6.86 (1H, d, *J* = 8.7 Hz, H-5′), 7.58 (1H, dd, *J* = 2.1, 8.7 Hz, H-6′), 7.70 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-2′). ^{13}C-NMR (75.5 MHz, CD_3OD) δ: 158.4 (C-2), 135.6 (C-3), 179.5 (C-4), 163.0 (C-5), 99.9 (C-6), 166.0 (C-7), 94.7 (C-8), 159.0 (C-9), 105.7 (C-10), 123.0 (C-1′), 116.0 (C-2′), 145.9 (C-3′), 149.8 (C-4′), 117.6 (C-5′), 123.2 (C-6′), 104.3 (C-1″), 75.5 (C-2″), 78.1 (C-3″), 71.2 (C-4″), 78.4 (C-5″), 62.5 (C-6″). FABMS *m/z* 487 $[M + Na]^+$, 465 $[M + H]^+$, 303 $[(M + H) - 162]^+$.

3,5-Dicaffeoylquinic acid [isochlorogenic acid a, 3,5-bis(3,4-dihydroxycinnamoyl)quinic acid, **24**]

– 미황색 분말. $[\alpha]_D^{26}$ = -145.9° (*c* = 0.46, MeOH). IR ν_{max} (KBr) 3389 (OH), 1692 (α,β-unsat. CO), 1603, 1520 (arom. C=C), 1277, 976 (*trans* CH=CH), 812 cm^{-1}. UV λ_{max} (log ε) (MeOH) 245 (sh, 4.44), 295 (4.52), 328 (4.64). ^{1}H-NMR (300 MHz, CD_3OD) δ: 2.11-2.34 (4H, m, H-2, 6), 3.95 (1H, dd, *J* = 3.0, 7.8 Hz, H-4), 5.37-5.44 (2H, m, H-3, 5), 6.26, 6.36 (1H each, *J* = 15.9 Hz, H-8′, 8″), 6.77 (2H, d, *J* = 7.8 Hz, H-5′, 5″), 6.96 (2H, dd, *J* = 2.1, 8.1 Hz, H-6′, 6″), 7.05, 7.06 (1H each, d, *J* = 2.1 Hz, H-2′, 2″), 7.57, 7.61 (1H each, d, *J* = 15.9 Hz, H-7′, 7″). ^{13}C-NMR (75.5 MHz, CD_3OD) δ: 75.2 (C-1), 36.3 (C-2), 72.9 (C-3), 71.1 (C-4), 72.0 (C-5), 38.2 (C-6), 127.7, 127.8 (C-1′, 1″), 115.3, 115.5 (C-2′, 2″), 146.6 (C-3′, 3″), 149.3, 149.4 (C-4′, 4″), 116.5 (C-5′, 5″), 123.0, 123.1 (C-6′, 6″), 147.0, 147.2 (C-7′, 7″), 115.1, 115.2 (C-8′, 8″), 168.5, 168.9 (C-9′, 9″), 178.1 (COOH). FABMS *m/z* 539 $[M + Na]^+$, 517 $[M + H]^+$.

Rhoifolin [apigenin 7-neohesperidoside, 5,7,4′-trihydroxyflavone 7-neohesperidoside, 5,7,4′-trihydroxyflavone 7-rhamnosyl-(1→2)-glucoside, **25**] – 미황색 분말. $[\alpha]_D^{26}$ = -151.0° (*c* = 0.13, MeOH). IR ν_{max} (KBr) 3388 (OH), 1657 (α,β-unsat. CO), 1605, 1497, 1488 (arom. C=C), 1249, 1178, 1074 (glycosidic C-O), 836 cm^{-1}. UV λ_{max} (log ε) (MeOH) 268 (4.20), 338 (4.30) nm; (MeONa) 267 (4.20), 387 (4.40) nm; (NaOAc) 257 (4.20), 266 (4.20), 391 (4.40) nm; (NaOAc + H_3BO_3) 268 (4.20), 339 (4.30) nm; ($AlCl_3$) 275 (4.20), 299 (4.10), 350 (4.20), 385 (4.20) nm; ($AlCl_3$ + HCl) 276 (4.20), 298 (4.10), 345 (4.20), 382 (4.10) nm. ^{1}H-NMR (300 MHz, CD_3OD) δ: 1.32 (3H, d, *J* = 6.0 Hz, 6‴-CH_3), 5.18 (1H, d, *J* = 7.5 Hz, H-1″), 5.28 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, H-1‴), 6.44 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-6), 6.64 (1H, s, H-3), 6.76 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-8), 6.91 (1H, d, *J* = 9.0 Hz, H-3′, 5′), 7.86 (1H, dd, *J* = 9.0 Hz, H-2′, 6′). ^{13}C-NMR (75.5 MHz, CD_3OD) δ: 164.4 (C-2), 104.1 (C-3), 184.0 (C-4), 159.0 (C-5), 99.8 (C-6), 166.7 (C-7), 95.9 (C-8), 162.9 (C-9), 107.1 (C-10), 123.0 (C-1′), 129.6 (C-2′), 117.1 (C-3′), 162.9 (C-4′), 117.1 (C-5′), 129.6 (C-6′), 99.8 (C-1″), 79.1 (C-2″), 78.3 (C-3″), 72.2 (C-4″), 79.1 (C-5″), 62.4 (C-6″), 101.0 (C-1‴), 71.4 (C-2‴), 72.2 (C-3‴), 74.0 (C-4‴), 70.0 (C-5‴), 18.3 (C-6‴). FABMS *m/z* 601 $[M + Na]^+$, 579 $[M + H]^+$, 271 [(M + H) – 146 – 162]$^+$.

(*E*)-Aldosecologanin [centauroside, 4,4'-[(1*Z*)-1-formyl-1-propene-1,3-diyl]bis[3-ethenyl-2-(β-D-glucopyranosyloxy)-3,4-dihydro-2*H*-pyran-5-carboxylic acid dimethyl ester, **26**] – 백색 분말. $[\alpha]_D^{28}$ = -155.9° (*c* = 0.22, MeOH). IR υ_{max} (KBr) 3409 (OH), 1691, 1633 (α,β-unsat. C=O), 1440, 1300 (ester), 1076 (glycosidic C-O), 930 (CH=CH_2), 767 cm^{-1}. UV λ_{max} (log ε) (MeOH) 237 (sh, 4.30), 252 (sh, 4.10), 282 (3.80) nm. ^{1}H-NMR (300 MHz, CD_3OD) δ: 2.44 (1H, m, H-6a), 2.59 (1H, m, H-9″), 2.78 (1H, m, H-9), 3.09 (2H, m, H-5, 6b), 3.18 (1H, dd, *J* = 7.8, 9.0 Hz, H-2′), 3.59 (3H, s, 11″-$COOCH_3$), 3.72 (3H, s, 11-$COOCH_3$), 3.82 (1H, brd, *J* = 10.8 Hz, H-6‴), 3.89 (1H, dd, *J* = 2.1, 12.0 Hz, H-6″), 4.04 (1H, m, H-5″), 4.68 (1H, d, *J* = 7.8 Hz, H-1‴), 4.69 (1H, d, *J* = 8.1 Hz, H-1′), 5.02 (1H, brd, *J* = 8.7 Hz, H-10″a), 5.06 (1H, brd, *J* = 16.8 Hz, H-10″b), 5.29 (1H, brd, *J* = 11.4 Hz, H-10a), 5.35 (1H, brd, *J* = 17.4 Hz, H-10b), 5.49 (1H, d, *J* = 3.9 Hz, H-1″), 5.57 (1H, d, *J* = 4.8 Hz, H-1), 5.59 (1H, dd, *J* = 9.9, 17.1 Hz, H-8″), 5.79 (1H, dd, *J* = 8.4, 16.8 Hz, H-8), 6.71 (1H, t, *J* = 6.9 Hz, H-7), 7.47 (1H, s, H-3″), 7.54 (1H, s, H-3), 9.21 (1H, s, H-7″). ^{13}C-NMR (75.5 MHz, CD_3OD) δ: 97.7 (C-1), 154.2 (C-3), 110.5 (C-4), 33.6 (C-5), 29.8 (C-6), 157.0 (C-7), 135.3 (C-8), 45.4 (C-9), 120.4 (C-10), 169.0 (C-11), 52.0 ($COOCH_3$), 100.2 (C-1′), 74.6

(C-2′), 77.9 (C-3′), 71.5 (C-4′), 78.0 (C-5′), 62.8 (C-6′), 97.4 (C-1″), 152.2 (C-3″), 169.0 (C-4″), 31.0 (C-5″), 143.2 (C-6″), 197.0 (C-7″), 135.5 (C-8″), 46.4 (C-9″), 119.4 (C-10″), 169.0 (C-11″), 51.7 ($COOCH_3$), 99.8 (C-1‴), 74.7 (C-2‴), 77.9 (C-3‴), 71.5 (C-4‴), 78.2 (C-5‴), 62.6 (C-6‴). FABMS *m/z* 781 $[M + Na]^+$, 759 $[M + H]^+$, 619 $[(M + Na) - 162]^+$, 597 $[(M + H) - 162]^+$, 435 $[(M + H) - (2 \times 162)]^+$.

Sucrose [β-D-fructofuranosyl-α-D-glucopyranoside, α-D-glucopyranosyl-β-D-fructofuranoside, sugar, saccharose, **27**] – 미백색 분말. $[\alpha]_D^{27}$ = +73.3° (*c* = 0.84, H_2O). ^{1}H-NMR (400 MHz, D_2O) δ: 3.31 (1H, t, *J* = 9.4 Hz, H-4′), 3.40 (1H, dd, *J* = 3.8, 10.0 Hz, H-2′), 3.51 (2H, s, H-1), 3.60 (1H, t, *J* = 9.8 Hz, H-3′), 3.66 (2H, br s, H-6′), 3.67 (2H, br s, H-6), 3.69 - 3.75 (2H, m, H-5, 5′), 3.89 (1H, t, *J* = 8.5 Hz, H-4), 4.60 (1H, d, *J* = 8.8 Hz, H-3), 5.25 (1H, d, *J* = 3.7 Hz, H-1′). ^{13}C-NMR (75.5 MHz, D_2O) δ: 62.4 (C-1), 104.6 (C-2), 77.4 (C-3), 75.0 (C-4), 82.3 (C-5), 63.3 (C-6), 93.1 (C-1′), 72.0 (C-2′), 73.3 (C-3′), 70.2 (C-4′), 73.5 (C-5′), 61.1 (C-6′).

Epivogeloside (Isovogeloside, nervoside, 5-ethenyl-6-(β-D-glucopyranosyloxy)-4,4a,5,6-tetrahydro-3-methoxy-1*H*,3*H*-pyrano[3,4-c]pyran-1-one, **28**) – 미백색 분말. $[\alpha]_D^{23}$ = -86.4° (*c* = 0.12, MeOH). IR υ_{max} (KBr) 3408 (OH), 1699, 1618 (α,β-unsat. C=O), 1392, 1266, 1075, 1039 (glycosidic C-O), 905 ($CH=CH_2$), 838, 757 cm^{-1}. UV λ_{max} (log ε) (MeOH) 234 (4.19), nm. ^{1}H-NMR (500 MHz, CD_3OD) δ: 1.71 (1H, ddd, *J* = 2.9, 13.7, 13.7 Hz, H-6), 1.86 (1H, ddd, *J* = 1.3, 5.6, 13.7 Hz, H-6), 2.64 (1H, m, H-9), 3.16-3.39 (5H, m, H-5, 2′-5′), 3.51 (3H, s, OCH_3), 3.66 (1H, dd, *J* = 5.7, 12.0 Hz, H-6′a), 3.88 (1H, dd, *J* = 2.0, 12.0 Hz, H-6′b), 4.68 (1H, d, *J* = 7.9 Hz, H-1′), 5.27 (1H, dd, *J* = 1.8, 10.2 Hz, H-10a), 5.29 (1H, dd, *J* = 1.8, 17.1 Hz, H-10b), 5.33 (1H, t, *J* = 2.2 Hz, H-7), 5.51 (1H, m, H-8), 5.55 (1H, d, *J* = 1.7 Hz, H-1). 7.61 (1H, d, *J* = 2.4 Hz, H-3). ^{13}C-NMR (125.5 MHz, CD_3OD) δ: 98.6 (C-1), 154.5 (C-3), 105.3 (C-4), 22.8 (C-5), 30.2 (C-6), 103.3 (C-7), 133.4 (C-8), 43.6 (C-9), 121.1 (C-10), 167.5 (C-11), 57.0 (OCH_3), 100.3 (C-1′), 74.6 (C-2′), 78.0 (C-3′), 71.5 (C-4′), 78.4 (C-5′), 62.7 (C-6′). FABMS *m/z* 411 $[M + Na]^+$, 389 $[M + H]^+$.

Chlorogenic acid [5-(3,4-dihydroxycinnamoyl)quinic acid, **29**] – 미백색 분말. $[\alpha]_D^{24}$ = -10.4° (*c* 0.09, MeOH). IR υ_{max} 3400 (OH), 1697 (acid, α,β-unsat. CO), 1604, 1521, 1446 (arom. C=C), 1280, 979 (*trans* CH=CH), 813 cm^{-1}. UV λ_{max} (log ε) (MeOH) 246 (sh, 3.99), 301 (4.07), 328 (4.18) nm. ^{1}H-NMR (300 MHz, CD_3OD) δ: 2.00 - 2.25 (4H, m, H-2, 6), 3.71 (1H, dd, *J* = 3.0, 8.1 Hz, H-4), 4.15 (1H, dt, *J* = 3.3, 5.4 Hz, H-3), 5.32 (1H, ddd, *J* = 4.5, 8.8, 8.8 Hz, H-5), 6.25 (1H, *J* = 15.9 Hz, H-8′), 6.77 (1H, d, *J* = 8.1 Hz, H-5′), 6.95 (1H, dd, *J* = 2.1, 8.1 Hz, H-6′), 7.04 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-2′), 7.55 (1H, d, *J* = 15.9 Hz, H-7′). ^{13}C-NMR (75.5 MHz, CD_3OD) δ: 38.2 (C-2), 38.8 (C-6), 71.3 (C-3), 72.0 (C-5), 73.5 (C-4), 76.1 (C-1), 115.2 (C-2′), 115.3 (C-8′), 116.5 (C-5′), 123.0 (C-6′), 127.8 (C-1′), 146.8 (C-3′), 147.1 (C-7′), 149.6 (C-4′), 168.7 (C-9′), 177.0 (COOH). FABMS *m/z* 377 $[M + Na]^+$, 355 $[M + H]^+$.

제3장 세부연구개발과제의 최종 연구개발 결과

인동으로부터 long-chain alcohol성분들인 *n*-eicosanol (C_{20}), *n*-docosanol (C_{22}), *n*-tetracosanol (C_{24}) 및 *n*-hexacosanol (C_{26})과, C_{16}-C_{26}의 지방산을 혼합물 형태로 분리하였으며, polyoxygenated C_{18} 지방산 계열의 화합물들인 pinellic acid와 9,12,13-trihydroxyoctadeca-10(*E*),15(*Z*)-dienoic acid, 6종의 triterpene계 성분인 (24*S*)-cycloart-25-en-3β,24-diol, pomolic acid, ursolic acid, euscaphic acid, hederagenin, 23-hydroxytormentic acid, 4α-methyl ergosterol 유도체들인 obtusifoliol, gramisterol 및 citrostadienol, β-sitosterol 및 이의 배당체인 daucosterol, 5종의 phenylpropanoid성분들인 caffeic acid, coniferin, coniferaldehyde, caffeic acid docosanoyl ester 및 coniferyl aldehyde 4-*O*-glucoside, 5종의 iridoid 성분들인 loganin, loganic acid, secologanin dimethyl acetal, sweroside 및 demethylsecologanol, 4종의 lignan 성분들인 9α-hydroxy pinoresinol, pinoresinol glucoside, (+)-5-demethyl-3-methoxyisolariciresinol, (7*R*,8*R*)-*threo*-4,7,9,3′,9′-pentahydroxy-3-methoxy-8-*O*-4′-neolignan, flavonoid인 linarin, 기타 trilinolein, bis(2-ethylhexyl)phthalate 등 총 34종의 화합물들을 분리 규명하였으며, 이중 lignan성분인 (+)-5-demethyl-3-methoxyisolariciresinol은 처음 분리된 신물질이다.
금은화로부터 *n*-nonacosane과 *n*-hexacosanol같은 hydrocarbon alcohol 및 monoacylglycerol계열인 monopalmitin, flavonoid 성분인 luteolin, luteolin 7-*O*-glucoside, flavoyadorinin-B, isoquercitrin, rhoifolin, rutin 등의 6종, chlorogenic acid, methyl chlorogenate, 3,5-dicaffeoylquinic acid, 3,5-dicaffeoylquinic acid methyl ester, 4,5-dicaffeoylquinic acid, 4,5-dicaffeoylquinic acid methyl ester같은 chlorogenic acid 유도체 6종, 7-ketologanin, secologanin dimethyl acetal, (*E*)-aldosecologanin, epivogeloside같은 iridoid 성분 4종, caffeic acid, vanillic acid 4-*O*-β-D-(6-*O*-benzoylglucopyranoside) 등 2종의 phenylpropanoid성분들 coumarin성분인 esculetin, 이외에도 protocatechuic acid, β-sitosterol, daucosterol, dicarboxylic acid계 지방산의 일종인 azelaic acid와 uracil, cerebroside 및 sucrose 등 총 29종의 화합물들을 분리 확인하였으며, 이중 vanillic acid 4-*O*-β-D-(6-*O*-benzoylglucopyranoside)는 처음으로 분리된 신물질이다 (Table 1, 2 참조). 이들 화합물 중 선행연구결과로 얻어진 화합물들을 포함하여 제2세부과제에 30종, 효능팀에 29종의 화합물들을 제공하여 실험재료로 사용하도록 하였다.

Table 1. 인동으로부터 분리한 화합물 목록

No.	Compound name	1차년도 (mg)	2차년도 (mg)	**총량** (mg)
1	hydrocarbon alcohol (docosanol + tetracosanol)	-	3	**3**
2	hydrocarbon alcohol (docosanol + tetracosanol + eicosanol)	-	4	**4**
3	24(*S*)-cycloart-25-en-3β,24-diol	-	5	**5**
4	trilinolein	20	-	**20**
5	*n*-hexacosanol	210	2	**212**
6	obtusifoliol	2	-	**2**

7	gramisterol	2	-	2
8	citrostadienol	3	-	3
9	β-sitosterol	1,124	2	1,126
10	DOP[bis(2-ethylhexyl)phthalate]	30	-	30
11	fatty acids	40	6	46
12	conferaldehyde	-	10	10
13	caffeic acid docosanoyl ester	-	13	13
14	pomolic acid	8	-	8
15	ursolic acid	20	-	20
16	9α-hydroxypinoresinol	-	5	5
17	euscaphic acid	10	-	10
18	hederagenin	10	-	10
19	secologanin dimethyl acetal	36	220	256
20	daucosterol	56	42	98
21	23-hydroxytormentic acid	16	-	16
22	caffeic acid	-	7	7
23	9,12,13-trihydroxyoctadeca-10(*E*),15(*Z*)-dienoic acid	-	17	17
24	pinellic acid	-	10	10
25	7,8-*threo*-4,7,9,3',9'-pentahydroxy-3-methoxy-8-*O*-4'-neolignan	-	2	2
26	5-demethxyl-3-methoxy isolariciresinol	-	2	2
27	pinoresinol 4-*O*-glucoside	-	105	105
28	sweroside	-	1,232	1,232
29	conferylaldehyde 4-*O*-glucoside	-	4	4
30	linarin	-	2	2
31	coniferin	-	120	120
32	loganin	1,210	5,316	6,526
33	loganic acid	-	304	304
34	demethyl secologanol	-	2	2

Table 2. 금은화로부터 분리한 화합물 목록

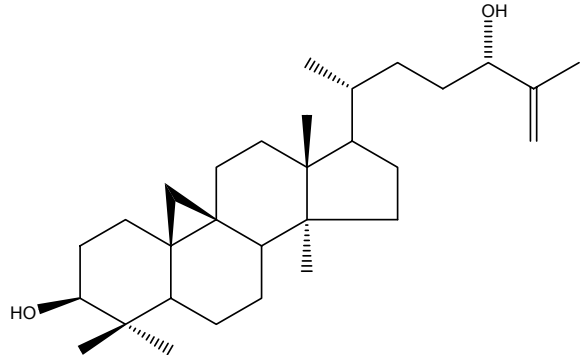
No.	Compound name	1차년도 (mg)	2차년도 (mg)	**총량** (mg)
1	*n*-nonacosane	-	44	**44**
2	*n*-hexacosanol	10	70	**80**
3	monopalmitin	-	10	**10**
4	β-sitosterol	42	20	**62**
5	daucosterol	175	2,978	**3,153**
6	luteolin	128	47	**175**
7	esculetin	-	2	**2**
8	protocatechuic acid	10	-	**10**
9	azelaic acid	7	-	**7**
10	caffeic acid	5	-	**5**
11	flavoyadorinin-B	-	16	**16**
12	4,5-dicaffeoylquinic acid	3	-	**3**
13	cerebroside	-	3	**3**
14	4,5-dicaffeoylquinic acid methyl ester	4	-	**4**
15	vanilic acid 4-*O*-β-D-(6-benzoylglucopyranoside)	-	7	**7**
16	7-ketologanin	-	3	**3**
17	secologanin dimethyl acetal	-	118	**118**
18	uracil	-	6	**6**
19	luteolin 7-*O*-glucoside	183	434	**617**
20	rutin	-	10	**10**
21	3,5-dicaffeoylquinic acid methyl ester	-	1,899	**1,899**
22	methyl chlorogenate	-	16	**16**
23	isoquercitrin	-	19	**19**
24	3,5-dicaffeoylquinic acid	-	513	**513**
25	rhoifolin	2	1	**3**
26	centauroside	-	70	**70**
27	sucrose	-	1,068	**1,068**
28	epivogeloside	-	3	**3**
29	chlorogenic acid	-	400	**400**

Table 3. 지표물질로 KFDA에 제출한 화합물 목록

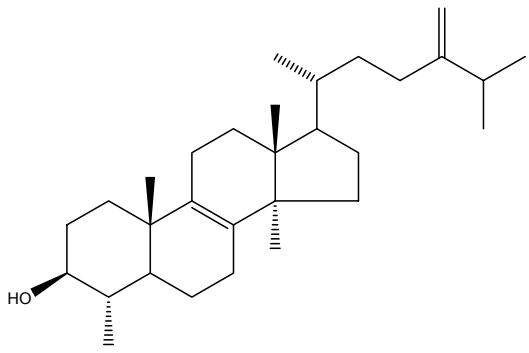
No.	인동의 지표성분 화합물명	무게 (㎎)	순도 (%)	금은화의 지표성분 화합물명	무게 (㎎)	순도 (%)
1	loganin	3,100	99.9	chlorogenic acid	3,030	99.9
2	sweroside	630	99.5	luteolin 7-*O*-glucoside	340	95.8
3	loganic acid	200	99.1	3,5-dicaffeoylquinic acid methyl ester	360	90.5
4	coniferin	120	97.5	3,5-dicaffeoylquinic acid	500	99.9
5	linarin	120	92.5	caffeic acid methyl ester	210	99.8
6	luteolin	100	96.6	caffeic acid	1,020	99.9
7	caffeic acid	1,050	99.9	centauroside	15	94.9
8	coniferylaldehyde	105	99.9	isoquercitrin	440	92.4
9	pinoresinol 4-*O*-glucoside	35	97.6	rutin	1,080	92.1
10	secologanin dimethyl acetal	150	95.3	sweroside	300	99.5

제4장 세부연구개발과제의 연구결과 고찰 및 결론

인동덩굴 (*Lonicera japonica*)의 줄기를 인동등 (忍冬藤), 꽃을 금은화 (金銀花)라고 하여 한방에서 사용되고 있는 약재로서, 대한민국약전 9개정 수재품목 (173품목)의 개정안에는 인동덩굴의 꽃봉오리 또는 막 피기 시작한 꽃으로 규정한 금은화 (Lonicera Flower, 金銀花) 와, 인동덩굴의 잎 및 덩굴성 줄기로 규정한 인동 (Lonicera Caulis, 忍冬)의 두 품목이 규정되어 있다. 인동 및 금은화의 성분연구는 90년대 초반부터 연구되기 시작하여 현재 많은 성분들이 분리되어 있다. 이들 성분들을 화합물 군으로 대별하면 flavonoid, iridoid, saponin 및 기타 phenol성 화합물들로 대별할 수 있다. 또한 지금까지의 이들 성분들의 활성연구 결과를 보면 대부분 항염증활성에 관한 연구가 주류를 이루고 있다. 인동의 hexane분획은 long-chain alcohol같은 비극성물질이 함유되어 있다. 이들을 분리하여 GC/MS를 실시하여 *n*-eicosanol (C_{20}), *n*-docosanol (C_{22}) 및 *n*-tetracosanol (C_{24}) 임을 알았다. 화합물 **3**의 ^{1}H-NMR spectrum을 보면 고자장영역에서 특징적으로 나타나는 2개의 doublet signal들이



(24*S*)-Cycloart-25-en-3β,24-diol **(3)**



Obtusifoliol **(6)**

나타나고 있는 것으로 보아 cycloartane계열의 triterpene임을 알았다. 이외에도 5개의 singlet CH_3 signal과 하나의 secondary CH_3 signal이 나타나며, tertiary CH_3 signal 중 저자장 (δ 1.72)에서 나타나는 CH_3 signal 및 2개의 exomethylene signal들이 각각 δ 4.84, 4.92에서 broad singlet signal로 나타나고 있는 것으로 보아 isopropenyl group의 존재를 추정할 수 있었다. 또한 δ 3.28에서 전형적인 H-3 (dd, J = 4.5, 11.1 Hz)와 또 하나의 allylic oxymethine proton이 δ 4.02 (t, J = 6.6 Hz)에서 나타나고 있음을 알았다. 이상의 결과는 ^{13}C-NMR에서도 입증할 수 있었다. Side chain에 존재하는 allylic oxymethine carbon 및 주변 탄소의 ^{13}C-NMR data가 24*S* configuration을 갖는 model compound와 일치하므로 화합물 **3**은 (24*S*)-cycloart-25-en-3β,24-diol로 결정하였다.[51-53] 인동의 CH_2Cl_2 분획에서 얻은 hexacosanol (**5**) 외에 화합물 **4**는 2중결합이 존재하는 long-chain 지방산이 결합되어 있는 acylglycerol로 추정되었다. 특히 glycerol 부분의 ^{13}C-NMR chemical shift값이 δ 62.1 (2C)과 68.9에서 나타나고 있는 것으로 보아 triacylglycerol이며, 지방산은 linoleic acid가 ester결합하고 있는 trilinolein 임을 추정하였다. FABMS에서도 특징적인 fragment ion들이 *m/z* 600, 263 등에서 나타나고 있는 것으로 이를 확인하였다.[54] 화합물 **6**, **7** 및 **8**은 ergostadiene으로 각각 1 ppm 부근

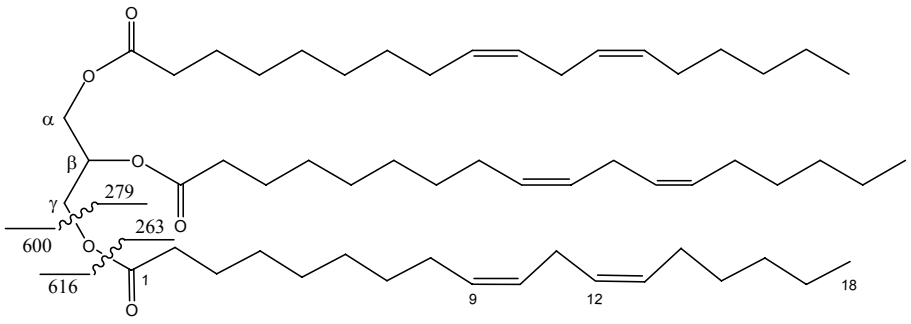
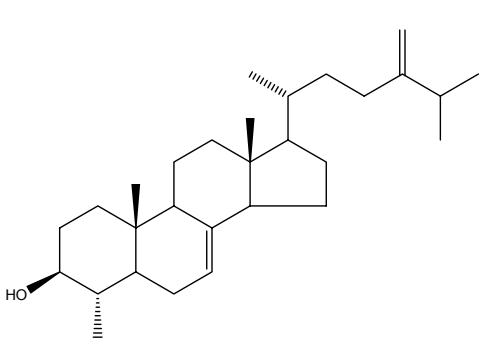
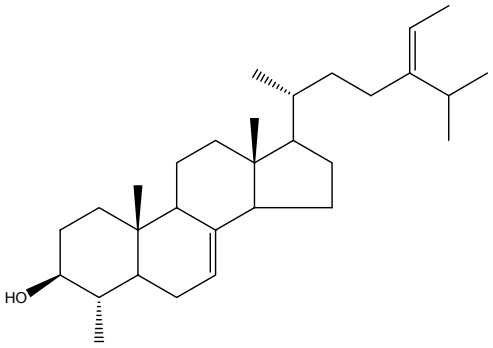


Fig. 1. Key FABMS fragmentation of trilinolein **(4)**

에서 나타나고 있는 secondary CH_3이 존재하고 있는 것으로 보아 4α-CH_3 ergostane계인 obtusifoliol (**6**), gramisterol (**7**) 및 citrostadienol (**8**)[55] 로 결정하였다. 화합물 **9**는 β-sitosterol이고 **10**은 dioctylphtalate (DOP),[56] **11**은 지방산 혼합물로 methylation시켜 GC/MS한 결과 lignoceric acid가 주성분임을 알았다. 화합물 **12**는 ABX type의 splitting pattern이 나타나며 하나의 OCH_3 signal과 *trans* olefinic proton이 각각 δ 7.58 (d, J = 15.6 Hz)과 6.65 (dd, J = 7.8, 15.6 Hz)에서 나타나며, aldehyde H가 δ 9.57 (d, J = 7.8 Hz)에서 나타나는 것으로 보아 coniferaldehyde (**12**) 로 확인하였다.[57,58]

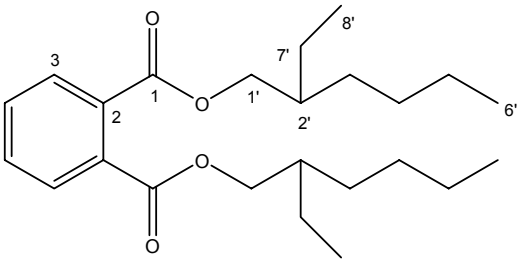


Gramisterol **(7)**

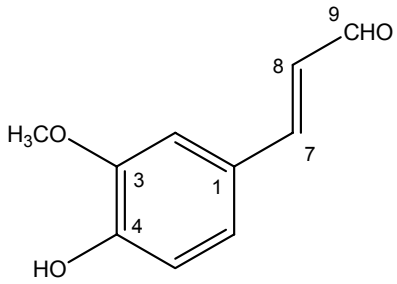


Citrostadienol **(8)**

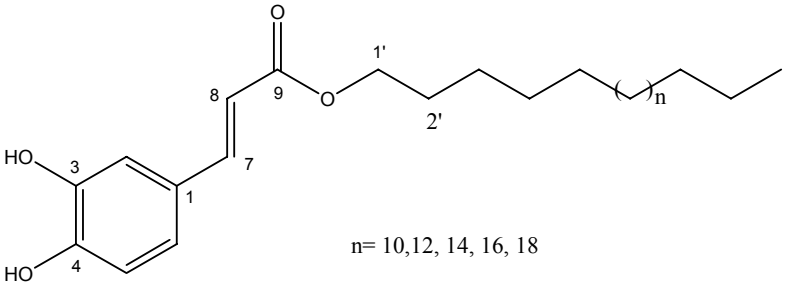
화합물 **13**은 전형적인 phenylpropanoid에 해당하는 signal들 외에 long-chain alcohol로 추정되는 특징적인 signal들이 나타나고 있는 것으로 보아 caffeic acid의 지방산 ester임을 추정하였다. 이를 alkali분해시켜 얻은 알콜을 GC/MS로 확인한 결과 짝수인 C_{18}부터 C_{26}까지의 *n*-alkanol들을 확인하였으며 이중 C_{22}인 *n*-docosanol이 주성분으로 확인됨에 따라 **13**은 docosanoyl caffeate로 결정하였다.[59,60] 화합물 **14**, **15**, **17**, **18** 및 **21**은 모두 triterpene 계열의 특징적인 spectral data들을 나타내고 있으며 화합물 **15**는 ursolic acid, **18**은 hederagenin임을 바로 확인하였다. 화합물 **14**도 **15**와 매우 유사하나, H-18 이 δ 3.05에서 broad singlet로 나타나고 있고, EIMS에서도 ursolic acid (**15**)의 분자량인 456 amu보다 16 dalton이 더 많은 472 amu에서 나타나고 있는 것으로 보아 pomolic acid (**14**)로 결정할 수 있었다. 화합물 **17**도 pomolic acid와 같은 19α-hydroxyursolic acid계열의 화합물이며



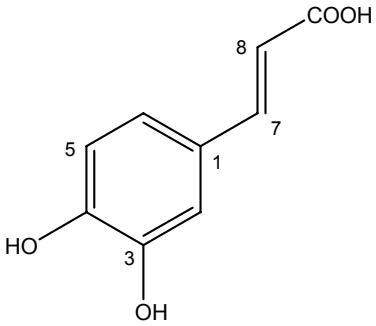
Bis(2-ethylhexyl)phthalate (DOP, **10**)



Coniferaldehyde (**12**)



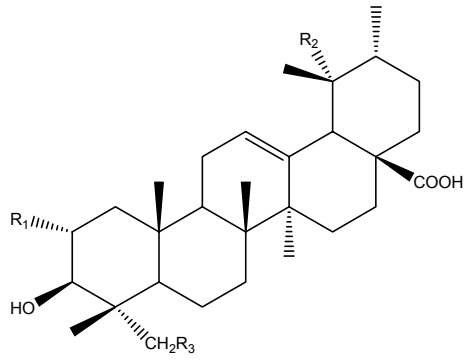
Caffeic acid docosanoyl ester (**13**)

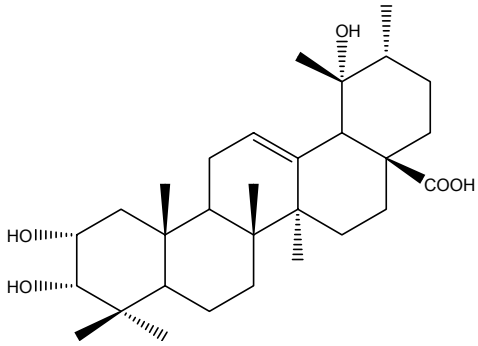


Caffeic acid (**22**)

분자량이 화합물 **14**보다 16 dalton이 더 크며 A/B ring쪽에 2개의 OH가 존재하는 것으로 이들의 oxygenated methine proton들이 각각 δ 3.75 (d, *J* = 2.4 Hz)와 4.29 (ddd, *J* = 2.7, 4.2, 11.6 Hz)에서 나타나고 있는 것으로 보아 2α,3α-dihydroxy group이 존재함을 알 수 있고 이는 ^{13}C-NMR data에서 δ 66.1과 79.3에서 signal들이 나타나므로 화합물 **17**은 euscaphic acid로 결정하였다. 화합물 **21**도 **14**나 **17**과 같은 19α-hydroxyursane계열이며 2α,3β,23-trihydroxy group이 존재함을 EIMS 및 NMR data로 확인할 수 있으므로 23-hydroxytormentic acid로 확정하였다.[61] 화합물 **20**은 β-

sitosterol glucoside (daucosterol)로 확인하였고, 화합물 **22**는 화합물 **13**과 ^{1}H-NMR에서 저자장 부문이 거의 유사하며, EIMS에서 분자이온 $[M]^{+}$이 *m/z* 180에서 강하게 나타나고 있는 것으로 보아 caffeic acid로 결정하였다. 화합물 **24**는 3개의 OH와 [δ_H 3.40; δ_C 75.1, δ_H 3.90; δ_C 76.1, δ_H 4.04; δ_C 71.8] 하나의 이중결합 [δ_H 5.65 (1H, dd, *J* = 5.0, 15.6 Hz; δ_C 136.5), δ_H 5.72 (1H, dd, *J* = 5.0, 15.6 Hz, δ_C 130.8] 이 존재함을 NMR data로 확인할 수 있었으며, 이의 HMBC spectrum을 보면





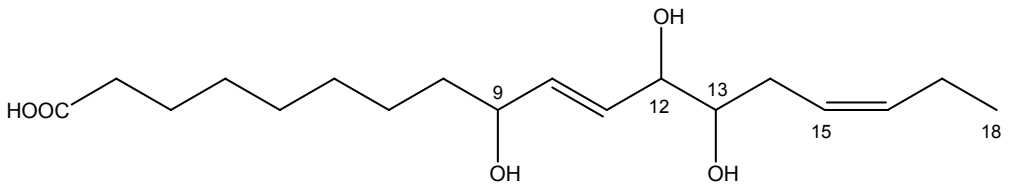
Pomolic acid **(14)** R_1=R_3= H R_2= OH

Ursolic acid **(15)** R_1=R_2=R_3= H

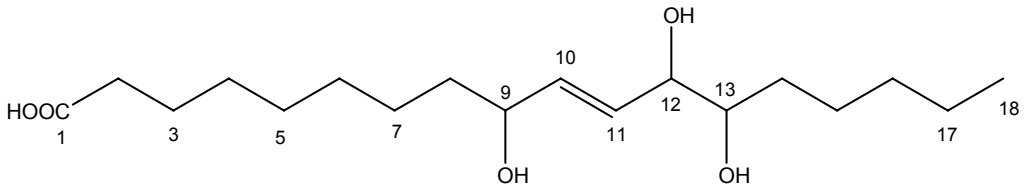
23-Hydroxytormentic acid **(21)** R_1=R_2=R_3= OH

Euscaphic acid **(17)**

Fig. 2 에서와 같이 이중결합을 중심으로 한 부분구조[-CH_2-CH(OH)-CH=CH-CH(OH)-CH(OH)-CH_2-]를 확인할 수 있으며, 이중결합은 앞에서 언급한바와 같이 olefinic proton들의 *J* 값 (15.6 Hz)으로 *trans* (*E*)임을 알았다. 이와 같은 부분구조는 이의 methyl ester를 TMS로 trimethylsilylation시켜 얻은



9,12,13-Trihydroxyoctadeca-10(*E*),15(*Z*)-dienoic acid **(23)**



Pinellic acid **(24)**

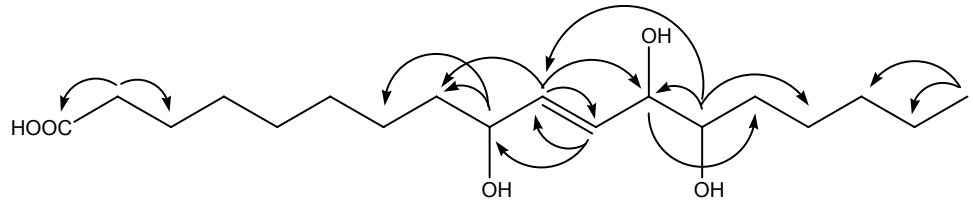


Fig. 2. Key HMBC correlations of pinellic acid (**24**)

유도체의 EIMS spectrum에서도 확인할 수 있었다. 즉 Fig. 3에서와 같이 TMSi group을 가진 두 탄소 결합 사이에서 끊어져서 *m/z* 173과 387에서 fragment ion들이 나타나고 있으므로 C_{18} 지방산의 12,13-vicinal diTMSi이며 이중결합의 위치는 C_{10}이고, 또 하나의 OH는 *m/z* 259 이온이 나타나고 있는 것으로 보아 C_9에 위치하고 있음을 알았다.[62-64] 즉 화합물 **24**는 9,12,13-trihydroxy-10(*E*)-octadecenoic acid 임을 알았으며, oxygenated carbon의 stereochemistry를 결정하기 위하여 문헌조사 결과 반하 (*Pinellia ternata*)에서 분리한 pinellic acid와[65] 일치하므로 화합물 **24**는 pinellic acid [9(*S*),12(*S*),13(*S*)-trihydroxy-10(*E*)-octadecenoic acid]로 결정하였으며, 이 물질은 시호 (*Bupleurum*

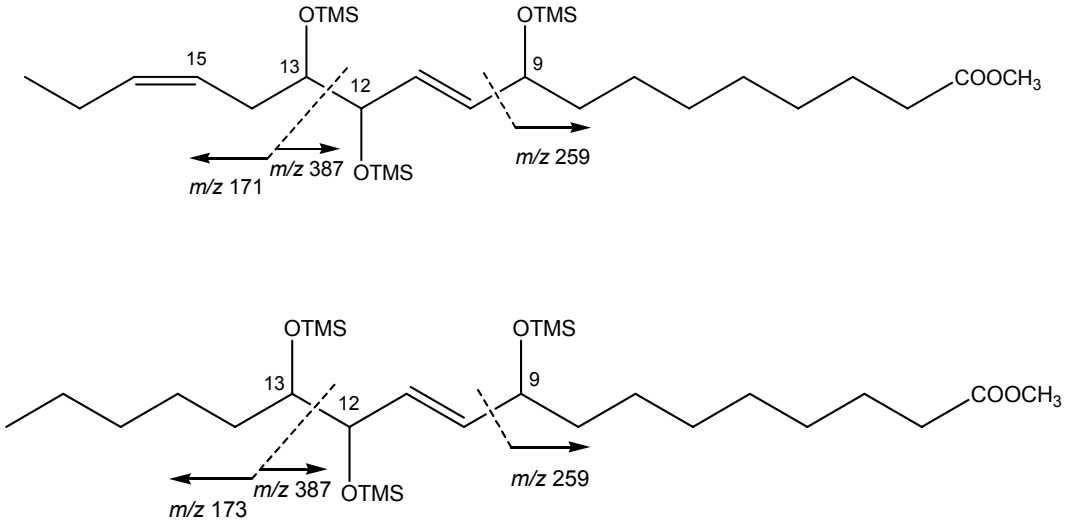
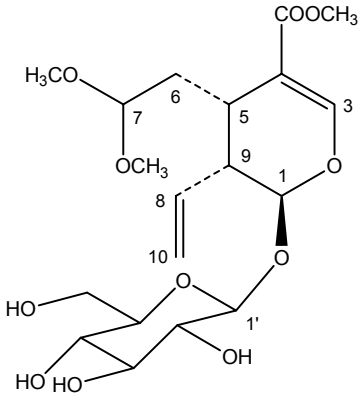


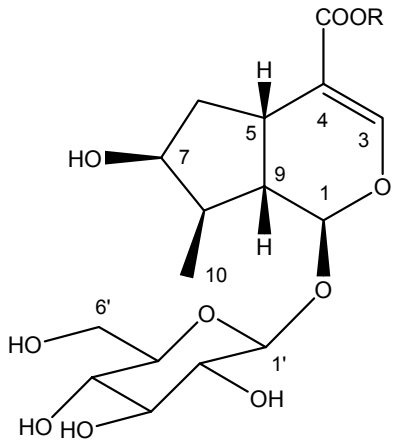
Fig. 3. Key EIMS fragmentation of methyl trimethylsilyl 9,12,13-trihydroxyoctadeca-10(*E*),15(*Z*)-dienoate (**23**, upper part) and methyl trimethylsilyl pinellate (**24**, lower part)

falcatum)로부터도 분리 보고된 바 있다.[66] 화합물 **23**도 **24**와 매우 유사한 spectrum을 제시하고 있다. 즉 FABMS에서 분자이온이 pinellic acid보다 2 amu 적은 *m/z* 328에서 나타나며, NMR spectrum에서 pinellic acid에 해당하는 signal들 이외에 또 하나의 이중결합 (*cis*)에 기인하는 signal들이 [δ_H 5.45 (2H, m); δ_C 126.4, 134.3] 나타나고 있는 것으로도 화합물 **23**은 9,12,13-trihydroxyoctadeca-10(*E*),X(*Z*)-diene

임을 추정할 수 있었다. 화합물 **24**와같이 **23**의 methyl trisilylate 유도체의 EIMS spectrum을 보면 pinellic acid (**24**)와같이 C_{12}-C_{13}에서 끊어져서 생성된 fragment ion들이 *m/z* 171 (100%)과 387에서 나타나는 것으로 이중결합은 ω-3 위치에 존재함을 추정할 수 있었다.[63] 또한, allylic C-17의 ^{13}C chemical shift값이 δ 21.6에서 나타나고 있는 것으로 보아 이중결합은 C-15에 위치하고 있음을 알았다.[63,67] 이상의 결과를 종합하여 화합물 **23**의 화학구조는 9,12,13-trihydroxyoctadeca-10(*E*),15(*Z*)-dienoic acid로 결정할 수 있었다. C-9, 12, 13 위치의 absolute configuration을 결정하기 위하여 문헌조사 결과 9*S*,12*S*,13*S*-trihydroxyoctadeca-10(*E*),15(*Z*)-dienoic acid인 fulgidic acid[68]와 9*S*,12*R*,13*S*-trihydroxyoctadeca-10(*E*),15(*Z*)-dienoic acid인 malyngic acid[69]가 보고된 바 있으나 그 이상의 비교는 불가능하였다. 화합물 **32**는 인동의 성분중 주성분으로 잘 알려진 iridoid 성분인 loganin[70,72]으로 결정할 수 있었으며, 화합물 **33**은 loganin과 분광학적 데이터가 거의 일치하나 분자량이 loganin 보다

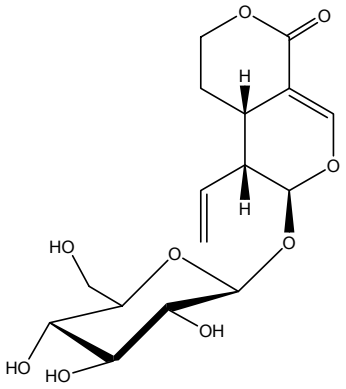


Loganin (**32**) R= CH_3
Loganic acid (**33**) R= H

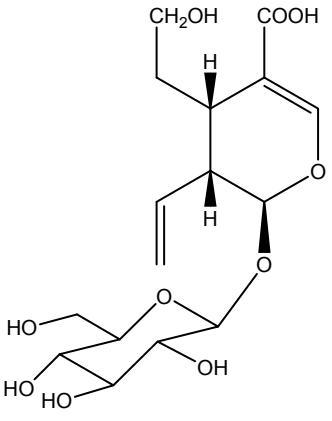


Secologanin dimethyl acetal (**19**)

14 amu 적으며 NMR에서 $COOCH_3$ 대신[δ_H 3.68; δ_C 169.5, 51.5]에 COOH에 기인한 signal [δ_C 170.9]들이 나타나고 있는 것으로 보아 loganic acid[70]로 결정하였다. 화합물 **19**, **28** 및 **34**는 분광학적 data들이 secologanin type의 특성들이 나타나고 있는 것으로 보아 이 계열의 iridoid 성분들임을 추정할 수 있었다. 화합물 **19**는 acetal에 기인하는 특징적인 signal들 [δ_H 4.48; δ_C 104.5] 및 OCH_3 signal들 [δ_H 3.28, 3.29; δ_C 52.6, 53.9]이 나타나고 있는 것으로 보아 secologanin의 분해산물로 알려지고 있는 secologanin dimethyl acetal[71]로 결정하였다. 화합물 **28**은 lactone ring에 기인하는 흡수band가 1691 cm^{-1} 및 δ_C 168.5 ppm에서 나타나고 있는 것으로 보아 sweroside[72] 임을 쉽게 결정할 수 있었다. 화합물 **34**는 분자식이 $C_{16}H_{24}O_{10}$ 으로 secologanin과 유사하나 일급알콜에 기인하는 signal이 δ_C 61.0 [δ_H 3.55]에서 나타나고 있고, 유리산 (COOH)에 기인하는 signal은 보이지 않으나 다른 carbon

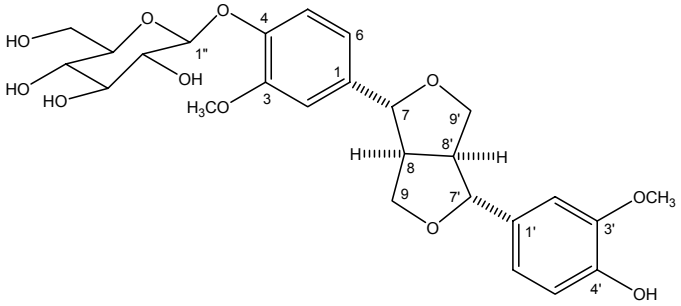


Sweroside (28)

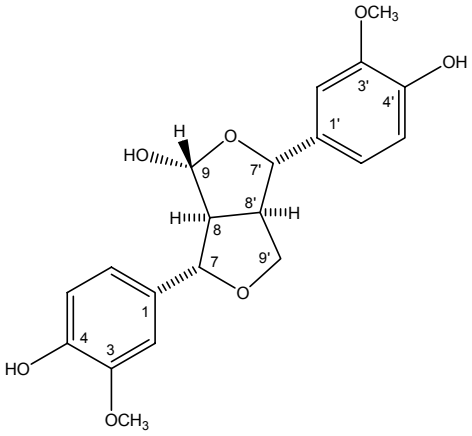


Demethylsecologanol (34)

chemical shift값이 demethylsecologanol[73]의 그것과 일치하는 것으로 보아 demethylsecologanol으로 결정하였다. 화합물 27은 phenol성 배당체로 당은 glucose이고 aglycon은 전형적인 furofuran

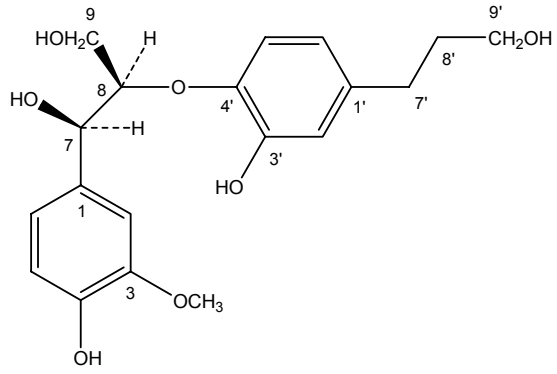


Pinoresinol glucoside (27)



9α-Hydroxypinoresinol (16)

lignan인 pinoresinol[61,74]임을 알았다. 따라서 화합물 27은 pinoresinol glucoside[75]로 결정하였다. 화합물 16은 2개의 vanillyl group이 존재하며, δ 5.47[δ_C 103.5]에서 hemiacetal의 특징적인 signal이 나타나고 EIMS에서 $[M - H_2O]^+$이 *m/z* 356에서 나타나며 이외에도 전형적인 furofuran lignan의 특징적인 fragment ion들이 *m/z* 163, 152, 151 등에서 강하게 나타나고 있는 것으로 보아 pinoresinol의 C-9에 OH기가 결합되어 있는 것으로 추정할 수 있었다. 따라서 문헌의 9α-pinoresinol[76,77]과 직접적으로 비교한바 일치하므로 화합물 16은 9α-pinoresinol로 결정하였다. 화합물 25는 2개의 phenyl propanol이 ether결합하고 있는 neolignan계 화합물로 추정되었다. 즉 전형적인 guaiacylglycerol과 3,4-dihydroxyhydrocinnamyl alcohol이 8-*O*-4′ ether형태로 결합하고 있음을 Fig. 4의 HMBC 와 Fig. 5의 NOESY spectrum을 해석하여 증명할 수 있었으며, δ 4.89에서 H-7의 *J* 값이 6.3 Hz의 doublet로 나



7,8-*threo*-4,7,9,3′,9′-Pentahydroxy-3-methoxy-8-*O*-4′-neolignan (25)

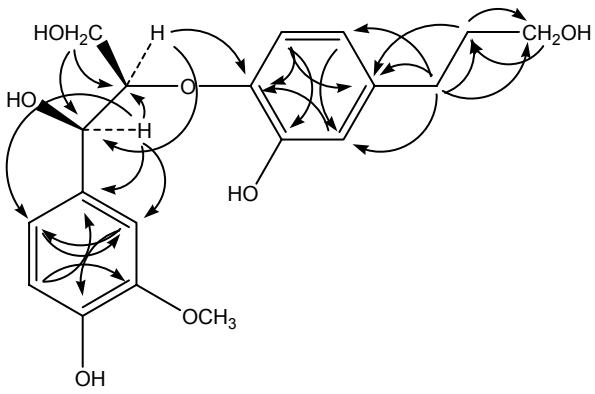


Fig. 4. Key HMBC correlations of **25**

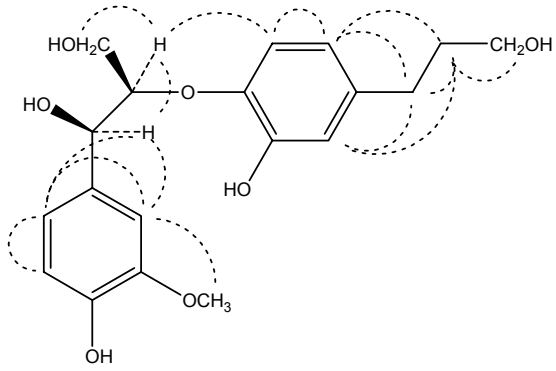
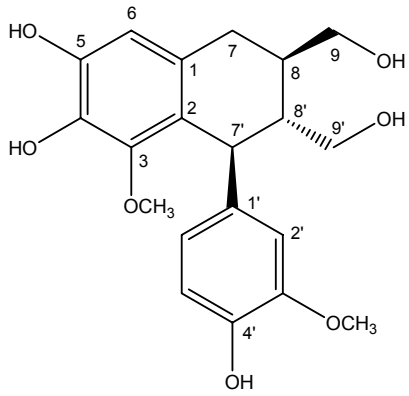


Fig. 5. Key NOEs observed for **25**



(+)-5-Demethyl-3-methoxy-isolariciresinol (26)

타나고 있으므로 *threo* type임을 알았다. 따라서 화합물 **25**는 *threo*-4,7,9,3′,9′-pentahydroxy-3-methoxy-8-*O*-4′-neolignan임을 알았으며, 절대배치는 이 화합물의 CD spectrum이 234 (-10,692), 283 (-1,050) nm 에서 negative Cotton effect를 나타내므로 7*R*,8*R* 로 결정하였다.[78] 이상의 결과를 종합하여 화합물 **25**는 (7*R*,8*R*)-*threo*-4,7,9,3′,9′-pentahydroxy-3-methoxy-8-*O*-4′-neolignan으로 결정하였다. 이 물질은 동속식물인 *L. gracilipes* var. *glandulosa*의 잎에서 배당체형태로 분리 보고된 바 있다.[79] 화합물 **26**의 분자식은 고분해능 EIMS를 측정하여 $C_{20}H_{24}O_7$임을 알았으며 이는 ^{13}C-NMR에서 18개의 carbon signal과 2개의 OCH_3 (δ_H 3.36, 3.74)에 기인하는 signal들이 나타나며, 이중 12개의 탄소는 2개의 aromatic ring에 기인하고, 2개의 hydroxymethyl [δ_H 3.42, 3.54, δ_C 67.0; δ_H 3.46, δ_C 64.5] 외에 하나의 CH_2, 3개의 CH에 기인하는 signal들이 존재하고 있는 것으로 보아 aryltetralin type lignan으로 추정되었으며, 이 계열의 화합물 중에서 잘 알려진 isolarciresinol 및 lyoniresinol[80]과 매우 유사함을 확인하였다. 또한 ^{1}H-NMR에서 1,2,3,4,5- 및 1,3,4-substituted aromatic ring이 존재하며 이는 Scheme 1에 제시한 바와 같이 EIMS에서 이 계열의 특징적인 fragment ion이 외에 2개의 benzylic ion들이 각각 *m/z* 153과 137에서 나타나고 있는 것으로도 확인할 수 있었다.[81] Fig. 6에 나

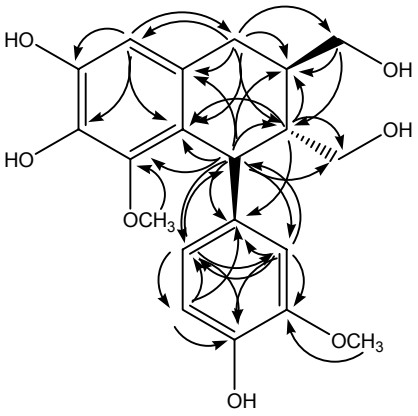


Fig. 6. Key HMBC correlations of 26

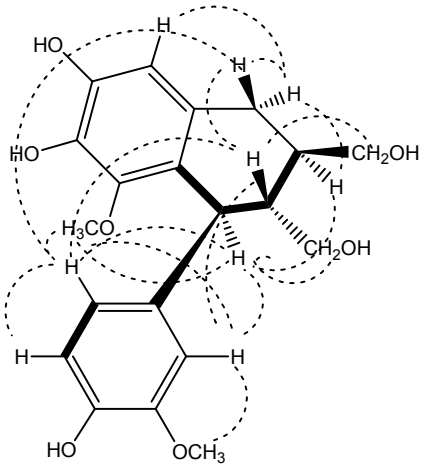
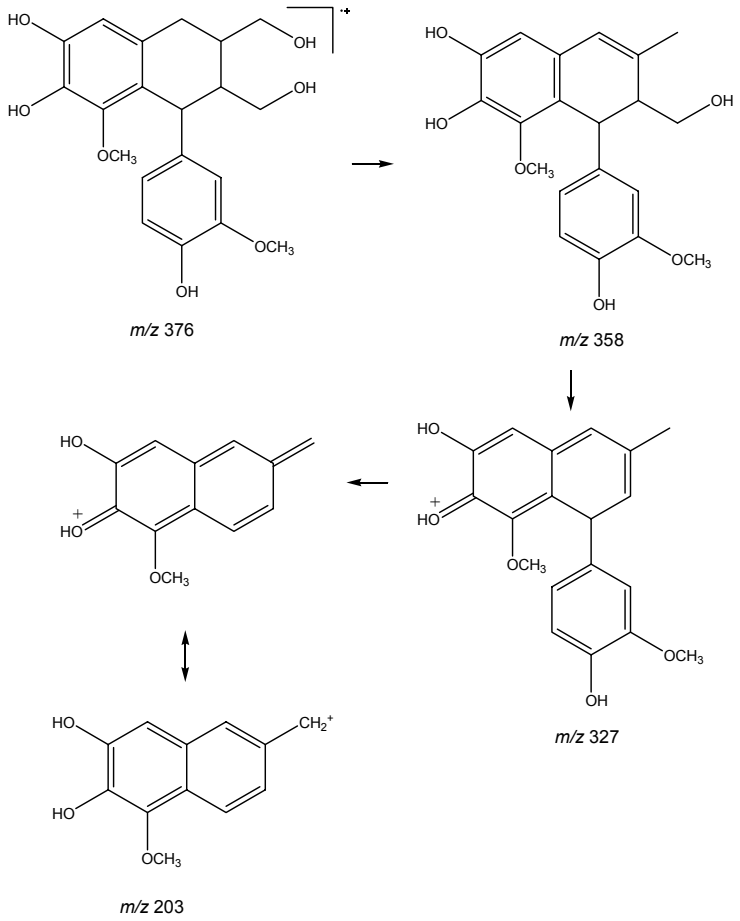
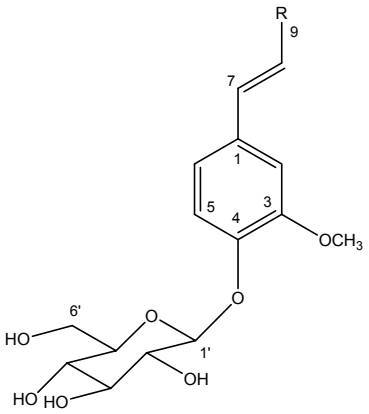


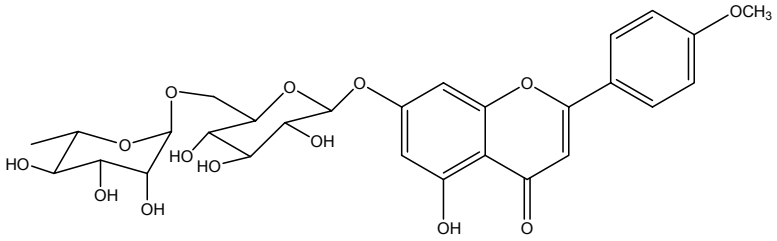
Fig. 7. Key NOEs observed for 26



Scheme 1. Key fragmentation of 26

타낸 바와 같이 이 화합물의 HMBC spectrum을 통하여 3-methoxy-4,5-dihydroxy 및 3-methoxy-4-hydroxy type의 aryl group을 가지고 있음을 확인할 수 있었다. 또한 서로 인접하는 3개의 methine proton (H-7′과 H-8′, H-8′과 H-8) 사이의 상대적인 배치는 이들 사이의 J 값 (5.2 Hz) 및 $W_{1/2}$ 값 (26 Hz, 15 Hz) 을 통하여 *trans*,*trans*-configuration 임을 확인할 수 있었으며,[82,83] 이는 Fig. 7에 나타낸 바와 같이 NOESY spectrum에 의하여서도 확인할 수 있었다. 화합물 **26**의 절대배치는 CD spectrum을 통하여 결정할 수 있었다. 즉 negative (-) B-absorption이 나타나고 있으므로 C-7′는 *S* 임을 알았다.[106,107] 이상의 결과를 종합하여 화합물 **26**은 (+)-5-demethyl-3-methoxy-isolariciresinol로 결정하였으며 지금까지 보고된 바 없는 신물질임을 알았다. 화합물 **29**와 **30**은 coniferaldehyde (**12**)나 caffeic acid (**22**)와 매우 유사한 분광학적 특성을 나타내고 있으며 glucose가 결합하고 있는 배당체들이다. 화합물 **29**는 aldehyde기가 존재함을 ^{1}H-NMR에서 특징적으로 δ 9.61 (d, J = 7.8 Hz)에서 나타나는 signal로 확인할 수 있으며, δ 3.90에서 나타나는 하나의 OCH_3 signal이 존재하는 것으로 보아 coniferyl aldehyde 4-*O*-glucoside[84]임을 알았으며, **30**은 **29**와 매우 유사하나 CHO 대신에 CH_2OH [δ_H 4.20; δ_C 63.8]가 존재함을 확인할 수 있어 식물에서 쉽게 확인할 수 있는 coniferin[85,86]으로 결정하였다. 화합물 **30**은 전형적인 flavonoid의 spectral data들을 제시하고 있고 당 (glucose, rhamnose)이





Coniferyl aldehyde 4-*O*-glucoside (**29**)　　Linarin (**30**)

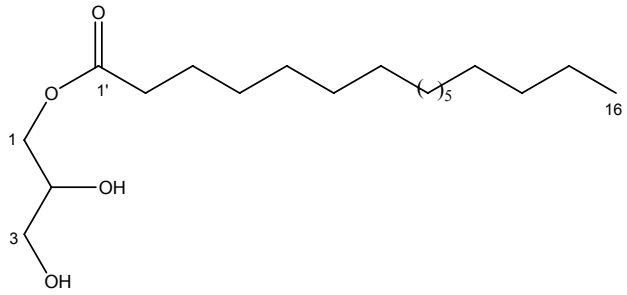
R= CHO

Coniferin (**31**)　　R= CH_2OH

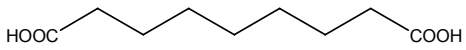
존재하는 것을 확인할 수 있으므로 flavonoid glycoside로 추정하였다. NMR data에서 flavone 골격을 나타내고 하나의 OCH_3 signal이 C-4′에 존재하는 것으로 보아 aglycon은 apigenin 4′-*O*-methyl ether로 결정하였다. 말단당은 rhamnose이고 glucose의 C-6가 66.3 ppm에서 나타나 저자장이동하고 있으므로 당은 rutinose이며, NaOAc를 가하여 UV를 측정하였을 때 나타나는 band II가 268 nm에서 나타나 MeOH에서 얻은 값과 변화가 없으므로 rutinose는 apigenin 4′-*O*-methyl ether의 C-7 위치에 결합되어 있음을 밝혔다. 따라서 화합물 **30**은 linarin[87]으로 결정하였다. 이상의 결과를 종합하여 인동으로부터 얻은 34종의 화합물들은 1종의 flavonoid, 5종의 phenylpropanoid, 4종의 lignan, 6종의 triterpenoid, 5종의 steroid, 4종의 iridoid, 3종의 지방산 계열 및 기타 6종으로 분류할 수 있으며, 이 중 신물질인 (+)-5-demethyl-3-methoxy-isolariciresinol을 포함하여 *n*-eicosanol (C_{20}), *n*-docosanol (C_{22}), *n*-tetracosanol (C_{24}), *n*-hexacosanol (C_{26}), pinellic acid, 9,12,13-trihydroxyoctadeca-10(*E*),15(*Z*)-dienoic acid, (24*S*)-cycloart-25-en-3β,24-diol, pomolic acid, ursolic acid, euscaphic

acid, hederagenin, 23-hydroxytormentic acid, obtusifoliol, gramisterol, citrostadienol, β-sitosterol, daucosterol, coniferin, coniferaldehyde, caffeic acid docosanoyl ester, coniferyl aldehyde 4-*O*-glucoside, loganic acid, demethylsecologanol, 9α-hydroxypinoresinol, pinoresinol 4-*O*-glucoside, (7*R*,8*R*)-*threo*-4,7,9,3′,9′-pentahydroxy-3-methoxy-8-*O*-4′-neolignan, linarin, trilinolein 및 bis(2-ethylhexyl)phthalate 등은 인동으로부터 처음으로 분리된 화합물들임을 알았다.

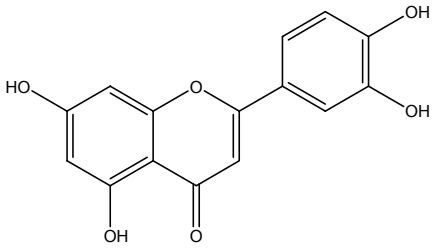
금은화의 hexane 및 CH_2Cl_2 분획은 TLC pattern이 동일하므로 CH_2Cl_2 분획을 chromatography를 반복 실시하여 화합물 **1**은 *n*-alkane 인 *n*-nonacosane으로, 화합물 **2**는 인동에서 분리된 *n*-hexacosanol임을 밝혔다. 화합물 **3**은 인동으로부터 분리한 trilinolein과 유사한 acylglycerol로 NMR에 의해 monoacyl glycerol로 확인하였으며, palmitic acid가 ester결합하고 있는 monopalmitin[61,88]으로 확인하였다. EtOAc 분획으로부터 β-sitosterol (**4**) 및 이의 glucoside인 daucosterol (**5**)을 분리 확인하였으며, 화합물 **6**은 식물에서 흔히 분리되는 flavone성분인 luteolin[1] 임을 확인하였으며, 화합물 **7**은 δ 6.17 과 7.77에서 각각 doublet (J = 9.4 Hz)로 나타나는 전형적인 coumarin의 H-3 및 4의 signal들이 나타나며, 2개의 aromatic proton들이 각각 singlet로 나타나고 있으므로 esculetin[89]으로 결정할 수 있었다. 화합물 **8**은 simple phenolic acid인 protocatechuic acid (**8**)[90] 임을 알았으며, 화합물 **9**는 ^{13}C-NMR에서 δ 26.0, 30.1, 34.9 및 177.7에서 signal들이 나타나고 있으나, EIMS에서는 *m/z* 171 $[M - OH]^+$이 나타나고 있는 것으로 보아 탄소 9개로 구성된 diacid로 추정하였으며 문헌조사 결과 azelaic acid (**9**)[91] 로 결정하였다.



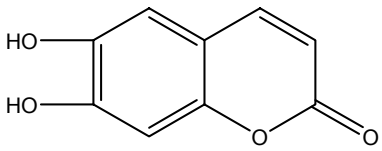
Monopalmitin (**3**)



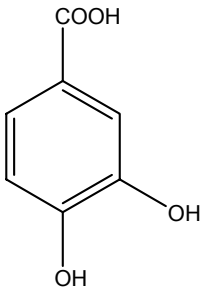
Azelaic acid (**9**)



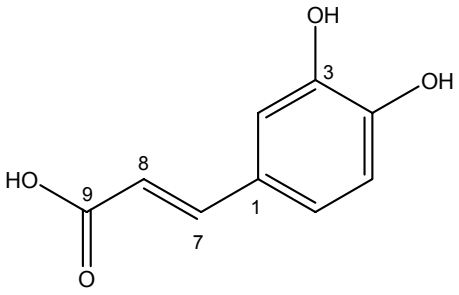
Luteolin (**6**)



Esculetin (**7**)

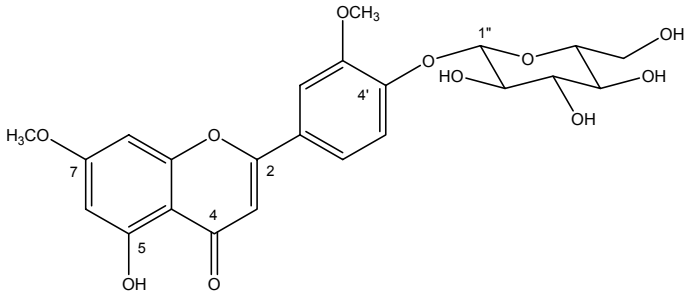


Protocatechuic acid (8)

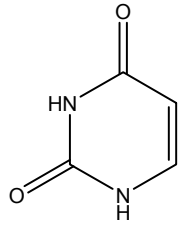


Caffeic acid (10)

화합물 10은 caffeic acid로 결정하였다. 화합물 11은 flavonoid정색반응에서 양성이며 269 (4.30) 와 335 (4.30) nm에서 각각 band II와 I이 나타나는 것으로 보아 flavone glycoside로 추정되었다. NaOAc를 가하여 측정하였을 때도 MeOH용액과 같은 spectrum을 나타내고 있으므로 C-7에는 OH는 없고, 5-OH가 존재하는 것으로 확인되었다. ^{1}H-NMR을 보면 δ 3.87과 3.90에서 2개의 OCH_3 과 C-5, 7, 3′ 및 4′가 치환되어 있음을 확인할 수 있었다. Anomeric H이 δ 5.07에서 J = 6.9 Hz의 doublet로 나타나고 있음으로 glucose는 β 결합하고 있음을 알았다. FABMS에서 *m/z* 499와 477에서 각각 $[M + Na]^+$와 $[M + H]^+$이 나타나고, EIMS에서 aglycon에 해당하는 이온이 *m/z* 314에서 base peak로 나타나고 있으며 rDA분해에 의한 $[A_1 + H]^+$과 $[B_2]^+$, $[B_1]^+$ 등의 fragment ion들이 각각 *m/z* 167, 151 및 148에서 나타나고 있으므로 A, B ring에 각각 하나의 OCH_3 group이 존재함을 알았다. ^{13}C-NMR data를 해석하여 이 화합물 11은 5,4′-dihydroxy-7,3′-dimethoxyflavone 4′-glucoside 인 flavoyadorinin-B[92,93]임을 확인하였다. 화합물 19, 20, 23 및 25도 flavonoid 배당체들임을 알았다.



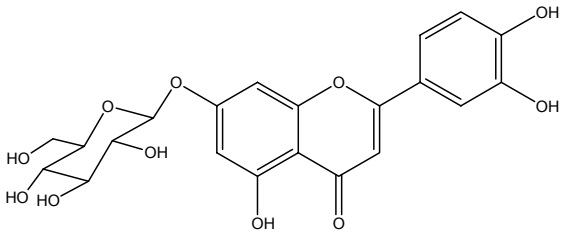
Flavoyadorinin-B (11)



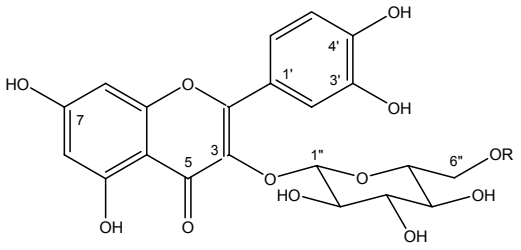
Uracil (18)

화합물 19는 254, 349 nm에서 각각 band II 및 I이 나타나므로 flavone 골격임을 추정하였으며, shift reagent에 의한 흡수밴드들의 변화를 검토하여 C-5, 3′, 4′ 위치에 유리 OH가 존재함을 알았다. FABMS에서 *m/z* 449에서 $[M + H]^+$와 glucose가 떨어져서 생성된 $[(M + H) - 162]^+$이 *m/z* 287에서 나타나고 있다. 따라서 이 화합물은 luteolin 7-*O*-glucoside[1] 임을 추정하였으며, NMR data로도 이를 확인하였다. 화합물 25도 268, 338 nm에서 각각 band II 및 I이 나타나므로 flavone 골격임을 추정하였으며, shift reagent에 의한 흡수밴드들의 변화를 검토하여 C-5, 4′ 위치에 유리 OH가 존재함을 알았다. FABMS에서 *m/z* 601와 579에서 각각 $[M + Na]^+$ 와 $[M + H]^+$이 나타나고, *m/z* 271에서 rhamnose 및 glucose가 떨어져서 생성된 $[(M + H) - 146 - 162]^+$이 나타나고 있다. ^{13}C-NMR

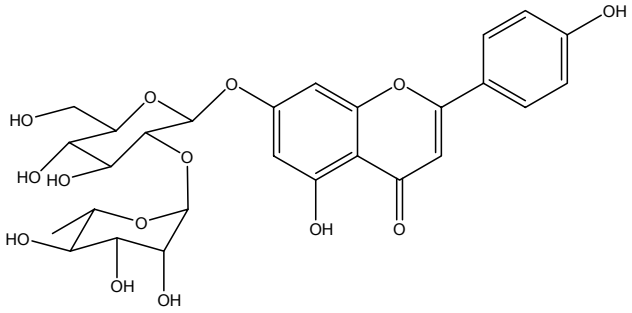
spectrum을 보면 말단당에 기인하는 rhamnose signal 들이 각각 δ 101.0 (C-1), 71.4 (C-2), 72.2 (C-3), 74.0 (C-4), 70.0 (C-5), 18.3 (C-6)에서 나타나며, glucose에 해당하는 signal들이 δ 99.8 (C-1), 79.1 (C-2), 78.3 (C-3), 72.2 (C-4), 79.1 (C-5), 62.4 (C-6) 등에서 나타나고 있다. Glucose의 anomeric carbon signal이 δ 99.8에서 나타나 고자장 이동하였으며, glucose의 C-2 signal이 δ 79.1에서 나타나 저자장 이동하였으므로 말단당인 rhamnose가 glucose의 C-2 OH에 결합되어 있는



Luteolin 7-*O*-glucoside **(19)**

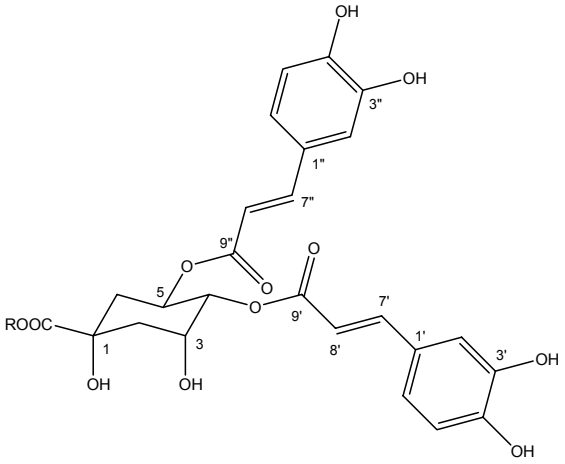


Rutin **(20)** R= Rhamnose
Isoquercitrin **(23)** R= H

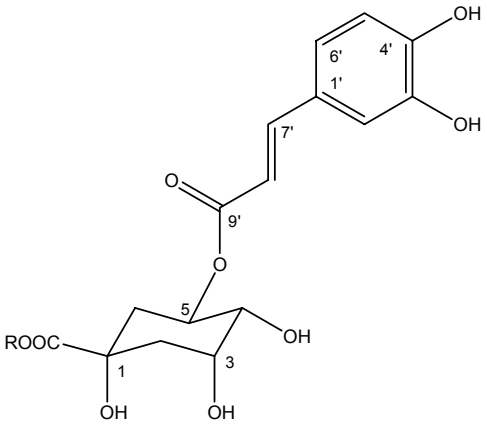


Rhoifolin **(25)**

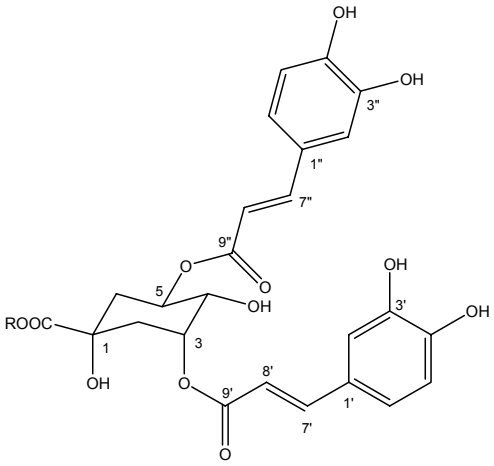
neohesperidose임을 알았으며 이 neohesperidose가 apigenin의 C-7 OH에 결합되어 있음을 알았으므로 이 화합물은 apigenin 7-neohesperidoside 즉 rhoifolin[1] 으로 결정하였다. 화합물 **20**과 **23**은 UV data 및 shift reagent에 의한 흡수밴드들의 변화를 검토하여 aglycon이 quercetin이고 이의 C-3 OH에 glucose + rhamnose 및 glucose가 결합되어 있는 것으로 추정되었다. 화합물 **20**은 식물에서 흔히 그 존재가 확인되는 rutin이며, 화합물 **23**은 quercetin 3-*O*-glucoside 즉 isoquercitrin[1] 임을 알았다. 화합물 **12**, **14**, **21**, **22**, **24** 및 **29** 등 6종의 화합물들은 chlorogenic acid 및 이의 dicaffeoyl ester들임을 추정할 수 있었으며, 특히 화합물 **14**, **21** 및 **22** 등은 대략 δ_H 3.70 및 δ_C 53.0에서 나타나고 있는 NMR signal의 확인으로 쉽게 **12**, **24** 및 **29**의 methyl ester임을 알았다. 특히 금은화 성분중 주성분으로 알려진 chlorogenic acid (**29**)[94,95] 및 이의 methyl ester (**22**)[96]는 쉽게 확인이 되었으며, dicaffeoyl ester들은 결합위치에 있는 proton 및 carbon chemical shift 값 및 coupling constant (*J*) 값으로 으로 결합위치를 결정할 수 있었다. 그 결과 4,5-dicaffeoylquinic acid (**12**)[97] 및 이의 methyl ester (**14**)[50], 3,5-dicaffeoylquinic acid (**24**)[97] 및 이의 methyl ester (**21**)를 각각 확인할 수 있었다.



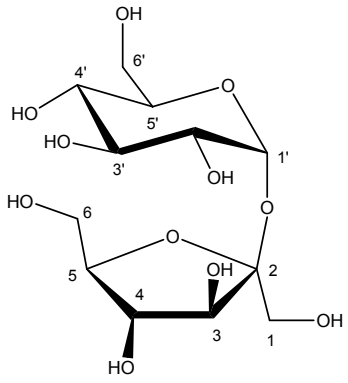
4,5-Dicaffeoylquinic acid **(12)** R= H
4,5-Dicaffeoylquinic acid
methyl ester **(14)** R= CH_3



Methyl chlorogenate **(22)** R= CH_3
Chlorogenic acid **(29)** R= H



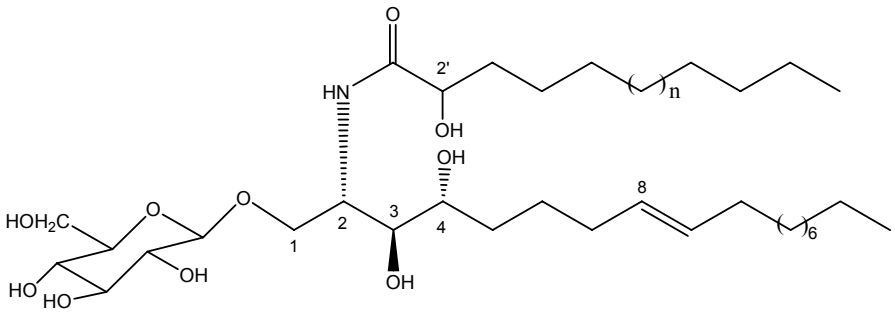
3,5-Dicaffeoylquinic acid
methyl ester **(21)** R= CH_3
3,5-Dicaffeoylquinic acid **(24)** R= H



Sucrose **(27)**

화합물 **13**은 ^{1}H-NMR spectrum상의 고자장에서 나타나고 있는 long-chain에 기인하는 signal들과 중간영역에서 나타나고 있는 당 및 oxygenated methine signal, 저자장 (δ_H 8.60)에서 doublet (J = 9.2 Hz)로 특징적으로 나타나는 amide proton등이 나타나는 것으로 보아 phytosphingosine type의 cerebroside 임을 알 수 있었으며, FABMS data와 가수분해로 얻어지는 glucose 및 지방산들이 확인되므로 long-chain base의 구조는 (2*S*,3*S*,4*R*,8*E*)-2-amino]-8-octadecene-1,3,4-triol이며 이의 C-1에 glucose, 2-hydroxy fatty acid들인 docosanoic acid (C_{22}), tricosanoic (C_{23}), tetracosanoic (C_{24}), pentacosanoic (C_{26}) 등이 amino group에 amide 형태로 결합되어 있음을 알았다. 따라서 화합물 **13**은 1-*O*-β-D-glucopyranosyl-(2*S*,3*S*,4*R*,8*E*)-2-[(2*R*)-2-hydroxy(tricosanoyl, tetracosanoyl, pentacosanoyl, docosanoyl)

amino]-8-octadecene-1,3,4-triol[98] 로 결정하였다. Kumar등[13]은 금은화로부터 4종의 ceramide와 2

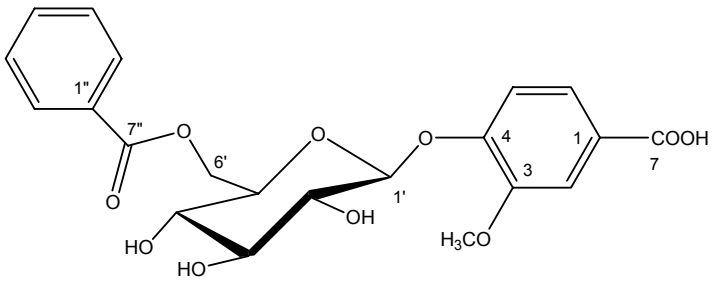


n= 13 - 16

Cerebroside (13)

종의 cerebroside를 분리하여 보고한 바 있다. 이들 화합물들의 long-chain base는 모두 1,3,5,6-tetra hydroxy-2-amino-9(*E*)-hexacosene (octacosene, tetracosene) 들로 화합물 13과는 상이한 화합물들임을 알았다.

화합물 15의 분자식은 $C_{21}H_{22}O_{10}$ 임을 HR-FABMS를 측정하여 결정하였으며, IR spectrum을 보면 3333 (OH), 1706, 1281 (ester C=O) 및 1070 (glycosidic C-O) cm^{-1}에 흡수band들이 나타나므로 phenolic 배당체임을 추정할 수 있어 가수분해하여 glucose를 확인하였다. ^{1}H-NMR을 보면 하나의 OCH_3 에 기인하는 signal이 δ 3.87에서 나타나며 δ 7.42 (1H, dd, *J* = 1.8, 8.4 Hz, H-6), 7.57 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, H-2) 및 7.13 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-5)에서 ABX type의 aromatic proton들이 나타나고, benzoyl group에 해당하는 signal들이 δ 7.47 (2H, tt, *J* = 1.5, 7.5 Hz, H-3, 5), 7.61 (1H, tt, *J* = 1.8, 7.2 Hz, H-4) 및 7.99 (2H, tt, *J* = 1.5, 7.2 Hz, H-2, 6)에서 나타나며 glucose의 anomeric H가 δ 5.06에서 *J* = 7.8 Hz의 doublet로 나타나고 있으므로 glucose는 β결합하고 있음을 알았다. 또한 glucose의 H-6가 δ 4.39 (1H, dd, *J* = 7.5, 11.7 Hz)와 4.71 (1H, dd, *J* = 2.1, 11.7 Hz)에서 나타나 저자장 이동하였으므로 이 위치에 acyl group이 있음을 알았다. 두 개의 acyl group은 benzoic



Vanillic acid 4-*O*-β-D-(6-*O*-benzoylglucopyranoside) (15)

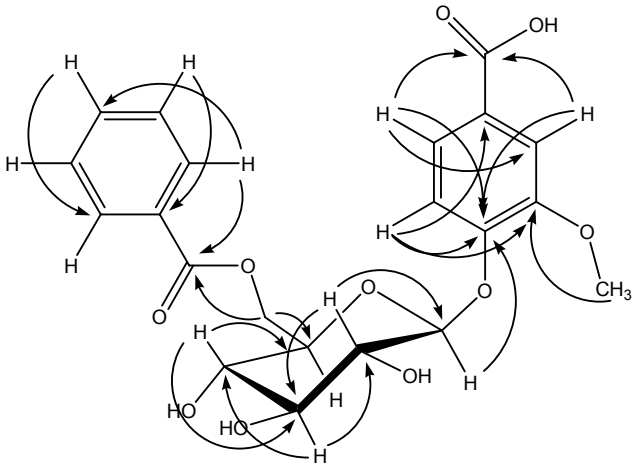
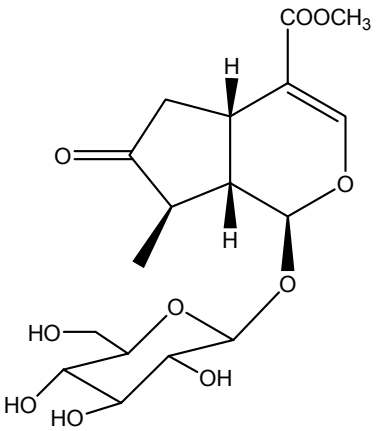
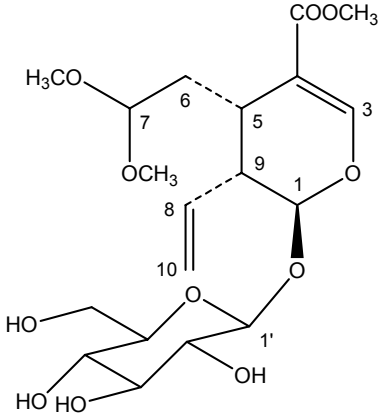


Fig. 8. Key HMBC correlations of vanillic acid 4-*O*-β-D-(6-*O*-benzoylglucopyranoside) **(15)**

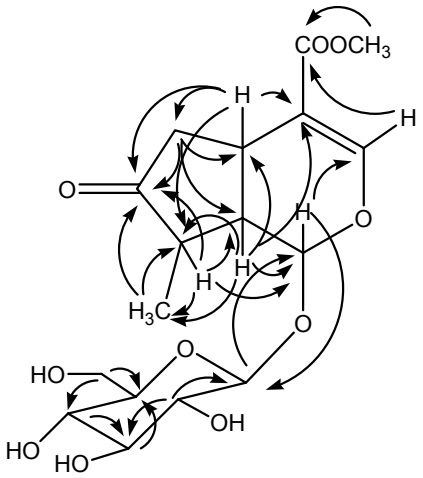
acid와 vanillic acid임을 확인하였다. 이와 같은 사실은 ^{13}C-NMR 및 FABMS로도 확인이 되었으므로 이 화합물은 glucose의 C-1 및 C-6에 benzoic acid와 vanillic acid가 ester결합 또는 ether결합하고 있음을 알고 결합위치를 결정하기 위하여 HMBC data를 이용하였다. 즉 Fig. 8에서 볼 수 있는 바와 같이 glucose의 anomeric 및 H-6 proton들이 각각 vanillic acid의 C-4 및 benzoic acid의 C=O와 correlation하고 있으므로 화합물 **15**는 vanillic acid 4-*O*-β-D-(6-*O*-benzoylglucopyranoside)[99-101]로 결정하였다. 이 화합물은 지금까지 보고된 바 없는 신물질임을 알았다. 화합물 **16**, **17**, **26** 및 **28**은 모두 iridoid계열의 추정되었다. 즉 인동으로부터 얻은 loganin과 매우 유사한 분광학적 특성을 보여 주고 있다. 화합물 **16**은 FABMS에서 *m/z* 411 $[M + Na]^+$, 389 $[M + H]^+$ 및 227 $[(M + H) - 162]^+$에서 fragment ion들이 나타나며, δ 217.5에서 C=O의 특징적인 signal이 나타나고 있는 것으로 7-ketologanin 으로 추정할 수 있다. 이 화합물의 HMBC spectrum을 해석하여 Fig. 9에 나타낸 바와



7-Ketologanin **(16)**



Secologanin dimethyl acetal **(17)**



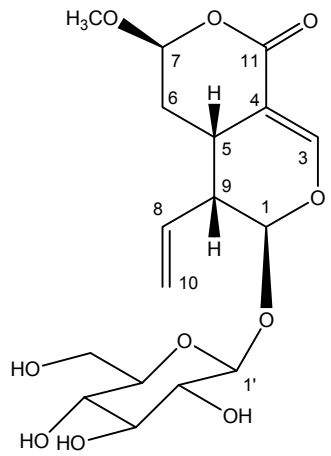
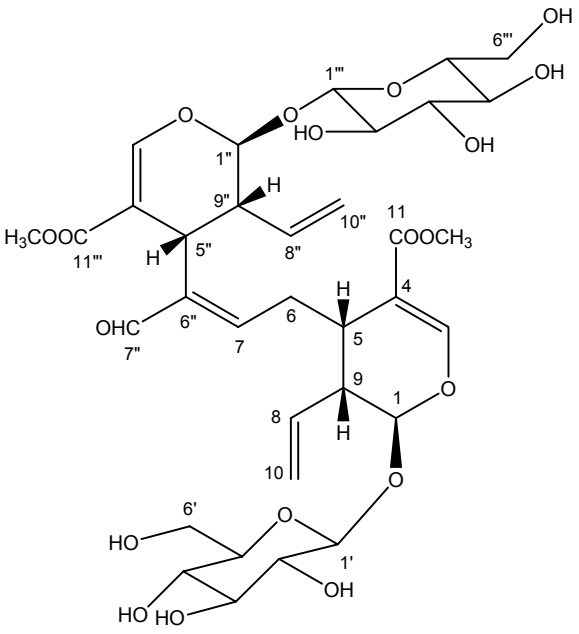


Fig. 9. Key HMBC correlations of **16**

Epivogeloside (**28**)

같이 C-7에 C=O가 결합되어 있음을 확인하여 화합물 **16**은 7-ketologanin[96]으로 결정하였다. 화합물 **17**은 인동에서 분리한 secologanin dimethyl acetal 임을 직접적으로 대조하여 확인하였으며, 화합물 **28**은 δ_C 167.5에서 lactone C=O의 특징적인 signal이 나타나고 하나의 acetal proton이 δ_H 5.33에서, acetal carbon이 δ_C 103.3에서 나타나며 OCH_3 [δ_H 3.51; δ_C 57.0] signal이 나타나는 것 등으로 epivogeloside[96]로 결정할 수 있었다. 화합물 **26**은 FABMS에서 $[M + Na]^+$ 및 $[M + H]^+$이 각각 *m/z* 781과 759에서 나타나며 이로부터 하나의 glucose가 탈리되어 생성된 이온들이 각각 *m/z* 619 $[(M + Na) - 162]^+$과 597 $[(M + H) - 162]^+$에서 2 mole의 glucose가 탈리되어 *m/z* 435 $[(M + H) - (2 \times 162)]^+$에서 fragment ion들이 나타나고 있어 secoiridoid 2 unit가 결합되어 있는 iridoid로 추정할 수 있다. NMR spectrum에서도 secoiridoid의 특징적인 signal들이 2 set씩 나타나고 있는 것을 확인할 수 있었으며 두 unit의 결합은 Fig. 10에 나타낸 바와 같이 HMBC spectrum을 해석하여 확정하였다. 이상의 결과를 종합하여 이 물질은 (*E*)-aldosecologanin[102,103]으로 확정하였다. 이 물질은 금은화 이외에 *Erythraea centaurium*으로부터 처음으로 분리 보고[104]된 바 있으며, 최근에는 *Kissenia capensis*[105] 로부터도 확인 되었다. 이 외에도 화합물 **18**은 uracil, 화합물 **27**은 sucrose로 확인하였다. 이상에서 기술한 바와 같이 금은화의 성분으로 총 29종의 화합물들을 단리하여 구조를 구명하였으며, 이들을 화합물 군으로 대별하면 6종씩의 flavonoid 및 chlorogenic acid, 4종의 iridoid, 1종의 coumarin 및 기타 성분으로 분류할 수 있었다. 금은화로부터 분리한 29종의 화합물중 신물질인 vanillic acid 4-*O*-β-D-(6-*O*-benzoylglucopyranoside)을 포함하여 *n*-nonacosane, *n*-hexacosanol, monopalmitin, flavoyadorinin-B, rhoifolin, 7-ketologanin, esculetin, azelaic acid, uracil, cerebroside 및 sucrose 등은 처음으로 분리된 화합물들임을 확인하였다. 이를 아래에 도표로 나타내었다.



(*E*)-Aldosecologanin (26)

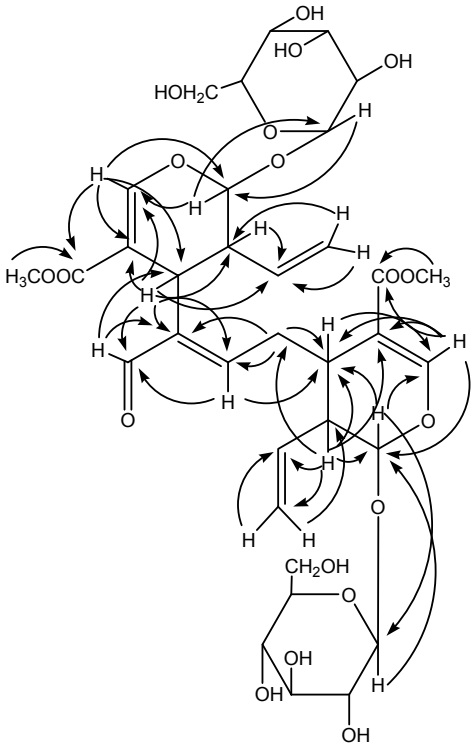


Fig. 10. Key HMBC correlations of **26**

	인동	금은화	계
분리한 화합물 총수	34	29	63
신물질 수	1	1	2
인동/금은화로부터 처음 분리한 화합물 수	28	11	39
기지 화합물 수	5	17	22

제5장 제1세부연구개발과제의 연구성과

5.1 활용성과

총괄과제명	한약재의 생리활성성분의 분리 및 분석연구(금은화, 인동)
총괄과제책임자	강삼식 / 서울대학교 / 천연물화학

가. 연구논문

나. 학술발표

번호	발표제목	발표형태	발표자	학회명	연월일	발표지	국내/국제
1	Inhibitory Effects of Ochnaflavone on the Proliferation of HCT-15 Human Colon Cancer Cells	포스터	Kang You-Jin, Kim Yeong Shik, Kang Sam Sik, Lee Sang Kook	대한약학회	2008. 10. 23-24	대한약학회 총회 및 학술대회 프로시딩	국내
2	Induction of cell cycle arrest and apoptosis mediated by ochnaflavone in human colon cancer cells	포스터	강유진, 김영식, 강삼식, 이상국	한국생약학회	2008. 6. 18-20	The 4th KSP-JSP-CCTCNM Joint Symposium on Pharmacognosy	국내
3	Growth inhibition and S phase cell cycle arrest mediated by methyl caffeate isolated from the extract of *Lonicera japonica* in human hepatocellular carcinoma cells	포스터	홍지영, 민혜영, 김영식, 강삼식, 이상국	한국생약학회	2008. 6. 18-20	The 4th KSP-JSP-CCTCNM Joint Symposium on Pharmacognosy	국내
4	Constituents from the Vines of *Lonicera japonica*	포스터	연민혜, 김주선 강삼식	대한약학회	2008. 4.30-5.3	Proceedings of the Spring International Convention	국내
5	Constituents from the Flowers of *Lonicera japonica*	포스터	이은주, 김주선, 강삼식	대한약학회	2008. 4.30-5.3	Proceedings of the Spring International Convention	국내
6	Constituents from the Aerial Parts of *Lonicera japonica*	포스터	이은주, 연민혜, 김주선, 강삼식	대한약학회	2007. 11.7-8	Proceedings of the Convention of the Pharmaceutical Society of Korea	국내

번호	발표제목	발표형태	발표자	학회명	연월일	발표지	국내/국제
7	Studies of the Constituents from the Flower Buds of *Lonicera japonica*	포스터	이은주, 김주선, 강삼식	1st Euro-Mediterranean Conference on Marine Natural Products	2008. 10.31-11.4	Proceedings of the 1st Euro-Mediterranean Conference on Marine Natural Products	국제
8	A New Arylnaphthalene Lignan Isolated from the Vines of *Lonicera japonica*	포스터	연민혜, 김주선 강삼식	1st Euro-Mediterranean Conference on Marine Natural Products	2008. 10.31-11.4	Proceedings of the 1st Euro-Mediterranean Conference on Marine Natural Products	국제

다. 지적재산권

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

라. 정책활용

인동, 금은화의 품질평가를 위한 기초자료 제공으로 대한약전 등 개정시 기준시험법 등에 반영

마. 타연구/차기연구에 활용

· 제1세부과제에서 분리한 성분들을 제2세부과제와 효능분석팀에 제공하여 연구에 활용하였음. · 약효, 독성, 임상 등 관련 학문분야의 실험을 위한 기초자료로 활용 · 한약재의 활성성분에 대한 high throughput screening을 위한 기반기술 확보 · 한약재의 dereplication을 위한 기반기술 확보

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

없음

제7장 참고문헌

1. Kun Ho Son, Jung Ok Park, Kyu Charn Chung, Hyeun Wook Chang, Hyun Pyo Kim, Ju Sun Kim, Sam Sik Kang: *Arch. Pharm. Res.*, **15**, 365-370 (1992)
2. Kun Ho Son, Ju Sun Kim, Sam Sik Kang, Hyun Pyo Kim, Hyeun Wook Chang: *Kor. J. Pharmacogn.*, **25**, 24-27 (1994)
3. Neeraj Kumar, Bikram Singh, Pamita Bhandari, Ajai P. Gupta, Sanjay K. Uniyal, Vijay K. Kaul: *Phytochemistry*, **66**, 2740-2744 (2005)
4. Zheng-Ming Qian, Hui-Jun Li, Ping Li, Jun Chen, Dan Tang: *Biomed. Chromatogr.*, **21**, 649-654 (2007)
5. Song Jin Lee, Eun Joo Shin, Kun Ho Son, Hyeun Wook Chang, Sam Sik Kang, Hyun Pyo Kim: *Arch. Pharm. Res.*, **18**, 133-135 (1995)
6. Hideaki Kawai, Masanori Kuroyanagi, Akira Ueno: *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 3664-3666 (1988)
7. Lamberto Tomassini, M. Francesca Cometa, Mauro Serafini, Marcello Nicoletti: *J. Nat. Prod.,* **58**, 1756-1758 (1995)
8. Koichi Machida, Hiromi Sakaki, Takeyoshi Iijima, Masao Kikuchi: *Chem. Pharm. Bull.*, **50**, 1041-1044 (2002)
9. Kun Ho Son, Keun Young Jung, Hyeun Wook Chang, Hyun Pyo Kim, Sam Sik Kang: *Phytochemistry*, **35**, 1005-1008 (1994)
10. Wie Jong Kwak, Chang Kyun Han, Hyeun Wook Chang, Hyun Pyo Kim, Sam Sik Kang, Kun Ho Son: *Chem. Pharm. Bull.*, **51**, 333-335 (2003)
11. Shoji Yahara, Naomi Kobayashi, Toshihiro Nohara: *Shoyakugaku Zasshi*, **44**, 339-342 (1990)
12. Hideaki Kawai, Masanori Kuroyanagi, Kaoru Umehara, Akira Ueno, Motoyoshi Satake: *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 4769-4775 (1988)
13. Neeraj Kumar, Bikram Singh, Ajai P. Gupta, Vijay K. Kaul: *Tetrahedron*, **62**, 4317-4322 (2006)
14. Li-Yan Peng, Shuang-Xi Mei, Bei Jiang, Hong Zhou, Han-Dong Sun: *Fitoterapia*, **71**, 713-715 (2000)
15. Rie Kakuda, Mio Imai, Koichi Machida, Yasunori Yaoita, Masao Kikuchi: *Nat. Med.*, **54**, 314-317 (2000)
16. Rong Wei Teng, De Zu Wang, Chang Xiang Chen: *Chin. Chem. Lett.*, **11**, 337-340 (2000)
17. Chang Xiang Chen, Wang Wei-Wei, Ni Wei, Chen Neng-Yu, Zhou Jun: *Acta Bot. Yun.*, **22**, 201-208 (2000)
18. Lou Hong Xiang, Lang Wei Jun, Lu Mu Jiam: *Zhongcaoyao*, **27**, 195-199 (1996)
19. Lou Hong Xiang, Tian Jinuo, Yuan Huiqing, Ji Mei: *Chin. J. Med. Chem.*, **5**, 208-210 (1995)
20. W.-C. Chang, F.-L. Hsu: *Prostagalandins Leuko. Essent. Fatty Acids*, **45**, 307-312 (1992)
21. Yue Song, Song-Lin Li, Meng-Hua Wu, Hui-Jun Li, Ping Li: *Anal. Chim. Acta*, **564**, 211-218 (2006)

22. Youyuan Peng, Fanghua Liu, Jiannong Ye: *Electroanalysis*, **17**, 356-362 (2005)
23. 정규찬, 권동렬, 백석환, 김상환, 장현욱: 약학회지, **32**, 328-333 (1988)
24. Huang Xiong, Li Song-Lin, Li Ping, Li Hui-Jun, Chai Xing-Yun, Song Yue: *Acta Pharm. Sin.*, **40**, 285-288 (2005)
25. Nobuo Ikeda, Masakazu Ishihara, Tomoyuki Tsuneya, Masayuki Kawakita, Masaaki Yoshihara: *Flavour & Fragrance J.*, **9**, 325-331 (1994)
26. Chun-Whan Choi, Hyun Ah Jung, Sam Sik Kang, Jae Sue Choi: *Arch. Pharm. Res.*, **30**, 1-7 (2007)
27. Hui-Jun Li, Ping Ki, Wen-Cai Ye: *J. Chromatogr.* A, **1008**, 167-172 (2003)
28. Hui-Jun Li, Ping Li: *Chin. Pharm. J.*, **41**, 818-819 (2006)
29. Rie Kakuda, Mio Imai, Yasunori Yaoita, Koichi Machida, Masao Kikuchi: *Phytochemistry*, **55**, 879-881 (2000)
30. Jun Chen, Yue Song, Ping Li: *J. Chromatgr.* A, **1157**, 217-226 (2007)
31. Xing-Yun Chai, Song-Lin Li, Ping Li: *J. Chromatogr.* A, **1070**, 43 (2005)
32. Zheng-Ming Qian, Hui-Jun Li, Ping Li, Mei-Ting Ren, Dan Tang: *Chem. Pharm. Bull.*, **55**, 1073-1076 (2007)
33. Zheng-Ming Qian, Su-Juan Qin, Hui-Jun Li, Ping Li, Xiao-Dong Wen: *Biomed. Chromatogr.*, **22**, 202-206 (2008)
34. Weixia Song, Shuai Li, Sujuan Wang, Yan Wu, Jiachen Zi, Maoluo Gan, Yanking Zhang, Mingtao Liu, Sheng Lin, Yongchun Yang, Jiangong Shi: *J. Nat. Prod.*, **71**, 922-925 (2008)
35. 문태철, 박정옥, 정광원, 손건호, 김현표, 강삼식, 장현욱, 정규찬: 약학회지, **43**, 117-123 (1999)
36. Jun Hyuk Lee, Woo Shin Ko, Young Hee Kim, Ho Sung Kang, Han Do Kim, Byung Tae Choi: *Int. J. Mole. Med.*, **7**, 79-83 (2001)
37. Song Jin Lee, Kun Ho Son, Hyeun Wook Chang, Sam Sik Kang, Pyeong-uk Park, Wie-jong Kwak, Chang-kyun Han, Hyun Pyo Kim: *Kor. J. Pharmacogn.*, **25**, 363-367 (1994)
38. S. J. Lee, K. H. Son, H. W. Chang, S. S. Kang, H. P. Kim: *Phytother. Res.*, **12**, 445-447 (1998)
39. S. J. Lee, J. H. Choi, K. H. Son, H. W. Chang, S. S. Kang, H. P. Kim: *Life Sci.*, **57**, 551-558 (1995)
40. 정대영, 이호영, 하혜경, 정다영, 강삼식, 김정숙: 생약학회지, **34**, 256-262 (2003)
41. Sung Yong Kim, Kun Ho Son, Hyeun Wook Chang, Sam Sik Kang, Hyun Pyo Kim: *Arch. Pharm. Res.*, **22**, 313-316 (1999)
42. Myung Woo Byun, Cheorun Jo, Tae Woong Jeon, Cheul Hee Hong: *Lebens.-Wiss. u.-Technol.*, **37**, 29-33 (2004)
43. He-Zhen Wu, Jing Luo, Yan-Xia Yin, Qun Wei: *Acta Pharmacol. Sin.*, **25**, 1685-1689 (2004)
44. Jin-A Kim, Dae-Ki Kim, Ok-Hwa Kang, Yeon-A Choi, Hye-Jung Park, Suck-Chei Choi, Tae-Hyun Kim, Ki-Jung Yun, Yong-Ho Nah, Young-Mi Lee: *Int. Immunopharmacol.*, **5**, 209-217 (2005)
45. Henry Wing-Cheung Leung, Chun-Hsiung Wu, Chia-Hsien Lin, Hong-Zin Lee: *Eur. J. Pharmacol.*, **508**, 77-83 (2005)

46. Seok-Jong Suh, Tae-Wook Chung, Min-Jung Son, Sung-Hoon Kim, Tae-Chul Moon, Kun-Ho Son, Hyun Pyo Kim, Hyeun Wook Chang, Cheorl-Ho Kim: *Arch. Biochem. Biophys.*, **447**, 136-146 (2006)
47. Min-Jung Son, Tae-Chul Moon, Eun-Kyung Lee, Kun-Ho Son, Hyun Pyo Kim, Sam Sik Kang, Jong Keun Son, Seung Ho Lee, Hyeun Wook Chang: *Arch. Pharm. Res.*, **29**, 282-286 (2006)
48. S. Thanabhorn, K. Jaijoy, S. Thamaree, K. Ingkaninan, A. Panthong: *J. Ethnopharmacol.*, **107**, 370-373 (2006)
49. Hye-Jung Yoo, Hyun-Jung Kang, Yun Seon Song, Eun-Hee Park, Chang-Jin Lim: *J. Pharm. Pharmacol.*, **60**, 779-786 (2008)
50. Rie Kakuda, Yasunori Yaoita, Koichi Machida, Masao Kikuchi: *J. Tohoku Pharm. Univers.*, **47**, 55-60 (2000)
51. Hong-Feng Luo, Qinglin Li, Shanggong Yu, Thomas M. Badger, Nianbai Fang: *J. Nat. Prod.*, **68**, 94-97 (2005)
52. Junichi Kitajima, Kaoru Kimizuka, Yasuko Tanaka: *Chem. Pharm. Bull.*, **46**, 1408-1411 (1998)
53. James P. Kutney, Günter Eigendorf, Brian R. Worth, John W. Rowe, Anthony H. Conner, Bhimsen A. Nagasampagi: *Helv. Chim. Acta*, **64**, 1183-1207 (1981)
54. G. Falsone, F. Cateni, E. Vrech, L. Birkofer, V. Lucchini, H. Wagner, O. Seligmann, L. Coassini Lokar: *Z. Naturforsch.*, **49B**, 1297-1304 (1994)
55. L. John Goad, Toshihiro Akihisa: "Analysis of Sterols", Blackie Academic & Professional, London, pp. 396, 397, 398 (1997)
56. Ju Sun Kim, Yoon Jung Kim, Joo Young Lee, Sam Slk Kang: *Kor. J. Pharmacogn.*, **39**, 28-36 (2008)
57. Lai-King Sy, Geoffrey D. Brown: *Phytochemistry*, **50**, 781-785 (1999)
58. H. M. T. B. Herath, R. S. Dassanayake, A. M. A. Priyadarshani, Susila de Silva, G. P. Wannigama, Joanne Jamie: *Phytochemistry*, **47**, 117-119 (1998)
59. Sam Sik Kang, Chang Min Kim: *Arch. Pharm. Res.*, **10**, 67-68 (1987)
60. Simon Gibbonsa, K. T. Mathewb, Alexander I. Gray: *Phytochemistry*, **51**, 465-467 (1999)
61. 강삼식, 손건호: 천연물성분 구조결정법, 서울대학교 출판부, 서울 (2000)
62. G. Eglinton, D. H. Hunneman, A. McCormick: *Org. Mass Spectrom.*, **1**, 593-611 (1968)
63. M. Habib Oueslati, Hichem Ben Jannet, Zine Mighri, J. Chriaa, Pedro M. Abreu: *J. Nat. Prod.*, **69**, 1366-1369 (2006)
64. Mitsuo Takasugi, Masaki Anetai, Tadashi Masamune: *Chem. Lett.*, 947-950 (1974)
65. Takayuki Nagai, Hiroaki Kiyohara, Kaori Munakata, Tstsuya Shirahata, Toshiaki Sunazuka, Yoshihiro Harigaya, Haruki Yamada: *Int. Immunopharmacol.*, **2**, 1183-1193 (2002)
66. Masaru Kobayashi, Tomoka Tawara, Takashi Tsuchida, Hiroshi Mitsuhashi: *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 3169-3171 (1990)
67. Renzo Rossi, Adriano Caprita, Maria G. Quirici, Carlo Alberto Veracini: *Tetrahedron*, **38**, 639-644 (1982)
68. Werner Herz, Palaniappan Kulanthaivel: *Phytochemistry*, **24**, 89-91 (1985)
69. John H. Cardellina, II, Richard E. Moore: *Tetrahedron*, **36**, 993-996 (1980)

70. Ihsan Calis, Mohamed F. Lahloub, Otto Sticher: *Helv. Chim. Acta*, **67**, 160-165 (1984)
71. Hideaki Kawai, Masanori Kuroyanagi, Akira Ueno: *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 3664-3666 (1988)
72. Noriko Matsuda, Masao Kikuchi: *Tohoku Yakka Daigaku Kenkyu Nempo*, **42**, 109-112 (1995)
73. Mariko Kitajima, Norie Fujii, Fumie Yoshino, Hiroshi Sudo, Kazuki Saito, Norio Aimi, Hiromitsu Takayama: *Chem. Pharm. Bull.*, **53**, 1355-1358 (2005)
74. Hosup Yeo, Young-Won Chin, Shin-Young Park, Jinwoong Kim: *Arch. Pharm. Res.*, **27**, 287-290 (2004)
75. Adriana C. Casabuono, Alicia B. Pomilio: *Phytochemistry*, **35**, 479-483 (1994)
76. Fumiko Abe, Tatsuo Yamauchi: *Phytochemistry*, **27**, 575-577 (1988)
77. Byung-Sun Min, Hui Song Cui, Hyeong-Kyu Lee, Dai-Eun Sok, Mee Ree Kim: *Arch. Pharm. Res.*, **28**, 1023-1026 (2005)
78. Changhong Huo, Hong Liang, Yuying Zhao, Bin Wang, Qingying Zhang: *Phytochemistry*, **69**, 788-795 (2008)
79. Noriko Matsuda, Masao Kikuchi: *Chem. Pharm. Bull.*, **44**, 1676-1679 (1996)
80. Rui-Rui Wang, Qiong Gu, Yun-Hua Wang, Xue-Mei Zhang, Liu-Meng Yang, Jun Zhou, Ji-Jun Chen, Yong-Tang Zheng: *J. Ethnopharmacol.*, **117**, 249-256 (2008)
81. Yu-Liang Yang, Fang-Rong Chang, Yang-Chang Wu: *Helv. Chim. Acta*, **88**, 2731-2737 (2005)
82. Ming-An Ouyang, Yung-Shung Wein, Ren-Kuan Su, Yueh-Hsiung Kuo: *Chem. Pharm. Bull.*, **55**, 804-807 (2007)
83. D. C. Ayres, J. D. Loike: Lignans. Chemical, biological and clinical properties, Cambridge University Press, Cambridge, pp. 216-219 (1990)
84. Valerie Steeves, Hartmut Forster, Ulrich Pommer, Rodney Savidge: *Phytochemistry*, **57**, 1085-1093 (2001)
85. Masataka Sugiyama, Eiko Nagayama, Masao Kikuchi: *Phytochemistry*, **33**, 1215-1219 (1993)
86. Marina Della Greca, Maria Ferara, Antonio Fiorentino, Pietro Monaco, Lucio Previtera: *Phytochemistry*, **49**, 1299-1304 (1998)
87. Jerome Quintin, Guy Lewin: *J. Nat. Prod.*, **67**, 1624-1627 (2004)
88. Dae Sik Jang, Muriel Cuendet, Harry H. S. Fong, John M. Pezzuto, A. Douglas Kinghorn: *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 2218-2222 (2004)
89. T. K. Razdan, B. Qadri, S. Harkar, E. S. Waicht: *Phytochemistry*, **26**, 2063-2069 (1987)
90. Kazuko Sano, Shuichi Sanada, Yoshiteru Ida, Junzo Shoji: *Chem. Pharm. Bull.*, **39**, 865-870 (1991)
91. C. J. Pouchert, J. Behnke: The Aldrich Library of ^{13}C and ^{1}H FT NMR Spectra (Ed. 1), Vol. 1, Aldrich Chemical Company, Inc., p. 772 (1993)
92. Naokazu Ohta, Kazuyoshi Yagishita: *Agric. Biol. Chem.*, **34**, 900-907 (1970)
93. Xiao-Zhong Gao, Chang-Xin Zhou, Shui-Li Zhang, Wei Yao, Yu Zhao: *China J Chin. Mat. Med.*, **30**, 126-128 (2005)
94. Guido F. Pauli, Ulrich Kuczkowiak, Adolf Nahrstedt: *Magn. Reson. Chem.*, **37**, 827-836

(1999)
95. G. F. Pauli, F. Poetsch, A. Nahrstedt: *Phytochem. Anal.*, **9**, 177-185 (1998)
96. Koichi Machida, Junko Asano, Noriko Machida, Masao Kikuchi: *Tohoku Yakka Daigaku Kenkyu Nempo*, **40**, 105-110 (1993)
97. Toshio Satake, Kohei Kamiya, Yin An, Tomomi Oishi, Junichiro Yamamoto: *Biol.. Pharm. Bull.*, **30**, 935-940 (2007)
98. Yoon Jung Kim, Min Hye Yean, Eun Ju Lee, Ju Sun Kim, Je-Hyun Lee, Sam Sik Kang: *Nat. Prod. Sci.*, **14**, 161-166 (2008)
99. Cheng-Bin Cui, Yasuhiro Tezuka, Hiroko Yamashita, Tohru Kikuchi, Hirofumi Nakano, Tatsuya Tamaoki, Jong-Hee Park: *Chem. Pharm. Bull.*, **41**, 1491-1497 (1993)
100. Jurgen Conrad, Bernhard Vogler, Iris Klaiber, Sabine Reeb, Jan-Hirich Guse, Gudrun Roos, Wolfgang Kraus: *Nat. Prod. Lett.*, **15**, 35-42 (2001)
101. X. Yang, Y. Ding, Z.-H. Sun, D.-M. Zhang: *J. Asian Nat. Prod. Res.*, **8**, 505-510 (2006)
102. Koichi Machida, Hiromi Sasaki, Takeyoshi Iijima, Masao Kikuchi: *Chem. Pharm. Bull.*, **50**, 1041-1044 (2002)
103. Hui-Jun Li, Ping Li: *Chin. Pharm. J.*, **41**, 818-819 (2006)
104. Shuzo Takagi, Masae Yamaki, Eizaburo Yumioko, Tadashi Nishimura, Kiyoshi Sakina: *Yakugaku Zasshi*, **102**, 313-317 (1982)
105. Christian Zidorn, Ernst P. Ellmerer, Angela Ziller, Hermann Stuppner: *Biochem. System. Ecol.*, **32**, 761-763 (2004)
106. Kazuyoshi Ohashi, Hisashi Watanabe, Yasuaki Okumura, Tahan Uji, Isao Kitagawa: *Chem. Pharm. Bull.*, **42**, 1924-1926 (1994)
107. Jinsaku Sakakibara, Hiroji Ina, Masaiti Yasue: *Yakugaku Zasshi*, **94**, 1377-1383 (1974)

제8장 첨부서류

제 2 세부연구개발과제 연구결과

세부과제명 : 지표물질 동시 정성정량분석법개발 및 패턴분석

세부과제책임자 : 신종헌/서울대학교 약학대학

제1장 세부연구개발과제의 최종 연구개발 목표

1.1 세부연구개발과제의 목표

1. 연구배경

전통 한방 생약은 그 자체로 오랜 기간 보건복지 분야에 막대한 기여를 하여 왔으나 과학기술의 발달과 더불어 이들에 내포된 비과학적 요소를 제거하고 보다 확고한 과학정보에 기초한 종합적인 약학적 평가가 요구되고 있다. 이러한 연구 및 기술동향을 볼 때에 첨단과학기술에 기초한 생약성분의 규격화, 표준화기술의 도입이 매우 중요하다. 본 연구는 생약에 함유된 활성물질의 실체를 정확히 규명하고 다양한 원산지, 재배방법에 따른 활성물질의 정량 및 정성분석 기술을 표준화하여 천연물 유래 신약개발 기술의 향상에 크게 기여할 것이다.

2. 연구목적

시중에 유통되고 있는 금은화와 인동에 함유된 생약성분의 품질관리를 위하여 정성 및 정량분석을 위한 동시분석법을 개발한다.

3. 연구범위

금은화와 인동에 함유된 생약성분 (각 5종 이상)의 정량 및 정성분석을 위한 크로마토그래피 동시분석법 개발하고 이에 대한 validation을 입증한다. 또한 시판되는 생약시료에 대한 분석과 패턴분석으로 개발방법의 실효성을 입증한다.

1.2 세부연구개발과제의 목표달성도

시중에 유통되고 있는 금은화와 인동시료의 품질관리를 위하여 동시표준분석법 개발에 성공하였다. 금은화와 인동의 HPLC, LC-MS 및 LC-MSMS의 분리조건 확립 및 validation을 입증하였다. 또한 시중에 유통되고 있는 금은화와 인동에 함유된 생약성분의 정성 및 정량분석 그리고 패턴분석을 완료하는 등 당초의 연구목표를 완전히 달성하였다.

1.3 국내·외 기술개발 현황

1) 외국의 경우

천연 생물자원으로부터 생리활성물질을 발견하고 이를 의약품으로 개발하는 연구가 대단히 활발하게 진행되고 있다. 이에 따라 열대우림 등 다양한 환경에 서식하는 생약자원에 대한 정성, 정량 분석과 이들을 분자생물학, 생화학, 약리학 등 신약개발의 후방기술과 접목하는 연구가 매우 왕성하다. 또한 중국, 일본 등 전통약물의 활용도가 매우 높은 인근의 국가들에서는 전통생약의 현대화를 위한 많은 연구가 진행되고 있으며 국제수준의 과학적 성과가 양산되고 있다.

2) 국내의 경우

자생식물을 생약으로 활용하여 온, 세계에서 유례를 찾기 어려운, 오랜 전통에도 불구하고 한방 생약의 대부분은 그 생물학적 기원, 성분 분석, 함량에 대한 정성, 정량적 근거가

미약한 채로 비전문적 지식이 범람하고 있다. 특히 국내의 천연물관련 연구기술이 상당한 수준에 도달해 있음에도 불구하고 의약학과 한약재의 접목은 제대로 이루어지고 있지 못한 실정이다. 이에 따라 식품의약품안정청에서 발주한 본 연구 사업이 이 분야의 국내 최초의 전문연구과제이다.

제2장 세부연구개발과제의 최종 연구개발 내용 및 방법

1. 연구내용

가. HPLC-DAD를 이용하여 금은화, 인동 유래의 생약성분 특히 flavonoid, phenolic compound 그리고 iridoid 성분의 효과적인 분리, 분석방법의 확립

나. 금은화, 인동 유래 활성물질의 벨리데이션 완료

다. LC-MS-MS를 이용한 활성물질들의 동정

라. 금은화, 인동 생약의 규격화를 위하여 활성성분에 대한 다양한 크로마토그래피 조건하에서의 함량분석 기초실험을 완료하고 이를 바탕으로 효율적인 동시 정성 및 정량분석법의 개발 및 이의 실제적인 적용 (5종 이상의 지표성분)

마. 금은화, 인동의 패턴 분석 완료

2. 연구방법

가. 금은화, 인동의 활성성분의 확보 (생약성분의 분리전문 연구진인 제 1세부과제에서 제공)

나. 활성분획의 활성성분을 동시에 5종 이상 정성, 정량적으로 검색할 liquid chromatography 조건의 파악

다. 금은화, 인동 유래 활성물질의 동시분석을 위한 직선성, 특이성, 정밀성, 정확성, 완건성 등 벨리데이션 완료

라. HPLC-MS/MS/를 이용한 금은화, 인동시료에 함유된 활성성분의 동정

마. 금은화, 인동 유래 활성성분의 함량분석을 위한 제반 기초실험

아. 상기 나. 과정에서 개발한 검색방법의 실제적 적용 범위 검증 (20종 이상의 시료에 적용)

자. 상기 아. 과정의 분석 자료를 바탕으로 금은화, 인동의 패턴분석 완료

제3장 세부연구개발과제의 최종 연구개발 결과

1절. 금은화에 함유된 표준성분들의 표준분석법 개발

(1) LC/DAD를 이용한 금은화의 표준분석법 개발

① 표준물질의 선정

금은화에 함유된 phenolic compounds, iridoids, flavonoids 계열의 chlorogenic acid, sweroside, luteolin 7-*O*-glucoside, (*E*)-aldosecologanin 그리고 3,5-dicaffeoylquinic acid등 총 5종을 표준시료로 선정하였다. 각각의 표준시료 약 1~2 mg을 메탄올 1 mL에 녹인 stock solution을 만든 후 원하는 농도로 희석하여 사용하였다.

정확한 정량분석을 위해 내부표준물질은 3,4,5-trimethoxybenzoic acid를 사용하였으며, Fig. 1에 금은화 표준물질들의 구조를 보여주고 있다.

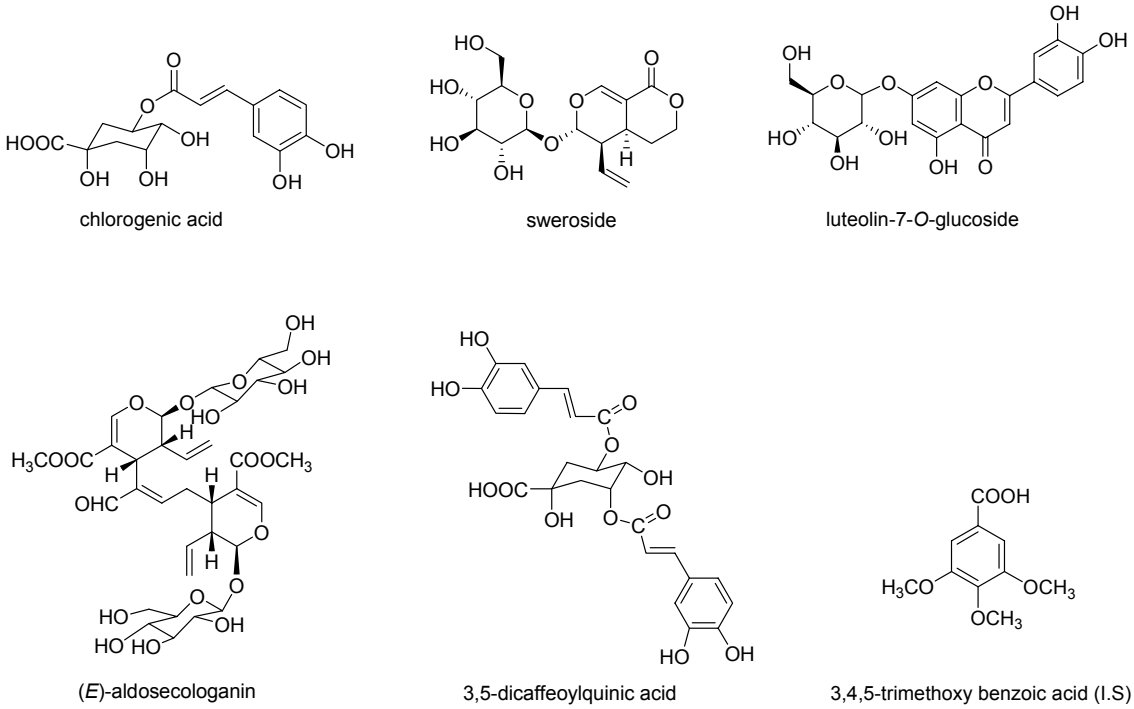


Fig. 1 . Chemical structures of stand ard compound in *Lonicera japo nica* flow ers.

② TLC 분석

선정된 표준물질에 대하여 silica gel plate와 ODS plate에서의 일차적인 분리조건과 개략적 패턴을 분석하였다. 다양한 시도 결과 silica gel plate의 경우 EtOAc : MeOH : H_2O = 8 : 2 : 1의 전개 용매 조건으로 전개하였고 (Fig 2-a), ODS plate의 경우 50% 메탄올을 전개용매로 사용하여 전개하였다 (Fig 2-b). 이때 각 표준물질과 함께 함량분석을 실시할 21종의 소재별 금은화 원시료 또한 동시 전개 하였으며, 발색시약으로 H_2SO_4, $FeCl_3$, I_2를 각각 사용하였다.

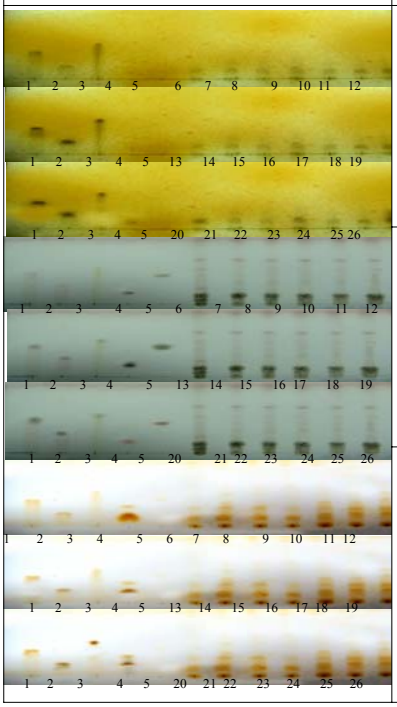
EtOAc : MeOH : H_2O = 8:2:1	Detection reagent	Compounds
	$FeCl_3$	1. 3,5-dicaffeoylquinic acid 2. chlorogenic acid 3. luteolin-7-*O*-glucoside 4. (*E*)-aldosecologanin 5. sweroside 6. Hong-cheon, gang-won 7. Nak-moon, an-dong 8. Go-heung, jeon-nam 9. Yang-yang, gang-won 10. Bong-hwa, gyung book 11. Kyo-yi, gang-reung 12. Bu-yeo, chung nam 13. Geo-jin, go-seong 14. Ui-seong, gyung book 15. Mt. seolak 16. Cheong-song, gyung book 17. Goon-wi, gyung book 18. Ul-jin, gyung book 19. An-dong, gyung book 20. China 21. Mil-hyun (China) 22. An-dong, gyung-book 23. Ha-nam jeong-ju (on-hyun, (China)) 24. Sandong (China) 25. Hanam (China) 26. Sandong (China)
	H_2SO_4	
	I_2	

Fig. 2 -a. TLC pattern an alysis in silica g el plate.

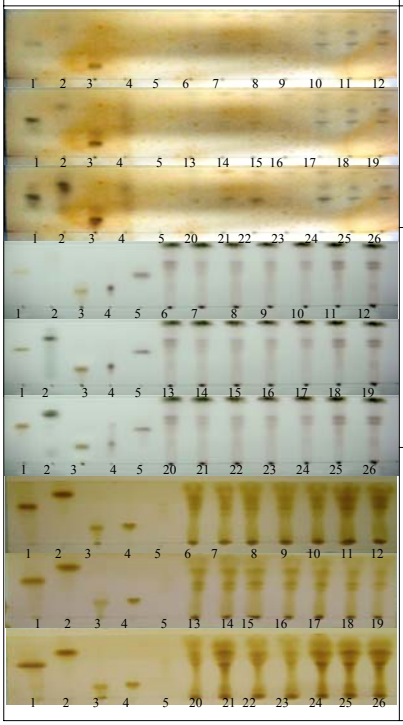
50% MeOH	Detection reagent	Compounds
	$FeCl_3$	1. 3,5-dicaffeoylquinic acid 2. chlorogenic acid 3. luteolin-7-*O*-glucoside 4. (*E*)-aldosecologanin 5. sweroside 6. Hong-cheon, gang-won 7. Nak-moon, an-dong 8. Go-heung, jeon-nam 9. Yang-yang, gang-won 10. Bong-hwa, gyung book 11. Kyo-yi, gang-reung 12. Bu-yeo, chung nam 13. Geo-jin, go-seong 14. Ui-seong, gyung book 15. Mt. seolak 16. Cheong-song, gyung book 17. Goon-wi, gyung book 18. Ul-jin, gyung book 19. An-dong, gyung book 20. China 21. Mil-hyun (China) 22. An-dong, gyung-book 23. Ha-nam jeong-ju (on-hyun, (China)) 24. Sandong (China) 25. Hanam (China) 26. Sandong (China)
	H_2SO_4	
	I_2	

Fig. 2 -b. TLC pattern analysis in ODS plate.

③ HPLC-DAD 조건의 확립

시료 분석을 위한 HPLC는 Agilent 1200 series로서 autosampler, column oven, binary pump, DAD detector (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany), degasser (Agilent Technologies, Tokyo, Japan)를 사용하였으며, software는 Agilent 사의 Chemstation software (Agilent Technologies, Avondale, CA, USA)를 사용하였다. HPLC 조건으로 컬럼 오븐의 온도는 25℃, 분석파장은 250 nm, 유속은 0.3 mL/min를 사용하였고, 컬럼은 Shiseido사의 Capcell Pak ODS UG120 (5 ㎛, 4.6 mm × 150 mm)를 사용하였다. 이동상은 A 용매로서 100% 3차 증류수와 B 용매 100% 아세토니트릴로 각각 0.1% 포름산을 첨가하여 사용하였으며 용매계는 용매기울기 용리로서 Table Ⅰ에 나타내었다.

Table Ⅰ. Solv ent g radient con dition fo r HPLC-DAD

Final ti me (mi n)	Flow ra te (mL/min)	A[a)]	B[b)]
0	0.3	85	15
10	0.3	80	20
30	0.3	65	35
35	0.3	65	35
40	0.3	85	15

[a)] H_2O with 0. 1% formic aci d.

[b)] ac etonitrile with 0. 1% formic aci d.

④ 금은화 시료의 추출방법 비교

금은화 원시료는 자연건조 시켰다가 분말 형태로 마쇄한 후 사용하였다.

㉮ 용매별 분석으로 시료 200 mg에 100%, 70% 에탄올 수용액과 100%, 70% 메탄올 수용액을 각각 10 mL를 넣은 후 ultrasonication 방법으로 60분 추출하였다. 추출된 에탄올 수용액을 0.2 μm membrane filter로 거른 후 1 mL를 취해 10 ㎍ 내부표준물질을 포함한 메탄올을 첨가하여 이를 농축 시킨 후, 이동상인 15% 아세토니트릴 수용액으로 녹여 20 ㎕를 컬럼 속으로 주입하여 분석하였다 (Table Ⅱ-a).

㉯ 실험 방법별 분석으로는 시료에 70% 에탄올 수용액을 첨가한 후, 각 시료를 vortex, reflux 그리고 ultrasonication의 방법으로 60분간 추출하여 분석 비교 하였다 (Table Ⅱ-b).

㉰ 추출 시간별 분석으로는 각 시료에 70% 에탄올 수용액을 첨가한 후 ultrasonication법을 사용하여 10분, 20분, 30분, 60분 그리고 90분을 각 시료별로 추출하여 분석 비교하였다 (Table Ⅱ-c).

Table Ⅱ (a~c)에 각 추출 방법별 정량 분석 결과를 보여주고 있다. 추출 용매로서는 70% 에탄올 수용액이 비교한 다른 용매에 비해 추출 효율이 좋았으며, 추출방법으로는 ultasonication 법이 reflux나 vortex 법에 비해 비교적 간단하며, 추출 효율 또한 비슷하거나 더 좋았다. 마지막 추출 시간별 분석으로 여러 추출 시간을 비교한 결과 60분이 가장 효율적인 시간이었다.

Table Ⅱ-a. Compared with extraction solvent by 100%, 70 % EtOH, 100% an d 70% MeOH in aqueous (μg/mL, n= 3)

Compound	100% MeOH	70% M eOH	100% E tOH	70% E tOH
chlorogenic acid	69488.93 ± 3 07.60	69525.45 ± 10 6.27	19857.91 ± 9 0.08	77510.59 ± 35 4.62
sweroside	3615.87 ± 22 .01	3581.86 ± 6.44	2889.23 ± 5. 95	3597.65 ± 5.19
luteolin 7- *O*-glucoside	1460.84 ± 8.65	1270.94 ± 2. 34	263.77 ± 3. 14	1450.35 ± 3. 52
(*E*)-aldosecologanin	2321.43 ± 11 .32	2375.71 ± 3.40	1706.46 ± 5. 20	2622.68 ± 2.41
3,5-dicaffeoylquinic acid	35714.24 ± 1 63.02	23862.10 ± 51 .04	13408.34 ± 2 5.03	34990.49 ± 53 .44

Table Ⅱ-b. Compared w ith ex traction meth od by vortex, r eflux and sonicatio n (μg/mL, n=3)

Compound	Ultrasonication	Vortex	Reflux
chlorogenic acid	152216.64 ± 23 1.54	147877.99 ± 114.27	150993.09 ± 36 1.54
sweroside	3598.10 ± 3 .97	3533.19 ± 6. 05	3558.71 ± 8 .81
luteolin 7- *O*-glucoside	1339.12 ± 2 .08	1231.14 ± 2. 03	2340.25 ± 3 .16
(*E*)-aldosecologanin	2668.40 ± 2 .66	2332.75 ± 2. 41	2360.06 ± 7 .05
3,5-dicaffeoylquinic acid	34213.34 ± 9. 46	32908.29 ± 33.11	29670.60 ± 63. 41

Table Ⅱ-c. Compared w ith e xtraction t ime by 10 m in, 20 m in, 30 m in, 60 m in a nd 90 m in (μg/mL, n=3)

Compound	10 min	20 min	30 mi n	60 mi n	90 m in
chlorogenic acid	73889.98 ± 133 .69	71645.51 ± 193 .94	74305.82 ± 15 6.66	72021.47 ± 13 3.77	74792.45 ± 6 5.41
sweroside	3457.85 ± 7 .72	3271.61 ± 9 .73	3355.39 ± 7. 31	3391.05 ± 6. 65	3517.58 ± 1. 97
luteolin 7 -*O*-glucoside	1544.64 ± 4 .51	1427.27 ± 5 .82	1566.15 ± 4. 38	1913.11 ± 3. 96	1189.94 ± 2. 48
(*E*)-aldosecologanin	2334.98 ± 5 .64	2248.30 ± 6 .99	2332.22 ± 6. 79	2575.35 ± 4. 49	2360.86 ± 5. 60
3,5-dicaffeoylquinic acid	33210.09 ± 68. 46	30797.87 ± 86. 79	32691.63 ± 65 .61	33058.63 ± 62 .95	33654.07 ± 3 6.77

⑤ Validation

금은화에 함유된 상기 5종의 표준물질에 대하여 제반 validation parameter를 측정하였다.

㉮ Specificity

표준시료에 대한 specificity는 LC에서의 retention time의 차이로 완전히 분리되었으며 각각의 화합물의 확인은 각각의 표준시료를 금은화 원시료와 동시 주입함으로써 확인되었다. Fig. 3에는 표준물질들의 분리된 크로마토그램을 보여주고 있다. 시료의 머무름 시간은 각각 11.59분에 chlorogenic acid, 14.47분에 sweroside, 23.40분에 luteolin 7-*O*-glucoside, 25.91분에 (*E*)-aldosecologanin, 27.19분에 3,5-dicaffeoylquinic acid성분들이 용출되었다.

㉯ Linearity and Range

정량분석을 위한 검량선으로 각 표준물질을 단계별 농도로 희석한 혼합용액을 반복분석하여 Table Ⅲ과 같은 결과를 얻었다. 분석 파장인 250 nm에서 각 표준물질의 흡광도에 따라 chlorogenic acid 그리고 3,5-dicaffeoylquinic acid의 경우 4 ~ 30 μg/mL 농도의 범위를 정하였으며, sweroside, luteolin 7-*O*-glucoside 그리고 (*E*)-aldosecologanin의 경우 1 ~ 20 μg/mL의 농도 범위를 정하였다. 분석결과 각 표준물질의 correlation coefficient (R^2) 값은 0.994에서 1.000으로 높은 직선성을 나타내었다.

㈐ Detection limit and Quantitation limit

Detection limit 그리고 quantitation limit는 시그널 대 노이즈비 3 : 1과 10 : 1로서 각각 0.02 ~ 0.09 (㎍/mL), 0.07 ~ 0.27 (㎍/mL)의 높은 감도를 나타내었다. 이들 중에서 (*E*)-aldosecologanin이 가장 낮은 측정한계 (detection limit 0.02 ㎍/mL, quantitation limit 0.07 ㎍/mL)를 나타내었고 3,5-dicaffeoylquinic acid가 가장 높은 한계 (detection limit 0.09 mg/L, quantitation limit 0.27 mg/L)를 보여주었다. Table Ⅲ에 결과를 보여주고 있다.

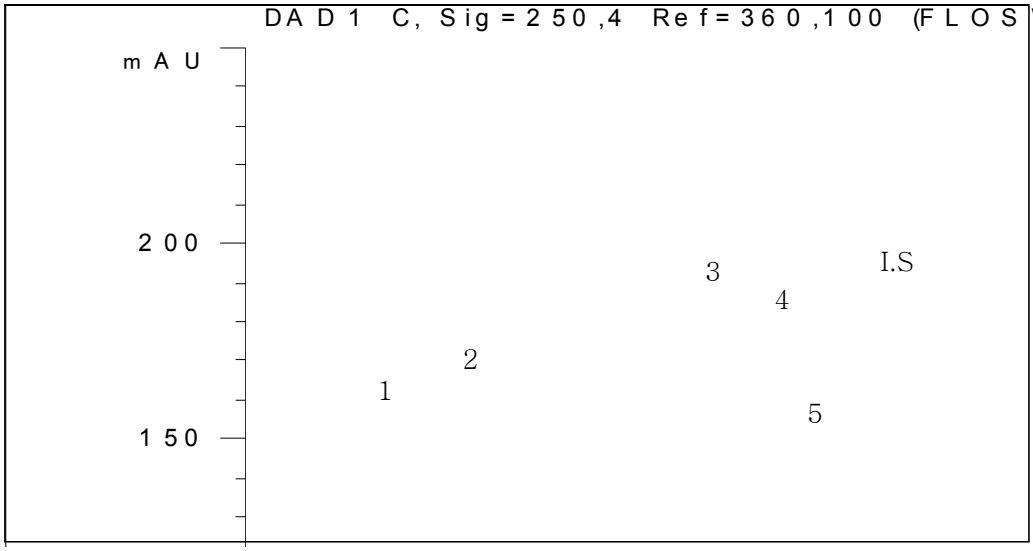


Fig. 3. The chro matogram of stan dard compounds by DAD detector

1: chlorogenic acid , 2: sweroside, 3: luteolin 7-*O*-glucoside, 4: (*E*)-aldosecologanin, 5: 3 ,5-dicaffeoylquinic acid , I.S: 3 ,4,5-trimethoxybenzoic acid

㈑ Accuracy and Precision

Accuracy와 precision을 측정하는 방법으로는 spiking recovery방법을 이용하였다. 자연 건조 시킨 후, 분말 형태로 마쇄한 금은화를 20 mg 잰 후 여기에 chlorogenic acid 그리고 3,5-dicaffeoylquinic acid는 40 μg, 80 μg, 그리고 120 μg의 양을 첨가하고 luteolin 7-*O*-glucoside는 20 μg, 40 μg, 그리고 70 μg의 양을, 그리고 (*E*)-aldosecologanin는 20 μg, 40 μg, 그리고 80 μg의 양을, sweroside는 20 μg, 40 μg, 그리고 100 μg의 양을 첨가하여, 70% 에탄올 수용액을 10 mL가 되게 넣은 후 ultrasonication 방법으로 60분간 추출하였다. 추출된 에탄올 수용액을 0.2 μm membrane filter로 거른 후 1 mL를 취해 10 μg 내부표준물질을 포함한 메탄올을 첨가하여 이를 농축하였다. 농축된 시료를 이동상 15% 아세토니트릴 수용액 1 mL에 용해시킨 후 20 μL를 컬럼 속으로 주입하여 분석하였다. 일내 (intra-day)와 일간 (inter-day)에서의 회수율을 측정한 결과 최소 97.71%에서 최대 103.65%로서 높은 정확성을 나타냈으며 상대표준편차 (RSD)는 최소 0.05%에서 최대 1.95%로서 우수한 정밀성을 나타내었다 (Table Ⅳ).

Table Ⅲ. Calibration curves , LODs and LOQs o f f ive stand ard compounds

Compounds	Range (μg/mL)	Conversion equation[a)]	r^2	LOD[b)] (μg/mL)	LOQ[c)] (μg/mL)
chlorogenic acid	4 ~ 30	y = 0.01226x - 0.01638	0.997	0.06	0.17
sweroside	1 ~ 20	y = 0.07545x + 0.01128	1.000	0.03	0.09
luteolin 7-*O*-glucoside	1 ~ 20	y = 0.05220x - 0.00121	0.997	0.03	0.10
(*E*)-aldosecologanin	1 ~ 20	y = 0.08436x - 0.02008	0.999	0.02	0.07
3,5-dicaffeoylquinic aci d	4 ~ 30	y = 0.01261x - 0.02576	0.994	0.09	0.27

a) y: pe ak area, x: co ncentration of th e an alyte (μg/mL)

b) LOD: limit of detection

c) LOQ: li mit of qua ntification

r^2: c orrelation coefficient

㈐ Reproducibility

5종의 표준물질을 반복 분석함으로써 각 peak의 면적비의 재현성 및 peak 머무름 시간의 재현성을 확인하였다. 각 peak 면적비의 상대표준편차는 최소 0.10%에서 최대 0.55%이었으며, 머무름 시간의 상대 표준편차는 최소 0.47%에서 최대 1.04%였다. Table Ⅴ에 결과를 보여주고 있다.

㈑ Robustness

1) 상기 5종의 표준시료에 대하여 Phenomenex사의 Gemini 5 μ C18 컬럼과 Agilent사의 ZORBAX Eclipse XDB-C18을 사용하여 분리능을 비교해 보았다. Phenomenex사의 Gemini 5 μ C18 컬럼의 경우 동일한 이동상 조건에서 모든 standard compounds는 분리가 되었으나 다른 컬럼에 비하여 전체적인 분석시간이 증가하였으며, 각각 근접해 있는 chlorogenic acid와 sweroside 그리고 luteolin 7-*O*-glucoside와 (*E*)-aldosecologanin의 분리능이 떨어 졌다. Agilent사의 ZORBAX Eclipse XDB-C18의 경우 표준물질간의 전체적인 머무름 시간과 분리능은 비슷하였으나 금은화 원시료를 분석하였을 시 표준물질과 미지의 물질간의 분리능이 떨어졌다. 따라서 컬럼은 Shiseido사의 CAPCELL PAK C18 UG120 컬럼이 금은화 분석 시 분리능이 훨씬 더 우수하였다 (Fig. 4). Table Ⅵ에는 용량계수 (k′), 선택성 (α), 이론단수 (N) 그리고 분리도 (Rs)로써 수치적 결과를 나타내었다.

2) 시료 분석 시 컬럼 오븐의 온도에 따른 분리능의 비교 분석으로서 동일한 조건하에 컬럼 오븐의 온도만을 20, 25, 30, 35 그리고 40℃로 바꾸어 이를 비교분석하여 용량계수 (k′), 선택성 (α), 이론단수 (N) 그리고 분리도 (Rs)로 나타내었다 (Table Ⅶ). 분석결과 온도가 높아질수록 (*E*)-aldosecologanin과 3,5-dicaffeoylquinic acid가 겹치는 경향을 보였으며, 금은화 원시료 분석시 표준물질의 peak와 미지 물질의 peak가 겹치는 경향을 보였다. 따라서 컬럼의 분석온도는 모든 표준물질이 뚜렷이 분리가 이루어지는 25℃가 우수하였다.

㈒ Stability

금은화 시료를 상온 (25℃) 그리고 냉장 (4℃)에서 각기 보관한 후, 두 시료를 일정한 날짜의 간격을 두고 정량분석하여 시간의 따른 표준시료의 함량 차이를 비교함으로써 표준시료의 안전성을 살펴보았다. 시료를 상온에 보관할 경우 3,5-dicaffeoylquinic acid의 함량이 감소하는 경향을 보였으며, sweroside와 luteolin 7-*O*-glucoside는 증가하는 경향을 보였다. 시료를 냉장에 보관할 경우 대부분의 표준물질이 비교적 안정하였다. Table Ⅷ에 수치화된 결과를, Fig. 5에 도식화된 결과를 나타내었다.

Table Ⅳ. Precision and accuracy of th e five standard compounds

Compounds	Spiked amo unt (μg)	Intra-day (n = 5)		Inter-day (n = 5)	
		Recovery (%)	RSD (%)	Recovery (%)	RS D (%)
chlorogenic aci d	4	100.05 1.	15	102.68	1.49
	8	99.97 0.	86	99.91	0.56
	12	101.69 0.	69	101.24	0.76
sweroside	2	103.65 0.	66	101.45	0.94
	4	101.31 1.	05	100.64	0.61
	10	99.58 0.	05	99.55	0.15
luteolin 7- *O*-glucoside	2	101.99 0.	51	99.79	0.92
	4	98.81 1.	19	97.71	2.26
	7	98.89 0.	29	99.52	0.29
(*E*)-aldosecologanin	2	99.73 0.	27	100.47	0.31
	4	100.16 0.	54	100.68	1.84
	8	98.41 0.	21	99.33	0.16
3,5-dicaffeoylquinic acid	4	98.71 1.	95	99.36	1.36
	8	99.64 1.	62	99.97	1.16
	12	101.49 0.	32	101.36	0.40

Table Ⅴ. R eproducibility o f th e fiv e standard co mpounds

Compounds	Peak area r atio (peak a rea/IS area)			Retention t ime (min)		
	Mean	SD	RSD (%)	Mean	SD	RSD (%)
chlorogenic acid	0.34	0.00	0.55	11.59	0.12	1.04
sweroside	0.46	0.00	0.10	14.47	0.12	0.85
luteolin 7 -*O*-glucoside	0.67	0.00	0.43	23.40	0.15	0.66
(*E*)-aldosecologanin	0.53	0.00	0.15	25.91	0.12	0.47
3,5-dicaffeoylquinic acid	0.28	0.00	0.47	27.19	0.15	0.54

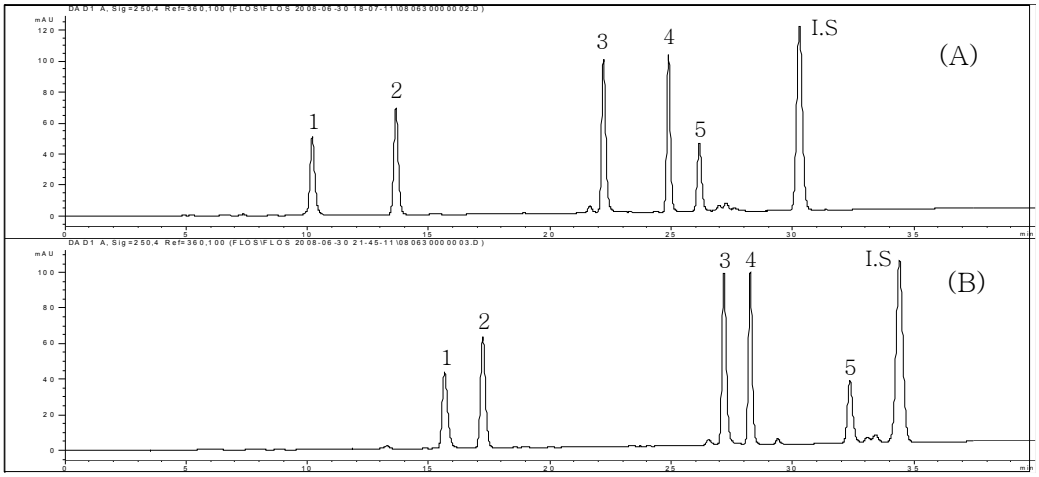


Fig. 4 . The chromatogram of s tandard compou nds b y A gilent ZO RBAX Eclipse XDB-C_{18} (A) an d Ph enomenex Gemini 5μ C_{18} column (B).

1: chlor ogenic acid, 2 : sweroside, 3: luteolin 7- *O*-glucoside, 4: (*E*)-aldosecologanin, 5 : 3,5-dicaffeoylquinic acid, I.S: 3, 4,5-trimethoxybenzoic acid

Table Ⅵ. C ompared with typ e of colu mn

Columns	Surface area/cm2	Pore size (Ao)	Analytes				
			chlorogenic acid	sweroside	luteolin 7- *O*-glucoside	(*E*)-aldosecologanin	3,5-dicaffeoyl quinic ac id
Theoretical plate (N)							
Shiseido C APCELL PAK C_{18} UG120	287	95	15219.33 ± 3144.86	26038.67 ± 4447.63	90855.33 ± 5475.34	139682.33 ± 201.21	96312.67 ± 1420.89
Phenomenex Gemini 5 μ C_{18}	383	104	25633.00 ± 655.05	35911.67 ± 383.62	121260.33 ± 1701.40	164520.00 ± 2645.35	113281.33 ± 319.88
Agilent Z ORBAX Eclipse XDB-C_{18}	180	80	14669.67 ± 532.92	28109.33 ± 494.50	89549.67 ± 1504.00	148723.33 ± 2740.93	110679.00 ± 1667.52
Capacity f actor (k ')							
Shiseido C APCELL PAK C_{18} UG120	287	95	0.74 ± 0.07	1.21 ± 0.06	2.60 ± 0. 01	2.99 ± 0.00	3.18 ± 0. 01
Phenomenex Gemini 5 μ C_{18}	383	104	1.42 ± 0.01	1.65 ± 0.00	3.18 ± 0. 00	3.34 ± 0.01	3.99 ± 0. 01
Agilent Z ORBAX Eclipse XDB-C_{18}	180	80	0.58 ± 0.01	1.11 ± 0.01	2.42 ± 0. 00	2.83 ± 0.01	3.03 ± 0. 01
Separation f actor(α)							
Shiseido C APCELL PAK C_{18} UG120	287	95	-	1.63 ± 0.09	2.16 ± 0. 09	1.15 ± 0.00	1.06 ± 0. 00
Phenomenex Gemini 5 μ C_{18}	383	104	-	1.16 ± 0.01	1.93 ± 0. 01	1.05 ± 0.00	1.19 ± 0. 00
Agilent Z ORBAX Eclipse XDB-C_{18}	180	80	-	1.90 ± 0.02	2.18 ± 0. 02	1.17 ± 0.00	1.07 ± 0. 00
Resolution (R s)							
Shiseido C APCELL PAK C_{18} UG120	287	95	-	8.29 ± 0.24	27.15 ± 0.47	8.57 ± 0.04	3.87 ± 0. 10
Phenomenex Gemini 5 μ C_{18}	383	104	-	4.00 ± 0.13	29.37 ± 0.19	3.60 ± 0.06	12.55 ± 0. 16
Agilent Z ORBAX Eclipse XDB-C_{18}	180	80	-	10.26 ± 0.04	27.20 ± 0.04	9.55 ± 0.12	4.52 ± 0. 10

Table Ⅶ. Compared with temper ature of colu mn oven

Temperature (℃)	Analytes				
	chlorogenic a cid	sweroside	luteolin 7- *O*-glucoside	(*E*)-aldosecologanin	3,5-dicaffeoyl quinic a cid
Theoretical plate(N)					
20	17916.67 ± 948.97	29042.67 ± 739.50	98785.67 ± 2054.74	141842.00 ± 1855.26	106694.33 ± 1008. 16
25	17221.67 ± 61. 44	27967.00 ± 27.18	92642.33 ± 1438.33	141996.33 ± 1661.04	102841.00 ± 2385. 16
30	16547.67 ± 583.08	27449.67 ± 426.39	86111.00 ± 1308.74	140199.67 ± 450.96	99893.67 ± 1381.18
35	15266.67 ± 64. 35	26539.33 ± 50.14	79101.33 ± 1057.88	125002.67 ± 1921.51	-
40	14119.00 ± 314.91	25269.33 ± 87.95	72307.67 ± 1122.23	87845.67 ± 291. 71	134405.00 ± 111.77
Capacity f actor(k')					
20	0.86 ± 0. 03	1.28 ± 0.01	2.71 ± 0.01	3.03 ± 0.01	3.33 ± 0.01
25	0.79 ± 0. 01	1.23 ± 0.01	2.61 ± 0.00	3.00 ± 0.01	3.19 ± 0.00
30	0.72 ± 0. 00	1.18 ± 0.00	2.51 ± 0.00	2.96 ± 0.00	3.05 ± 0.01
35	0.65 ± 0. 00	1.13 ± 0.00	2.40 ± 0.00	2.92 ± 0.00	-
40	0.58 ± 0. 01	1.08 ± 0.01	2.29 ± 0.01	2.77 ±0.01	2.87 ± 0.01
Separation f actor(α)					
20	-	1.50 ± 0.03	2.11 ± 0.02	1.12 ± 0.00	1.10 ± 0.01
25	-	1.56 ± 0.01	2.11 ± 0.00	1.15 ± 0.00	1.07 ± 0.00
30	-	1.65 ± 0.01	2.12 ± 0.01	1.18 ± 0.00	1.03 ± 0.00
35	-	1.74 ± 0.01	2.13 ± 0.00	1.21 ± 0.01	-
40	-	1.83 ± 0.01	2.13 ± 0.00	1.21 ± 0.00	1.04 ± 0.01
Resolution (R s)					
20	-	7.79 ± 0.16	28.25 ± 0.15	7.13 ± 0.17	6.23 ± 0.22
25	-	8.18 ± 0.04	27.22 ± 0.12	8.56 ± 0.02	4.14 ± 0.06
30	-	8.72 ± 0.05	26.37 ± 0.12	10.01 ± 0.01	2.00 ± 0.03
35	-	9.04 ± 0.04	25.27 ± 0.10	11.10 ± 0.07	-
40	-	9.26 ± 0.04	23.96 ± 0.12	9.67 ± 0.03	2.06 ± 0.10

Stability test (상온) Stability test (냉장)

Fig. 5 . Stability of stan dard compounds in normal temperature and cold temperature.

Table Ⅷ. The resu lt of stability of standard compou nds in room temperature and cold temperature (%)

Analytes	Temp	Day								Mean	SD	RSD
	.(℃)	1	3	5	7	15	20	25	30			(%)
chlorogenic ac id	R.T.	100.00	99.22 96.	92 96.13 92.		89 94.35 93.		53 93.91 95.		87	2.67	2.79
	4℃	100.00	99.94	100.18	99.98 99.	22 99.24 99.		33 98.84 99.		59	0.49	0.49
sweroside	R.T.	100.00 101.88 103.		49 105.00 106.		76 107.66 115.		07 118.25 107.		26	6.36	5.93
	4℃	100.00 100.16 100.		10	99.95	102.38 102.90 102.		65 103.49 101.		45	1.53	1.51
luteolin 7- *O*-glucoside	R.T.	100.00 101.53 101.		38 104.68 111.		89 115.54 121.		52 123.18 109.		96	9.37	8.52
	4℃	100.00 99.87 100.		06 99.99 101.		93	102.03	100.70	102.38	100.87	1.07	1.06
(*E*)-aldosecologanin	R.T.	100.00	98.50 98.	35	102.39	98.99 94.87 94.		37 96.23 97.		96	2.69	2.75
	4℃	100.00	100.15	99.95 99.99 99.		26 98.93 92.		23 91.68 97.		77	3.62	3.70
3,5-dicaffeoylquinic acid	R.T.	100.00	98.75 92.	17 89.43 73.		01 75.79 69.		37 74.95 84.		18 12.27 14.		57
	4℃	100.00	100.06	100.11	94.42 94.	92 94.48 91.		18 88.56 95.		47	4.34	4.54

⑥ HPLC-DAD-ESI-MS를 이용한 표준물질의 동정

금은화에 함유된 표준물질의 동정에 있어 HPLC-DAD를 통해서는 머무름 시간의 일치를 통한 chromatogram상의 시각적인 정보만을 얻을 수 있다. 그래서 HPLC-DAD-MS/MS를 통해 금은화 시료에 함유된 표준물질의 머무름 시간과 *m/z*값 및 fragment의 패턴을 확인함으로써 시료내의 표준물질을 동정하였다.

질량분석기는 HPLC (Agilent 1200 series)를 inlet으로 사용하였으며, *m/z*비 2000까지의 범위를 수용할 수 있는 Finnigan electrospray source가 결합된 Finnigan MAT LCQ ion-trap mass spectrometer (San Jose, CA, USA)를 사용하여 분석하였고 software는 Xcalibur (Finnigan MAT)를 사용하였다. 질량분석의 조건은 각 표준물질의 최적의 감도를 고려해 물질별로 나누어 설정하였다. Table Ⅸ에 분석 파라미터들을 나타내었다. 분석하기 전 먼저 MS에 각 표준물질을 직접 주입하여 scan함으로써 각 성분들의 *m/z*값 및 fragment ion의 패턴을 확인하였다. Chlorogenic acid 와 luteolin 7-*O*-glucoside는 음이온 모드에서 sweroside, (*E*)-aldosecologanin 그리고 3,5-dicaffeoylquinic acid는 양이온 모드에서 검출되었으며, Fig. 6에 시료들의 scan스펙트럼을 보여주고 있다. 위의 정보를 바탕으로 HPLC-DAD-ESI-MS 분석을 실시하였다. 컬럼과 이동상은 앞에서 언급한 동일한 LC조건으로 분리하였으며, 각 표준성분들의 특성피크를 선택하여 SRM 모드를 사용하여 분석하였다. 분석결과 chlorogenic acid는 12.3분, sweroside는 15.3분, luteolin 7-*O*-glucoside는 24.2분, (*E*)-aldosecologanin는 26.5분 그리고 3,5-dicaffeoylquinic acid는 28.2분의 retention time 차이로 완전히 분리되었으며, 분리된 각 표준성분들의 특성피크를 확인한 결과 chlorogenic acid는 *m/z* : 354 > 353으로, sweroside는 *m/z* : 358 > 381로, luteolin 7-*O*-glucoside는 *m/z* : 448 > 447로, (*E*)-aldosecologanin는 *m/z* : 758 > 781로, 그리고 3,5-dicaffeoylquinic acid는 *m/z* : 516 > 517로, 직접주입 하였을 때의 값들과 비교하였을 때 분리된 각

성분들의 *m/z*값 및 fragment ion의 패턴이 동일함을 확인함으로써 시료내의 표준성분들을 동정하였다. Table X에 각 peak에 대한 분석결과를 나타내었으며 Fig. 7에서 분리된 SRM 크로마토그램을 보여주고 있다.

Table Ⅸ. An alytical parameters for HPLC-ESI-MS

<ESI sour ce>	Method 1	Method 2	Method 3	Method 4	Method 5
Sheath g as flow r ate (arb)	80.00	80.00	80.00	80.00	80.00
Aux g as flow r ate (arb)	20.00	20.00	20.00	20.00	20.00
Spray v oltage (kV)	4.50	7.00	4.50	7.00	4.50
Capillary temp (℃)	250.00	250.00	250.00	250.00	250.00
Capillary v oltage (V)	-2.00	24.00	-47.00	1.50	9.50
Tube lens off est (V)	55.00	6.00	-25.00	-17.00	-15.00
<Ion op tics>					
Compounds	chlorogenic a cid	sweroside	luteolin 7- *O*-glucoside	(*E*)-aldosecologanin	3,5-dicaffeoyl quinic a cid
Octapole 1_ o ffset (V)	4.50	-2.00	3.00	-2.75	-1.75
Lens v oltage (V)	22.00	-34.00	20.00	-18.00	-22.00
Octapole 2_ o ffset (V)	9.50	-4.50	6.50	-4.50	-5.00
Octapole RF amplitu de (V p-p)	400.00	400.00	400.00	400.00	400.00

Table Ⅹ. HPLC-DAD-MS/MS Data o f th e fiv e bio active co mpounds in *Lonicera j aponica* flo wers

Peak No.	MW[a)]	MS (*m/z*)	MS/MS (*m/z*)	C.E[b)]	Ion mo de	Identification
1	354	353	191	26	Negative	chlorogenic acid
2	358	381	219	40	Positive	sweroside
3	448	447	285	34	Negative	luteolin 7- *O*-glucoside
4	758	781	549	58	Positive	(*E*)-aldosecologanin
5	516	517	501	30	Positive	3,5-dicaffeoylquinic acid

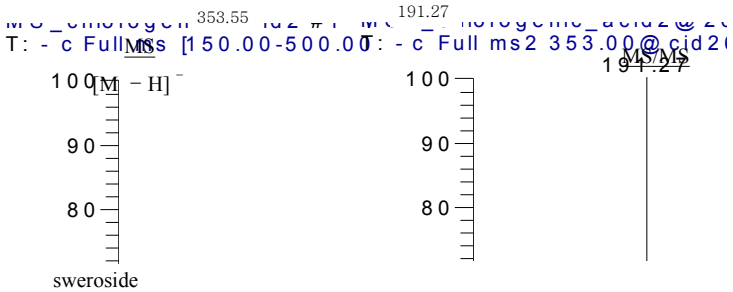
a) mol ecular wei ght.

b) collision energy.

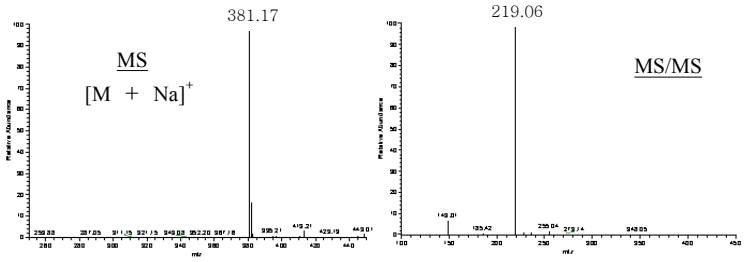
⑦ 금은화 시료의 정량분석

시중에서 구입한 중국산과 국내산 금은화를 제시된 실험방법으로 정량 분석하였다. Crude sample의 분리된 크로마토그램을 Fig. 8에서 보여주고 있고, Fig. 9에 정량분석된 결과를 도식화하였다. 밀현, 하남, 정주, 하남 그리고 산동에서 구입한 중국산과 홍천, 낙문, 고흥, 양양, 봉화, 강릉, 부여, 고성, 의성, 설악산, 청송, 군위, 울진 그리고 안동에서 구입한 국내산을 정량분석하여 비교한 결과 21종의 금은화에 함유된 생리활성 물질의 함량은 대체적으로 불규칙적이었으며, 대체적으로 sweroside, luteolin 7-*O*-glucoside, (*E*)-aldosecologanin은 낮은 함량을 가졌고 chlorogenic acid와 3,5-dicaffeoylquinic acid은 높은 함량을 가졌다. 또한 전반적인 활성 물질의 함량을 볼 때 중국 하남산과 산동산이 가장 높았다. Table XI에 정량분석된 데이터를 보여주고 있다.

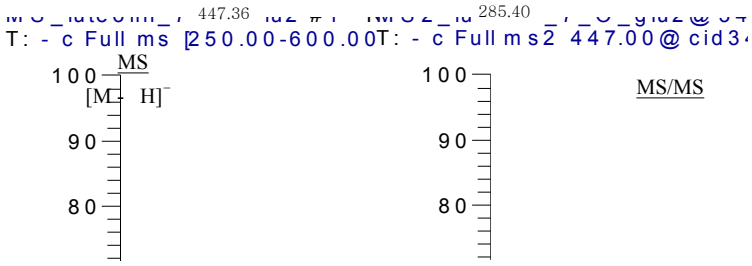
chlorogenic ac id



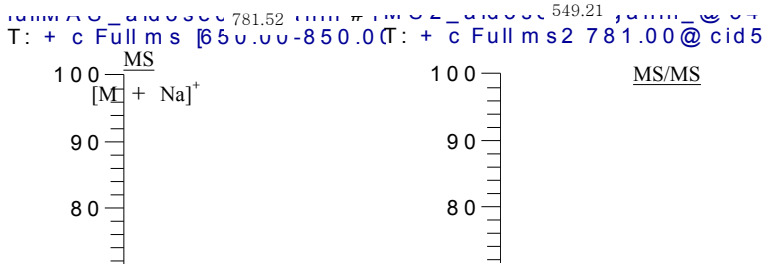
sweroside



luteolin 7- *O*-glucoside



(*E*)-aldosecologanin



3,5-dicaffeoylqucinic acid

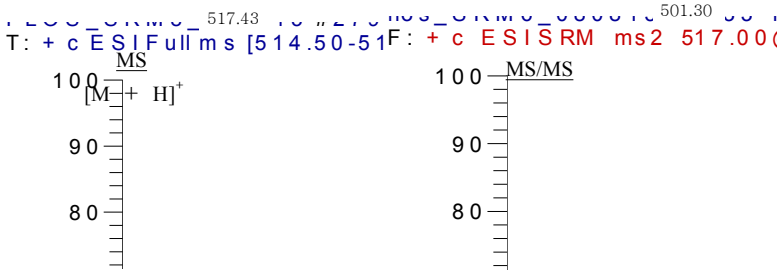


Fig. 6 . Mass spectrum (scan mode) of standard compounds.

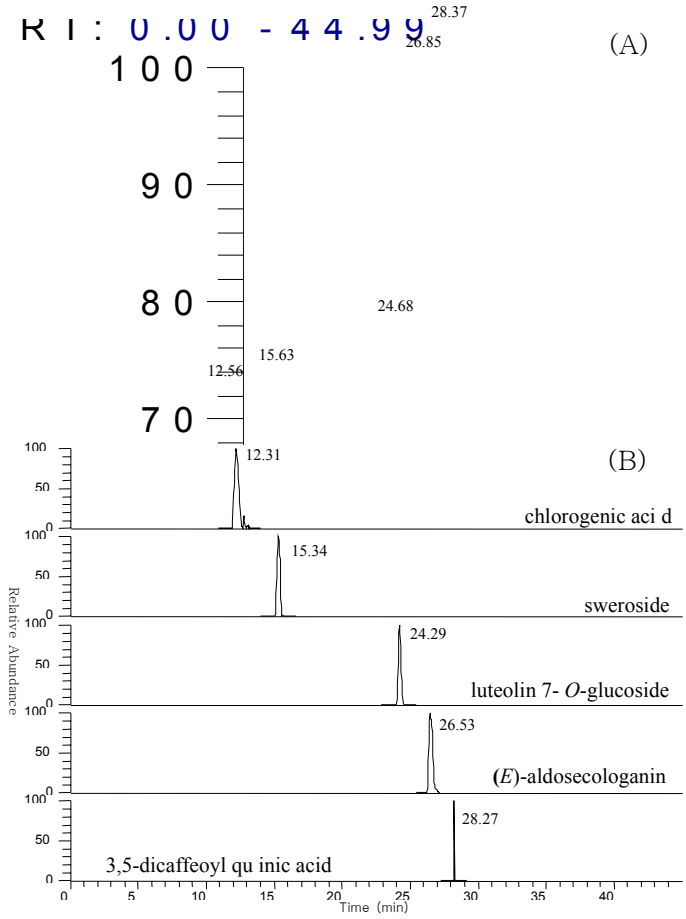


Fig. 7. Total io n ch romatograms of *Lonicera japo nica* flowers in SIM mode (A) an d SRM mode (B).

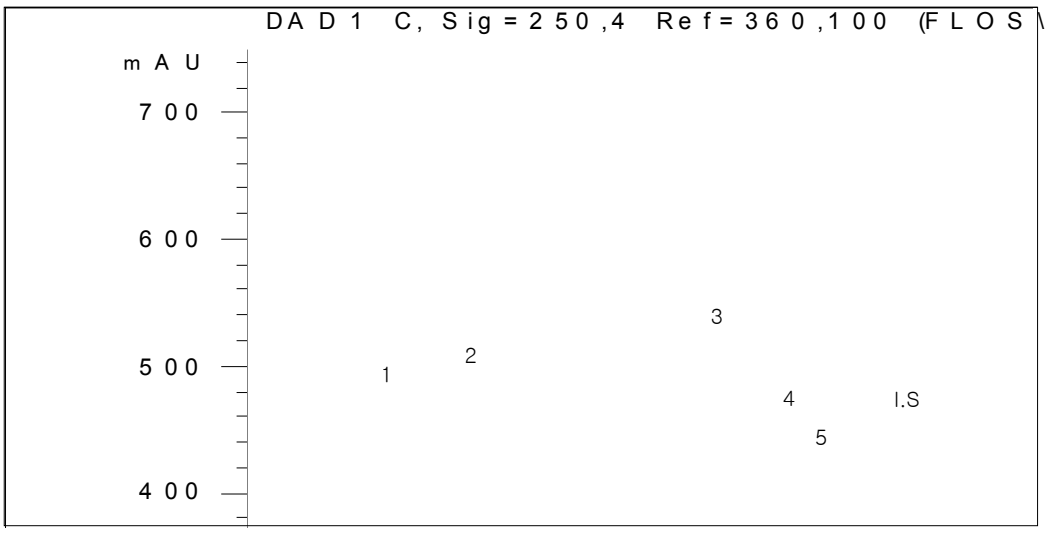


Fig. 8 . The chromatogram of crud e sample by DAD detector .

1: chlor ogenic acid, 2 : sweroside, 3: luteolin 7- *O*-glucoside, 4: (*E*)-aldosecologanin, 5 : 3,5-dicaffeoylquinic acid, I.S: 3, 4,5-trimethoxybenzoic acid

Table Ⅺ. The results of quantitative analysis of *Lonicera japonica* flowers from various regions (μg/mL)

Samples	chlorogenic acid	sweroside	luteolin 7-*O*-glucoside	(*E*)-aldosecologanin	3,5-dicaffeoyl quinic acid
Hong-cheon	5924.49	1156.15	674.24	325.16	4870.20
Nak-moon	2941.07	834.07	740.00	172.01	2613.17
Go-heung	2881.87	534.02	949.01	-	4292.22
Yang-yang	2221.00	457.22	633.02	133.30	3238.51
Bong-hwa	3601.50	804.81	949.01	-	4292.22
Kyo-yi	6475.80	1011.85	822.01	320.28	5442.21
Bu-yeo	4909.73	1071.91	874.65	187.30	3681.06
Geo-jin	3542.25	866.89	619.49	161.65	4042.88
Ui-seong	6637.39	1154.31	1185.49	293.86	5306.25
Mt. seolak	5851.42	668.13	748.63	226.91	6665.29
Cheong-song	10126.69	1438.64	1228.70	323.25	7447.40
Goon-wi	4230.96	659.26	1366.43	132.24	3929.51
Ul-jin 2	866.85	589.57	471.12	80.10	3274.00
An-dong	3456.77	926.17	614.99	175.73	2885.57
China	3144.18	1532.69	807.89	401.76	3611.50
Mil-hyun (China)	62441.82	3297.94	705.81	2523.07	27465.54
An-dong	7989.60	1157.86	1023.19	257.97	5566.93
Ha-nam (China)	2815.78	788.32	521.13	120.07	2335.76
Sandong (China)	43840.90	1559.03	1560.76	606.95	29747.88
Hanam (China)	64247.89	3120.63	750.17	2562.84	29177.90
Sandong (China)	59194.80	2635.71	908.53	2639.58	26975.64

(μg/g)

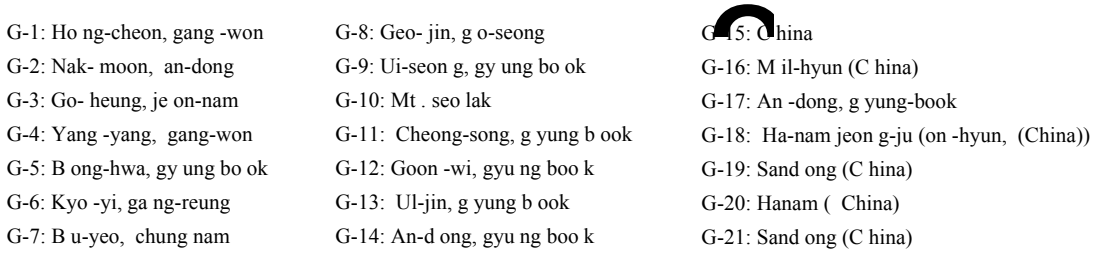


Fig. 9 . Quantitativ e analy sis o f *Lonicera j aponica* flo wers from v arious regions.

⑧ 금은화 시료의 패턴분석

밀현, 하남, 정주, 하남 그리고 산동에서 구입한 중국산과 홍천, 낙문, 고흥, 양양, 봉화, 강릉, 부여, 고성, 의성, 설악산, 청송, 군위, 울진 그리고 안동에서 구입한 국내산 등 산지별 21종의 금은화시료를 HPLC-DAD를 이용하여 분석하였다. 머무름 시간 11.53분의 chlorogenic acid, 14.45분의 sweroside, 16.99분의 미지의 시료 A, 23.53분의 luteolin 7-*O*-glucoside, 26.15분의 (*E*)-aldosecologanin, 27.30분의 3,5-dicaffeoylquinic acid 그리고 29.18분의 미지의 시료 B까지 총 7가지 성분을 분석하고 7가지 성분을 다변량으로 한 패턴 인식법을 실시하였다. Fig. 10에 패턴분석을 위한 크로마토그램을 나타내었다.

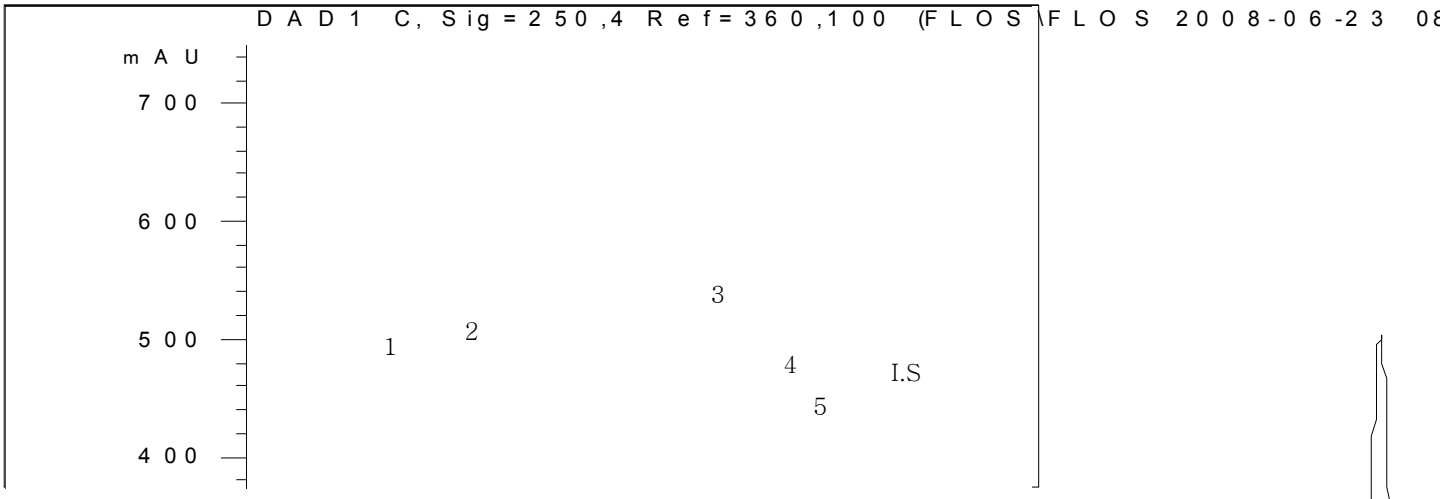


Fig. 1 0. The chromatogram of *Lonicera japo nica* flow ers for pattern analysis.

금은화 원시료를 각각 HPLC로 분석하고 7개 성분의 적분 값을 계산하였다. 각 성분의 적분값은 내부표준물질인 3,4,5-trimethoxybenzoic acid peak의 적분 값으로 나누어 각각의 개체에 대한 변수로 사용하였다. 다변량 자료는 R 통계 프로그램으로 처리하였으며, 유의수준은 0.01로 하였다.

21종의 금은화 시료로부터 chlorogenic acid (CA), sweroside (SS), luteolin 7-*O*-glucoside (L7OG), (*E*)-aldosecologanin (ASL), 3,5-dicaffeoylquinic acid (35DCQ) 그리고 두 가지 미지성분 A, B등 총 7가지 성분을 HPLC로 분석한 결과를 Table XII에 나타내었다. 1번부터 14번, 17번 시료는 국내산 금은화이며, 15번, 16번 그리고 18번에서 21번까지의 시료는 중국산 금은화이었다. 분석결과를 Fig. 11과 같이 boxplot으로 표현하였을 경우, sweroside 그리고 (*E*)-aldosecologanin성분은 국내산과 중국산을 비교하여 볼 때 유의성의 차이를 나타냈으며, 그 외 나머지 성분은 막대그래프가 중첩되는 것으로 보아 그 범위에 대해 국내산과 중국산간의 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다. Table XIII에 전체시료, 국내산 그리고 중국산을 산지별로 그룹화하여 7종 지표성분에 대하여 A_{std}/A_{IS}의 범위를 나타내었다. 앞의 boxplot에서 언급한 바와 같이 대부분의 성분은 상당히 넓은 범위에 퍼져 있으며, sweroside 그리고 (*E*)-aldosecologanin성분을 제외하고 그 범위에 대해 중국산과 국내산의 특징은 없는 것으로 나타났다. Table XIV에는 시료를 전체와 국가별로 그룹화하고 각 표준 성분의 A_{std}/A_{IS}의 평균 및 표준편차를 비교하였다. 모든 표준성분들의 A_{std}/A_{IS}의 평균과 표준 편차로 chlorogenic acid는 3.60 ± 5.30, sweroside는 1.90 ± 1.22, 미지의 성분 A는 1.31 ± 1.88, luteolin 7-*O*-glucoside는 0.91 ± 0.30, (*E*)-aldosecologanin은 0.93 ± 1.44, 3,5-dicaffeoylquinic acid는 2.21 ± 2.47 그리고 미지의 성분 B는 0.68 ± 0.37으로 성분 대부분이 표준편차와 평균값이 거의 비슷하게 나타났다. 이는 앞에서 언급한 boxplot의 결과와 같이 산지별 시료들의 표준 성분들은 넓은 범위에 걸쳐 면적비를 나타냄을 알 수 있었다. 전체 시료를 볼 때 chlorogenic acid와 3,5-dicaffeoylquinic acid가 가장 큰 면적 비를 나타내며 국

내산과 중국산을 비교해 볼 때 평균적으로 중국산시료가 국내산 시료에 비해 높은 면적비를 나타내었다.

Table Ⅻ. C ontents of seven co mponents f rom samples (A_{std}/A_{IS})

No.	CA	SS	A	L7OG	ASL	35DCQ	B
1	1.44 ± 0 .00	1.76 ± 0 .00	1.79 ± 0. 00	0.70 ± 0. 00	0.53 ± 0.00	1.20 ± 0.00	0.63 ± 0 .00
2	0.70 ± 0 .00	1.27 ± 0 .00	0.00 ± 0. 00	0.77 ± 0. 00	0.27 ± 0.00	0.63 ± 0.01	0.39 ± 0 .00
3	0.69 ± 0 .01	0.82 ± 0 .00	0.57 ± 0. 00	0.99 ± 0. 00	0.00 ± 0.00	1.06 ± 0. 00	0.34 ± 0.00
4	0.53 ± 0 .00	0.70 ± 0 .00	0.39 ± 0. 00	0.66 ± 0. 00	0.20 ± 0.00	0.79 ± 0.00	0.26 ± 0 .00
5	0.87 ± 0 .00	1.23 ± 0 .00	0.38 ± 0. 00	1.19 ± 0. 00	0.26 ± 0.00	0.84 ± 0.00	0.36 ± 0 .00
6	1.57 ± 0 .00	1.54 ± 0 .00	1.73 ± 0. 01	0.86 ± 0. 00	0.56 ± 0.06	1.35 ± 0.00	0.74 ± 0 .00
7	1.19 ± 0 .00	1.63 ± 0 .01	0.00 ± 0. 00	0.91 ± 0. 00	0.30 ± 0.00	0.90 ± 0.00	0.59 ± 0 .00
8	0.85 ± 0 .00	1.32 ± 0 .00	0.37 ± 0. 00	0.65 ± 0. 00	0.25 ± 0.00	0.99 ± 0.00	0.44 ± 0 .00
9	1.61 ± 0 .00	1.75 ± 0 .00	0.38 ± 0. 00	1.24 ± 0. 00	0.48 ± 0.00	1.31 ± 0.00	0.81 ± 0 .00
10	1.42 ± 0 .00	1.02 ± 0 .00	1.18 ± 0. 00	0.78 ± 0. 00	0.36 ± 0.00	1.65 ± 0.00	0.59 ± 0 .00
11	2.47 ± 0 .01	2.18 ± 0 .00	0.61 ± 0. 00	1.28 ± 0. 00	0.53 ± 0.00	1.85 ± 0.00	1.05 ± 0 .00
12	1.02 ± 0 .00	1.01 ± 0 .00	0.36 ± 0. 00	1.43 ± 0. 00	0.20 ± 0.00	0.97 ± 0.00	0.35 ± 0 .00
13	0.69 ± 0 .00	0.90 ± 0 .00	0.32 ± 0. 00	0.49 ± 0. 00	0.12 ± 0.00	0.80 ± 0.00	0.46 ± 0 .00
14	0.83 ± 0 .00	1.41 ± 0 .00	0.29 ± 0. 00	0.64 ± 0. 00	0.28 ± 0.00	0.70 ± 0.00	0.39 ± 0 .00
15	0.75 ± 0 .00	2.32 ± 0 .00	0.00 ± 0. 00	0.84 ± 0. 00	0.66 ± 0.00	0.88 ± 0.00	0.54 ± 0 .00
16	15.30 ± 0. 01	4.99 ± 0 .00	4.86 ± 0. 00	0.74 ± 0. 00	4.24 ± 0.00	6.90 ± 0.01	1.49 ± 0 .00
17	1.94 ± 0 .01	1.76 ± 0 .00	0.41 ± 0. 00	1.07 ± 0. 00	0.42 ± 0.00	1.38 ± 0.00	0.74 ± 0 .00
18	0.67 ± 0 .00	1.20 ± 0 .01	0.00 ± 0. 00	0.54 ± 0. 00	0.18 ± 0.00	0.56 ± 0.00	0.36 ± 0 .00
19	10.73 ± 0. 01	2.36 ± 0 .01	2.08 ± 0. 00	1.63 ± 0. 00	1.00 ± 0.00	7.48 ± 0.00	1.08 ± 0 .00
20	15.74 ± 0. 02	4.72 ± 0 .00	5.35 ± 0. 01	0.78 ± 0. 00	4.30 ± 0.00	7.33 ± 0.01	1.45 ± 0.00
21	14.50 ± 0. 06	3.99 ± 0 .02	6.37 ± 0. 03	0.95 ± 0. 00	4.43 ± 0.02	6.78 ± 0.03	1.23 ± 0 .01

Values represent mea n ± st andard deviation (n=3) .

Origin: Ko rea (No. 1 ~14, 1 7), C hina (No . 15, 1 6, 18 ~21).

CA: chlorogenic ac id, SS: swerosi de, L7OG: luteoli n 7- *O*-glucoside, A SL: (*E*)-aldosecologanin, 3 5DCQ: 3 ,5-dicaffeoylquinic acid , A and B: u nknown compounds

Table X III. Range of the concentration for marker compou nds f or twenty-one samp les (A_{std}/A_{IS})

	CA	SS	A	L7OG	ASL	35DCQ	B
All s amples	0.53-2.47	0.70-4.99	0.00-6.37	0.49-1.63	0.00-4.43	0.56-7.48	0.26-1.49
Korea sample s	0.53-2.47	0.70-2.18	0.00-1.79	0.49-1.43	0.00-0.56	0.63-1.85	0.26-1.05
China s amples	0.67-15.74	1.20-4.99	0.00-6.37	0.54-1.63	0.18-4.43	0.56-7.48	0.36-1.49

CA: chlorogenic ac id, SS: swerosi de, L7OG: luteoli n 7- *O*-glucoside, A SL: (*E*)-aldosecologanin, 3 5DCQ: 3 ,5-dicaffeoylquinic acid , A and B: u nknown compounds

Table XI V. Changes of con tents of mar ker compounds in sample f rom dif ferent or igin (A_{std}/A_{IS})

	CA	SS	A	L7OG	ASL	35DCQ	B
All s amples	3.60 ± 5. 30	1.90 ± 1. 22	1.31 ± 1 .88	0.91 ± 0. 30	0.93 ± 1. 44	2.21 ± 2 .47	0.68 ± 0. 37
Korea sample	1.19 ± 0. 55	1.35 ± 0.42	0.59 ± 0 .55	0.91 ± 0. 28	0.32 ± 0. 16	1.10 ± 0 .36	0.54 ± 0. 22
China s ample	9.62 ± 7. 12	3.26 ± 1. 52	3.11 ± 2 .80	0.91 ± 0. 38	2.47 ± 2. 05	4.99 ± 3 .32	1.03 ± 0. 47

CA: chlorogenic ac id, SS: swerosi de, L7OG: luteoli n 7- *O*-glucoside, A SL: (*E*)-aldosecologanin, 3 5DCQ: 3 ,5-dicaffeoylquinic acid , A and B: u nknown compounds

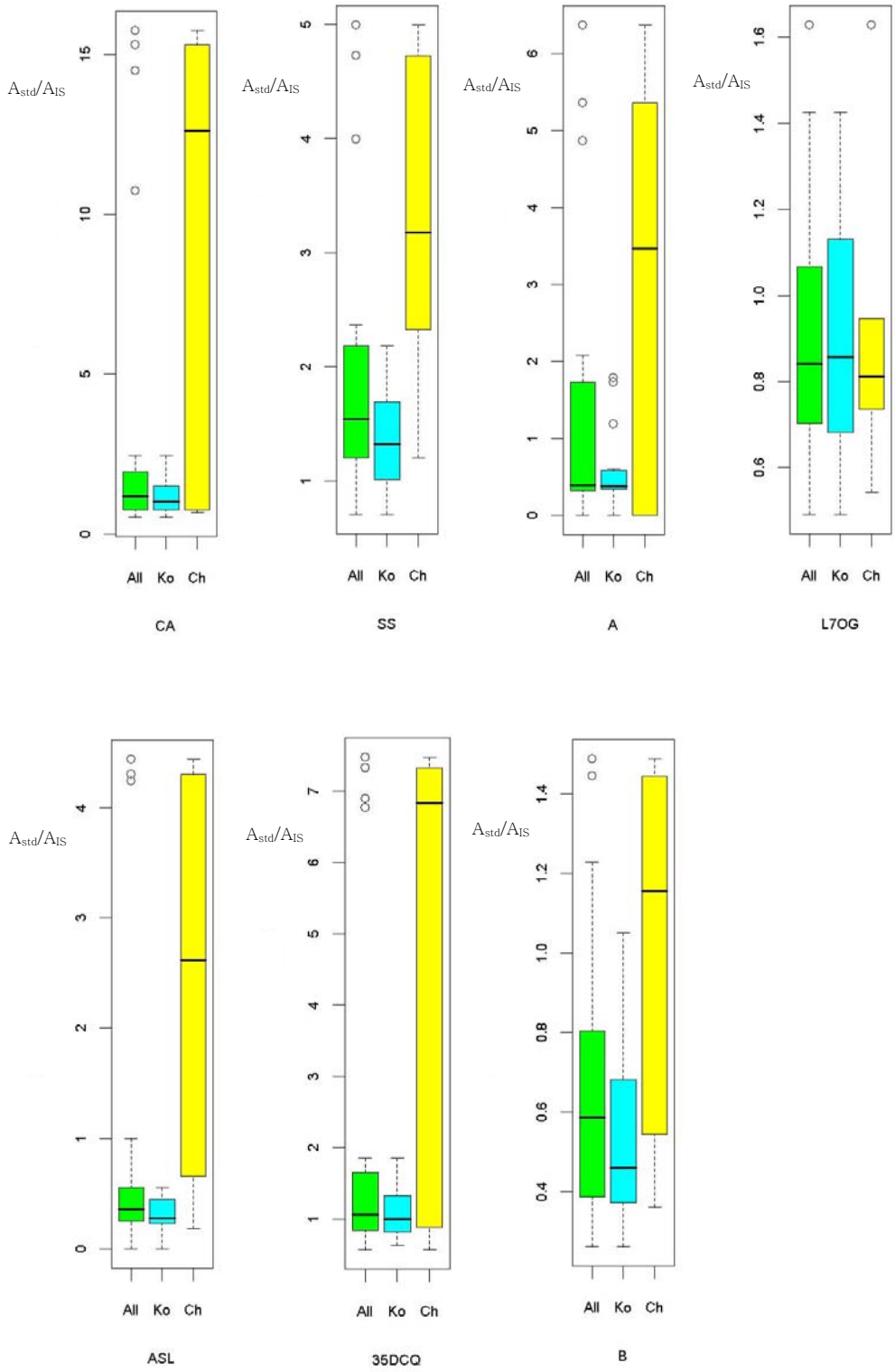


Fig. 1 1. B oxplot o f th e marker compounds fo r twenty -one samples.

CA: chlorogenic ac id, SS: swerosi de, L7OG: luteoli n 7- *O*-glucoside, A SL: (*E*)-aldosecologanin, 3 5DCQ: 3 ,5-dicaffeoylquinic acid , A and B: u nknown compounds

※ 패턴인식법에 의한 다변량 분석

산지별 21종의 국내산과 중국산 금은화에 대해 chlorogenic acid, sweroside, luteolin 7-*O*-glucoside, (*E*)-aldosecologanin, 3,5-dicaffeoylquinic acid 그리고 미지의 시료 A, B등 7개의 표준성분의 면적비를 변수로 하여 다변량 분석을 실시하였다.

㉮ 유사도의 평가

식품의약안전청(KFDA)에서 제공한 5종(No. 17-21)의 면적비를 표준으로 삼고 이를 이용하여 각 시료의 유사도를 평가하였으며, 유클리드 거리, 코사인, 면적비, 상관계수 등을 통해 21종 산지별 금은화의 유사도를 평가하였다. 계산식은 아래와 같다.

유클리드 거리 $d_{ir} = [\sum_{k=1}^{m} (X_{ik} - X_{rk})^2]^{1/2}$

코사인 $C_{ir} = \frac{\sum_{k=1}^{m} X_{ik} \times X_{rk}}{\sqrt{(\sum_{k=1}^{m} X_{ik}^2)(\sum_{k=1}^{m} X_{rk}^2)}}$

면적비 $A_{ir} = \frac{2\sum_{k=1}^{m} \min(X_{ik}, X_{rk})}{\sum_{k=1}^{m} (X_{ik} + X_{rk})}$

상관계수 $r_{ir} = \frac{\sum_{k=1}^{m} (X_{ik} - \overline{X_i})(X_{ik} - \overline{X_i})}{\sqrt{\sum_{k=1}^{m} (X_{ik} - \overline{X_i})^2 \sum_{k=1}^{m} (X_{ik} - \overline{X_i})^2}}$

Fig. 12에서 보는 바와 같이 cosine의 경우 G17, G19, G20 그리고 G21의 시료에 대하여 낮은 동질성을 나타냈으며, 나머지 시료에 대해서는 전반적으로 높은 동질성을 나타내었다. 상관계수를 유사성 척도로 삼았을 때 G1, G3, G6, G10, G17, G19, G20 그리고 G21의 시료에 대해서는 낮은 동질성을 나타냈으며, 나머지 시료에 대해서는 높은 동질성을 나타내었다. 마찬가지로 면적비를 척도로 삼았을 때 G17, G19 - G21의 시료에 대해서는 낮은 동질성을 나타내었으며, 나머지 시료에 대해서는 높은 동질성을 나타내었다. 거리는 G17 그리고 G19 - G21의 시료에 대해 표준시료와 높은 동질성을 나타내었으며, 나머지 시료의 대해서는 비교적 낮은 동질성을 나타내었다. 산지별 21종의 금은화의 표준성분에 대하여 거리, 상관계수, Cosine 그리고 면적비등의 척도로서 유사성을 알아본 결과 각 척도마다 서로 다른 특정 시료에 대하여 유사성이 떨어지는 것으로 나타났다. 완벽한 유사성을 나타내지 않지만 다른 척도에 비해 대체적으로 높은 동질성을 나타내는 Cosine과 거리를 유사성의 척도로 사용하는 것이 효율적이라고 판단되었다.

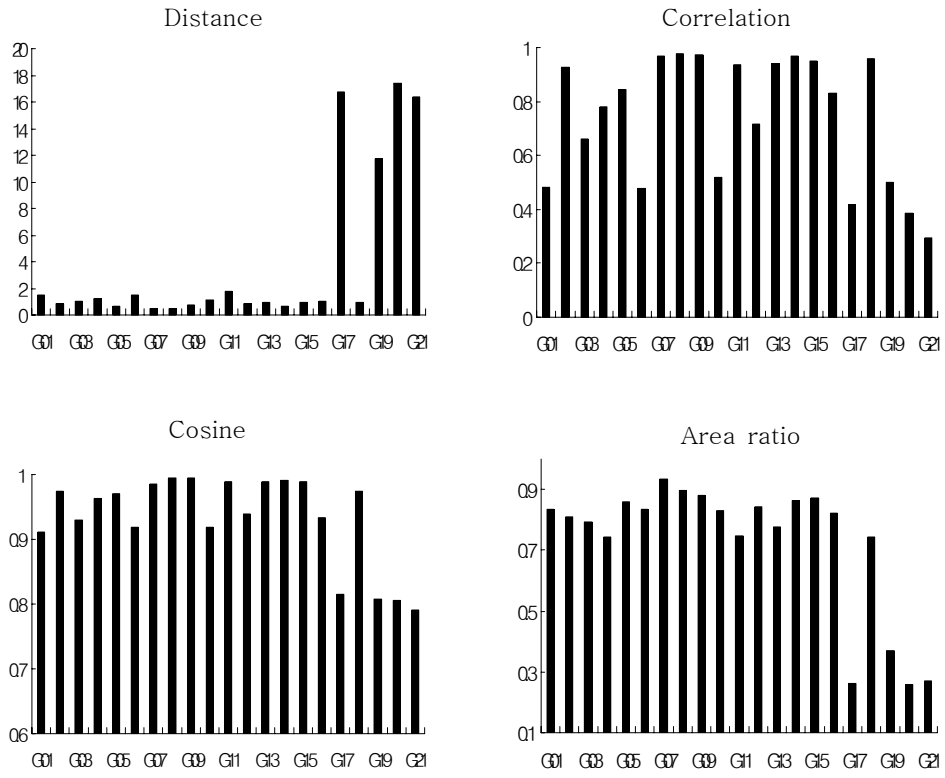


Fig. 1 2. Cosine, Ar ea ratio, Correlation and distance for similarity measurement.

㈏ 계층적 군집방법을 이용한 시료의 군집분석

산지의 정보를 무시하고 성분의 차이만으로 각각의 시료가 어떤 군집을 형성하는지 관찰하였다. 계층적 방법은 군집의 수를 미리 정하지 않고 계층적 구조의 군집을 형성하고 목적에 따라 묶는 방법으로서 작은 군집에서 출발하여 병합해 가는 병합적 방식의 agnes (Agglomerative nesting)와 hclust (Hierarchical clustering)가 있으며, 큰 군집에서 출발하여 분리해 나가는 분할적 방식 diana (Divisive analysis)가 있다.

산지별 21종의 국내산과 중국산 금은화에 대해 chlorogenic acid, sweroside, luteolin 7-*O*-glucoside, (*E*)-aldosecologanin, 3,5-dicaffeoylquinic acid 그리고 미지의 시료 A, B등 7개의 표준성분의 면적비를 변수로 하여 계층적 군집분석을 수행하였다. Fig. 13에 제시한 hclust에 의한 dendrogram을 보면 시료가 크게 두 개의 군집으로 나누어진 것을 볼 수 있다. 오른쪽의 작은 군집을 보면 시료 G17, G19, G20 그리고 G21이 유사도 평가의 거리의 척도에서 비교적 높은 막대그래프와 연관성을 가지며 오른쪽 군집에 속하는 나머지 시료들은 유사도 평가의 거리의 척도에서 낮은 막대그래프와 연관성을 가졌다. 이는 hclust 군집 분류가 거리를 기초로 하기 때문이다. Dendrogram상의 오른쪽 군집을 보면 중국산 시료들 중에 국내산 시료인 G17이 속해 있으며, 왼쪽의 군집도 마찬가지로 국내산 시료들 중에 중국산 시료인 G15, G16 그리고 G18이 속해 있었다. 이는 21종의 금은화 시료에 대하여 표준성분의 면적비를 변수로 하여 계층적 군집분석을 수행하였을 때 나타난 두 개의 군집은 국내산 중국산 두 곳의 산지별 군집과 일치하지 않는 것을 알 수 있다.

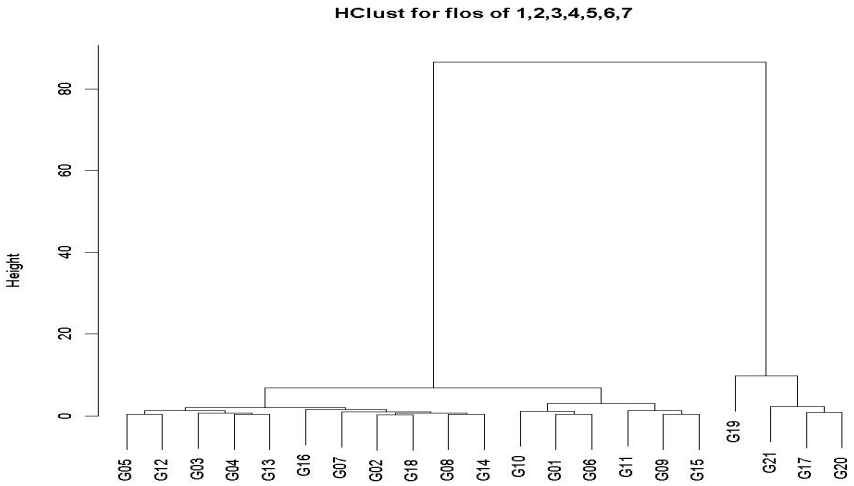


Fig. 1 3. The hierarchical clustering analys is of twenty-one *Lonicera japo nica* flowers samples.

㉰ 주성분 분석 (Principal components analysis)

주성분 분석은 다변량 자료로부터 변량을 대표하는 소수의 합성 변량을 구하고자 할 때 사용한다. principal compd와 예측을 위한 predict를 이용하여 21종의 금은화 시료에 대해 7개의 성분을 이용하여 주성분 분석을 수행하였다. Fig. 14를 보면 comp. 1과 comp. 2의 두 개의 주성분으로 21개의 시료가 크게 국내산과 중국산 두 개의 집단으로 분리 되고 있지만 앞의 계층적 군집분석과 마찬가지로 중국산 시료인 G15, G16 그리고 G18이 국내산으로 분류되는 경향이 강하였다.

㉱ 판별분석에 의한 시료의 산지 평가

판별분석은 산지 정보와 성분의 차이를 판별분석법을 적용하여 판별식을 계산하고 이 판별식을 통하여 미지 시료의 산지를 추정할 때 사용한다.

국내산과 중국산등 21종의 금은화 시료마다 각각 알려진 원산지 정보와 성분의 차이를 이용하여 판별식을 작성하고 이 판별식을 통하여 각 시료의 원산지를 추정하였다. Fig. 15를 보면 판별식의 값(out)이 양수인 것은 국내산 (○)이며, 음수인 것이 중국산 (△)일 때 중국산 시료인 G18이 국내산으로 분류되어 이상치를 나타내었다. 21개의 시료중 하나의 시료만이 판별식에 위배되므로 시료 G18 제외하면 어느 정도 정확성을 나타낸다고 할 수 있다. 하지만 총 21종의 시료 중 국내산이 15종인 것에 비해 중국산은 6종에 불과하므로 비교집단에 있어 시료의 개수가 균형적이지 않으며, 전체적인 시료의 수 또한 신뢰성 있는 결과를 얻기에 충분하지 않다. 그러므로 국내산과 중국산을 구분하기 위한 판별식에 신뢰성을 갖기 위해서는 각 산지별 시료가 충분히 확보되어야 한다고 사료된다.

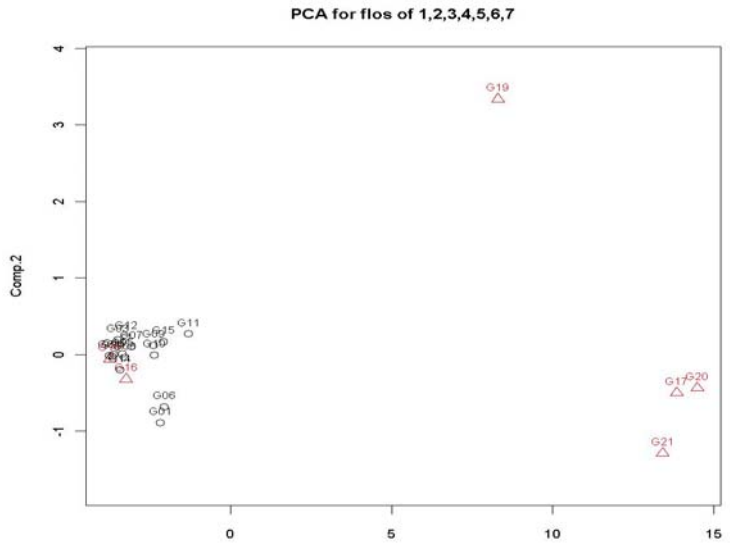


Fig. 1 4. Principal components analysis for th e pred iction of orig ins of twenty-one *Lonicera ja ponica* flowers. (Korea { ○}, China { △})

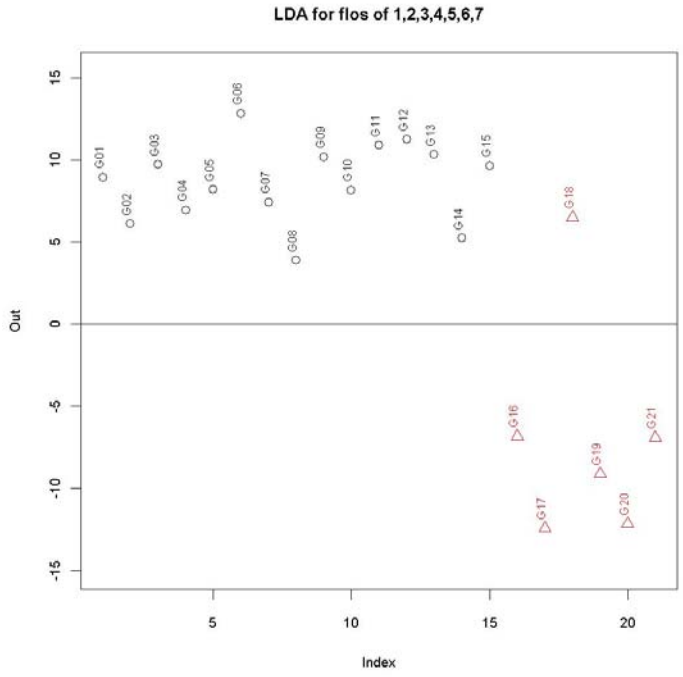


Fig. 1 5. R esult of linear discriminant analysis of the twenty-one *Lonicera j aponica* flowers samples for the pred iction of orig in for Ko rea (○) o r Chin a (△).

⑨ 금은화 DNA 분석 및 비교

DNA 분석을 통한 금은화 동정결과 21개의 동정시료 모두 금은화로 동정되었고, 금은화 감별마커 탐색 결과 127 bp, 198 bp에서 금은화 DNA 마커 밴드를 확인할 수 있었다 (한국한의학연구원).

Table XV. Id entification o f *Lonicera j aponica* flowers by DNA analysis

	NO.	기원식물	산지	기타	비고	동정결과
1	NO.1(ㄱ-10-13)	*L. japonica*	중국 밀현	미개화	서울시장수집 식약청 (No.1) (동국대 제공)	*Lonicera japonica*
2	NO.2(ㄱ-10-14)	*L. japonica*	경북 안동	거의개화	서울시장 수집 식약청 (No.2)(동국대 제공)	*Lonicera japonica*
3	NO.3(ㄱ-10-15)	*L. japonica*	중국 하남 정주(온현)	미개화	정주시장 수집 식약청 (No.3)(동국대 제공)	*Lonicera japonica*
4	NO.4(ㄱ-10-16)	*L. japonica*	중국 산동	개화+미개화	서녕시장 수집 식약청 (No.4)(동국대 제공)	*Lonicera japonica*
5	NO.5(ㄱ-10-17)	*L. japonica*	중국 하남	미개화	안국시장 수집 식약청 (No.5)(동국대 제공)	*Lonicera japonica*
6	NO.6(ㄱ-10-18)	*L. japonica*	중국 산동	미개화	영천시장 수집 식약청 (No.6)(동국대 제공)	*Lonicera japonica*
7	ㄱ-10-18		강원도 홍천군 내면	100,79g	경동 시장 (서울대 제공)	*Lonicera japonica*
8	ㄱ-10-19		경북 안동시 낙문동	100,18g	경동 시장(서울대 제공)	*Lonicera japonica*
9	ㄱ-10-20		전남 고흥	100,84g	경동 시장(서울대 제공)	*Lonicera japonica*
10	ㄱ-10-21		강원도 양양군 양양읍	100,42g	경동 시장 (서울대 제공)	*Lonicera japonica*
11	ㄱ-10-22		경북 봉화	100,68g	경동 시장(서울대 제공)	*Lonicera japonica*
12	ㄱ-10-23		강원도 강릉시 교이	100,38g	경동 시장(서울대 제공)	*Lonicera japonica*
13	ㄱ-10-24		충남 부여	100,27g	경동 시장(서울대 제공)	*Lonicera japonica*
14	ㄱ-10-25		강원도 고성군 거진읍	100,14g	경동 시장(서울대 제공)	*Lonicera japonica*
15	ㄱ-10-26		경북 의성	70,39g	경동 시장(서울대 제공)	*Lonicera japonica*
16	ㄱ-10-27		설악산	100,23g	경동 시장(서울대 제공)	*Lonicera japonica*
17	ㄱ-10-28		경북 청송군 청송읍 부곡리	100,95g	대구 약전시장(서울대 제공)	*Lonicera japonica*
18	ㄱ-10-29		경북 군위군 부계면 가오리	100,32g	대구 약전시장(서울대 제공)	*Lonicera japonica*
19	ㄱ-10-30		경북 울진군, 읍 내리	100,03g	대구 약전시장(서울대 제공)	*Lonicera japonica*
20	ㄱ-10-31		경북 안동	100,4g	대전 한약거리(서울대 제공)	*Lonicera japonica*
21	ㄱ-10-32		중국산	100,75g	경동 시장(서울대 제공)	*Lonicera japonica*

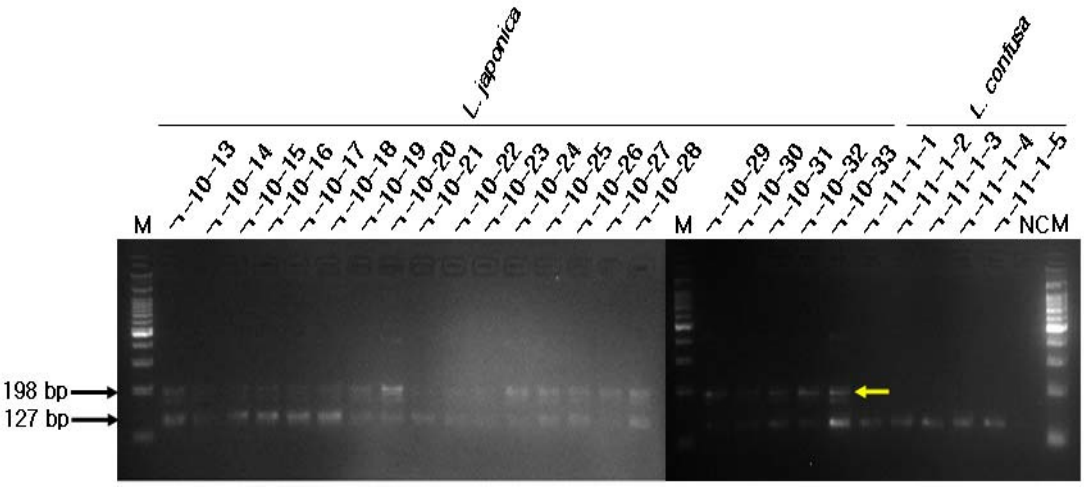


Fig. 16 . Th e result of PCR a nalysis of discriminative marker (primer LJ01F/LJ02F/LJ02R) f or *Lonicera japonica* flowers.
M: size marker

Table XV, Fig. 16의 DNA 분석결과를 볼 때 시중에 유통되고 있는 금은화 21종은 모두 동일하다는 것을 알 수 있었다. 즉 Fig. 9에서 보는 바와 같이 21종의 금은화에 함유된 표준물질이 비슷한 함량 패턴을 나타내며 또한 패턴분석을 볼 때 산지별 유의적인 차이를 나타내지 않으므로 시중에서 유통되고 있는 금은화는 모두가 동일한 종이며, 화학적으로도 같은 패턴임이 결론되어진다.

2절. 인동에 함유된 표준성분들의 표준분석법 개발

(1) LC/DAD를 이용한 인동의 표준분석법 개발

① 표준물질의 선정

인동에 함유된 phenolic compounds, iridoids 계열의 coniferin, loganic acid, demethylsecologanol, sweroside 그리고 loganin등 총 5종을 표준시료로 선정하여, 각각의 표준시료 약 1-2 mg을 메탄올 1 mL에 녹인 stock solution을 만든 후 원하는 농도로 희석하여 사용하였다. 정확한 정량분석을 위해 내부표준물질은 3,4,5-trihydroxybenzoic acid를 사용하였다. Fig. 1에 인동 표준물질들의 구조를 보여주고 있다.

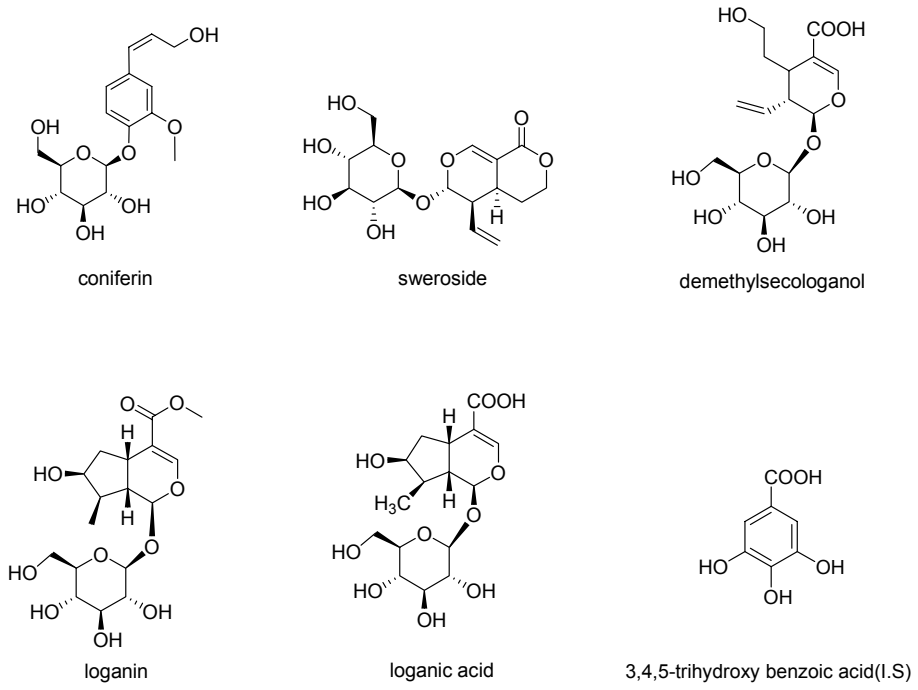


Fig. 1 . Chemical structures of standard compound in caulis *Lonicera j aponica.*

② TLC 분석

선정된 표준물질에 대하여 silica gel plate와 ODS plate에서의 일차적인 분리조건과 개략적 패턴을 분석하였다. 다양한 시도 결과 silica gel plate의 경우 EtOAc : MeOH : H_2O = 5.2 : 2.8 : 0.8의 전개 용매 조건으로 전개하였고 (Fig 2-a), ODS plate의 경우 55% 메탄올을 전개용매로 이용하여 전개하였다 (Fig 2-b). 이때 각 표준물질과 함께 함량분석을 실시할 24종의 소재별 인동 원시료 또한 동시 전개 하였으며, 발색시약으로 H_2SO_4, $FeCl_3$, I_2를 각각 사용하였다.

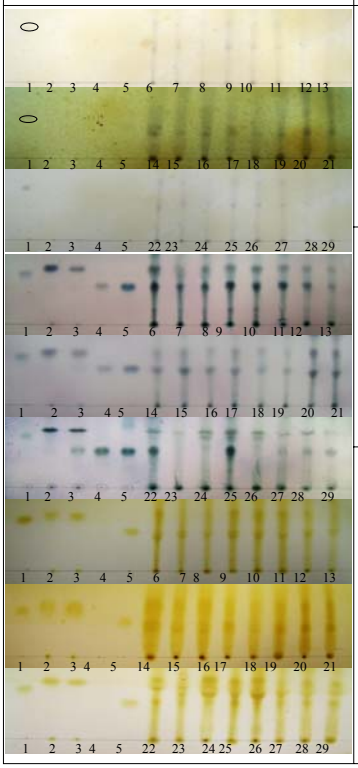
EtOAc : MeOH : H_2O = 5.2:2.8:0.8	Detection reagent	Compounds
	$FeCl_3$	1. c oniferin 2. loga nic a cid 3. de methylsecologanoside 4. swer oside 5. loga nin 6. Uije ongbu, gye onggi 7. Hong-c heon, ga ng-won 8. Gimpo, gye onggi 9. Cheong- song, gyung book 10. P ocheon, gye onggi 11. W ansan, ye ongcheon 12. Hwa san, ye ongcheon 13. Yong-mun, yangpyung 14. S ang-ju, gyung book 15. An-dong, gyung book 16. Yuseong, dae jeon 17. Ga nghwa 18. Dong-gu, dae jeon 19. Gimc heon, gyung book 20. China 21. Ga ng-won 22. Bong-hwa , gyung book (ste m) 23. Gyung-ju, gyung book (stem) 24. Gyung-ju, gyung book (le af) 25. S eoul (ste m) 26. S eoul (le af) 27. S andong, c hina (stem) 28. S andong, c hina (stem) 29. Ye ongcheon (ste m)
	H_2SO_4	
	I_2	

Fig. 2 -a. TLC pattern analy sis in silica gel plate.

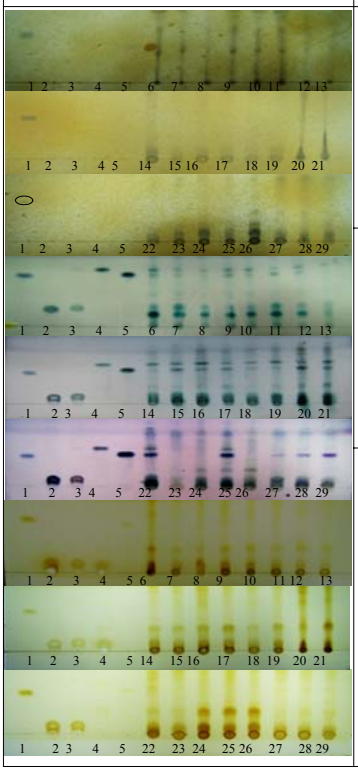
50% MeOH	Detection reagent	Compounds
	$FeCl_3$	1. c oniferin 2. loga nic a cid 3. de methylsecologanoside 4. swer oside 5. loga nin 6. Uije ongbu, gye onggi 7. Hong-c heon, ga ng-won 8. Gimpo, gye onggi 9. Cheong- song, gyung book 10. P ocheon, gye onggi 11. W ansan, ye ongcheon 12. Hwa san, ye ongcheon 13. Yong-mun, yangpyung 14. S ang-ju, gyung book 15. An-dong, gyung book 16. Yuseong, dae jeon 17. Ga nghwa 18. Dong-gu, dae jeon 19. Gimc heon, gyung book 20. China 21. Ga ng-won 22. Bong-hwa , gyung book (ste m) 23. Gyung-ju, gyung book (stem) 24. Gyung-ju, gyung book (le af) 25. S eoul (ste m) 26. S eoul (le af) 27. S andong, c hina (stem) 28. S andong, c hina (stem) 29. Ye ongcheon (ste m)
	H_2SO_4	
	I_2	

Fig. 2-b . TLC pattern analys is in ODS plate.

③ HPLC-DAD 조건의 확립

시료 분석을 위한 HPLC는 Agilent 1200 series로서 autosampler, column oven, binary pump, DAD detector (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany), degasser (Agilent Technologies, Tokyo, Japan)를 사용하였으며, software는 Agilent 사의 Chemstation software (Agilent Technologies, Avondale, CA, USA)를 사용하였다. HPLC 조건으로 컬럼 오븐의 온도는 35℃, 분석파장은 254 nm, 유속은 0.3 mL/min를 사용하였고, 컬럼은 Shiseido사의 Capcell Pak ODS UG120 (5 ㎛, 4.6 mm × 150 mm)를 사용하였다. 이동상은 A 용매로서 100% 3차 증류수와 B 용매 100% 메탄올로 각각 0.1% 포름산을 첨가하여 사용하였으며 용매계는 용매기울기 용리로서 Table Ⅰ에 나타내었다.

Table Ⅰ. Solv ent g radient con dition fo r HPLC-DAD

Final ti me (mi n)	Flow ra te (mL/min)	A[a)]	B[b)]
0	0.3	80	20
15	0.3	65	35
25	0.3	35	65
30	0.3	35	65
35	0.3	80	20

[a)] H_2O with 0. 1% formic aci d.

[b)] meth anol with 0. 1% f ormic acid.

④ 인동 시료의 추출방법 비교

인동 원시료는 자연건조 시켰다가 분말 형태로 마쇄한 후 사용하였다.

㉮ 용매별 분석으로 시료 200 mg에 100%, 70% 에탄올 수용액과 100%, 70% 메탄올 수용액을 각각 10 mL를 넣은 후 ultrasonication 방법으로 60분 추출하였다. 추출된 에탄올 수용액을 0.2 μm membrane filter로 거른 후 1 mL를 취해 10 ㎍ 내부표준물질을 포함한 메탄올을 첨가하여 이를 농축 시킨 후, 이동상인 20% 메탄올 수용액으로 녹여 20 ㎕를 컬럼 속으로 주입하여 분석하였다 (Table Ⅱ-a).

㉯ 실험 방법별 분석으로는 시료에 70% 에탄올 수용액을 첨가한 후, 각 시료를 vortex, reflux 그리고 ultrasonication의 방법으로 60분간 추출하여 분석 비교 하였다 (Table Ⅱ-b).

㉰ 추출 시간별 분석으로는 각 시료에 70% 에탄올 수용액을 첨가한 후 ultrasonication법을 사용하여 10분, 20분, 30분, 60분 그리고 90분을 각 시료별로 추출하여 분석 비교하였다 (Table Ⅱ-c).

Table Ⅱ (a~c)에 각 추출 방법별 정량 분석 결과를 보여주고 있다. 추출 용매로서는 70% 에탄올 수용액이 비교한 다른 용매에 비해 추출 효율이 좋았으며, 추출 방법으로는 ultasonication법이 reflux나 vortex법에 비해 비교적 간단하며, 추출 효율 또한 비슷하거나 더 좋았다. 마지막 추출 시간별 분석으로 여러 추출 시간을 비교한 결과 30분이 가장 효율적인 시간이었다.

Table Ⅱ-a. Compared with extraction solvent by 100%, 70 % EtOH, 100% an d 70% MeOH in aqueous (μg/mL, n= 3)

Compound	100% MeOH	70% MeOH	100% EtOH	70% EtOH
coniferin	240.78 ± 2. 31	213.98 ± 0. 13	212.39 ± 0.52	316.78 ± 0.52
loganic acid	1024.92 ± 8 .14	1022.54 ± 1 .47	908.51 ± 2.99	1297.39 ± 6. 89
demethylsecologanol	720.71 ± 6. 76	736.42 ± 1. 91	584.77 ± 1.06	1080.32 ± 3. 41
sweroside	2552.69 ± 1 1.82	2340.63 ± 5 .76	2369.82 ± 3. 51	3112.12 ± 1. 38
loganin	2684.19 ± 1 2.40	2469.96 ± 5 .63	2432.32 ± 5. 05	3279.19 ± 3. 48

Table Ⅱ-b. Compared w ith ex traction meth od by vortex, r eflux and sonicatio n (μg/mL, n=3)

Compound	Ultrasonication	Vortex	Reflux
coniferin	209.27 ± 0.28	192.18 ± 0. 49	263.08 ± 0. 55
loganic acid	1643.59 ± 2. 53	1541.74 ± 4 .12	2142.42 ± 6 .57
demethylsecologanol	882.19 ± 3.44	802.28 ± 1. 17	1130.16 ± 4 .40
sweroside	2209.88 ± 0. 96	2070.94 ± 3 .35	2901.31 ± 7 3.98
loganin	4426.22 ± 3. 19	4145.29 ± 4 .85	5684.27 ± 1 4.28

Table Ⅱ-c. Co mpared w ith extraction time by 10 min , 20 min , 30 min , 60 min and 90 min (μg/mL, n=3)

Compound	10 min	20 min	30 min	60 min	90 min
coniferin	234.64 ± 0. 41	238.13 ± 0.51	242.26 ± 0. 10	229.54 ± 0. 09	258.17 ± 0.60
loganic acid	1872.73 ± 3. 06	1927.52 ± 4.31	1957.30 ± 0. 73	1706.46 ± 1. 79	1931.79 ± 3 .19
demethylsecologanol	958.57 ± 2.02	996.58 ± 0 .84	1001.08 ± 2. 96	859.73 ± 0.68	979.36 ± 1. 04
sweroside	2509.36 ± 1. 39	2547.55 ± 3.93	2598.20 ± 2. 47	2276.60 ± 5. 35	2580.40 ± 1 .89
loganin	5063.54 ± 4. 63	5217.12 ± 7.63	5224.61 ± 4. 69	4519.42 ± 10 .79	5097.76 ± 4 .91

⑤ Validation

인동에 함유된 상기 5종의 표준물질에 대하여 제반 validation parameter를 측정하였다.

㉮ Specificity

표준시료에 대한 specificity는 LC에서의 retention time의 차이로 완전히 분리되었으며 각각의 화합물의 확인은 각각의 표준시료를 인동 원시료 와 동시 주입함으로써 완전히 확인되었다. Fig. 3에는 표준물질들의 분리된 크로마토그램을 보여주고 있다. 시료의 머무름 시간은 각각 14.33분에 coniferin, 15.90분에 loganic acid, 17.90분에 demethylsecologanol, 22.05분에 sweroside, 그리고 23.39분에 loganin성분들이 용출되었다.

㉯ Linearity and Range

정량분석을 위한 검량선으로 각 표준물질을 단계별 농도로 희석한 혼합용액을 반복분석하여 Table Ⅲ과 같은 결과를 얻었다. 각각의 시료에 대한 range 1-20 μg/mL 구간에서 conversion equation을 획득하였으며, correlation coefficient (R^2) 값은 0.998에서 1.000으로 높은 직선성을 나타내었다.

㉰ Detection limit and Quantitation limit

Detection limit 그리고 quantitation limit는 시그널 대 노이즈비 3 : 1과 10 : 1로서 각각 0.25 ~ 1.09 (μg/mL), 0.75 ~ 3.32 (μg/mL)의 높은 감도를 나타내었다. 이들 중에서 demethylsecologanol이 가장 낮은 측정한계 (detection limit 0.25 μg/mL, quantitation limit 0.75 μg/mL)를 나타내었고 loganin이

가장 높은 한계 (detection limit 1.09 mg/L, quantitation limit 3.32 mg/L)를 보여주었다. Table Ⅲ에 결과를 보여주고 있다.

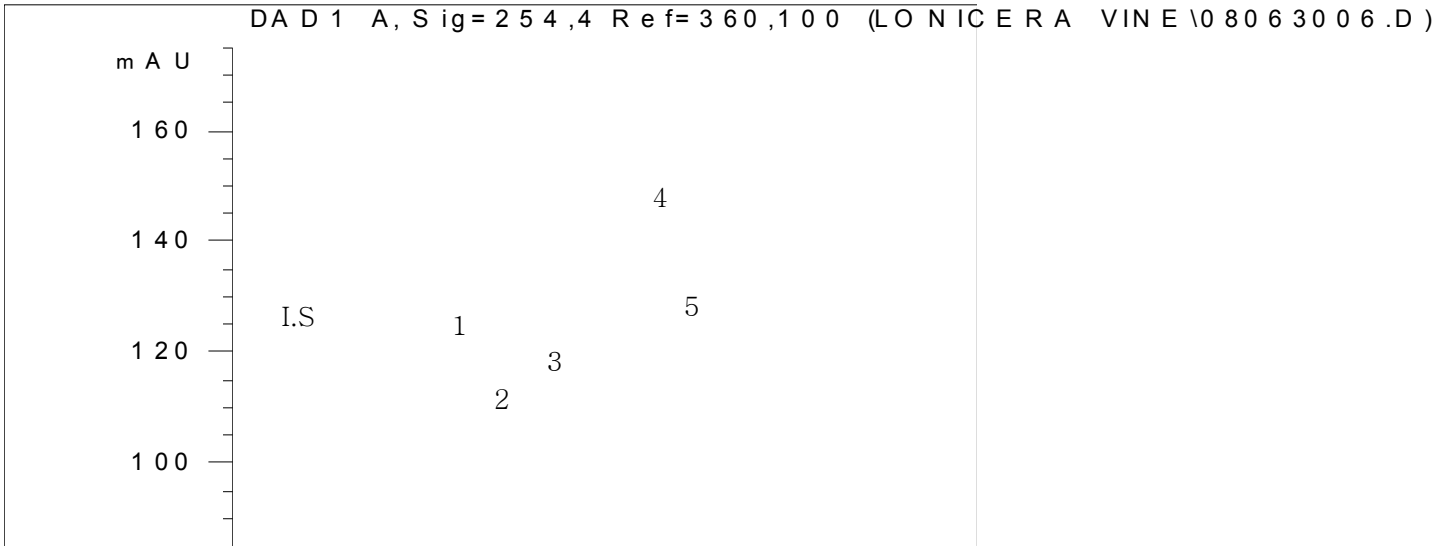


Fig. 3 . The chromatogram of standard compou nds b y D AD detector

1: con iferin, 2: loganic acid, 3: deme thylsecologanol, 4: sweroside, 5: log anin, I. S: 3, 4,5-trihydroxybenzoic acid.

Table Ⅲ. Calibration curves , LODs and LOQs o f f ive stand ard compounds

Compounds	Range (μg/mL)	Conversion equatio n[a)]	r^2	LOD[b)] (μg/mL)	LOQ[c)] (μg/mL)
coniferin	1 ~ 20	Y = 0. 18180X + 0.02239 0.	99	0.557	1.687
loganic aci d	1 ~ 20	Y = 0 .02735X - 0.00282	1.00	0.327	0.990
demethylsecologanol	1 ~ 20	Y = 0. 03862X + 0.00776	1.00	0.250	0.757
sweroside	1 ~ 20	Y = 0. 09848X + 0.00084 0.	99	0.657	1.990
loganin	1 ~ 20	Y = 0 .06499X - 0.01462	0.99	1.098	3.327

a) y: pe ak area, x: co ncentration of th e an alyte (μg/mL)

b) LOD: limit of detection

c) LOQ: li mit of qua ntification

r^2: c orrelation coefficient

㉣ Accuracy and Precision

Accuracy와 precision을 측정하는 방법으로는 spiking recovery 방법을 이용하였다. 자연 건조 시킨 후, 분말 형태로 마쇄한 인동을 20 mg 잰 후 여기에 coniferin, loganic acid, demethylsecologanol, sweroside, 그리고 loganin을 20 μg, 40 μg, 그리고 80 μg씩 각각 첨가하고, 70% 에탄올 수용액을 10 mL가 되게 넣은 후 ultrasonication 방법으로 30분간 추출하였다. 추출된 에탄올 수용액을 0.2 μm membrane filter로 거른 후 1 mL를 취해 10 μg 내부표준물질을 포함한 메탄올을 첨가하여 이를 농축하였다. 농축된 시료를 이동상 20% 메탄올 수용액 1 mL에 용해시킨 후 20 μL를 컬럼 속으로 주입하여 분석하였다. 일내 (intra-day)와 일간 (inter-day)에서의 회수율을 측정한 결과 최소 99.39%에서 최대 105.89%로서 높은 정확성을 나타냈으며 상대표준편차 (RSD)는 최소 0.14%에서 최대 3.28%로서 우수한 정밀성을 나타내었다 (Table Ⅳ).

Table Ⅳ. Precision and accuracy of th e five standard compounds

Compounds	Spiked amo unt (μg)	Intra-day (n = 5)		Inter-day (n = 5)	
		Recovery (%)	RSD (%)	Recovery (%)	RSD (%)
coniferin	2	101.19 0	.45	100.62	0.45
	4	100.08 0	.20	100.18	0.26
	8	99.90 0	.23	100.72	0.27
loganic acid	2	105.89 3	.15	102.50	1.99
	4	100.87 1	.96	100.88	0.96
	8	100.00 0	.56	100.10	0.58
demethylsecologanol	2	103.61 3	.28	100.86	1.65
	4	102.64 0	.59	101.94	0.71
	8	99.89 0	.31	100.25	0.38
sweroside	2	100.55 0	.57	101.14	0.86
	4	99.81 0	.16	100.27	0.48
	8	99.39 0	.16	99.61	0.14
loganin	2	100.02 0	.69	100.76	0.65
	4	99.64 0	.45	100.15	0.67
	8	101.64 1	.74	100.13	0.78

㈐ Reproducibility

5종의 표준물질을 반복 분석함으로써 각 peak의 면적비의 재현성 및 peak 머무름 시간의 재현성을 확인하였다. 각 peak 면적비의 상대표준편차는 최소 0.03%에서 최대 0.19%이었으며, 머무름 시간의 상대 표준편차는 최소 1.21%에서 최대 1.81%였다. Table Ⅴ에 결과를 보여주고 있다.

㈑ Robustness

1) 상기 5종의 표준시료에 대하여 Phenomenex사의 Gemini 5 μ C18 컬럼과 Agilent사의 ZORBAX Eclipse XDB-C18을 사용하여 분리능을 비교해 보았다. Phenomenex사의 Gemini 5 μ C18 컬럼의 경우 동일한 이동상 조건에서 모든 standard compounds는 분리가 되었으나 다른 컬럼에 비하여 전체적인 분석시간이 증가하였다. Agilent사의 ZORBAX Eclipse XDB-C18의 경우 표준물질간의 전체적인 머무름 시간과 분리능은 비슷하였으나 인동 원시료를 분석하였을 시 표준물질과 미지의 물질간의 분리능이 떨어졌다. 따라서 컬럼은 Shiseido사의 CAPCELL PAK C18 UG120 컬럼이 인동 분석 시 분리능이 훨씬 더 우수하였다 (Fig. 4). Table Ⅵ에는 용량계수 (k′), 선택성 (α), 이론단수 (N) 그리고 분리도 (Rs)로써 수치적 결과를 나타내었다.

2) 시료 분석 시 컬럼 오븐의 온도에 따른 분리능의 비교 분석으로서 동일한 조건하에 컬럼 오븐의 온도만을 25, 30, 35, 40 그리고 45℃로 바꾸어 이를 비교분석하여 용량계수 (k′), 선택성 (α), 이론단수 (N) 그리고 분리도 (Rs)로 나타내었다 (Table Ⅶ). 분석결과 온도가 높아질수록 coniferin과 loganin의 분리도가 떨어지는 경향을 보였으며, 인동 원시료 분석 시 표준물질의 peak와 미지 물질의 peak가 겹치는 경향을 보였다. 따라서 컬럼의 분석온도는 모든 표준물질이 뚜렷이 분리가 이루어지는 35℃가 우수하였다.

Table Ⅴ. R eproducibility o f th e fiv e standard co mpounds

Compounds	Peak ar ea r atio (peak area/IS ar ea)			Retention time (min)		
	Mean	SD	RSD (%)	Mean	SD	RSD (%)
coniferin	0.85	0.00	0.05	14.33	0.25	1.74
loganic aci d	0.52	0.00	0.09	15.90	0.29	1.81
demethylsecologanol	0.52	0.00	0.19	17.90	0.29	1.60
sweroside	2.28	0.00	0.03	22.05	0.27	1.21
loganin	1.13	0.00	0.13	23.39	0.29	1.22

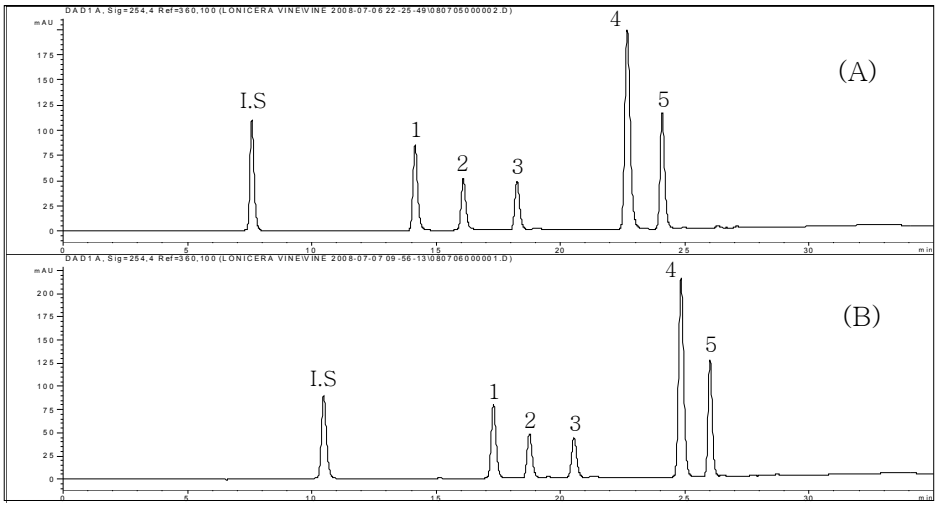


Fig. 4 . The chromatogram of s tandard compou nds b y A gilent ZO RBAX Eclip se XDB-C18 (A) and Phenomenex Gemini 5 μ C18 column (B).

1: con iferin, 2: loganic acid, 3 : demethylsecologanol, 4 : sweroside, 5: loganin, I .S: 3,4,5-trihydroxybenzoic acid.

Table Ⅵ. C ompared with typ e of colu mn

Columns	Surface area/cm2	Pore size (Ao)	Analytes				
			coniferin	loganic a cid	demethylsecologanol	sweroside	loganin
Theoretical plate (N)							
Shiseido C APCELL PAK C_{18} UG120	287	95	30260.00 ± 510. 49	39002.00 ± 560.89	44758.00 ± 556. 18	57276.26 ± 624.36	92897.00 ± 1168.34
Phenomenex Gemini 5 μ C_{18}	383	104	39417.00 ± 514. 85	44325.33 ± 553.77	49956.67 ± 590. 00	76078.33 ± 830.74	123533.67 ± 1908.80
Agilent Z ORBAX Eclipse XDB-C_{18}	180	80	30822.00 ± 556. 90	37342.33 ± 403.20	43492.33 ± 608. 87	57332.67 ± 132.40	72175.33 ± 0.00
Capacity f actor (k ')							
Shiseido C APCELL PAK C_{18} UG120	287	95	1.18 ± 0.01	1.48 ± 0. 01	1.81 ± 0. 01	2.49 ± 0.01	2.70 ± 0.01
Phenomenex Gemini 5 μ C_{18}	383	104	1.66 ± 0.00	1.88 ± 0. 01	2.16 ± 0. 00	2.82 ± 0.00	3.00 ± 0.00
Agilent Z ORBAX Eclipse XDB-C_{18}	180	80	1.51 ± 0.01	1.79 ± 0. 01	2.13 ± 0. 01	2.81 ± 0.01	3.02 ± 0.01
Separation f actor (α)							
Shiseido C APCELL PAK C_{18} UG120	287	95	6.93 ± 0.13	1.25 ± 0. 00	1.22 ± 0. 01	1.38 ± 0.00	1.09 ± 0.00
Phenomenex Gemini 5 μ C_{18}	383	104	2.69 ± 0.03	1.13 ± 0. 00	1.15 ± 0. 00	1.31 ± 0.01	1.06 ± 0.00
Agilent Z ORBAX Eclipse XDB-C_{18}	180	80	3.07 ± 0.00	1.18 ± 0. 00	1.19 ± 0. 00	1.32 ± 0.00	1.08 ± 0.01
Resolution (R s)							
Shiseido C APCELL PAK C_{18} UG120	287	95	21.31 ± 0.13	5.87 ± 0. 02	6.39 ± 0. 01	10.94 ± 0.07	4.04 ± 0.03
Phenomenex Gemini 5 μ C_{18}	383	104	19.34 ± 0.02	4.09 ± 0. 02	4.93 ± 0. 02	11.77 ± 0.03	3.55 ± 0.01
Agilent Z ORBAX Eclipse XDB-C_{18}	180	80	17.69 ± 0.05	4.75 ± 0. 05	5.79 ± 0. 03	12.21 ± 0.06	3.40 ± 0.01

Table Ⅶ. Compared with temper ature of colu mn oven

Temperature (℃)	Analytes				
	coniferin	loganic a cid	demethylsecologanol	sweroside	loganin
Theoretical plate (N)					
25	31956.67 ± 458.50	38317.00 ± 281.51	44951.67 ± 609. 71	67969.33 ± 51. 64	103215.33 ± 4064.81
30	31946.00 ± 844.56	37773.00 ± 1178.10	43999.00 ± 1359. 46	59198.33 ± 1405. 63	84204.33 ± 1351.77
35	29825.00 ± 596.92	36147.67 ± 637.27	42169.67 ± 740. 17	56038.67 ± 762. 36	71067.67 ± 170.42
40	27732.00 ± 936.31	34245.33 ± 348.33	39417.33 ± 1548. 80	53077.67 ± 531. 74	62570.67 ± 2104.56
45	26748.00 ± 102.68	31441.67 ± 1056.21	37396.00 ± 818. 11	49995.00 ± 1187. 00	60890.67 ± 896.68
Capacity f actor (k ')					
25	1.74 ± 0. 01	2.09 ± 0.01	2.48 ± 0.00	3.10 ± 0. 01	3.28 ± 0. 01
30	1.61 ± 0. 01	1.69 ± 0.42	2.29 ± 0.01	2.94 ± 0. 01	3.14 ± 0. 01
35	1.49 ± 0. 01	1.76 ± 0.01	2.10 ± 0.01	2.77 ± 0. 01	2.98 ± 0. 01
40	1.37 ± 0. 01	1.61 ± 0.01	1.93 ± 0.01	2.61 ± 0. 01	2.83 ± 0. 01
45	1.26 ± 0. 01	1.46 ± 0.01	1.76 ± 0.01	2.46 ± 0. 01	2.67 ± 0. 01
Separation f actor (α)					
25	2.70 ± 0. 01	1.20 ± 0.01	1.19 ± 0.01	1.25 ± 0. 00	1.06 ± 0. 01
30	2.90 ± 0. 02	1.19 ± 0.00	1.19 ± 0.00	1.29 ± 0. 01	1.07 ± 0. 00
35	3.15 ± 0. 03	1.39 ± 0.36	1.19 ± 0.01	1.32 ± 0. 00	1.08 ± 0. 00
40	3.40 ± 0. 03	1.17 ± 0.00	1.20 ± 0.01	1.36 ± 0. 01	1.08 ± 0. 00
45	3.66 ± 0. 02	1.16 ± 0.00	1.20 ± 0.00	1.40 ± 0. 00	1.09 ± 0. 00
Resolution (R s)					
25	17.62 ± 0. 13	5.66 ± 0.06	6.05 ± 0.09	9.74 ± 0. 12	2.96 ± 0. 02
30	17.81 ± 0. 15	5.21 ± 0.08	5.91 ± 0.04	10.24 ± 0. 12	3.22 ± 0. 01
35	17.41 ± 0. 15	4.68 ± 0.05	5.72 ± 0.08	10.82 ± 0. 07	3.40 ± 0. 02
40	17.07 ± 0. 27	4.15 ± 0.03	5.44 ± 0.03	11.28 ± 0. 03	3.49 ± 0. 02
45	16.83 ± 0. 07	3.58 ± 0.01	5.22 ± 0.02	11.77 ± 0. 13	3.55 ± 0. 02

㈏ Stability

인동 시료를 상온 (25℃) 그리고 냉장 (4℃)에서 각기 보관한 후, 두 시료를 일정한 날짜의 간격을 두고 정량분석하여 시간의 따른 표준시료의 함량 차이를 비교함으로써 표준시료의 안전성을 살펴보았다. 시료를 상온에 보관할 경우 demethylsecologanol의 함량이 감소하는 경향을 보였으며, sweroside는 증가하는 경향을 보였다. 시료를 냉장에 보관할 경우 대부분의 표준물질이 비교적 안정하였다. Table Ⅷ에 수치화된 결과를, Fig. 5에 도식화된 결과를 나타내었다.

Stability test (상온)

Stability test (냉장)

Fig. 5 . Stability of standard co mpounds in n ormal temp erature and cold temp erature.

Table Ⅷ. The result of stability of standard compounds in normal and cold temperature (%)

Analytes	Temp.	Day								Mean	SD	RSD
	(℃)	1	3	5	7	15	20	25	30			(%)
coniferin	R.T.	100.00	98.65	99.11	94.	96	94.78	96.	33	91.94	96.	54	2.88	2.99	2.99
	4℃	100.00	91.96	91.18		90.98	93.57	93.	20	93.17	93.	44	3.07	3.29	3.29
loganic acid	R.T.	100.00	98.67	99.86	99.	37	99.78	100.	86	99.47	99.	72	0.67	0.67	0.67
	4℃	100.00	100.	55	100.11	99.	91	98.00	100.55	99.05		99.74	0.92	0.92	0.92
demethylsecologanol	R.T.	100.00	97.96	46.91	24.	09	19.34	19.	61	14.31	46.	03	37.66	81.	81	81.81
	4℃	100.00	99.96	100.11		99.91	98.00	100.	55	99.05	99.	65	0.86	0.86	0.86
sweroside	R.T.	100.00	106.	56	115.62	121.	04	121.48	122.	21	124.12	115.	86	9.17	7.92	7.92
	4℃	100.00	101.	33	103.05	100.	72	103.80	106.	20	107.52	103.	23	2.83	2.74	2.74
loganin	R.T.	100.00	99.	98	99.99		100.09	100.90	100.	28	100.68	100.	27	0.37	0.37	0.37
	4℃	100.00	100.	17	100.24	100.	26	100.81	101.	04	101.29	100.	55	0.50	0.49	0.49

⑥ HPLC-DAD-ESI-MS를 이용한 표준물질의 동정

인동에 함유된 표준물질의 동정에 있어 HPLC-DAD를 통해서는 머무름 시간의 일치를 통한 chromatogram상의 시각적인 정보만을 얻을 수 있다. 그래서 HPLC-DAD-MS/MS를 통해 인동 시료에 함유된 표준물질의 머무름 시간과 *m/z*값 및 fragment의 패턴을 확인함으로써 시료내의 표준물질을 동정하였다.

질량분석기는 HPLC (Agilent 1200 series)를 inlet으로 사용하였으며, *m/z*비 2000까지의 범위를 수용할 수 있는 Finnigan electrospray source가 결합된 Finnigan MAT LCQ ion-trap mass spectrometer (San Jose, CA, USA)를 사용하여 분석하였고 software는 Xcalibur (Finnigan MAT)를 사용하였다. 질량분석의 조건은 각 표준물질의 최적의 감도를 고려해 물질별로 나누어 설정하였다. Table Ⅸ에 분석 파라미터들을 나타내었다.

Table Ⅸ. Analytical parameters for HPLC-ESI-MS

<ESI source>	Method 1	Method 2	Method 3	Method 4
Sheath gas flow rate (arb)	80.00	80.00	80.00	80.00
Aux gas flow rate (arb)	20.00	20.00	20.00	20.00
Spray voltage (kV)	7.00	4.50	7.00	7.00
Capillary temp (℃)	250.00	250.00	250.00	250.00
Capillary voltage (V)	27.50	34.00	15.00	24.00
Tube lens offset (V)	-17.00	-20.00	-25.00	6.00
<Ion optics>				
Compounds	coniferin	loganic acid	demethylsecologanol	sweroside, loganin
Octapole 1_offset (V)	-0.50	-0.75	-0.50	-2.00
Lens voltage (V)	-16.00	-16.00	-84.00	-34.00
Octapole 2_offset (V)	-5.00	-4.50	-4.50	-4.50
Octapole RF amplitude (V p-p)	400.00	400.00	400.00	400.00

분석하기 전 먼저 MS에 각 표준물질을 직접 주입하여 scan함으로써 각 성분들의 *m/z*값 및 fragment ion의 패턴을 확인하였다. 표준시료들은 전부 양이온 모드에서 검출되었으며, Fig. 6에 시료들의 scan스펙트럼을 보여주고 있다. 위의 정보를 바탕으로 HPLC-DAD-ESI-MS 분석을 실시하였다. 컬럼과 이동상은 앞에서 언급한 동일한 LC조건으로 분리하였으며, 각 표준성분들의 특성피크를 선택하여 SRM 모드를 사용하여 분석하였다. 분석결과 coniferin은 14.37분, loganic acid는 15.96분, demethylsecologanol는 17.22분, sweroside는 22.05분 그리고 loganin는 23.38분의 retention time 차이로 완전히 분리되었으며, 분리된 각 표준성분들의 특성피크를 확인한 결과 coniferin는 *m/z* : 365 > 185으로, loganic acid는 *m/z* : 399 > 381로, demethylsecologanol는 *m/z* : 399 > 237로, sweroside는 *m/z* : 381 > 219로, 그리고 loganin는 *m/z* : 413 > 251로, 직접주입 하였을 때의 값들과 비교하였을 때 분리된 각 성분들의 *m/z*값 및 fragment ion의 패턴이 동일함을 확인함으로써 시료내의 표준성분들을 동정

하였다. Table Ⅹ에 각 peak에 대한 분석결과를 나타내었으며 Fig. 7에서 분리된 SRM 크로마토그램을 보여주고 있다.

Table Ⅹ. HPLC-DAD-MS/MS data o f th e fiv e bio active co mpounds in cau lis *Lonicera ja ponica*

MW[a)]	MS (*m/z*)	MS/MS (*m/z*)	C.E[b)]	Ion mode	Identification
342	365	185	32	Positive	coniferin
376	399	381	26	Positive	loganic acid
376	399	237	30	Positive	demethylsecologanol
358	381	219	40	Positive	sweroside
390	413	251	30	Positive	loganin

a) mol ecular wei ght.

b) collision energy.

⑦ 인동 시료의 정량분석

시중에서 구입한 중국산과 국내산 인동을 제시된 실험방법으로 정량 분석하였다. crude sample의 분리된 크로마토그램을 Fig. 8에서 보여주고 있고, Fig. 9에 정량분석된 결과를 도식화하였다. 산동에서 구입한 중국산과 의정부, 홍천, 김포, 청송, 포천, 완산, 화산, 양평, 상주, 안동, 유성, 강화, 대전, 김천, 강원도, 봉화, 경주, 서울 그리고 영천에서 구입한 국내산을 정량분석하여 비교한 결과 24종의 인동에 함유된 생리활성 물질의 함량은 대체적으로 불규칙적이었으며, 대체적으로 coniferin, loganic acid 그리고 demethylsecologanol은 낮은 함량을 가졌고 sweroside 그리고 loganin은 높은 함량을 가졌다. 또한 전반적인 활성 물질의 함량을 볼 때 서울산이 가장 높았다. Table Ⅺ에 정량분석된 데이터를 보여주고 있다.

Table Ⅺ. The results of quan titative analysis of caulis *Lonicera japo nica* fro m various regio ns (μg/mL)

Samples	coniferin	loganic a cid	demethylsecologanol	sweroside	loganin
Uijeongbu	155.14	1168.64	365.49	7029.87	1291.37
Hongcheon	64.94	488.95	120.97	2842.11	1096.85
Gimpo	128.32	514.86	205.60	3360.85	687.41
Cheongsong	217.04	1044.87	347.81	6974.89	2062.74
Pocheon	208.56	853.62	687.23	8335.13	987.78
Wansan	159.25	839.28	155.19	3394.63	2291.35
Hwasan	155.31	1035.00	-	8412.94	1553.55
Yong-mun	-	961.77	-	4031.45	151.99
Sangju	-	599.77	178.90	6146.61	392.33
Andong	420.74	1631.54	95.24	4715.45	3241.19
Yuseong	-	1198.66	-	4158.96	866.46
Ganghwa	99.15	1466.63	214.41	2380.97	1542.08
Dong-gu	-	1651.58	-	3081.24	674.78
Gimcheo	-	705.29	-	3971.13	369.23
China	74.07	2410.59	41.95	1326.68	1974.00
Gangwon	46.93	1289.82	94.87	2382.44	702.51
Bonghwa	204.22	1092.22	205.40	3541.88	4213.94
Gyungju (stem)	15.78	-	-	374.55	55.05
Gyungju (leaf)	105.33	-	-	640.08	-
Seoul (s tem)	81.69	1543.54	469.60	4600.27	7003.21
Seoul (leaf)	72.55	636.78	-	829.47	-
Sandong, Chi na (s tem)	43.83	416.89	36.04	862.61	723.63
Sandong, Chi na (s tem)	98.77	3019.19	57.21	1704.80	1305.29
Yeongcheon (stem)	215.83	822.55	266.35	4094.85	2792.49

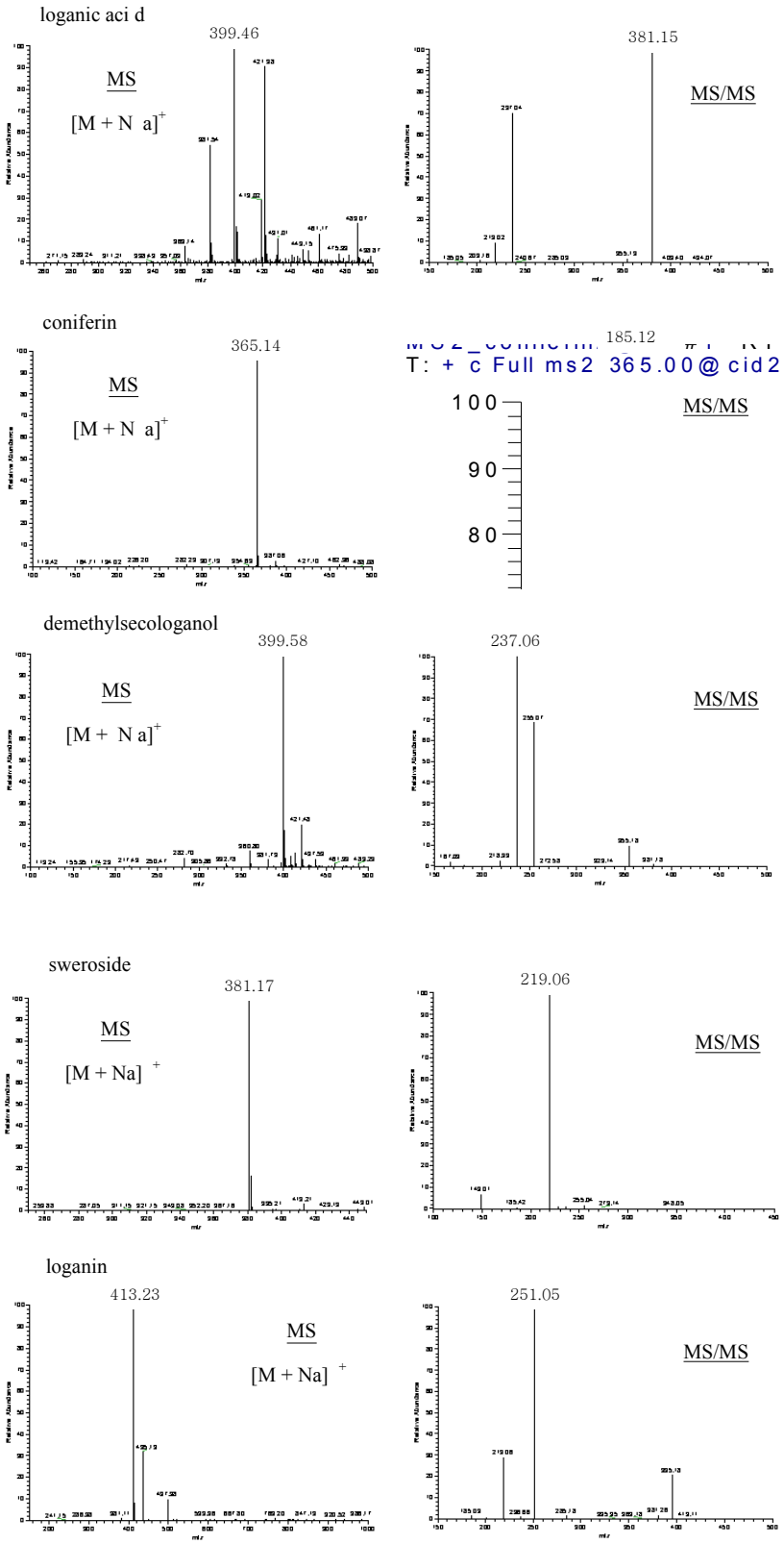


Fig. 6 . Mass spectrum (scan mode) of standard compounds.

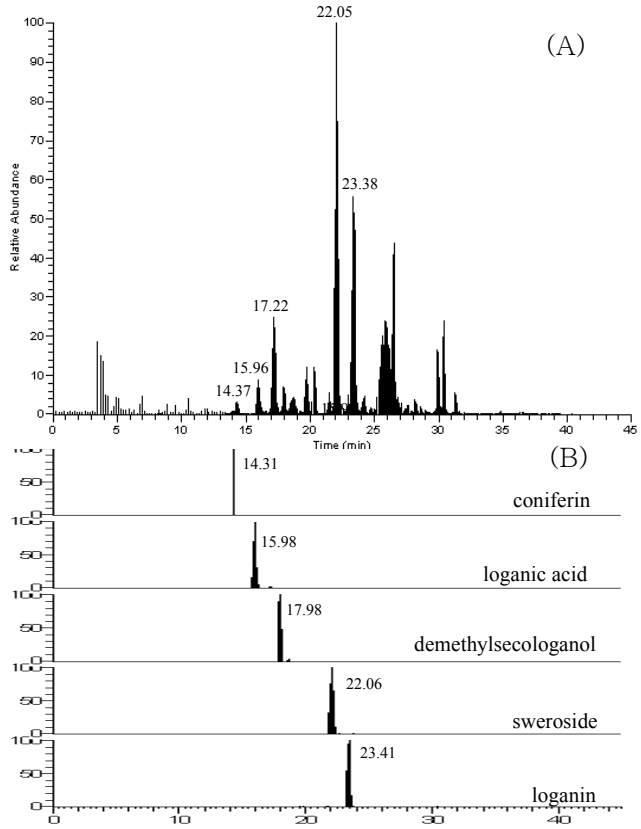


Fig. 7 . Total ion chromatograms o f cau lis *Lonicera ja ponica* in SIM mode (A) an d SRM mode (B).

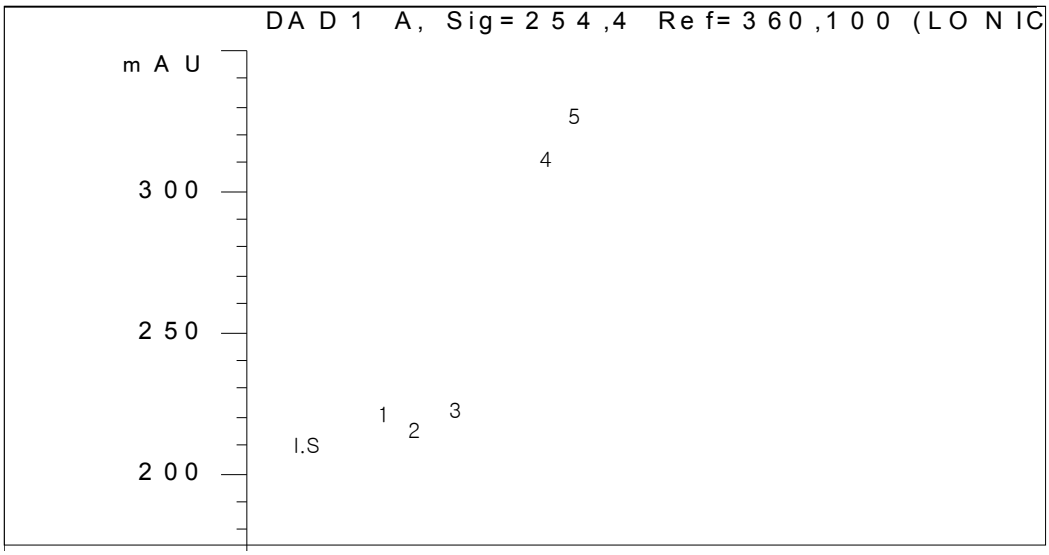


Fig. 8 . The chromatogram of crud e sample by DA D detector.

1: con iferin, 2: loganic acid, 3 : demethylsecologanol, 4 : sweroside, 5: loganin, I .S: 3,4,5-trihydroxybenzoic acid.

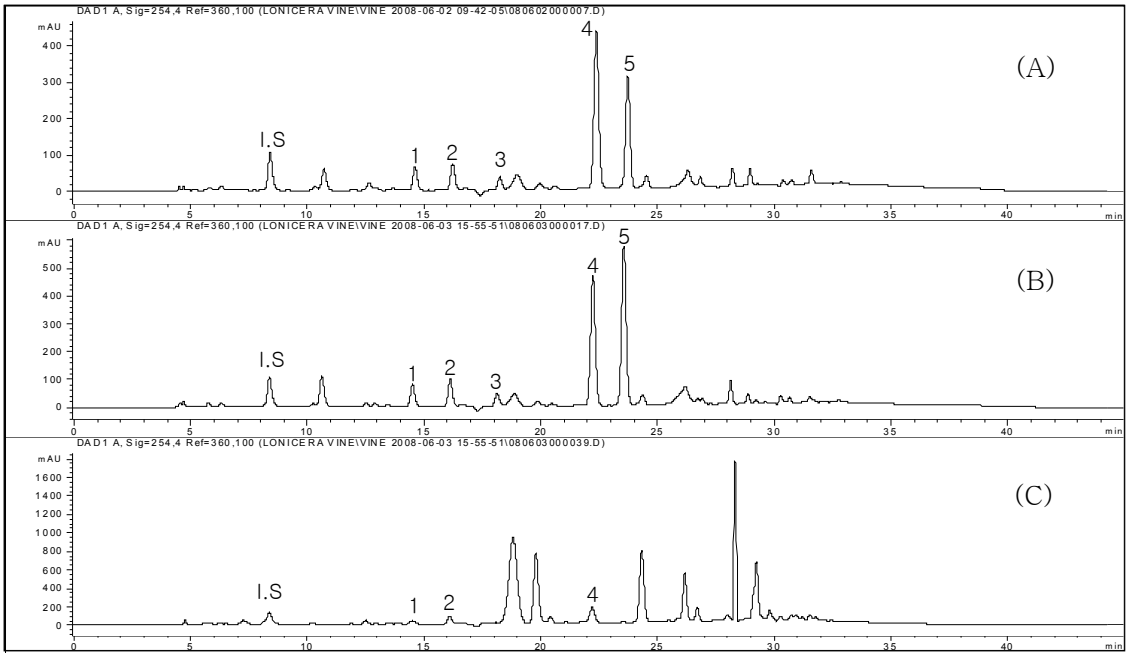
(μg/g)

H-1: Uijeo ngbu, Gyeon ggi
H-2: Ho ngcheon, Gangwon
H-3: Gimpo , Gyeonggi
H-4: C heongsong, Gyungbook
H-5: Po cheon, Gyeon ggi
H-6: Wansan, Yeon gcheon
H-7: Hwasan, Yeong cheon
H-8: Yo ng-mun, Yang pyung
H-9: Sang ju, Gyungbook
H-10: Ando ng, Gyungbook
H-11: Yuseong , Daejeo n
H-12: Gan ghwa, Gyunggi
H-13: Dong -gu, Daejeo n
H-14: Gimcheon , Gyun gbook
H-15: China
H-16: Ga ngwon
H-17: Bo ngnwa, Gy ungbook (stem)
H-18: Gyu ngju, Gy ungbook (stem)
H-19: Gyu ngju, Gy ungbook (leaf)
H-20: Seoul (stem)
H-21: Seoul (leaf)
H-22: Sando ng, C hina (stem)
H-23: Sando ng, C hina (stem)
H-24: Yeong cheon (stem)

Fig. 9 . Quantitativ e analy sis o f cau lis *Lonicera ja ponica* v arious regions.

⑧ 인동의 사용부위 변경에 따른 표준물질 함량 패턴 비교

인동의 사용부위가 2007년 12월 개정 공표된 대한약전 제9개정판에 의하면 줄기 (stem)로부터 줄기 및 잎 (leaf and stem) 으로 변경됨에 따라 인동의 줄기 (stem) 및 잎 (leaf), 잎 및 줄기 (leaf and stem)에 대하여 각각 표준물질의 패턴을 비교분석하였다 (Fig. 10).



1: coniferin, 2 : lo ganic acid, 3: demethylsecologanol, 4 : sweroside, 5: loganin , I.S: 3,4,5 -trihydroxybenzoic acid.

Fig. 1 0. The chromatogram of *Lonicera* caulis, (A): stem and l eaf, (B): stem, (C): leaf

총 24종의 산지별 인동시료 중 H1～H16은 줄기와 잎을 시료로 사용하여 분석하였으며, H17, H18, H20, H22～H24는 줄기만을 시료로, 그리고 H19와 H21은 잎만을 시료로 하여 분석하였다. Fig. 10에 각 시료의 크로마토그램을 나타내었다. 크로마토그램을 보면 줄기와 잎을 시료로 하여 분석하였을 때와 줄기만을 시료로 하여 분석하였을 때 각 표준물질 peak패턴이 비교적 비슷하였다. 하지만 잎만을 시료로 하여 분석하였을 시 줄기와 잎을 시료로 하여 분석하거나 줄기만을 시료로 하여 분석하였을 때와 전혀 다른 peak 패턴으로 표준물질의 peak가 작거나 나타나지 않으며, 표준물질의 peak외에 미지의 peak들이 주요 peak로 나타났다. Table XII는 줄기와 잎을 시료로 하여 분석하였을 때와 줄기만을 시료로 하여 분석하였을 때 그리고 잎만을 시료로 하여 분석하였을 때의 각 표준성분들의 함량을 수치화하여 나타내었다. Table XII를 보면 각 표준 성분들의 함량이 큰 표준편차를 가짐으로 각 시료별 표준성분 함량이 일관성을 나타내지 않음을 알 수 있었다. 또한 줄기와 잎을 시료로 하였을 때와 줄기만을 시료로 하였을 때의 각 표준 성분들의 함량을 비교하였을 시 두 시료는 비슷한 함량 패턴을 가졌으며, 줄기와 잎을 시료로 하여 분석하였을 때 coniferin, demethylsecologanol 그리고 sweroside의 함량이 줄기만을 시료로 하여 분석하였을 때 보다 더 높게 나타났고 줄기만을 시료로 하여 분석하였을 시 loganic acid와 loganin의 함량이 줄기와 잎을 시료로 하여 분석하였을 때보다 더 높게 나타났다. 하지만 잎만을 시료로 하여 분석하였을 때는 표준물질들의 함량이 적거나 peak가 나타나지 않았으며, 미지의 성분 peak가 주요 peak로 나타남으로써 줄기와 잎을 시료로 하여 분석하였을 때와 줄기만을 시료로 하여 분석하였을 때의 표준물질의 함량패턴과 전혀 다르게 나타났다.

Table XII. Compared with concentration of stem and leaf of *Lonicera* (μg/g)

	stem and leaf			stem			leaf		
	mean	SD	RSD (%)	mean	SD	RSD (%)	mean	SD	RSD (%)
coniferin 157	.22	103.67	65.94	110.02	82.78	75.24	88.94	23.18	26.06
loganic acid	1,095.13	519.45	47.43	1,380.88	1,008.43	73.03	636.78	-	-
demethylsecologanol	184.19	101.22	54.96	172.43	178.79	103.69	-	-	-
sweroside	4,223.19	1,959.70	46.40	2,529.83	1,781.34	70.41	734.77	133.92	18.23
loganin	1,224.08	838.79	68.52	2,682.27	2,594.74	96.74	-	-	-

⑨ 인동 시료의 패턴분석

산동에서 구입한 중국산과 의정부, 홍천, 김포, 청송, 포천, 완산, 화산, 양평, 상주, 안동, 유성, 강화, 대전, 김천, 강원도, 봉화, 경주, 서울 그리고 영천에서 구입한 국내산등 산지별 총 24종의 인동시료를 HPLC-DAD를 이용하여 머무름 시간 14.33분의 coniferin, 15.90분의 loganic acid, 17.90분의 demethylsecologanol, 22.05분의 sweroside, 23.39분의 loganin 그리고 머무름 시간이 10.48분과 11.82분인 미지의 두 peak까지 총 7가지 성분을 분석하고 7가지 성분을 다변량으로 한 패턴 인식법을 실시하였다. Fig. 11에 패턴분석을 위한 크로마토그램을 나타내었다.

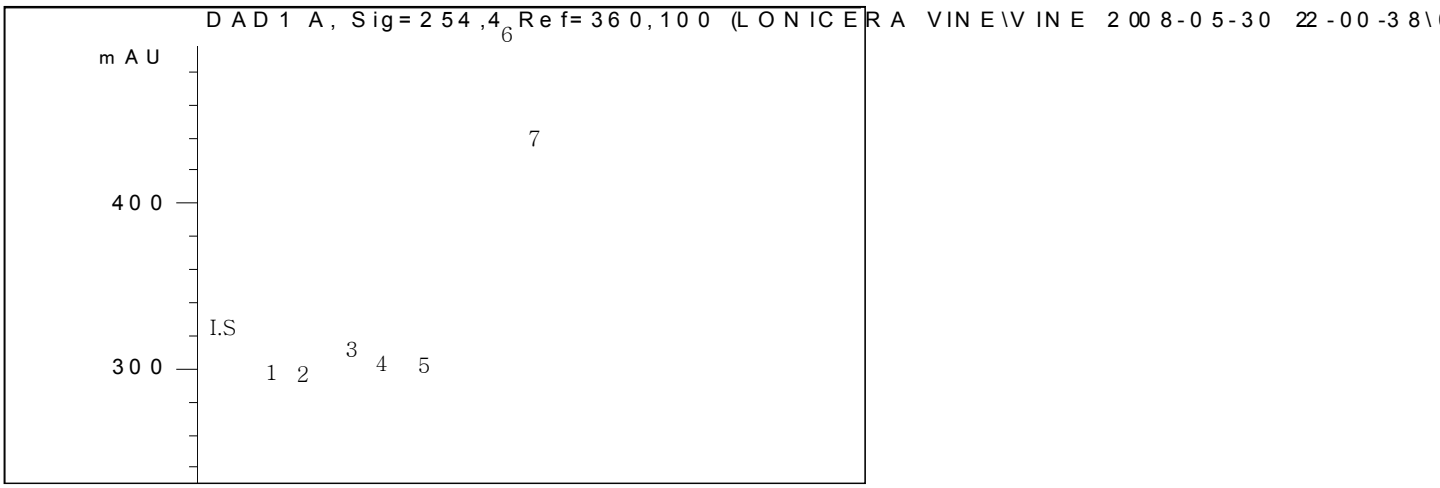


Fig. 1 1. The chromatogram of caulis *Lonicera j aponica* fo r p attern analysis.

인동 원시료를 각각 HPLC로 분석하고 7개 성분의 적분 값을 계산하였다. 각 성분의 적분값은 내부표준물질인 3,4,5-trihydroxybenzoic acid peak의 적분 값으로 나누어 각각의 개체에 대한 변수로 사용하였다. 다변량 자료는 R 통계 프로그램으로 처리하였으며, 유의수준은 0.01로 하였다.

24종의 인동 시료로부터 coniferin (CF), loganic acid (LA), demethylsecologanol (DMSL), sweroside (SS), loganin (LG) 그리고 두 가지 미지성분 A, B등 총 7가지 성분을 HPLC로 분석한 결과를 Table XIII에 나타내었다. 1번부터 14번, 16에서 21번, 그리고 24번은 국내산 인동이며, 15, 22, 23번은 중국산 인동이었다. 분석결과를 Fig. 12와 같이 boxplot으로 표현하였을 경우, 미지성분 A, loganic acid 그리고 sweroside성분의 경우 국내산과 중국산을 비교하여 볼 때 유의성의 차이를 나타냈으며, 그 외 나머지 성분은 점선으로 나타낸 표준편차 값이 넓은 구간에 걸쳐 퍼져 있음으로 그 범위에 대해 중국산과 국산 간의 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다.

Table XIV에 전체시료, 국내산 그리고 중국산을 산지별로 그룹화하여 7종 지표성분에 대하여 A_{std}/A_{IS}의 범위를 나타내었다. 앞의 boxplot에서 언급한 바와 같이 각 성분은 상당히 넓은 범위에 퍼져 있었고,

그 범위에 대해 중국산과 국내산의 특징은 없는 것으로 나타났다. Table XV에는 시료를 전체와 국가별로 그룹화하고 각 표준 성분의 A_{std}/A_{IS}의 평균 및 표준편차를 비교하였다. 표준성분들의 A_{std}/A_{IS}의 평균과 표준 편차로 미지성분 A는 0.31 ± 0.29, B는 0.02 ± 0.08, coniferin는 0.41 ± 0.37, loganic acid는 0.82 ± 0.53, demethylsecologanol은 0.33 ± 0.37, sweroside는 4.82 ± 3.03 그리고 loganin는 1.94 ± 2.06으로 표준편차와 평균값이 거의 비슷하게 나타났다. 이는 앞에서 언급한 boxplot의 결과와 같이 산지별 인동 시료들의 표준 성분들은 넓은 범위에 걸쳐 면적비를 나타냄을 알 수 있었다. 전체 시료를 볼 때 sweroside와 loganin이 가장 큰 면적 비를 나타내며 국내산과 중국산을 비교해 볼 때 국내산은 coniferin, demethylsecologanol, sweroside 그리고 loganin의 면적비가 높게 나타났으며, 중국산의 경우 미지의 성분 A, loganic acid, sweroside 그리고 loganin의 면적비가 높게 나타났다.

Table X III. Con tents of seven comp onents fro m samples (A_{std}/A_{IS})

No.	A	B	CF	LA	DMSL	SS	LG
1	0.34 ± 0 .00	0.00 ± 0 .00	0.59 ± 0. 00	0.91 ± 0. 00	0.72 ± 0.00	9.12 ± 0.04	1.66 ± 0 .00
2	0.00 ± 0 .00	0.00 ± 0 .00	0.26 ± 0. 00	0.39 ± 0. 00	0.24 ± 0.00	3.68 ± 0.01	1.41 ± 0 .00
3	0.22 ± 0 .00	0.00 ± 0 .00	0.49 ± 0. 00	0.41 ± 0. 01	0.41 ± 0.00	4.35 ± 0.01	0.88 ± 0 .00
4	0.00 ± 0 .00	0.00 ± 0 .00	0.81 ± 0. 00	0.81 ± 0. 00	0.69 ± 0.00	9.05 ± 0.02	2.67 ± 0 .01
5	0.21 ± 0 .00	0.00 ± 0 .00	0.78 ± 0. 00	0.67 ± 0. 00	1.35 ± 0.00	10.82 ± 0 .02	1.27 ± 0 .00
6	0.58 ± 0 .00	0.00 ± 0 .00	0.60 ± 0. 00	0.66 ± 0. 00	0.31 ± 0.00	4.40 ± 0.01	2.96 ± 0 .01
7	0.20 ± 0 .00	0.00 ± 0 .00	0.59 ± 0. 00	0.81 ± 0. 00	1.01 ± 0.00	10.92 ± 0 .01	2.00 ± 0 .00
8	0.40 ± 0 .00	0.00 ± 0 .00	0.00 ± 0. 00	0.75 ± 0. 00	0.00 ± 0.00	5.23 ± 0.00	0.18 ± 0 .00
9	0.15 ± 0 .00	0.00 ± 0 .00	0.00 ± 0. 00	0.47 ± 0. 00	0.35 ± 0.00	7.98 ± 0.02	0.50 ± 0 .00
10	0.71 ± 0 .00	0.00 ± 0 .00	1.55 ± 0. 00	1.27 ± 0. 00	0.19 ± 0.00	6.11 ± 0.01	4.20 ± 0 .00
11	0.18 ± 0 .00	0.00 ± 0 .00	0.00 ± 0. 00	0.93 ± 0. 00	0.00 ± 0.00	5.39 ± 0.00	1.11 ± 0 .00
12	0.00 ± 0 .00	0.00 ± 0 .00	0.38 ± 0. 00	1.14 ± 0. 00	0.42 ± 0.00	3.08 ± 0.00	1.99 ± 0 .00
13	0.29 ± 0 .00	0.00 ± 0 .00	0.00 ± 0. 00	1.28 ± 0. 00	0.00 ± 0.00	3.99 ± 0.00	0.86 ± 0 .00
14	0.24 ± 0 .00	0.00 ± 0 .00	0.00 ± 0. 00	0.55 ± 0. 00	0.00 ± 0.00	5.15 ± 0.00	0.47 ± 0 .00
15	0.66 ± 0 .00	0.00 ± 0 .00	0.29 ± 0. 00	1.87 ± 0. 00	0.08 ± 0.00	1.71 ± 0.00	2.55 ± 0 .00
16	0.48 ± 0 .00	0.00 ± 0 .00	0.19 ± 0. 00	1.00 ± 0. 00	0.19 ± 0.00	3.08 ± 0.00	0.90 ± 0 .00
17	1.06 ± 0 .00	0.00 ± 0 .00	0.76 ± 0. 00	0.85 ± 0. 00	0.41 ± 0.00	4.59 ± 0.01	5.46 ± 0 .01
18	0.00 ± 0 .00	0.00 ± 0 .00	0.08 ± 0. 00	0.00 ± 0. 00	0.00 ± 0.00	0.47 ± 0.00	0.06 ± 0 .00
19	0.00 ± 0 .00	0.00 ± 0 .00	0.41 ± 0. 00	0.00 ± 0. 00	0.00 ± 0.00	0.82 ± 0.00	0.00 ± 0 .00
20	0.00 ± 0 .00	0.00 ± 0 .00	0.32 ± 0. 00	1.20 ± 0. 00	0.93 ± 0.00	5.97 ± 0.01	9.09 ± 0 .02
21	0.00 ± 0 .00	0.00 ± 0 .00	0.29 ± 0. 00	0.50 ± 0. 00	0.00 ± 0.00	1.06 ± 0.00	0.00 ± 0 .00
22	0.40 ± 0 .00	0.10 ± 0 .00	0.18 ± 0. 00	0.33 ± 0. 00	0.07 ± 0.00	1.11 ± 0.00	0.93 ± 0 .00
23	0.75 ± 0 .00	0.00 ± 0 .00	0.38 ± 0. 00	2.35 ± 0. 00	0.11 ± 0.00	2.20 ± 0.00	1.68 ± 0 .00
24	0.52 ± 0 .00	0.37 ± 0 .00	0.81 ± 0. 00	0.64 ± 0. 00	0.53 ± 0.00	5.31 ± 0.01	3.62 ± 0 .01

Values r epresent mean±standard deviation (n =3).

Origin: Ko rea (No. 1 ~14, 1 6~21, 24), China (No. 15 , 22, 2 3).

CF: co niferin, LA: lo ganic aci d, DMSL: demethylsecologanol, SS: swero side, L G: loganin, A and B : unknown compo unds

Table X IV. Range of the concentration for marker compou nds f or twenty-four samples (A_{std}/A_{IS})

	A	B	CF	LA	DMSL	SS	LG
All samp les	0-1.06	0-0.37	0-1.55	0-2.35	0-1.35	0.47-10.92	0-9.09
Korea samples	0-1.06	0-0.37	0-1.55	0-1.28	0-1.35	0.47-10.92	0-9.09
China s amples	0.4-0.75	0-0.1	0.18-0.38	0.33-2.35	0.07-0.11	1.11-2.2	0.93-2.55

CF: co niferin, LA: lo ganic aci d, DMSL: demethylsecologanol, SS: swero side, L G: loganin, A and B : unknown compo unds

Table X V. Changes of conten ts of mark er compounds in sample from diff erent orig in (A_{std}/A_{IS})

	A	B	CF	LA	DMSL	SS	LG
All s amples	0.31 ± 0. 29	0.02 ± 0. 08	0.41 ± 0 .37	0.82 ± 0. 53	0.33 ± 0. 37	4.82 ± 3 .03	1.94 ± 2. 06
Korea sample	0.27 ± 0. 28	0.02 ± 0. 08	0.42 ± 0 .39	0.73 ± 0. 36	0.37 ± 0. 39	5.27 ± 2 .97	1.97 ± 2. 19
China s ample	0.60 ± 0. 18	0.03 ± 0. 06	0.29 ± 0 .10	1.52 ± 1. 05	0.09 ± 0. 02	1.67 ± 0 .55	1.72 ± 0. 81

CF: co niferin, LA: lo ganic aci d, DMSL: demethylsecologanol, SS: swero side, L G: loganin, A and B : unknown compo unds

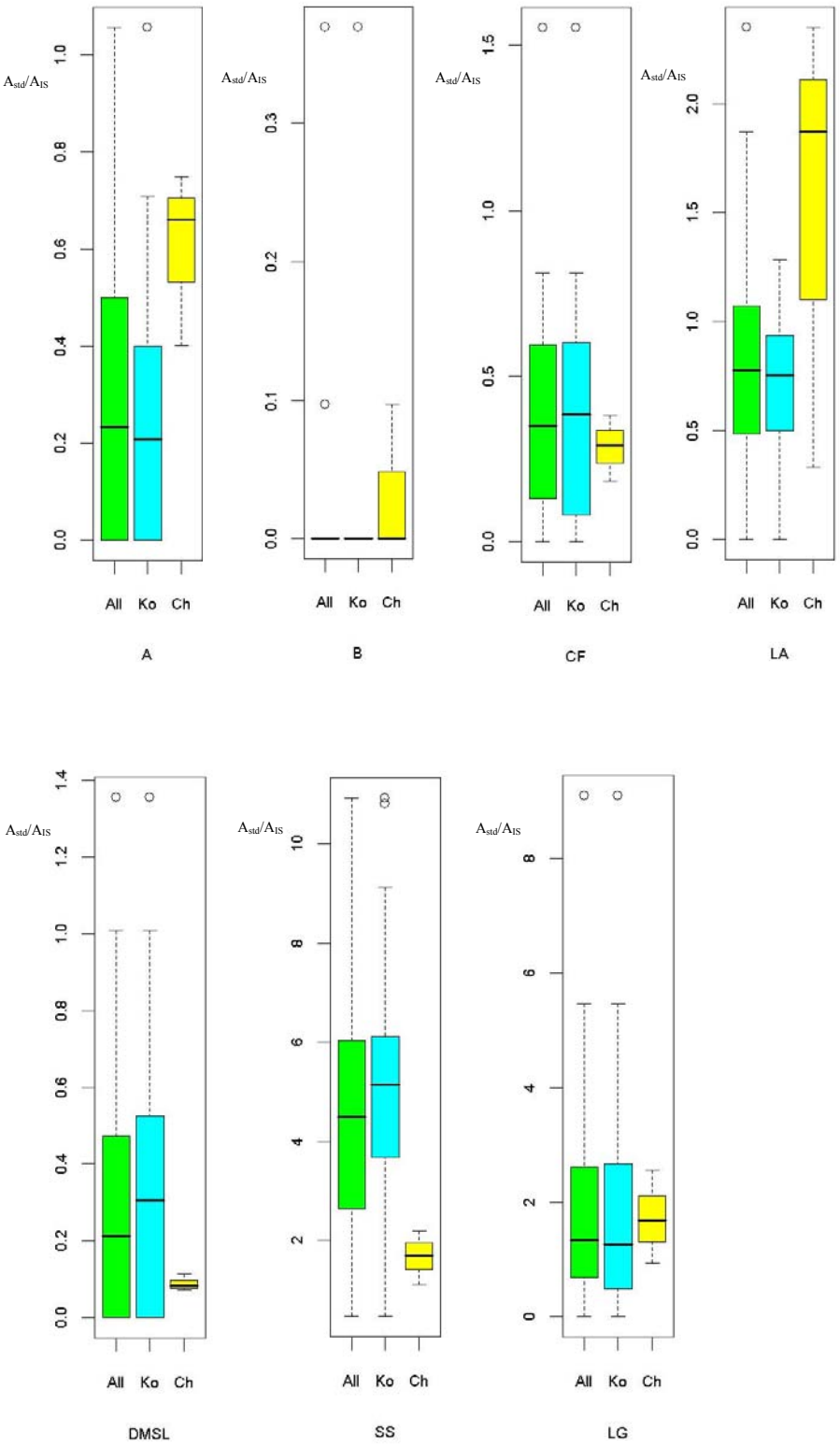


Fig. 1 2. B oxplot o f th e marker compounds fo r twenty -four samples.

CF: co niferin, LA: lo ganic aci d, DMSL: demethylsecologanol, SS: swero side, L G: loganin, A and B : unknown compo unds

※ 패턴인식법에 의한 다변량 분석

산지별 24종의 국내산과 중국산 인동에 대해 coniferin, loganic acid, demethylsecologanol, sweroside, loganin 그리고 미지의 시료 A, B등 7개의 표준성분의 면적비를 변수로 하여 다변량 분석을 실시하였다.

㉮ 유사도의 평가

식품의약안전청(KFDA)에서 제공한 8종 (No. 17-24)의 면적비를 표준으로 삼고 이를 이용하여 각 시료의 유사도를 평가하였으며, 유클리드 거리, 코사인, 면적비, 상관계수 등을 통해 24종 산지별 인동의 유사도를 평가하였다. 계산식은 아래와 같다.

유클리드 거리 $d_{ir} = [\sum_{k=1}^{m} (X_{ik} - X_{rk})^2]^{1/2}$

코사인 $C_{ir} = \frac{\sum_{k=1}^{m} X_{ik} \times X_{rk}}{\sqrt{(\sum_{k=1}^{m} X_{ik}^2)(\sum_{k=1}^{m} X_{rk}^2)}}$

면적비 $A_{ir} = \frac{2\sum_{k=1}^{m} \min(X_{ik}, X_{rk})}{\sum_{k=1}^{m} (X_{ik} + X_{rk})}$

상관계수 $r_{ir} = \frac{\sum_{k=1}^{m} (X_{ik} - \overline{X_i})(X_{ik} - \overline{X_i})}{\sqrt{\sum_{k=1}^{m} (X_{ik} - \overline{X_i})^2 \sum_{k=1}^{m} (X_{ik} - \overline{X_i})^2}}$

Fig. 13에서 보는 바와 같이 cosine의 경우 H15, H17, H20 그리고 H23의 시료에 대하여 낮은 동질성을 나타냈으며, 나머지 시료에 대해서는 전반적으로 높은 동질성을 나타내었다. 상관계수를 유사성 척도로 삼았을 때 H15, H17, H20 그리고 H23의 시료에 대해서는 낮은 동질성을 나타냈으며, 나머지 시료에 대해서는 높은 동질성을 나타내었다. 마찬가지로 면적비는 H18 - H22의 시료에 대해서는 낮은 동질성을 나타내었으며, 나머지 시료에 대해서는 높은 동질성을 나타내었다. 거리는 H02, H03, H06, H08, H11 - H14 그리고 H15의 시료에 대해 표준시료와 높은 동질성을 나타내었으며, 나머지 시료에 대해서는 비교적 낮은 동질성을 나타내었다. 산지별 24종의 인동의 표준성분에 대하여 거리, 상관계수, Cosine 그리고 면적비등의 척도로서 유사성을 알아본 결과 각 척도마다 서로 다른 특정 시료에 대하여 유사성이 떨어지는 것으로 나타났다. 완벽한 유사성을 나타내지 않지만 다른 척도에 비해 대체적으로 높은 동질성을 나타내는 거리를 유사성의 척도로 사용하는 것이 효율적이라고 판단되었다.

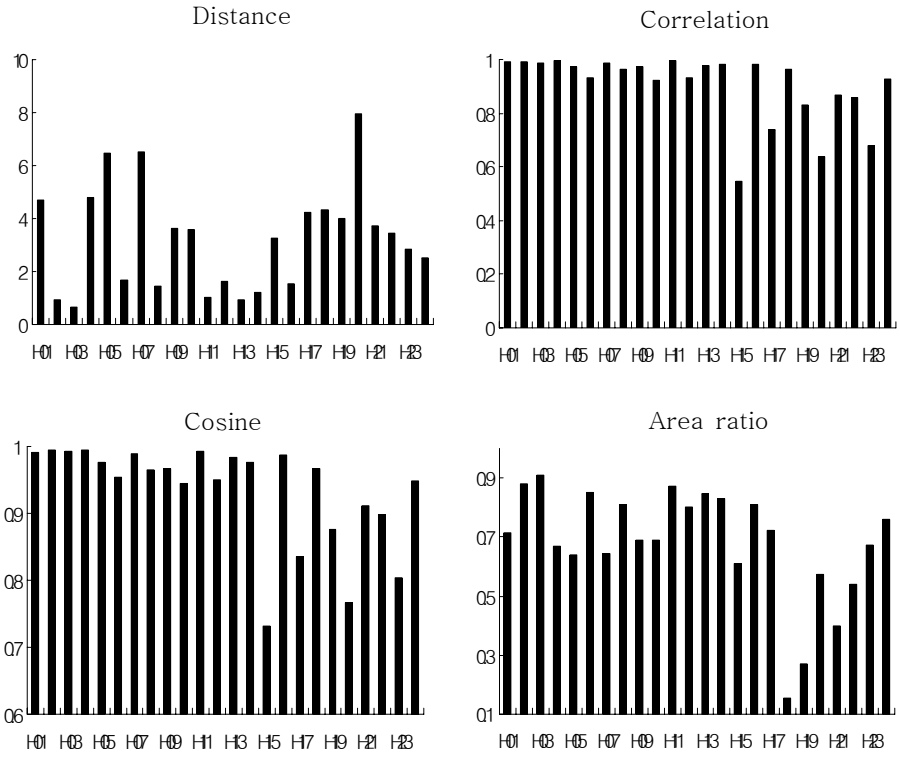


Fig. 1 3. Cosine, Ar ea ratio, Correlation and distance for similarity measurement.

㈏ 계층적 군집방법을 이용한 시료의 군집분석

산지의 정보를 무시하고 성분의 차이만으로 각각의 시료가 어떤 군집을 형성하는지 관찰하였다. 계층적 방법은 군집의 수를 미리 정하지 않고 계층적 구조의 군집을 형성하고 목적에 따라 묶는 방법으로서 작은 군집에서 출발하여 병합해 가는 병합적 방식의 agnes (Agglomerative nesting)와 hclust (Hierarchical clustering)가 있으며, 큰 군집에서 출발하여 분리해 나가는 분할적 방식 diana (Divisive analysis)가 있다.

산지별 24종의 국내산과 중국산 인동에 대해 coniferin, loganic acid, demethylsecologanol, sweroside, loganin 그리고 미지의 시료 A, B등 7개의 표준성분의 면적비를 변수로 하여 계층적 군집분석을 수행하였다. Fig. 14에 제시한 hclust에 의한 dendrogram을 보면 시료가 크게 두 개의 군집으로 나누어진 것을 볼 수 있다. 왼쪽의 큰 군집을 보면 시료 H02, H03, H08, H11, H13, H14 그리고 H16이 유사도 평가의 거리의 척도에서 비교적 낮은 막대그래프와 연관성을 가지며 오른쪽 군집에 속하는 H01, H05, H07, H09, H10, H17, H20 그리고 H24는 유사도 평가의 거리의 척도에서 높은 막대그래프와 연관성이 있었다. 이는 hclust 군집 분류가 거리를 기초로 하기 때문이다. Dendrogram상의 오른쪽 군집을 보면 모두 국내산 시료들로 군집을 이루고 있다. 하지만 왼쪽 군집의 경우 국내산 시료들 중에 중국산 시료인 H15, H22 그리고 H23이 속해 있었다. 이는 24종의 인동시료에 대하여 표준성분의 면적비를 변수로 하여 계층적 군집분석을 수행하였을 때 나타난 두 개의 군집은 국내산, 중국산 두 곳의 산지별 군집과 일치하지 않는 것을 알 수 있다

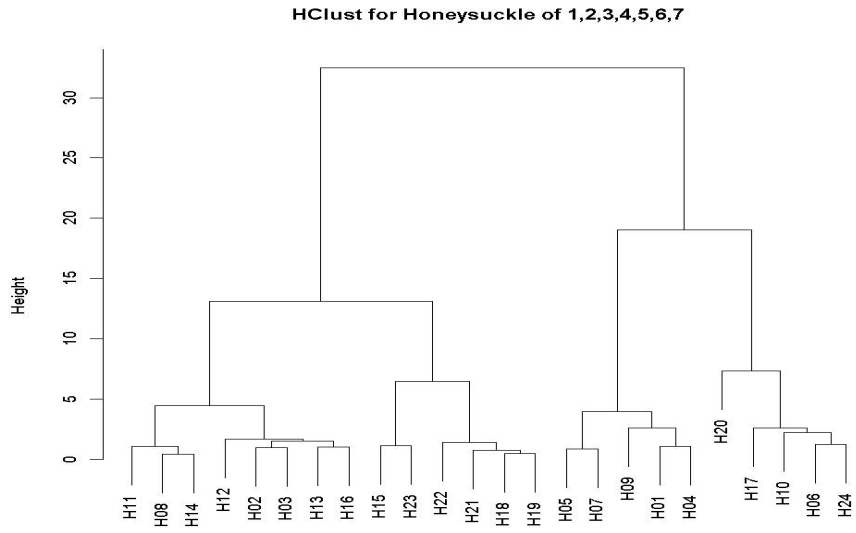


Fig. 1 4. The hierarchical clustering analysis of twenty-four caulis *Lonicera japo nica* sa mples.

㉰ 주성분 분석 (Principal components analysis)

주성분 분석은 다변량 자료로부터 변량을 대표하는 소수의 합성 변량을 구하고자 할 때 사용한다. principal compd와 예측을 위한 predict를 이용하여 24종의 시료에 대해 7개의 성분을 이용하여 주성분 분석을 수행하였다. Fig. 15를 보면 comp. 1과 comp. 2의 두 개의 주성분으로 24개의 시료가 두 개의 집단으로 분리 되고 있지만 국내산 시료인 H18, H19, H21이 중국산으로 분류되는 경향이 강하였다.

㉱ 판별분석에 의한 시료의 산지 평가

판별분석은 산지 정보와 성분의 차이를 판별분석법을 적용하여 판별식을 계산하고 이 판별식을 통하여 미지 시료의 산지를 추정할 때 사용한다.

국내산과 중국산등 24종의 시료마다 각각 알려진 원산지 정보와 성분의 차이를 이용하여 판별식을 작성하고 이 판별식을 통하여 각 시료의 원산지를 추정하였다. Fig. 16을 보면 판별식의 값(out)이 양수인 것은 국내산 (○)이고, 음수인 것이 중국산 (△)일 때 중국산 시료인 H22가 국내산으로 분류되어 이상치를 나타내었다. 24개의 시료중 하나의 시료만이 판별식에 위배되므로 시료 H22를 제외하면 어느 정도 정확성을 나타낸다고 할 수 있다. 하지만 총 24종의 시료 중 국내산이 21종인 것에 비해 중국산은 3종에 불과하므로 비교집단에 있어 시료의 개수가 균형적이지 않으며, 전체적인 시료의 수 또한 신뢰성 있는 결과를 얻기에 충분하지 않다. 그러므로 국내산과 중국산을 구분하기 위한 판별식에 신뢰성을 갖기 위해서는 각 산지별 시료가 충분히 확보되어야 한다고 사료된다.

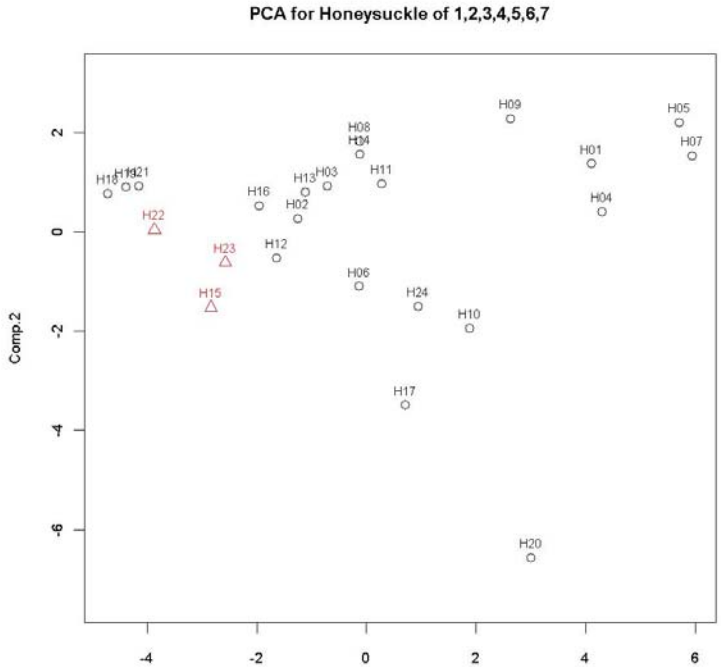


Fig. 1 5. Prin cipal co mponents an alysis for the prediction of origins of caulis *Lonicera j aponica*. (Korea { ○}, China { △})

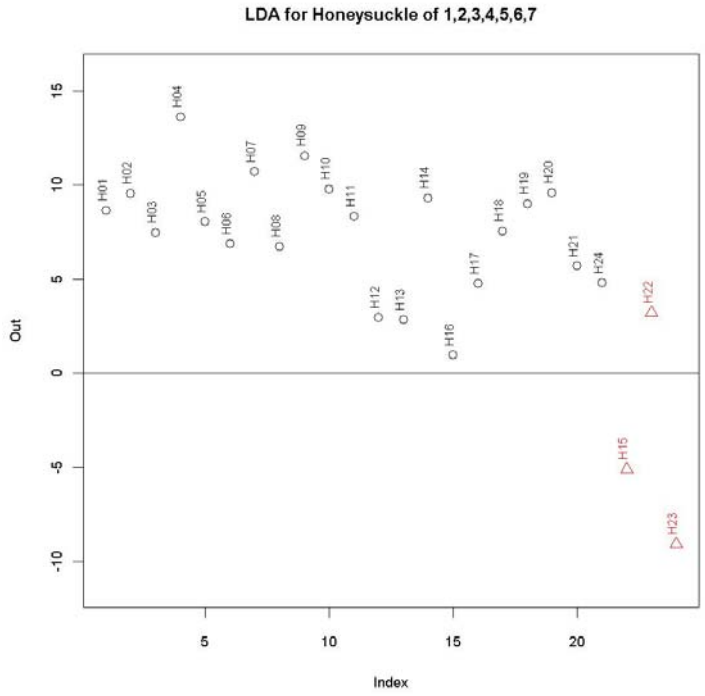


Fig. 1 6. R esult of linear discriminant analysis of the twenty-four caulis *Lonicera j aponica* samples for the p rediction o f o rigin fo r Korea (○) or Chin a (△).

⑩ 인동 DNA 분석 및 비교

DNA 분석을 통한 인동 동정결과 23개의 동정시료 모두 인동으로 동정되었고, 인동 감별 마커를 개발하였다. 따라서 506 bp에서 인동 DNA 마커 밴드를 확인할 수 있었다 (한국한의학연구원).

Table X VI. Identification of caulis *Lonicera j aponica* b y DN A analy sis

	NO.	산지	비고	동정결과
1	O-19-3	경북 봉화	동국대 한의학과	*Lonicera japonica* (인동)
2	O-19-10	경북 경주	동국대 한의학과	*Lonicera japonica* (인동)
3	O-19-11	경북 경주	동국대 한의학과	*Lonicera japonica* (인동)
4	O-19-12	한국 서울	동국대 한의학과	*Lonicera japonica* (인동)
5	O-19-13	한국 서울	동국대 한의학과	*Lonicera japonica* (인동)
6	O-19-14	중국 산동	서녕시장	*Lonicera japonica* (인동)
7	O-19-15	중국 산동	안국시장	*Lonicera japonica* (인동)
8	O-19-16	한국 영천	연천시장	*Lonicera japonica* (인동)
9	O-19-17	경기 의정부	경동 시장	*Lonicera japonica* (인동)
10	O-19-18	강원 홍천	경동 시장	*Lonicera japonica* (인동)
11	O-19-19	경기 김포	경동 시장	*Lonicera japonica* (인동)
12	O-19-20	경북 청송	경동 시장	*Lonicera japonica* (인동)
13	O-19-21	경기 포천	경동 시장	*Lonicera japonica* (인동)
14	O-19-22	경북 영천	경동 시장	*Lonicera japonica* (인동)
15	O-19-23	경북 영천	경동 시장	*Lonicera japonica* (인동)
16	O-19-24	양평 용문	경동 시장	*Lonicera japonica* (인동)
17	O-19-25	경북 상주	대구 약전시장	*Lonicera japonica* (인동)
18	O-19-26	경북 안동	대전 한약거리	*Lonicera japonica* (인동)
19	O-19-27	대전 유성	대전 한약거리	*Lonicera japonica* (인동)
20	O-19-28	강화도	경동 시장	*Lonicera japonica* (인동)
21	O-19-29	대전 중동	대전 한약거리	*Lonicera japonica* (인동)
22	O-19-30	경북 김천	대전 한약거리	*Lonicera japonica* (인동)
23	O-19-31	중국	대전 한약거리	*Lonicera japonica* (인동)

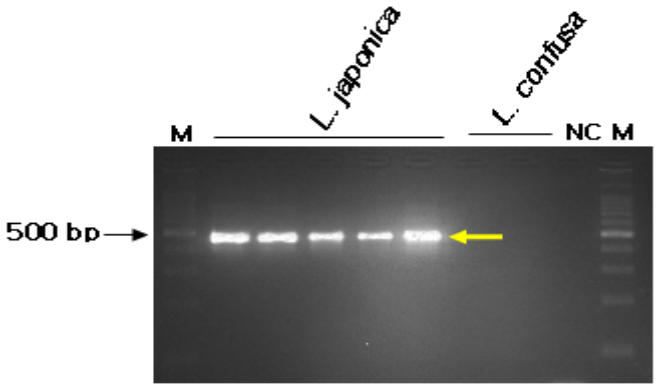


Fig. 17 . Th e result of PCR a nalysis of discriminative marker (primer LJI01F/LJI02R) fo r caulis *Lonicera j aponica*.
M: size marker

Table XVI, Fig. 17의 DNA 분석결과를 볼 때 시중에 유통되고 있는 인동 23종은 모두 동일하다는 것을 알 수 있었다. 즉 Fig. 9에서 보는 바와 같이 21종의 인동에 함유된 표준물질이 비슷한 함량 패턴을 나타내며 또한 패턴분석을 볼 때 산지별 유의적인 차이를 나타내지 않으므로 시중에서 유통되고 있는 인동은 모두가 동일한 종이며, 화학적으로도 같은 패턴임이 결론되어진다.

제4장 세부연구개발과제의 연구결과 고찰 및 결론

금은화와 인동에 함유된 flavonoid, iridoid 그리고 phenolic compound계 생약성분의 효과적인 분리, 분석방법을 개발하였고, 최적의 조건에 대한 평가로서 validation parameter를 제시하였다. 시중에 유통되고 있는 금은화와 인동 생약시료의 품질관리를 위하여 다양한 크로마토그래피 조건하에서 활성성분의 함량분석 기초실험을 완료하였고 이를 바탕으로 효율적인 동시 정성 및 정량분석법의 개발 하였다.

금은화의 경우, chlorogenic acid, sweroside, luteolin 7-*O*-glucoside, 3,5-dicaffeoylquinic acid 그리고 (*E*)-aldosecologanin 등 지표물질 5종을 선택하였으며, 지표물질에 대한 최적의 분석조건을 제시하였다. 또한 specificity, linearity (correlation coefficient ≧ 0.994), range (1 ~ 20, 4 ~ 30 ㎍/mL), detection limit (0.02 ~ 0.09 ㎍/mL), quantitation limit (0.07 ~ 0.27 ㎍/mL), accuracy (recovery ratio > 97%), precision (RSD 0.05 ~ 1.95%), reproducibility, robustness, stability등 동시분석조건 평가를 위한 validation의 제반 조건을 합리적으로 제시하였다. 확립된 분석법을 통하여 시중에 유통되고 있는 국내·외 21종의 금은화의 활성성분 함량을 비교분석하였으며, 패턴 분석을 통해 주성분분석, 군집분석, 판별분석 그리고 유의성분석등의 실험을 성공적으로 수행하였다.

인동의 경우 coniferin, loganic acid, demethylsecologanol, sweroside 그리고 loganin등 지표물질 5종을 선택하였으며, 지표물질에 대한 최적의 분석조건을 제시하였다. 또한 specificity, linearity (correlation coefficient ≧ 0.998), range (1 ~ 20, ㎍/mL), detection limit (0.25 ~ 1.09 ㎍/mL), quantitation limit (0.75 ~ 3.32 ㎍/mL), accuracy (recovery ratio > 99.39%), precision (RSD 0.14 ~ 3.28%), reproducibility, robustness, stability등 동시분석조건 평가를 위한 validation의 제반 조건을 합리적으로 제시하였다. 확립된 분석법을 통하여 시중에 유통되고 있는 국내·외 24종의 인동의 활성성분 함량을 비교분석하였으며, 패턴 분석을 통해 주성분분석, 군집분석, 판별분석 그리고 유의성분석등의 실험을 성공적으로 수행하였다. 인동의 사용부위가 2007년 12월 개정 공표된 대한약전 제9개정판에 의하면 줄기 (stem)로부터 줄기 및 잎 (leaf and stem) 으로 변경됨에 따라 인동의 줄기 (stem) 및 잎 (leaf), 잎 및 줄기 (leaf and stem)에 대하여 각각 표준물질의 패턴을 비교분석하였다.

개발된 정성 및 정량분석법은 제반 validation parameters의 측정을 통하여 일차적으로 검증되었고 이들을 실제 시판중인 금은화와 인동 시료에 대하여 적용함으로서 그 실용성을 입증하였다. 이로서 금은화와 인동에 함유된 활성성분에 대한 동시 정성, 정량분석법의 개발이라는 당초의 목표를 완전히 달성한 것으로 사료된다.

금 은 화
(金 銀 花)
Lonicera Flower

Lonicerae Flos

정량법

금은화를 가루가 될 때까지 믹서로 간 다음 200 mg을 정확히 재어 70% 에탄올 수용액 10 mL를 넣은 후 ultrasonication 방법으로 60분간 추출한다. 추출된 에탄올 수용액을 0.2 μm membrane filter로 거른 후 1 mL를 취해 10 μg 내부표준물질 (3,4,5-trimethoxybenzoic acid)을 포함한 메탄올을 첨가하여 이를 농축 시킨다. 농축된 시료를 이동상인 15% 아세토니트릴 수용액으로 녹인 후 20 ㎕를 컬럼 속으로 주입하여 분석한다. 내부표준물 방법으로 계산하여 정량한다.

조작조건

검출기 : 자외부 흡광광도계 (측정파장 : 250 nm)
컬럼 : 안지름 4.6 mm 길이 15 cm인 particle size 5 μm의 액체크로마토그래피용 C18 컬럼
컬럼온도 : 25℃ 부근의 일정온도 (실온)

이동상 :

Final time (min)	Flow rate (mL/min)	A	B
0	0.3	85	15
10	0.3	80	20
30	0.3	65	35
35	0.3	65	35
40	0.3	85	15

A 용매: 100% 3차 증류수에 0.1% 포름산을 첨가
B 용매: 100% 아세토니트릴에 0.1% 포름산을 첨가
유속 : 0.3 mL/min

시스템적합성

시스템의 성능 : 검액 10 μL를 가지고 위의 조건으로 조작할 때 chlorogenic acid, sweroside, luteolin 7-*O*-glucoside, (*E*)-aldosecologanin, 3,5-dicaffeoylquinic acid 및 3,4,5-trimethoxybenzoic acid의 순서로 유출되고 주변 피크와의 분리도가 3.87 이상이다.

인　　동
(忍　　冬)
Lonicera Caulis

Lonicerae Caulis

정량법

인동을 가루가 될 때까지 믹서로 간 다음 200 mg을 정확히 재어 70% 에탄올 수용액 10 mL를 넣은 후 ultrasonication 방법으로 30분간 추출한다. 추출된 에탄올 수용액을 0.2 μm membrane filter로 거른 후 1 mL를 취해 10 μg 내부표준물질 (3,4,5-trihydroxybenzoic acid)을 포함한 메탄올을 첨가하여 이를 농축 시킨다. 농축된 시료를 이동상인 20% 메탄올 수용액으로 녹인 후 20 ㎕를 컬럼 속으로 주입하여 분석한다. 내부표준물 방법으로 계산하여 정량한다.

조작조건

검출기 : 자외부 흡광광도계 (측정파장 : 254 nm)
컬럼 : 안지름 4.6 mm 길이 15 cm인 particle size 5 μm의 액체크로마토그래피용 C18 컬럼
컬럼온도 : 35℃ 부근의 일정온도

이동상 :

Final time (min)	Flow rate (mL/min)	A	B
0	0.3	80	20
15	0.3	65	35
25	0.3	35	65
30	0.3	35	65
35	0.3	80	20

A 용매: 100% 3차 증류수에 0.1% 포름산을 첨가
B 용매: 100% 메탄올에 0.1% 포름산을 첨가
유속 : 0.3 mL/min

시스템적합성

시스템의 성능 : 검액 10 μL를 가지고 위의 조건으로 조작할 때 3,4,5-trihydroxybenzoic acid, coniferin, loganic acid, demethylsecologanol, sweroside 및 loganin의 순서로 유출되고 주변 피크와의 분리도가 3.40 이상이다.

제5장 제2 세부연구개발과제의 연구성과

5.1 활용성과

총괄과제명	한약재의 생리활성성분의 분리 및 분석연구(금은화, 인동)
총괄과제책임자	강삼식 / 서울대학교 / 천연물화학

가. 연구논문

번호	논문제목	저자명	저널명	집(권)	페이지	Impact factor	국내/국외	SCI여부
1	HPLC-DAD-MS/MS를 이용한 금은화 생리활성 물질의 동시분석	유성광, 전주은, 강경원, 강삼식, 신종헌	약학회지	52 (6)	446-451		국내	

나. 학술발표

번호	발표제목	발표형태	발표자	학회명	연월일	발표지	국내/국제
1	Simultaneous analysis of bioactive metabolites from *Lonicera japonica* flower buds by HPLC-DAD-MS/MS	포스터	신종헌, 강경원	대한약학회	2007. 11. 08	2007년 대한약학회 추계학술발표 초록집	국내
2	Simultaneous analysis of bioactive metabolites from caulis *Lonicera japonica* by HPLC-DAD-MS/MS	포스터	신종헌, 강경원	대한약학회	2008. 10. 24	2008년 대한약학회 추계학술발표 초록집	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

없음

제7장 참고문헌

1) Song, Y., Li, S.-L., Wu, M.-H., Li, H.-J. and Li, P. : Qualitative and quantitative analysis of iridoid glycosides in the flower buds of *Lonicera* species by capillary high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometric detector. *Anal. Chim. Acta* **564**, 211 (2006).

2) Peng, Y., Liu, F. and Ye, J. : Determination of phenolic acids and flavones in *Lonicera japonica* thumb. by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Electroanal.* **17**, 356 (2005).

3) Qian, Z.-M., Li, H.-J., Li, P., Ren, M.-T. and Tang, D. : Simultaneous qualitation and quantification of thirteen bioactive compounds in Flos Lonicerae by high-performance liquid chromatography with diode array detector and mass spectrometry. *Chem. Pharm. Bull.* **55**, 1073 (2007).

4) Xiang, T., Xiong, Q. B., Ketut, A. I., Tezuka, Y., Nagaoka, T., Wu, L. J. and Kadota, S. : Studies on the hepatocyte protective activity and the structure-activity relationships of quinic acid and caffeic acid derivatives from the flower buds of *Lonicera bournei*. *Planta Medica* **67**, 322 (2001).

5) Chang, W.-C. and Hsu, F.-L. : Inhibition of platelet activation and endothelial cell injury by polyphenolic compounds isolated from *Lonicera japonica* Thunb. *Prost. Leuk. Essen. Fatty Acids* **45**, 307 (1992).

6) Lee, S. J., Choi, J. H., Chang, H. W., Kang, S. S. and Kim, H. P. : Suppression of mouse lymphocyte proliferation in vitro by naturally-occurring biflavonoids. *Life Sci.* **57**, 551 (1995).

7) 정규찬, 권동렬, 백석환, 김성환, 장현욱 : 금은화 (Lonicerae Flos) 의 ethyl acetate 분획이 돌연변이원성에 미치는 영향 (Effects of Lonicerae Flos′ ethyl acetate fraction on mutagenicity). 약학회지 **32**, 328 (1988).

8) Peng, L.-Y., Mei, S.-X., Jiang, B., Zhou, H. and Sun, H.-D. : Constituents from *Lonicera japonica*. *Fitoterapia* **71**, 713 (2000).

9) Machida, K., Sasaki, H., Iijima, T. and Kikuchi, M. : Studies on the constituents of Lonicera species. XVII. New iridoid glycosides of the stems and leaves of *Lonicera japonica* Thunb. *Chem. Pharm. Bull.* **50**, 1041 (2002).

10) Xing, J. and Li, P. : Research on chemical constituents of Lonicera : A review and prospects. *J. Chin. Med. Mater.* **22**, 366 (1999).

11) Rahimuddin, S. A., Khoja, S. M., Zuhair, M. M., Howell, N. K. and Brown, J. E. : Inhibition of lipid peroxidation in UVA-treated skin fibroblasts by luteolin and its glucosides. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **109**, 647 (2007).

약학회지 제 52 권 제 6 호 446~451 (2008)
Yakhak Hoeji Vol. 52, No. 6

藥學會誌

HPLC-DAD-MS/MS를 이용한 금은화 생리활성 물질의 동시분석

유성광 · 전주은 · 강경원 · 강삼식 · 신종헌#
서울대학교 약학대학 천연물과학연구소
(Received September 16, 2008; Revised November 7, 2008)

Simultaneous Analysis of Bioactive Metabolites from *Lonicera japonica* Flower Buds by HPLC-DAD-MS/MS

Sungkwang Ryu, Ju-eun Jeon, Gyoung Won Kang, Sam Sik Kang and Jongheon Shin#
Natural Products Research Institute, College of Pharmacy, Seoul National University, San 56-1, Shillim, Kwanak, Seoul 151-742, Korea

Abstract — A high-performance liquid chromatography (HPLC) with diode array detector (DAD) and electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) was established for the simultaneous determination of chlorogenic acid (**1**), sweroside (**2**), luteolin-7-*O*-glucoside (**3**), (*E*)-aldosecologanin (**4**) and 3,5-dicaffeoylquinic acid (**5**) from *Lonicera joponica* flower buds. The optimal chromatographic conditions were obtained on an ODS column (5 μm, 4.6×150 mm) with the column temperature 25°C. The mobile phase was composed of (A) water with 0.1% formic acid and (B) acetonitrile with 0.1% formic acid using a gradient elution, the flow rate was 0.3 ml/min. Detection wavelength was set at 250 nm. All calibration curves showed good linear regression (r^2>0.994) within test ranges. The developed method provided satisfactory precision and accuracy with overall intra-day and inter-day variations of 0.05~1.95% and 0.15~2.26%, respectively, and the overall recoveries of 97.71~103.65% for the five compounds analyzed. The verified method was successfully applied to quantitative determination of the three types (phenolic compounds, iridoids and flavonoids) of bioactive compounds in 21 commercial *L. japonica* flower buds samples from different markets in Korea and China. The analytical results demonstrated that the contents of the five analytes vary significantly with sources.

Keywords □ HPLC-DAD, *Lonicera japonica* flower buds, iridoids, phenolic compounds, flavonoids

한방생약의 오랜 활용 경험이 축적되어 있는 우리나라에서는 약품시장에서 생약이 양약에 버금가는 비중을 차지하고 있으며, 천연물신약 연구개발에 있어서도 전통 생약의 중요성이 지속적으로 증가하고 있다. 그러나 생약 특유의 생산 및 유통공정에 기인한 비 규격화와 질적 가치의 비 영속화, 산지별 함량 편차 및 생물학적 동질성의 미확인 등의 문제들은 한약재의 평가 및 신약개발에 있어 가장 큰 저해 요인으로 작용하고 있다. 그러므로 합리적인 생약 사용 기준과 나아가 현대적인 개념의 천연물 신약개발을 위해서 활성물질의 정성적, 정량적 분석에 기초를 둔 규격화가 시급히 요구된다.

금은화는 인동과(Caprifoliaceae)에 속하는 인동덩굴 (*Lonicerae flos* Thunb.)의 꽃으로,[1] 한방에서는 두통, 인두통, 호흡기 감염, 화농증, 전염병, 종양의 치료제 및 해열, 이뇨, 해독 등의 목적으로 사용되어 왔으며,[2,3] 천연물 연구를 통하여 항생, 소염, 항미생물, 항산화, 항바이러스, 세포보호, 간보호 등 다양한 생리활성이 규명되었다.[4-8]

현재까지 연구된 금은화의 주요 활성 물질로 다양한 작용기를 가진 phenolic compounds, iridoids 그리고 flavonoids가 알려져 있다.[5] 천연물 함량에 대한 사전 탐색연구를 바탕으로 수행된 본 연구에서는 금은화에 함유된 천연물 중에서 생리활성과 함량이 우수한 물질로 phenolic compounds 중에서 chlorogenic acid (**1**)[6,9,10]와 3,5-dicaffeoylquinic acid(**5**),[6,11] iridoids로서 sweroside (**2**)[12]와 (*E*)-aldosecologanin(**4**),[13] 그리고 flavonoids[14]의 luteolin-7-*O*-glucoside(**3**),[15] 등 5종의 화합물을(Fig. 1) 표준물질로 선정하여 금은화에 함유된 각 물질의 함량을 HPLC-DAD와 LC-MS/MS를 이용하여 동시 정량 · 정성 분석하는 최적의 분석법을 개발하였으며, 이를 활용하여 21종의 국내 · 외 지역에서 산출된 금은화 활성 물질의 함량을 분석 비교하였다.

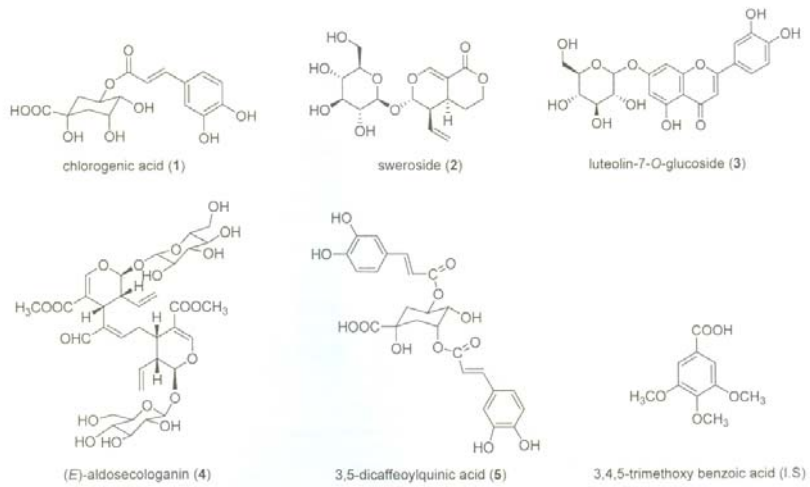


Fig. 1 – Chemical structures of five compounds in *Lonicera japonica* flower buds.

실험 방법

시료 및 시약

표준시료로 사용한 chlorogenic acid(**1**), sweroside (**2**), luteolin-7-*O*-glucoside(**3**), (*E*)-aldosecologanin(**4**) 그리고 3,5-dicaffeoylquinic acid(**5**)는 본 연구팀에 의해 금은화로부터 추출, 분리, 정제하여 UV, IR, MS, ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR 등을 통해 구조 동정되었으며 HPLC-DAD를 이용한 순도 실험 결과 95% 이상의 순수 물질임을 확인하였고 내부표준물질로 3,4,5-trimethoxy benzoic acid(Sigma-Aldrich, USA)를 사용하였다.

각 소재별 활성물질의 함량을 비교분석하기위해 사용된 국내산, 중국산의 21종 중 15종의 금은화 시료는 서울 경동시장, 대구 약령시, 대전 약전거리, 전라남도에서 각각 원산지별로 구입하였으며, 나머지 6종은 식약청에서 제공받았다. 각 시료는 자연건조시킨 후 분말형태로 마쇄하여 분석시료로 사용하였다.

용매로서 아세토니트릴(J. T. Baker, USA), 3차 증류수(J. T. Baker, USA)와 증류된 에탄올(Duksan, Korea)을 사용하였으며 이동상에 포름산(Wako, Japan)을 첨가하였다.

HPLC system 및 condition

시료 분석을 위한 HPLC는 Agilent 1200 series로서 auto-sampler, column oven, binary pump, DAD detector(Agilent Technologies, Waldbronn, Germany), degasser(Agilent Technologies, Tokyo, Japan)를 사용하였으며, software는 Agilent 사의 Chemstation software(Agilent Technologies, Avondale, CA, USA)를 사용하였다. HPLC 조건으로 컬럼 오븐의 온도는 25°C, 분석파장은 250 nm, 유속은 0.3 ml/min를 사용하였고, 컬럼은 Shiseido사의 Capcell Pak ODS UG120(5 μm, 4.6 mm×150 mm)를 사용하였다. 이동상은 A 용매로 100% 3차 증류수와 B 용매 100% 아세토니트릴로 각각 0.1% 포름산을 첨가하여 사용하였으며 용매계는 용매기울기 용리로서 Table I에 나타내었다.

Table I – Solvent gradient condition for HPLC-DAD

Final time (min)	Flow rate (ml/min)	A[a]	B[b]
0	0.3	85	15
10	0.3	80	20
30	0.3	65	35
35	0.3	65	35
40	0.3	85	15

[a]Water with 0.1% formic acid.
[b]Acetonitrile with 0.1% formic acid.

HPLC-MS system 및 condition

질량분석기는 HPLC(Agilent 1200 series)를 inlet으로 사용하였으며, *m/z*비 2000까지의 범위를 수용할 수 있는 Finnigan electrospray source가 결합된 Finnigan MAT LCQ ion-trap mass spectrometer(San Jose, CA, USA)를 사용하여 분석하였고 software는 Xcalibur(Finnigan MAT)를 사용하였다. 질량분석의 조건은 각 표준물질의 최적의 감도를 고려해 물질별로 나누어 설정하였다(Table II).

시료의 준비

표준시료는 검량선을 작성하기 위해 각각 메탄올로 희석하여 화합물 **1, 5**는 4, 8, 15, 20, 25, 30 μg/ml, **2~4**는 1, 2, 4, 8, 15, 20 μg/ml으로 각 농도별 혼합 시료를 준비하였다.

금은화 원시료는 자연건조 시켰다가 분말 형태로 마쇄한 후

Table II – Analytical parameters for HPLC-MS/MS

<ESI source>	Method 1	Method 2	Method 3	Method 4	Method 5	Method 6
Sheath gas flow rate (arb)	80.00	80.00	80.00	80.00	80.00	80.00
Aux gas flow rate (arb)	20.00	20.00	20.00	20.00	20.00	20.00
Spray voltage (kV)	4.50	7.00	4.50	7.00	4.50	4.50
Capillary temp (°C)	250.00	250.00	250.00	250.00	250.00	250.00
Capillary voltage (V)	-2.00	24.00	-47.00	1.50	9.50	-47.00
Tube lens offest (V)	55.00	6.00	-25.00	-17.00	-15.00	35.00
<Ion optics>						
Compounds	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**IS**
Octapole 1 offset (V)	4.50	-2.00	3.00	-2.75	-1.75	4.50
Lens voltage (V)	22.00	-34.00	20.00	-18.00	-22.00	70.00
Octapole 2 offset (V)	9.50	-4.50	6.50	-4.50	-5.00	6.50
Octapole RF amplitude (V p-p)	400.00	400.00	400.00	400.00	400.00	400.00

Table III – Comparison of effectiveness by extraction solvent (μg/g, n=3)

Compound	100% Methanol	70% Methanol	100% Ethanol	70% Ethanol
1	69488.93±307.60	69525.45±106.27	19857.91±90.08	77510.59±354.62
2	3615.87±22.01	3581.86±6.44	2889.23±5.95	3597.65±5.19
3	1460.84±8.65	1270.94±2.34	263.77±3.14	1450.35±3.52
4	2321.43±11.32	2375.71±3.40	1706.46±5.20	2622.68±2.41
5	35714.24±163.02	23862.10±51.04	13408.34±25.03	34990.49±53.44

Table IV – Comparison of effectiveness by extraction time (μg/g, n=3)

Compound	10 min	20 min	30 min	60 min	90 min
1	73889.98±133.69	71645.51±193.94	74305.82±156.66	72021.47±133.77	74792.45±65.41
2	3457.85±7.72	3271.61±9.73	3355.39±7.31	3391.05±6.65	3517.58±1.97
3	1544.64±4.51	1427.27±5.82	1566.15±4.38	1913.11±3.96	1189.94±2.48
4	2334.98±5.64	2248.30±6.99	2332.22±6.79	2575.35±4.49	2360.86±5.60
5	33210.09±68.46	30797.87±86.79	32691.63±65.61	33058.63±62.95	33654.07±36.77

Table V – Comparison of effectiveness by extraction method (μg/g, n=3)

Compound	Ultrasonication	Vortex	Reflux
1	152216.64±231.54	147877.99±114.27	150993.09±361.54
2	3598.10±3.97	3533.19±6.05	3558.71±8.81
3	1339.12±2.08	1231.14±2.03	2340.25±3.16
4	2668.40±2.66	2332.75±2.41	2360.06±7.05
5	34213.34±9.46	32908.29±33.11	29670.60±63.41

사용하였다. 최적의 추출 방법을 확립하기 위해 70%, 100% 에탄올, 70%, 100% 메탄올을 사용하여 추출 · 분석함으로써 용매별 추출 효율을(Table III), 10, 20, 30, 60, 90분 각각 추출 · 분석함으로써 추출 시간별 추출 효율을(Table IV), sonication, reflux, vortex법으로 각 시료를 추출 · 분석함으로써 추출 방법별 추출 효율을 비교하였다(Table V). 그 결과 얻어진 최상의 추출방법이 용매 70% 에탄올, 추출시간 60분, 그리고 sonication임을 확인하였다. 그리하여 마쇄한 시료 200 mg에 70% 에탄올 10 ml을 넣은 후 60분간 sonication하여 추출한 뒤 이를 0.2 μm membrane filter로 여과, 내부표준물질 10 μg 첨가한 후 HPLC 분석에 사용하였다.

실험결과 및 고찰

최적의 HPLC-DAD 조건의 탐색

서로 다른 3 종류의 생리활성물질을 동시에 분리하기 위해 여러 용매조건들을 시도한 결과 Shiseido사의 Capcell Pak C18 UG120(5 μm, 4.6 mm×150 mm)를 사용 시 이동상은 A 용매

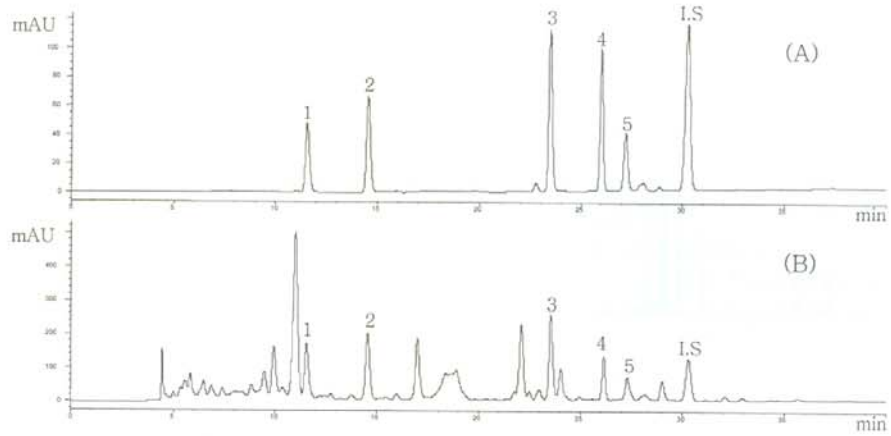


Fig. 2 – HPLC chromatograms of standard solution mixture (A) and extract of *Lonicera japonica* flower buds (B).

Table VI – Calibration curves, LODs and LOQs of five standard compounds

Compounds	Range (μg/ml)	Conversion equation[a)]	r^2	LOD[b)] (μg/ml)	LOQ[c)] (μg/ml)
1	4~30	y=0.01226x-0.01638	0.997	0.06	0.17
2	1~20	y=0.07545x+0.01128	1.000	0.03	0.09
3	1~20	y=0.05220x-0.00121	0.997	0.03	0.10
4	1~20	y=0.08436x-0.02008	0.999	0.02	0.07
5	4~30	y=0.01261x-0.02576	0.994	0.09	0.27

[a)]y: peak area, x: concentration of the analyte (μg/ml).
[b)]LOD, limit of detection. c) LOQ, limit of quantification.

100% 3차 증류수, B 용매 100% 아세토니트릴로 각각 0.1% 포름산을 첨가하여 사용하며, 컬럼 오븐의 온도를 25℃로 분석하였을 때 분석 시간 35분 이내에 모든 표준물질의 peak들이 분리되었다. 또한 각 compound들이 적절한 흡광도를 갖는 분석 파장을 탐색한 결과 250 nm에서 모든 표준물질의 peak들이 최적의 감도를 갖는 것을 알 수 있었다. Fig. 2에 혼합한 표준물질들의 chromatogram과 금은화 원시료에 대한 chromatogram을 제시하였다.

직선성, 범위, 검출한계와 정량한계

정량분석을 위한 검량선으로 각 표준물질을 단계별 농도로 희석한 혼합용액을 반복분석하여 Table VI과 같은 결과를 얻었다. 분석 파장인 250 nm에서 각 표준물질의 흡광도에 따라 **1**, **5**의 경우 4~30 μg/ml 농도의 범위를 정하였으며, **2**, **3**, **4**의 경우 1~20 μg/ml의 농도 범위를 정하였다. 분석결과 각 표준물질은 상관계수 0.994에서 1.000의 값의 높은 직선성을 나타내었으며, 검출한계와 정량한계는 시그널 대 노이즈비 3 : 1과 10 : 1로서 각각 0.02~0.09(μg/ml), 0.07~0.27(μg/ml)의 높은 감도를 나타내었다.

정확성과 정밀성

금은화 시료에 단계별 기지농도의 표준물질을 넣은 후 일간, 일내 반복 실험하여 표준물질의 회수율과 실험의 정밀성을 측정하였을 때 회수율은 최소 97.71%에서 최대 103.65%로서 높은 정확성을 나타냈으며 상대표준편차(RSD)는 최소 0.05%에서 최대 1.95%로서 우수한 정밀성을 나타내었다(Table VII).

Table VII – Precision and accuracy of the five standard compounds

Compounds	Spiked amount (μg)	Intra-day (n=5)		Inter-day (n=5)	
		Recovery (%)	RSD (%)	Recovery (%)	RSD (%)
1	4	100.05	1.15	102.68	1.49
	8	99.97	0.86	99.91	0.56
	12	101.69	0.69	101.24	0.76
2	2	103.65	0.66	101.45	0.94
	4	101.31	1.05	100.64	0.61
	8	99.58	0.05	99.55	0.15
3	2	101.99	0.51	99.79	0.92
	4	98.81	1.19	97.71	2.26
	8	98.89	0.29	99.52	0.29
4	2	99.73	0.27	100.47	0.31
	4	100.16	0.54	100.68	1.84
	8	98.41	0.21	99.33	0.16
5	4	98.71	1.95	99.36	1.36
	8	99.64	1.62	99.97	1.16
	12	101.49	0.32	101.36	0.40

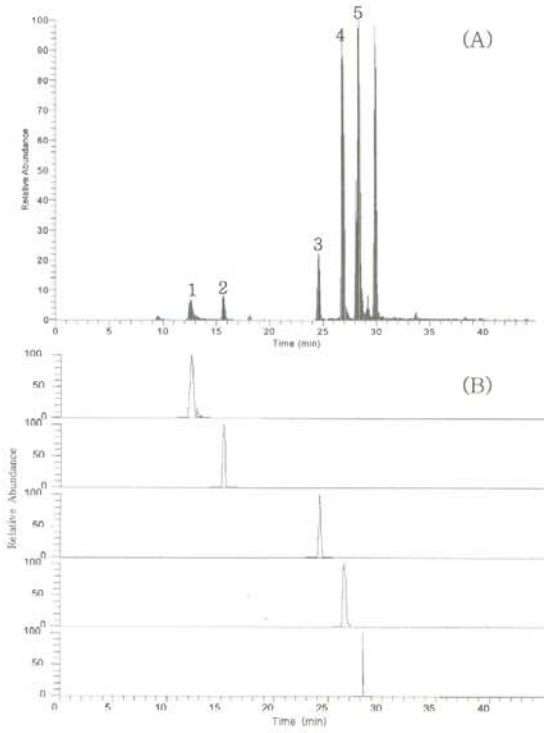


Fig. 3 – Total ion chromatograms of *Lonicera japonica* flower buds in SIM mode (A) and SRM mode (B).

HPLC-DAD-MS/MS를 이용한 표준물질의 동정

금은화에 함유된 표준물질의 동정에 있어 HPLC-DAD를 통해서는 머무름 시간의 일치를 통한 chromatogram상의 시각적인 정보만을 얻을 수 있다. 그래서 HPLC-DAD-MS/MS를 통해 금은화 시료에 함유된 표준물질의 머무름 시간과 m/z값 및 fragment의 패턴을 확인함으로써 시료내의 표준물질을 동정하였다(Fig. 3). Table VIII에 각 peak에 대한 분석결과를 나타내었다.

산지별 생리활성 물질 함량 비교

국내에서 현재 유통되고 있는 금은화는 대부분 중국산과 국내산이며, 산지별 생리활성물질의 함량이 차이가 있음에도 불구하고 이를 비교분석할 만한 신뢰성 있는 자료가 부족하다. 그러므로 본 실험에서 확립한 최적의 분석법을 토대로 산지별 21종의 생리활성 물질을 분석하였다(Table IX).

Table IX – Content of five compounds in samples of twenty-one commercial products from diverse sources (μg/g)

Samples	1	2	3	4	5
An-dong 1	3456.77	926.17	614.99	175.73	2885.57
An-dong 2	7989.60	1157.86	1023.19	257.97	5566.93
Bong-hwa	3601.50	804.81	949.01	-	4292.22
Bu-yeo	4909.73	1071.91	874.65	187.30	3681.06
Cheong-song	10126.69	1438.64	1228.70	323.25	7447.40
Geo-jin	3542.25	866.89	619.49	161.65	4042.88
Go-heung	2881.87	534.02	949.01	-	4292.22
Goon-wi	4230.96	659.26	1366.43	132.24	3929.51
Hong-cheon	5924.49	1156.15	674.24	325.16	4870.20
Yang-yang	2221.00	457.22	633.02	133.30	3238.51
Kyo-yi	6475.80	1011.85	822.01	320.28	5442.21
Mt. seolak	5851.42	668.13	748.63	226.91	6665.29
Nak-moon	2941.07	834.07	740.00	172.01	2613.17
Ui-seong	6637.39	1154.31	1185.49	293.86	5306.25
Ul-jin	2866.85	589.57	471.12	80.10	3274.00
China (unidentified)	3144.18	1532.69	807.89	401.76	3611.50
Hanam 1 (China)	2815.78	788.32	521.13	120.07	2335.76
Hanam 2 (China)	64247.89	3120.63	750.17	2562.84	29177.90
Mil-hyun (China)	62441.82	3297.94	705.81	2523.07	27465.54
Sandong 1 (China)	43840.90	1559.03	1560.76	606.95	29747.88
Sandong 2 (China)	59194.80	2635.71	908.53	2639.58	26975.64

1: chlorogenic acid, **2**: sweroside, **3**: luteolin-7-*O*-glucoside, **4**: (*E*)-aldosecologanin, **5**: 3,5-dicaffeoylquinic acid.

분석결과 21종의 금은화에 함유된 생리활성 물질의 함량은 대체적으로 불규칙적이었으며, 대체적으로 sweroside(**2**), luteolin-7-*O*-glucoside(**3**), (*E*)-aldosecologanin(**4**)은 낮은 함량을 가졌고 chlorogenic acid(**1**)와 3,5-dicaffeoylquinic acid(**5**)은 높은 함량을 가졌다. 또한 전반적인 활성 물질의 함량을 볼 때 중국 하남산과 산동산이 가장 높았다.

대부분의 한약제와 마찬가지로 금은화 또한 함량이 높은 활성물질 하나로는 금은화가 가지 고 있는 전반적인 약효를 나타내지 못하며 여러 개의 활성물질이 같이 존재할 때 시너지 효과를 발휘한다고 알려져 있다.[16] 그러므로 단일 활성 성분만을 분석하여 생약재의 질을 판단하기 보다는 보다 체계적인 활성검색에 의하여 시너지 효과가 규명된 활성 물질에 대한 동시 분석법이

Table VIII – HPLC-DAD-MS/MS Data of the five bioactive compounds in *Lonicera japonica* flower buds

Peak No.	MW[a]	MS (m/z)	MS/MS (m/z)	C.E[b]	Ion mode	Identification
1	354	353	191	26	Negative	chlorogenic acid
2	358	381	219	40	Positive	sweroside
3	448	447	285	34	Negative	luteolin-7-*O*-glucoside
4	758	781	549	58	Positive	(*E*)-aldosecologanin
5	516	517	501	25	Positive	3,5-dicaffeoylquinic acid

[a]Molecular weight.
[b]Collision energy.

한약재 평가를 위한 적절한 접근방법으로 사료된다.

결 론

본 실험은 HPLC-DAD-MS/MS를 이용하여 금은화에 함유된 3 종류의 생리활성물질의 동시분석법을 개발하였으며, 최적의 조건에 대한 평가로서 직선성, 범위, 검출한계, 정량한계, 정밀성과 정확성 등 여러 validation parameter들을 제시하였다. 또한 각 표준물질들의 정확한 동정을 위하여 HPLC-DAD-MS/MS를 이용하여 이를 확인하였고 이와 같이 확립한 최적의 분석법을 통하여 국내에 유통되고 있는 금은화 21종의 활성성분 함량을 비교분석하였다.

감사의 말씀

본 연구는 한국 식품의약품안전청(KFDA) 주관아래 수행된 한약재 과학화사업(과제번호: 07092 한약재 321)으로서 연구비 지원에 감사드립니다.

참고문헌

1) 정보섭, 김일혁, 김재가 : 원색 천연물대사전 상권, 남산당, p. 12 (1984).
2) 진재인 : 도설한방의학대사전(중국약학대전) I, 강담사, p. 160 (1982).
3) Pharmacopoeia of the people's republic of China, Chemical Industry Press, Peking, p. 152 (2005).
4) Chang, C.-W., Lin, M.-T., Lee, S.-S., Liu, K. C. S. C., Hsu, F.-L. and Lin, J.-Y. : Differential inhibition of reverse transcriptase and cellular DNA polymerase-a activities by lignans isolated from Chinese herbs, Phyllanthus myrtifolius Moon, and tannins from Lonicera japonica Thunb and Castanopsis hystrix. *Antiviral Res.* **27**, 367 (1995).
5) Xiang, T., Xiong, Q. B., Ketut, A. I., Tezuka, Y., Nagaoka, T., Wu, L. J. and Kadota, S. : Studies on the hepatocyte protective activity and the structure-activity relationships of quinic acid and caffeic acid derivatives from the flower buds of Lonicera bournei. *Planta Medica* **67**, 322 (2001).
6) Chang, W.-C. and Hsu, F.-L. : Inhibition of platelet activation and endothelial cell injury by polyphenolic compounds isolated from Lonicera japonica Thunb. *Prost. Leuk. Essen. Fatty Acids* **45**, 307 (1992).
7) Leung, H. W.-C., Kuo, C.-L., Yang, W.-H., Lin, C.-H. and Lee, H.-Z. : Antioxidant enzymes activity involvement in luteolin-induced human lung squamous carcinoma CH27 cell apoptosis. *Eur. J. Pharmacol.* **534**, 12 (2006).
8) Lee, S. J., Choi, J. H., Chang, H. W., Kang, S. S. and Kim, H. P. : Suppression of mouse lymphocyte proliferation *in vitro* by naturally-occurring biflavonoids. *Life Sci.* **57**, 551 (1995).
9) Peng, Y., Liu, F. and Ye, J. : Determination of phenolic acids and flavones in lonicera japonica thumb. by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Electroanal.* **17**, 356 (2005).
10) 정규찬, 권동렬, 백석환, 김성환, 장현욱 : 금은화 (Lonicerae Flos)의 ethyl acetate 분획이 돌연변이원성에 미치는 영향 (Effects of Lonicerae Flos' ethyl acetate fraction on mutagenicity). 약학회지 **32**, 328 (1988).
11) Peng, L.-Y., Mei, S.-X., Jiang, B., Zhou, H. and Sun, H.-D. : Constituents from Lonicera japonica. *Fitoterapia* **71**, 713 (2000).
12) Song, Y., Li, S.-L., Wu, M.-H., Li, H.-J. and Li, P. : Qualitative and quantitative analysis of iridoid glycosides in the flower buds of Lonicera species by capillary high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometric detector. *Anal. Chim. Acta* **564**, 211 (2006).
13) Machida, K., Sasaki, H., Iijima, T. and Kikuchi, M. : Studies on the constituents of Lonicera species. XVII. New iridoid glycosides of the stems and leaves of *Lonicera japonica* THUNB. *Chem. Pharm. Bull.* **50**, 1041 (2002).
14) Xing, J. and Li, P. : Research on chemical constituents of Lonicera : A review and prospects. *J. Chin. Med. Mater.* **22**, 366 (1999).
15) Rahimuddin, S. A., Khoja, S. M., Zuhair, M. M., Howell, N. K. and Brown, J. E. : Inhibition of lipid peroxidation in UVA-treated skin fibroblasts by luteolin and its glucosides. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **109**, 647 (2007).
16) Qian, Z.-M., Li, H.-J., Li, P., Ren, M.-T. and Tang, D. : Simultaneous qualitation and quantification of thirteen bioactive compounds in Flos Lonicerae by high-performance liquid chromatography with diode array detector and mass spectrometry. *Chem. Pharm. Bull.* **55**, 1073 (2007).

총괄 연구과제 요약

과제번호	08182한약재252			
단위과제명	한약재의 생리활성성분의 분리 및 분석연구			
과 제 명	한약재의 생리활성성분의 분리 및 분석연구(금은화, 인동)			
연구책임자	성 명	강 삼 식	주민등록번호 (앞번호만기재)	
	소속 기관명	서울대학교 약학대학		

○ 연구목표 (400~600자)

금은화 및 인동으로부터 유효성분 중심의 한약재 관리에 필요한 생리활성 성분의 분리, 확인 및 이들 생리활성 성분을 이용한 HPLC/UV 및 LC-MS(MS)법에 의한 동시분석법을 개발하고 pattern인식법에 의한 기원별, 산지별 한약재 정보를 구축한다. 분석을 위한 표준품을 제조, 공급하고, 차후 연구를 위한 시료를 확보하여 제공하고자 한다. 이를 위하여 금은화 및 인동으로부터 주성분들을 포함한 활성성분들을 대량 분리하여 분석용 표준품 및 연구용 시료로 제공한다.
금은화 및 인동 활성성분의 효과적인 정성정량 분석법 확립, 순도결정 및 5성분 이상의 지표물질 동시 분석법 개발과 산지 기원에 따른 20품목 이상의 시료에 대한 패턴인식/지문인식법에 의한 한약재 평가 완료한다.

○ 연구내용 (1000~1200자)

인동으로부터 2종의 polyoxygenated C_{18} 지방산, 6종의 triterpene, 5종의 sterol, 5종의 phenyl propanoid들과 5종의 iridoid, 4종의 lignan 성분들인 9α-hydroxypinoresinol, pinoresinol glucoside, (+)-5-demethyl-3-methoxyisolariciresinol, (7*R*,8*R*)-*threo*-4,7,9,3′,9′-pentahydroxy-3-methoxy-8-*O*-4′-neolignan을 비롯하여 linarin, trilinolein, bis(2-ethylhexyl)phthalate, long chain alcohol성분과 지방산 혼합물 등 총 34종의 화합물들을 분리 규명하였으며, 이중 lignan성분인 (+)-5-demethyl-3-methoxyisolariciresinol은 처음 분리된 신물질이다. 금은화로부터 6종의 flavonoid, chlorogenic acid 유도체 6종, iridoid 4종, caffeic acid, vanillic acid 4-*O*-β-D-(6-*O*-benzoylglucoside) 등 2종의 phenyl propanoid성분, esculetin, 기타 protocatechuic acid, β-sitosterol, daucosterol, azelaic acid와 uracil, cerebroside, hydrocarbon alcohol, monopalmitin 및 sucrose 등 총 29종의 화합물들을 분리 확인하였으며, 이중 vanillic acid 4-*O*-β-D-(6-*O*-benzoylglucopyranoside)는 처음으로 분리된 신물질이다. 금은화, 인동 유래의 생리활성성분 특히 flavonoid, phenol성 물질 및 iridoid 성분들의 HPLC-DAD를 이용한 효과적인 분리, 분석방법 확립하였으며 벨리데이션 완료하였다. 금은화, 인동으로부터 분리한 5종 이상의 지표성분들에 대한 동시 표준분석법을 개발 하였으며, 금은화와 인동의 HPLC, LC-MS 및 LC-MSMS의 분리조건 확립 및 validation을 입증하였다. 또한 시중에 유통되고 있는 20종 이상의 금은화와 인동에 함유된 생약성분의 정성 및 정량분석 그리고 패턴분석을 완료하였다. 금은화, 인동 생약의 규격화를 위하여 활성성분에 대한 다양한 크로마토그래피 조건하에서의 함량분석 및 기초실험을 완료하였다.

○ 연구성과(응용분야 및 활용범위포함) (400~600자)

인동/금은화로부터 각각 신물질인 1종을 포함하여 34종/29종의 화합물들을 분리하고 이들의 화학구조들을 규명하였다. 분리된 많은 화합물들은 인동/금은화로부터 처음으로 분리된 화합물들임을 알았다. 이들 화합물들을 동시분석법 개발을 위한 시료 (18종) 및 효능검색용 시료 (22종)로 제공하였다. 연구결과를 종합하여 인동의 지표성분으로 loganin, sweroside, pinoresinol glucoside, linarin 등과, 금은화의 chlorogenic acid, luteolin 7-*O*-glucoside, 3,5-dicaffeoylquinic acid, caffeic acid 등을 지표성분으로 활용가능성 제시하였으며, 국가 표준품으로 이용하기 위하여 각 10종씩 제공할 예정이다. 금은화와 인동의 HPLC, LC-MS 및 LC-MSMS의 분리조건 확립 및 validation을 수행하였으며, 시중 한약재의 품질관리를 위하여 동시분석법을 개발하고 20종이상의 인동/금은화 성분의 정성, 정량분석 및 패턴분석을 완료하였다. 이들 활용한 금은화와 인동의 규격화를 위한 지표자료로 활용하며, 한약재들의 과학화를 위한 자료의 제공과 약전 및 관련 DB 구축을 위한 자료로 활용가능을 제시하였다.

○ 총괄 참여연구원

성 명	주민등록번호(앞번호만 기재)	성 명	주민등록번호(앞번호만 기재)
강삼식		신종헌	
김주선		장경화	
이은주		유성광	
연민혜		전주은	
이소영		오하나	
서현규			
신현정			

Keywords (5개 내외)	한글	인동, 금은화, 활성성분 분리, 동시분석법
	영문	*Lonicera japoninca*, Vine and Flower, Isolation, Bioactive components, simultaneous determination

주1) 연구목표, 연구내용, 연구성과를 서술형으로 기재
2) 국가연구개발사업 DB를 통한 공개를 희망하지 않는 경우 공개가능여부란에 “공개불가"로 표시
3) 연구성과는 그간의 연구결과 및 기대성과를 서술

세부 연구과제 요약

과제번호	08182한약재252			
단위과제명	한약재의 생리활성성분의 분리 및 분석연구			
제1세부과제명	금은화 및 인동으로부터 한약재 생리활성성분의 분리			
연구책임자	성 명	강 삼 식	주민등록번호 (앞번호만기재)	
	소속 기관명	서울대학교		

○ 연구목표 (400~600자)

금은화 및 인동으로부터 유효성분 중심의 한약재 관리에 필요한 생리활성 성분의 분리, 확인하고 pattern인식법에 의한 기원별, 산지별 한약재 정보를 구축하고자 한다. 분리된 성분들을 효능평가를 위한 실험재료로 공급한다. 기원별, 산지별 분석을 위한 표준품을 제조, 공급하고, 차후 연구를 위한 시료를 확보하여 제공하고자 한다.

○ 연구내용 (1000~1200자)

인동으로부터 pinellic acid와 9,12,13-trihydroxyoctadeca-10(*E*),15(*Z*)-dienoic acid, 6종의 triterpene계 성분, 5종의 4α-methyl ergosterol 유도체들 및 phytosterol류, 5종의 phenyl propanoid성분들과 5종의 iridoid 성분들, 4종의 lignan 성분들인 9α-hydroxypinoresinol, pinoresinol glucoside, (+)-5-demethyl-3-methoxyisolariciresinol, (7*R*,8*R*)-*threo*-4,7,9,3′,9′-pentahydroxy-3-methoxy-8-*O*-4′-neolignan을 비롯하여 linarin, trilinolein, bis(2-ethylhexyl) phthalate, long-chain alcohol성분과, 지방산 혼합물 등 총 34종의 화합물들을 분리 규명하였으며, 이중 lignan성분인 (+)-5-demethyl-3-methoxyisolariciresinol은 처음 분리된 신물질이다.
금은화로부터 6종의 flavonoid 성분, chlorogenic acid 유도체 6종, 7-ketologanin 등 iridoid 성분 4종, caffeic acid, vanillic acid 4-*O*-β-D-(6-*O*-benzoylglucopyranoside) 등 2종의 phenyl propanoid 성분, esculetin, 기타 protocatechuic acid, β-sitosterol, daucosterol, azelaic acid와 uracil, cerebroside, hydrocarbon alcohol, monopalmitin 및 sucrose 등 총 29종의 화합물들을 분리 확인하였으며, 이중 vanillic acid 4-*O*-β-D-(6-*O*-benzoylglucopyranoside)는 처음으로 분리된 신물질이다. 분리된 많은 화합물들은 인동/금은화로부터 처음으로 분리된 화합물들이며 이들의 화학구조는 분광학적 방법을 주로 이용하였다.

○ 연구성과(응용분야 및 활용범위포함) (400~600자)

인동으로부터 신물질인 (+)-5-demethyl-3-methoxyisolariciresinol을 포함하여 34종의 화합물, 금은화로부터 신물질인 vanillic acid 4-*O*-β-D-(6-*O*-benzoylglucopyranoside)을 포함하여 29종의 화합물들을 분리하여 주로 분광학적 방법을 활용하여 이들의 화학구조들을 규명하였다. 분리된 많은 화합물들은 인동/금은화로부터 처음으로 분리된 화합물들임을 알았다. 분리된 화합물들을 동시분석법 개발을 위한 시료 (18종) 및 효능검색용 시료 (22종)로 제공하였다. 이상의 연구수행 결과를 종합하여 인동의 지표성분으로 loganin, sweroside, coniferylaldehyde, linarin 등과, 금은화의 chlorogenic acid, luteolin 7-*O*-glucoside, 3,5-dicaffeoylquinic acid, caffeic acid 등을 지표성분으로 활용가능할 것으로 생각되며, 이들 화합물들에 대하여서는 국가 표준품으로 이용하기 위하여 각 10종씩 제공할 예정이다.

○ 참여연구원

성 명	주민등록번호(앞번호만 기재)	성 명	주민등록번호(앞번호만 기재)
강삼식			
김주선			
이은주			
연민혜			
이소영			
서현규			
신현정			

Keywords (5개 내외)	**한글**	인동, 금은화, 활성성분 분리
	영문	*Lonicera japoninca*, vine and flower, isolation, bioactive components

주1) 연구목표, 연구내용, 연구성과를 서술형으로 기재
2) 국가연구개발사업 DB를 통한 공개를 희망하지 않는 경우 공개가능여부란에 “공개불가"로 표시
3) 연구성과는 그간의 연구결과 및 기대성과를 서술
4) 세부과제가 없을시 작성하지 않음 (세부과제별로 작성)

세부 연구과제 요약

과제번호	08182한약재252			
단위과제명	한약재의 생리활성성분의 분리 및 분석연구			
제2 세부과제명	지표물질 동시 정성정량분석법개발 및 패턴분석			
연구책임자	성 명	신종헌	주민등록번호 (앞번호만기재)	
	소속 기관명	서울대학교 약학대학		

○ 연구목표 (400~600자)

금은화와 인동에 함유된 활성성분의 품질관리를 위하여 정성 및 정량분석법을 확립하고 5성분 이상의 지표물질 동시분석법을 개발한다. 또한 산지 및 기원에 따른 20품목 이상의 시료에 대한 패턴인식 및 지문인식법에 의한 한약재를 평가한다. 개발된 분석법들에 대한 validation을 실시하여 입증한다. 또한 시판되는 생약시료에 대한 분석과 패턴분석으로 개발방법의 실효성을 입증한다. 시중에 유통되고 있는 금은화와 인동시료의 품질관리를 위하여 동시표준분석법을 개발한다. 금은화와 인동의 HPLC, LC-MS 및 LC-MSMS의 분리조건 확립 및 validation을 수행한다. 또한 시중에 유통되고 있는 20종 이상의 금은화와 인동에 함유된 생약성분의 정성 및 정량분석 그리고 패턴분석을 수행한다.

○ 연구내용 (1000~1200자)

금은화, 인동 유래의 생리활성성분 특히 flavonoid, phenol성 물질 및 iridoid 성분들의 HPLC-DAD를 이용한 효과적인 분리, 분석방법의 확립하였으며, 개발된 분석법들에 대한 벨리데이션 완료하였다. 금은화, 인동으로부터 분리한 5종 이상의 지표성분들에 대한 동시표준분석법을 개발 하였으며, 금은화와 인동의 HPLC, LC-MS 및 LC-MSMS의 분리조건 확립 및 validation을 입증하였다. 또한 시중에 유통되고 있는 20종 이상의 금은화와 인동에 함유된 생약성분의 정성 및 정량분석 그리고 패턴분석을 완료하는 등 당초의 연구목표를 완전히 달성하였다. 금은화, 인동 생약의 규격화를 위하여 활성성분에 대한 다양한 크로마토그래피 조건하에서의 함량분석 및 기초실험을 완료하였다.

○ 연구성과(응용분야 및 활용범위포함) (400~600자)

금은화와 인동의 HPLC, LC-MS 및 LC-MSMS의 분리조건 확립 및 validation을 입증하였다. 시중에 유통되고 있는 금은화와 인동시료의 품질관리를 위하여 동시표준분석법을 개발에 성공하였다. 또한 시중에 유통되고 있는 금은화와 인동에 함유된 생약성분의 정성 및 정량분석 그리고 패턴분석을 완료하는 등 당초의 연구목표를 완전히 달성하였다.
정량, 정성적인 지표들을 활용한 금은화와 인동의 생약성분들의 규격화를 위한 지표자료로 활용하며, 한약재들의 과학화를 위한 정책적인 자료의 제공과 약전 및 관련 DB 구축을 위한 자료로 활용가능하리라고 사료된다.

○ 참여연구원

성 명	주민등록번호(앞번호만 기재)	성 명	주민등록번호(앞번호만 기재)
신종헌			
장경화			
유성광			
오하나			
전주은			

Keywords (5개 내외)	한글	금은화, 인동, 생리활성성분, 정성 및 정량분석, 패턴분석
	영문	*Lonicera japonica*, bioactive components, qualitative & quantitative analyses, pattern analysis

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)

〔별지 제12호서식〕

용역연구개발과제 최종보고서

과제번호	08182한약재252			
단위과제명	한약재의 생리활성성분의 분리 및 분석연구			
과 제 명	국문	한약재의 생리활성성분의 분리 및 분석연구(금은화, 인동)		
	영문	Isolation and quantitative analysis of bioactive components from Lonicera Vine and Lonicera Flower		
주관 연구기관	기 관 명		소재지	대 표
	서울대학교		서울 관악구 신림9동 산56의1	이 장 무
주관 연구책임자	성 명		소속 및 부서	전 공
	강 삼 식		약학대학 천연물과학연구소	천연물화학
총연구기간	2007년 2월 28일 - 2008년 11월 30일(1년 5.6개월)			
총 연구개발비	320,000천원			
연구년차	연구기간		연구개발비	
1차년도	2007. 2. 28 - 2007. 11. 10		160,000천원	
2차년도	2008. 3. 13 - 2008. 11. 30		160,000천원	
총참여연구원	12명 (책임연구원: 2명, 연구원: 1명, 연구보조원: 9명 보조원: 0명)			

2008년도 용역연구개발과제에 의하여 수행중인 연구과제의 최종보고서를 붙임과 같이 제출합니다.

2008년 11월 30일

주관연구책임자 강 삼 식 (인 또는 서명)

주관연구기관장 (직인)

식품의약품안전청장 귀하

편집순서 1 : 겉표지

(뒷면) (측면) (앞면)

주 의 (주 의 내 용 기 재) (흔글 14 point 고딕체)	과 제 명 2 0 0 6 식 품 의 약 품 안 전 청	최종보고서 **국문과제명** **영문과제명** 주관연구기관 : **식품의약품안전청**

주 의

1. 이 보고서는 식품의약품안전청에서 시행한 용역연구개발사업의 연구결과보고서입니다.

2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 식품의약품안전청에서 시행한 용역연구개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.

3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.

4. 이 보고서 내용을 신문, 방송, 참고문헌, 세미나 등에 인용 시에는 해당 주관부서 또는 연구책임자와 사전에 상의하여 주시기 바랍니다.

최종보고서

한약재의 생리활성성분의 분리 및 분석연구 (금은화, 인동)

Isolation and quantitative analysis of bioactive components from Lonicera Vine and Lonicera Flower

주관연구기관 : 서울대학교

식품의약품안전청

한약재의 생리활성성분의 분리 및 분석연구 (금은화, 인동) 2008
식품의약품안전청