

인지기능개선 건강기능식품의 산업화연구

**Development of nutraceuticals improving
cognitive functions**

한국화학연구원

교육과학기술부

인지기능개선 건강기능식품의 산업화연구

Development of nutraceuticals improving
cognitive functions

한국화학연구원

교육과학기술부

제 출 문

교육과학기술부 장관 귀하

본 보고서를 “인지기능개선 건강기능식품의 산업화연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2010 . 05. 25.

주관연구기관명	:	한국화학연구원
주관연구책임자	:	김 영 섭
		연 구 원: 유 시 용
		연 구 원: 연 규 환
		연 구 원: 홍 경 식
		연 구 원: 유 대 석
		연 구 원: 최 연 희
		연 구 원: 최 춘 환
협동연구기관명	:	(주)장생도라지 생명과학연구소
협동연구책임자	:	박 병 근
위탁연구기관명	:	한국국제대학교 식품바이오테크노센터
위탁연구책임자	:	정 영 철

보고서초록

과제관리번호	PF06215-00	해당단계 연구기간	2006.04.01 - 2010.03.31	단계 구분	(3단계) / (3단계)
연구사업명	중 사업명	21C 프론티어연구개발사업			
	세부사업명	자생식물이용기술개발사업			
연구과제명	중 과제명	인지기능개선 건강기능식품의 산업화연구			
	세부(단위)과 제명	인지기능개선 건강기능식품의 규격화연구 (한국화학연구원 : 김영섭) 인지기능개선 건강기능식품의 제품화연구 (장생도라지 생명과학연구소 : 박병근)			
연구책임자	김 영 섭	해당단계 참여 연구원수	총 : 60 명 내부 : 20 명 외부 : 60 명	해당단계 연구비	정부: 720,000 천원 기업: 480,000 천원 계 : 1,200,000 천원
연구기관명 및 소속부서명	한국화학연구원 신물질연구단		참여기업명	(주)장생도라지	
국제공동연구	상대국명 :		상대국연구기관명 :		
위 탁 연 구	연구기관명 : 한국국제대학교		연구책임자 : 정 영철		
요약 (연구결과를 중심으로 개조식 500자이내)				보고서 면수	129
<p>1.2 단계 연구결과를 토대로 3단계에서는 인지기능개선 건강기능식품의 산업화에 중점을 두고 연구를 수행하였다.</p> <p>첫째로 도라지의 약효성분인 사포닌을 도라지 추출물로부터 분리 정제하여 표준품의 사포닌을 신규 화합물 3종을 비롯한 20여 종류 확보하였다. 두 번째로는 이를 바탕으로 기존의 분석방법으로는 분석할 수 없었던 도라지 사포닌의 표준분석방법을 찾아내었다. 세 번째로는 에탄올 및 스코폴라민을 이용한 수동회피실험과 수미로 실험을 통하여 도라지 추출물의 인지기능저하 개선 효능을 찾아내었으며, 또한 뇌 허혈로 인한 뇌 신경세포의 사멸로 발생할 수 있는 인지기능저하 가능성을 억제하기 위한 신경세포보호효능에 관한 연구를 통하여 도라지 추출물은 뇌허혈시 발생하는 뇌신경세포의 사멸을 억제함을 발견하였다. 네 번째로는 약 동력학 실험을 수행하여 도라지 추출물의 제형 개발 및 체내 동태에 관한 연구를 수행하였다. 다섯 번째로는 산업화 연구로 원료의 품질 표준화, 생산공정의 표준화등을 통하여 현재 GMP 시설을 갖춘 제 2 공장을 건설 중에 있으며, 이는 2010년 5월초에 준공하여 다양한 인지기능개선용 제품을 생산 준비 중에 있다. 마지막으로 인지기능저하 개선용 건강기능식품 개별인정을 획득하기 위하여 현재 임상실험을 진행 중에 있다.</p>					
색 인 어 (각 5개 이상)	한 글	인지기능개선, 허혈, 수동회피실험, 수미로실험, 도라지			
	영 어	cognitive dysfunction, ischemia, passive avoidance test, water maze test <i>P. glandiflorum</i>			

요 약 문

I. 제 목

인지기능개선 건강기능식품의 산업화연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

노인성치매(Alzheimer's Disease)는 암, AIDS와 함께 WHO가 지정하고 있는 21세기 3대 난치성질환으로서 기억력 및 학습력 등 여러가지 인지기능이 점차적으로 퇴화, 손상되는 진행형 퇴행성 뇌질환이다.

현재 국내에서는 40만명 정도의 인지기능저하를 호소하는 환자들이 있으며, 미국의 경우 400만명 이상의 노인성 치매환자가 있으며 이들의 치료 및 간병관리에 소요되는 의료비가 연간 1,000억 달러에 달하고 있다 (2000년 WHO통계).

구미각국에서는 이 질병의 예방 및 치료를 목적으로 대규모의 신약개발연구가 진행 중에 있으며 이와 병행하여 다양한 식품의약 (nutraceutical)의 개발이 시도되고 있다. 이와 같은 연구추세에 따라 우리나라에서도 범국가적으로 노인성 치매로 인한 각종 인지기능퇴행을 효과적으로 예방하거나 개선시킬 수 있는 천연물의약 혹은 식품의약의 개발연구를 추진하여야 하리라 사료된다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

제 1, 2단계 자생식물이용 기술개발연구사업을 통하여 이미 도출된 바 있는 탁월한 인지기능개선효과를 보여주는 AL-27, AL-33 등 10종의 복합제제의 기본생약제인 도라지에 관한 연구를 집중적으로 수행하여 인지기능개선용 식품의약으로 연구 발전시켜 상품화를 이룩한다. 이에따라 개발된 상품은 우선적으로 국내시장에의 출시를 목표로 하고 아울러 해외시장으로의 진출 방안을 모색한다. 이와 같은 연구목표를 위하여 식품의약의 상품화연구를 전담할 (주)장생도라지와 공동연구를 통하여 복합제제의 대량생산공정기술을 개발하고 제품의 규격화를 확립함과 동시에 표준분석방법, 약효 약동력학 및 안전성 등을 연구하여 도라지를 주원료로하는 시제품생산은 물론 상품화를 위한 기반연구를 체계적으로 수

행하고자 한다.

IV. 연구개발결과

첫째로 도라지의 약효성분인 사포닌을 도라지 추출물로부터 분리정제하여 표준품의 사포닌을 신규 화합물 3종을 비롯한 20여 종류 확보하였다. 두 번째로는 이를 바탕으로 기존의 분석방법으로는 분석할 수 없었던 도라지 사포닌의 표준 분석방법을 찾아내었다. 세 번째로는 에탄올 및 스코폴라민을 이용한 수동회피실험과 수미로 실험을 통하여 도라지 추출물의 인지기능저하 개선 효능 찾아내었으며, 또한 뇌 허혈로 인한 뇌 신경세포의 사멸로 발생할 수 있는 인지기능저하 가능성을 억제하기 위한 신경세포보호효능에 관한 연구를 통하여 도라지 추출물은 뇌허혈시 발생하는 뇌신경세포의 사멸을 억제함을 발견하였다. 네 번째로는 약 동력학 실험을 수행하여 도라지 추출물의 제형 개발 및 체내 동태에 관한 연구를 수행하였다. 다섯 번째로는 산업화 연구로 원료의 품질 표준화, 생산공정의 표준화등을 통하여 현재 GMP 시설을 갖춘 제 2 공장을 건설 중에 있으며, 이는 2010년 5월초에 준공하여 다양한 인지기능개선용 제품을 생산 준비 중에 있다. 마지막으로 인지기능저하 개선용 건강기능식품 개별인정을 획득하기 위하여 현재 임상실험을 진행 중에 있다.

V. 연구개발결과의 활용계획

제 2단계 연구를 통하여 도출된 인지기능 개선용 복합제제 장생 Royal 은 국내에서의 건강기능식품 등록에 앞서서 미리 해외 시장 진출사업을 추진한 결과 2005년 7월에 일본 고요(高陽)사와 매년 300 만불의 수출계약을 체결하는 등 기대 이상의 성과를 얻고 있어 향후 국내시장을 선점할 수 있는 교두보를 확보하였다.

제 3단계 연구를 통하여 건강기능식품 등록과 함께 보다 더 고부가가치의 상품으로 발전시켜 본격적으로 국내에서 상용화될 수 있는 발판을 구축하고 아울러 일본 등 아시아지역을 넘어 미국 등 구미시장으로의 진출할 수 있는 발판을 구축하고자 한다.

S U M M A R Y

For developing a new kind of nutraceutical consist of plant materials with improving effect upon the cognition (memory) impairment caused by the progress of neurodegenerative disease such as senile dementia or Alzheimer's diseases (AD), we have conducted several tasks inquired for the production of commercial nutraceuticals consist of the plant material, *Platycodon grandiflorum* (Campanulaceae) and industrialization of them.

For this purpose, more than 20 kinds of standard saponin components, which were generally accepted as active principles of *P. grandiflorum*, including three novel compounds were completely purified from the species. A standardized simultaneous quantitative assay method by HPLC equipped with ELSD or ESI-MS-MS detector for the analyses of saponin contents of the commercial product were established, which was employed as a valuable tool for the quality control procedures.

The cognitive enhancing activity of the extract of *P. grandiflorum* was further confirmed by animal experiments using scopolamine-induced amnesia mice and evaluated by passive avoidance scores acquired by step through test and water maze test. Protective effect of the extract from *P. grandiflorum* as well as saponin components on ischemia/reperfusion injury in the gerbil hippocampus was evaluated, which could support in part the ameliorating effect of the extract of *P. grandiflorum* on cognitive impairment caused by the progress of neurodegenerative disease.

Extensive preclinical, toxicologic and pharmacokinetic investigation of characteristic saponin of *P. grandiflorum*, platycodin D and platycoside E after oral administration or intravenous injection, which could provide us with valuable information for the establishment of dosage form of commercial nutraceutical products.

The big plant for the production of commercial nutraceutical products were under construction in Jinju and bound to complete in May 2010, equipped with modern installation and facilities applicable to the regulation of GMP, which can be capable of automatization of all processes for manufacturing of various types of foods and nutraceuticals.

A large scale of Clinical trials on the developed nutraceutical products comprising the extract of *P. grandiflorum* is scheduled to perform in six individual hospitals from April, 2010 under the financial support of the Plant Diversity Research Center, which is the final step for the registration of nutraceutical products.

C O N T E N T S

Chapter 1. Perspective of view	8
I Objectives and importance of the R & D project	8
1. Objectives and importance of the R & D project	8
2. Contents and scope of the R & D project	9
Chapter 2. State of Art of the R & D project	11
Chapter 3. Contents and results of the R & D	13
I Standardization of the purification method and analysis of saponins in balloonflower	13
II Cognition enhancing effect and neuro protective effects of the Platycodin Radix	70
III Toxicology and PK study of the Platycodin Radix and its saponins	102
IV Development & commercialization of nutraceuticals with cognition enhancing effect	113
Chapter 4. Contribution of research product and the result	120
Chapter 5. Application of the research product and the result	123
Chapter 6. Other scientific informations collected	124
Chapter 7. References	125

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	8
제 1 절 연구개발의 목적, 필요성	8
1. 연구개발의 필요성	8
2. 연구개발의 범위	9
제 2 장 국내외 기술개발 현황	11
제 1 절 특허를 중심으로 도라지 연구현황	11
제 2 절 논문을 중심으로 도라지 연구현황	12
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	13
제 1 절 도라지 사포닌들의 분리정제 및 표준 분석방법	13
제 2 절 도라지 추출물의 인지기능개선 및 뇌신경보호 효능 연구 ..	70
제 3 절 도라지 추출물 및 사포닌의 약동력학 연구	102
제 4 절 인지기능개선 건강기능식품의 산업화 연구	113
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	120
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	123
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	124
제 7 장 참고문헌	125

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적, 필요성

1. 연구개발의 필요성

(1) 기술적 측면

- 1) 노인성치매(Senile dementia ; Alzheimer's Disease)는 암, AIDS와 함께 세계 보건기구(WHO)가 지정한 21세기 3대 난치성질환의 하나로써, 기억력 장애를 비롯한 여러가지 인지기능을 손상시켜 환자의 인간적 삶을 황폐화시키고 결국은 죽음에 이르게 하는 대표적인 만성 진행성 퇴행성 뇌정신질환으로 현대의학이 해결하여야 할 최대의 숙제이다.
- 2) 미국을 비롯한 구미각국에서는 이 질병의 예방, 치료 및 관리를 위하여 줄기세포이용법을 비롯한 다각적인 신약개발연구를 대규모로 진행하고 있으며 이와 병행하여 여러가지 대체요법들을 강구하고 있으며 대표적인 예로 다양한 식품의약 (nutraceutical) 의 개발을 제시하고 있다.
- 3) 현재까지 구미선진국에서 연구개발된 식품의약들은 대부분 비타민 C나 E, 베타카로틴, 플라보노이드, 은행잎 추출물 (Egb 761)등을 함유하는 제제들로서 아직까지 충분한 체계적인 연구는 부족한 편이나 긍정적인 결과가 보고되고 있다.

(2) 경제·산업적 측면

현대의학의 비약적 발전에도 불구하고 노인성치매는 병의 진단 및 진행상황을 정확하게 파악하기 위한 특별한 검사법이나 효과적인 치료제가 전무한 실정이다. 현재 미국의 경우 500만명 이상의 알츠하이머형 치매환자가 있으며 이들의 간병관리에 소요되는 의료비만 연간 1,200억 달러에 달하고 있으며 우리나라의 경우도 이와 비슷한 추세를 보여주고 있다. 따라서 이 질병의 예방 및 치료 혹은 관리등에 도움을 줄 수 있는 훌륭한 의약품 혹은 식품의약들이 개발될 경우 이들의 경제적 부가가치는 상상을 초월하리라 예상된다.

(3) 사회·문화적 측면

우리나라에는 1960년에는 전체인구 2,500만명 중 노인 인구가 72만명으로 2.9%에 불과 했지만 1990년에는 약 214만여명 (5.0%), 1995년에는 약 250만여명 (5.6%)으로 증가하였고 2010년 이후에는 전체 인구에 10-15 %까지 증가할 것으로 보아 본격적인 고령화 사회가 될 것으로 예측된다. 이와같이 노인 인구의 증가와 더불어 노인성치매 환자의 수도 급격히 비례하여 증가하는데 65세 이상의 연령대에서는 10%, 85세 이상의 경우에는 40-50 % 정도가 노인성치매에 시달리게 될 것으로 전문가들은 예측하고 있다. 따라서 이 질병의 예방 및 치료 혹은 관리등에 도움을 줄 수 있는 훌륭한 의약품 혹은 식품의 약들이 개발될 경우 이들로부터 창출되는 직접적인 경제적 부가가치는 물론 노인들의 건강한 노후 삶의 보장 및 환자의 간병에 소요되는 인적 물적자원의 감축등 사회전반에 지대한 영향을 미칠 수 있으리라 예상된다.

2. 연구개발의 범위

도라지(桔梗)는 방약합편 수재처방에서 17번째로 빈용되는 생약으로써¹⁾ 초롱꽃과 (Campanulaceae)에 속하는 다년생식물 도라지(balloon flower, *Platycodongrandiflorum*)의 뿌리이다. 대한약전에서는 뿌리를 물로 씻어서 가는 뿌리를 제거하고 그대로 (겉질 붙은 것) 또는 주피를 제거하여 말린 것이라고 규정하고 있다.

자연산 도라지의 경우 대개 2 ~ 3년 근을 식용 또는 약용으로 사용하고 있으나 최근 국내 연구진에 의하여 20년 이상 성장이 가능한 도라지의 재배기술이 개발되었으며 이 재배기술을 통하여 생산되는 다년생 도라지를 활용하여 다양한 식품들이 시판되고 있다.²⁾

길경의 함유성분으로는 inulin 및 fructo-oligosaccharide 등 탄수화물이 전체 추출물의 95% 이상을 차지하고 있으며³⁾ 이 외에 platycodigenin, polygalacic acid 등 oleanane 계 triterpene을 aglycone으로 한 20여종의 사포닌들이 1 - 4 % 정도 함유되어 있다고 알려져 있으며 이들 사포닌 성분들은 도라지 추출물이 보여주는 다양한 약리활성의 활성성분으로 주목 받고 있

다.^{4,7)}

길경 및 길경 사포닌의 약리효능으로는 진해, 거담, 중추신경억제작용(진정, 진통, 해열효과), 항염증작용, 항궤양 및 위액분비억제작용, 항콜린작용, 혈당강화작용, 콜레스테롤 대사 개선작용 등 다양한 활성이 보고되어 있다.^{8,9)} 특히, 최근의 연구에 따르면 다년생 길경의 열수 추출물은 carbon tetrachloride¹⁰⁾ 및 acetaminophen¹¹⁾ 에 의한 간 손상을 유의적으로 억제한다고 보고되어 있으며, 복강거식세포 활성과 면역활성을 증가시킨다고 보고되어 있다.^{12,13)}

따라서 본 연구에서는 제 1, 2단계 자생식물이용 기술개발연구사업을 통하여 이미 도출된 바 있는 탁월한 인지기능개선효과를 보여주는 AL-27, AL-33 등 10종의 복합제제의 기본 생약제인 도라지에 관한 연구를 집중적으로 수행하여 인지기능개선용 식품의약으로 연구 발전시켜 상품화를 이룩한다. 이에 따라 개발된 제품은 우선적으로 국내시장에의 출시를 목표로 하고 아울러 해외 시장으로의 진출 방안을 모색한다. 이와 같은 연구목표를 위하여 식품의약의 상품화연구를 전담할 (주)장생도라지와 공동연구를 통하여 복합제제의 대량 생산공정기술을 개발하고 제품의 규격화를 확립함과 동시에 표준분석방법, 약효 약동력학 및 안전성 등을 연구하여 도라지를 주원료로하는 시제품생산은 물론 상품화를 위한 기반연구를 체계적으로 수행하고자 한다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 특허를 중심으로 도라지 연구현황

하기 표에서 나타낸것과 같이 지금까지 출원된 도라지 관련 특허는 총 356편이었으며, 이들 가운데 중국 175편, 한국 131편, 일본 38편, 미국 12편으로 국가별 점유율은 중국 49%, 한국 37%, 일본 11% 순이었다. 미국특허는 동북아시아 3국에서 해외 출원한 것으로서 도라지에 관한 연구는 주로 도라지 재배지와 동일한 동북아시아 3국에 국한 되어 있음을 알 수 있었다.

특히 이들 특허 가운데 대부분의 특허는 복합제제에 관한 연구로 나타났으며 순수한 도라지에 관련된 특허는 한국 23편, 일본 3편, 중국 2편으로 국내 연구진에서 도라지에 관한 연구를 많이 수행하였다고 볼 수 있다.

<p>1. 사용된 키워드</p> <p>도라지, 길경, 桔梗 or 키쿄우, jie, <i>Platycodon grandiflorum</i>, Platycodi Radix, platycodin, ballon flower 그리고 A61K*</p> <p>*A61K A: 생활필수품 (HUMAN NECESSITIES) 61: 의학 또는 수의학 위생학 MEDICAL OR VETERINARY SCIENCE; HYGIENE) K: 의약품, 치과용 또는 화장용 제제 PREPARATIONS FOR MEDICAL, DENTAL, OR TOILET PURPOSES)</p>	<p>2. 국가별 연도별 특허 출원 건수</p>
<p>3. 국가별 점유율 분석</p>	<p>4. 특허 종류별 분석</p> <ul style="list-style-type: none"> •KR A: 도라지 단독 효과 B: 도라지 복합 효과 •JP C: 도라지 단독 효과 D: 도라지 복합 효과 •CN E: 도라지 단독 효과 F: 도라지 복합 효과 •US G: 도라지 단독 효과 H: 도라지 복합 효과 <p>KR: 한국, CN:중국, JP:일본, US: 미국</p>

제 2 절 논문을 중심으로 도라지 연구현황

1. 도라지 분리정제에 관한 논문분석

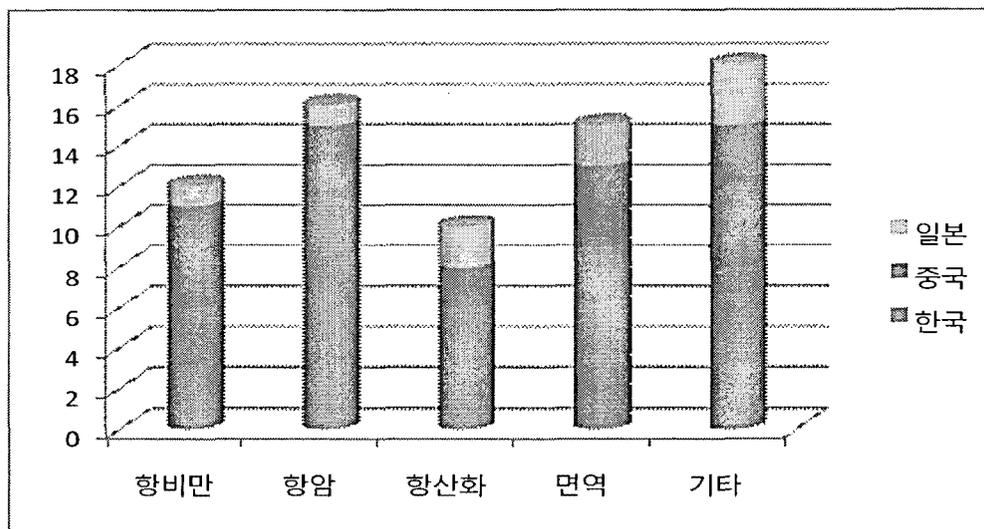
도라지 추출물의 분리정제는 주로 도라지의 약리활성 성분인 사포닌을 분리정제하는 논문이 대부분이었다. 이들 논문 역시 한중일 3국을 중심으로 이루어졌는데 일본 26편, 중국 25편, 한국 8편 기타 4편으로 총 63편이 보고 되어 있다. 이는 초기 즉 1990년대 이전 연구는 일본이 주도 하였으며 그 이후는 주로 중국에서 많은 연구를 하여오고 있으며, 국내에서의 연구는 상대적으로 미약하였다.

2. 도라지 분석방법에 관한 논문분석

분석방법에 관한 연구 역시 동북아 3국에서 연구를 주로 수행하였다. 논문은 총 29편으로 중국 16편, 한국 4편, 일본 3편, 기타 1편으로 보고 되어 있다.

3. 도라지 생리활성에 관한 논문분석

도라지의 생리활성에 관한 논문은 총 76편을 분석 하였다. 항암관련 논문이 16편, 항비만 12편, 항산화 10편, 면역 15편, 기타 23편이었다. 앞서 분석한 도라지의 분리정제와 분석방법에 관한 논문과는 다르게 전 부분에서 한국 논문이 많았다. 특히 항암관련 논문이 가장 많았고 면역과 항비만관련 논문이 그 다음으로 높았다.



제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 도라지 사포닌들의 분리정제 및 표준 분석방법

1. 고순도, 고함량 조사포닌을 함유하는 도라지 추출물의 제조방법

도라지는 그 약리 성분이 사포닌에 기인하는 경우가 대부분이다. 그럼에도 불구하고 도라지로부터 조사포닌의 분리정제 방법은 도라지 추출물을 증류수에 현탁시킨 후 부탄올로 추출하는 방법^{14,15)} 외에는 특별한 방법이 알려져 있지 않다.

그러나 상기 부탄올로 추출하는 방법은 추출물로부터 부탄올로 사포닌을 액액 추출하는 과정에서 사포닌 성분 이외에도 글루코스, 솔비톨, 프락토스, 슈크로스, 프락토올리고당 및 이눌린 성분들이 상당량 부탄올 층으로 이행되며, 잔류 증류수 층에도 유효 도라지 사포닌들이 상당량 잔류하게 되어 사포닌 함량이 줄어들고 순도가 떨어지는 문제점이 있었다.

따라서 본연구팀에서는 보다 간단하고 효율이 높으면서 유효 사포닌의 함량을 증가시키는 방법을 연구하던 중, 종래의 부탄올을 이용한 조사포닌 제조방법에 비하여 유효 사포닌의 함량이 많고 고순도의 조사포닌 조성물을 얻을 수 있는 조사포닌 조성물의 새로운 제조방법을 찾아내었다.

도라지 사포닌의 제조방법은 다음 3 단계로 이루어지는데 먼저 생도라지로부터 착즙하여 얻는 방법과 건조 도라지를 증류수, 메탄올 내지 에탄올을 이용하여 도라지 추출물을 수득하는 단계(단계 1);

상기 단계 1에서 수득한 추출물을 증류수에 용해시킨 후 역상겔이 충전된 컬럼에 가하여 사포닌 성분을 흡착시키는 흡착공정 및 흡착된 사포닌을 에탄올 또는 메탄올 수용액으로 용출시키는 용출공정을 포함하는 사포닌을 수득하는 단계(단계 2); 및 상기 단계 2에서 얻어진 조사포닌을 유기용매를 사용하여 정제하는 단계(단계 3)로 이루어진다.

가. 조사포닌의 제조 방법

<실시 예 1> 100% 에탄올을 이용하여 추출한 조 사포닌 조성물의 제조

단계 1 : 도라지 100% 에탄올 추출물의 제조

음지에서 잘게 분쇄한 도라지 분말 1,000 g에 95 % 에탄올 5 ℓ를 가하고 상온에서 1주(168시간)동안 추출한 후 30분 동안 10,000 × g에서 원심 분리하여 고형분을 제거하였다. 원심 분리된 용액을 감압 건조하여 분말 상의 도라지 95% 에탄올 추출물 277 g을 수득하였다.

단계 2 : 도라지 에탄올 추출물로부터 사포닌의 제조

실시 예 1의 단계 1에서 수득한 도라지 에탄올 추출물 100 g을 증류수 1,000 ml에 녹인 후 RP-18 겔(40 μm-60 μm, 90 A, Merck) 400 g이 충전된 컬럼(50 x 250 mm)에 주입한 후 컬럼을 증류수 1,000 ml, 3 % 아세토니트릴 수용액 500 ml 순으로 세척한 후 증류수 500 ml로 재차 세척하여 추출물에 함유된 글루코스, 솔비톨, 프락토스, 슈크로스, 프락토올리고당 및 이눌린 성분들을 제거하였다. 이후 컬럼에 80% 에탄올 500 ml를 가한 후 10 ml/분의 속도로 용출하였다. 용출액을 모아 감압 농축하여 조 사포닌 14.5 g을 수득하였다.

단계 3 : 유기용매를 사용하여 조 사포닌 조성물의 정제

실시 예 1의 단계 2에서 수득한 조 사포닌을 에탄올 50 ml에 녹인 후 여과지로 여과하고 여액에 에틸아세테이트 100 ml를 가한 후 12시간 동안 상온에 정치하여 고형분이 석출되도록 하였다. 석출된 고형분을 다시 여과지로 여과한 후 잘 건조시켜 13.8 g의 조 사포닌 조성물을 수득하였다.

<실시 예 2> 10% 에탄올을 이용하여 용출한 조 사포닌 조성물의 제조

단계 2 : 도라지 에탄올 추출물로부터 사포닌의 제조

실시 예 1의 단계 1에서 수득한 도라지 에탄올 추출물 20 g을 증류수 200 ml에 녹인 후 RP-18 겔(40 μm-60 μm, 90 A, Merck) 100 g이 충전된 컬럼(50 x 250 mm)에 주입한 후 컬럼을 증류수 200 ml, 3 % 아세토니트릴 수용액 100 ml 순으로 세척한 후 증류수 100 ml로 재차 세척하여 추출물에 함유된 글루코스, 솔비톨, 프락토스, 슈크로스, 프락토올리고당 및 이눌린 성분들을 제거하였다. 이후 컬럼에 10% 에탄올 500 ml를 가한 후 10 ml/분의 속도로 용출하였다. 용출액을 모아 감압 농축하

여 조 사포닌 0.18 g을 수득하였다.

단계3 : 유기용매를 사용하여 조 사포닌 조성물의 정제

실시 예 2의 단계 2에서 수득한 조 사포닌을 에탄올 10 ml에 녹인 후 여과지로 여과하고 여액에 에틸아세테이트 20 ml를 가한 후 12시간 동안 상온에 정치하여 고형분이 석출되도록 하였다. 석출된 고형분을 다시 여과지로 여과한 후 잘 건조시켜 0.17 g의 조 사포닌 조성물을 수득하였다.

<실시 예 3> 30% 에탄올을 이용하여 용출한 조 사포닌 조성물의 제조

실시 예 2의 단계 2에서 10% 에탄올 대신에 30% 에탄올을 사용하는 것을 제외하고는 상기 실시 예 2의 단계 2 및 단계 3과 동일한 방법으로 0.86 g의 조 사포닌 조성물을 수득하였다.

<실시 예 4> 50% 에탄올을 이용하여 용출한 조 사포닌 조성물의 제조

실시 예 2의 단계 2에서 10% 에탄올 대신에 50% 에탄올을 사용하는 것을 제외하고는 상기 실시 예 2의 단계 2 및 단계 3과 동일한 방법으로 2.5 g의 조 사포닌 조성물을 수득하였다.

<실시 예 5> 80% 에탄올을 이용하여 추출한 조 사포닌 조성물의 제조

실시 예 1의 단계 1에서 100% 에탄올 대신에 80% 에탄올을 사용하는 것을 제외하고는 상기 실시 예 1의 단계 2 및 단계 3과 동일한 방법으로 14.5 g의 조 사포닌 조성물을 수득하였다.

<실시 예 6> 증류수를 이용하여 추출한 조 사포닌 조성물의 제조

실시 예 1의 단계 1에서 100% 에탄올 대신에 증류수를 사용하고 90 °C에서 3시간씩 3회 반복 추출하여 수행하는 것을 제외하고는 실시 예 1의 단계 2 및 단계 3과 동일한 방법으로 5.5 g의 조 사포닌 조성물을 수득하였다.

<실시 예 7> 100 % 메탄올을 이용하여 추출한 조 사포닌 조성물의 제조

실시 예 1의 단계 1에서 에탄올 대신에 100% 메탄올을 사용하는 것을 제외하고

는 상기 실시 예 1의 단계 2 및 단계 3과 동일한 방법으로 18.6 g의 조 사포닌 조성물을 수득하였다.

<실시 예 8> 도라지 착즙공정을 이용하여 추출한 조 사포닌 조성물의 제조

단계 1 : 도라지 착즙물의 제조

생도라지 5,000 g을 민찍기로 분쇄한 후, 착즙기로 1차 착즙하여 300 ml의 도라지 생즙을 얻었다. 1차 착즙하고 남은 잔류물에 다시 증류수 1,000 ml를 가해 25 °C에서 12시간 동안 숙성한 후 착즙기로 2차 착즙하여 1,100 ml를 수득하였다. 1차, 2차 착즙한 도라지 생즙을 합하고 30분 동안 10,000 × g에서 원심 분리하여 고형분을 제거하였다. 원심 분리된 용액을 동결 건조하여 분말 상의 도라지 착즙 물 476 g 을 수득하였다.

단계 2 : 도라지 착즙 물로 부터 조 사포닌의 제조

실시 예 8의 단계 1에서 수득한 도라지 착즙물 100 g을 증류수 1,000 ml에 녹인 후 RP-18 겔(40 μm-60 μm, 90 Å, Merck) 400 g이 충전된 컬럼(50 x 250 mm)에 주입한 후 컬럼을 증류수 1,000 ml, 3 % 아세토니트릴 수용액 500 ml 순으로 세척한 후 증류수 500 ml로 재차 세척하여 추출물에 함유된 글루코스, 솔비톨, 프락토스, 슈크로스, 프락토올리고당 및 이눌린 성분들을 제거하였다. 이후 컬럼에 80% 에탄올 500 ml를 가한 후 10 ml/분의 속도로 용출하였다. 용출액을 모아 감압 농축하여 조 사포닌 15.8 g 을 수득하였다.

단계 3 : 유기용매를 사용하여 조 사포닌 조성물의 정제

실시 예 8의 단계 2에서 수득한 조 사포닌을 다시 에탄올 50 ml에 녹인 후 여과지로 여과하고 여액에 에틸아세테이트 100 ml를 가한 후 12시간 동안 상온에 정치하여 고형분이 석출되도록 하였다. 석출된 고형분을 다시 여과지로 여과한 후 잘 건조시켜 14.6 g의 조사포닌 조성물을 수득하였다.

<실시 예 9> 10% 메탄올을 이용하여 추출한 조 사포닌 조성물의 제조

단계 1 : 도라지 10% 메탄올 추출물의 제조

실시 예 1의 단계 1에서 100% 에탄올 대신에 10% 메탄올을 사용하는 것을 제

외하고는 실시 예 1의 단계 1과 동일한 방법으로 10% 메탄올 추출물 454 g을 수득하였다.

단계 2 : 도라지 10% 메탄올 추출물로부터 사포닌의 제조

실시 예 9의 단계 1에서 수득한 10% 메탄올 추출물 100 g을 증류수 1,000 ml에 녹인 후 실시 예 1의 단계 2와 동일한 방법으로 조 사포닌 1.3 g을 수득하였다.

단계 3 : 유기용매를 사용하여 조 사포닌 조성물의 정제

실시 예 9의 단계 2에서 수득한 조 사포닌을 에탄올 10 ml에 녹인 후 여과지로 여과하고 여액에 에틸아세테이트 20 ml를 가한 후 12시간 동안 상온에 정치하여 고형분이 석출되도록 하였다. 석출된 고형 분을 다시 여과지로 여과한 후 잘 건조시켜 1.2 g의 조 사포닌 조성물을 수득하였다.

<실시 예 10> 50% 메탄올을 이용하여 추출한 조 사포닌 조성물의 제조

실시 예 9의 단계 1에서 10% 메탄올 대신에 50% 메탄올을 사용하는 것을 제외하고는 상기 실시 예 9의 단계 1, 2 및 단계 3과 동일한 방법으로 11.3 g의 조 사포닌 조성물을 수득하였다.

<실시 예 11> 80% 메탄올을 이용하여 추출한 조 사포닌 조성물의 제조

실시 예 9의 단계 1에서 10% 메탄올 대신에 80% 메탄올을 사용하는 것을 제외하고는 실시 예 9의 단계 1, 2 및 단계 3과 동일한 방법으로 15.9 g의 조 사포닌 조성물을 수득하였다.

<실시 예 12> 100% 메탄올을 이용하여 추출한 조 사포닌 조성물의 제조

실시 예 9의 단계 1에서 10% 메탄올 대신에 100% 메탄올을 사용하는 것을 제외하고는 실시 예 9의 단계 1, 2 및 단계 3과 동일한 방법으로 19.7 g의 조 사포닌 조성물을 수득하였다.

<실시 예 13> 10% 에탄올을 이용하여 추출한 조 사포닌 조성물의 제조

상기 실시 예 9의 단계 1에서 10% 메탄올 대신에 10% 에탄올을 사용하는 것을

제외하고는 실시 예 9의 단계 1, 2 및 단계 3과 동일한 방법으로 0.6 g의 조 사포닌 조성물을 수득하였다.

<실시 예 14> 50% 에탄올을 이용하여 추출한 조 사포닌 조성물의 제조

실시 예 9의 단계 1에서 10% 메탄올 대신에 50% 에탄올을 사용하는 것을 제외하고는 실시 예 9의 단계 1, 2 및 단계 3과 동일한 방법으로 8.6 g의 조 사포닌 조성물을 수득하였다.

<실시 예 15> 80% 에탄올을 이용하여 추출한 조 사포닌 조성물의 제조

실시 예 9의 단계 1에서 10% 메탄올 대신에 80% 에탄올을 사용하는 것을 제외하고는 실시 예 9의 단계 1, 2 및 단계 3과 동일한 방법으로 15.3 g의 조 사포닌 조성물을 수득하였다.

<실시 예 16> 95% 에탄올을 이용하여 추출한 조 사포닌 조성물의 제조

실시 예 9의 단계 1에서 10% 메탄올 대신에 95% 에탄올을 사용하는 것을 제외하고는 실시 예 9의 단계 2 및 단계 3과 동일한 방법으로 14 g의 조 사포닌 조성물을 수득하였다.

<실시 예 17> 증류수를 이용하여 추출한 조 사포닌 조성물의 제조

실시 예 9의 단계 1에서 10% 메탄올 대신에 증류수를 사용하고 추출온도를 4℃로 하는 것을 제외하고는 실시 예 9의 단계 1, 2 및 단계 3과 동일한 방법으로 1.3 g의 조 사포닌 조성물을 수득하였다.

<실시 예 18> 10% 에탄올을 이용하여 용출한 조 사포닌 조성물의 제조

상기 실시 예 1의 단계 3에서 얻은 도라지 조 사포닌 조성물 1 g에 증류수 20 ml를 가한 후 80% 에탄올 대신에 10% 에탄올을 사용하는 것을 제외하고는 실시 예 1의 단계 2와 동일한 방법으로 처리하여 조 사포닌 조성물을 0.01 g을 수득하였다.

<실시 예 19> 30% 에탄올을 이용하여 용출한 조 사포닌 조성물의 제조

실시 예 18에서 10% 에탄올 대신에 30% 에탄올을 사용하는 것을 제외하고는 실시 예 18과 동일한 방법으로 0.32 g의 조 사포닌 조성물을 수득하였다.

<실시 예 20> 80% 에탄올을 이용하여 용출한 조 사포닌 조성물의 제조

실시 예 18에서 10% 에탄올 대신에 80% 에탄올을 사용하는 것을 제외하고는 실시 예 18과 동일한 방법으로 0.96 g의 조 사포닌 조성물을 수득하였다.

<실시 예 21> 10% 메탄올을 이용하여 용출한 조 사포닌 조성물의 제조

실시 예 18에서 10% 에탄올 대신에 10% 메탄올을 사용하는 것을 제외하고는 실시 예 18과 동일한 방법으로 0.02 g의 조 사포닌 조성물을 수득하였다.

<실시 예 22> 30% 메탄올을 이용하여 용출한 조 사포닌 조성물의 제조

실시 예 18에서 10% 에탄올 대신에 30% 메탄올을 사용하는 것을 제외하고는 실시 예 18과 동일한 방법으로 0.42 g의 조 사포닌 조성물을 수득하였다.

<실시 예 23> 80% 메탄올을 이용하여 용출한 조 사포닌 조성물의 제조

실시 예 18에서 10% 에탄올 대신에 80% 메탄올을 사용하는 것을 제외하고 실시 예 18과 동일한 방법으로 0.97 g의 조 사포닌 조성물을 수득하였다.

<비교 예 1> 부탄올을 이용한 조 사포닌의 추출방법

실시 예 1의 단계 1에서 수득한 도라지 에탄올 추출물 100 g을 증류수 1,000 ml에 현탁시킨 후 디에틸에테르 1,000 ml로 3회 액액 추출하였다. 디에틸에테르층을 제거한 후 남은 증류수 층을 포화 부탄올 1,000 ml로 3회 추출한 후 부탄올 층을 모아 감압 농축하여 부탄올 분획물 5.5 g을 수득하였다.

나. 조 사포닌 조성물의 함유 성분 분석방법

실시 예 1의 단계 1의 도라지 에탄올 추출물, 비교 예 1의 부탄올 분획물, 비교 예 1의 잔류 증류수 층 및 실시 예 1의 단계 3의 조 사포닌 조성물에 대하여 고성능 액체크로마토그래피(HPLC)를 이용하여 함유 성분을 측정하였다. 분석방법으로

는 NS-3000i, 일체형 고성능 액체크로마토그래피 시스템(integrated HPLC gradient type, futecs.co.ltd)에 광 산란 검출기(evaporation light scattering detector, USA, Softa)를 장착하여 분사 온도(spray temperature): 25 °C, 이동 및 검출 온도(drift, detection chamber temperature): 70 °C, 주입 가스 압력(gas pressure): 질소 가스(N₂ gas): 55.0 psi, 감도(Filter): 4, 역상 칼럼 4.6 x 150 mm, 3 μm(Chemco) 으로 하고, 컬럼 온도는 40 °C를 유지하도록 하여 기기 조건을 설정하고 이동상으로는 하기 용매 A와 용매 B 를 기울기(gradient) 용리방법을 이용하였다.

A : 50 mM 아세트산 암모늄 : 아세토니트릴 : 메탄올(85 : 10 : 5 v/v%)

B : 50 mM 아세트산 암모늄 : 아세토니트릴 : 메탄올(55 : 40 : 5 v/v%)

유속(flow rate) : 0.5 ml/min,

전체 분석 시간(total run time) : 98분

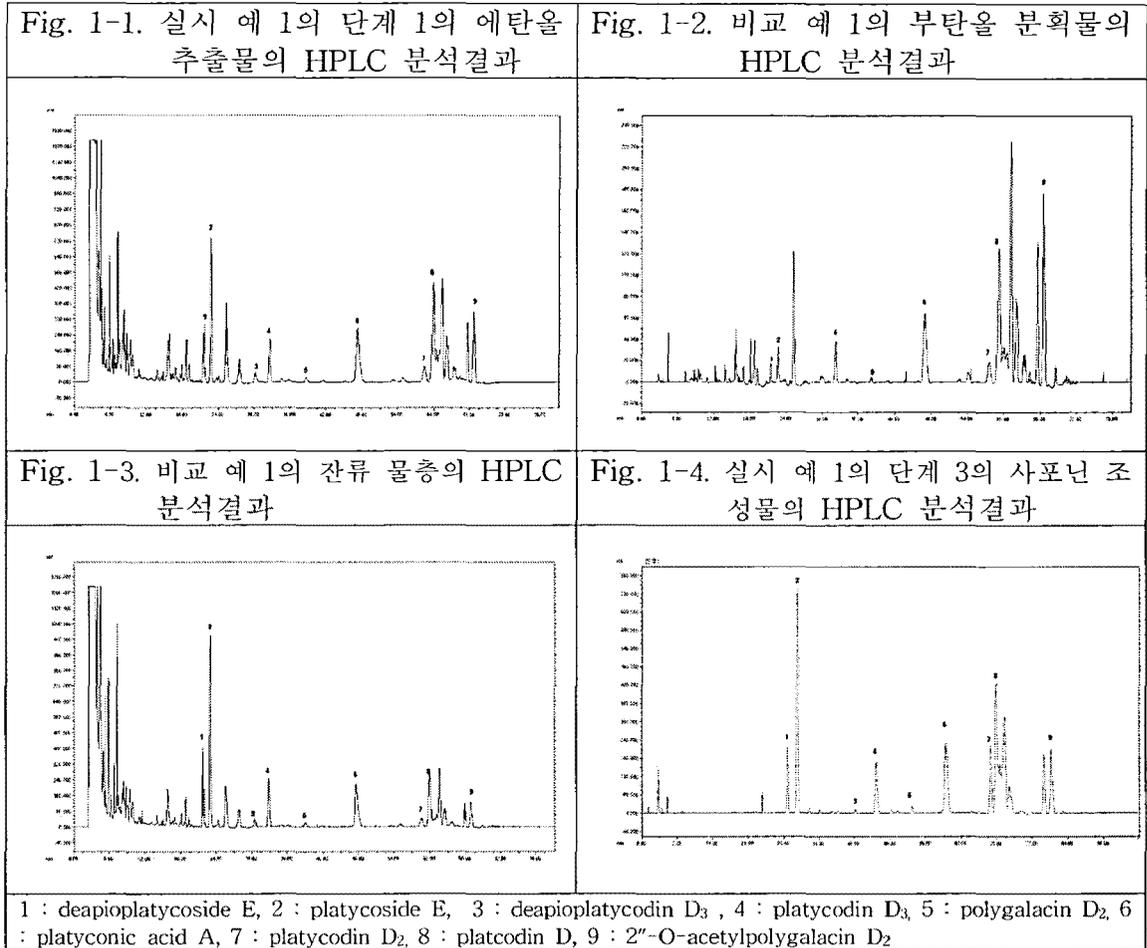
상기 실험에 대한 측정결과를 Fig. 1-1 내지 Fig. 1-4에 나타내었다. 실시 예 1의 단계 1의 도라지 에탄올 추출물의 크로마토그램을 Fig. 1-1에 나타내었고, 비교 예 1의 부탄올 분획물의 크로마토그램을 Fig. 1-2에 나타내었고, 비교 예 1의 잔류 증류수 층의 크로마토그램을 Fig. 1-3에 나타내었으며, 실시 예 1의 단계 3의 조사포닌 조성물의 크로마토그램을 Fig. 1-4에 나타내었다.

Fig. 1-1에 나타난 바와 같이 실시 예 1의 단계 1의 도라지 에탄올 추출물의 경우에는 머무름 시간 20분 이후에 deapioplatycoside E, platycoside E, deapioplatycodin D₃, platycodin D₃, polygalacin D₂, platycodin D₂, platycodin D 등 도라지의 대표적인 사포닌 성분들이 순서적으로 잘 검출되고 있으며 머무름 시간 5분 이내에서는 도라지의 당 성분들이 복잡하게 나타나는 것을 알 수 있다.

비교 예 1의 부탄올 분획물의 경우에는 Fig. 1-2에 나타난 바와 같이, polygalacin D₂, platycodin D₂, platycodin D 등 상대적으로 극성이 작은 사포닌들은 양호하게 검출되고 있는 반면 deapioplatycoside E, platycoside E, deapioplatycodin D₃, platycodin D₃ 등 비교적 극성도가 높은 사포닌 종류는 상대적으로 함량이 적게 나타남을 알 수 있다.

그리고 Fig. 1-3에 나타난 바와 같이, 비교 예 1의 부탄올로 사포닌 성분들을 추출하고 남은 잔류 증류수 층의 경우에는 deapioplatycoside E, platycoside E,

deapioplatycodin D₃, platycodin D₃ 등 비교적 극성도가 높은 사포닌 종류들이 상당량 검출되는 것을 확인 할 수 있다. 위의 분석 결과를 통해 종래의 부탄올 추출방법으로는 도라지 사포닌에 대한 추출 방법으로 적절하지 않음을 알 수 있다. 특히 deapioplatycoside E, platycoside E, deapioplatycodin D₃, platycodin D₃ 등 비교적 극성도가 높은 사포닌 종류들의 추출 효율이 현저히 떨어 지고 있음을 알 수 있다.



한편 Fig. 1-4에 나타난 바와 같이 실시 예 1의 단계 3의 조 사포닌 조성물의 경우에는 머무름 시간 20분 이후에 deapioplatycoside E, platycoside E, deapioplatycodin D₃, platycodin D₃, polygalacin D₃, platycodin D₂, platycodin D 등 도라지의 주요 사포닌 성분들이 순서적으로 잘 검출되는 것을 알 수 있으며, 또한 Fig. 1-1의 실시 예 1의 단계 1, 도라지 에탄올 추출물에서 확인 할 수 있는 머무름 시간 5분 이내의 당 성분들이 모두 제거되어 있는 것을 알 수 있었다.

실시 예 1의 단계 3, 조사포닌 조성물 및 비교 예 1의 부탄올 분획물에 함유된 각 주요 사포닌의 함량을 정량 분석하여 그 결과를 Table 1-1에 나타내었다.

Table 1-1. 비교 예 1와 실시 예의 주요 사포닌 함량 비교

사포닌 성분명	비교예 1의 부탄올 분획물 (mg/g)	실시예 1의 단계 3 (mg/g)
deapioplatycoside E	10	85
platycoside E	20	350
platycodin D ₃	15	85
deapioplatycodin D ₃ ,	5	40
polygalacin D ₂	3	60
platyconic acid A	80	95
platycodin D ₂	50	80
platycodin D	90	90
2''-o-acetylpolygalacin D ₂	60	95
total	333	980

Table 1-1에 나타난 것과 같이 실시 예 1의 단계 3, 조사포닌 조성물은 비교 예 1의 부탄올 분획물에 비하여 주요 사포닌 전체 함량이 2배 이상 증가하였다. 특히 deapioplatycoside E, platycoside E, deapioplatycodin D₃, platycodin D₃ 등 비교적 극성도가 높은 사포닌 종류들에 대한 함량은 5배 내지 10배 정도 증가함을 확인 할 수 있었다.

이 결과로부터 본 연구팀에서 수행한 분리방법에 의해 얻어진 조 사포닌 조성물은 종래의 부탄올을 이용한 조 사포닌의 추출방법에 비하여 유효 및 주요 사포닌의 함량이 높고, 불순물 함량이 적은 것을 알 수 있었다.

다. 추출용매 조건에 따른 조 사포닌의 함량 변화

추출용매 조건 변화를 통해 얻어진 도라지 추출 조성물의 조 사포닌 함량의 변화를 알아보기 위해 실시 예 8 에서 17 과 같이 실험을 수행하고 그 추출 조성물의 조 사포닌 량의 결과를 하기 Table 1-2에 나타내었다.

Table 1-2. 추출용매조건에 따른 조 사포닌의 함량 변화

추출용매	조사포닌 조성물(g)	추출용매	조사포닌 조성물(g)
실시 예 8	14.6	실시 예 13	0.6
실시 예 9	1.2	실시 예 14	8.6
실시 예 10	11.3	실시 예 15	15.3
실시 예 11	15.9	실시 예 16	14.0
실시 예 12	19.7	실시 예 17	1.3

Table 1-2와 같이 추출용매의 농도 의존적으로 사포닌 추출효과가 증가하며, 100% 메탄올을 사용하는 경우에 조사포닌 조성물의 함량이 19.7 g으로 사포닌 추출효과가 가장 우수한 것을 알 수 있다. 또한, 착즙을 사용하는 경우에 조 사포닌 조성물의 함량이 14.6 g으로 비교적 높은 농도로 사포닌이 추출되는 것을 확인할 수 있었다.

이로부터 조 사포닌 조성물은 추출용매 중 알코올의 농도가 높아질수록 사포닌 추출효과가 증가하며, 특히 메탄올 추출 또는 착즙을 사용하는 경우에 사포닌 추출효과가 우수한 것을 알 수 있었다.

라. 용출용매에 따른 조 사포닌의 함량 변화

도라지 추출의 용출용매에 따른 조 사포닌의 함량 변화를 알아보기 위해 하기의 실험을 수행하였다. 실시예 18 내지 23의 조사포닌 조성물의 수득량 및 회수율을 하기 Table 1-3에 나타내었다.

Table 1-3. 용출용매에 따른 사포닌의 함량 변화

용출용액	조사포닌 조성물의 수득량(g)	조사포닌 조성물의 회수율(%)
실시 예 18	0.01	1.0
실시 예 19	0.32	32.0
실시 예 20	0.96	96.0
실시 예 21	0.02	2.0
실시 예 22	0.42	42.0
실시 예 23	0.97	97.0

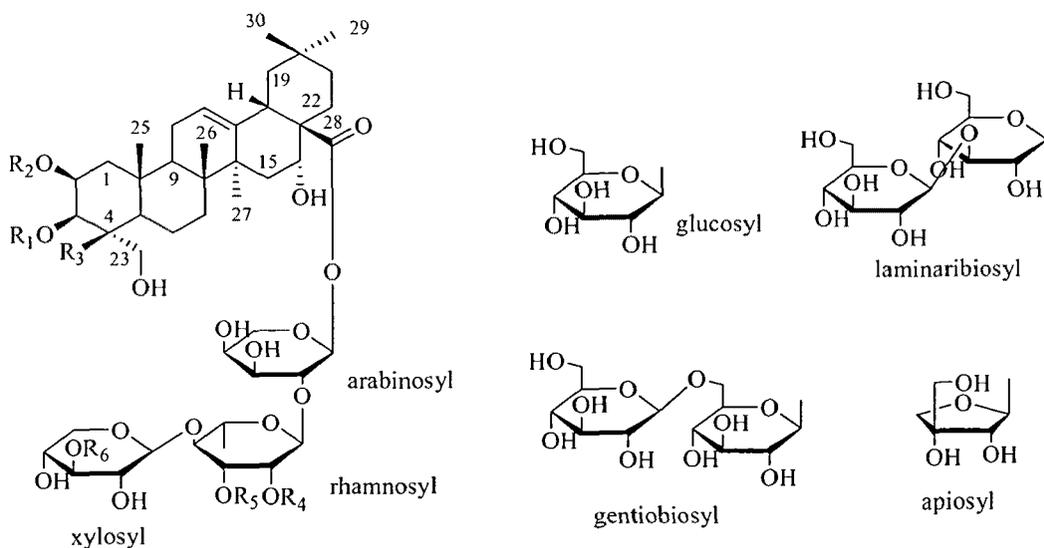
그 결과 Table 1-3과 같이 조사포닌 조성물의 수득량 및 회수율은 용출용매의 종류에 영향을 받지 않고 용출용액 중 알코올의 농도에 영향을 받는 것을 알 수 있었다. 용출용액으로 에탄올을 사용한 상기 실시 예 18 내지 20과 용출용액으로 메탄올을 사용한 실시 예 21 내지 23의 조사포닌 조성물의 수득량 및 회수율은 큰 차이가 없는 것을 알 수 있었다. 반면에, 용출용매로 에탄올을 사용하는 경우에 에탄올의 농도가 10%, 30%, 80%로 높아질수록 조사포닌 조성물의 수득량이 0.01 g, 0.32 g, 0.96 g으로 증가하며, 용출용매로 메탄올을 사용하는 경우에 메탄올의 농도가 10%, 30%, 80%로 높아질수록 조사포닌 조성물의 수득량이 0.02 g, 0.42 g, 0.97 g으로 증가하는 것을 알 수 있다. 이로부터 도라지 추출물은 용출용액 중 알코올의 농도가 높아질수록 조사포닌 조성물의 수득량 및 회수율이 증가하는 것을 알 수 있었다.

2. 도라지 추출물의 제조 및 지표성분의 분리정제

건조된 도라지 5 kg을 20 L의 메탄올로 일주일간 냉침시킨 후 여과하고 여액을 감압 농축하여 메탄올 추출물 1.4 kg을 얻었다. 상기 메탄올 추출물을 증류수 1 L에 현탁시킨 후 Diaion HP-20 column 을 이용하여 column chromatography를 실시하여 5 L의 증류수로 column을 씻어내고, 5 L의 methanol로 흘린 후 감압 농축하여 조사포닌 75 g을 얻었다. 조사포닌 75 g을 MPLC를 이용하여 ODS column chromatography (MeOH : H₂O = 9:1, 7:3, 5:5, 2:8, 10:0)를 실시하여 5개의 분획 (Fr.1 - Fr.5)으로 분획하였다. Fr.2 (1.2 g)을 MPLC를 이용하여 silica gel column chromatography (EtOAc:EtOH = 9:1 ~ 1:9)를 실시하여 화합물 6 (35 mg), 화합물 7 (12 mg)을 분리하였다. Fr.3 (28.0 g)을 MPLC를 이용하여 silica gel column chromatography (EtOAc:EtOH = 9:1 ~ 1:9)를 실시하여 4개의 분획(Fr.31 - Fr.34)을 수득하였다. 각각의 분획을 prep-HPLC (Shim-pack ODS column)을 이용하여 55% 메탄올을 이동상으로 사용하고, 3 ml/분으로 정제하여 화합물 3 (17 mg), 화합물 5 (800 mg), 화합물 8 (15 mg), 화합물 9 (450 mg), 화합물 14 (150 mg), 화합물 15 (130 mg), 화합물 16 (40 mg), 화합물 17 (230 mg), 화합물 18 (100 mg), 화합물 19 (32 mg)을 얻었다. Fr. 4 (10.0 g)은 MPLC를 이용하여 silica gel column chromatography (CH₂Cl₂ : methanol = 7:3 ~ 0:10)를 실시하여 3개의

분획물(Fr. 41 - Fr.43)을 얻었다. 각각의 분획물을 prep-HPLC (Shim-pack ODS column)을 이용하여 53% 메탄올을 이동상으로 사용하고, 3 ml/분으로 정제하여 화합물 4 (790 mg), 화합물 10 (420 mg), 화합물 11 (28 mg), 화합물 20 (62 mg)을 얻었다. Fr. 5 (4.8 g)을 위와 같은 방법으로 MPLC를 이용하여 silica gel column chromatography (CH₂Cl₂ : methanol = 7:3 ~ 0:10)를 실시하여 3개의 분획물(Fr. 51 - Fr.53)을 얻었다. 각각의 분획물을 prep-HPLC (Shim-pack ODS column)을 이용하여 50% 메탄올을 이동상으로 사용하고, 3 ml/분으로 정제하여 화합물 1 (3 mg), 화합물 2 (4 mg), 화합물 12 (350 mg), 화합물 13 (32 mg)을 얻었다.

화합물 1-3은 ¹H-,¹³C-NMR spectrum data를 검토하고 2D-NMR (HMQC, HMBC, COSY)기법을 이용하여 화합물의 구조를 확인하였고 HR-ESI-MS로 정확한 분자량을 확인하여 화합물 1은 platycogenic acid A lactone 3-o-[β-D-glucopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranosyl]-28-o-[β-D-apiofuranosyl-(1→3)-β-D-xylopyranosyl-(1→4)-α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-α-L-arabinopyranoside], 화합물 2는 platycogenic acid A lactone 3-o-[β-D-glucopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranosyl]-28-o-[β-D-xylopyranosyl-(1→4)-α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-α-L-arabinopyranoside], 화합물 3은 deapioplatycodin D₂로 구조결정 하였으며, 이 화합물들은 신규 물질로 아직까지 보고된바 없다. 화합물 4는 본 실험실에서 2008년 molecule에¹⁶⁾ 신규물질로 보고한 platyconic acid A이며, 화합물 13 또한 본 실험실에서 2005년 planta medica에¹⁷⁾ 신규물질로 보고한 deapioplatycoside E이다. 화합물 5-12, 14-20은 ¹H-NMR과 ¹³C-NMR spectrum data를 참고문헌과^{5,18)} 비교하여 화합물 5는 platycodin D, 화합물 6은 2"-o-acetylplatycodin D, 화합물 7은 3"-o-acetylplatycodin D, 화합물 8은 deapioplatycodin D, 화합물 9는 platycodin D₂, 화합물 10은 platycodin D₃, 화합물 11은 deapioplatycodin D₃, 화합물 12는 platycoside E, 화합물 14는 polygalacin D, 화합물 15는 2"-o-acetylpolygalacin D, 화합물 16은 3"-o-acetylpolygalacin D, 화합물 17은 polygalacin D₂, 화합물 18은 2"-o-acetylpolygalacin D₂, 화합물 19는 3"-o-acetylpolygalacin D₂, 화합물 20은 platycoside D로 구조 동정 하였다.



Compound	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
1	gentiobiosyl	— CO —		H	H	apiosyl
2	gentiobiosyl	— CO —		H	H	H
3	laminarybiosyl	H	CH ₂ OH	H	H	H
4	glucosyl	H	COOH	H	H	apiosyl
5	glucosyl	H	CH ₂ OH	H	H	apiosyl
6	glucosyl	H	CH ₂ OH	Ac	H	apiosyl
7	glucosyl	H	CH ₂ OH	H	Ac	apiosyl
8	glucosyl	H	CH ₂ OH	H	H	H
9	laminarybiosyl	H	CH ₂ OH	H	H	apiosyl
10	gentiobiosyl	H	CH ₂ OH	H	H	apiosyl
11	gentiobiosyl	H	CH ₂ OH	H	H	H
12	glucosyl6→1gentiobiosyl	H	CH ₂ OH	H	H	apiosyl
13	glucosyl6→1gentiobiosyl	H	CH ₂ OH	H	H	H
14	glucosyl	H	CH ₃	H	H	apiosyl
15	glucosyl	H	CH ₃	Ac	H	apiosyl
16	glucosyl	H	CH ₃	H	Ac	apiosyl
17	laminarybiosyl	H	CH ₃	H	H	apiosyl
18	laminarybiosyl	H	CH ₃	Ac	H	apiosyl
19	laminarybiosyl	H	CH ₃	H	Ac	apiosyl
20	gentiobiosyl	H	CH ₃	H	H	apiosyl

Fig. 1-5. Structures of compounds 1-20 isolated from the MeOH extract of *P.grandiflorum*.

Table 1-5. ^{13}C NMR spectroscopic data for the aglycon moieties of **1-10**.
(in pyridine- d_5)

position	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	41.2	41.1	45.1	46.7	45.1	45.1	45.1	45.2	45.0	45.2
2	83.5	83.4	69.7	69.6	69.2	69.2	69.2	69.2	69.4	68.6
3	89.5	89.5	86.4	83.3	86.4	86.4	86.4	86.5	86.4	87.6
4	54.1	54.0	48.1	56.3	48.0	48.0	48.0	48.0	48.0	48.0
5	51.9	51.8	46.7	49.6	48.0	48.0	48.0	48.0	48.0	46.7
6	19.5	19.4	19.4	20.3	19.6	19.6	19.6	19.6	19.6	19.7
7	33.6	33.4	33.7	33.7	33.7	33.7	33.7	33.8	33.7	33.7
8	40.5	40.4	40.5	40.0	40.7	40.7	40.7	40.7	40.7	40.8
9	48.1	48.0	47.8	47.2	48.0	48.0	48.0	48.0	48.0	48.0
10	37.7	37.6	37.5	37.2	37.6	37.6	37.6	37.6	37.5	38.0
11	24.7	24.6	24.3	24.4	24.2	24.2	24.2	24.2	24.3	24.2
12	122.4	122.3	123.2	122.9	123.2	123.4	123.4	123.4	123.5	123.4
13	145.1	145.0	144.5	144.2	144.4	144.3	144.3	144.4	144.4	144.3
14	42.4	42.3	42.4	42.2	42.5	42.5	42.5	42.5	42.5	42.5
15	36.0	36.0	36.1	36.2	36.2	36.1	36.1	36.2	36.2	36.2
16	73.9	73.8	74.1	73.8	74.1	74.1	74.1	74.1	74.1	74.0
17	49.6	49.6	49.7	49.5	50.1	50.1	50.1	50.1	50.1	50.1
18	41.4	41.3	41.6	41.3	41.8	41.7	41.7	41.8	41.7	41.8
19	47.1	47.0	47.1	47.1	47.1	47.2	47.2	47.2	47.2	47.2
20	31.0	31.0	31.0	30.6	30.8	30.8	30.8	30.8	30.8	30.8
21	36.0	36.0	36.2	35.9	36.2	36.1	36.1	36.1	36.2	36.2
22	32.2	32.1	32.2	31.7	31.3	31.3	31.3	31.4	31.4	31.5
23	57.1	57.0	63.6	63.5	63.8	63.9	63.9	63.9	63.8	63.7
24	178.5	178.5	63.5	181.4	66.3	66.4	66.4	66.3	66.0	67.7
25	17.5	17.5	18.3	16.1	18.2	18.2	18.2	18.2	18.2	18.8
26	18.2	18.2	17.7	17.4	17.6	17.7	17.7	17.7	17.7	17.7
27	27.4	27.3	27.2	27.0	27.3	27.3	27.3	27.3	27.3	27.2
28	176.1	176.0	176.1	175.8	175.8	175.9	175.9	175.8	175.8	175.8
29	33.4	33.3	33.4	33.3	33.1	33.1	33.1	33.1	33.1	33.1
30	24.9	24.8	24.8	24.8	25.2	25.2	25.2	25.2	25.2	25.2

Table 1-6. ^{13}C NMR spectroscopic data for the aglycon moieties of **11-20**.
(in pyridine- d_5)

position	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	45.2	45.2	45.0	44.2	44.3	44.3	44.3	44.4	44.4	44.4
2	68.7	68.6	68.6	70.2	70.3	70.3	70.1	70.1	70.1	69.7
3	87.6	88.8	88.5	83.9	84.0	84.0	83.7	83.9	83.9	84.5
4	48.1	48.1	47.8	42.8	42.8	42.8	42.9	42.8	42.8	43.1
5	46.7	47.5	47.3	48.4	48.5	48.5	48.3	48.3	48.3	47.9
6	19.7	19.5	19.1	18.1	18.1	18.1	18.1	18.1	18.1	18.7
7	33.8	33.5	33.2	33.4	33.5	33.5	33.5	33.5	33.5	33.6
8	40.8	40.5	40.2	40.6	40.6	40.6	40.6	40.6	40.6	40.5
9	48.1	45.0	44.7	48.0	48.0	48.0	48.0	48.0	48.0	48.0
10	38.0	37.9	37.7	37.2	37.2	37.2	37.2	37.2	37.2	37.4
11	24.2	24.0	23.7	24.2	24.2	24.2	24.2	24.3	24.3	24.4
12	123.4	123.1	122.8	123.4	123.4	123.4	123.4	123.4	123.4	123.2
13	144.3	144.3	144.0	144.4	144.4	144.4	144.4	144.4	144.4	144.4
14	42.5	42.4	42.1	42.4	42.5	42.5	42.5	42.5	42.5	42.6
15	36.1	36.1	35.8	36.2	36.2	36.2	36.2	36.1	36.1	36.5
16	74.1	73.9	73.7	74.1	74.1	74.1	74.2	74.2	74.2	74.3
17	50.1	49.7	49.4	50.0	50.1	50.1	50.1	50.1	50.1	49.9
18	41.8	41.6	41.3	41.6	41.6	41.6	41.6	41.6	41.6	41.6
19	47.2	47.1	47.8	47.2	47.2	47.2	47.2	47.2	47.2	47.4
20	30.8	30.9	30.6	30.8	30.8	30.8	30.8	30.8	30.8	31.3
21	36.1	36.0	35.8	36.2	36.2	36.2	36.2	36.1	36.1	36.3
22	31.4	32.1	32.4	31.3	31.3	31.3	31.3	31.4	31.4	32.6
23	63.7	63.6	63.1	66.8	66.8	66.8	66.8	66.5	66.5	66.3
24	67.7	67.1	67.1	14.8	14.8	14.8	14.8	14.8	14.8	15.6
25	18.8	19.1	18.8	17.8	17.8	17.8	17.8	17.8	17.8	18.0
26	17.7	17.6	17.4	17.5	17.5	17.5	17.5	17.5	17.5	17.9
27	27.3	27.0	26.7	27.3	27.4	27.4	27.3	27.3	27.3	27.6
28	175.9	176.0	175.7	175.8	175.9	175.9	175.8	175.9	175.9	176.1
29	33.1	33.2	33.0	33.1	33.1	33.1	33.1	33.1	33.1	33.6
30	25.2	24.7	24.4	25.2	25.3	25.3	25.3	25.3	25.3	25.2

Table 1-7. ^{13}C NMR spectroscopic data for the sugar moieties of 1-10.
(in pyridine- d_5)

position	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Glucose (inner)										
1'	105.2	105.1	105.7	106.0	105.9	105.9	105.9	106.0	105.4	105.9
2'	74.9	74.9	74.2	74.8	75.2	75.3	75.3	75.3	74.1	75.0
3'	78.1	78.1	88.5	78.2	78.6	78.6	78.6	78.6	88.6	77.9
4'	71.3	71.2	69.8	71.8	72.0	72.0	72.0	72.1	70.1	72.0
5'	77.2	77.1	78.1	78.2	78.2	78.1	78.1	78.2	77.9	76.5
6'	70.1	70.0	62.2	61.8	62.9	62.9	62.9	63.0	62.7	70.3
Glucose (terminal)										
1'''	105.5	105.5	105.6						105.4	104.8
2'''	75.1	75.2	75.5						75.3	75.0
3'''	78.3	78.3	78.2						78.3	78.6
4'''	71.6	71.6	71.6						72.0	71.9
5'''	78.5	78.4	78.8						78.2	77.9
6'''	62.7	62.6	62.6						62.8	63.0
Arabinose										
1	93.6	93.4	93.6	93.4	93.7	93.6	93.6	93.7	93.7	93.7
2	75.4	75.5	75.3	75.5	75.6	76.3	76.3	75.7	75.7	75.6
3	70.1	70.0	70.1	70.3	70.4	70.3	70.3	70.2	70.4	70.3
4	66.1	65.8	66.1	66.2	65.9	65.8	65.8	65.9	66.0	66.0
5	63.1	62.8	63.2	61.8	62.9	62.9	62.9	63.0	63.1	63.0
Rhamnose										
1	101.3	101.3	101.3	101.2	101.0	98.4	101.6	101.1	101.1	101.0
2	71.9	71.8	71.9	71.8	72.0	73.6	70.3	72.1	72.0	72.0
3	72.6	72.5	72.6	72.3	72.4	70.3	75.3	72.5	72.5	72.4
4	83.7	83.5	83.6	83.3	83.7	83.4	77.6	83.7	83.7	83.8
5	68.7	68.6	68.7	68.4	68.6	68.7	68.7	68.7	68.7	68.6
6	18.5	18.3	18.5	18.4	18.1	18.3	18.3	18.2	18.2	18.1
CH ₃ CO						20.7	21.1			
CH ₃ CO						170.6	170.6			
Xylose										
1	106.9	106.5	106.8	106.2	106.6	106.4	105.4	106.7	106.6	106.6
2	76.0	75.0	76.0	74.7	75.0	75.0	75.0	75.7	75.0	75.0
3	78.5	84.8	78.5	85.2	85.6	85.7	85.7	78.4	85.7	85.6
4	71.0	69.3	71.0	68.9	69.5	69.5	69.5	71.0	69.5	69.5
5	67.5	66.9	67.5	66.5	66.8	66.7	66.7	67.3	66.8	66.8
Apiose										
1		111.1		110.8	111.2	111.2	111.2		111.2	111.3
2		77.7		77.8	77.9	77.9	77.9		77.9	77.9
3		80.4		80.1	80.0	80.0	80.0		80.0	80.0
4		75.1		74.3	75.0	75.0	75.0		75.0	75.0
5		65.2		65.1	65.7	65.8	65.7		65.7	65.7

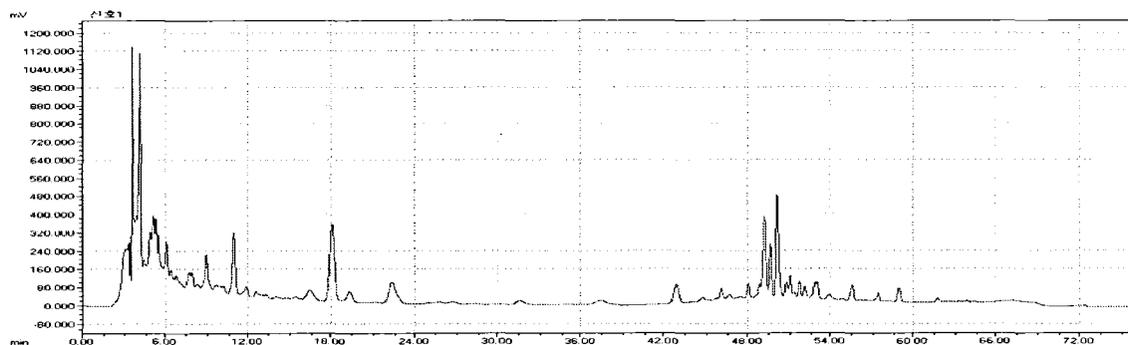
Table 1-8. ^{13}C NMR spectroscopic data for the sugar moieties of 11-20.(in pyridine- d_5)

position	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Glucose (inner)										
1'	105.9	106.0	105.8	105.2	105.2	105.2	104.9	104.9	104.9	105.7
2'	75.3	74.8	74.8	75.5	75.4	75.4	74.2	74.2	74.2	75.5
3'	78.0	78.3	78.4	78.5	78.5	78.5	88.7	88.7	88.7	78.7
4'	72.1	72.3	72.0	72.0	72.0	72.0	70.1	70.1	70.1	72.2
5'	76.6	76.5	76.2	77.9	77.9	77.9	77.7	77.7	77.7	77.0
6'	70.3	70.8	70.6	63.0	63.0	63.0	62.9	62.8	62.8	70.8
Glucose (center)										
1''		104.9	104.7							
2''		75.3	74.8							
3''		78.4	78.3							
4''		71.3	71.2							
5''		77.1	76.8							
6''		70.2	70.1							
Glucose (terminal)										
1'''	104.9	105.6	105.4				105.5	105.5	105.5	105.3
2'''	75.0	75.2	74.9				75.3	75.3	75.3	75.5
3'''	78.7	78.6	78.2				78.2	78.4	78.4	78.6
4'''	72.1	71.0	70.8				72.0	72.0	72.0	70.4
5'''	78.0	77.7	77.4				78.2	78.2	78.2	78.0
6'''	63.0	62.7	62.8				62.9	62.8	62.8	62.9
Arabinose										
1	93.7	93.6	93.3	93.7	93.5	93.5	93.7	93.5	93.5	93.7
2	75.8	75.2	74.5	75.7	76.3	76.3	75.7	76.3	76.3	75.5
3	70.3	71.3	71.7	70.2	70.3	70.3	70.2	70.2	70.2	71.8
4	65.9	66.4	66.0	65.8	65.8	65.8	65.8	75.8	65.8	66.3
5	63.0	63.1	62.8	63.0	63.0	63.0	62.9	62.8	62.8	63.2
Rhamnose										
1	101.1	101.1	100.8	101.1	98.4	101.5	101.1	98.4	101.5	101.4
2	72.1	71.9	70.9	72.0	73.6	70.3	72.0	73.6	70.2	72.3
3	72.5	72.7	72.4	72.4	70.3	75.4	72.5	70.2	75.3	73.0
4	83.6	83.9	83.3	83.7	83.4	77.6	83.7	83.4	77.7	83.9
5	68.7	68.5	68.3	68.6	68.7	68.7	68.7	68.7	68.7	68.9
6	18.2	18.3	18.1	18.1	18.3	18.3	18.1	18.4	18.4	18.7
CH ₃ CO					20.7	21.1		20.7	21.1	
CH ₃ CO					170.4	170.6		170.4	170.6	
Xylose										
1	106.7	106.8	106.5	106.6	106.5	105.4	106.6	106.5	105.5	106.8
2	75.8	76.0	75.7	75.0	75.0	75.0	75.0	75.0	75.0	75.6
3	78.4	84.8	78.0	85.5	85.6	85.6	85.6	85.5	85.5	85.0
4	71.0	69.4	69.8	69.5	69.5	69.6	89.5	69.6	69.6	70.1
5	67.3	66.9	67.1	66.8	66.8	66.8	66.8	66.9	66.9	67.2
Apiose										
1		111.2		111.2	111.3	111.3	111.3	111.3	111.3	111.4
2		77.8		77.9	77.9	77.9	77.9	77.9	77.9	78.3
3		80.4		80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.7
4		75.2		75.0	75.0	75.0	75.0	75.0	75.0	75.5
5		65.4		65.8	65.8	65.8	65.8	65.8	65.8	65.6

3. 도라지 추출물 및 조사포닌의 표준 분석 방법의 확립

도라지 사포닌들을 분석하는 방법으로는 1999년 일본에서 Saeki T, Koide K와 Nikaide T (M-1) 가 제시한 역상컬럼을 이용한 자외선(ultra-violet)검출 분석방법과 2002년 발표된 김금숙 (M-2) 그리고 2006년 발표된 서울대의 김영식 교수팀 (M-3) 등에서 제시한 역상컬럼을 이용한 광 산란(ELSD)검출 분석에 대한 방법이 이미 보고되어 있다. 그러나 이들 세 가지의 방법을 이용하여 도라지 사포닌들을 분석 하여본 결과 아래와 같은 문제점들이 있음을 발견 하였다.

M-1의 방법을 사용하여 분석한 경우 아래의 그림과 같이 0~24분 영역과 42분에서 60분 사이의 영역에서 도라지 사포닌과 다른 불순물들이 함께 용출됨을 확인 하였다. 이 방법은 자외선검출기의 특징 중 하나인 자외선 흡광계수가 높은 화합물에 따라 상대적으로 높은 감응 정도를 나타낸다. 하지만 자외선 검출기는 자외선흡광이 약하여 감도가 떨어지는 도라지 사포닌들과 같은 사포닌들의 정량은 어렵다. 또한 용매의 조성에 따라 검출기의 기준선(base-line) 변동으로 재현성 있는 정량값을 얻기가 어렵다는 것을 확인 하였다. 그리고 이 방법으로 도라지 사포닌들을 정량 할 때 0~12분 영역에 존재하는 도라지 사포닌이 자외선 흡광도가 높은 불순물들과 함께 있어 정확한 정성과 정량을 하기에 더욱 어려움이 있음을 확인 하였다.



M-2의 방법은 단지 platycodin D를 정량하는 방법으로 다른 도라지 사포닌들을 분석하는 방법에 대한 조건은 제시하지 못하였으며, M-3의 방법은 전처리 과정을 통하여 일반적인 다당(polysaccharide) 및 단당(carbohydrate)을 제거 하는 과정을 거쳐야 하므로 실험자의 숙련도에 따라 재현성의 문제가 있음을 확인 할 수 있

었다.

따라서 본 연구에서는 도라지 사포닌의 새로운 분석조건을 확립하기 위하여, 다음과 같은 분석 조건의 최종 목표를 설정하였다. 첫째 분리능(Rs)은 도라지 사포닌 성분 마다 1.5 이상의 분리능 값이 되도록 한다. 둘째 시그널과 노이즈 비(S/N ratio) 수치가 가장 높은 값이 유지 되도록 하여, 검출 감도를 높인다. 셋째 도라지 사포닌 성분들의 피크의 비대칭 계수를 0.9~1.5이내로 유지하도록 하여 도라지 사포닌들 피크의 꼬리 끌림(tailing)현상을 최소화 한다. 넷째로 도라지 사포닌 분석용 칼럼의 이론단수를 최대 20,000~150,000 이상이 되도록 한다. 마지막으로 용량 계수(capacity factor k')값을 $0.5 \leq k' \leq 20$ 이내의 범위에 이르도록 한다.

위의 분석 조건 목표를 충족시키기 위하여 이동상의 조건, 검출기 및 칼럼등 세 가지의 조건의 최적화를 통해 최적의 분석조건을 확립하고자 하였다. 첫째 이동상의 조성변화로 다양한 용매의 조성 비율을 변화시키면서 칼럼 내에서의 도라지 사포닌들의 이동, 피크모양, 분리능등을 확인하여 최적의 이동상 조건을 확립 한다. 둘째 검출기에 따른 변화로서 도라지 사포닌들을 정확하게 검출 할 수 있는 검출기를 확정 하고, 검출기에 대한 S/N비를 높여 검출 한계 및 정량 한계를 확인하여 최적의 검출기조건을 설정한다. 마지막으로 칼럼의 종류에 따른 변화로 역상칼럼을 생산하는 제조사별로 대표적인 칼럼을 선정하여, 도라지 사포닌에 대한 분리능, 이론 단수 등을 확인하여 최적의 칼럼을 선정하고 이를 분석에 적용한다.

가. 도라지의 주요 사포닌 분석을 위한 용매조성 설정

최적의 분석조건을 확인하기 위하여, 기기는 NS-3000i integrated HPLC gradient type (futechs.co.ltd)와 evaporation light scattering detector (ELSD, USA, Softa)를 이용하여 ELSD조건을 spray chamber: 25℃, drift & detector chamber: 70℃, gas pressure : N₂ gas 55.0psi, noise filter: 4로 설정하여하였다. 칼럼은 optimapak (4.6x 250 mm, 5 μm, 100Å, rstech.co ltd, Korea)을 사용하여, 칼럼온도는 40 ℃를 유지하도록 하였다. 이동상 조건은 용매 A와 용매 B를 이용하여 기울기 (gradient) 용리를 통해 최적의 분석 조건을 찾아내었다.[A: 50mM ammonium acetate: acetonitril: methanol (85:10:5 v/v%), B: 50mM ammonium acetate: acetonitril: methanol (55:40:5 v/v%)]

1) 1차조건

가) 기울기용리 조건

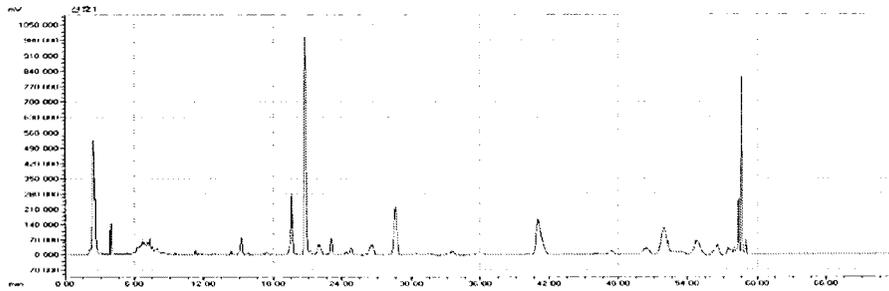
유속(flow rate) : 0.9 ml/min, 전체 분석 시간(total run time) : 71 min

시 간	A 용매(V %)	B 용매(V %)
0~2 min	75	25
2~5 min	75	25
5~18 min	60	40
18~23 min	60	40
23~28 min	59	41
28~33 min	59	41
33~41 min	57	43
41~51 min	57	43
51~56 min	0	100
56~61 min	0	100
61~71 min	100	0

나) 결과 및 고찰

광 산란검출기는 자외선검출기와 달리 시료 안에 존재하는 물질의 함량에 따라 감응하므로, 존재량에 따라 피크의 크기가 다르게 나타나게 된다. 따라서 본 조건에서는 자외선검출기의 조건처럼 총 분석시간을 약 71분대로 조절하였고, 시간에 따른 이동상의 변화 속도를 빠르게 하여 분석하여 보았다.

분석 결과 광 산란 검출기에서는 자외선검출기와 달리 2분에서 20분 사이의 자외선 감응도가 높았던 피크들이 사라졌으며, 또한 기준선의 안정화가 매우 좋게 나타났을 뿐만 아니라 도라지 사포닌으로 예상되는 성분에 대한 피크의 크기가 자외선검출기 210 nm 에서 보다 매우 높은 감응 도를 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 18분대에서 30분 영역에서 도라지 사포닌으로 예상되는 성분들의 피크가 매우 크게 나타났으며, 36분 이후에서도 분리가 잘 이루어지고 있음을 알 수 있었다. 하지만 48분에서 60분 영역의 피크는 분리가 된 것 같이 보이지만 k'값이 0에 가까운 결과를 나타내어 분석 조건을 조절하여 최적의 조건을 확립하기로 하였다.



2). 2차조건

가) 기울기용리 조건

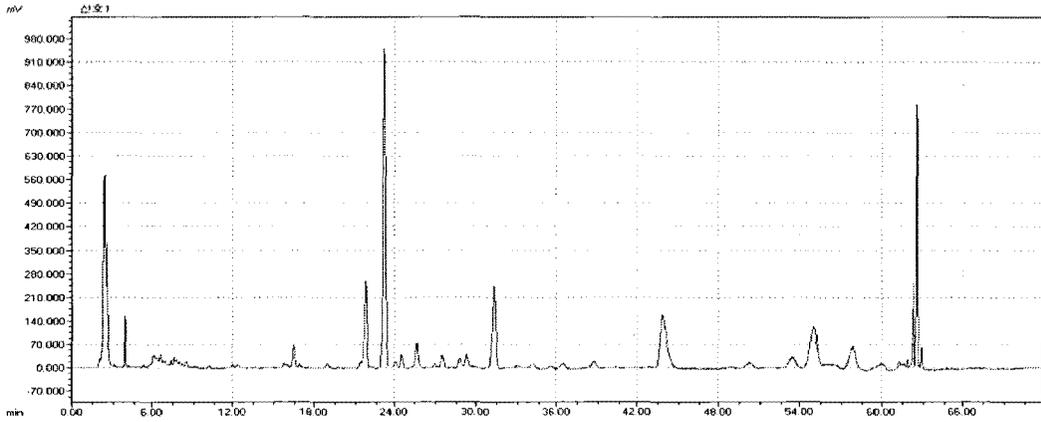
유속(flow rate) : 0.9 ml/min, 전체 분석 시간(total run time) : 75 min

시 간	A 용매(V %)	B 용매(V %)
0~1 min	85	15
1~2 min	85	15
2~4 min	75	25
4~7 min	75	25
7~22 min	60	40
22~27 min	60	40
27~32 min	59	41
32~37 min	59	41
37~45 min	57	43
45~55 min	57	43
55~60 min	0	100
60~65 min	0	100
65~75 min	100	0

나) 결과 및 고찰

1차 조건에서 18분과 24분 영역에서 불순물이 있는듯하여, 이동상의 조성 비율을 달리 하였다. 1차조건과는 달리 유속은 0.9 ml/min을 그대로 유지하고 0~22분 사이의 시간 영역에서 용매의 조성차이를 두기위하여 A:B의 조성 비율 85:15를 추가하여 지표물질로 예상되는 피크를 다른 물질들로부터 단독 피크로 존재하도록 시도하였다. 또한 A:B 조성 비율이 57:43이 되는 영역의 분석시간을 2분 정도 추가하여 48분에서 60분 사이의 분리되어 있는 듯 보이지만 k' 값이 0에 가까운 피크들의 분리능을 개선 해보고자 시도하였다. 분석한 결과 1차 조건에서는 18분에서 30분 사이에 나타나던 도라지 사포닌으로 예상된 물질의 피크들이 2차 조건에서는 20분에서 36분 영역에서 확인이 되었고, 일부 불순물들이 분리되는 결과를 얻게 되었

다. 그러나 내용면에서 보면 1차조건과 차이가 없는 것으로 사료 되었다. 50분 이후의 영역에서는 별다른 변화가 없는 것으로 사료되어 다시 조건을 조절하여 54분 이후의 피크들의 분리능을 개선하는 방법을 설정하여 보기로 하였다.



3) 3차조건

가) 기울기용리 조건

유속 (flow rate) : 0.9 ml/min, 전체 분석 시간(total run time) : 75 min

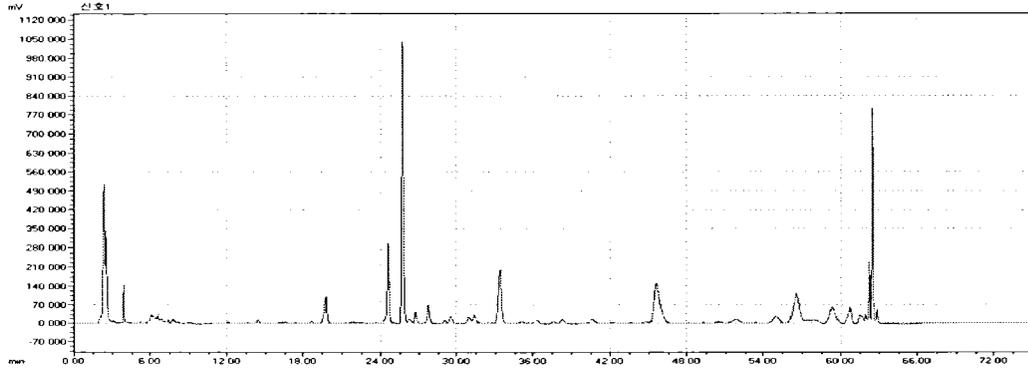
시 간	A 용매(V %)	B 용매(V %)
0~1 min	85	15
1~4 min	85	15
4~22 min	60	40
22~27 min	60	40
27~32 min	59	41
32~37 min	59	41
37~45 min	57	43
45~55 min	57	43
55~60 min	0	100
60~65 min	0	100
65~75 min	100	0

나) 결과 및 고찰

2차 조건과 동일하게 유속을 유지하였고, 분석 시간도 동일하게 하였다. 2차 조건에서 문제가 되었던 18분에서 36분 영역의 성분들에 대한 분리능을 증가시키기 위하여 2차 조건에서는 A:B의 조성 비율 75:25가 존재하였으나, 조성 비율 75:25가 18분과 36분 영역에 존재하는 피크에 영향을 주지 않는 것으로 사료되어, A:B의 조성 비율 85:15에서의 시간을 2분 추가하였고, A:B의 조성 비율이 60:40으로 이동 시작

점을 85:15부터 시작 하도록 설정하였다.

분석결과 도라지 사포닌으로 예상되는 성분들의 피크가 24~36분 영역에서 선명하게 확인이 되었으며, 48분에서 66분 사이의 분리는 해결되지 않았다. 따라서 60분대 이후의 영역들을 분리하기 위하여 새로운 분석 조건을 정하기로 하였다.



4). 4차조건

가) 기울기용리 조건

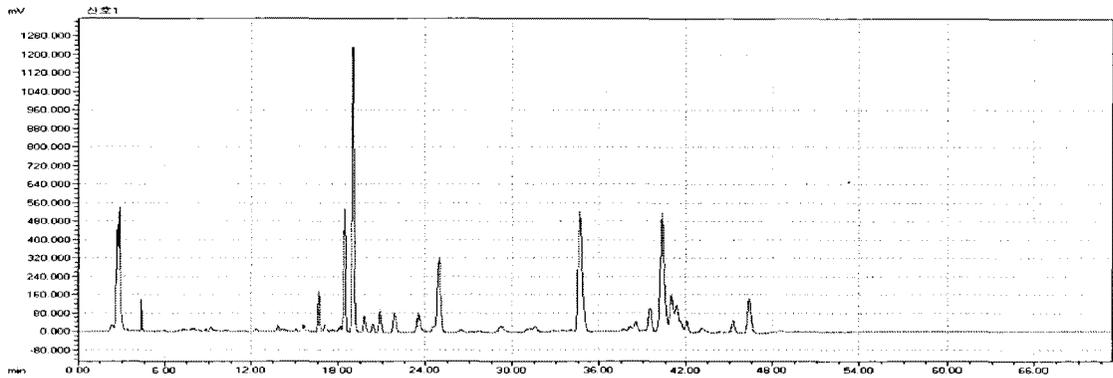
유속 (flow rate) : 0.8 ml/min, 전체 분석 시간(total run time): 75 min

시 간	A 용매(V %)	B 용매(V %)
0~3 min	85	15
3~13 min	57	43
13~25 min	57	43
25~40 min	40	60
40~55 min	40	60
55~60 min	0	100
60~65 min	0	100
65~75 min	100	0

나) 결과 및 고찰

1, 2, 3차 조건과는 다르게 유속을 0.9 ml/min에서 0.8 ml/min으로 조절하여, 분리능을 증가시키기 위한 시도를 하였다. 또한 유속이 느려지는 관계로 도라지 사포닌으로 예상되는 시료들의 용출 시간대를 조절하기 위하여, 3차 조건에서 A:B의 조성 비율 85:15 영역의 시간을 4분에서 3분으로 단축하였고, A:B의 조성 비율 60:40과 A:B의 조성 비율 59:41 영역의 시간을 삭제하였으며, A:B의 조성 비율 57:43 영역의 시간을 2분 추가하였다. 또한 3차 조건에서는 없었던 A:B의 조성 비율 40:60 영역을 추가하여, A:B의 조성 비율 57:43에서 A:B의 조성 비율 40:60 까지 도달하

는 시간을 15분으로 설정하였고, A:B의 조성 비율 40:60을 지속적으로 15분 동안 유지하도록 하여, 45분 이후에 나타나는 피크들의 분리능이 증가되도록 시도하였다. 조정된 조건으로 분석한 결과 도라지 사포닌으로 예상되었던 성분들의 피크는 3차 조건에서 24분~ 36분 영역에서 확인 되었으나, 4차 조건에서는 약 6분 정도 앞으로 이동되어 나타났다. 유속을 조절한 결과 불순물과의 분리능이 약간 증가됨을 확인할 수 있었다. 그리고 3차 조건에서 확인되었던 45분 이후의 피크들은 4차 조건에서는 30분 영역으로 이동하는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 3차조건 보다 개선되어진 것은 36분 이후의 피크들의 분리능이 증가 하고 있음을 확인할 수 있었다. 또한 분석 시간이 단축이 되는 장점은 있으나, 최적의 분석 조건이라 아니라 사료되어 다시 분석 조건을 수정, 설정하기로 하였다.



5) 5차조건

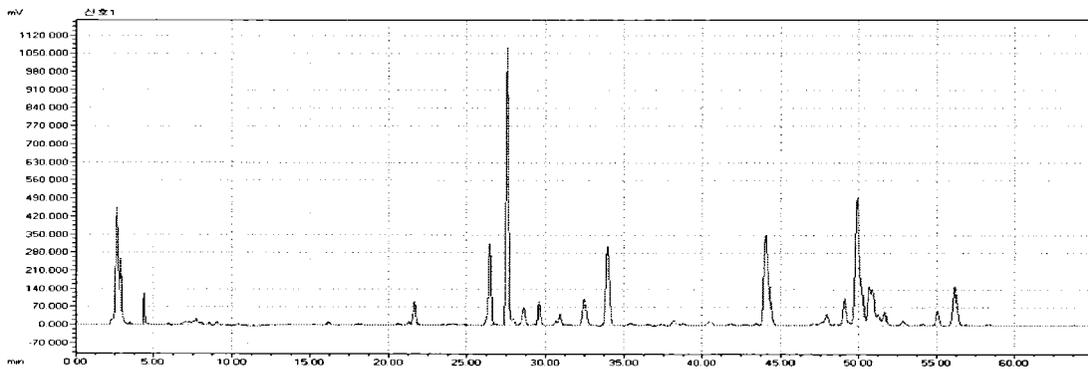
가) 기울기용리 조건

유속(flow rate) : 0.8 ml/min, 전체 분석 시간(total run time) : 75 min

시 간	A 용매(V %)	B 용매(V %)
0~2 min	85	15
2~5 min	85	15
5~25 min	57	43
25~35 min	57	43
35~50 min	40	60
50~55 min	40	60
55~60 min	0	100
60~65 min	0	100
65~75 min	100	0

나) 결과 및 고찰

4차 조건에서 유속을 0.8 ml/min으로 변경하여 A:B의 조성 비율 85:15 영역을 2분만 유지 하도록 변경한 결과 도라지 사포닌으로 예상되는 성분들의 피크 중 일부가 k'값이 0로 형성되는 것을 확인하여, 유속은 4차 조건과 동일하게 유지하고, A:B의 조성 비율 85:15 영역의 시간을 7분으로 증가시켰고, A:B의 조성 비율 85:15에서 A:B의 조성 비율 57:43 까지 변화하는 시간을 4차 조건에서는 10분으로 설정되었으나 5차 조건에서는 20분 증가 시켰다. 또한 A:B의 조성 비율 57:43을 유지하는 시간을 4차에서는 12분이었으나, 5차 조건에서는 10분으로 단축하였고, A:B의 조성 비율 40:60을 유지하는 영역의 시간을 4차에서는 15분이었으나, 5차에서는 5분으로 단축하였다. 이렇게 조정하므로 18분에서 25분 영역에 있는 피크들의 분리능이 향상되도록 시도하였고, 36분에서 48분 영역에 있는 피크들의 분리능이 향상되도록 시도하였다. 분석한 결과 4차 조건에서 나타난 18분에서 25분 영역에서 확인되었던 피크들이 25분에서 35분 영역으로 이동하여, 분리능이 향상 되어진 것을 확인할 수 있었다. 하지만 일부 피크들은 불순물을 포함하고 있는 것을 확인되었고, 36분에서 48분 영역의 피크들은 45분에서 55분 사이의 영역으로 이동하였으나, 의도했던 피크의 분리능은 향상되지 않아 다시 분석조건을 조정하기로 하였다.



6) 6차조건

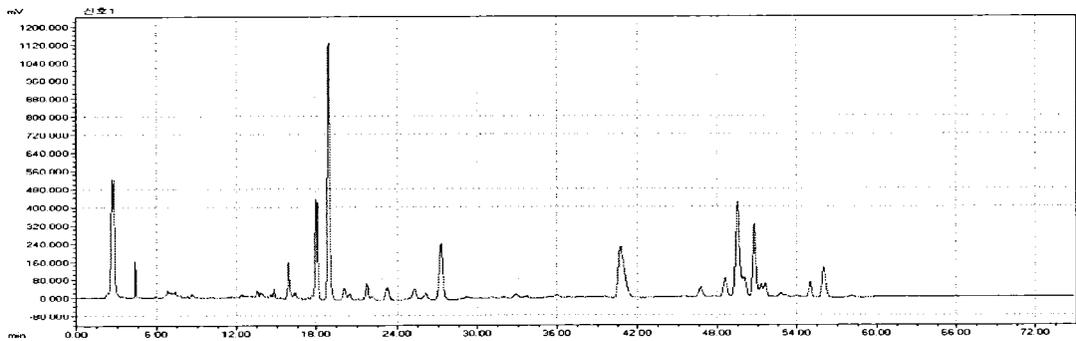
가) 기울기용리 조건

유속 (flow rate) : 0.8 ml/min, 전체 분석 시간 (total run time) : 77 min

시 간	A 용매(V %)	B 용매(V %)
0~1 min	85	15
1~4 min	85	15
4~9 min	62	38
9~14 min	62	38
14~24 min	60	40
24~29 min	60	40
29~44 min	57	43
44~49 min	57	43
49~54 min	40	60
54~59 min	40	60
59~62 min	0	100
62~67 min	0	100
67~77 min	100	0

나) 결과 및 고찰

5차 조건에서 A:B의 조성 비율 85:15 영역의 시간을 7분으로 하였으나 6차에서는 4분으로 하였고, 5차 조건에 없던 A:B의 조성 비율 62:38을 추가하여 변화시간을 5분, 유지시간을 5분으로 설정하였다. 또한 6차 조건에서는 2,3차에 있던 A:B의 조성 비율 60:40을 추가하여, 변화시간을 10분, 유지시간을 15분으로 설정 하였다. 그리고 A:B 조성 비율 57:43 영역에서 5차에서는 변화시간이 20분이었으나, 6차 조건에서는 15분으로 단축하였고, 유지시간은 5차 조건에서는 10분이었으나, 6차 조건에서는 5분으로 단축하였다.



분석한 결과 25분에서 36분 영역의 피크들이 다시 18분에서 30분 영역으로 이동하였으며, 5차 보다는 불순물들과의 분리능이 향상된 현상을 확인할 수 있었다. 의외로 45분에서 60분 영역 피크들의 분리능이 향상 되어진 것을 확인할 수 있어, 약간의 분석조건을 조정하여 최적의 조건을 확립하기로 하였다.

7) 7차조건

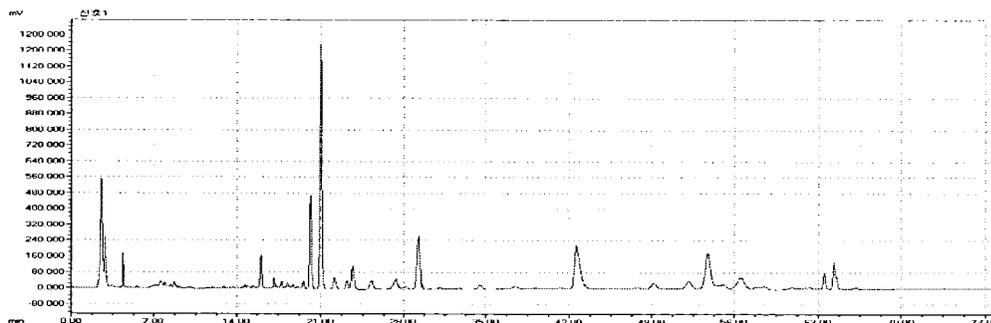
가) 기울기용리 조건

유속 (flow rate) : 0.8 ml/min, 전체 분석 시간 (total run time) : 81 min

시 간	A 용매(V %)	B 용매(V %)
0~2 min	85	15
2~5 min	85	15
5~13 min	62	38
13~18 min	62	38
18~28 min	60	40
28~33 min	60	40
33~48 min	57	43
48~53 min	57	43
53~58 min	40	60
58~63 min	40	60
63~66 min	0	100
66~71 min	0	100
71~80 min	100	0

나) 결과 및 고찰

6차 조건에서와 동일하게 유속(flow rate)을 유지 하였으며, 전체 분석 시간 (total run time)은 6차 조건에서는 77분 이었으나, 7차 조건에서는 4분을 추가 81분 으로 설정하였고, A:B의 조성 비율 85:15로 변화 시간은 1분을 추가하였고, 유지는 동일하게 3분으로 하였으며, A:B의 조성 비율 62:38로 변화 시간을 6차에서는 5분 이었으나, 7차에서는 3분을 추가한 8분으로 설정하여 18분과 26분 사이의 피크들에 대한 불순물로부터 분리를 개선하고자 시도 하였다. 분석 결과 6차에서 18분에서 36분 영역의 피크들 중 불순물과 분리가 이루어 진 것을 확인할 수 있었으며, 또한 45분에서 63분 영역대의 피크들이 좋은 분리능을 이루는 것을 확인 하였다.



결론적으로 광 산란 검출기(ELSD)에서 최적의 분석 조건을 확인하여 본 결과 총 7차에 걸친 분석방법 확립과정을 거쳐 마지막 7차 조건을 최적의 조건으로 확정하게 되었다.

나. 검출기의 종류에 따른 검출 특이성 확인

ELSD에서 검출된 피크들이 도라지추출물에 존재하는 주요 사포닌들인지 확인하기 위하여, 자외선 검출기를 이용, 각각 다른 자외선 파장들에서의 피크 변화를 확인하여 보았다.

1) 자외선검출기를 이용한 분석

가) 실험방법 및 분석조건

고속액체크로마토그래피 시스템(HPLC system)은 휴텍스(futechs)사의 NS-3000i 를 이용하여 자외선검출기 파장 210 nm, 254 nm, 280 nm 에서 각각 도라지 조 사포닌 시료를 분석하였다.

시료의 제조 방법은 도라지의 열수 추출물 농축액을 7~10g을 정밀히 달아 삼각플라스크에 넣고 증류수 50 ml에 녹인 후 메탄올 200ml를 가하고 격렬히 흔들어 10분간 정치한 후 거름종이로 여과한다. 여액은 농축플라스크에 옮겨 감압 농축하고, 여기에 증류수를 가하여 10 ml가 되도록 한 후 이 용액 1ml을 취하여 ODS칼럼 (충진물 ODS, 입자10 μ m, ϕ 13 mm x 40 mm)에 흡착시킨다. 칼럼을 증류수 10ml 씩 3회 세척하고, 메탄올 20ml로 용출시킨다. 이 용액을 감압 농축하여, 물 1ml로 완전히 녹여 필터(filter)하여 사용하였다.

분석에 사용한 칼럼은 Optimapak (4.6 x 250 mm, 5 μ m, 100Å, Rstech.co ltd, korea)를 사용하였으며, 칼럼온도 40 °C를 유지 시킨 후, 210 nm, 254 nm, 280 nm에 서 시료에 대한 성분 흡광도 변화를 확인 하였다. 또한 용매조건은 아래와 같이 ELSD에서 사용한 50mM ammonium acetate는 210nm에서 UV흡광이 발생하여 UV 검출기에는 적합하지 않아 인산염으로 교체하여 분석하였다.]

A : 50mM KH₂PO₄ : Acetonitrile : Methanol (85:10:5) V/V%

B : 50mM KH₂PO₄ : Acetonitrile : Methanol (55:40:5) V/V%

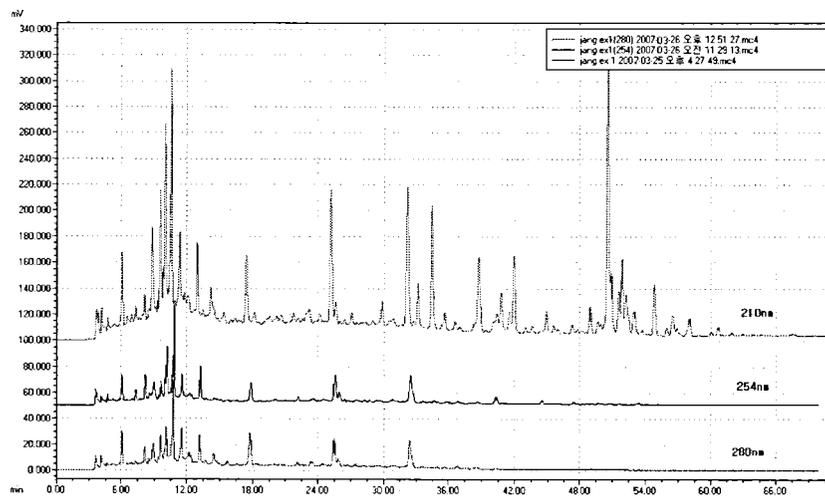
유속(flow rate)은 0.8 ml/min, 전체 분석 시간(total run time)은 81 min으로 하여

아래 표와 같이 기울기용리 하였다.

시 간	A 용매(V %)	B 용매(V %)
0~5 min	85	15
5~10 min	85	15
10~30 min	60	40
30~33 min	60	40
48~51 min	40	60
51~66 min	0	100
66~71 min	0	100
71~81 min	100	0

나) 파장변화에 따른 분석 결과

아래의 크로마토그램과 같이 자외선 파장 210 nm에서는 도라지 사포닌으로 예상되는 물질들의 피크를 확인할 수 있었다. 크로마토그램에서 볼 수 있는 것 같이 10분에서 66분 사이에서 확인이 가능하였다. 자외선파장 254 nm에서는 아래의 크로마토그램과 같이 210 nm에서 확인되어진 피크들의 감도가 낮게 확인이 되었으며, 10분에서 66분 영역에서 보면 일부의 피크들이 사라지는 현상을 확인 할 수 있었다. 이 사라지는 피크들이 도라지 사포닌으로 예상된다. 자외선파장 280 nm에서는 254 nm에서 확인한 결과와 같이 비슷한 경향을 보였으며, 일부 피크들은 완전히 사라지는 것을 확인 할 수 있었다. 특히 30분에서 66분 사이의 도라지 사포닌으로 예상되는 피크들이 사라지는 것을 확인할 수 있었다.



결론적으로 자외선파장에 따라 도라지 사포닌으로 예상되는 피크의 크기는 변화

를 나타내었으며, 특히 18분에서 66분 사이에 있는 화합물의 피크들의 감도가 낮아 지기도 하고 사라지기도 하는 현상을 확인할 수 있었다. 따라서 자외선검출기로는 도라지 사포닌의 정성 및 정량 분석에 어려움이 있을 것으로 사료된다.

2) 광 산란 검출기(ELSD)를 이용한 도라지 사포닌의 분석

검출기에 따라 검출에 대한 특이성을 가지고 있다. 자외선 검출기에서는 자외선 흡광성을 가진 구조의 화합물은 자외선 검출기에서 감도가 높게 나타나지만, 자외선흡광성을 가지지 못하는 배당체 계열 혹은 탄수화물 등은 감도가 떨어지는 현상이 있어, 분석에 어려움이 있다. 광 산란 검출기(Evaporation Light Scattering Detector)의 경우는 비휘발성 화합물에서는 좋은 감도를 유지하며, 존재하는 질량에 따른 감도를 표시하므로 간단한 전처리 과정을 통하여 쉽게 분석을 할 수 있다. 하지만 분석 조건이 매우 까다롭고, 특히 안정화 시간과, 온도에 따른 감응도등이 매우 다양하게 나타나는 현상이 있어 초보자들이 사용하기에는 매우 조심스러운 장비이다.

이러한 각각의 장단점을 가지고 있으므로, 도라지내에 존재하는 주요 사포닌들을 자외선검출기와 광 산란 검출기(evaporation light scattering detector)를 이용하여 검출 감도에 대한 상대적인 값을 확인하여 보기로 하였다.

가) 실험 방법 및 기기

① 광 산란 검출기(evaporation light scattering detector) 실험방법 및 기기

분석기기는 NS-3000i integrated HPLC gradient type (futecs.co.ltd)를 사용하였고, 검출기는 evaporation light scattering detector (ELSD, USA, Softa) 로 spray chamber내 온도 25℃, drift, detection chamber는 70℃, gas pressure는 N₂ gas 55.0psi로 noise filter 4 에서 분석 조건을 설정하였다. 이때 사용된 칼럼은 optimapak (4.6 x 250 mm, 5 μm, 100 Å, rstech.co ltd, Korea)로 칼럼온도는 40 ℃를 유지하도록 하였다.

② 이동상 조건

아래의 표와 같이 용매 A[50mM KH₂PO₄ : acetonitrile : methanol (85:10:5 V/V%)]와 용매 B[50mM KH₂PO₄ : acetonitrile : methanol (55:40:5 v/v%)]를 아래

와 같은 조건으로 사용한 기율기용리방법을 이용하였다. 이때 이동상의 유속은 0.8 ml/min, 전체 분석 시간은 81분 이었다.

시 간	A 용매(V %)	B 용매(V %)
0~2 min	85	15
2~5 min	85	15
5~13 min	62	38
13~18 min	62	38
18~28 min	60	40
28~33 min	60	40
33~48 min	57	43
48~53 min	57	43
53~58 min	40	60
58~63 min	40	60
63~66 min	0	100
66~71 min	0	100
71~80 min	100	0

③ 시료 준비 방법

표준시료는 본 연구팀에서 분리 정제 하여, HPLC, NMR 그리고 Mass를 이용하여 구조규명이 완료된 순도 99%이상의 시료를 사용하였다. 표준시료로는 deapioplatycoside E, platycoside E, deapioplatycodin D₃, platycodin D₃, polygalacin D₃, platycodin D₂, platycodin D, 총 7종의 표준 시료를 선정하여 확인 하였다.

나) 결과 및 고찰

분석 결과 아래와 같은 결과를 얻게 되었다. 자외선검출기를 기준으로 하여 백분율로 확인 하였으며 여기서 사용된 함량 확인은 아래 식을 사용하여 각각 성분의 대한 자외선 검출기 : 광 산란 검출기(ELSD)의 상대적인 값으로 하여 감도의 차이를 확인 하였다.

$$\% = (\text{대조군 의 면적} / \text{기준 군의 면적}) * 100$$

Table 1-4에서와 같이 자외선검출기 보다, 광 산란 검출기(ELSD)의 감도가 도라지 사포닌 각각의 성분에 따라 약 4.7~12배 정도의 차이가 있음을 확인할 수 있었다.

결론적으로 도라지 추출물에서 조 사포닌 성분들의 정성 및 정량분석에는 자외선

검출기 보다 광 산란 검출기가 효과적임을 확인 할 수 있다.

Fig. 1-9. 검출기 종류에 따른 도라지 사포닌들의 HPLC 분석결과

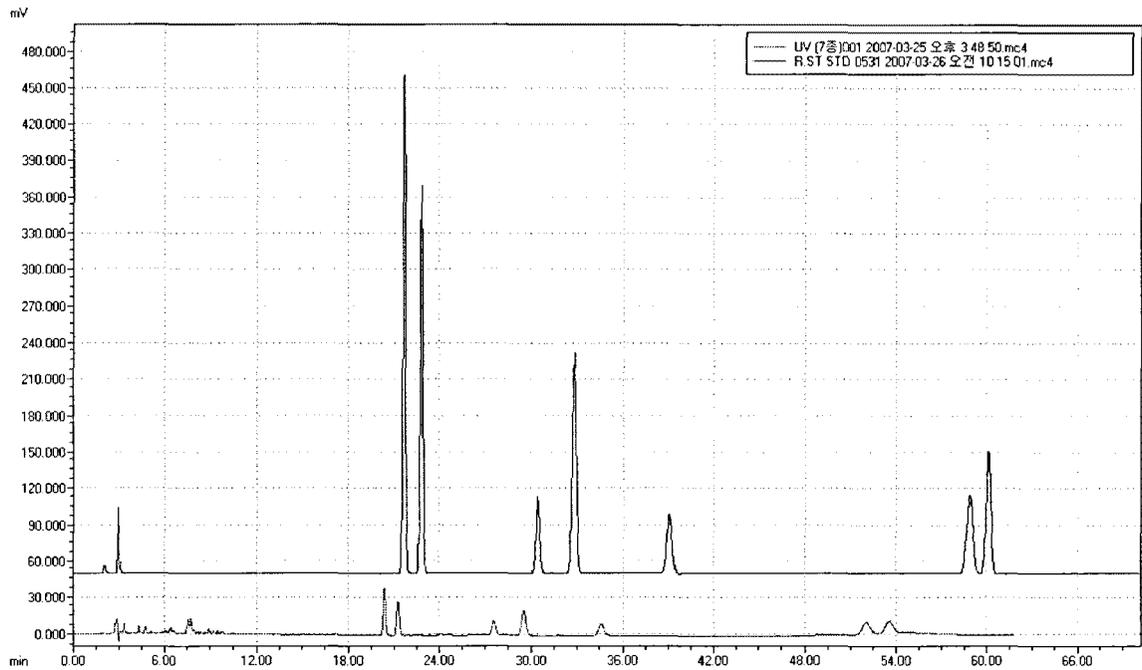


Table 1-4. 도라지 사포닌 성분별 검출기에 나타나는 함량 비교

성분	검출기	머무름 시간	면적 (%)	ELSD의 감도 (UV 검출기 기준)
deapioplatycoside E	UV detection 210nm	20.383	18.398	1,117%
	ELSD	21.666	26.735	
platycoside E	UV detection 210nm	21.250	14.612	1,103%
	ELSD	22.800	20.954	
deapioplatycodin D ₃	UV detection 210nm	27.550	8.986	4,961%
	ELSD	30.383	5.897	
platycodin D ₃	UV detection 210nm	29.516	17.926	787%
	ELSD	32.826	18.353	
polygalacin D ₃	UV detection 210nm	29.516	10.558	467%
	ELSD	32.816	6.409	
platycodin D ₂	UV detection 210nm	34.616	14.505	554%
	ELSD	39.049	10.442	
platycodin D	UV detection 210nm	52.016	15.016	574%
	ELSD	60.066	11.211	

3) 광 산란 검출기(ELSD)의 검출 한계 확인

가) 실험방법 및 시료

기기(NS-3000i integrated HPLC gradient type (futechs.co.ltd)), 검출기 (evaporation light scattering detector (ELSD, USA, Softa)), 컬럼(optimapak (4.6 x 250 mm, 5 μ m, 100 Å, rstech.co ltd, Korea)) 및 이동상의 조건은 상기 실험과 동일한 조건을 사용하였다.

표준시료는 상기 실험에서 사용한 deapioplatycoside E, platycoside E, deapioplatycodin D₃, platycodin D₃, polygalacin D₃, platycodin D₂, platycodin D 등 총 7종의 표준 시료를 선정 하였다. 7종의 표준시료는 각각 deapioplatycoside E 2.9 mg, platycoside E 2.7mg, deapioplatycodin D₃ 1.1mg, platycodin D₃ 2.1mg, polygalacin D₃ 1.4 mg, platycodin D₂ 2.7 mg, platycodin D 3.0mg을 평량하여, 각각 증류수 1ml에 완전히 녹여 준비하였다.

준비된 표준시료를 각각 50 μ l를 취하여, 전체 부피 1400 μ l가 되도록 희석 하여 표준농도를 deapioplatycoside E 103.57 ppm, platycoside E 96.43 ppm, deapioplatycodin D₃ 39.29 ppm, platycodin D₃ 75.00 ppm, polygalacin D₃ 50.00 ppm, platycodin D₂ 96.43 ppm, platycodin D 107.14 ppm이 되도록 하였다. 이 용액 들을 다시 각각 희석 하여, Table 1-5와 같이 표준액을 준비 하였다.

Table 1-5. 순수 사포닌을 이용한 표준액의 제조 (단위 ppm)

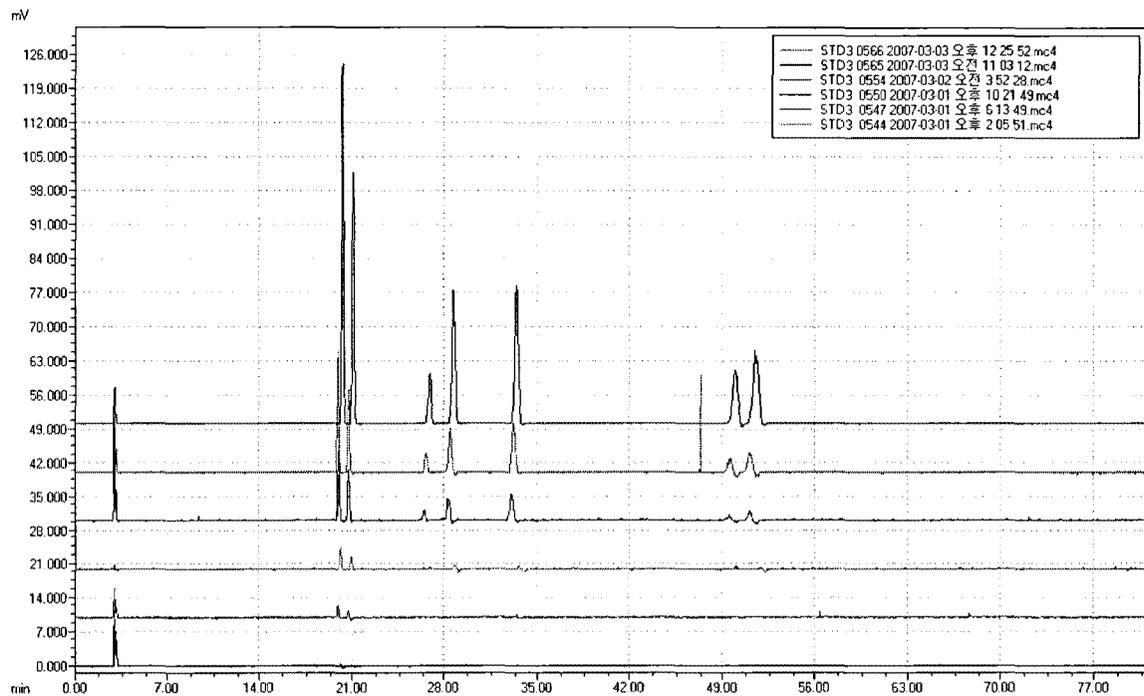
성분명	농도 1	농도 2	농도 3	농도 4	농도 5	농도 6
deapioplatycoside E	103.57	51.79	34.52	15.54	10.35	5.18
platycoside E	96.43	48.21	32.14	14.46	9.64	4.82
deapioplatycodin D ₃	39.29	19.64	13.10	5.89	3.93	1.96
platycodin D ₃	75.00	37.50	25.00	11.25	7.5	3.75
polygalacin D ₃	50.00	25.00	16.67	7.5	5	2.5
platycodin D ₂	96.43	48.21	32.14	14.46	9.64	4.82
platycodin D	107.14	53.57	35.71	16.07	10.71	5.36

나) 결과 및 고찰

준비된 위의 농도를 달리한 도라지 사포닌 표준액을 분석한 결과 Fig. 1-10 같은 결과를 얻었다. 농도 1, 2, 3에서는 7종의 표준 시료들이 확인이 되었으며, 농도

4, 5, 6에서는 deapioplatycoside E와 platycoside E 만 확인이 되었다. 또한 농도 1, 2, 3에서 면적적분을 했을 경우, 재현성 있는 값을 얻을 수 있는 농도는 농도 1로 사료되어 표준시료 제조 시 농도의 최저 한계를 농도 1로 설정 하는 것이 정확성과 재현성 있는 값을 얻을 수 있는 것으로 사료되었다. 또한 분석에 필요한 미지시료의 예측 농도를 농도 1이상으로 하여, 시료 채취 및 전처리 과정을 진행하면 오차를 줄일 수 있을 것으로 사료 되었다.

Fig. 1-10. 순수 도라지 사포닌들로부터 제조된 농도별 표준액의 분석 결과



다. 시스템(system) 적합성 확인 및 최적의 칼럼 선정

앞에서는 각각 시스템과 분석 방법의 설정에 대하여 최적의 조건을 확인 하였다. 분석조건을 선정하는데 있어 칼럼은 매우 중요한 역할을 하며, 한가지의 칼럼을 선정하여 분석 조건을 확인하는 것 보다. 다양한 칼럼을 선정하여, 최적의 칼럼을 선택하여 분석하는 것이, 결과 값에 대한 정밀성을 높이는 문제를 해결 할 수 있는 방법이 되므로 칼럼 제조사 별로 대표적인 칼럼을 선정하여, 분석하고자 하는 도라지 사포닌의 표준 시료를 제조하여 각각 칼럼들에 대한 시스템 적합성 결과를 확인 하여 보았다.

1) 실험방법

기기(NS-3000i integrated HPLC gradient type (futechs.co.ltd)), 검출기 (evaporation light scattering detector (ELSD, USA, Softa)), 컬럼(optimapak (4.6 x 250 mm, 5 μ m, 100 Å, rstech.co ltd, Korea)) 및 이동상의 조건은 상기 실험과 동일한 조건을 사용하였다.

표준시료는 상기 실험에서 사용한 deapioplatycoside E, platycoside E, deapioplatycodin D₃, platycodin D₃, polygalacin D₃, platycodin D₂, platycodin D 등 총 7종의 표준 시료를 선정 하였다.

실험에 사용한 칼럼은 제조사별로 각각 1개를 선정 하여 총 5개의 칼럼으로 사용 하였다. 칼럼의 종류는 hypersil gold C18 4.6 x 250 mm 5 μ m 120 Å (thermo scientific. co. ltd, USA), luna C18 4.6 x 250 mm 5 μ m 120 Å (phenomenx, USA), eurobond ace- C18 4.6x 250 mm 5 μ m 100 Å (beschhoff, Germany), grom-st C18 4.6 x 250 mm 5 μ m 120 Å (alltech grom, Germany), optimapak C18 4.6 x 250 mm 5 μ m 100 Å (rstech. Korea)로. 최적의 칼럼조건을 찾아내기 위하여 농도, 용량 계수, 이론단수, 분해능(USP), S/N비의 값을 측정하여, 최적의 조건을 비교 확인 하였다.

2) 결과 및 고찰

(가) 상대적인 머무름 시간(relative retention time)

상대적인 머무름 시간을 비교하여 본 결과 optimapak 칼럼을 기준으로 하여 eurobond 칼럼과 alltech 칼럼은 상대적인 머무름 시간이 약 2~3분정도로 뒤쪽에 나타나는 것을 확인 할 수 있었고, 반면 hypersil 칼럼은 다른 칼럼보다 약 1~4분 정도 앞에서 나타나는 것을 확인 할 수 있었다. 상대적인 머무름 시간이 증가한다는 것은 칼럼내에서 분석하고자 하는 성분과 칼럼내의 충전 물(packaging material)과의 상호 작용이 좋다는 것을 의미한다. 그러므로 hypersil 칼럼보다는 luna 칼럼, eurobond 칼럼, alltech 칼럼, optimapak 칼럼이 도라지 사포닌을 분석하는 칼럼으로 적합한 것으로 사료되었다.

Fig. 1-10. 도라지 사포닌 표준액을 이용한 분석 칼럼별 HPLC 분석결과

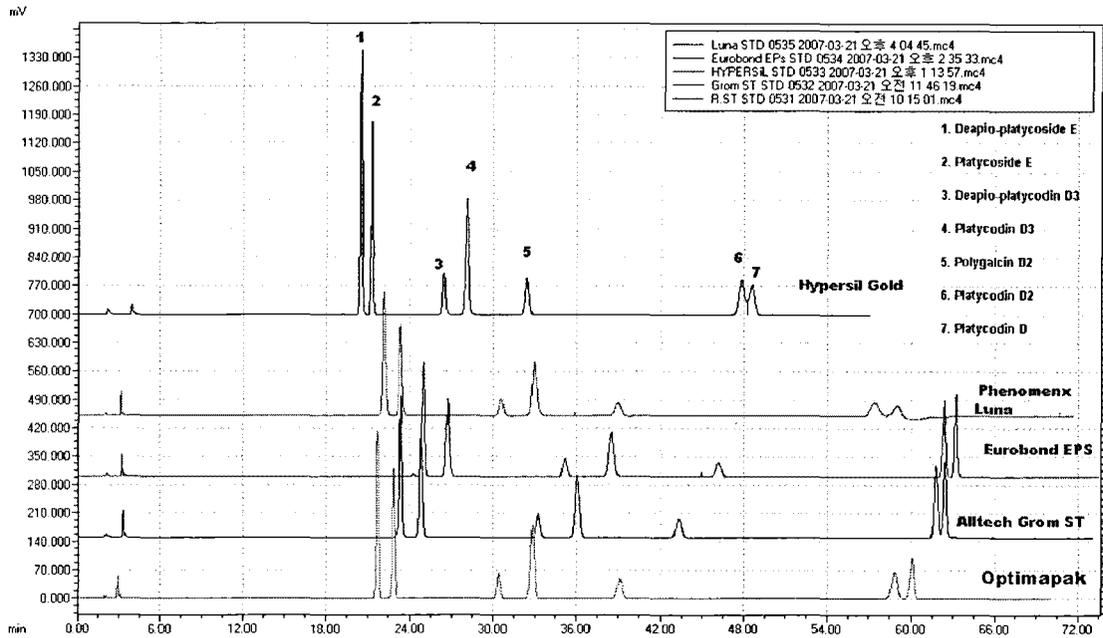


Table 1-6. 분석 칼럼별 도라지 사포닌들의 머무름시간 비교

성분 명	상대 머무름 시간(relative retention time) (min)				
	hypersil gold	luna	eurobond	alltech grom-ST	optimapak
deapioplatycoside E	20.46	22.13	24.93	23.33	21.66
platycoside E	21.23	23.28	26.70	24.78	22.80
deapioplatycodin D ₃	26.45	30.53	35.18	33.21	30.38
platycodin D ₃	28.11	32.93	38.53	36.06	32.81
polygalacin D ₃	32.36	38.93	46.14	43.23	39.04
platycodin D ₂	47.81	57.38	62.36	61.78	58.84
platycodin D	48.59	58.98	63.21	62.43	60.06

상대 머무름 시간 (R.R.T.) = $tR * t_{is-elution} / t_{isR}$

tR : R retention time, $t_{is-elution}$: elution time fo last peak,
 t_{isR} : retention time of last peak

(나) 용량 계수(capacity factor)

용량 계수는 용매, 시료 및 칼럼 내에 있는 충전 물(packing material) 과의 상

호 관계를 수식으로 표현한 것으로 시료와 칼럼에 대한 용매의 적합성을 알려준다. k' 값이 0 에 가까우면 피크와 피크의 간격이 좁아지므로 분리능이 떨어지는 현상을 보이고, k' 값이 너무 크면 전체 분리능은 좋아지나, 전체 분석시간이 길어지는 현상이 발생하여, 전체적으로 분리에 어려움을 줄 수 있다. 따라서 가장 적합한 k' 값의 범위는 $0.5 \leq k' \leq 20$ 범위 이다. hypersil 칼럼: 8.3~ 21.0, luna 칼럼: 6.02~ 17.72, eurobond 칼럼: 6.63~18.35, alltech 칼럼: 6.03~17.82, optimapak 칼럼:6.38~ 19.47로 확인이 되었다. 그러므로 위의 5종 칼럼은 현재 확립된 기율기 용리조건에서 도라지 사포닌을 분리 할 수 있는 적합한 칼럼들임을 확인 할 수 있다.

Table 1-8. 분석 칼럼별 도라지 사포닌들의 용량 인자 계수 비교

성분 명	용량 인자 계수 (Capacity factor k')				
	hypersil gold	luna	eurobond	alltech grom-ST	optimapak
deapioplatycoside E	8.3	6.02	6.63	6.03	6.38
platycoside E	8.6	6.39	7.17	6.47	6.77
deapioplatycodin D ₃	11.0	8.69	9.77	9.01	9.35
platycodin D ₃	11.7	9.45	10.79	9.87	10.18
polygalacin D ₃	13.7	11.36	13.12	12.03	12.31
platycodin D ₂	20.7	17.21	18.09	17.62	19.06
platycodin D	21.0	17.72	18.35	17.82	19.47

$$k' = (tR - tM) / tM$$

tR : retention time of compound , tM : retention time of mobile phase

(다) 상대 머무름 계수(relative retention factor)

상대 머무름 계수는 분석된 성분 피크와 이 성분 피크의 전 피크와의 상대적인 비교 값으로 1 이상이면 분리가 잘 이루어짐을 확인하는 수치이다. 따라서 현재 분석에 사용한 5종의 칼럼들은 각 성분들에 대한 상대 머무름 값이 1 이상이므로 적합한 것으로 확인 되었다.

Table 1-9. 분석 칼럼별 도라지 사포닌들의 상대 머무름 계수 비교

성분 명	상대 머무름 계수 (r)				
	hypersil gold	luna	eurobond	alltech grom-ST	optimapak
deapioplatycoside E	1	1	1	1	1
platycoside E	1.04	1.06	1.08	1.07	1.06
deapioplatycodin D ₃	1.27	1.36	1.36	1.39	1.38
platycodin D ₃	1.07	1.09	1.10	1.10	1.09
polygalacin D ₃	1.16	1.20	1.22	1.22	1.21
platycodin D ₂	1.51	1.52	1.38	1.46	1.55
platycodin D	1.02	1.03	1.01	1.01	1.02

상대 머무름 계수(R.I.) = $k'i/k'i-1$

$k'i$ = capacity factor, $k'i-1$: capacity factor of the front peak.

(라) 비대칭 계수 (asymmetry)

비대칭 계수 (A_s)의 의미는 각 성분의 피크에 대한 꼬리 끌림 현상을 확인하는 지표로 칼럼의 수명과도 연관이 된다. 그러므로 꼬리 끌림의 형태에 따라서 비대칭 계수(A_s)값이 차이가 난다. 즉 0.90 이하의 수치를 나타내면 전 꼬리 끌림이 있다는 의미이며, 1.5이상의 수치를 나타내면 후 꼬리 끌림이 있다는 것이다. 그러므로 새로 구입한 칼럼이라도, 이동상과 시료, 칼럼 내의 충전 물과의 상호 작용에 의하여 꼬리 끌림 현상이 발생하는 경우가 있다. 또한 비대칭 계수가 1.5 이상으로 커질수록 피크의 겹치는 현상이 많아진다. 그러므로 비대칭 계수의 적합범위는 $0.9 \leq A_s \leq 1.5$ 가 좋다. 따라서 위의 칼럼의 경우 hypersil 칼럼은 deapioplatycoside E, platycodin D₃에서 0.9 이하의 수치를 나타내었고, eurobond 칼럼은 platycodin D₃, alltech 은 platycoside E, polygalacin D₃를 제외한 5종의 시료에서 0.9이하의 수치를 나타내었다. 반면 luna칼 럼과 optimapak 칼럼에서는 7종 모두 균일하게 적합 범위 안에 들어가는 것을 확인하였다.

Table 1-10. 분석 칼럼별 도라지 사포닌들의 비대칭 계수 비교

성분 명	비대칭 계수(5%)				
	hypersil gold	luna	eurobond	alltech grom-ST	optimapak
deapioplatycoside E	0.89	1.01	0.96	0.84	0.94
platycoside E	0.90	1.20	1.19	1.02	0.99
deapioplatycodin D ₃	1.02	1.31	0.91	0.86	1.27
platycodin D ₃	0.89	1.10	0.80	0.87	0.95
polygalacin D ₃	1.38	1.01	1.14	1.27	1.23
platycodin D ₂	0.90	1.10	0.93	0.85	0.95
platycodin D	1.22	0.97	0.93	0.81	0.99

asymmetry factor = b/a : a: front width (5%), b: rear width (5%)

(마) 이론단수 (theoretical plate)

이론단수(theoretical plate, plate number, N)는 칼럼의 분리 효율, 충전 상태를 나타내는 지표이다. 특히 잘 충전된 칼럼은 높은 이론단수(N)값을 나타낸다. 분석하는 성분 마다 조금씩 차이가 있으나 일반적으로 입자크기가 5 μm 이고 칼럼내경과 길이가 4.6 x 250 mm 인 일반적인 분석용 칼럼인 경우 이론 단수 값은 20,000~150,000 이상의 값을 나타내게 되어있다. 그러므로 위의 컬럼들의 이론 단수 값은 적합 범위 이상이므로, 도라지 사포닌을 분석하기에 적합함을 확인 하였다.

Table 1-11. 분석 칼럼별 도라지 사포닌들의 이론단수 비교

성분 명	이론 단수 (efficiency 5s)				
	hypersil gold	luna	eurobond	alltech grom-ST	optimapak
deapioplatycoside E	115087	64684	68592	79779	77628
platycoside E	116046	55841	56347	67069	76007
deapioplatycodin D ₃	74600	43175	59083	62402	68917
platycodin D ₃	68602	42192	50029	57953	65462
polygalacin D ₃	64349	35298	55226	52380	54672
platycodin D ₂	63209	36128	345197	292243	87029
platycodin D	57268	39191	496858	381039	182665

Efficiency (5s) N= (tR/σ)²

tR : Retention time of compound, σ: Standard deviation(=W1/2/2.355 or Wi/2)

(바) 분리능 (resolution USP)

분리능(Rs)은 컬럼과 용매조건 등이 최적화 되었는지를 확인할 수 있는 수치이다. 이 수치를 통하여 피크와 피크 사이의 분리가 되었는지를 확인할 수 있다.

일반적으로 1.5 이상이면 적합하다. 분리능이 1.5 이하 이면 전 피크와 겹치게 되는 현상이 있다는 것으로 분리가 완전히 이루어진 것이 아니라고 보아야 한다. 따라서 컬럼들을 확인하여 본 결과 hypersil 컬럼은 platycodin D₂와 platycodin D의 Rs 값이 각각 0.25 로 완벽하게 분리되지 않고 겹치는 현상을 보이고 있다. 또한 Luna 컬럼은 platycodin D의 Rs 값이 1.28 로 앞 피크와 완벽하게 분리되지 않고, 약간 겹치는 현상이 있음을 확인할 수 있었다. 반면 다른 3종의 경우 모든 성분들의 Rs 값이 1.5 이상의 값을 확인할 수 있었다. 그러므로 hypersil 컬럼과 luna 컬럼은 도라지 사포닌을 분석하기에는 부적합함을 확인할 수 있다.

Table 1-11. 분석 컬럼별 도라지 사포닌들의 분리능 비교

성분 명	분리능 (resolution USP)				
	hypersil gold	luna	eurobond	alltech grom-ST	optimapak
deapioplatycoside E	67.72	85.59	88.01	80.05	84.58
platycoside E	3.15	3.14	4.12	4.11	3.50
deapioplatycodin D ₃	16.26	14.59	15.84	17.92	18.47
platycodin D ₃	3.88	3.73	5.14	4.87	4.83
polygalacin D ₃	8.74	7.60	10.09	10.32	10.27
platycodin D ₂	0.25	17.00	25.80	30.18	26.41
platycodin D	0.25	1.28	2.10	1.51	1.75

The resolution of two peaks in terms of their average peak width at base
 $Rs = 2 * (tR2 - tR1) / (Wb1 + Wb2)$

Wb: tangent width (using tangent line inflection point)

(사) 시그널과 노이즈비(S/N ratio)

피크의 시그널 대 잡음 비(signal-to-noise ratio)는 각각의 컬럼과 검출기에 대한 검출한계(LOD)와 검량한계(LOQ)를 확인할 수 있는 수치이다. 즉 S/N ratio는 기준선 잡음 값과 피크의 높이 값의 비를 계산한 것으로, S/N ratio가 높다는 것은 피크의 높이가 높은 것을 의미 한다. 즉 검출하고자 하는 성분이 미량인 경우 S/N ratio가 크면 피크로 인식이 가능하고, 검량 가능한 농도의 경우 S/N ratio가 높으면

농도의 정밀성과 정확성을 높일 수 있다. 그러므로 S/N ratio의 값이 높을수록 좋은 결과를 얻을 수 있다.

Table 1-12. 분석 칼럼별 도라지 사포닌들의 시그널과 노이즈비

성분 명	S/N 비 (S/N Ratio)				
	hypersil gold	luna	eurobond	alltech grom-ST	optimapak
deapioplatycoside E	4388.90	5667.80	396.28	5433.57	6623.50
platycoside E	3196.37	4141.51	270.26	4037.81	5157.08
deapioplatycodin D ₃	683.90	768.40	64.53	890.06	1016.41
platycodin D ₃	192.57	2462.25	154.41	2350.09	2936.70
polygalacin D ₃	594.66	653.26	49.92	716.09	787.37
platycodin D ₂	592.29	715.99	266.71	2688.13	1052.29
platycodin D	502.46	599.10	288.06	2820.73	1636.77

S/N ratio = peak height/ average height of noise detection range

따라서 위의 컬럼들의 S/N ratio을 비교한 결과, deapioplatycoside D, platycoside E, deapioplatycodin D₃, platycodin D₃, polygalacin D₃에 대해서는 optimapak 컬럼이 다른 컬럼 보다 높은 값을 나타냄을 확인 하였고, platycodin D₂와 platycodin D는 alltech 컬럼이 높게 나왔다.

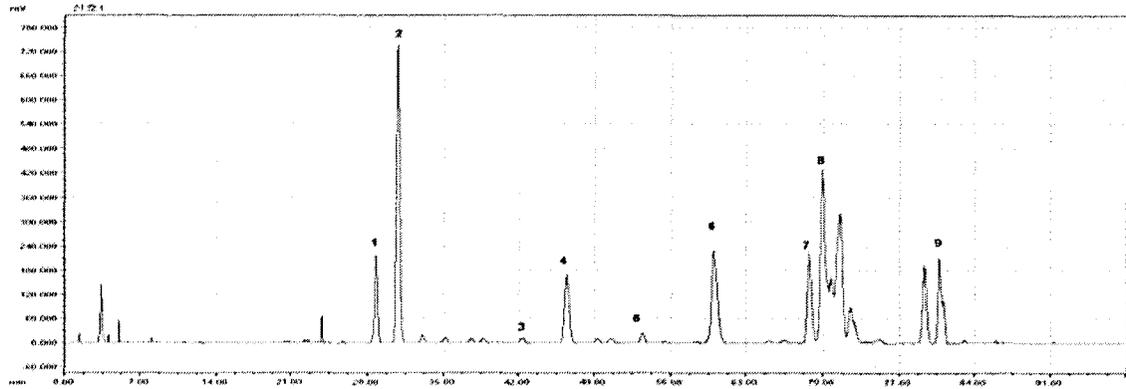
결론적으로 위의 여러 가지 컬럼에 대한 적합성들을 검토 하여본 결과 가장 적합한 컬럼으로는 optimapak 컬럼이 적합한 것으로 확인이 되었다. 그러나 platycodin D 영역의 peak들이 overlap 되어 있음을 확인 하였다.

라. 도라지 사포닌 분석의 최적화

상기의 실험결과 optimapak 컬럼을 이용하는 조건으로 도라지 조 사포닌을 분석 하였을 때, 표준성분 상태에서는 문제가 없었으나, 조 사포닌 및 일반 추출물을 분석할 때에는 Fig. 1-11과 같이 7 (platycodin D₂), 8 (platycodin D) 및 그 이후의 성분들이 겹치는 현상이 나타나 도라지의 대표적인 지표 성분인 platycodin D를 정성 및 정량을 할 수 없는 분석방법이 되었다. 따라서 표준 품이 아닌 일반적인 추출물 상태, 혹은 제품 공정개발 시 정확한 함량을 확인하기에는 문제가 있음을 알 수 있

다. 그러므로 컬럼 및 분석 조건을 변경, 조절하여 최적화가 필요하게 되었다.

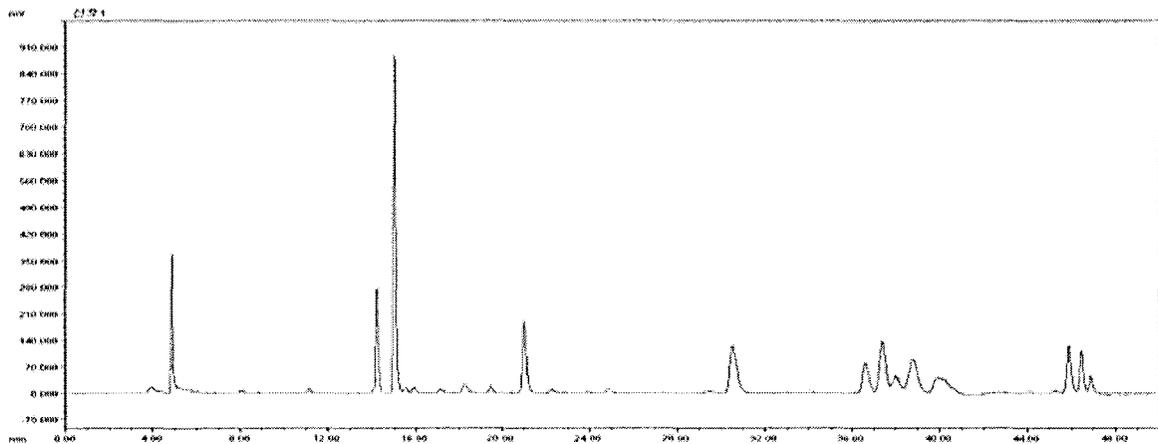
Fig. 1-11. optimapak 컬럼을 이용한 도라지 조 사포닌 분석 결과



가) 사전 조사

컬럼의 입자 크기를 기존의 $5\mu\text{m}$ 보다 작은 $3.5\mu\text{m}$ 로 하고 buffer 종류를 ammonium acetate에서 0.1% formic acid로 처리한 결과 Fig. 1-12에서와 같이 모든 성분들의 retention time이 빨라지는 것을 확인 하였다. 그리고 8번 이후의 성분들의 크로마토그램 피크의 모양도 기존의 peak모양과 달리, 대칭성이 좋아진 것을 확인 하였다. 따라서 도라지 사포닌의 분석에 있어서 buffer의 역할이 중요함을 확인하였다. 보다 구체적으로 도라지 조 사포닌의 pH를 확인 하였을 때 pH 4.81로 나타났으며, 이를 기초로 도라지 사포닌들은 약한 산성의 성격을 가지고 있음을 알 수 있다.

Fig. 1-12. 컬럼의 입자 $3.5\mu\text{m}$ 를 사용한 조 사포닌 분석 결과



약 산성 혹은 약 알칼리성의 성질을 가지는 화합물들이 HPLC 분석에서 buffer의 역할이 매우 중요하다는 사실은 1977년 Horvath, etl., 등(Anal. Chem. 1977,40,142-154)이 monopotic acid의 경우 머무름 정도를 나타내는 capacity factor의 값이 pH에 영향을 받는 것을 실험적인 결과로 제시하였다. 그 외에도 많은 문헌들이 약 산성, 혹은 약 알칼리성의 특징을 가지는 유기화합물들에 대한 액체 크로마토그래피 상에서의 pH 영향을 말하고 있다. 그러므로 도라지의 사포닌을 개별적으로 분석할 수 있는 최적의 조건을 확립하기 위하여 buffer를 이용하여 pH 값을 최적화하여, 각각의 개별 사포닌으로 분석하기 위한 분석방법을 최적화 하기로 하였다.

나) 실험 방법

분석조건을 최적화하기 위하여 Table 1-13과 같이 먼저 용매와 buffer 종류에 따라 pH 변화를 측정하였다. 용매 조성은 A용매는 buffer: acetonitrile: methanol의 조성으로 75:20:5의 부피비로 하여 준비하였고, B용매는 A용매와 동일한 조성에 부피 비만 72:23:5로 조정하여 기울기 용리법으로 분석하였다. 분석 장비는 초기 조건을 잡은 NS-3000i와 ELSD검출기를 사용하였다. 또한 buffer 농도에 따른 주요 사포닌의 머무름 시간의 변화를 확인하기 위하여 Table 1-14와 같이 ammonium acetate 농도에 따라 용매를 만들었다. A용매, B용매의 조성은 Table 1-13의 용매 조성과 동일하다.

Table 1-13. 산의 종류와 농도에 따른 buffer용액의 pH변화

Buffer type	pH	Eluent A ^a pH	Eluent B ^b pH
0.1% F.A ^c	2.82	3.12	3.16
50 mM A.A ^d +0.2%F.A	4.41	4.9	4.98
50 mM A.A+0.1%F.A	4.92	5.55	5.59
50 mM A.A	6.96	7.25	7.28
50 mM A.A+0.1%TEA ^e	8.71	8.62	8.6

Eluent,buffer:methanol:acetonitrile= ^a,75:5:20,v/v/v% and ^b,72:5:23,v/v/v%

^c,formicacid; ^d,ammoniumacetate; ^e,triethylamine.

Table 1-14. Buffer용액의 농도에 따른 pH변화

Buffer type	pH	Eluent A ^a pH	Eluent B ^b pH
10 mM A.A ^c +0.05%F.A ^d	4.41	4.76	4.93
25 mM A.A + 0.05% F.A	4.94	5.5	5.61
30 mM A.A+0.05%F.A	5.03	5.55	5.73

Eluent, buffer:methanol:acetonitrile= ^a,75:5:20v/v/v% and ^b,72:5:23v/v/v%
^c,ammonium acetate; ^d,formicacid;

다) 결과 및 고찰

(1) pH에 따른 변화

최적화된 기울기용리 방법을 이용하여 도라지 조 사포닌을 pH의 변화에 따라 분석 하여본 결과 Fig. 1-13과 같은 크로마토그램을 얻게 되었다.

Fig. 1-13. pH 변화에 따른 도라지 조 사포닌의 HPLC 분석 결과

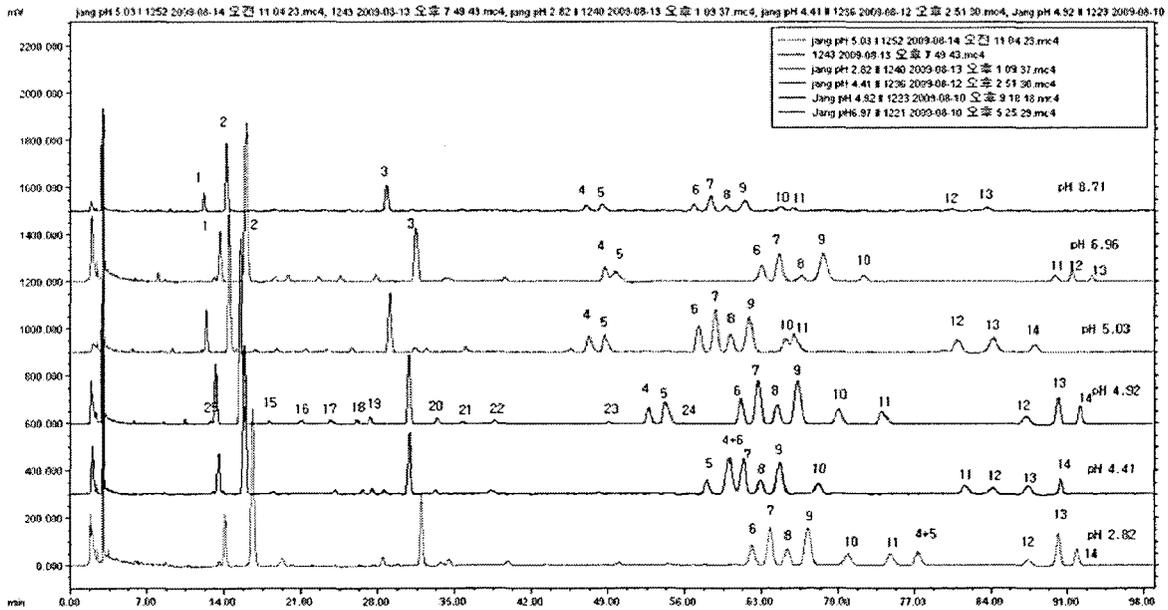


Fig. 1-13의 결과를 보면 도라지 조 사포닌의 수용액 pH 4.81과 비슷한 pH 4.92를 기준으로 pH 변화에 따라 성분들의 움직임을 비교하여 보면 도라지 사포닌

성분들이 pH에 어떻게 영향을 받는지 확인 할 수 있다. pH 4.92에서는 농도 차이에 의한 결과 일수는 있지만 총 24개의 성분을 확인 하였다.

pH에 따른 움직임을 확인하기 위하여 본 실험실에서 분리한 주요 11개 화합물을 이용하여 각각의 성분 에 대한 머무름 시간을 확인하여, 아래의 표에 기술하였다.

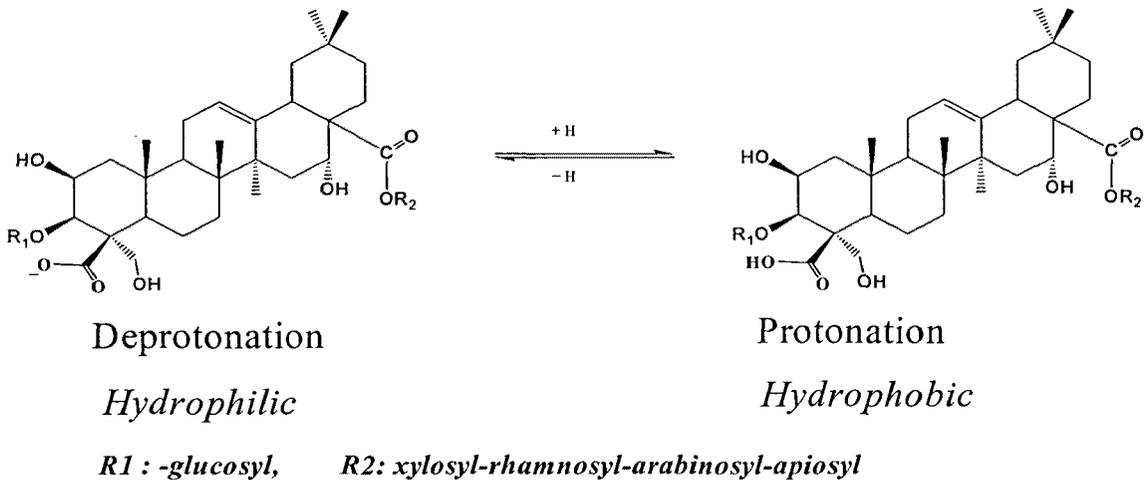
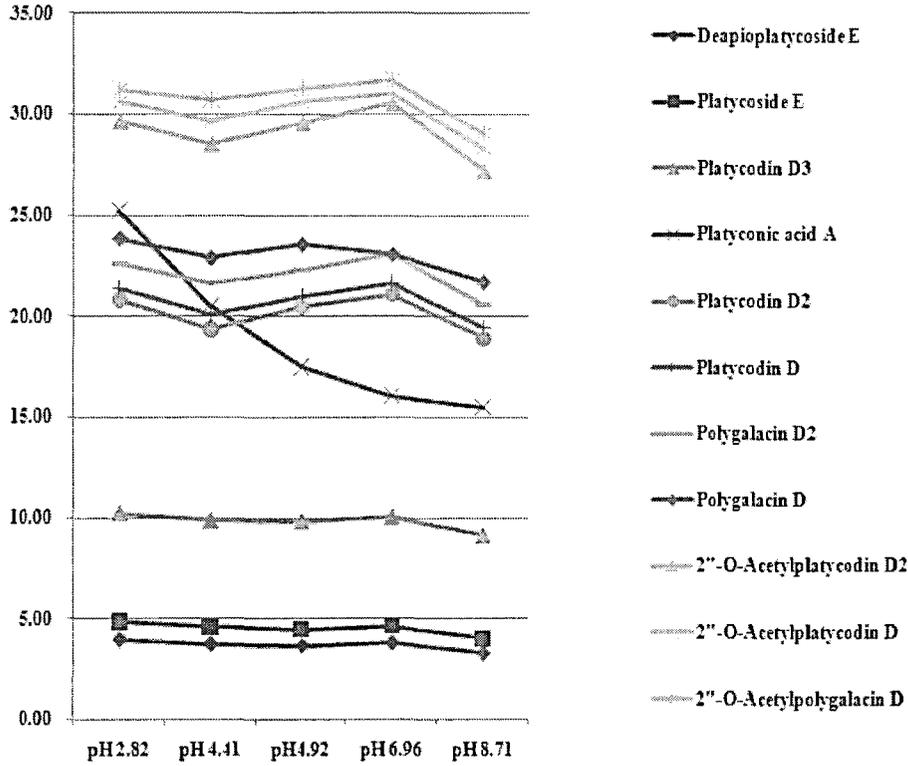
Table 1-15. pH변화에 따른 주요 사포닌들의 retention time의 변화

Components Capacity factor k'	pH 2.82	pH 4.41	pH4.92	pH5.03	pH 6.96	pH 8.71
platycoside E	4.85	4.58	4.47	4.10	4.63	4.02
platycodin D ₃	10.23	9.86	9.84	9.23	10.05	9.14
platyconic acid A	25.25	20.54	17.50	15.60	16.09	15.51
platycodin D ₂	20.84	19.37	18.05	16.12	16.45	16.02
platycodin D	21.40	20.11	20.48	19.13	21.10	18.95
polygalacin D ₂	22.60	21.69	21.02	19.65	21.69	19.48
polygalacin D	23.88	22.92	21.63	20.16	22.37	20.01
platycodin V	29.67	28.55	22.27	20.73	23.09	20.61
platycodin A	30.64	29.67	23.59	21.88	23.09	21.72

위와 같이 11개의 성분을 중심으로 각각의 성분 에 대한 k'(capacity factor)값을 확인 하여 본 결과 매우 흥미로운 사실들을 발견 할 수 있었다. Fig. 1-14에서 보는 바와 같이 각각의 성분들이 일정한 형태의 규칙을 가지고 움직이고 있음을 알 수 있었다. 특히 aglycon의 형태에 따라 pH에 영향을 크게 받는 것을 확인하였다. platycodigenin을 가지고 있는 platycoside E, platycodin D₃, platycodin D들은 polygalacic acid를 aglycon으로 가지고 있는 화합물들 보다 k' 값이 상대적으로 적은 것을 확인하였다. 새로운 aglycon 인 platycodigenic acid를 가지고 있는 platyconic acid A는 pH에 따라 k'값이 매우 크게 변하는 것을 확인 할 수 있었다. Fig 1-14 아래 그림은 platyconic acid A가 pH에 영향을 받는 이유에 대한 개념을 그림으로 표현한 것으로 monoprotic acid type의 carboxylic acid 작용기를 가지고 있으므로 pH에 따른 물성의 변화로 인하여 pH가 낮은 경우 k'값이 증가하다, pH가 높아지면 k'값이 감소하는 pH값에 대한 k'값이 반비례하는 곡선을 그리는 것을 확

인 하였다.

Fig. 1-14. pH변화에 따른 주요 사포닌들의 retention time의 변화



각각의 pH에 따른 사포닌들의 움직임의 살펴보면, 산성인 pH 2.82에서는 사포닌들의 k'값이 전반적으로 증가하는 현상이 나타났으며, 특히 platyconic acid A는 급

격히 증가함을 알 수 있다. 약산성인 pH 4.41에서는 사포닌의 k'값이 전반적으로 감소하였다. 이런 감소 현상은 platyonic acid A에도 나타났으며, 이로 인하여 platyonic acid와 platycodin D가 서로 overlap됨을 확인 할 수 있다. 도라지 사포닌의 pH와 유사한 pH 4.92에서는 전반적으로 사포닌의 k'값이 pH 4.41보다는 증가하는 현상을 발견하였다. 하지만 platyonic acid A는 감소하였다. 전체적인 $\Delta k'$ 값들을 비교하여 본 결과 overlap되는 peak들이 거의 없음을 확인 하였다. 중성인 pH6.96은 전반적으로 k'값이 증가하였으나, platyonic acid A와 polygalacin D는 감소하였다. 특히 polygalacin D는 polygalacin D₂와 overlap됨을 확인하였다. 염기성인 pH 8.71에서는 전반적인 사포닌의 k'값이 급격히 감소함을 확인하였다. 이런 결과를 통하여 확인할 수 있었던 것은 사포닌의 pH와 유사한 4.81~4.92의 영역에서 가장 좋은 분리가 이루어짐을 추측 할 수 있다.

(2) Ammonium acetate농도에 따른 변화

앞의 실험 방법에서 ammonium acetate의 농도에 따른 변화에 대한 값들을 확인 하였다.

Fig. 1-15. Ammonium acetate농도 변화에 따른 조 사포닌의 HPLC 분석결과

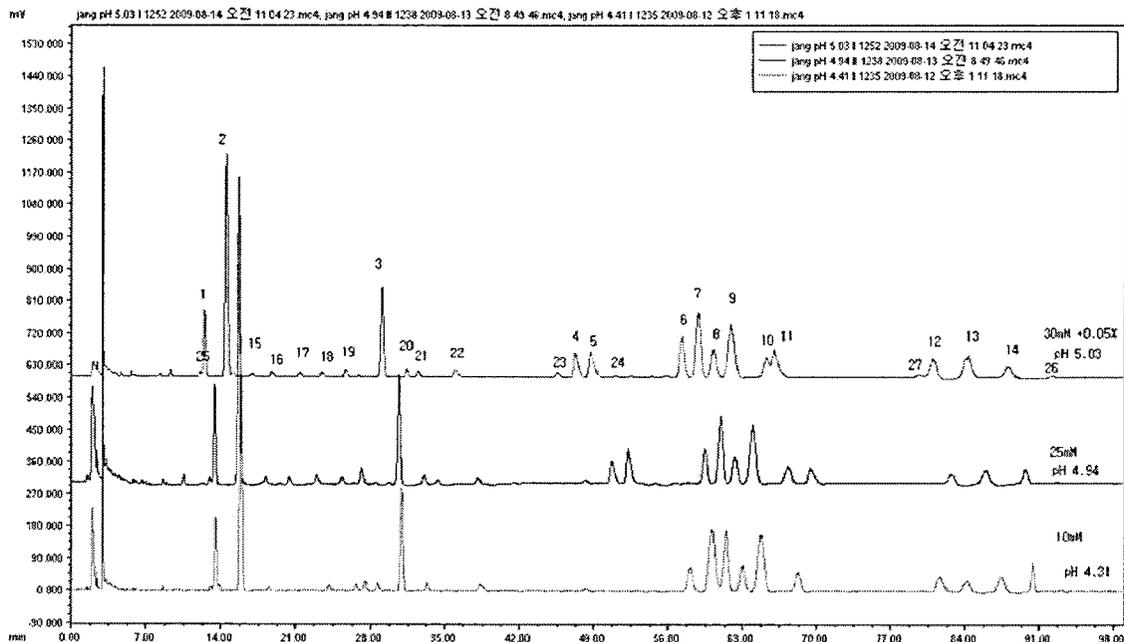


Fig. 1-15와 같이 ammonium acetate의 농도에 따른 값들을 확인하여 본 결과 ammonium acetate의 농도에 따라 pH 값도 함께 변화함을 확인하였다. 즉 0.05% formic acid로 농도를 일정하게 하고 ammonium acetate의 농도를 조절하면 10mM 일때 4.31, 25mM : 4.94, 30mM : 5.03의 값을 얻었다. 그리고 이들을 이용하여 조사포닌과 표준 사포닌을 확인하여 본 결과 위의 그림과 같은 크로마토그램을 확보하였다. 25mM의 경우는 pH값이 50mM ammonium acetate+0.1%formic acid의 pH 값과 비슷하였고 분석 결과도 유사하게 나타났다. 각각의 농도에 따른 표준 사포닌의 k'값을 Table 1-16과 같이 정리하였다.

Table 1-16. ammonium acetate 농도변화에 따른 사포닌들의 머무름 시간 이동현황

Components	10mM	25mM	30mM	Components	10mM	25mM	30mM
Capacityfactor(k')	(pH4.31)	(pH4.94)	(pH5.03)	Capacityfactor(k')	(pH4.31)	(pH4.94)	(pH5.03)
platycoside E	4.579	4.514	4.099	polygalacin D ₂	21.725	21.456	20.731
platycodin D ₃	9.871	9.766	9.228	polygalacin D	22.971	22.631	21.883
platyconic acid A	19.409	16.807	15.602	platycodin V	28.555	28.017	27.397
platycodin D ₂	20.105	19.877	19.128	platycodin A	29.678	29.198	28.579
platycodin D	20.573	20.386	19.655				

Fig. 1-16. ammonium acetate농도 변화에 따른 사포닌들의 머무름 시간 이동현황

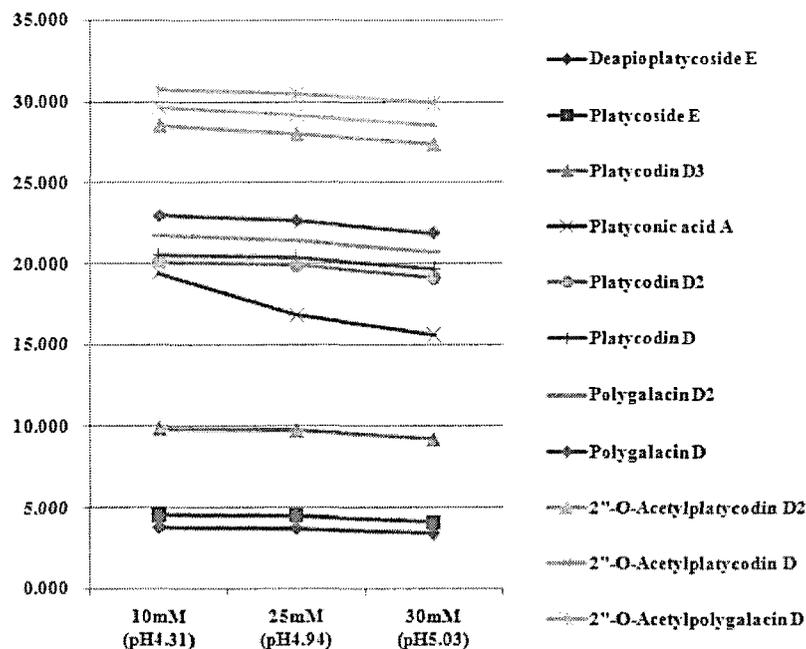
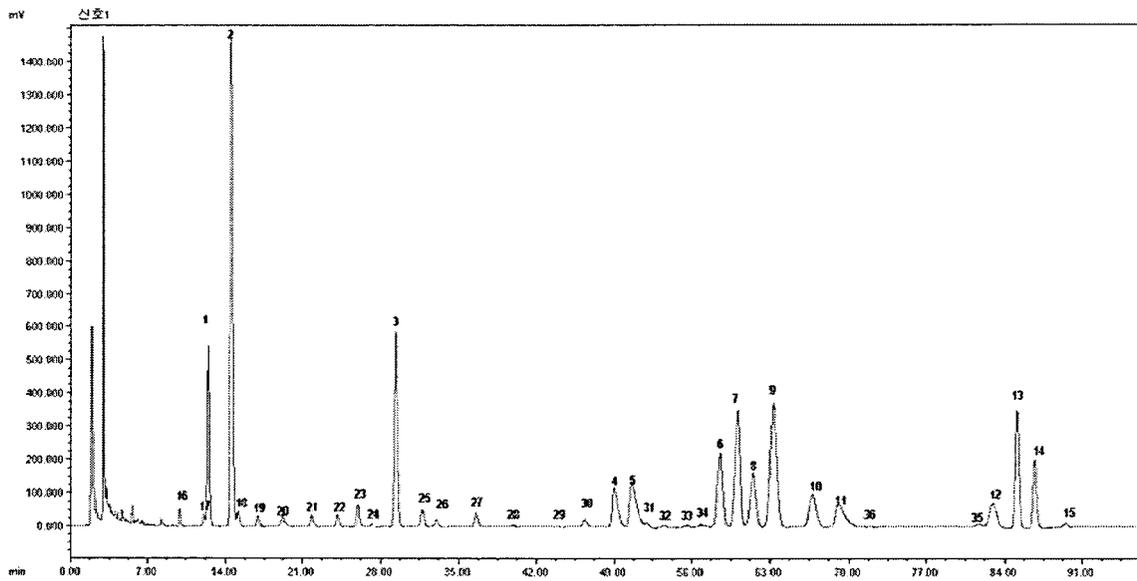


Table 1-16을 그림(Fig. 1-16)으로 표현 하였을 때 ammonium acetate의 농도 증가에 따라서 주요 사포닌들의 k'값이 감소하는 현상이 나타남을 확인할 수 있었다. 특히 platyconic acid A의 경우는 ammonium acetate의 농도가 증가함에 따라서 k'값이 다른 사포닌들에 비하여 감소하는 폭이 증가하였다. 그러나 ammonium acetate의 농도가 30mM일때 대부분의 사포닌들은 $\Delta k'$ 값들의 편차가 크게 나타남을 확인 하였다. 하지만 ammonium acetate의 농도가 30mM일때 pH값이 5.03으로 중성에 가까워 성분확인이 안된 peak들이 서로 겹치게 되는 것이 확인 되었다. 따라서 앞에서 최적화한 pH 4.81을 유지하는 용매조건을 만들기 위하여 0.07% formic acid를 30mM ammonium acetate 수용액에 첨가하여 pH 4.81의 용매를 만들었다. 이 buffer 조건으로 도라지 조 사포닌을 분석 하여본 결과 Fig. 1-17의 크로마토그램을 확인 하였다.

Fig. 1-17. 표준분석 방법으로 분석한 도라지 조사포닌의 분석결과



위의 그림에서 확인 되어진것 처럼 사포닌으로 예상되는 peak 25개를 확인 하였다.

Table 1-17. 최적 분석 방법에 의한 HPLC 결과의 피크 해석 결과

No.	Name of Saponin	RT ^a	MW	Peak Type
1	platycoside E	15.30	1548	major
2	platycodin D ₃	31.03	1386	major
3	platyconic acid A	52.98	1238	major
4	platycodin D ₂	60.99	1386	major
5	platycodin D	62.39	1224	major
6	polygalacin D ₂	65.66	1370	major
7	polygalacin D	69.09	1208	major
8	2''-o-acetylplatycodin D ₂	85.76	1428	major
9	2''-o-acetylplatycodin D	87.46	1266	major
10	deapioplatycoside E	13.10	1416	major
11	unknown	54.84	1280	major
12	3''-o-acetylplatycodin D ₂	63.96	1428	major
13	3''-o-acetylplatycodin D	73.91	1266	major
14	2''-o-acetylpolygalacin D ₂	89.16	1412	major
15	β -gentiobiosyl platycodigenin	10.68	828	miner
16	unknown	12.65	-	miner
17	unknown	17.83	-	miner
18	unknown	20.71	1238	miner
19	unknown	23.50	1280	miner
20	deapioplatyconic acid B lactone(new)	26.16	1250	miner
21	deapioplatycodin D ₃	27.38	1254	miner
22	platyconic acid B lactone (new)	28.68	1382	miner
23	3''-o-acetylplatycodin D ₃	33.41	1428	miner
24	deapio-3''-o-acetylpolygalacin D ₃	35.28	1296	miner
25	polygalacin D ₃	38.38	1370	miner

마. LC/MS/MS를 이용한 도라지 사포닌의 분석

1) 실험 방법

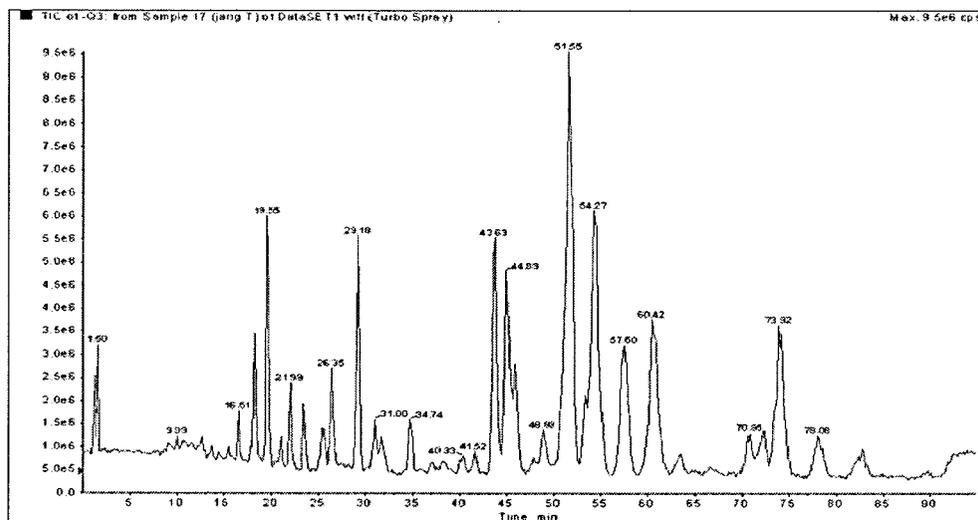
ESI/MS/MS 는 API 3200 Q-trap (ABI. USA)을 이용하였으며, 분석 방법은 제조사에서 설정한 조건을 사용하였다. Ion spray voltage는 positive 에서는 4.5kV 그리고 negative에서는 -4.5kV를 이용하였고, 질소 gas는 60psi를 유지하도록 하였으며, 이온화된 시료의 온도는 상온에서 이온화 되어 Mass로 유입되도록 하였다. LC/MS/MS 조건은 위에서 최적화한 HPLC조건을 이용하여 동일 컬럼과 동일 용매로 확인 하였다.

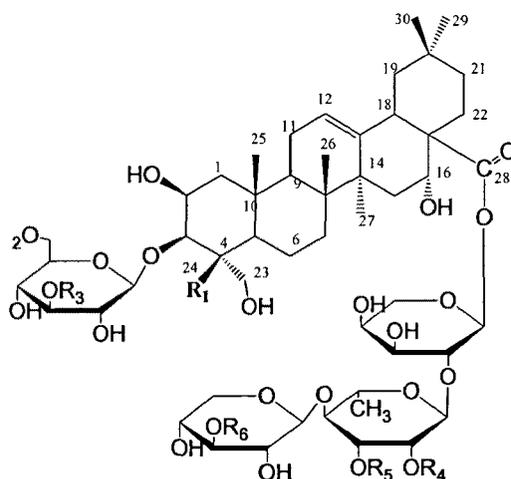
2) 결과

최적화한 도라지 표준 분석법을 이용하여 LC/MS/MS로 total mass ion 크로마토그래피를 얻고 이로부터 29개의 사포닌 peak을 확인 하였다.

위의 total mass ion 크로마토그래피를 통하여 각각의 사포닌을 동정한 결과 이미 분리 정제되어 알려진 사포닌은 25개 이었고 미지의 사포닌은 5개 이상 존재하는 것으로 나타났다. 이미 알려져 있는 물질들을 아래 표와 같이 정리 하였으며 이것을 기초로 위의 도라지 분석법에 의해 확인 된 자료와 비교 분석하여 최종확인 하였다.

Fig. 1-18. 도라지 조사포닌의 LC/MS/MS 분석 결과





No	Compounds	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	M.W.
1	deapioplatycoside E	CH ₂ OH	Glc-Glc	H	H	H	H	1416
2	platycoside E	CH ₂ OH	Glc-Glc	H	H	H	Api	1548
3	deapioplatycodin D ₃	CH ₂ OH	Glc	H	H	H	H	1254
4	platycodin D ₃	CH ₂ OH	Glc	H	H	H	Api	1386
5	platyconic acid A	OOH	H	H	H	H	Api	1238
6	deapioplatycodin D	CH ₂ OH	H	H	H	H	H	1092
7	platycodin D ₂	CH ₂ OH	H	Glc	H	H	Api	1386
8	platycodin D	CH ₂ OH	H	H	H	H	Api	1224
9	2''-o-acetylplatycodin D (platycodin A)	CH ₂ OH	H	H	Acetyl	H	Api	1266
10	3''-o-acetylplatycodin (platycodin C)	CH ₂ OH	H	H	H	Acetyl	Api	1266
11	2''-o-acetylplatycodin D ₃	CH ₂ OH	Glc	H	Acetyl	H	Api	1428
12	3''-o-acetylplatycodin D ₃	CH ₂ OH	Glc	H	H	Acetyl	Api	1428
13	2''-o-acetylplatycodin D ₂ (platycodin V)	CH ₂ OH	H	Glc	Acetyl	H	Api	1428
14	3''-o-acetylplatycodin D ₂ (platycodin VI)	CH ₂ OH	H	Glc	H	Acetyl	Api	1428
15	polygalacin D	CH ₃	H	H	H	H	Api	1208
16	2''-o-acetylpolygalacin D (polygalacin VIII)	CH ₃	H	H	Acetyl	H	Api	1250
17	3''-o-acetylpolygalacin D (polygalacin IX)	CH ₃	H	H	H	Acetyl	Api	1250
18	polygalacin D ₃	CH ₃	Glc	H	H	H	Api	1370
19	2''-o-acetylpolygalacin D ₃	CH ₃	Glc	H	Acetyl	H	Api	1412
20	3''-o-acetylpolygalacin D ₃	CH ₃	Glc	H	H	Acetyl	Api	1412
21	deapi-2''-o-acetylpolygala cin D ₃	CH ₃	Glc	H	Acetyl	H	H	1296
22	polygalacin D ₂	CH ₃	H	Glc	H	H	Api	1370
23	2''-o-acetylpolygalacin D ₂ (polygalacin XI)	CH ₃	H	Glc	Acetyl	H	Api	1412
24	3''-o-acetylpolygalacin D ₂ (polygalacin XII)	CH ₃	H	Glc	H	Acetyl	Api	1412
25	deapi-2''-o-acetylpolygala cin D ₂	CH ₃	Glc	H	Acetyl	H	H	1296

바. 지역별 도라지의 성분 분석

대한민국의 전 지역을 대상으로 하는 대표적 도라지산지의 도라지를 수집하여 각각의 지역에 대한 도라지들의 주요 사포닌 함량을 확인 하였다. 도라지는 지역 농촌 기술센터에서 소개하여 준 작목반을 중심으로 하여 직접 구매하였으며, 이 때 구매된 생도라지는 지역별로 20kg씩 27개 지역이었다.

분석방법은 상기에서 확립한 도라지 사포닌의 표준 분석 방법을 이용하였다. 그 결과를 Table 1-18 및 Table 1-19.에 정리 하였다.

Table 1-18. 5~6월 생산된 도라지추출물의 사포닌 함량 분석 결과(I)

성분명	금산	금산-중국 ^b	김해	논산	무안	무안-산 ^c	무안-백 ^d	무주
1 deapioplatycoside E	530.28	309.57	279.16	183.53	569.13	371.98	290.52	239.99
2 platycoside E	1634.81	2092.3	1222.97	871.33	2484.38	1738.56	2086.94	849.76
3 platycodin D ₃	155.01	276.31	181.69	54.17	217.86	286.2	303.73	72.44
4 platyconic acid A	N.D. ^f	9.62	1.28	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
5 미지성분-1	483.02	823.03	423.26	441.32	783.16	914.86	704.63	462.8
6 platycodin D ₂	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
7 platycodin D	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
8 미지성분-2	266.39	643.64	244.06	206.37	481.97	547.88	582.65	238.71
9 polygalacin D ₂ + 3"-o-acetylplatycodin D	384.42	1014.27	367.82	373.83	805.21	710.28	678.77	420.03
10 polygalacin D	149.09	274.55	218.4	166.63	309.99	262.5	368.56	85.29
11 3"-o-acetylpolygalacin D	229.19	495.29	260.34	240.38	536.48	531.41	437.36	249.48
12 미지성분-3	19.96	213.77	33.85	N.D.	135.53	158.54	190.13	18.99
13 2"-o-acetylplatycodin D	250.77	910.46	268.7	279.44	589.47	510.86	462.11	317.74
14 미지성분-4	77.72	208.15	159.92	142.8	225.64	210.34	233.82	93.69
total	4180.67	7270.95	3661.44	2959.81	7138.8	6243.4	6339.22	3048.93
total 조사포닌 mg/g	4.18	7.27	3.66	2.96	7.14	6.24	6.34	3.05
total 조사포닌 %	0.42%	0.73%	0.37%	0.30%	0.71%	0.62%	0.63%	0.30%

Table 1-18. 5~6월 생산된 도라지추출물의 사포닌 함량 분석 결과(II)

성분명	보은	사천	여수	이천	제주-청 ^c	제주-백 ^d	횡성
1 deapioplatycoside E	90.27	274.45	795.81	293.51	381.36	365.57	88.78
2 platycoside E	610.8	2250.77	2728.12	1710.61	2596.86	2184.04	659.4
3 platycodin D ₃	23.97	136	546.33	110.55	359.2	264.76	87.99
4 platyconic acid A	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	78.88	N.D.	N.D.
5 미지성분-1	152.92	315.65	956.72	499.03	1107.3	845.87	377.38
6 platycodin D ₂	N.D.	N.D.	N.D.	1.15	70.31	N.D.	N.D.
7 platycodin D	N.D.	N.D.	7.73	11.9	262.46	22.55	N.D.
8 미지성분-2	66.77	319.17	587.62	375.55	754.42	341.87	61.17
9 polygalacin D ₂ + 3"-o-acetylplatycodin D	146.66	472.81	989.98	1085.4	2463.74	975.21	470.79
10 polygalacin D	27.78	193.1	390.12	207.67	573.17	339.27	50.91
11 3"-o-acetylpolygalacin D	52.44	194.47	534.93	319.62	779.57	556.28	209.95
12 미지성분-3	N.D.	97.99	191.75	83.79	250.23	49.62	N.D.
13 2"-o-acetylplatycodin D	127.66	340.81	639.18	742.91	1674.18	662.15	370.68
14 미지성분-4	22.09	159.57	305.43	138.25	447.59	297.27	99.92
total	1321.36	4754.79	8673.72	5579.94	11799.27	6904.47	2476.99
total 조사포닌 mg/g	1.32	4.75	8.67	5.58	11.8	6.9	2.48
total 조사포닌 %	0.13%	0.48%	0.87%	0.56%	1.18%	0.69%	0.25%

Table 1-19. 2~3월 생산된 도라지추출물의 사포닌 함량 분석 결과(I)

성분명	전남 함평	전남 강진	전남 순천	경기 강화	경기 이천	전북 순창	전남 함평	전남 강진	전남 순천	경기 강화	경기 이천
1 deapioplatycoside E	354	173	564	477	231	611	354	173	564	477	231
2 platycoside E	3349	661	2338	2321	1828	5532	3349	661	2338	2321	1828
3 platycodin D ₃	330	131	151	377	148	268	330	131	151	377	148
4 platyconic acid A	6	129	5	7	87	13	6	129	5	7	87
5 미지성분-1	410	562	887	1710	1575	1771	410	562	887	1710	1575
6 platycodin D ₂	6	N.D	N.D	N.D	20	46	6	N.D	N.D	N.D	20
7 platycodin D	20	635	49	201	593	111	20	635	49	201	593
8 미지성분-2	488	381	826	1409	1630	1730	488	381	826	1409	1630
9 polygalacin D ₂ + 3"-o-acetylplatycodin D	538	634	1279	2944	3244	2862	538	634	1279	2944	3244
10 polygalacin D	306	633	736	1240	959	1703	306	633	736	1240	959
11 3"-o-acetylpolygalacin D	186	338	532	1038	879	1044	186	338	532	1038	879
12 미지성분-3	119	71	273	445	545	560	119	71	273	445	545
13 2"-o-acetylplatycodin D	139	147	407	1015	1179	1023	139	147	407	1015	1179
14 미지성분-4	N.D	65	168	243	264	362	N.D	65	168	243	264
total	6251	4560	8215	13427	13182	17636	6251	4560	8215	13427	13182
total 조사포닌 mg/g	6.25	4.56	8.22	13.43	13.18	17.64	6.25	4.56	8.22	13.43	13.18
total 조사포닌 %	0.63	0.46	0.82	1.34	1.32	1.76	0.63	0.46	0.82	1.34	1.32

Table 1-19. 2~3월 생산된 도라지추출물의 사포닌 함량 분석 결과(II)

성분명	전북 순창	전북 고창	전북 진안	충북 영동	충북 청원	경북 구미	경북 영천	경북 영양	경북 울진	경북 예천	경북 선산
1 deapioplatycoside E	611	251	207	271	206	241	266	736	878	262	338
2 platycoside E	5532	1231	1428	1510	1895	2033	1214	2366	3519	1800	1697
3 platycodin D ₃	268	237	356	131	109	233	151	282	648	304	284
4 platyconic acid A	13	137	245	69	0	16	172	119	227	74	82
5 미지성분-1	1771	1245	1769	1443	602	651	1258	1294	2077	1301	1226
6 platycodin D ₂	46	15	71	N.D	N.D	N.D	40	N.D	101	N.D	N.D
7 platycodin D	111	571	954	313	24	177	879	670	1976	449	622
8 미지성분-2	1730	894	1305	939	411	507	976	973	2364	755	749
9 polygalacin D ₂ + 3"-o-acetylplatycodin D	2862	1325	2511	1717	687	707	1659	2876	5448	1976	2199
10 polygalacin D	1703	902	1288	1204	393	320	1085	1119	1545	629	640
11 3"-o-acetylpolygalacin D	1044	632	1074	883	280	262	724	847	1065	766	645
12 미지성분-3	560	258	366	297	80	111	253	271	678	208	150
13 2"-o-acetylplatycodin D	1023	336	736	538	194	176	466	910	1703	685	676
14 미지성분-4	362	152	259	274	N.D	N.D	187	163	239	N.D	N.D
total	17636	8186	12569	9589	4881	5434	9330	12626	22468	9209	9308
total 조사포닌 mg/g	17.64	8.19	12.57	9.59	4.88	5.43	9.33	12.63	22.47	9.21	9.31
total 조사포닌 %	1.76	0.82	1.26	0.96	0.49	0.54	0.93	1.26	2.25	0.92	0.93

Table 1-19. 2~3월 생산된 도라지추출물의 사포닌 함량 분석 결과(II)

성분명	경남 밀양	경남 합천	경남 함양	충남 논산	충남 홍성	강원 홍천	강원 양구	강원 삼척	강원 정선	제주
1 deapioplatycoside E	93	186	105	449	24	14	450	382	315	476
2 platycoside E	662	1774	859	2676	1463	968	1719	2533	2032	2095
3 platycodin D ₃	162	150	137	261	210	123	268	201	111	169
4 platyconic acid A	143	11	48	231	78	89	97	37	N.D	22
5 미지성분-1	1038	1413	586	1661	833	507	1097	881	650	1141
6 platycodin D ₂	37	N.D	N.D	46	4	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
7 platycodin D	931	13	575	784	731	526	503	19	46	214
8 미지성분-2	873	944	477	1248	725	342	653	564	367	1141
9 polygalacin D ₂ + 3"-o-acetylplatycodin D	1633	1443	750	2010	1222	645	1352	1096	848	1466
10 polygalacin D	1024	983	469	1084	549	320	892	541	554	693
11 3"-o-acetylpolygalacin D	634	800	292	1034	400	231	681	430	33	562
12 미지성분-3	227	311	34	374	158	111	119	163	74	305
13 2"-o-acetylplatycodin D	459	481	121	631	327	N.D	393	262	220	416
14 미지성분-4	158	184	5	216	31	N.D	56	9	18	67
total	8074	8693	4458	12705	6755	3876	8280	7118	5268	8767
total 조사포닌 mg/g	8.07	8.69	4.46	12.71	6.76	3.88	8.28	7.12	5.27	8.77
total 조사포닌 %	0.81	0.87	0.45	1.27	0.68	0.39	0.83	0.71	0.53	0.88

위의 결과를 살펴 보면, 지역간 도라지추출물의 사포닌 함량에 차이가 많이 나는 것을 확인 하였다. 이는 아마도 온도, 토양등의 재배 환경과 품종에 대한 영향등이 있는 것으로 향후 도라지 표준화를 위한 자료로서 이용할 수 있을 것으로 사료된다. 특히 도라지 채취시기의 적기인 2~3월에 채취한 도라지들의 주요 사포닌 함량을 아래의 그림과 같은 표를 작성하였다. 표와 같이 대부분의 지역에서는 주요 사포닌들의 함량이 평균적으로 약 1~1.5% 사이에서 나타나고 있음을 알 수 있었다. 그러나 경북울진(2.5%), 전북진안(1.9%)과 충남논산(1.38%)에서 재배된 도라지들의 사포닌 함량은 다른 지역에 비하여 높게 나옴을 확인 하였다. 따라서 도라지 표준화를 위하여는 지역간 품질관리가 필요함을 확인하였다.

또한 채취시기에 따른 도라지사포닌의 함량 변화를 확인하기 위하여 2월과 4~5월에 채취한 도라지를 비교해 보면 4~5월 도라지는 platycodin D를 함유하지 않는 도라지들이 대부분 이었다. 그러므로 채취시기도 제품 표준화에서 매우 중요한 요소임을 알 수 있었다.

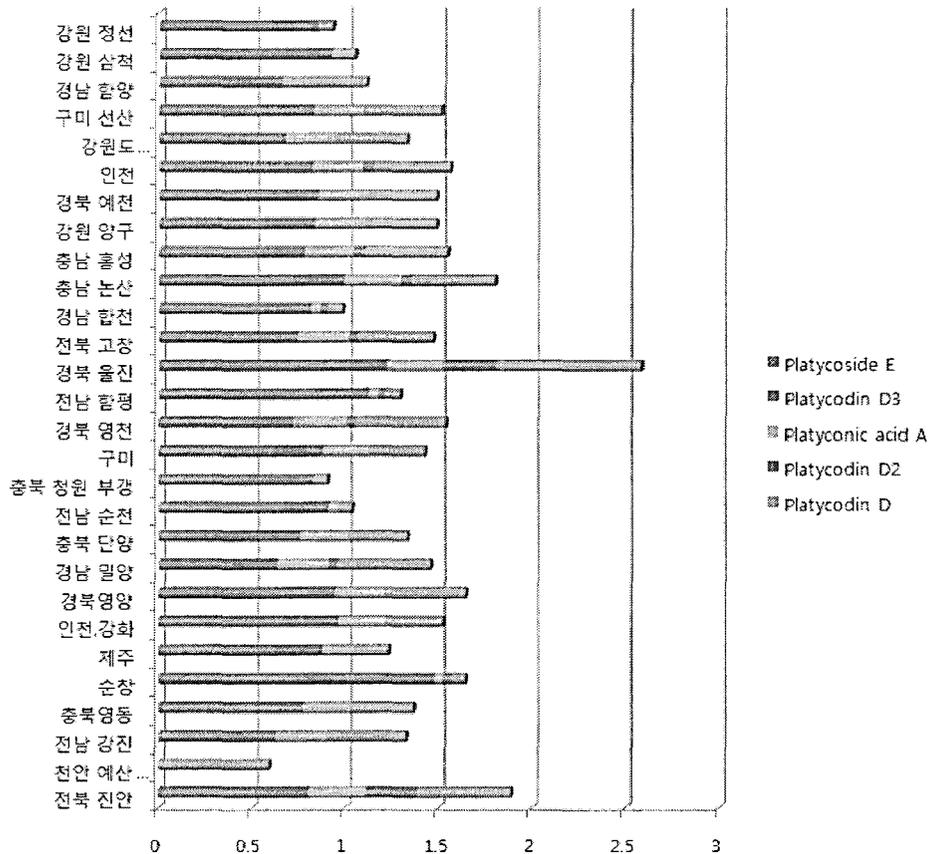


Fig. 1-18 지역별 도라지추출물의 주용 사포닌 함량 비교

제 2 절 도라지 추출물의 인지기능개선 및 뇌신경보호 효능

퇴행성 질환의 하나인 치매는 가벼운 기억력의 장애에서부터 전반적인 인지기능의 장애가 주된 증상을 가지고 있어 오늘날의 노령화 사회에서 노인의 건강수명을 단축시키고 삶의 질을 감소시키는 요인 중의 하나이다. 치매는 알츠하이머병(Alzheimer's disease : AD), 혈관성 치매(vascular dementia : VD), 중독성 치매로 구분되고 있으며, 이 중에서 알츠하이머병은 50% 이상의 많은 비율을 차지하고 있는 것으로 알려져 있다.^{19,20)} 알츠하이머는 염증, 사고에 의한 손상 및 신경절달물질 등의 많은 유발인자가 관여하는 것으로 알려져 있으며 알츠하이머의 대표적인 유발 기전은 amyloid precursor proteins(APP)의 과다생성으로 인해 amyloid β protein(A β)이 과량 생산되면서 침적으로 인해 노인반의 신경독성으로 말미암아 신경세포의 파괴가 일어난다는 가설이 제기되고 있다.²¹⁾ 또한 acetylcholine 등 신경전달 물질의 감소로 기억력을 감소시키며 이러한 인지장애는 acetylcholine을 생산하는 신경세포의 퇴화와 더불어 acetylcholinesterase(AChE)의 증가로 심화된다고 알려져 있다. 알츠하이머의 주된 증상인 기억력 감퇴현상은 choline성 신경계와 밀접한 관계가 있다는 증거가 제시되고 있어²²⁾ 현재 acetylcholine을 측정하여 알츠하이머 환자의 임상적 상태를 관찰하는 방법들이 연구되고 있다.^{23,24)}

도라지(Platycodon grandiflorus A.De Candolle)는 도라지로서 초롱꽃과에 속하는 다년생 초본의 뿌리로서 최근 식품 및 약리성 건강식품으로 대두되고 있어 소비량이 증가하면서 재배면적이 확대되고 있다. 도라지의 사포닌 성분으로 인한 독특한 쓴맛과 향은 식품으로서 뿐만 아니라 약리성도 뛰어나 일석이조의 효과를 얻을 수 있는 식품으로 알려져 있다.^{25,26)} 현대과학에서 보고된 도라지의 중요 약리효과는 triterpenoid계 사포닌으로서 항염증작용, 중추신경억제작용, 혈압강하작용, 용혈작용 등이 있는 것으로 보고되고 있다.^{27,28)} 또한, 사포닌을 신경화학물질의 하나로 간주함과 동시에 노화와 관련된 기억력 손실과 인지능력 및 항상성 유지능력 저하에 대한 억제효과가 있음이 제시되고 있다.²⁹⁾

치매는 발병하면 치료가 어려워 어떠한 질병보다 예방의 중요성이 강조되고 있다. 현재, 치매에 대한 치료 및 개선제의 개발에 대한 연구가 진행되고 있으나 노인성 치매의 예방에 대한 식품학적 연구가 미비한 실정이다. 따라서 본 실험에서는

scopolamine에 의한 일시적 기억력 감퇴 현상을 억제하는 도라지 추출물 및 saponin의 효과에 대해 조사하였다.

1. 에탄올로 유발된 인지기능저하 개선 효능 실험

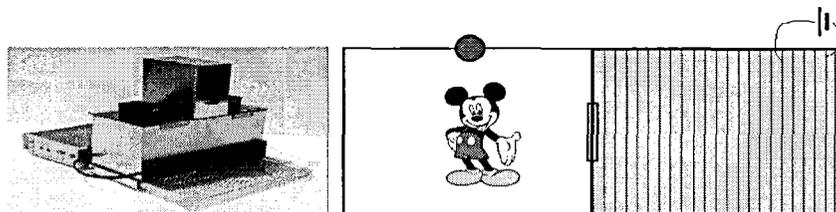
가. 실험방법

1) 실험동물 및 실험약제의 투여

실험동물은 ICR계의 체중 19 ± 1 g인 수컷의 생쥐를 대한바이오링크 (충북 음성)로부터 구입하였다. 실험동물은 타 동물과 격리하여 수용하였으며 12시간 명암주기(6 : 00부터 18 : 00사이는 밝게 18 : 00부터 익일 6 : 00까지는 어둡게 함)와 항온(24 ± 1 °C), 항습(55 ± 5 %) 조건 하에서 사료와 물을 자유롭게 공급하면서 3 - 4 일간 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 실험동물을 공시험(blank)군, 대조시험(control)군, 표준약물(standard)군, 도라지추출물 투여군(2군), 사포닌분획 투여군(2군), 비사포닌분획 투여군(1군) 등 8군으로 나누었으며 각 군은 10마리씩으로 하였다. 공시험 (blank)군, 대조시험 (control)군은 약물 대신에 증류수를 체중 g당 0.01 ml의 용량으로 투여하였다. 약물투여군은 도라지추출물 투여군의 경우 도라지추출물을 매회 20 mg/kg, 100 mg/kg 씩, 사포닌분획 투여군은 도라지사포닌 분획을 매회 2 mg/kg, 10 mg/kg 씩, 비사포닌분획 투여군은 도라지 비사포닌분획을 매회 500 mg/kg 씩 투여하였으며 표준약물(standard)군은 tacrine을 매회 10 mg/kg씩 투여하였다. 투여약제는 모두 증류수에 녹여 체중 g당 0.01 ml의 용량으로 1일 1회 4일간 경구 투여하였다.

2)수동회피실험 (step-through test)

인지기능 손상에 대한 개선 효능은 팩스-30 셔틀박스 시스템 (PACS-30, Columbus Co., OH, USA)을 사용한 수동회피실험을 통하여 평가하였다.



실험장치로 사용한 팩스-30 셔틀박스 시스템 (PACS-30, Columbus Co., OH,

USA)은 동일한 크기의 두 개의 방(15 x 15 x 22 cm)으로 구성되어 있으며, 방과 방 사이는 guillotine door (4 x 3.5 cm)가 설치된 칸막이로 차단되어 있다. 두 개의 방 중 한쪽의 방에는 강도 10 W의 조명을 비추어 밝게 하였으며 나머지 한쪽 방은 차광하여 어둡게 하였다. 어두운 쪽 방의 바닥에는 전기 쇼크를 줄 수 있는 grid를 설치하였다. 실험은 동일한 방법으로 learning trial(학습훈련)과 memory acquisition test (기억력 시험)를 24시간 간격으로 진행하였으며 이들 실험은 모두 오후 6시 이후 시간대에 수행하였다. 즉 생쥐를 1시간 동안 암실에서 순응시킨 후 실험장치의 밝은 쪽 방에 넣고 30 초가 경과한 뒤 guillotine door가 자동으로 열리도록 하였다. 생쥐가 반대쪽 어두운 방으로 옮겨가면 guillotine door가 자동으로 닫히면서 생쥐는 바닥으로부터 5 초간 0.6 mA의 전기쇼크를 받게 하였다 (학습훈련). 학습훈련 24시간 후 생쥐를 동일한 실험장치의 밝은 쪽 방에 넣고 반대편 방으로 옮겨가는데 걸리는 시간 (latency)을 측정하였다 (기억력 시험). 이때 5분이 경과한 경우에도 어두운 쪽 방으로 옮겨가지 않는 경우는 latency를 5분으로 하였으며 학습훈련 시 밝은 쪽 방에서 2분 이내에 반대편 방으로 옮겨가지 않는 생쥐는 실험에서 제외시켰다.

최종약물투여는 학습훈련 1시간 전에 종료하고 공시험 (blank)군을 제외한 모든 시험군의 생쥐에게는 학습훈련 30 분전에 3.0 g/kg 씩의 에탄올을 경구투여하였으며 공시험 (blank)군은 에탄올 대신 동량의 증류수를 경구 투여하였다.

3) 통계처리

실험결과는 평균값 ± 표준오차로 표시하였다. Student's t-test를 이용하여 유의 여부를 검정하였다.

나. 실험재료

경동시장에서 구입한 국산 도라지 600g을 MeOH에 6일간 냉침시킨 후 감압 농축하여 MeOH extract 150g을 얻었다 (도라지추출물). 이 MeOH extract를 1 L의 증류수에 현탁한 후 Diaion HP-20 column (Ø=5.0 x 100 cm)을 통과시키고 증류수 10 L로 세척하였으며 용출액과 세척액은 합하여 감압 농축하였다 (비사포닌분획, 130 g). 이후 Diaion HP-20 column을 5 L의 85 % MeOH로 거둬 용출시키고 용출액을 감압 농축하였다 (사포닌분획, 9 g). 또 column을 5 L의 MeOH로 세척하고

세척액을 감압농축하였다 (수득량 0.2 g). 이와 같은 방법으로 조제된 도라지추출물, 사포닌분획 및 비사포닌분획을 각각 증류수에 현탁하여 투여약제로 사용하였다.

다. 도라지추출물, 사포닌분획 및 단일 사포닌들의 인지기능 개선효능

학습훈련 (learning trial)과 기억력시험(memory acquisition test)을 통하여 생쥐가 밝은 쪽 방에서 어두운 쪽 방으로 옮겨가는데 걸리는 시간(latency)을 각 시험군별로 측정하였으며 학습 훈련 시에 비하여 기억력시험 시의 latency가 증가하는 정도를 지표로 하여 인지기능의 개선효과를 평가하였다(Fig. 1). 학습훈련 전 에탄올을 투여하지 않은 공시험(blank)군의 경우 실험동물들은 학습 훈련 시에는 모두 1분 이내의 latency를 보여주었으나 24시간이 경과한 후 실시한 기억력시험 시에는 모두 4 - 5 분대의 latency를 기록하고 있어 학습훈련을 통하여 습득한 전기쇼크의 경험을 24시간이 경과한 후에도 잘 기억하고 있음을 알 수 있었다. 반면 학습훈련 전 에탄올을 투여한 대조시험 (control)군의 경우에는 학습훈련 시에는 공시험군의 경우와 같이 모두 1분 이내의 latency를 보여 주고 있으나 기억력 시험 시에도 모두 1분 이내의 latency를 보이고 있어 학습훈련을 통한 전기쇼크의 기억을 24시간 이후에서는 모두 잊어버리고 있음을 알 수 있다. 이와 같은 연구결과는 실험동물로 사용한 생쥐들의 경우 에탄올의 경구투여로 인지기능(기억력) 손상이 잘 유도되고 있음을 시사하고 있다.

한편 도라지추출물 투여군의 경우에는 투여량(20 mg/kg, 100 mg/kg)에 상관없이 학습훈련 시에 비하여 기억력시험 시에 밝은쪽 방으로부터 어두운 쪽 방으로 옮겨가는데 걸리는 시간 (latency)이 150초 정도로 대조시험 (control)군의 경우에 비하여 약 3배 정도 증가하고 있어 에탄올 투여로 야기된 인지기능 손상이 상당부분 회복되고 있음을 알 수 있었다. 사포닌분획 투여군의 경우에는 학습훈련 시에 비하여 기억력시험 시의 latency가 약물투여량(2 mg/kg, 10 mg/kg)에 따라 투여용량 의존적으로 증가하였다. 특히 고용량(10 mg/kg)의 사포닌분획을 투여한 군의 경우에는 기억력 시험시 측정된 latency가 에탄올을 투여하지 않은 공시험군의 경우와 비슷한 수준 (74%)으로 증가하였으며 대조약물로 사용한 tacrine (Cognex)에 버금가는 우수한 인지기능 개선효능을 보여주었다. 반면 고용량의 비사포닌분획 (500 mg/kg)을 투여한 시험군의 경우에는 학습 훈련 시에 비하여 기억력시험 시의 latency가

거의 변동이 없어 인지기능 개선효능이 미미한 것으로 사료된다.

이와 같은 연구결과는 실험동물로 사용한 생쥐의 경우 도라지의 MeOH 추출물을 반복 경구투여하므로서 에탄올 투여로 유발된 인지기능 (기억력) 손상이 효과적으로 개선되고 있음을 시사하고 있으며 이러한 도라지추출물의 약리효능은 주로 추출물에 함유된 사포닌 성분들에 기인하고 있음을 암시하고 있다.

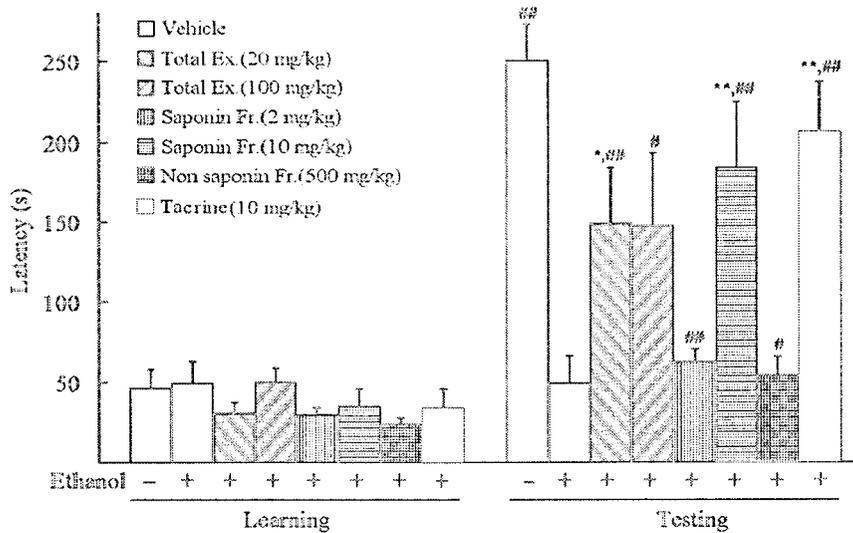


Fig 2-1. Effects of extracts and fractions from Platycodon root on cognitive performance in ethanol-treated mice. Values represent the mean \pm S.E.M. of nine to ten mice. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ when compared with the vehicle group with ethanol administration in testing. # $p < 0.05$ and ## $p < 0.01$ when compared with the respective learning latency.

한편 도라지추출물로부터 상법에 따라 분리 정제한 사포닌, platycoside E 및 platycodin D를 각각 투여한 후 별도의 시행한 수동회피실험 결과 도라지추출물 투여군의 경우에는 투여량(20 mg/kg, 100 mg/kg)에 상관없이 학습훈련 시에 비하여 기억력시험 시에 밝은쪽 방으로부터 어두운 쪽 방으로 옮겨가는데 걸리는 시간 (latency)이 150초 정도로 대조시험 (control)군의 경우에 비하여 약 3배 정도 증가하고 있어 에탄올 투여로 야기된 인지기능 손상이 상당부분 회복되고 있음을 알 수 있었다. platycoside E 및 platycodin D 투여군의 경우에는 학습훈련 시에 비하여 기억력시험 시의 latency가 약물투여량(2 mg/kg, 10 mg/kg)에 따라 투여용량 의존적으로 증가하였다. 특히 고용량(10 mg/kg)의 platycoside E을 투여한 군의 경우에는 기억력 시험시 측정된 latency가 에탄올을 투여하지 않은 공시험군의 경우와 비

슷한 수준 (74%)으로 증가하였으며 대조약물로 사용한 tacrine (Cognex)에 버금가는 우수한 인지기능 개선효능을 보여주었으며 결론적으로 도라지추출물의 에탄올 투여로 야기된 인지기능 손상의 개선효능은 주로 추출물에 함유된 사포닌 분획에 기인하리라 사료되며 특히 사포닌 platycoside E는 대조약물 tacrine (Cognex)에 버금가는 우수한 인지기능 개선효능을 보여주었다.

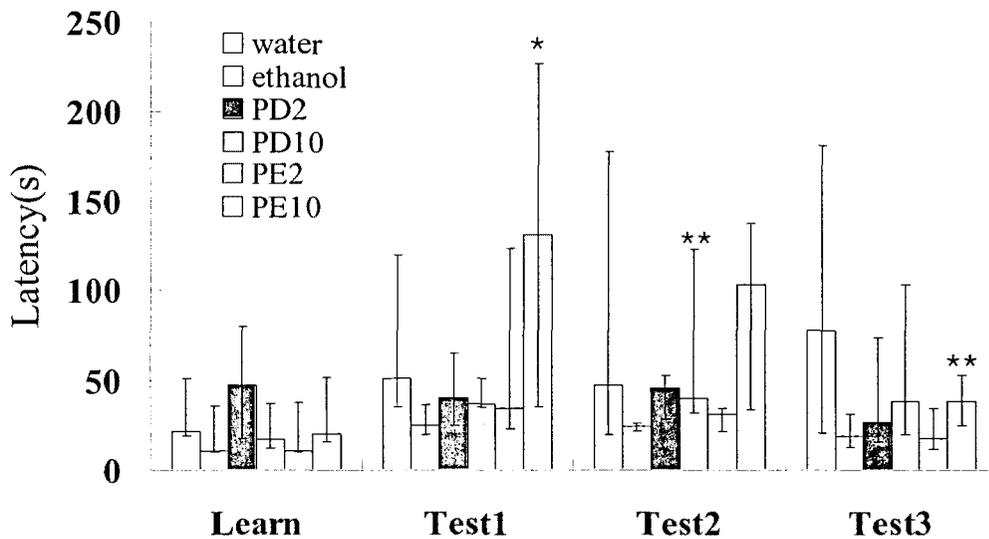


Fig 2-2. Effect of Platycodin D and Platycoside E on ethanol treated Learning impairment in mice. Each figures are medians using Wilcoxon Test and range of 7-9 mice. * $p = 0.064$ of the PE10 group in test1 compared to ethanol group in test1. ** $p < 0.05$ of the PD10 group in test2 and PE10 group in test3 compared to ethanol group. It is explained that water group is mice which take only water and ethanol group is mice which take water instead of drug but take ethanol and another groups is mice which take drug and ethanol.

한편, Learning trial의 latency를 보면, control 그룹인 ethanol 그룹과 비교해 봤을 때 그 외 모든 그룹에서 비슷한 정도를 보였다 (중앙값 = 11-47초). 그러나 test1 (마지막 투여 24시간 후)에서 PE10 그룹의 중앙값이 132초로 증가하여 ethanol 그룹과 비교해 봤을 때 유의적인 차이를 보였다 ($p=0.064$). 하지만 그 외 PD2와 PD10, PE2 그룹은 ethanol 그룹과 비슷한 수준이었다 (중앙값=25-40초). 이는 PD는 저농도 고농도 모두 ethanol 처치한 마우스의 기억력 감퇴에 대하여 효과가 없지만, 고농도로 투여한 PE의 경우 효과가 있다는 것을 의미한다. 그러나 그 효과는 시간이 지나면서 감퇴함을 알 수 있었다. 둘째 날과 셋째 날 시행한 실험에서 중앙

값이 각각 103, 38초로 감소하여 물질 투여전의 수준으로 환원되었다.

Table 2-1. Memory enhancing effect of 4 day administration of test materials prepared from the extract of *P.grandiflorum* on ethanol-induced amnesia in mice.

Pretreatment of test material		EtOH treatment	step through latency period (STL)	
test material	dose(mg/kg bw)		training trial	test trial
none	-	-	45.2 ± 3.5	*260.5 ± 15.3
none	-	+	49.7 ± 4.5	48.7 ± 4.3
whole ex.	20	+	47.2 ± 3.4	*150.4 ± 11.3
	100	+	50.4 ± 7.5	*165.8 ± 12.2
non saponin fr.	20	+	41.7 ± 5.4	52.5 ± 6.4
	100	+	44.3 ± 3.0	62.4 ± 5.7
saponin fr.	2	+	46.1 ± 2.8	87.5 ± 7.4
	10	+	40.7 ± 4.3	*220.5 ± 19.2
platycodin D	2	+	44.4 ± 3.8	65.2 ± 4.1
	10	+	47.8 ± 3.3	*130.9 ± 12.8
platycoside E	2	+	46.6 ± 2.5	85.5 ± 7.3
	10	+	43.7 ± 5.0	*280.1 ± 22.5
Tacrine	10	+	42.9 ± 3.9	*210.5 ± 18.6

p < 0.05, compared with ethanol-treated group.

Each experimental group consisted of 10 male mice. Each test materials were orally administered for 4 consecutive days before ethanol intoxication, and memory enhancing effect was evaluated by prolonged step-through latency period (STL : mean ± SEM) in step through passive avoidance test after induction of amnesia with ethanol.

2. Scopolamine으로 유발된 인지기능저하 개선 효능 실험

가. 실험 재료 및 방법

1) 실험재료

상기와 동일한 방법으로 추출한 도라지 추출물 및 사포닌을 사용하였다.

2) 실험동물 및 실험군

본 실험에서는 ICR mouse(수컷, 4주)를 중앙실험동물로부터 구입하였으며, 일반 고형 사료로 자유급여 하였다. 일주일간 환경에 적응시킨 뒤 체중에 따라 난괴법에 의하여 정상군(normal), scopolamine으로 건망증을 유도한 대조군(control), 도라지 추출물 0.2% 및 0.5%, 도라지 saponin 0.02% 및 0.05%를 사료에 첨가하여 급여하였다. 실험식은 AIN-96 diet 조성에 의거하여 조제하였으며 실험식이와 물은 자유로이 섭취하도록 하였고 일주일에 한 번씩 체중을 측정하였다. 실험식이를 4주간 급여한 후에 scopolamine으로 건망증을 유도한 후 passive avoidance test 및 Morris water maze test를 이용하여 기억력 회복 정도를 측정하였다.

3) Scopolamine에 의한 건망증의 유발

도라지 추출물 및 사포닌을 첨가한 식이로 4주간 사육한 ICR mouse를 scopolamine(HBr, 1mg/kg, I.p., Sigma, U.S.A)을 복강주사하여 건망증을 유발시키고 30분 후에 각각 passive avoidance test 및 water maze test 실험을 실시하여 scopolamine에 의한 건망증의 유발과 도라지 추출물 및 사포닌에 의한 기억력 회복 효과를 관찰하였다.

4) Passive avoidance test

Passive avoidance(256000-series, TSE-System, German)는 마우스의 어둠을 좋아하는 습성을 이용하여 설계된 장치로서 암실과 명실로 구분되어 있으며, 그 사이에 작은 문으로 연결되어 있다. 실험동물을 명실에 넣고 빛을 주면 곧 암실로 들어 가는데, 이 때 문을 닫고 0.3mA의 전류를 5초간 주어 이를 기억하게 한다. 이와 같은 방법으로 test 하루 전날 2회 연습시킨 후, 다음 날 test시 scopolamine을 주사(1mg/kg body weight, i.p.)하고 30분 후에 다시 명실에 마우스를 두어 빛을 피하여 암실로 들어가는데 걸리는 시간(step through latency)를 측정하였다.

5) Morris water maze test

ICR mouse를 Morris water maze에서 1일 2회 반복학습을 이틀간 실시하였다. Morris water maze는 직경이 110cm, 높이가 90cm인 수조로써, 수온이 26~28℃인 수돗물을 2/3정도 채우고, 그 안에 마우스가 올라갈 수 있는 직경이 10cm인 원통형

platform을 설치하고 적당량의 우유로 부유시켜 platform이 육안으로 보이지 않도록 제조하였다. 1일 2회 연습시 마우스가 180초 이내에 수조안에서 platform으로 올라갈 수 있도록 하였으며, 180초 이내에 platform을 찾지 못하면 마우스를 platform으로 인도하여 이를 인지하게 하였다. 2일 동안의 연습 후, test시 scopolamine을 주사 (1mg/kg body weight, i.p.)하고 30분 후에 위와 동일한 방법으로 water maze test를 실시하여 platform으로 올라가는데 까지 걸리는 유영시간(step through latency)을 측정하였다.

6) 생화학적 분석

가) 혈액 및 장기의 채취

scopolamine을 주사하여 passive avoidance test와 Morris water maze test를 실시한 실험동물은 scopolamine을 주사한 지 2시간 이내에 안구채혈 방법으로 혈액을 채취하였다. 채취한 혈액은 원심분리관에 담아 ice bath에 20분간 방치한 후 3000rpm, 4℃에서 10분간 원심분리(Refrigerated multi-purpose centrifuge union 55R, Hanil, Korea)하여 적혈구와 혈청을 분리하고, 분리된 혈청은 분석시까지 -70℃ deep freezer에 보관하였으며 혈액을 채취한 후 장기들은 ice cold saline용액에 세척한 다음 여지로 물기를 제거하여 무게를 측정한 후 분석시까지 -70℃ deep freezer에 보관하였다.

나) 혈청과 뇌의 acetylcholinesterase의 활성 측정

혈청과 뇌의 acetylcholinesterase 활성은 Elman법에 근거하여 측정하였다. 혈청 acetylcholinesterase 활성 측정은 3ml의 cuvette에 0.1M phosphate buffer(pH 8.0) 3.0ml를 가하고, 기질용액 0.075M acetylthioline iodide 20 μ l, 0.01M dithiobisnitrobenzoic acid(DTNB)/phosphate buffer(pH 7.0) 25 μ l을 각각 가하여 잘 혼합한 혈청을 넣어 412nm에서 5분간의 흡광도 변화를 측정하였다. 뇌의 acetylcholinesterase 활성 측정은 3ml의 cuvette에 0.1M phosphate buffer(pH 8.0) 2.9ml를 가하고, 기질용액 0.075M acetylthioline iodide 20 μ l, 0.01M dithiobisnitrobenzoic acid(DTNB)/phosphate buffer(pH 7.0) 100 μ l을 각각 가하여 잘 혼합한 혈청을 넣어 412nm에서 5분간의 흡광도 변화를 측정하였다. 혈청과 뇌의 acetylcholinesterase의 활성은 단위 단백질 당, 1분당의 활성도로 산출하였다.

7) 뇌의 지질 과산화물 측정

뇌의 지질 과산화물 분석은 조직 1g당 10ml의 0.25M sucrose/0.5M EDTA buffer를 가하여 병냉하에 homogenizer로 분쇄하여 얻은 균질액을 사용하여 TBARS를 측정하였다. 뇌의 균질액에 20% acetic acid 1.5ml과 8.1% SDS 0.2ml 그리고 0.8% TBA 시약 1.5ml을 첨가한 후 95°C에서 1시간 가열한 후 원심분리를 통하여 얻은 상층액을 532nm에서 흡광도를 측정하였다.

8) 통계분석

실험결과는 SAS를 이용하여 실험군당 평균±표준오차로 나타내었으며, 각 군의 유의차 검정은 duncan's multiple range test를 사용하였다.

나. 실험결과

1) 체중, 식이섭취량 및 장기무게

scopolamine의 주사 및 도라지 추출물과 도라지의 사포닌의 급여는 4주간의 실험 기간동안 체중의 변화에 영향을 미치지 않았으며, 각 실험군들 간의 식이 섭취량에도 변화가 없었다.(Table 2-2) 또한, 장기무게도 실험군간의 변화가 없었다.(Table 2-3)

Table 2-2. Body weight and food intake of fed experimental diet for 4weeks

	Normal	Scopolamine inj.(1mg/kg, i.p.)				
		Control	EX 0.2%	EX 0.5%	Saponin 0.02%	Saponin 0.05%
IBW(g) ¹⁾	30.32±0.54 ^{NS3)}	30.71±0.48	30.44±0.43	30.42±0.39	30.34±0.45	30.71±0.43
FBW)(g) ²⁾	35.95±0.91 ^{NS}	36.27±0.49	36.12±0.58	37.25±0.93	37.13±1.67	35.92±0.46
Food intake (g/day)	4.27±0.10 ^{NS}	4.23±0.12	4.25±0.15	4.26±0.10	4.01±0.06	4.21±0.06

1)Initial body weight, 2)Final body weight, 3)NS: not significant

Table 2-3. Organ tissue weights of fed experimental diet for 4weeks

	Normal	Scopolamine inj.(1mg.kg, i.p.)				
		Control	EX 0.2%	EX 0.5	Saponin 0.02%	Saponin 0.05%
Liver(g)	1.54±0.12 ^{NS1)}	1.44±0.05	1.53±0.06	1.44±0.04	1.45±0.04	1.39±0.06
Kidney(g)	0.56±0.05 ^{NS}	0.51±0.03	0.51±0.02	0.53±0.02	0.51±0.01	0.54±0.02
Spleen(g)	0.11±0.01 ^{NS}	0.12±0.02	0.10±0.00	0.09±0.00	0.10±0.01	0.10±0.01
Brain(g)	0.40±0.02 ^{NS}	0.39±0.04	0.36±0.01	0.36±0.00	0.36±0.01	0.36±0.01

1)NS: not significant

2) Passive avoidance test를 통한 기억력 손상예방 평가

하루 동안, passive avoidance test를 통하여 훈련시키고 다음 날 Scopolamine 주사 30분후에 step through latency를 조사한 결과를 Fig 2-3에 나타내었다. 건망증이 유도되지 않은 정상군(Normal)은 어두운 방으로 이동하는데 평균 223초가 걸린 반면에 scopolamine에 의해 건망증이 유도된 대조군(Control)은 69초가 걸려 건망증이 유도됨을 확인하였다. scopolamine으로 건망증을 유도하고 도라지의 추출물(0.02%)첨가 식이를 급여한 그룹에서는 대조군과 유의한 차이가 나타나지 않았으며 도라지의 추출물(0.05%)첨가 식이를 급여한 그룹에서는 거의 정상군 수준으로 유지되어 도라지의 추출물은 농도의존적인 반응을 나타내었다. 도라지의 사포닌(0.02%)을 첨가한 그룹에서는 정상군과 유의차가 나타나지 않았지만, 감소하는 것으로 보아 건망증 개선에 효과가 있는 것으로 나타났으나, 도라지의 사포닌(0.05%)의 농도가 높은 그룹에서는 오히려 시간이 감소하는 것으로 나타났다.

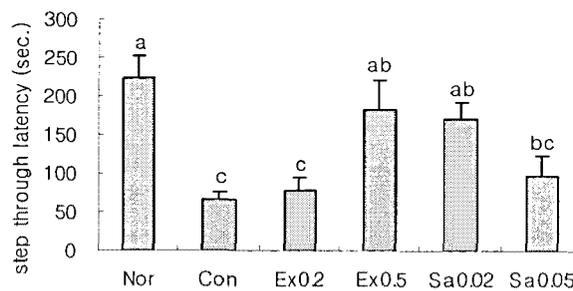


Fig 2-3. Protective effect of extract and saponin(*Platycodon grandiflorum*) on the scopolamine induced cognitive deficit in mice through passive avoidance

3) Morris water maze test를 통한 기억력 개선능의 평가

Fig 2-4에서는 scopolamine으로 유도된 건망증에 미치는 영향을 water maze test를 통하여 분석한 결과를 나타내었다. 즉, 실험동물을 water maze test를 통하여 3회 훈련시킨 다음 scopolamine 주사하고 30분후에 flat form를 찾아 목적지까지 찾아가는데 걸리는 시간을 측정하였다. 출발지에서 flat form까지 도달하는데 걸리는 시간은 건망증이 유도되지 않은 정상군의 경우, 25초가 걸렸으나 scopolamine에 의해 건망증이 유도된 대조군은 119초가 걸려 목적지까지 걸리는 시간이 유의하게 증가되어 scopolamine에 의해 건망증이 유도됨을 확인할 수 있었다. 도라지의 추출물을 첨가한 식이를 공급한 그룹에서는 대조군에 비하여 소요시간이 절반정도로 감소하여 그 시간이 유의하게 감소하였다. 도라지 추출물의 농도가 높은 그룹에서 조금 더 감소하였으나 유의차는 인정되지 않았다. 도라지의 사포닌을 첨가한 식이를 공급한 그룹에서는 사포닌의 농도가 낮은 그룹(Sa0.02%)이 높은 그룹(Sa0.05%)보다 소요시간이 더 감소한 것으로 나타났다.

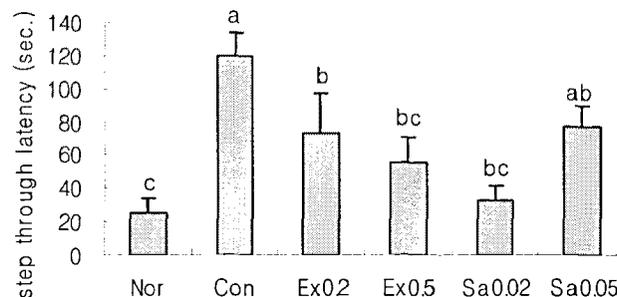


Fig 2-4. Protective effect of extract and saponin(*Platycodon grandiflorum*) on the scopolamine induced cognitive deficit in mice through water maze test

4) 혈청과 뇌 조직의 acetylcholinesterase 활성

Fig. 2-5에는 도라지의 추출물과 사포닌이 혈청의 acetylcholinesterase activity(AChE)의 활성에 미치는 영향을 나타내었다. scopolamine으로 기억력 손상을 유발시킨 대조군의 효소활성은 정상군에 비하여 유의하게 증가하였다. 도라지 추출물의 첨가 그룹에서의 효소활성은 대조군에 비하여 감소하는 경향을 보였으며, 추출물의 농도가 높을수록 효소활성이 감소하는 것으로 나타났으나, 농도차에 따른 통계적인 유의차는 없는 것으로 나타났다. 도라지의 사포닌이 첨가된 군에서의 효

소활성은 대조군에 비하여 감소하는 경향을 보였으나 농도에 따른 통계적인 유의차는 없는 것으로 나타났다.

Fig 2-5. Effect of extract and saponin(*Platycodon grandiflorum*) on the serum acetylcholinesterase activity in scopolamine treated mice

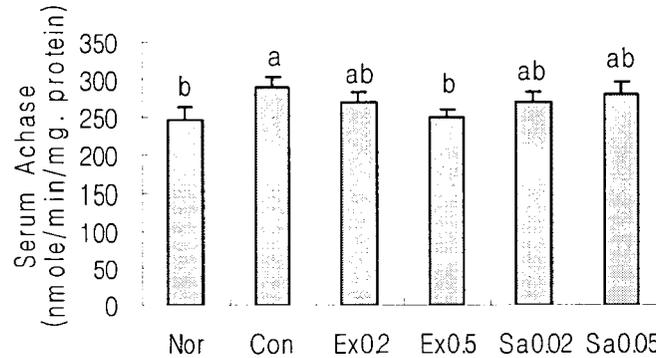
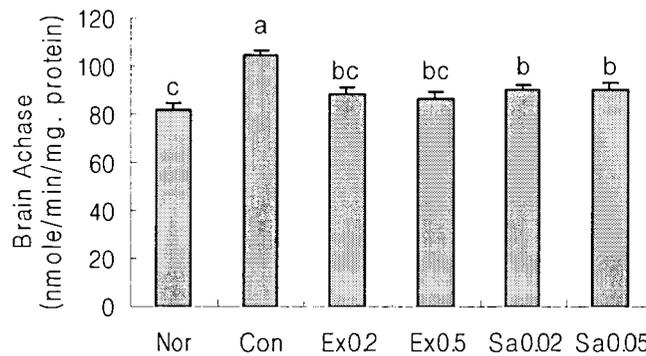


Fig 2-6에서는 뇌 조직에서의 acetylcholinesterase activity의 활성에 미치는 도라지의 추출물과 사포닌의 영향을 나타내었다. scopolamine으로 기억력 손상을 유도시킨 대조군의 효소활성이 정상군에 비하여 유의하게 증가하였으며 도라지 추출물의 그룹은 대조군에 비하여 효소활성이 감소하였으나 첨가농도에 따른 차이는 없는 것으로 나타났다. 또한, 도라지의 사포닌 첨가 그룹도 대조군에 비하여 감소하는 경향을 나타내었으나 첨가농도에 따른 차이는 없는 것으로 나타났다.

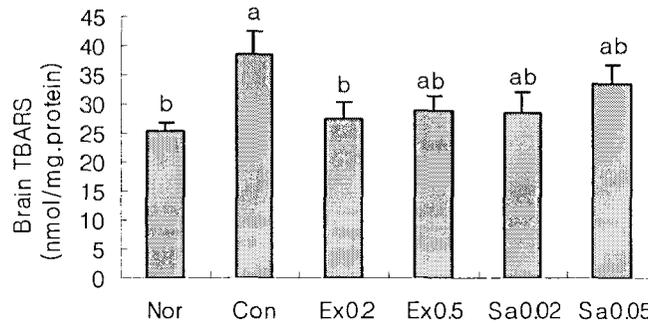
Fig 2-6. Effect of extract and saponin(*Platycodon grandiflorum*) on the brain acetylcholinesterase activity in scopolamine treated mice



5) 뇌의 지질 과산화물 함량

Fig 2-7에서는 뇌에서의 지질 과산화물 함량에 미치는 도라지의 추출물 및 사포닌의 영향을 나타내었다. 뇌에서의 지질 과산화물 함량은 scopolamine에 의해 증가하는 것으로 나타났으며, 도라지의 추출물 및 사포닌을 첨가한 그룹에서 감소하는 것으로 나타났다. 첨가농도가 낮은 그룹의 지질 과산화물의 함량이 낮은 것으로 나타났으나, 농도차이에 따른 통계적인 유의차는 나타나지 않았다.

Fig 2-7. Effect of extract and saponin(*Platycodon grandiflorum*) on the brain thiobarbituric acid reactive substances in scopolamine treated mice



다. 고찰

현대사회는 생활수준의 향상과 의학의 발달 등으로 인하여 인간의 수명이 연장됨으로써 노년층의 인구가 늘어나고 있다. 이로 인한 여러 가지 의학적 문제가 새롭게 부각되고 있는데, 그 중에서 대표적 질환인 노년기 치매가 근래 들어 점차 증가하는 추세에 있어 커다란 사회문제로 대두될 것으로 생각된다. 뇌 조직에서 acetylcholine(ACh)의 농도는 식이 choline이나 phosphatidylcholine의 보충에 의해 증가되는데³⁰⁾ ACh 농도가 증가하면 choline성 신경세포를 활성화시키고 이로 인해 생성된 acetylcholine esterase(AChE)의 활성 또한 증가하며³¹⁾ choline성 신경세포는 전뇌기저핵을 포함하는 전뇌기저부에 존재하며 기억력과 관련이 있는 주된 신경세포로서 인지기능을 담당하는 것으로 알려져 있다.³²⁾ 학습 및 기억은 두뇌 신경세포의 신경전달물질의 시냅스에서 변화를 일으킨 결과로 알려져 있으나 구체적인 메카니즘은 알려지지 않았으며 choline성 신경계가 일부 관여하는 것으로 알려져 있다. 한편, 노화가 진행되면서 acetylcholine, dopamine, serotonin, GABA 등의 신경전달물질이 감소하며 알츠하이머의 기억력 감퇴는 acetylcholine을 생산하는 신경세포의 퇴화와 더불어 acetylcholinesterase(AChE)의 증가로 알려져 있다.^{33,34)} 이는 본 실험

에서 scopolamine으로 건망증이 유도된 대조군에서의 혈청과 뇌의 acetylcholinesterase activity가 증가하는 것으로 나타나 것을 통해 알 수 있었다. 학습 및 기억 능력 개선의 측정은 실험동물을 이용한 여러 가지 행동 관찰 방법이 이용되고 있으며 본 실험에서는 Morris water maze test와 Passive avoidance test를 이용하였다. scopolamine으로 유도된 대조군은 정상군에 비하여 passive avoidance test에서 소요시간이 감소하고, water maze test는 증가하는 것으로 나타났다. Riekkinen 등³⁵⁾은 scopolamine을 쥐에게 투여하면 water maze와 passive avoidance 실험에서 실패율이 높아지고, 안 등³⁶⁾은 shuttle box에서 회피율이 증가한다고 보고되었다. Water maze test는 scopolamine으로 건망증이 유도된 대조군에 비하여 도라지의 추출물과 사포닌이 첨가된 그룹에 의해 소요시간이 감소하는 경향을 보였으며 Passive avoidance test는 대조군에 비하여 도라지의 추출물과 사포닌에 의해 소요시간이 증가하는 경향을 보였다. 도라지의 추출물은 첨가농도의 의존성을 보였다. 홍삼 추출물 및 홍삼 사포닌이 passive avoidance test를 통한 연구에서 학습 및 기억력을 증진시킨다고 보고된 바 있다.^{37,38)} scopolamine으로 기억력 손상을 유도한 대조군에 비하여 도라지의 추출물 및 사포닌이 학습 및 기억력을 증진시키는 효과를 보였다. 이는 scopolamine의 특성이 콜린 효능성 신경계에 작용하는 약물임을 고려할 때, 도라지의 추출물 및 사포닌이 콜린 신경계에 작용하여 기억력 손상을 개선시킬 수 있다고 사료된다.

한편, 산화적 스트레스의 증가는 여러 조직이나 세포에 치명적인 세포사 또는 괴사를 유도해내는데, 특히 신경세포의 경우는 치매, 중풍, 퇴행성 뇌질환과 많은 연관성을 가지고 있다. 알츠하이머 질환을 가지고 있는 사람의 뇌에서 lipid, 단백질, DNA의 산화수준이 정상인 사람보다 높으며 뇌 조직에서의 지질 과산화 함량이 증가하는 것으로 보고된 바 있다. 본 연구에서는 scopolamine으로 기억력 손상을 유도한 대조군에서 지질 과산화 함량이 증가된 것으로 나타났으며, 도라지의 추출물 및 사포닌의 첨가로 지질 과산화 함량이 감소하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 도라지의 열수 추출물이 간세포에서 t-butyl hydroperoxide에 의해 유발된 산화적 스트레스에 대해 free radical을 제거함으로써 간세포 보호능을 갖는다는 최 등의 보고³⁹⁾와 도라지의 잎과 줄기의 용매 분획물 농도에 의한 항산화활성을 갖는다고 보고한 정 등⁴⁰⁾의 결과로 미루어 도라지 추출물 및 사포닌이 갖는 항산화 활성에 의한다고 사료되어진다. Doaa A. 등⁴¹⁾의 연구에서 scopolamine으로 기억력 손상을

유도하면 뇌의 MDA가 증가하고 GSH가 감소하며 MDA와 GSH 수준에 미치는 영향을 통하여 뇌의 산화적인 스트레스가 증가한다고 보고된 바 있다.

이상의 본 실험에서 나타난 결과는 도라지 추출물 및 사포닌은 scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴 및 기억력 손상을 예방하는 효과를 갖고 있으며 이러한 효과는 도라지 추출물 및 사포닌이 갖는 acetylcholinesterase(AChE) 억제 활성과 항산화 활성에 기인한다고 할 수 있다. 또한 도라지 주요 약리성분인 사포닌에만 국한되는 것이 아니라, 도라지 추출물에 포함되어 있는 사포닌 이외의 다른 성분과도 길항효과를 갖는 것으로 사료되어 도라지에 함유되어 있는 기타 다른 약리효능 성분의 검색이 필요하다고 사료된다.

3. 저빌마우스를 이용한 도라지 추출물 및 사포닌들의 뇌 신경보호효과

뇌졸중(stroke)은 뇌혈관의 이상으로 인한 뇌경색이나 뇌출혈에 의해 갑자기 사망에 이르게 하거나 신체적, 정신적 장애를 일으키게 하는 심각한 신경계 질환으로 악성종양 및 심장질환과 함께 성인에 있어서 중요 사망 원인의 하나이다. 뇌졸중은 크게 뇌혈관이 막히는 허혈성 뇌졸중(뇌경색)과 뇌혈관이 터지는 출혈성 뇌졸중(뇌출혈)으로 구분할 수 있으며, 허혈성 뇌졸중의 경우 동맥경화나 혈전 등에 의해 유발되며, 뇌출혈의 경우 고혈압에 의한 원발성 뇌출혈과 동정맥 기형이나 동맥류에 의한 지주막하 출혈이 중요한 원인으로 알려져 있다. 뇌졸중에 의한 신경세포의 사멸은 크게 두 가지 기전에 의한 것으로 알려져 있다. 하나는 혈관 폐쇄시 흥분성 신경전달물질인 글루타메이트(glutamate)의 과다 생성으로 인한 뇌신경세포의 파괴이고, 다른 하나는 혈관의 폐쇄 및 재관류 등의 반응시 유발되는 활성 산소종(reactive oxygen species)으로 인한 흥분성 신경세포사이다. 흥분성 아미노산인 글루타메이트 수용체는 일종의 리간드-게이티드 이온 채널(ligand-gated ion channel)로서, 작용제에 따라 N-메틸-D-아스파테이트(N-methyl-D-aspartate, NMDA), α -아미노-4-아이소옥사졸-프로피온산(α -amino-4-isoxazole-propionic acid, AMPA), 카이네이트(kainate) 등으로 구분되며(Nakanishi, 1992), 이들 수용체의 과도한 활성화는 신경세포의 손상을 초래하며, 특히 카이네이트 수용체의 과도한 활성화는 활성 산소종의 생성을 급격히 증가시킨다. 반면, 비-NMDA 수용체의 과도한 활성화는 나트륨 이온 유입에 따른 신경세포의 부종을 유발하는 것으로 알려져 있다. 이러한 혈

관의 폐쇄-재관류시의 갑작스러운 에너지 공급은, 세포 내에서 대사를 급격하게 진행시킴으로써 과산화수소의 양을 급격하게 증가시킨다. 이렇게 생성된 과산화수소는 인간 초산화물 불균화 효소(Cu,Zn-superoxide dismutase) 등에 의해 쉽게 분해되지만, 혈관의 재관류시에는 생체 내의 철과 반응하는 하버-웨이스 반응(Haber-Weiss reaction) 및 펜톤 반응(Fenton reaction)을 유발하여 체내에 하이드록실 라디칼(hydroxyl radical)의 양을 급증시킨다. 이렇게 증가된 하이드록실 라디칼은 반응성이 매우 높아 체내에 존재하는 비포화 물질, 예를 들면 DNA, RNA 및 세포 지질막과 반응을 하게 된다. 세포 지질막과 반응하는 경우 지질 과산화(lipid peroxidation)를 유발하여 세포의 염증반응을 매개하고, DNA와 반응하는 경우 8-하이드록시구아노신 부가물(8-hydroxyguanosine adduct)을 형성하여 DNA를 손상시키는 것으로 알려져 있다.

따라서 안전하고 독성이 없으며 다양한 약리 작용을 하는 장생 도라지 추출물이 신경세포 손상을 효과적으로 예방함과 동시에 뇌허혈에 의한 신경세포사를 억제할 수 있음을 발견하였다. 따라서, 본 연구의 목적은 허혈성 뇌혈관 질환을 효과적으로 예방 또는 개선할 수 있는 약학 조성물을 제공하고자 하였다. 또한 허혈성 뇌혈관 질환을 효과적으로 예방 또는 개선할 수 있는 건강증진용 식품 조성물을 제공하고자 하였다.

나. 실험방법

1) 장생 도라지 추출물의 제조

(주)장생 도라지(경남 진주시 금곡면 정자리)에서 획득한 장생 도라지 추출물을 제조하기 위하여 장생 도라지 분말 0.2 kg에 증류수 2 ℓ 을 가하고 90 °C 에서 6 시간 동안 2회 환류 추출한 후 30분 동안 10,000 Xg 에서 원심 분리하여 고형분을 제거하였다. 원심 분리된 용액을 동결 건조하여 분말 상의 장생 도라지 추출물 67 g을 얻었다. 또한, 장생 도라지 분말 0.2 kg에 주정 2 ℓ 을 가하고 수욕상에서 6 시간 동안 2회 환류 추출한 후 30분 동안 10,000 Xg에서 원심분리하여 고형분을 제거하였다. 원심 분리된 용액을 동결 건조하여 분말 상의 장생 도라지 추출물 36 g을 얻었다.

2) 실험동물 및 실험군

체중 65 내지 75g의 수컷 몽골리안 저빌(Mongolian gerbil, *Meriones unguiculatus*, Harlan, USA) 40마리를 오전 7시부터 오후 7시까지 빛을 가하는 일정한 명암주기 하에서 온도 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $55\pm 10\%$ 에서 사육하였다. 음식과 물은 자유로이 섭취하게 하였다.

3) 뇌 허혈 시 장생 도라지 추출물의 신경세포 보호 효능 검증

장생 도라지 추출물을 증류수에 용해시킨 후 사육한 저빌에 허혈 유발 전 10일 부터 허혈 유발 후 2일까지 매일 1일 1회씩 경구투여군(400 mg/kg 체중), 복강투여군(100 mg/kg 체중) 및 대뇌투여군(0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 체중)으로 나누어 투여하였다 (실험군). 상기 저빌을 질소와 산소를 7:3으로 혼합한 가스에 3% 이소플루란(isoflurane, Baxtor, USA)으로 전신마취하고, 동일한 가스에 2.5% 이소플루란으로 마취를 유지하면서 수술을 수행하였다. 저빌 목 부위의 털을 깎고 소독한 다음 정중절개를 하여 양쪽 온목 동맥을 노출시키고, 동맥류 클립(aneurysm clip, Staelting, 미국)을 이용하여 5분 동안 결찰하여 뇌허혈을 유발한 후, 클립을 제거하여 재관류시켰다. 이때 각 실험군은 검안경(ophthalmoscope)을 이용하여 망막중심동맥(central artery of retina)의 혈액 순환 유무를 관찰하여 완전한 온목 동맥의 폐쇄를 확인하였다. 뇌허혈을 유발하는 동안 직장 내 체온계를 삽입하여 체온을 측정하였으며, 실온열 패드를 사용하여 체온을 정상 체온인 $37 \pm 0.3^{\circ}\text{C}$ 로 일정하게 유지시켰다.

각 실험군(경구투여군, 복강투여군 및 대뇌투여군)을 뇌허혈 유발 4일 후 티오펜탈 소듐(thiopental sodium, 유한양행, 한국)을 각각 30 mg/kg 체중의 용량으로 복강 내 주사하여 마취시킨 후, 1,000 ml 당 헤파린 1,000 IU를 함유한 4°C 의 생리식염수를 좌심실로 주입하여 관류 세척하였다. 관류 세척이 끝난 동물은 바로 4% 파라포름알데하이드를 함유하는 4°C 의 0.1 M 인산완충액(pH 7.4)으로 관류 고정하였다. 관류 고정한 동물의 뇌를 적출한 다음, 상기와 동일한 고정액으로 6시간 동안 후고정하였다. 후고정한 뇌를 30% 슈크로스 용액을 함유하는 0.1 M 인산완충액에서 침강시킨 후, 슬라이드 마이크로톰(sliding microtome, Reichert-Jung, 독일)으로 조직을 30 μm 두께로 잘라 보존액이 들어있는 6웰 플레이트에 넣어 사용 전까지 4°C 에서 보관하였다.

각 조직절편 중에서 해마(hippocampus) 부위가 잘 나와 있는 조직을 선택하여 0.01 M PBS로 10분씩 3회 세척한 후, 젤라틴 코팅된 슬라이드에 도말하여 37°C 에

서 충분히 건조시켰다. 크레실 바이올렛(Cresyl violet) 염색을 수행하기 위하여 조직을 증류수에 잠시 담근 후, 2% 크레실 바이올렛 아세테이트(Sigma, 미국) 용액으로 1분 동안 염색하였다. 이어 상기 조직을 흐르는 물에 충분히 세척하여 슬라이드에 묻어 있는 과량의 염료를 제거하고, 증류수에 잠시 담근 후 50%, 70%, 80%, 90%, 95% 및 100% 에탄올을 거쳐 탈수하였다. 조직에서 니슬 소체(Nissle body)를 확인한 후, 자일렌(Junsei, 일본)에 담가 투명화하고 캐나다 발삼(Canada Balsam, 일본 간토 소재)으로 봉입하였다. 허혈-재관류를 실시하지 않은 정상군(가수술군)은 온목 동맥을 결찰하지 않은 것을 제외하고는 동일한 방법으로 수술, 조직처리, 크레실 바이올렛 염색을 수행하였다. 또한, 허혈-재관류를 실시한 대조군(용매투여군)은 장생 도라지 추출물 대신 증류수를 투여한 것을 제외하고는 동일한 방법으로 수술, 조직처리 및 크레실 바이올렛 염색을 수행하였다.

정상군, 대조군 및 실험군의 각 조직들을 디지털 카메라(Axiocam, Carl Zeiss, 독일)가 장착된 악시오엠1 현미경(Axiom1 microscope, Carl Zeiss, 독일)으로 전체 해마 영역을 40배로, CA1 영역을 200배로 확대하여 사진 촬영하였다. 그 결과로 전체 해마 영역을 촬영한 사진을 Fig. 1의 A 및 C에, 해마의 CA1 영역을 촬영한 사진을 Fig. 1의 B 및 D에 나타내었다. 또한 이미지 분석기 옵티마스 6.5(Optimas 6.5, CyberMetrics, 미국)를 사용하여 염색된 부분의 신경세포를 계수한 상대 세포수의 비율(%)을 Fig. 1에 나타내었다. 각 군에 대한 유의성의 검증은 일원분산 분석(one-way ANOVA test)으로 수행하였다. 또한 허혈로 인한 손상(damage)에 대한 장생 도라지 추출물의 신경세포 보호효능을 확인하기 위하여, 상기와 같이 제조된 조직 절편을 사멸중이거나 사멸한 신경세포를 표지하는 플루오로-제이드 B(Fluoro-Jade B, F-J B) 0.0001%로 염색하여 그 결과를 Fig. 2-9의 A, B, C, D 및 E에 나타내었다.

4) MAP-2, GFAP 및 Iba-1에 대한 면역조직학적 분석

허혈-재관류 후 해마의 CA1 영역에서 장생 도라지 추출물의 신경세포 보호효능 및 아교세포(microglia) 활성을 확인하기 위하여 미리 제작된 조직 절편들에 대한 면역조직화학적 분석을 실시하였다. 먼저 신경세포 보호효능을 확인하기 위하여, 항-MAP-2(microtubule associated protein-2) 항체(Chemicon, 미국 캘리포니아, 테메쿨라 소재)를 1:1,000으로 희석한 것을 이용하여 조직 절편을 염색한 후 DAPI 봉입

제(Vector, 미국 캘리포니아 벨링엄 소재)로 봉입하여 표본을 만들어 디지털 카메라(Axiocam, Carl Zeiss, 독일)가 부착되어 있는 악시오엠1 현미경(Carl Zeiss, 독일)으로 확인한 결과를 Fig. 2의 F, G, H, I 및 J에 나타내었다. 또한, 아교세포 활성을 확인하기 위하여 별아교세포(astrocyte)의 표지자인 GFAP(glial fibrillary acidic protein)에 대한 토끼 항-GFAP 항체(Chemicon, 캐나다 테메큘라 소재)를 1:10,000으로 희석한 것을 사용하고, 미세아교세포의 표지자인 Iba-1(ionized calcium-binding adapter molecule-1)에 대한 토끼 항-Iba-1 항체(Wako, 일본 오사카 소재)를 1:500으로 희석한 것을 이용하여 면역 염색하고 상기와 같이 표본을 만든 후 확인한 결과를 Fig. 2-11에 나타내었다.

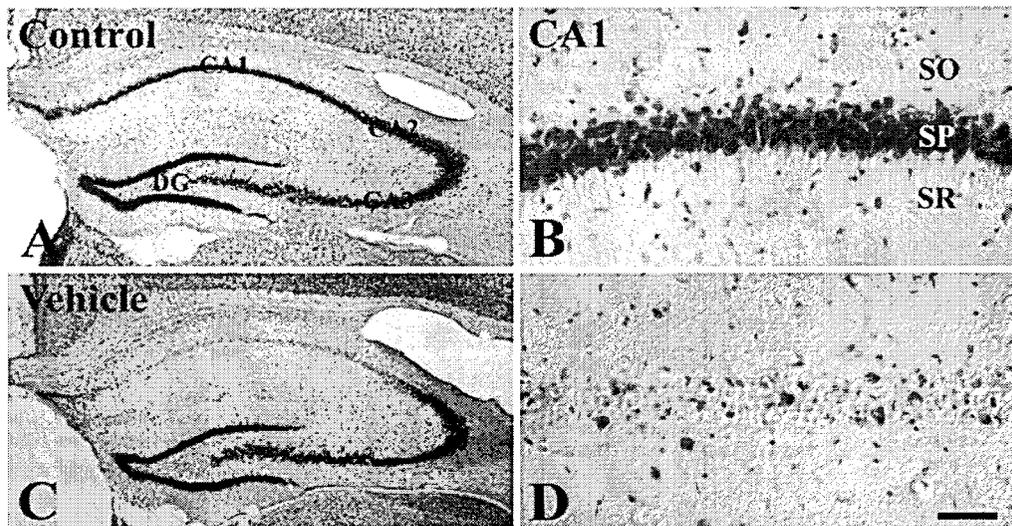
5) 사이클로옥시게네이즈-2(COX-2)에 대한 웨스턴 블롯 분석

허혈-재관류 후 3시간, 12시간 및 24시간 후에, 장생 도라지 추출물을 대뇌투여한 저빌 5마리로 구성된 실험군의 CA1 영역에서 사이클로옥시게네이즈-2(COX-2)의 수준 변화를 다음과 같이 웨스턴 블롯 분석에 의해 확인하였다. 각 저빌의 뇌를 취하여 조직을 바이브레이톰(Vibratome, Lecia, Wetzlar, 독일)으로 400 μ m 두께로 관상 절단(cornal section)하고 CA1 영역을 외과용 칼로 분리하였다. 20 μ g의 총 단백질을 함유하는 분획(aliquot)을 150 mM Tris(pH 6.8), 3 mM DTT, 6% SDS, 0.3% 브로모페놀 블루 및 30% 글리세롤이 혼합된 완충액에 넣고 5분 동안 끓인 후 10% 폴리아크릴아마이드 겔 위에서 전기 영동하였다. 그 후, 겔 상의 단백질 밴드를 나이트로셀룰로스 전이막(nitrocellulose transfer membranes, Pall Crop, East Hills, NY)으로 옮겼다. 배경 염색을 최소화하기 위하여 0.1% 트윈 20을 함유하는 PBS에 용해된 5% 무지방 건조유(non-fat dry milk)와 함께 45분 동안 배양한 후 염소 항-COX-2 항혈청(goat anti-COX-2 antiserum, 1:1,000) 및 퍼옥시다제 접합된 항-염소 IgG(oxidase conjugated anti-goat IgG, Sigma, St Louis, MO)를 첨가하고 추가 배양하고 마지막으로 ECL 키트(Pierce Chemical, Rockford, IL)를 사용하여 염색하였다. 각 시료의 단백질량을 소혈청알부민을 기준으로 마이크로 BCA 단백질 키트(Pierce Chemical, Rockford, USA)를 이용하여 표준화하였다. 해마의 CA1 영역에서 COX-2 단백질의 변화를 정상군에 대한 상대적인 비율로 나타낸 그래프를 도 5에 나타내었다.

나. 실험결과

정상군에는 CV+ 신경세포들이 해마 전 영역에서 골고루 관찰되었다 (Fig. 2-8. A, B). 반면 대조군에서는 CA2 및 CA3 영역에서 정상군과 비슷한 정도의 CV+ 신경세포들이 관찰되었으나, CA1 영역에서는 이들이 거의 관찰되지 않았다(Fig. 2-8. C, D). 또한, 대조군의 CA1 영역에서는 정상군에 비하여 생존율 11.3%의 CV+ 피라미드 뉴런(pyramidal neuron)이 관찰되었다. 즉, 허혈 후 해마 CA1 영역에서는 지연성 신경세포사로 인하여 대부분의 피라미드 뉴런이 사멸하게 됨을 알 수 있다. 각 실험군의 해마 CA1 영역에서의 피라미드 뉴런의 생존율을 Fig. 2-10에 나타내었다.

Fig 2-8. CV staining of the gerbil hippocampus in control (A and B) and ischemia-operated (C and D) groups 4 days after ischemia/reperfusion.



SP; stratum pyramidale, SO; Stratum radiatum, SR; stratum radiatum. Bar = 400 μ m (A and C), 50 μ m (B and D)

한편, 허혈 후 CA1 영역에서 장생 도라지 추출물의 신경세포 보호효능을 확인하기 위하여, 허혈-재관류 4일 후 플루오로-제이드 B(F-J B)로 염색하여 신경세포의 수를 측정하였다. 정상군에서는 F-J B+ 신경세포들이 CA1 영역에서 거의 관찰되지 않았지만(Fig. 2-9. A), 다수의 DAPI+ 핵 및 MAP-2+ 섬유가 관찰되었다(Fig. 2-9. F). 그러나 대조군의 경우 지연성 신경세포사로 인하여 CA1 영역에서 F-J B+ 신경세포들이 다수 관찰되었으나(Fig. 2-9. B), MAP-2+ 섬유는 거의 관찰되지 않

았다. 또한 DAPI+ 핵의 급격한 감소는 주로 피라미드 세포층(stratum pyramidale)에서 관찰되었다(Fig. 2-9. G).

한편 장생 도라지 추출물 경구 투여군은 CA1 영역에서 F-J B+ 신경세포의 수가 대조군과 유사하였으며(Fig. 2-9. C), 소수의 MAP-2+ 섬유가 관찰되었고, DAPI+ 핵은 거의 관찰되지 않았다(Fig. 2-9. H). 복강투여군에서도 F-J B+ 신경세포가 다수 관찰되었지만 대조군에 비하여 다소 감소하였으며(Fig. 2-9. D), 극소량의 MAP-2+ 섬유가 관찰되었고, DAPI+ 핵은 거의 관찰되지 않았다(Fig. 2-9. I).

또한 경구투여군과 복강투여군의 CA1 영역에서 피라미드 뉴런의 생존율은 각각 12.6% 및 15.8%였다(Fig. 2-10). 따라서 장생 도라지 추출물의 경구투여군 및 복강투여군은 장생 도라지 추출물을 처리하지 않은 대조군과 비교하여 큰 차이점을 보이지 않음을 확인할 수 있었다.

그러나 대뇌투여군의 경우 CA1 영역의 피라미드 세포층에서 소수의 F-J B+ 신경세포(Fig. 2-9. E), 다수의 MAP-2+ 섬유 및 DAPI+ 핵이 관찰되었다(Fig. 2-9. J). 이때 CA1 영역에서 생존율 64.2%의 피라미드 뉴런들이 관찰되었다(Fig. 2-10).

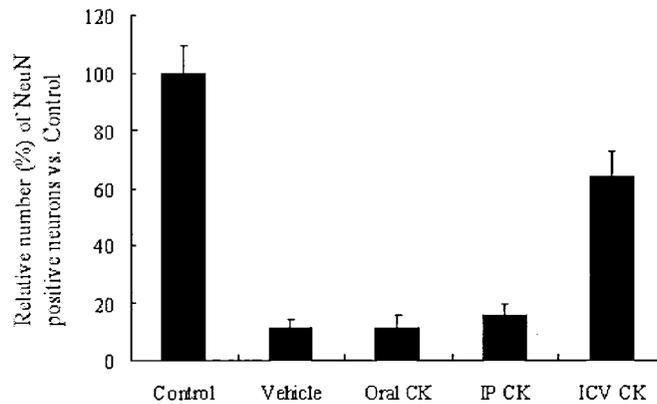


Fig. 2-10. Relative numeric analysis of survived CA1 pyramidal neurons. In the icv CK (0.5 μ g/kg)-treated group, about 64% of pyramidal neurons are survived 4 days after I/R ($n=7$ pergroup;

* $P<0.05$, significantly different from the control group. The bars indicate the means \pm SEM.

Fig 2-9. F-J B and MAP2 staining of the CA1 in control (A and F), vehicle- (B and G), ol CK (400 mg/kg)- (C and H), ip CK (100 mg/kg)- (D and I) and icv CK (0.5 μ g/kg)-treated (E and J) groups 4 days after ischemia/reperfusion. Bar=50 μ m.

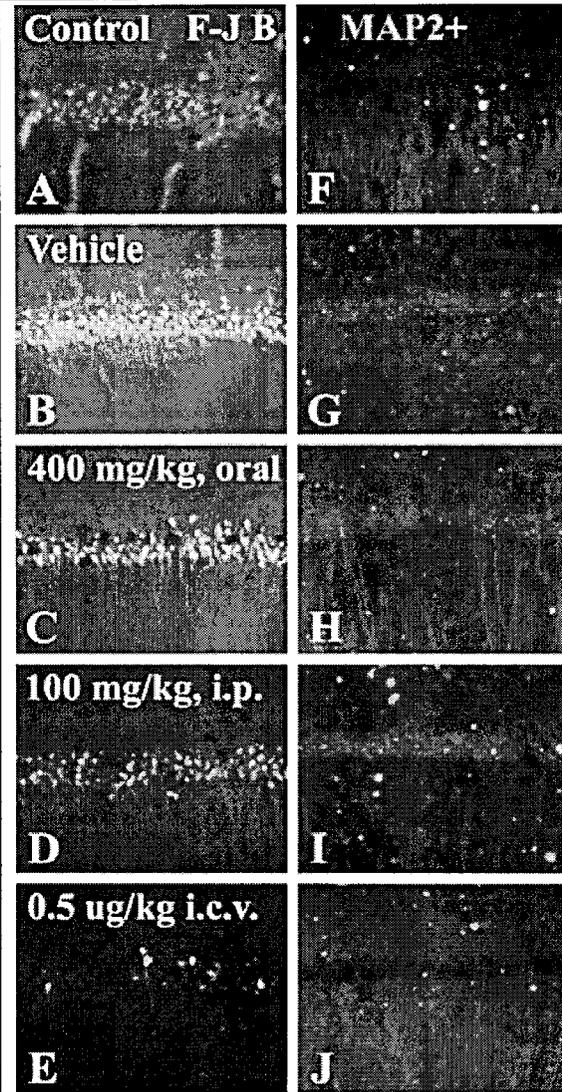
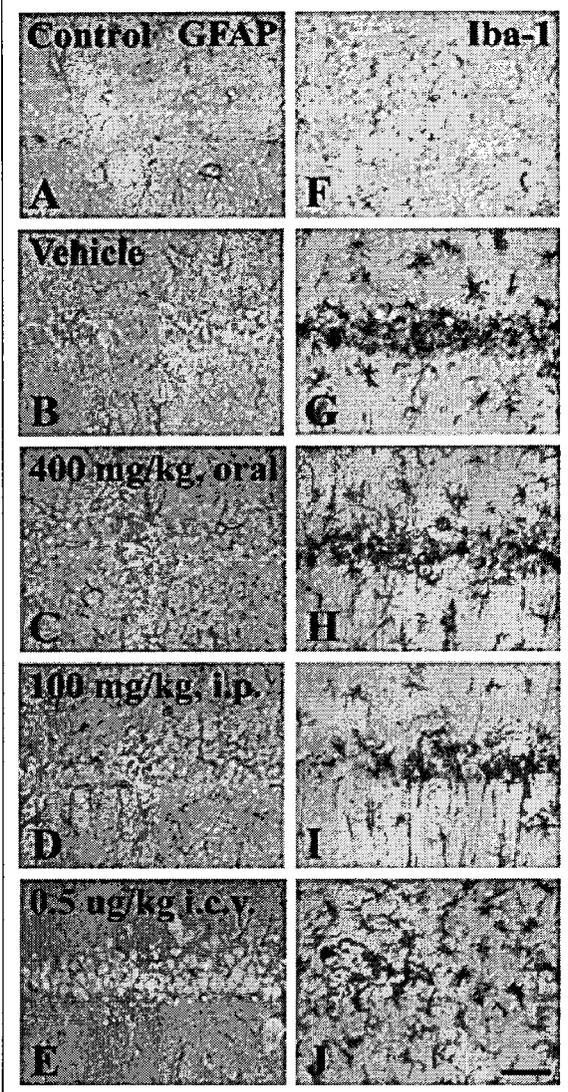


Fig 2-11. GFAP and Iba-1 immunohistochemistry in the CA1 in control (A and F), vehicle- (B and G), ol CK (400 mg/kg)- (C and H), ip CK (100 mg/kg)- (D and I) and icv CK (0.5 μ g/kg)-treated (E and J) groups 4 days after I/R. Bar=50 μ m.



한편, GFAP+ 별아교세포는 정상군의 경우 휴면 상태의 구조로 잘 분포되어 있었다 (Fig. 2-11. A). 그러나 대조군에서는 GFAP+ 면역 반응성이 상당히 증가되어 GFAP+ 별아교세포가 활성화된 파괴되는 세포질(punctuated cytoplasm)의 형태를 보였다(Fig. 2-11. B). 한편 실험군 중 경구투여군 및 복강투여군에서는 대조군과

유사하게 GFAP+ 별아교세포가 많이 활성화되었고(Fig. 2-11. C, D), Iba-1+ 미세아교세포 역시 활성화되고 있었다(Fig. 2-11, H, I). 대뇌투여군에서는 대부분의 GFAP+ 별아교세포가 대조군과 유사하게 휴면 상태를 유지하고 있었고(Fig. 2-11. E), Iba-1+ 미세아교세포는 덜 활성화된 상태임을 확인할 수 있었다(Fig. 2-11. J).

COX-2 수준은, 대조군에서는 허혈-재관류 3시간 후부터 시간에 따라서 증가하였지만, 실험군 중 대뇌투여군에서는 뚜렷한 변화가 관찰되지 않았다(Fig. 2-12). 이상의 결과는 장생 도라지 추출물이 뇌허혈 유발에 따른 지연성 신경세포사로 인한 신경세포의 손상을 효과적으로 보호할 수 있음을 입증한다.

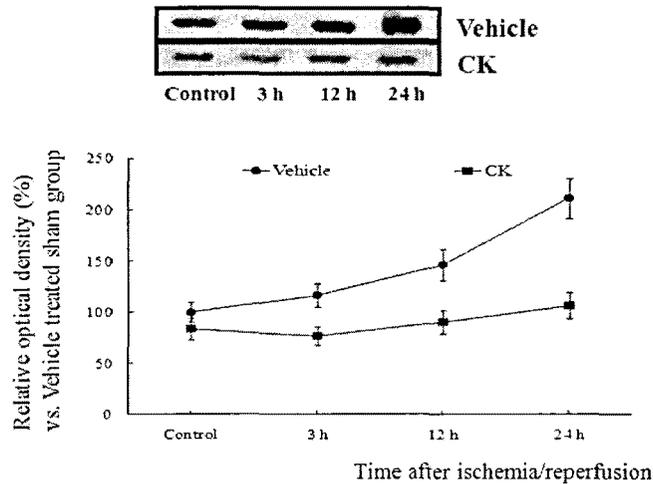


Fig. 2-12. Changes in COX-2 levels in the CA1 homogenates.

다. 허혈/재관류에 의한 해마 CA1영역의 손상에 도라지에서 분리된 단일사포닌의 신경보호효과

1) Cresyl violet staining(CV) 과 Fluoro-Jade B(F-J B) staining

허혈로 인해 손상된 해마 CA1영역의 피라미드세포층에 도라지에서 분리된 단일사포닌의 신경보호효과는 단일사포닌(5mg/kg/day)을 10일 동안 복강 투여하여, 허혈/재관류를 실시한 4일 또는 10일 후 세포의 수를 측정하여 평가하였다.(Fig. 2-13, 2-15 and 2-16). 그 결과 허혈/재관류를 실시하지 않은 정상군(Sham group)은 CV⁺ 신경세포들이 해마 전 영역에서 골고루 관찰되었으나(Fig. 2-13 A and B) 허혈/재관류

를 실시한 대조군(Vehicle group)에서는 CA2/3영역에서는 정상군과 유사하게 나타났으나, CA1영역에서는 거의 관찰되지 않았음(Fig. 2-13A, D and 2-15A, D). 또한, 대조군의 CA1영역에서는 정상군에 비하여 생존율 11.3%의 CA⁺ 피라미드 뉴런이 관찰되었음(Fig.2-15). 즉 허혈 후 해마 CA1영역에서는 지연성 신경세포사로 인하여 대부분 피라미드 뉴런이 사멸됨을 알 수 있었다.

또한 Deapioplatycoside E(DPE), Platycoside E(PE), Platyconic acid A(PA) 처리군은 CA1영역에서 CV⁺뉴런이 거의 발견되지 않았으나, Platycodin D(PD), 2''-O-acetylpolysgalacin D₂(PD₂) 처리군에서는 많은 CV⁺뉴런이 관찰되어졌다(Fig. 2-14). 신경세포 퇴행에 대한 표지자인 F-J B로 염색하여 신경세포 수를 측정된 결과 F-J B⁺ 뉴런이 정상군에서는 거의 나타나지 않았으나(Fig. 2-13C), 대조군에서는 CA1영역의 피라미드 세포층에서 유의적으로 증가하였다(Fig. 2-13F and 2-16). CA1영역 내 F-J B⁺ 뉴런이 DPE, PE 그리고 PA 처리군에서는 대조군과 유사하게 나타났으나(Fig. 2-14C, F and D), PD, PD₂ 처리군에서는 허혈 된 CA1영역의 피라미드 세포층에서 거의 관찰되지 않았다(Figs. 2-14L and O).

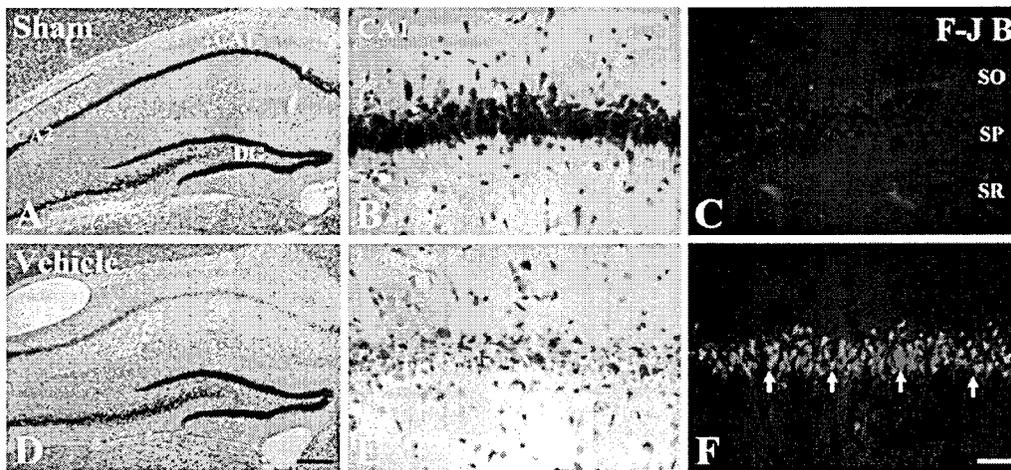


Fig. 2-13 CV and F-J B stainings of the gerbil hippocampus in sham (A-C) and ischemia-operated (D-F) groups 4 days after ischemia/reperfusion.

SO; Stratum oriens, SR, stratum radiatum. Bar=400 μ m (A and D), 50 μ m (B, C, E and F).

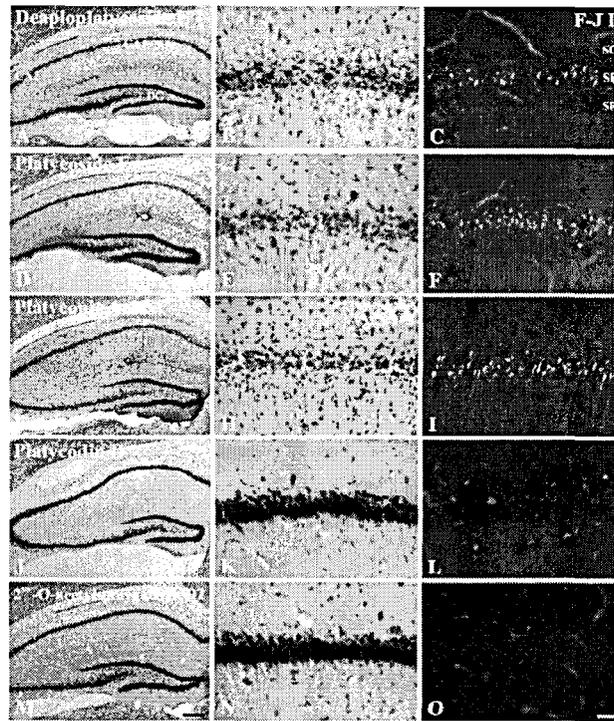


Fig. 2-14 CV and F-J B stainings of the hippocampus in DPE- (A-C), PE- (D-F), PA- (G-I), PD- (J-L) and PD2- treated (M-O) ischemic groups 4 days after ischemia/reperfusion.

SO; stratum oriens, SP, stratum pyramidale SR, stratum radiatum. Bar=400 μ m (A, D, G, J and M), 50 μ m (B, C, E, F, H, I, K, L N and O).

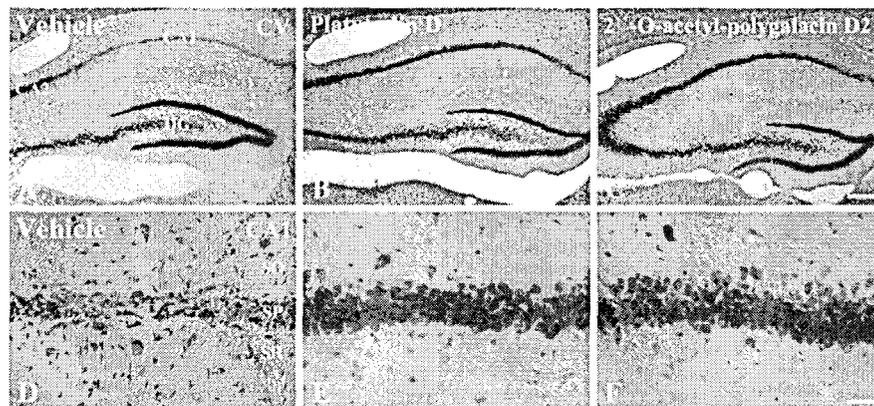


Fig. 2-15 CV staining of the gerbil hippocampus in vehicle- (A and D), PD- (B and E) and PD2-treated (C and F) ischemic groups 10 days after ischemia/reperfusion. Abundant CV+ neurons are observed in the hippocampal CA1 region in the PD- and PD2-treated groups. SO; stratum oriens, SP, stratum pyramidale SR, stratum radiatum. Bar=400 μ m (A-C), 50 μ m (D-F).

2) Reactive gliosis에 대한 영향

Glial fibrillary acidic protein positive(GFAP⁺) 별아교세포는 정상군의 경우 휴면상태의 구조로 잘 분포되어 있으나(Fig. 2-17A) 대조군의 경우에는 GFAP 면역반응성이 유의적으로 증가하였고(Fig. 2-17H) 활성화 된 상태로 세포질이 파괴된 형태를 보였다(Fig. 2-17B). DPE, PE 그리고 PA 처리군에서는 활성화 된 별아교세포가 많았으나(Fig. 2-17C-E), PD, PD₂ 처리군에서는 휴면상태의 별아교세포가 많이 발견되었다(Fig. 2-17F and G). Ionized calcium-binding adapter molecule 1 positive(Iba-1⁺) 미세아세포는 정상군에서는 섬유막 같은 망상조직으로 진행됨을 발견하였으며(Fig. 2-18A), 대조군의 경우 허혈/재관류 4일 후 미세아세포의 진행이 비대해졌고 Iba-1 면역반응은 유의적으로 증가하였음(Figs. 2-18B and H). DPE, PE 그리고 PA 처리군에서 미세아세포가 활성화되었고, Iba-1 면역반응은 유의적으로 증가하였음(Figs. 2-18C-E). PD, PD₂ 처리군에서는 휴면상태의 미세아세포가 많이 발견되었고 Iba-1 면역반응은 정상군과 유사하였다(Figs. 2-18F, G and H).

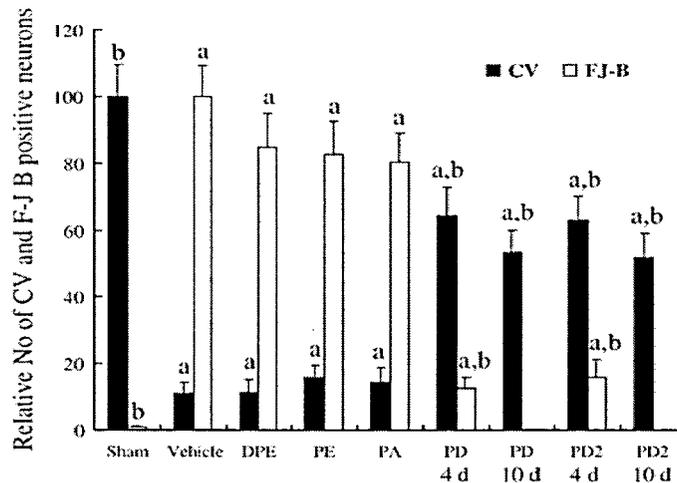


Fig. 2-16 Relative numeric analysis (No) of CV⁺ and F-J B⁺ CA1 pyramidal neurons.

aP<0.05, significantly different from the sham group; bP<0.05, significantly different from the vehicle-treated group). The bars indicate the means±SEM.

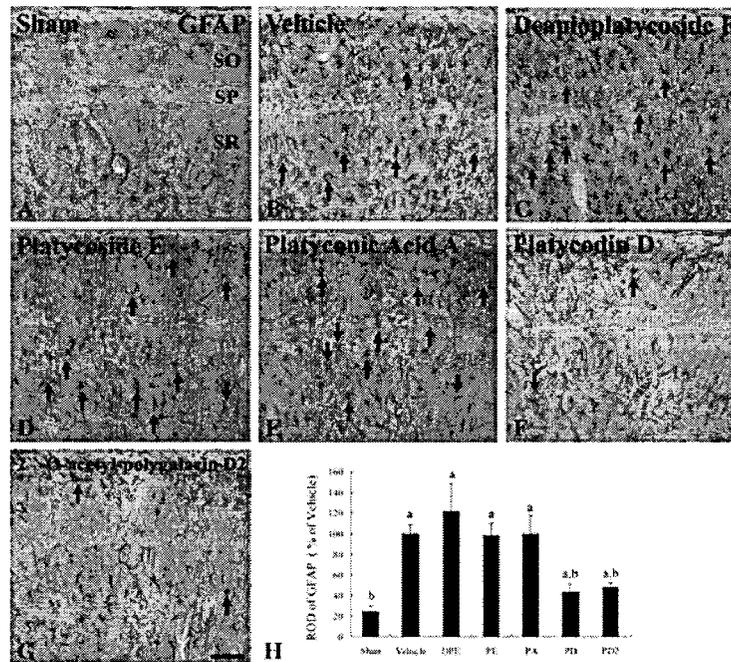


Fig. 2-17 GFAP immunohistochemistry in the CA1 region in sham (A), vehicle- (B), DPE- (C), PE- (D), PA- (E), PD- (F) and PD2-treated (G) groups 4 days after ischemia/reperfusion. Arrows indicate the activated astrocytes which have a punctuated cytoplasm. SO; stratum oriens, SP, stratum pyramidale SR, stratum radiatum. Bar=200 μ m. H: Relative optical density (ROD) as % of GFAP immunoreactivity in the sham, vehicle-, DPE-, PE-, PA-, PD- and PD2-treated groups. aP<0.05, significantly different from the sham group; bP<0.05, significantly different from the vehicle-treated group). The bars indicate the means \pm SD.

3) Cu, Zn-superoxide dismutase(SOD1) 면역반응에 대한 영향

정상군의 경우 SOD1 면역반응은 CA1영역의 피라미드 세포층에서 주로 발견되었고 (Fig. 2-19A). 대조군의 경우 해마의 CA1영역의 조금의 SOD1⁺세포가 발견되었다(Fig. 2-19B). DPE, PE 그리고 PA 처리군의 SOD1 면역반응은 정상군에 비해 피라미드층이 현저하게 감소하였음(Fig. 2-19C-E and H). PD, PD₂ 처리군에서는 피하미드층이 정상군과 유사하였음(Fig. 2-19F-H).

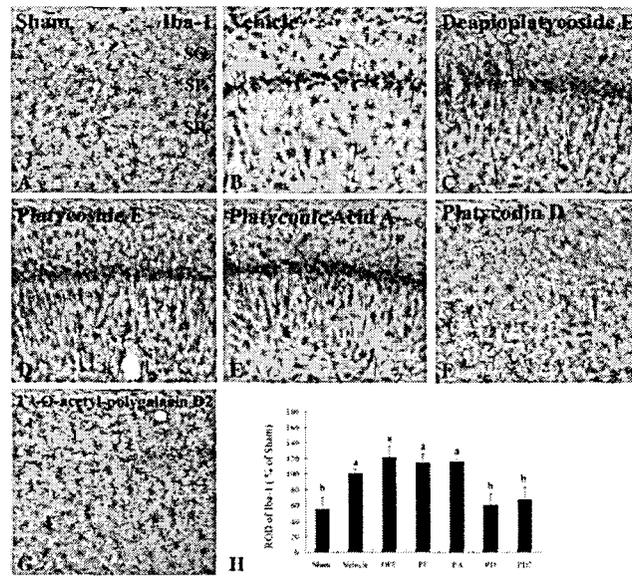


Fig. 2-18 - Iba-1 immunohistochemistry in the CA1 region in sham (A), vehicle- (B), DPE- (C), PE- (D), PA- (E), PD- (F) and PD2-treated (G) groups 4 days after ischemia/reperfusion. SO; stratum oriens, SP, stratum pyramidale SR, stratum radiatum. Bar=200 μ m. H: Relative optical density (ROD) as % of Iba-1 immunoreactivity in the sham, vehicle-, DPE-, PE-, PA-, PD- and PD2-treated groups ($aP < 0.05$, significantly different from the sham group; $bP < 0.05$, significantly different from the vehicle-treated group). The bars indicate the means \pm SD.

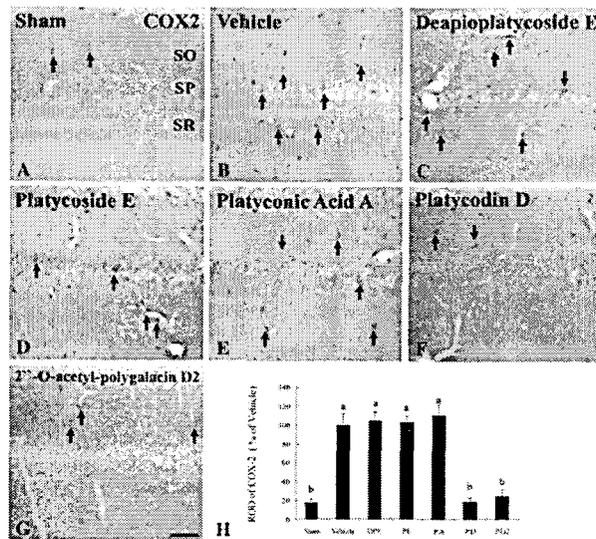


Fig. 2-19 - COX-2 immunohistochemistry in the CA1 region in sham (A), vehicle- (B), DPE- (C), PE- (D), PA- (E), PD- (F) and PD2-treated (G) groups 4 days after ischemia/reperfusion. . SO; stratum oriens, SP, stratum pyramidale SR, stratum radiatum. Bar=200 μ m. H: Relative optical density (ROD) as % of COX-2 immunoreactivity in the sham, vehicle-, DPE-, PE-, PA-, PD- and PD2-treated groups. $aP < 0.05$, significantly different from the sham group; $bP < 0.05$, significantly different from the vehicle-treated group). The bars indicate the means \pm SD.

4) Cyclooxygenase-2(COX-2) 면역반응에 대한 영향

정상군의 경우 CA1영역에서 COX-2⁺세포가 거의 발견되지 않았으나 대조군의 경우 많은 COX-2⁺세포가 발견되었다(Fig. 2-20A and B). DPE, PE 그리고 PA 처리군의 경우 대조군과 유사하게 많은 COX-2⁺세포가 관찰되어졌으며, 약간의 COX-2⁺세포에서 맥관구조가 발견되었다(Fig. 2-20C-E). 그러나 PD, PD₂ 처리군에서는 CA1영역에서 거의 발견되지 않았으며, 대조군에 비해 유의적으로 감소하였다(Fig. 2-20F-H).

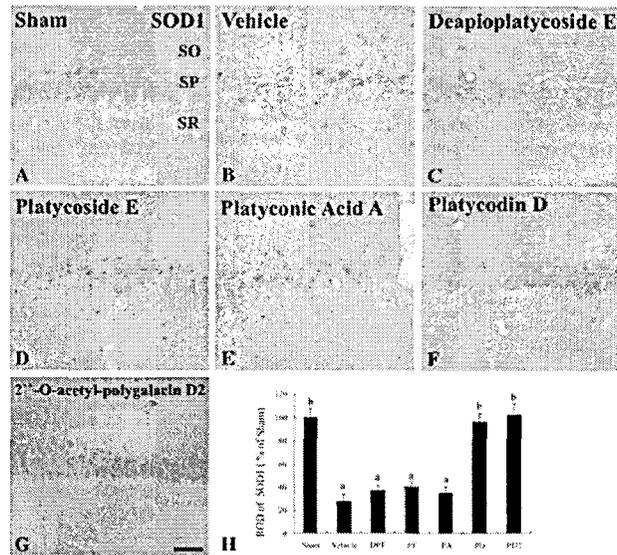


Fig. 2-20 - SOD1 immunohistochemistry in the CA1 region in sham (A), vehicle- (B), DPE- (C), PE- (D), PA- (E), PD- (F) and PD2-treated (G) groups 4 days after ischemia/reperfusion. SO; stratum oriens, SP, stratum pyramidale SR, stratum radiatum. Bar=50 μ m. H: Relative optical density (ROD) as % of SOD1 immunoreactivity in the sham, vehicle-, DPE-, PE-, PA-, PD- and PD2-treated groups (aP<0.05, significantly different from the sham group; bP<0.05, significantly different from the vehicle-treated group). The bars indicate the means \pm SD.

5) Nuclear factor kappa B(NF- κ B) 면역반응에 대한 영향

정상군의 경우 해마의 CA1영역에서 NF- κ B⁺세포가 거의 발견되지 않았으나 대조군의 경우 많은 NF- κ B⁺세포가 발견되었다(Fig. 2-21A and B). DPE, PE 그리고 PA 처리군의 경우 대조군과 유사하게 많은 NF- κ B⁺세포가 관찰되었으나, PD, PD₂ 처리군에서는 해마의 CA1영역에서 약간의 NF- κ B⁺세포가 발견되었다(Fig. 2-21C-G).

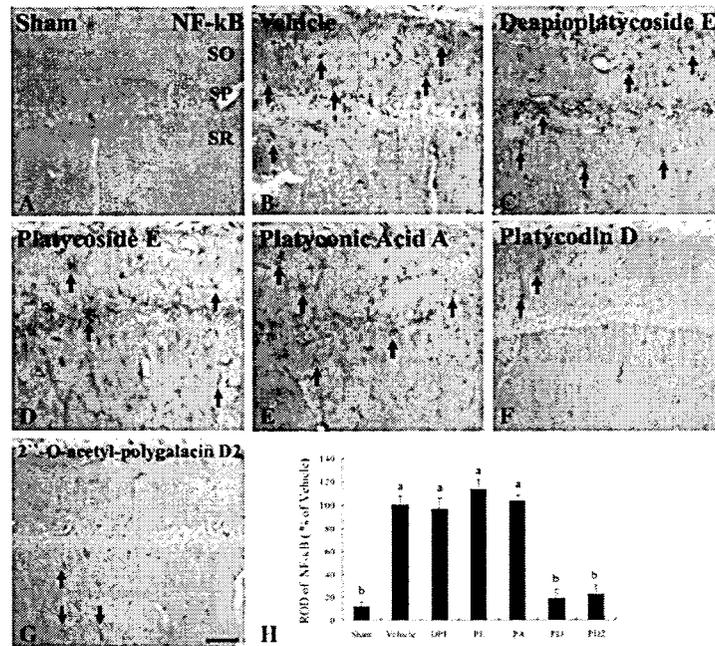


Fig. 2-21 - NF- κ B immunohistochemistry in the CA1 in sham (A), vehicle- (B), DPE- (C), PE- (D), PA- (E), PD- (F) and PD2-treated (G) groups 4 days after ischemia/reperfusion.

SO; stratum oriens, SP, stratum pyramidale SR, stratum radiatum. Bar=200 μ m. H: Relative optical density (ROD) as % of NF- κ B immunoreactivity cells in the sham, vehicle-, DPE-, PE-, PA-, PD- and PD3-treated groups (aP<0.05, significantly different from the sham group; bP<0.05, significantly different from the vehicle-treated group). The bars indicate the means \pm SD.

결론적으로 PD, PD2 처리는 허혈성 손상으로부터 피라미드 뉴런을 보호하고 글리아 세포(glial cell)의 활성을 억제시키고, 허혈/재관류에 의해 손상된 해마 CA1영역의 신경염증을 유의적으로 감소시켰다. 이상의 결과는 도라지추출물에서 분리한 사포닌이 뇌허혈 유발에 따른 지연성 신경세포사로 인한 신경세포의 손상을 효과적으로 보호할 수 있음을 보여주고 있다.

제 3 절 도라지 사포닌의 약동력학 연구

신약개발 초기단계에서 수행되는 약효가 확인된 유효물질들의 약물성과 독성 (ADME/Tox)을 *in vitro/in vivo* 상태에서 효율적으로 분석 평가 지원하고, 기존의 알려진 화합물의 특성을 미리 예측하는 *in silico* 예측기술을 이용하여 약물성이 우수한 화합물을 선별하여 집중연구 할 수 있도록 하는 연구가 약동력학 연구이다.

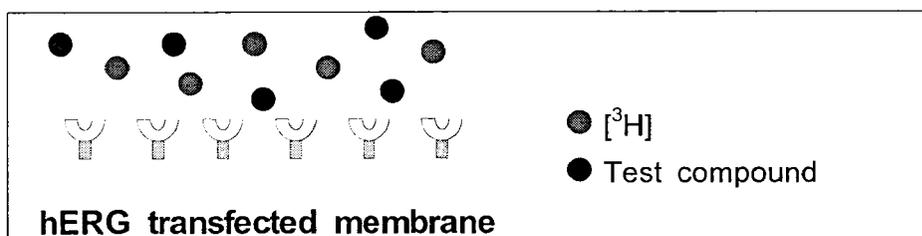
따라서 본 연구에서 수행중인 도라지 사포닌들 중 주요 사포닌들에 대하여 *in vitro/in vivo* 약동력학 연구를 수행함으로써 약물로서의 문제점을 찾고자 하였다.

1. hERG K⁺ Channel binding assay

가. 측정원리 및 방법

최근 시판중인 여러 약물들이 돌연사라는 부작용으로 시장에서 퇴출되었으며, 이러한 돌연사는 약물들이 hERG potassium channel을 저해해 electrocardiogram (ECG) QT interval을 증가시켜 TdPa를 일으키기 때문이라고 밝혀졌다. 수천억원을 들여 개발된 신약이 시장에서 퇴출됨으로 제약업체들은 큰 타격을 입었으며, 현재는 모든 신약개발 프로그램에서 hERG potassium channel을 저해하는 약물들은 초기에 탈락시키고 있다.

따라서 본 연구에서도 hERG(Human Ether a-go-go Related Gene) binding assay를 통하여 도라지 사포닌들의 심장에서의 부작용 여부를 확인하고자 하였다. hERG K⁺ channel을 발현하는 stable cell line (CHO)을 이용한 receptor binding assay 진행하여 기존에 잘 알려진 hERG억제제인 3H-Astemizole, 3H-dofetilide, 35S-MK-499 중의 하나인 3H-astemizole을 이용하여 hERG transfected membrane에 측정하고자 하는 약물과의 경쟁적 결합률을 측정함으로써 화합물에 대한 hERG screening에 이용할 수 있는 방법을 이용하였다.



나. 실험 결과

실험 결과 platycodin D₂, platycodin D₃, 및 platycoside E는 EC₅₀이 100uM이상으로 상당히 안전한 화합물로 판명되었다. 그러나 platycodin D는 다른 화합물들에 비하여 EC₅₀가 낮은 농도인 11uM인 것으로 나타나 도라지 추출물의 이용시 platycodin D의 함량에 유의 하여야 할 것으로 사료된다. 현재는 platycodin D의 함량이 서로 다른 중국도라지와 한국 도라지의 조사포닌에 대하여 또 다른 심장독성을 확인 할 수 있는 방법인 patch clamp 방법으로 연구를 수행하고 있다.

Table 3-1. 도라지 사포닌들의 hERG K⁺ Channel binding assay 결과

Sample I.D.	측정방법	EC ₅₀	비고
platycodin D	[³ H]Astemizolebinding	11uM	
platycodin D2	“	>100uM	
platycodin D3	“	>100uM	
platycoside E	:	>100uM	
Control (Astemizole)	”	5.95nM	

2. *In vitro* metabolic stability 에 관한 연구

가. 측정원리 및 방법

대사안정성은 약물의 Clearance, Half-life, Oral bioavailability와 같은 PK parameter등에 영향을 미칠 수 있는 요인으로서 Drug candidate가 지녀야 할 중요한 특성으로 간주되고 있다. 약물 대사의 주요 장기인 간에 의한 약물의 대사 정도를 *in vitro* 실험을 통하여 예측하는 실험으로 liver microsome 또는 hepatocyte 등 metabolically active system을 사용하여 약물의 대사 안정성을 평가한다.

약물대사반응의 과정은 크게 Phase I과 Phase II로 나누어 진다. Phase I 반응은 약물이 산화, 환원, 가수분해 등을 받아서 극성기를 생성하며 주로 microsome 분획에 존재하는 약물대사 효소계에 의해서 이루어진다. Phase II 반응은 포합반응으로 glucuronate, sulfate, glutathione 등의 생체성분이 결합하는 것으로 주로 세포질에서 이루어지며 glucuronidation 반응은 microsome에서 이루어진다.

metabolic stability 실험은 다양한 metabolizing enzyme을 포함하고 있는 species-specific (mouse, rat, human) liver microsome을 이용하여 NADPH와 반응시킨 후 LC/MS/MS로 정량하여 약물의 stability를 판단한다.

대사 가능성 문제를 피하기 위하여는 최소한 60% 이상의 값을 지니는 화합물이 이상적이나 liver microsomal stability는 화합물마다 조건에 따라서 달라질 수 있다. 실험 결과의 판단 기준은 아래와 같다.

- 30분간의 반응실험결과인 % remaining 값에 따른 microsomal stability 평가기준
- > 90% : 반감기가 3시간이상으로 매우 안정한 화합물
- 70~90% : 반감기가 1~3시간 정도로 안정한 화합물로 판단
- 50~70% : 반감기가 30~60분 정도로 비교적 안정한 화합물
- 30~50% : 반감기가 15~30분 정도로 비교적 불안정한 화합물
- 30%미만: 반감기가 15분 이하로 불안정하며 대사가 빨리될것으로 예상되는 화합물

나. 실험결과

platycodin D₃ 를 제외한 화합물은 간마이크로솜에서 안정하며 대사의 영향을 적게 받을 것으로 예상되며, platycodin D₃ 은 human liver microsomal stability 가 좋지 않으며, 간대사 속도가 빠를 것으로 예상됩니다.

Table 3-2. Human liver microsomal stability (% Remaining during 30 min)

Compound	% Remaining	Half-life (min) **
platycodin D	> 99%	(>300 min)
platycodin D ₂	> 99%	(>300 min)
platycodin D ₃	36.9 ± 12.5	(21.8 ± 8.2 min)
platycoside E	> 99%	(>300 min)

** 30분 % remaining 양을 이용한 반감기 시간을 나타냄

3. Protein binding assay

가. 측정원리 및 방법(20 uM)

약물과 혈장 단백질의 결합은 약물의 흡수, 분포, 대사 및 배설에 대한 전반적인 약동력학 profile에 영향을 주는 요소이다. 또한 혈장 단백질과 결합하지 않은 free form의 약물이 약효를 나타내므로 단백질결합율은 약물의 용량 설정 및 안전성에도 중요한 인자로 작용한다. 대부분의 약물은 보통 알부민(혈장 6~8%의 단백질함유, 그 중 50%함유)에 가역적으로 결합한다. 많은 약물이 혈중에서 알부민(albumin)등과 결합형으로 존재하여 이러한 단백질결합이 조직으로의 이행을 저해하는 주인자로 작용하게 된다. 조직으로의 이행은 비결합형(유리형) 약물만이 이행이 가능하기 때문에 약물투여 후 평형상태에서는 혈장과 조직내 유리형 약물 농도만이 같아지게 된다. 혈장단백과의 결합은 동적인 과정이며 유리형 약물이 조직중으로 이동하며 결합형 약물의 평형이 이동하여 유리형이 보충된다.

단백결합의 측정에는 equilibrium dialysis, ultracentrifugation, ultrafiltration 방법 등이 이용되며 결합율에는 단백질 및 약물의 농도, pH, 온도 등의 영향을 받는다. Ultrafiltration 방법을 이용하여 plasma에 일정한 농도의 약물을 첨가하여 반응시킨후 원심분리하여 filter를 통과한 free form 약물을 측정하여 단백질결합율을 확인한다. 또한 recovery를 확인하여 filter membrane에 대한 약물의 nonspecific binding정도를 확인한다.

나. 실험 결과

platycodin D₃의 혈장단백결합율은 47% 수준으로 낮았고 platycodin D 및 platycodin D₂는 91.7~93.3 % 수준으로 약간 높은 단백질결합율을 나타내며 혈장에서의 안정성은 모든 화합물 모두 30분 동안 83% 이상으로 안정할 것으로 판단됩니다.

Table 3-3. Plasma protein binding rate and stability during 30 min in rat plasma

	<i>Protein binding (%)</i>	<i>Plasma stability (%)</i>
platycodin D	93.3 ± 0.5	>99
platycodin D ₂	91.7 ± 1.2	87.3 ± 0.5
platycodin D ₃	47.0 ± 7.3	83.3 ± 9.1
platycoside E	52.2	88.9 ± 8.2

4. CYP450 Screening assay

가. 측정원리 및 방법

Test compound의 CYP의 효소 활성 저해 정도를 측정함으로써 약물간의 상호작용을 예측할 수 있는 assay로서 약물A가 CYP3A4에 의해 대사 된다면, 그 약물의 개발 과정에서 약물의 대사까지 고려하여 용량을 결정합니다. 그런데 CYP3A4의 작용을 inhibition하는 효과가 있는 약물 B와 약물 A를 병용 투여하는 경우, CYP3A4에 의한 A약물의 정상적 대사가 저해됨으로 인해, A약물의 혈중농도가 높아져, 이 경우 A약물의 높아진 혈중 농도는 높은 약효로 나타날 수 있지만 독성 또한 높아질 가능성이 높습니다. 문제는 이러한 상황이 정확히 예상되거나 control할 수 없다는데 있기에 CYP inhibition 효과가 큰 약물은 아무리 그 자체로서는 안전하더라도 다른 약물에 의해 독성이 나타날 수 있기 때문에 그 사용은 상당히 제한될 가능성이 높다는 것입니다. 따라서 CYP와 관련된 약물상호작용을 예측하기 위해서는 어떤 isozyme을 주로 억제하는지에 대한 정보가 우선 필요합니다. 중요한 CYP효소로는 CYP3A4(28%) CYP2C9(20%) CYP1A2(12%) CYP2E1(6%) CYP2D6(4%) CYP2C19등이 있습니다.

CYP450 Screening assay는 metabolism and inhibition (of the predominant human P450 isozymes involved in hepatic drug metabolism: CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 and CYP3A4)를 평가하기 위해 고안되었습니다. CYP450 BACULOSOMES® 시료는 human P450 isozyme and rabbit NADPH-P450 reductase를 나타내는, 곤충 세포에서 추출한 microsomes입니다. The Vivid® Substrates는 제품에 들어 있는 수용성 형광물질을 투입하여, 특정 CYP450 enzyme에 의해 변화(대사)됩니다. Figure 1. 은 형광물질의 metabolite를 투입하여 Vivid® CYP450 Substrate의 대사 작용을 설명한 그림입니다. Vivid® Substrates가 대사작용을 위해 두 개의 potential sites를 가지는 것 (Figure 1)과 산화 반응이 일어나는 것(형광 대사 물질에 의해 시각화 됨)에 주목하십시오.

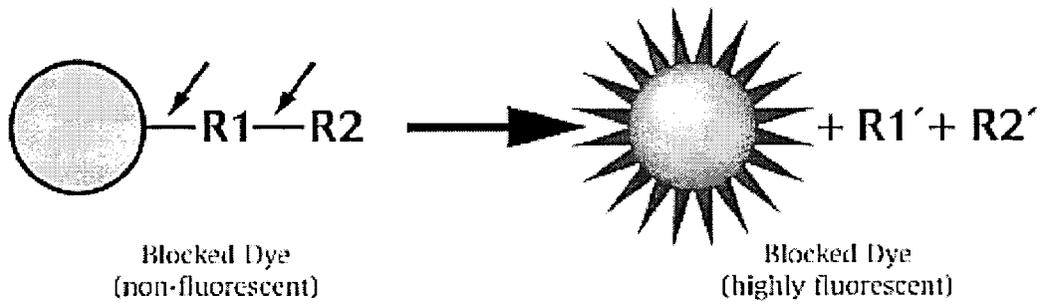


Figure 1. Schematic of the metabolism of the “blocked” dye substrate into a fluorescent metabolite

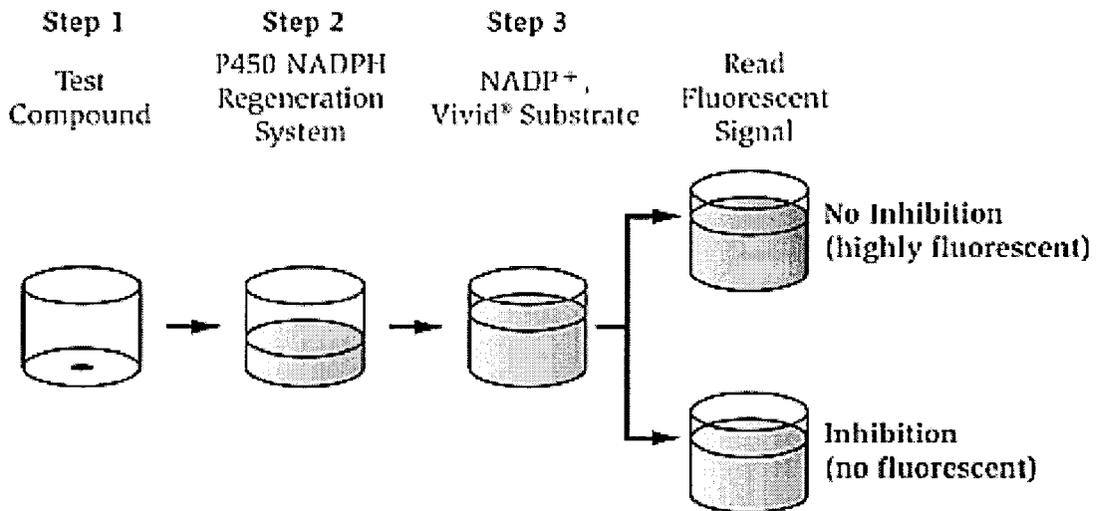


Figure 2. Three-step CYP450 screening protocol

나. 실험 결과

실험 결과 Table 3-4와 같이 CYP 1A2, CYP 2C9, CYP 2C19, CYP 2D, CYP 3A4, 에서 도라지 사포닌 platycodin-D2, platycodin-D3, platycoside-E, platycodin-D들은 $10^{-9} \sim 10^{-4}M$ 에서 CYP inhibition을 하지 않는 것으로 사료된다.

Table 3-4. % CYP 1A2 inhibition of compound

CYP	Compounds	$10^{-9}M$	$10^{-8}M$	$10^{-7}M$	$10^{-6}M$	$10^{-5}M$	$10^{-4}M$
1A2	platycodin-D2	≈0	≈0	≈0	≈0	≈0	11.19
	platycodin-D3	≈0	≈0	≈0	≈0	≈0	16.41
	platycoside-E	≈0	≈0	≈0	≈0	≈0	9.20
	platycodin-D	≈0	≈0	≈0	0.90	0.83	1.79
	Inhibitor (α -Naphthoflavone)	3.36	24.12	48.78	95.54	96.96	97.40
2C9	platycodin-D2	≈0	≈0	≈0	≈0	5.65	0.01
	platycodin-D3	≈0	≈0	≈0	8.89	14.40	29.81
	platycoside-E	≈0	≈0	5.16	3.77	1.99	19.40
	platycodin-D	10.18	12.73	14.53	11.49	24.67	15.60
	Inhibitor (Sulfaphenazole)	0.97	14.94	38.33	44.77	83.30	77.40
2C19	platycodin-D2	$10^{-9}M$	$10^{-8}M$	$10^{-7}M$	$10^{-6}M$	$10^{-5}M$	$10^{-4}M$
	platycodin-D3	≈0	≈0	≈0	0.02	1.34	26.64
	platycoside-E	≈0	≈0	≈0	≈0	1.75	30.39
	platycodin-D	≈0	≈0	≈0	0.52	5.56	31.24
	Inhibitor (Ketoconazole)	≈0	≈0	≈0	3.43	3.53	18.47
2D6	platycodin-D2	$10^{-9}M$	$10^{-8}M$	$10^{-7}M$	$10^{-6}M$	$10^{-5}M$	$10^{-4}M$
	platycodin-D3	≈0	≈0	≈0	≈0	≈0	22.71
	platycoside-E	≈0	≈0	≈0	12.07	7.80	27.78
	platycodin-D	≈0	≈0	≈0	≈0	10.27	31.35
	Inhibitor (Quinidine)	≈0	≈0	≈0	3.14	9.72	29.42
3A4	platycodin-D2	$10^{-9}M$	$10^{-8}M$	$10^{-7}M$	$10^{-6}M$	$10^{-5}M$	$10^{-4}M$
	platycodin-D3	0.62	4.55	1.53	6.44	5.45	25.71
	platycoside-E	≈0	≈0	≈0	4.52	4.89	22.20
	platycodin-D	≈0	≈0	≈0	≈0	9.71	37.77
	Inhibitor (Ketoconazole)	≈0	≈0	≈0	≈0	≈0	12.13

5. *In vivo* pharmacokinetic 에 관한 연구

가. 실험방법

화합물의 *in vivo* 흡수, 분포, 대사 및 배설 등 체내 동태 변화를 확인하는 실험으로 약물의 약효 및 독성 발현과 상관성이 있다. 주로 SD rat을 이용하여 실험한다. Rat의 경정맥 및 대퇴정맥에 tube를 삽입하고 정맥투여의 경우 대퇴정맥으로 약물을 투여하며 경구투여의 경우 구강으로 약물을 투여한 후 경정맥으로부터 정해진 시간에 채혈한다. 혈액은 원심분리하여 혈장을 분리하고 적정 유기용매를 사용하여 혈장 및 뇨 시료를 전처리한 후 LC-MS/MS로 농도를 분석한다.

경구 및 정맥 투여 후 분석한 compound의 혈중 농도-시간 데이터로부터 WinNonlin(Pharsight, USA)을 이용하여 아래와 같은 noncompartmental pharmacokinetic parameter를 산출한다.

Pharmacokinetic parameter	
Cmax	maximum plasma concentration
T _{1/2}	terminal half-life
AUC _{0-time}	areas under the plasma concentration-time curve
AUC _{0-∞}	areas under the plasma concentration-time curve from time zero to time infinity
CL	total clearance from plasma
V _{ss}	steady-state volume of distribution
MRT	mean residence time
A _e in Urine time	total amount excreted in urine as drug from time zero to last time
A in GI time	total amount recovered from entire gastrointestinal tract as drug from time zero to last time
F	bioavailability, the ratio of AUC values between p.o. and i.v. $(AUC_{p.o.} / AUC_{i.v.}) \times 100$

나. 실험 결과

1) Platycodin D(SA-286)에 대한 *in vivo* Pharmacokinetics 시험결과

SA-286화합물을 정맥 10 mg/kg 용량, 경구 30mg/kg 용량투여 후의 약물 동태 프로파일은 Table 3-4와 Fig. 3-1과 같다. SA-286의 경우 정맥투여 후 24시간까지의 AUC_{0-24h}값은 114.4 였으며 무한시간까지의 AUC_{0-∞}예상값은 150.4(IV) (mg·hr/mL) 이고, 경구투여의 경우 8시간까지의 AUC_{0-8h}값은 1.2였으며 무한시간까지의 AUC_{0-∞}예상 값은 1.4이며, SA-286화합물의 정맥 및 경구투여 후 24시간까지의 뇨 배설은 정맥에서 0.14%, 경구에서 0.02% 수준이었으며 경구 투여 시 위장관 잔류량은 1.1% 수준으로 소량이 위장관에 잔류하고 있다.

특히 SA-286의 T_{1/2}는 1.7시간이나 실제로는 분해되어 platycodigenin(SA-695)형태로 위장관내에 24시간 후에도 53%가 존재하는 것으로 나타났다. 이는 앞으로 연구를 계속 진행하여야 할 것으로 사료된다.

Table 3-4. Pharmacokinetic parameters after an iv and oral administration (10 mg/kg, 30 mg/kg) in SD male rats (n=3)

Parameters	SA-286(IV)	SA-286(PO)	SA-695(IV)	SA-695(PO)
T _{max} (hr)	-	2.3 ± 1.5	-	-
C _{max} (mg/mL)	-	0.3 ± 0.2	-	-
T _{1/2} (hr)	12.6 ± 9.4	1.7 ± 1.4	-	-
AUC _{0-8h} (mg·hr/mL)	114.4 ± 7.5	1.2 ± 0.8	-	-
AUC _{0-∞} (mg·hr/mL)	150.4 ± 29.6	1.4 ± 1.0	-	-
CL (L/kg/hr)	0.07 ± 0.01	-	-	-
V _{ss} (L/kg)	1.0 ± 0.2	-	-	-
MRT(hr)	15.8 ± 6.9	3.8 ± 0.9	-	-
Ae in Urine _{8h} (%ofdose)	0.14 ± 0.03	0.02 ± 0.03		
A in GI _{24h} (%ofdose)	-	18.7 ± 5.0		53.0 ± 18.1
F _{24hr} (%)		1.1		

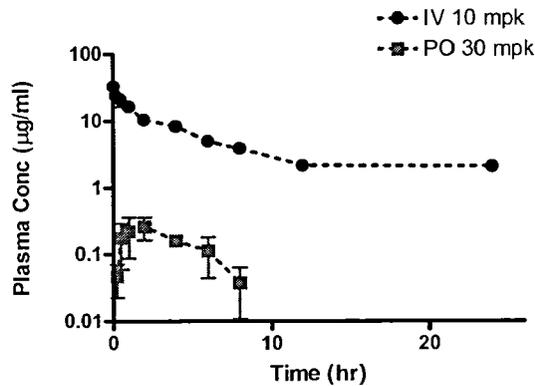


Fig. 3-1 Plasma concentration-time plots after an iv(●) and oral(■) administration (10 mg/kg, 30 mg/kg) in SD male rats(n=3).
 Drug preparation (10~30 mg/kg dose; 2 ml/kg volume) : 10 mg of drug /2 ml in PEG400:Saline:DMSO = 40:55:5 (%)

2) Platycoside E(SA-285)에 대한 *in vivo* Pharmacokinetics 시험결과

SA-285는 IV투여 후 빠른 속도로 소실 ($T_{1/2}=0.25h$)되며, 87%가 Urine으로 배설되며, SA-285의 경구투여 후 T_{max} 는 1.3시간이었고, Urine으로 배설되는 비율이 4%미만으로 IV 투여 결과와 다른 양상을 보였으며, 37%가 SA-695(platycodigenin)로 전환되어 장관내 존재하는 것으로 나타났다. 그리고 SA-285는 IV, PO투여 모두 SA-695의 혈중농도는 LOD (Limit of detection)이하의 극히 미량 존재하였다.

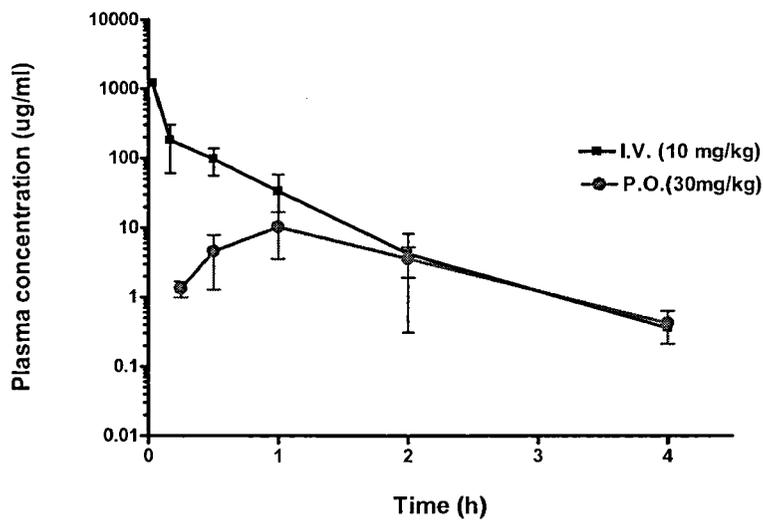


Figure 3-2 . Plasma concentration-time plots after an iv and oral administration in SD male rats (n=3/group)

Table 3-5. Pharmacokinetic parameters after an iv and oral administration

Parameters	SA-285 (IV)	SA-285(PO)	SA-695(IV)	SA-695(PO)
T _{max} (hr)	-	1.3 ± 0.58		
C _{max} (mg/mL)	-	10.9 ± 11.2		
T _{1/2} (hr)	0.25 ± 0.126	0.55 ± 0.13		
AUC _{0-24h} (mg·hr/mL)	209.5 ± 44.2	15.6 ± 11.2		
AUC _{0-∞} (mg·hr/mL)	211.6 ± 42.7	15.8 ± 16.3		
CL (L/kg/hr)	48.5 ± 8.85	-		
V _{ss} (L/kg)	16.4 ± 11	-		
MRT(hr)	0.32 ± 0.18	1.37 ± 0.19		
Ae in Urine 24h(%ofdose)	87 ± 41.2	3.9 ± 2.91	0.7± 0.18	1 ± 0.89
A in GI 24h(%ofdose)		0.1 ± 0.1		37.3 ± 0.39
F (%)		2.48		

제 4 절 인지기능개선 건강기능식품의 산업화 연구

1. 장생도라지 유래 인지능력 저하개선 기능성 물질의 대량 생산공정 개발 및 제품화 기반 기술 구축

가. 장생도라지 열수추출물 및 주정추출물들의 최적화

- 열수추출물의 대량생산공정은 표준화가 완료되었고, 각 공정별 기준 및 규격이 확립되었으며 지표물질 및 확인물질의 특성이 조사하였다.

나. 유용물질 분획별 특성 및 지표물질 등

- 장생도라지 유래 인지기능개선 기능성 물질의 대량생산 방법을 기능성, 안전성, 생산설비 등 기반설비 및 개별인정 획득의 용이성 측면 등을 종합적으로 검토한 결과 다음과 같은 결론을 도출하였다.

- 인지기능개선용 물질 : 장생도라지 열수추출물

- 지표성분 : 사포닌

- 성분확인 : platycodin D 또는 deapioplatycoside E

다. 고 사포닌 장생도라지 원료생산 방법, 원료의 전처리 최적방법, 추출·농축방법, 제품화 공정 등이 확립하였다.

2. 장생도라지 유래 인지기능개선 기능성 물질의 표준화

가. 장생도라지 유래 인지기능 개선 기능성 물질의 원료 의 기능성 물질의 표준화를 위해 품질관리를 위한 모든 공정을 '건강기능식품 기능성원료 인정에 관한 규정'을 토대로 세부 기준규격 및 조건을 결정하였다.

나. 주요규격 및 공정의 조건은 아래와 같다.

- 인지기능개선용 원료 : 장생도라지 열수추출물

- 제형 : 농축액(고형분 함량 60% 이상)

- 기능성분 : 사포닌 30mg/g의 80~120%

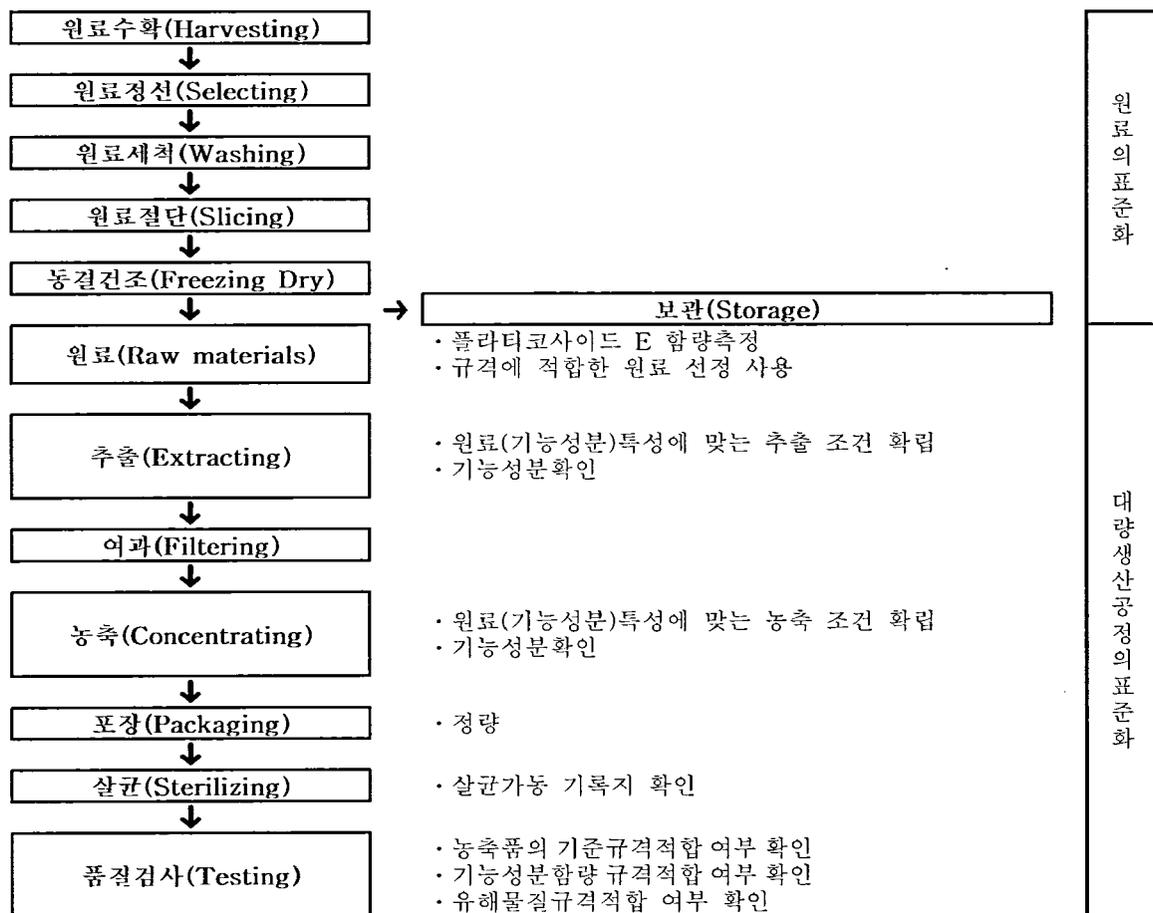
- 성분확인 물질 : 플라티코사이드 E

다. Small scale 실험에서 전 제조공정 중에 기능성물질의 안정성 및 품질관리

를 위한 표준화 방법이 확보되었으며, 이 규격 및 제조공정 세부조건을 토대로 양산체계구축하였다.

3. 상품화 기술 표준화 및 수출판로 개척

대량생산 제조공정 중 기능성분의 안정성 확보 및 표준화 체계구축 완료하여 원료 및 대량생산공정의 표준화를 확립하였으며 3롯트 3반복 실험을 통한 공정의 표준화를 완료하였다.



가. 유형별 제품개발 기술 및 제조공정의 최적화

- 1) 장생도라지 열수추출물을 함유한 연질캡슐 개발(건강기능식품 제형) → 시작 품제작 완료

(가) 원료명 및 배합비율

원재료명	배합비율(%)
장생도라지 열수추출물 (고형분 60%)	37.5
○○○	35
밀 납	8
대두레시틴	1.5
○○○	13
밀크씨슬	○○
합 계	100

(나) 건강기능식품의 기준 및 규격

항 목	세 부 내 용	
건강기능식품의 유형	<ul style="list-style-type: none"> 장생도라지 성분함유 제품 장생도라지 열수추출물(고형분 60%)을 주원료 [가용성 장생도라지 성분(장생도라지 사포닌 30mg/g을 기준으로 할 때)] 37.5%로 하여 제조·가공	
기능성분 (또는 지표성분)의 함량	<ul style="list-style-type: none"> 기능성분 또는 지표성분의 함량[조사포닌] : 11.25mg/g(1캡슐) 성분확인물질 : 플라티코사이드 E 	
제조기준	<ul style="list-style-type: none"> 원 재 료 : 장생도라지 열수추출물 제조방법 : <ul style="list-style-type: none"> -장생도라지 열수추출물을 연질캡슐로 제형화하여 식용에 적합하도록 함. -상기 제품(연질캡슐) 대량생산 공정에 따라 식용에 적합하도록 함. -기능성분 또는 지표성분의 함량[조사포닌] : 11.25mg/g 	
규 격	<ul style="list-style-type: none"> 성 상 : 명적색의 연질캡슐(고유의 색택과 향미를 가지며 이 미·이취가 없어야 함.) 기능성분(또는 지표성분)의 함량[사포닌] : 표시량의 80~120% 대장균군 : 음성 붕해시험 : 적합 	
최종 제품의 요건	기능성내용	인지기능개선에 도움을 줌 (식약청 원료인정 신청 예상 기능성)
	일일섭취량	1일 3회, 1회 3캡셀

(다) 대량생산공정 확립

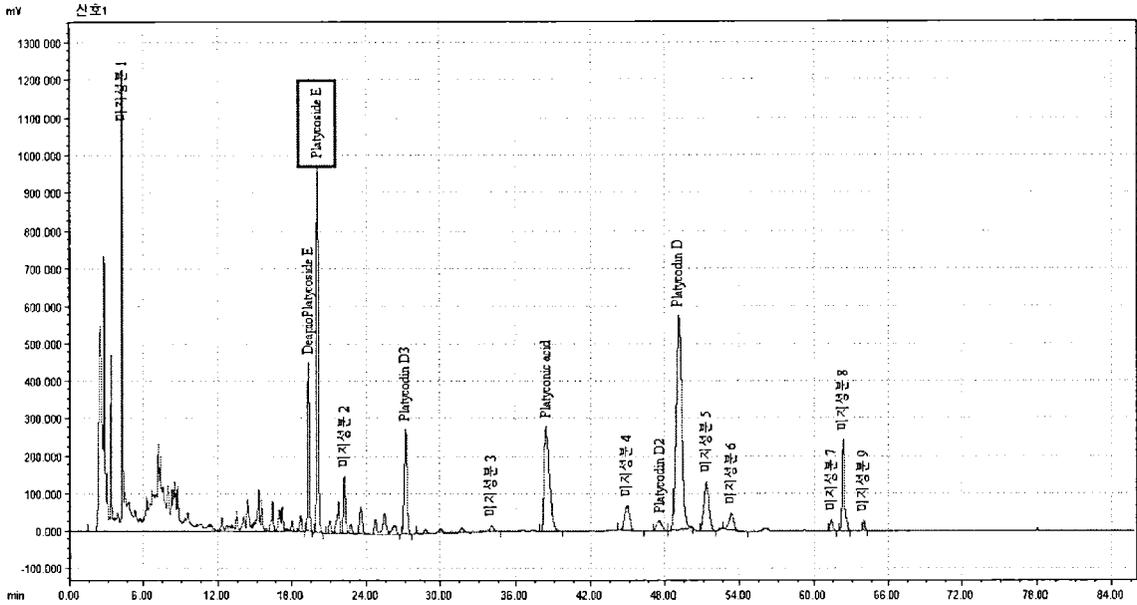
세부공정	주요내용	검사항목	판정 (적/부)
원료의 구입 및 선별	<ul style="list-style-type: none"> 원료는 건강기능식품의 제조기준 및 규격에 적합한 원료를 선별하여 국내외에서 구입 		
칭량	<ul style="list-style-type: none"> 각 액상원료 및 분말원료를 전자저울 (1g~35kg)을 사용하여 칭량함 		
캡셀기제 제조	<ul style="list-style-type: none"> 젤라틴, 정제수, 글리세린, 식용색소적색40호, 이산화티타늄, 식용색소적색3호, 식용색소황색5호, 식용색소청색1호를 용해탱크에 넣고 30분간 20rpm으로 혼합하고 60분간 550~720mmHg의 진공 혼합하여 캡셀기제를 만듦 (감압시간 : 25~30분) 		
내용물 제조	<ul style="list-style-type: none"> 캡셀기제 원료를 제외한 원료를 혼합기에 투입한 후 90분간 1,000~1,800rpm으로 교반·혼합하여콜로이드밀을 통과시키고 진공 (400~500 mmHg)을 가하며 재혼합 		
반제품 검사	<ul style="list-style-type: none"> 혼합된 원료를 품질관리팀에서 기준·규격의 반제품 시험을 실시 	<ul style="list-style-type: none"> 성상, 수분 대장균군 기능성분함량 	
충전 및 성형	<ul style="list-style-type: none"> 제조된 캡셀기제와 내용물을 사용하여 연결캡셀충전·성형기(온도:14℃, 속도:2.1rpm)에서 1캡셀당 1,000mg단위로 일정하게 충전·성형 		
건조 및 선별	<ul style="list-style-type: none"> 충전·성형된 제품에 대해 덤블러 건조기를 이용하여 1~2 시간 건조한 후 건조실(온도:19-23℃, 습도 : 20-22%)에서 3일간 건조한다. 건조 완료된 캡셀제품을 선별기를 이용하여 이물 및 성형 중 불량인 캡셀을 선별 		
반제품 검사	<ul style="list-style-type: none"> 선별된 제품에 대해 품질관리팀에서 기준·규격의 반제품 시험을 실시 	<ul style="list-style-type: none"> 성상, 수분 기능성분함량 대장균군 붕해시험 	
포장 등	<ul style="list-style-type: none"> 검사결과 적합한 제품에 대해 포장단위에 따라 포장한 후 유통기한 등을 표시 		

(라) 연질캡슐 내 기능성분(또는 지표성분)의 함량 확인

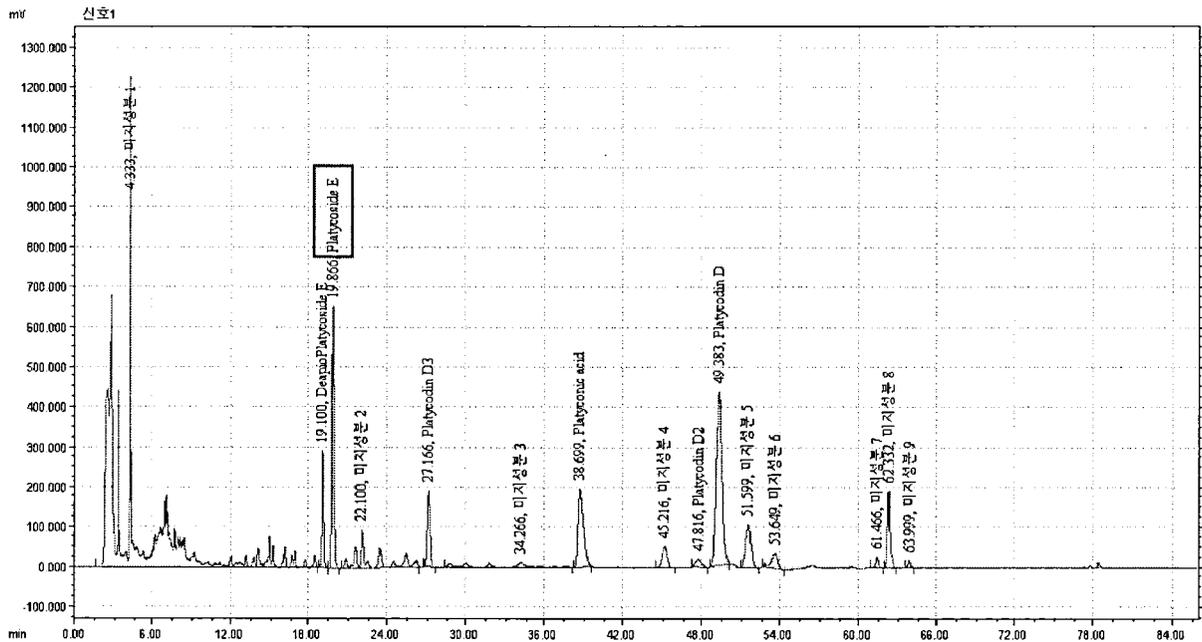
: 건강기능식품 제형인 연질캡슐 내 사포닌 함량은 11.25mg/g(1캡슐)이상의
 로 제조기준에 적합하도록 제조 되었다.

○건강기능식품 기능성원료 :

장생도라지 열수추출물(60Brix) 내 기능성분(또는 지표성분) 확인



○건강기능식품 : 연질캡슐 내 기능성분(또는 지표성분) 확인



2). 장생도라지 활맥단 제품 특성 및 기준규격확립

상기 제조공정에 따라 제조한 시작품으로 품질검사(수분, 미생물 등)를 시행하여 아래와 같이 기준규격을 확립하였다.

항 목	내 용	비 고																		
제 품 명	장생도라지 활맥단																			
제품유형	기타가공품(환제품)																			
제품특성	<ul style="list-style-type: none"> 장생도라지 활용 인지기능개선에 우수한 제품 장생도라지 활용 면역활성이 우수한 제품 식품형태는 대환으로서 개별 포장의 프리미엄급 제품 																			
원재료명 및 배합비율	장생도라지허브농축액[고형분60%, 장생도라지 7%, 장생도라지 분말(국산) 5.8%의 11종, 유당, 유산균, 프락토올리고당, 알로에분말, 치커리이눌린분말, 다시마분말, ○○○분말, 키토산 분말, 녹차추출물분말, 비타민혼합분말(비타민A아세테이트, 비타민C, 비타민B ₁ 염산염, 비타민B ₂ , 비타민D ₃ , DL-α-토코페롤), 글리세린, 자일리톨, 수크랄로스, 자몽종자추출물, 전분																			
품질기준규격	<ul style="list-style-type: none"> 원재료의 기준규격 : 식품공전 및 건강기능식품공전 제품의 기준규격 <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 20%;">항 목</th> <th>기준규격</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>성 상</td> <td>고유향미를 갖는 암갈색 대환으로서 이취가 없는 것</td> </tr> <tr> <td>이 물</td> <td>무</td> </tr> <tr> <td>수 분</td> <td>11%이하</td> </tr> <tr> <td>내 용 량</td> <td>표시량의 97%이상</td> </tr> <tr> <td>붕 해 도</td> <td>적 합</td> </tr> <tr> <td>대장균군</td> <td>음 성</td> </tr> <tr> <td>합성보존료</td> <td>불검출</td> </tr> <tr> <td>합성착색료</td> <td>불검출</td> </tr> </tbody> </table> <p>※ 품질기준에 정하여지지 않은 사항은 식품공전 등 관련법령의 기준에 따름</p>	항 목	기준규격	성 상	고유향미를 갖는 암갈색 대환으로서 이취가 없는 것	이 물	무	수 분	11%이하	내 용 량	표시량의 97%이상	붕 해 도	적 합	대장균군	음 성	합성보존료	불검출	합성착색료	불검출	
항 목	기준규격																			
성 상	고유향미를 갖는 암갈색 대환으로서 이취가 없는 것																			
이 물	무																			
수 분	11%이하																			
내 용 량	표시량의 97%이상																			
붕 해 도	적 합																			
대장균군	음 성																			
합성보존료	불검출																			
합성착색료	불검출																			

항 목	내 용	비 고
포장재질	▪ 폴리에틸렌	
포장방법 및 포장단위	▪ 3.75g/환*10환/박스	
보존 및 유통기준	▪ 직사광선을 피하여 서늘한 곳에 보관하시고 개봉 후에는 변질될 수 있으므로 바로 섭취 ▪ 냉장보관 시 딱딱하게 굳어지므로 실온보관	
섭취량 및 섭취방법	▪ 1회 1환, 1일 3회, 식전에 천천히 씹어서 섭취 ▪ 환표면의 흰 가루는 전분이오니 안심하고 섭취	
섭취 시 주의사항	▪ 특이체질 등 알러지 체질의 경우 성분을 확인하신 후 섭취	
유통기간	▪ 제조일로부터 2년	
주된 기능성	▪ 인지기능개선, 항암면역증진, 간 기능 개선 및 해독, 장 기능 강화	

나. 장생도라지 수출촉진을 위한 국제학술세미나를 2회 개최하여 장생도라지 소재의 약리효능 및 고기능성을 각인시키고 자생식물이용 기술개발사업 세부 추진내역 및 연구진행 경과 홍보와 일본지역 유통체계, 채널 및 현황 파악을 하였으며 해외 박람회(FOODEX JAPAN 2007, 2008)에 참가하여 장생도라지에 대한 해외 인지도를 상승시켰다.

4. 인지기능 개선용 기능성 성분·원료의 개별 인정 조건 확립

가. 건강기능식품 기능성 원료 인정에 관한 규정(개정 2007.06.28 식품의약품안전청고시 제2007-51호)에 의거 장생도라지 유래 인지기능개선 기능성원료 인정 1차 조건 확립완료(제출서류 : 총괄요약본 외 9종) 하였다.

나. 건강기능식품의 제형 제한 삭제에 따른 건강기능식품 기능성 원료 인정에 관한 규정의 일부개정(개정 2008. 11.17 식품의약품안전청고시 제2008-72호)에 의거 2차 조건 확립 진행하였다(제출서류 : 총괄요약본 외 10종)

- 추가제출서류 : 원료를 사용하여 제조하고자 하는 건강기능식품의 기준 및 규격에 관한 자료를 완성 하였다.

다. CRO를 통한 인체시험 타당성 검토.

- 인체시험계획서에 전반적인 협의(프로토콜 등) 후 CRO를 설정하였다.
- 연구기관 및 연구자 검토 등 건강기능식품 기능성원료 인정에 관한 규정 개정(제 2008-72호)으로 인해 인체적용시험에 관한 자료 요건으로 국제임상시험관리기준(ICH GCP)에 따라야 함으로 연구기관 및 연구자 범위 위축으로 인한 재검토하였다.

5. 인지기능 개선용 제품(2종)에 대한 인정조건 확립 및 임상시험

가. 건강기능식품 기능성 원료 인정을 위한 임상시험 시작하였다.

- 제목 : 경도인지장애자에서 인지기능 향상에 미치는 도라지 추출물의 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12주, 다기관, 무작위배정, 이중맹검, 위약대조 임상시험
- 실시기관 : 인제대학교 상계백병원, 가천의대길병원, 건국대학교병원, 경희대학교 의과대학병원, 인제대학교 일산백병원, 인하대병원
- 기간 : 임상시험 승인 일로부터 12개월
- 대상 : 경도인지장애자
- 복용방법 : 1일 3회, 1회 2정씩 복용(총 6정, 도라지추출물로써 3g/일)

나. 인지기능 개선을 타겟으로 한 타정제품 1종, 대환제품 1종 개발 및 양상체계 구축하였다.

다. 임상시험용 제형을 위한 사포닌 제조 공정을 확립하여 시제품 제작을 완료하였으며 전국 대리점을 활용하여 선호도 조사 및 매출 기여도를 조사하였다.(타사 건강기능식품과 비교하여 경쟁력 있는 시제품 1종 판매개시)

라. 인지기능개선을 위한 제품 2종을 개발하여 그 중 1종은 상품화하여 판매개시하였으며 1종은 임상시험을 위한 시험군으로 사용될 예정이다.

마. 제품 생산을 위한 원료 수급에서부터 완제품 생산까지 위탁업체들을 포함한 모든 공정상의 조건들을 최적화 하였으며 국내·외용 디자인 개발을 완료하였다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1절 연구평가의 착안점 및 달성도

년차	연구평가의 착안점	달성내용	달성도 (%)
1차 년도	● 기능성분의 함량 변화 분석	● 장생도라지의 정량 및 정성 분석방법에 대한 연구를 완료하였다.	90
	● 시제품의 약효 및 안전성 평가를 위한 대량추출법 확립 및 규격화연구	● 장생도라지의 최적 추출방법이 실험실적으로 수행되었다.	90
	● 최적화제제에 대한 기능성 연구	● 인지기능개선과 관련된 신경세포 보호효과와 재생효능에 대한 연구 결과 좋은 활성을 나타내었다.	80
	● 인지 능력 저하 개선 기능성 물질의 대량 생산 공정 개발	● 원료 수확 방법부터 최적 전처리 조건, 추출, 농축, 건조 공정 등의 대량생산공정을 공장규모에서 시작품제작을 완료	100
	● 제품화 기반 기술 구축	● 시작품 제작을 위한 기준·규격이 확립되었고, 특히 수출촉진을 위한 일본 현지 국제심포지엄이 성공적으로 개최되었음	100
2차 년도	● 제제의 조합 및 재구성연구 : 최적화연구	● 원료의 확보부터 최종제품까지의 모든 과정을 최적화 하였음	100
	● 기능성분(혹은 지표성분)의 함량 변화 분석	● 기능성분으로 사포닌을 지표성분으로 플라티코사이드 E로 정하여 분석방법을 확립하였음	100
	● 원료·성분의 안전성	● 장기적인 투여시(30일) 원료성분의 안전성 및 스코폴라민을 대조로하여 수동회피 실험 및 maze실험을 통하여 활성 확인	80
	● 식품의약품 안전청에 건강기능식품 원료 또는 성분 인정 신청서 제출용 자료 확보	● 식품의약품 안전청에 건강기능식품 원료 또는 성분 인정 신청서 제출용 자료 확보	80
	● 장생도라지로부터 인지기능 개선물질을 활용한 개별 인정형 상품화 기술의 표준화	● 장생도라지로부터 인지기능 개선물질을 활용한 개별인정형에 알맞은 기능성 성분·원료의 기준 및 규격을 확립하였음	100
	● 장생도라지 인지기능 개선 ● 기능성 물질의 표준화	● 전 제조공정의 기능성분의 안정화 조건 및 기준 규격 표준화 및 타당성 확보	100
	● 상품화 기술 표준화	● 장생도라지에서 유래한 인지기능 개선 지표 물질인 사포닌을 가장 많이 함유할 수 있게 하는 수확 부위, 수확 계절 및 원료의 크기와 같은 세부 사항을 확립함으로써 최적 상품화 기술 표준화를 확립하였고, 해외 세미나와 같은 학술회의를 개최하여 수출촉진을 시도하여 좋은 반응을 얻음	100

년차	연구평가의 착안점	달성내용	달성도 (%)
3차 년도	<ul style="list-style-type: none"> ● 도라지내에 존재하는 미량의 사포닌성분들을 분리하여 구조규명하고 년근별 도라지들의 사포닌 분포 특이성을 규명 	<ul style="list-style-type: none"> ● 년근별 및 지역별 도라지(100종)들의 사포닌 분포 패턴을 조사하였다. 	100
	<ul style="list-style-type: none"> ● 년근별 장생 도라지에 존재하는 다당체들의 분포 패턴 분석 	<ul style="list-style-type: none"> ● GPC를 이용하여 년근별 및 지역별 도라지(100종)들의 탄수화물 성분의 특이성을 규명하였다. 	100
	<ul style="list-style-type: none"> ● 장생 도라지내 내에 존재하는 약리성분인 주요 사포닌(saponin)을 대량 분리 하여 개별적인 약리 효능을 검증 	<ul style="list-style-type: none"> ● 주요사포닌 11종을 분리정제 하여 약효검정 및 도라지간의 차이점을 분석하였다. 	95
	<ul style="list-style-type: none"> ● 인지기능 개선용 기능성 성분·원료의 개별 인정 조건 확립 	<ul style="list-style-type: none"> ● 건강기능식품 기능성 원료 인정에 관한 규정(개정 2007.06.28 식품의약품안전청고시 제 2007- 51호)에 의거 장생도라지 유래 인지기능개선 기능성원료 인정 1차 조건 확립완료 ● 건강기능식품의 제형 제한 삭제에 따른 건강기능식품 기능성 원료 인정에 관한 규정의 일부개정(개정 2008. 11.17 식품의약품안전청고시 제2008-72호)에 의거 2차 조건 확립 중→ 추가제출서류항목이 4차년도 위탁연구목표에 속함 	100
	<ul style="list-style-type: none"> ● 상품화 체계 구축 	<ul style="list-style-type: none"> ● 건강기능식품 기능성원료 인정을 위한 장생도라지 열수추출물(고형분 60%)을 함유한 건강기능식품 상품화 체계 구축 완료 :2종 ● 제품이미지 및 판매방향을 고려한 국내·외용 디자인개발 진행 중(2008년 3월 완료 예정) 	100
4차 년도	<ul style="list-style-type: none"> ● 임상 시험물질의 표준화 	<ul style="list-style-type: none"> ● 조사포닌, 고 함량의 사포닌 분획, Platycosid E들의 확보 및 분석완료 	100
	<ul style="list-style-type: none"> ● 임상 지표성분과 유효성분의 대량분리정제 	<ul style="list-style-type: none"> ● Platycosid E, Platycoside D, Platyconic Acid, 2'-O-acetyl platycodin D2의 대량확보 	100
	<ul style="list-style-type: none"> ● 인지기능저하 개선용 제품의 기준·규격 확립 	<ul style="list-style-type: none"> ● 개별인정을 위한 자료확보 완료 	100
	<ul style="list-style-type: none"> ● 건강기능식품 2종 상품화 	<ul style="list-style-type: none"> ● 건강기능식품 2종 상품화(활맥단, Dr.J) ● 수출 300만불 이상 	100
	<ul style="list-style-type: none"> ● 임상 시료의 확보 및 임상을 위한 안전성 및 효능연구 	<ul style="list-style-type: none"> ● 임상시료확보(placebo 및 시험물질 제작완료) ● 안전성 및 약동력학 연구중(GLP) 	100

제 2절 관련분야의 기술발전예의 기여도

1. 기술력 측면

- 가. 도라지사포닌 표준품의 분리정제, 도라지 사포닌의 분석기술의 표준화, 도라지 추출물의 안전성 및 약동력학등 도라지에 관한 포괄적인 연구가 이루어져 향후 도라지를 이용한 다양한 제품군을 개발할 시 본 연구자료는 대단히 중요할 것으로 사료된다.
- 나. 세계에서 발병율이 급증하고 있는 뇌장질환을 효과적으로 예방·개선시킬 수 있는 무독성·고활성 건강기능식품 제조를 위한 소재와 제품이 출시예상됨에 따라 국민보건 증진에 기여할 뿐만 아니라 의약품 개발에 중요한 소재를 제공.
- 다. 지역특화품목으로서 토종 생약재인 장생도라지를 활용한 건강기능식품 인증 기술 모델은 약리적 효능이 우수한 다양한 국산 생약재를 활용한 기능성식품 개발에 응용될 수 있는 신 모델을 제공할 뿐만 아니라 선진국의 과학기술라운드(TR)를 통한 독립적 지배체제에 대처하는 토종 생약재의 기술경쟁력 확보에 기여

2. 경제·산업적 측면

- 가. 건강기능식품 제조를 위한 원료 1종과 제품 2종의 산업화로 최소 3백만불 이상 수출을 통한 외화획득(2006년 300만불 수출탑 수상)
- 나. 특허보호작물로서 지역특화품목이면서 독창성 및 독점권이 확보되어 있는 장생도라지의 글로벌 명품 브랜드 육성이 가능해 졌음.
- 다. 현재 인지기능 개선용 건강기능식품에 대한 인정사례는 소수에 불과하므로 장생도라지 인지기능 개선원료 및 제품이 출시되면 예방용으로서 국내 시장은 연간 300억 정도 매출이 기대되고, 치매 치료의 보조식품으로 사용될 경우에는 국내 시장만 약 500억 이상의 시장이 형성될 것으로 전망되며, 또한 수입대체 효과도 상기 금액의 50%를 점유할 것으로 예측됨
- 라. 장생도라지 위탁재배농가 확대를 통한 농가소득 증대(연간 7억 보장)
- 마. 지역특산물의 건강기능식품화를 위한 모범 모델 제공 및 확산·보급
- 바. 지역특화품목의 고부가가치화로 지역경제 활성화 및 신기능성 소재 발굴에 따른 기능성식품산업의 활성화에 기여
- 사. 장생도라지 유래의 유용약리물질의 규명 및 최적화 연구를 통한 신약개발 후보물질 확보

제5장 연구개발결과의 활용계획

우리나라는 2000년 7월부터 고령화 사회에 진입함에 따라 노인 인구의 지속적 증가와 더불어 영양의 과잉 섭취, 영양 불균형, 운동부족 등의 식생활 습관의 변화 등으로 인지기능저하를 동반하는 뇌질환자의 수가 급격히 증가하고 있는 추세이다.

이와 같은 뇌질환이 일단 발병하면 개인, 가정, 국가적으로 모두 육체적, 정신적, 경제적으로 부담을 크게 주고, 특히 완치가 거의 불가능하므로 치료보다는 예방차원에서 관리하는 것이 최적의 방안임이 만성질환 치료에 소요되는 의료비 비중을 보면 알 수 있는데, 즉 우리나라의 경우 2000년에 GDP의 약 4%인 20조원, 일본의 경우에는 37조엔으로서 GDP의 약 7%, 미국은 1조 1000억달러로 14%를 점유하여 선진국일수록 의료비 비중은 급격히 증가하기 때문에 이에 따른 철저한 대비가 요구되고 있다.

치매와 같은 만성질환을 효율적으로 예방·개선하기 위해서 구비해야 할 필수요건은 예방목적으로 소량씩 장기간 섭취해도 독성이 없으면서 특정질환에 대한 예방 및 개선 활성이 높아야 하는데, 이런 요건에 부합되는 것이 식용 가능한 천연물 유래의 기능성 물질을 활용한 기능성 식품이며, 우리나라를 비롯한 미국, 일본, EU 등은 이와 관련된 법률을 정비하여 국가 성장주도 산업으로 적극적으로 육성하고 있어 향후 기능성식품 시장은 자동차 시장과 대등하게 성장할 것으로 예상되고 있다.

따라서 본 연구과제에서 산업화 하고자 하는 장생도라지는 특허보호 작물로서 독창성 및 독립권이 확보되어 있고 특히 장생도라지 추출물은 인지기능저하 개선 활성이 선행연구에서 규명되어 이미 국제 학회지에 게재 되었고 또한 특허로 출원되어 있어 기능성 및 안전성 실험이 체계적으로 추진되어 “개별인정형” 건강기능식품으로 허가를 취득하게 되면 현재 급격히 증가되는 뇌질환의 예방 및 개선 기능성 식품의 “명품브랜드”로서 국내·외 시장 진입이 매우 용이 할 것으로 전망된다. 또한 본 연구를 통하여 얻어진 연구 결과인 “도라지사포닌 표준품의 분리정제, 도라지 사포닌의 분석기술의 표준화, 도라지 추출물의 안전성 및 약동력학”등 도라지에 관한 포괄적인 연구가 이루어져 향후 도라지를 이용한 다양한 제품군을 개발할 시 본 연구자료는 대단히 활용가치가 높을 것으로 사료된다.

제6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

- 해당사항 없음

제 7 장 참고문헌

1. 홍문화(1972) 한방처방의 통계적 연구(I), 생약학회지 3(2), 57-64.
2. Lee, S. H. and Lee, Y. C. (1991) Method of cultivating the perennial balloon flower, Patent No. 100045791, Korea.
3. Oka, M., Ota, N., Mino, Y., Iwashita, T. and Komura, H. (1992) Studies on the conformational aspects of inulin oligomers. Chem. Pharm. Bull. 40(5): 1203-1207.
4. Ishii, H., Tori, K., Tozyo, T. and Yoshimura, Y. (1981) Saponins from roots of *Platycodon grandiflorum*. Part 1. Structure of prosaponins. J.C.S. Perkin I: 1928-1933.
5. Ishii, H., Tori, K., Tozyo, T. and Yoshimura, Y. (1984) Saponins from roots of *Platycodon grandiflorum*. Part 2. Isolation and structure of new triterpene glycosides. J.C.S. Perkin I: 661-668.
6. Saeki, T., Koike, K. and Nikaido, T. (1999) A Comparative study on commercial, botanical gardens and wild samples of the roots of *Platycodon grandiflorum*. Planta Med. 65: 428-431.
7. Nikaido, T., Koike, K., Mitsunagi, K. M. and Saeki, T. (1999) Two new triterpenoid saponins from *Platycodon grandiflorum*. Chem. Pharm. Bull. 47(6): 903-904.
8. Kim, Y.P., Lee, E. B., Kim, S. Y., Li, D., Ban, H. S., Lim, S. S., Shin, K. H. and Ohuchi, K. (2001) Inhibition of prostaglandin E2 production by platycodin D isolated from the root of *Platycodon grandiflorum*. Planta Med. 67(4): 362-364.
9. Shin, C. Y., Lee, W. J., Lee, E. B., Choi, E. Y. and Ko, K. H. (2002) Platycodin D and D₃ increase airway mucin release *in vivo* and *in vitro* in rats and hamsters. Planta Med. 68(3): 221-225.
10. Lee, K.J. and Jeong, H.G. (2002) Protective effect of Platycodi Radix on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. Food Chem. Toxicol. 40: 517-525.
11. Lee, K.J., You, H.J., Park, S.J., Kim, Y.S., Chung, Y.C., Jeong, T.C. and

- Jeong, H.G. (2001) Hepatoprotective effects of *Platycodon grandiflorum* on acetaminophen-induced liver damage in mice. *Cancer Lett.* 174: 73-81.
12. Choi, C.Y., Kim, J.Y., Kim, Y.S., Chung, Y.C., Seo, J.K. and Jeong, H.G. (2001) Aqueous extract isolated from *Platycodon grandiflorum* elicits release of nitric oxide and tumor necrosis factor- α from murine macrophages. *International Immunopharmacology* 1: 1141-1151.
13. Choi, C.Y., Kim, J.Y., Kim, Y.S., Chung, Y.C., Hahm, K.S. and Jeong, H.G. (2001) Augmentation of macrophage functions by an aqueous extract isolated from *Platycodon grandiflorum*. *Cancer Lett.* 166: 17-25.
14. Akihiro, T.A, Yoshio, K., Junzo, S. and Shoji, S. (1975) Studies on the saponins of the root of *Platycodon grandiflorum* A. De Candolle. I. Isolation and the structure of platycodin-D. *Chem. Pharm. Bull.* 23(11): 2965-2972.
15. Son, I.H., Park, Y.H., Lee, S.I., Yang, H.D. and Moon, H.-I. (2007) Neuroprotective activity of triterpenoid saponins from platycodi radix against glutamate-induced toxicity in primary cultured rat cortical cells. *Molecules* 12(5): 1147-1152.
16. Choi, Y.H., Yoo, D.S., Choi, C.W., Cha, M.-R., Kim, Y.S., Lee, H.S., Lee, K.R. and Ryu, S.Y. (2008) Platyconic acid A, a genuine triterpenoid saponin from the roots of *Platycodon grandiflorum*. *Molecules* 13: 2871-2879.
17. Kim, Y.S., Kim, J.S., Choi, S.-U., Kim, J.S., Lee, H.S., Roh, S.H., Jeong, Y.C., Kim, Y.-K. and Ryu, S.Y. (2005) Isolation of new saponin and cytotoxic effect of saponins from the root of *Platycodon grandiflorum* on human tumor cell lines. *Planta Med.* 71: 566-568.
18. Nikaido, T., Koike, K., Mitsunaga, K. and Saeki, T. (1999) Two new triterpenoid saponins from *Platycodon grandiflorum*. *Chem. Pharm. Bull.* 47(6): 903-904.
19. Altstiel, L.D. and Sperber, K. (1991) Cytokines in Alzheimer's disease, *Prog. Neuro. Psychopharmacol. Biol. Psychiat.* 15(4): 481-495.
20. Alzheimer's Disease Collaboratory Group (1995) The structure of presenilin 1(S182) gene and identification of six novel mutations in early onset AD

- families, Nat. Gene. 11(35): 219-222.
21. Kowall, N. W., Beal, M.F., Busciglio, J., Dutty, L.K. and Yankner, B.A.(1991) An *in vivo* model for the neurodegenerative effects of beta amyloid and protection by substance P. Proc. Natl. Acad. Sci. 88(16): 7247-7251.
 22. Selkoe, D.J. (1991) Scientific American, November, Scientific American Inc. New York. 68-72.
 23. McGeer, E.G. and McGeer, P.L. (1998) The importance of inflammatory mechanisms in Alzheimer's Disease. Exp. Gerontol. 33(5): 371-378.
 24. Weinstein, H.C., Scheltens, P., Hijdra, A. and van Royen, E.A. (1993) Neuroimaging in the diagnosis of Alzheimer's disease II. Positron and single photon emission tomography. Clinical Neuro. Neurosurg. 95(2): 81-91.
 25. 류기억 (1995) 한국산 초롱꽃과(Campanulaceae) 식물의 분류학적 연구. 강원대학교 대학원 박사학위 논문.
 26. 이상인 (1981) 본초학, 수서원, 서울. 한국. p.329.
 27. Ishii, H., Tori, K., Tozyo, T. and Yoshimura, Y. (1984) Saponins from roots of the structure of new triterpene glycosides. J Chem Soc 1: 661-668.
 28. Sidhu, G.S. and Oakenful, D.G. (1986) A mechanism for the activity of saponin. Br J Nutr 55: 643-649.
 29. Petkov, V.D., Konstantinova, E., Petkov, V.V., Lazarova, M. and Petkova, B. (1991) Acta Physiol. Pharmacol. Bulg. 17: 17.
 30. Jope, R.S. (1982) Effects of phosphatidylcholine administration to rats on choline in blood and choline and acetylcholine in brain. J Pharmacol Exp Ther 220: 332-328.
 31. Cheon, Y.H., Chang, Y.K. and Baik, T.K., (1999) Evidence of memory improvement by phosphatidylcholine supplement at fetus and neonate. Kor J Nutr 32: 864-869.
 32. Mesulam, M.M. (1990) Human brain cholinergic pathways. Prog Brain Res 84: 231-241.
 33. Kang, J., Park, E.J., Jou, I., Kim, J.H. and Joe, E.H. (2001) Reactive oxygen species mediate A beta(22-35)-induced activation of BV-2 microglia.

- Neuroreport 12(7): 1449-1452.
34. Kuhl, D.E., Koeppe, R.A., Minoshima, S., Snyder, S.E., Ficarò, E.P., Foster, N.L., Frey, K.A. and Kilbourn, M.R. (1999) In vivo mapping of cerebral acetylcholinesterase activity in aging and Alzheimer's disease. *Neurology* 52(4): 691-699.
 35. Riekkinen, P.J., Schmidt, B., Stefanski, R., Kuitunen, J. and Riekkinen, M. (1996) Metrifonate improves spatial navigation and avoidance behavior in scopolamine-treated, medial septum-lesioned and aged rats. *Europ J Pharm.* 390(2): 121-130.
 36. Ahn, H.S., Kang, S.A. and Lee, L.H. (1999) Effects of vitamin E and vitamin C supplementation on the decrease in cognitive function induced by scopolamine. *J Korean Nutr Soc.* 32(3): 239-247.
 37. Kim, H.-S., Jang, C.-C., Yang, J.-W., Kim, N.-M., Jeon, B.-S., Choi, K.-J., Kim, S.-K., Seong, Y.-H., Park, W.-K. and Oh, K.-W. (1996) Effects of Red Ginseng Extract Including Vitamin B Groups on Learning and Memory in Mice. *J Korean Ginseng Sci.* 20(3): 226-232.
 38. Jin, S.-H., Kyung, J.-S., Kim, S.-C. and Nam, K.-Y. (1996) Effects of Red Ginseng Saponin on Normal and Scopolamine-induced Memory Impairment of Mice in Passive Avoidance Task. *J Korean Ginseng Sci.* 20(1): 7-14.
 39. Choi, C.Y., Lee, K.J. and Jeong, H.G. (2002) Effects of aqueous extract isolated from platycodon grandiflorum against t-butyl hydroperoxide induced oxidative stress in rat primary hepatocytes. *Yakhak Hoeji* 46: 466-471.
 40. Chang, H.J. and Ki, H.S. (2006) Chemical Composition and Antioxidative activities of platycodon grandiflorum Leaves and Stems. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 35(5): 511-515.
 41. Doaa, A.T.-S., Khalifa, A.-E., Attia, A. S. and Eldenshary, E.T.-D.S. (2003) Hypericum perforatum extract demonstrates antioxidant properties against elevated rat brain oxidative status induced by amnestic dose of scopolamine. *Pharmacology, Biochem and Behav.* 76: 525-533.

주 의

1. 이 보고서는 교육과학기술부에서 시행한 21세기 프론티어연구개발사업 (자생식물이용기술개발사업)의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 교육과학기술부에서 시행한 21세기 프론티어연구개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.

주 의

1. 이 보고서는 교육과학기술부에서 시행한 21세기 프론티어연구개발사업 (자생식물이용기술개발사업)의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 교육과학기술부에서 시행한 21세기 프론티어연구개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.