

최종보고서

한약재의 생리활성성분 분리 및 분석연구  
(계지, 목단피)

Isolation and Quantitative Analysis of Bioactive Compounds from  
Cinnamoni Ramulus and Moutan Root Bark

주관연구기관 : 충남대학교

식품의약품안전청

연구과제제안서(RFP)					
세세사업명	한약재 평가기술 과학화 연구			과제번호	08182한약재2 57
단위과제명	한약재 생리활성성분 분리 및 분석 연구				
과제명	한약재의 생리활성성분 분리 및 분석 연구(계지, 목단피)				
주관부서	인체노출평가과	과제담당자	이종화		
보안성	유( ) 무( ○ )				
연구기간	단년도		다년도	총( 2 )개년 중 ( 2 )년차	
수행방법	자체		용역	공모	
				지정	○
소요예산	총액 (천원)	320,000	1차년도	160,000 천원	
			2차년도	160,000 천원	
연구형태	조사연구( ), 시험연구( ○ )				
연구성과 활용유형	<input type="checkbox"/> 기준규격 제/개정 (○) <input type="checkbox"/> 언론/대국민홍보 ( ) <input type="checkbox"/> 시험법 확립 (○) <input type="checkbox"/> 학술발표(논문) (○) <input type="checkbox"/> 제도개선반영 ( ) <input type="checkbox"/> 특허출원 ( ) <input type="checkbox"/> DB/시스템 구축 ( ) <input type="checkbox"/> 기타 (                      ) <input type="checkbox"/> 가이드라인 개발 (○)				
연구분야 기술코드	1	2	3	4	5
	20305				

\*다년도과제는 총괄 및 연차별 예산, 목적, 주요연구내용 및 기대성과 등을 구분하여 서술

연구의 필요성	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 한약재의 오용 및 저질 한약재 유통에 따른 부작용 발생 근절을 위하여 유효성분 중심의 한약재 기준규격 설정으로 품질 및 안전성, 유효성 확보 필요</li> <li>○ 한약재는 기원별, 산지별로 다양한 성분을 함유하고 있어 현행 1종의 지표성분으로 평가하는데 한계가 있으므로 다성분 다변량 분석 등으로 전환 필요</li> <li>○ 한약재 생리활성성분의 동시분석 및 효능확인연구를 위한 생리활성성분 제공 및 정량용 표준품 대량확보 필요</li> </ul>	
연구목표	<p>[1차년도]</p> <p>(1세부)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 한약재 생리활성성분 분리 및 연구용 시료제공</li> </ul> <p>(2세부)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 한약재 생리활성성분의 분석법 개발</li> </ul> <p>[2차년도]</p> <p>(1세부)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 한약재 생리활성성분 분리 및 연구용 시료제공</li> <li>○ 유효성분 정량용 표준품 제조</li> </ul> <p>(2세부)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 패턴인식법에 의한 기원별, 산지별 한약재 정보 구축</li> </ul>	
연구내용	<p>[1차년도]</p> <p>(1세부)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 한약재 생리활성성분 분리 및 동정 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 기원이 확인된 2종 한약재를 대상으로 각 10종 이상의 생리활성성분 분리 및 동정</li> <li>- 2종 한약재: 계지(KHP), 목단피(KP)</li> </ul> </li> <li>○ 기원별(산지별) 한약재의 70% 에탄올엑스 각 5종 이상 제조</li> <li>○ 연구용 시료 제공 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 분리정제된 생리활성성분(순도 표기) 및 70% 에탄올엑스(수율 표기)를 생리활성성분 분석팀 및 효능확인연구팀에 연구용으로 제공</li> <li>- 효능확인 연구를 위한 생리활성성분 대량 제조</li> </ul> </li> </ul> <p>(2세부)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 2종 한약재 생리활성성분 동시분석 <ul style="list-style-type: none"> <li>- LC-MS/MS에 의한 기원 및 산지별 한약재 각 20품목 이상 분석</li> <li>- TLC분석 및 HPLC-UV에 의한 동시분석법 개발, 밸리데이션 수행</li> </ul> </li> <li>○ 패턴인식/지문인식법에 의한 한약재 평가 <ul style="list-style-type: none"> <li>- chemical fingerprint 등에 의한 기원별, 산지별 분석</li> </ul> </li> </ul> <p>[2차년도]</p> <p>(1세부)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 효능확인 연구를 위한 생리활성성분 대량 제조</li> <li>○ 유효성분으로 확인된 3성분 이상에 대하여 정량용 표준품 제조 및 표준품 규격서 작성</li> <li>○ 한약재 감별, LC-MS/MS 분석, HPLC 분석, DNA 분석연구 및 효능확인연구팀과 협의하여 한약재별 정보구축 및 평가도출</li> </ul> <p>(2세부)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 2종 한약재 생리활성성분 동시분석법 개발 및 밸리데이션 수행</li> <li>○ 패턴인식/지문인식법에 의한 한약재 평가 <ul style="list-style-type: none"> <li>- chemical fingerprint 등에 의한 기원별, 산지별 분석</li> </ul> </li> </ul>	
기대성과	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 유효성분 다성분에 의한 한약재 기준규격 설정</li> <li>○ 다성분함량분석 및 화학적 패턴인식/지문인식법을 통해 기원별, 산지별 한약재 평가</li> <li>○ 한약재 유효성분 표준품 확보</li> </ul>	
연구성과 활용계획일정	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 2008년; 확립된 분석법으로 유효성분 함량 모니터링</li> <li>○ 2008년; 유효성분에 의한 한약재 함량기준 및 시험법 제안</li> <li>○ 2009년; 공정서 중 생약 규격 개정 및 정책 반영</li> </ul>	
색인 단어	국문	생리활성성분, 함량분석, 패턴인식법, 지문인식, 표준품
	영문	bioactive component, assay, pattern recognition analysis, chemical fingerprint, control reference standard
붙임		

편집순서 2 : 제출문

## 제 출 문

식품의약품안전청장 귀하

이 보고서를 “한약재의 생리활성성분 분리 및 분석연구 (계지, 목단피) (충남대학교/배기환)”과제의 최종보고서로 제출합니다.

2008 . 11 .

주관연구기관명 : 충남대학교

주관연구책임자 : 배기환

제 1 세부과제명 : 계지 및 목단피의 생리활성 성분 분리 및 분석 연구  
(제 1 세부연구기관/세부과제책임자): 배기환

제 2 세부과제명 : 계지, 목단피의 생리활성성분 동시분석  
(제 2 세부연구기관/세부과제책임자): 박경래

편집순서 3 : 목차

## 목 차

### I. 연구개발결과 요약문

(한글)

(영문)

### II. 총괄연구개발과제 연구결과

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

### III. 제1 세부연구개발과제 연구결과 (세부과제별로 작성)

- 제1장 제1 세부연구개발과제의 최종 연구개발 목표
- 제2장 제1 세부연구개발과제의 연구대상 및 방법
- 제3장 제1 세부연구개발과제의 최종 연구개발 결과
- 제4장 제1 세부연구개발과제의 연구결과 고찰 및 결론
- 제5장 제1 세부연구개발과제의 연구성과
- 제6장 기타 주요변경사항
- 제7장 참고문헌
- 제8장 첨부서류

### III. 제2 세부연구개발과제 연구결과 (세부과제별로 작성)

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

## 편집순서 4 : 요약문

## 최종보고서 요약문

과 제 명	한약재의 생리활성성분 분리 및 분석연구 (계지, 목단피)		
중심단어	계지, 목단피, 생리활성 성분 분리, 밸리데이션, 패턴인식		
주관연구기관	충남대학교	주관연구책임자	배기환
연구기간	2007년 4월 17일 - 2008년 11월 30일(1년 4.7개월)		
<p>계지와 목단피의 에탄올 추출물을 통상적인 방법으로 용매분획하고 각각의 분획들에 대해 각종 chromatography를 반복 실시하여 계지로부터 5종의 신물질을 포함한 27종의 화합물, 목단피로부터 2종의 신물질을 포함한 27종의 화합물을 분리하였다. 계지로부터는 5종의 신물질인 cassiferaldehyde, cinnacassine, icaraside, dihydrocinnacasside, cinnacasside와 22종의 알려진 화합물 cinnamaldehyde, eugenol, 2-methoxycinnamaldehyde, coumarin, <math>\beta</math>-sitosterol, 2-hydroxy cinnamaldehyde, cinnamic acid, coniferaldehyde, cinnamic alcohol, 4-hydroxy benzoic acid, syringaldehyde, daucosterol, amygdalactone, eugenol glucopyranoside, <i>o</i>-coumaric acid, rosavin, (+)-lyoniresinol-3a-O-<math>\beta</math>-D-glucopyranosid, (-)-lyoniresinol-3a-O-<math>\beta</math>-D-glucopyranosid, dihydromelilotoside, (+)-lyoniresinol, (-)-lyoniresinol, methyl dihydromelilotoside을 분리하였다. 목단피로부터는 2종의 신물질인 4-<i>O-n</i>-butylpaeniflorin, 5-hydroxy-3-hydroxymethylene-6-methyl-2,3-dihydrobenzofuran와 25종의 알려진 화합물인 paeonol, <math>\beta</math>-sitosterol, ursolic acid, betulinic acid, daucosterol, benzoic acid, oleanolic acid, Palbinone, apiopaenoside, paeonoside, 6-methoxypaeoniflotrigenone, benzoylpaeniflorin, methylgallate, kaempferol, paeoniflorin, <math>\alpha</math>-benzoyloxypaeoniflorin, <math>\beta</math>-benzoyloxypaeoniflorin, galloylpaeniflorin, (+)-catechin, gallic acid, paeonolide, paeoniflorigenone, 30-norhederagenin, oxypaeniflorin, and mudanpinoside H을 분리하였다. 분리한 화합물들의 구조는 각종 분광학적 방법과 문헌과의 비교를 통하여 결정하였다.</p> <p>계지로부터는 coumarin, 2-hydroxycinnamaldehyde, cinnamyl alcohol, cinnamic acid, cinnamaldehyde, 2-methoxy cinnamaldehyde, eugenol 등의 7개의 화합물과 목단피로부터는 paeonol, paeoniflorin, benzoyl paeoniflorin 등의 3종의 화합물을 지표물질로 설정하고 이들 화합물의 동시분석을 HPLC 방법을 이용하여 수행하였다. 계지의 최적추출조건은 70% MeOH로 결정하였고, 추출방법은 sonication 방법, 추출시간은 60분으로 하였다. 목단피의 최적추출조건은 70% EtOH로 결정하였고, 추출방법은 sonication 방법, 추출시간은 60분으로 하였다. 계지 및 목단피 성분의 동시분석을 위하여 최적 HPLC 조건을 설정하였으며, HPLC 조건은 정확성, 정밀도, 회수율, 검출한계, 완전성 등을 조사하여 validation 을 수행하여 설정하였다. 또한 설정된 지표성분은 실온과 냉장보관으로 안정성을 검토하였으며, 계지와 목단피의 지표성분은 15일 이상 동안 유의성 있는 함량변화를 나타내지 않았다. 설정된 HPLC 조건으로 시중에 유통되고 있는 각각의 생약 20여종 이상을 수집하여 생리활성 성분의 분석을 실시하여 주요 생리활성 성분의 함량을 조사하였으며, HPLC로 얻어진 함량 등은 패턴인식법에 의하여 기원별 산지별 분석을 실시하였다. 계지의 기원별 산지별 분석에서는 계지, 계피 시료 7개의 성분에 대해서 지역별 차이보다는 품목별 차이가 더 컸으며, 계지, 계피에 있어 산지의 차이가 거의 없다는 것이 파악되었고, 목단피의 경우는 사업단에서 제공한 표준품 7개(S10-S16)에 대해 다변량기각검정법, 유사도비교, 군집분석 등의 다양한 기법을 이용하여 평가한 결과 목단피의 국산, 중국산의 분류는 통계적으로 큰 의미가 없는 것으로 판단되었다. 패턴인식법에 의한 계지와 계피의 성분 평가 결과 coumarin, 2-hydroxyl cinnamaldehyde, cinnamyl alcohol, cinnamic acid, cinnamaldehyde, 2-methoxy cinnamaldehyde 및 eugenol의 함량은 상당히 넓은 범위에 퍼져 있는 것을 확인할 수 있었는데, 계지에서는 cinnamic acid, 2-methoxy cinnamaldehyde, eugenol의 함량이, 계피에서는 coumarin, 2-hydroxyl cinnamaldehyde, cinnamyl alcohol, cinnamaldehyde의 함량이 높은 것으로 나타났다. 작약, 목단피의 평가에서는 작약의 경우는 paeoniflorin의 함량이 가장 높고, paeonol의 경우는 목단피에 비하여 상대적으로 낮은 것을 알 수 있었다. 시료의 DNA 감별결과에 따른 패턴분석에서는 제공된 22개의 계지시료의 감별결과 <i>C. cassia</i>가 2개, <i>C. sieboldii</i>가 20로 나타났고, 목단피의 경우는 제공된 20개의 시료 중 16개 시료는 모두 기원이 확인된 목단피 100% 일치하여 목단피의 약재로 확인되었으며, 4개 시료는 2-8bp 차이를 나타내어 98-99%의 유사성을 보였다.</p>			

<b>주관연구책임자 의견</b>	
<b>연구의 범위</b>	<p>계지와 목단피의 에탄올 추출물로부터 각각 10종 이상의 물질을 분리하여 화학구조를 규명하고, 계지와 목단피의 70% 에탄올 엑스와 함께 분석팀에게 제공한다.</p> <p>계지와 목단피의 주요 지표성분들로부터 계지와 목단피의 생리활성성분을 동시에 분석할 수 있는 HPLC 방법을 개발하고, 패턴인식에 의한 한약재를 평가한다.</p>
<b>연구의 한계점</b>	<p>계지의 경우 대부분 <i>Cinnamomum cassia</i>인 것으로 판단되나 정확한 표준생약이 없어 비교 분석하기에 어려움이 있었다.</p> <p>목단피의 경우 시중에서 구입한 20개의 시료로 패턴인식을 통한 한국산과 중국산의 산지별 분석을 하기에는 한국산 시료의 수가 부족하였다. 국내에 유통되는 목단피는 대부분 중국산으로 국산시료를 구하기가 무척 힘들었다.</p>
<b>인용시 주의사항</b>	
<b>주관부서 연락처</b>	식품의약품안전청 인체노출평가과



편집순서 5 : 요약문(영문)

## Summary

<b>Title of Project</b>	Isolation and Quantitative Analysis of Bioactive Compounds from Cinnamomi Ramulus and Moutan Root Bark		
<b>Key Words</b>	Ramulus Cinnamomi, Moutan Cortex Radicis, Isolation of bioactive components, Validation, Pattern Analysis		
<b>Institute</b>	Chungnam National University	<b>Project Leader</b>	KiHwan Bae
<b>Project Period</b>	2007. 4. 17 - 2008. 11. 30 ( 1 year 4.7 month)		
<p>Twenty seven bioactive compounds were isolated from the ethanol extract of twig of C.cassia, including one new cinnamaldehyde: cassiferaldehyde, one new amino phenol, cinnacassine and two new phenyl ethyl glycosides: icariside DC and dihydrocinnacasside, and one diterpene glycoside: cinnacasside A, together with twenty two known compounds such as cinnamaldehyde, eugenol, 2-methoxycinnamaldehyde, coumarin, <math>\beta</math>-sitosterol, 2-hydroxy cinnamaldehyde, cinnamic acid, coniferaldehyde, cinnamic alcohol, 4-hydroxy benzoic acid, syringaldehyde, daucosterol, amygdalactone, eugenol glucopyranoside, o-coumaric acid, rosavin, (+)-lyoniresinol-3a-O-<math>\beta</math>-D-glucopyroanosied, (-)-lyoniresinol-3a-O-<math>\beta</math>-D-glucopyroanosied, dihydromelilotoside, (+)-lyoniresinol, (-)-lyoniresinol, and methyl dihydromelilotoside. Twenty seven compounds were isolated from the ethanol extract of root bark of P. suffruticosa comprise two new ones: 4-O-n-butylpaeniflorin, 5-hydroxy-3-hydroxymethylene-6-methyl-2,3-dihydrobenzofuran, together with twenty five known compounds such as paeonol, <math>\beta</math>-sitosterol, ursolic acid, betulinic acid, daucosterol, benzoic acid, oleanolic acid, Palbinone, apiopaeonoside, paeonoside, 6-methoxypaeoniflotrigenone, benzoylpaeniflorin, methylgallate, kaempferol, paeoniflorin, <math>\alpha</math>-benzoyloxypaeoniflorin, <math>\beta</math>-benzoyloxypaeoniflorin, galloylpaeniflorin, (+)-catechin, gallic acid, peanolide, paeoniflorigenone, 30-norhederagenin, oxypaeniflorin, and mudanpinoside H. Their structures were elucidated from physicochemical data and in comparison with those of literatures.</p> <p>A HPLC method was developed for quality assessment of Ramulus Cinnamomi and Moutan Cortex Radicis through determination of key pharmacological compounds. Key pharmacological compounds of Ramulus Cinnamomi were determined 7 compounds such as coumarin, 2-hydroxycinnamaldehyde, cinnamyl alcohol, cinnamic acid, cinnamaldehyde, 2-methoxy cinnamaldehyde, eugenol, and key pharmacological compounds of Moutan Cortex Radicis were determined 3 compounds such as paeonol, paeoniflorin, benzoyl paeoniflorin. The chromatographic fingerprints were developed and validated by analyzing several samples of Moutan Cortex Radicis and Ramulus Cinnamomi from different markets in Korea China and Vietnam. The key pharmacological compounds were determined by their characteristic UV profile and the information of molecular structure provided by LC/MS method. The linearity, precisions of intra-day and inter-day, recoveries, were measured using validation method. HPLC fingerprint analysis, principle component analysis (PCA), and cluster analysis were analyzed for quality assessment. Thin layer chromatography (TLC) comparisons were made using reversed-phase plate and normal-phase plate.</p>			

<b>Opinion of Project Manager</b>	
<b>Scope</b>	<p>Over than 10 bioactive compounds were isolated from the ethanol extracts of Ramulus Cinnamomi and Moutan Cortex Radicis, respectively. The structures of isolated compounds were determined by the spectroscopic analysis. 70% ethanol extracts of Ramulus Cinnamomi and Moutan Cortex Radicis were provided to analysis team for further investigation.</p> <p>A HPLC method was developed for quality assessment of Ramulus Cinnamomi and Moutan Cortex Radicis through determination of key pharmacological compounds and the chromatographic fingerprints were developed and validated by analyzing several samples of Moutan Cortex Radicis and Ramulus Cinnamomi.</p>
<b>Limitation</b>	<p>Most of the samples of Ramulus Cinnamomi are considered <i>Cinnamomum casia</i>. However, it was difficult to analyse and compare with standard sample because it was difficult to get standard sample.</p> <p>In case of Moutan Cortex Radicis, most of the samples obtained from markets are Chinese samples. Therefore, it was difficult to developed the chromatographic fingerprints by analyzing several samples of Moutan Cortex Radicis due to the shortage of Korean samples.</p>
<b>Direction For Citation</b>	
<b>Supervisory Office</b>	KFDA Human Exposure Assessment Division

편집순서 6 : 총괄연구과제의 연구결과

## 총괄연구개발과제 연구결과

### 제1장 총괄연구개발과제의 최종 연구개발 목표

#### 1.1 총괄연구개발과제의 목표

구 분	최종 연구개발 목표
총괄연구과제	<p>1차년도 연구목표</p> <p>한약재의 유효성분 중심의 관리를 위하여 한약재(목단피, 계지) 생리활성성분 분리(각 10종 이상) 및 연구용 시료를 제공하고, 분리된 성분들의 분석법을 개발하고자 함.</p> <p>2차년도 연구목표</p> <p>한약재의 유효성분 중심의 관리를 위하여 한약재(목단피, 계지) 생리활성성분 분리(각 10종 이상) 및 연구용 시료를 제공, 유효성분 정량용 표준품을 제조, 분리된 성분들의 패턴인식법에 의한 기원별, 산지별 한약재 정보를 구축하고자 함.</p>
제1 세부과제	<p>한약재의 유효성분 중심의 관리를 위하여 한약재(목단피, 계지) 생리활성성분 분리(각 10종 이상) 및 연구용 시료를 제공하여 분리된 성분들의 패턴 인식법에 의한 기원별, 산지별 한약재 정부를 구축하고자 함.</p>
제2 세부과제	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) 계지와 목단피의 생리활성성분 분석에 관하여 HPLC-UV 및 LC/MS/MS를 활용한 분석법 개발하고자 함.</li> <li>2) 계지와 목단피의 생리 활성 물질의 HPLC-UV 및 LC/MS/MS 분석법의 과학적 validation 법의 확립: 직선성, 정량범위, 정확성, 정밀성, 검출한계, 정량한계, 완전성, 안정성 등을 실시하고자 함.</li> <li>3) 계지와 목단피의 지표물질에 대한 동시 다 성분 분석법 확립하고자 함.</li> <li>4) 패턴인식법에 의한 기원별, 산지별 분석을 실시하고자 함.</li> </ol>

## 1.2 총괄연구개발과제의 목표달성도

가. 계지 및 목단피에 함유되어 있는 유효성분들을 중심으로 한약재규격관리에 요구되는 10종 이상의 생리활성성분 분리에 성공하였다. 즉, 계지로부터는 5종의 신물질인 cassiferaldehyde, cinnacassine, icariside DC, dihydrocinnacasside, cinnacasside와 22종의 알려진 화합물 cinnamaldehyde, eugenol, 2-methoxycinnamaldehyde, coumarin,  $\beta$ -sitosterol, 2-hydroxy cinnamaldehyde, cinnamic acid, coniferaldehyde, cinnamic alcohol, 4-hydroxy benzoic acid, syringaldehyde, daucosterol, amygdalactone, eugenol glucopyranoside, *o*-coumaric acid, rosavin, (+)-lyoniresinol-3a-O- $\beta$ -D-glucopyranoside, (-)-lyoniresinol-3a-O- $\beta$ -D-glucopyranoside, dihydromelilotoside, (+)-lyoniresinol, (-)-lyoniresinol, methyl dihydromelilotoside 등 총 27종의 생리활성성분을 분리하였고, 목단피로부터는 2종의 신물질인 4-O-*n*-butylpaeoniflorin, 5-hydroxy-3-hydroxymethylene-6-methyl-2,3-dihydrobenzofuran와 25종의 알려진 화합물인 paeonol,  $\beta$ -sitosterol, ursolic acid, betulinic acid, daucosterol, benzoic acid, oleanolic acid, Palbinone, apiopaeonoside, paeonoside, 6-methoxypaeoniflotrigenone, benzoylpaeoniflorin, methylgallate, kaempferol, paeoniflorin,  $\alpha$ -benzoyloxypaeoniflorin,  $\beta$ -benzoyloxypaeoniflorin, galloylpaeoniflorin, (+)-catechin, gallic acid, paeonolide, paeoniflorigenone, 30-norhederagenin, oxypaeoniflorin, mudanpinoside H 등 총 27종의 생리활성성분을 분리하였다. 대량분리를 통해 계지로부터 coumarin, 2-hydroxycinnamaldehyde, cinnamyl alcohol, cinnamic acid, cinnamaldehyde, 2-methoxy cinnamaldehyde, eugenol 등의 7종, 목단피로부터 paeoniflorin, paeonol, benzoyl paeoniflorin 등의 3종의 유효성분을 확보하였으며, 확보된 유효성분들을 식약청에 제출하였다.

나. 계지와 목단피 각각으로부터 분리 정제된 10종 이상의 생리활성성분을 생리활성성분 분석팀 및 효능확인연구팀에 연구용으로 제공하였다.

다. 계지와 목단피의 중국산은 서울 경동시장, 대구약령시장 및 금산생약시장에서 구입하였고, 국내산은 생산지를 방문하여 구입하였다. 이들 자료들을 약전(8개정)규정대로 각각 5종 이상의 시료에 대해 70% 에탄올로 추출하여 용매를 유기하고 표준엑스를 제조하여 효능연구진에게 제공하였다.

라. 계지와 목단피의 생리활성성분 동시분석에 관한 연구를 수행하여, 계지와 목단피의 생리활성 물질의 HPLC-UV 조건을 설정하였다. HPLC 조건의 validation을 위하여 설정한 조건의 직선성, 정량범위, 정확성, 정밀성, 검출한계, 정량한계, 완전성, 안정성 등을 조사하였다.

마. 계지의 경우는 coumarin, 2-hydroxycinnamaldehyde, cinnamyl alcohol, cinnamic acid,

cinnamaldehyde, 2-methoxy cinnamaldehyde, eugenol 등의 7개의 지표물질에 대한 동시분석법을 개발하였고, 목단피에 대하여는 paeoniflorin, paeonol, benzoyl paeoniflorin 등의 3종의 지표물질에 대한 동시 다 성분 분석법을 확립하였다. 각각의 HPLC 분석결과를 패턴인식법에 의하여 분석하여 기원별, 산지별 분석을 수행하였으며, TLC와 LC/MS 분석 등을 통하여 주요성분을 확인하였다.

### 1.3 국내·외 기술개발 현황

#### 가. 계지

계지의 경우 대한약전 9개정에도 확인시험만 기재되어 있고 정량법 등은 체계적으로 확립되어 있지 않다. 또한 계지와 계피의 구별 등도 확립되어 있지 않다. 외국의 경우 계지의 분석법에 대한 연구가 일부 논문으로 보고되었다. 본 연구로 계지와 계피의 HPLC 분석법을 확립하였고 패턴인식으로 계지와 계피의 구별이 가능하게 되었다.

#### 특허

- (1). 식물성 정유 및 정유 성분을 유효성분으로 포함하는 살선충성 조성물. 국내특허 번호 10-0750750-0000 (2007.08.13).
- (2). 계지 추출물을 포함하는 골절의 예방 및 치료용 조성물. 국내특허 번호 10-0700481-0000 (2007.03.21).
- (3). 천연 모기 기피제 조성물. 국내특허 번호 10-0484887-0000 (2005.04.13).
- (4). BHH 17 복합생약추출물을 유효성분으로 함유하는 골절 질환의 예방 및 치료용 조성물. 국내특허 번호 10-0851783-0000 (2008.08.06).
- (5). 신부전 예방 및 치료용 약제학적 조성물. 국내특허 번호 10-0770634-0000 (2007.10.22).
- (6). 나노입자화된 계피 추출물을 함유하는 구강위생 증진용 조성물. 국내특허 번호 10-0489267-0000 (2005.05.03).
- (7). 학습능력을 향상시키는 약제 조성물 및 그 제조방법. 국내특허 번호 10-0530213-0000 (2005.11.15).
- (8). 계피 추출물을 유효성분으로 함유하는 장내 균총 개선 및면역기능 증진용 조성물. 국내특허 번호 10-0842053-0000 (2008.06.23).
- (9). 해충억제효과가 있는 베개의 제조방법. 국내특허 번호 10-0851883-0000 (2008.08.06).
- (10). 신나밀알콜을 포함하는 향진균제 조성물. 국내특허 번호 10-0437576-0000 (2004.06.16).

#### 나. 목단피

목단피의 경우 대한약전 9개정에 paeonol에 대한 정량법이 공고되었으나 3가지 성분의 동시 분석법에 대해서는 기술이 개발되어 있지 않다. 최근 목단피에 대한 HPLC 정량법에 관한 외국논문도 발표되었

다. 본 연구를 통한 지표성분 동시 분석기술은 향후 목단피의 정량법 확립에 활용될 수 있다.

#### 특허

- (1). 목단피 추출물을 유효성분으로 함유하는 당뇨병 치료용 조성물. 국내특허 번호 10-0626357-0000 (2006.09.13).
- (2). 목단피 추출물을 유효성분으로 포함하는 조성물. 국내특허 번호 10-0536550-0000 (2005.12.07).
- (3). 목단피 추출물 또는 이로부터 분리된 활성성분을 포함하는 혈압강하용 조성물. 국내특허 번호 10-0732886-0000 (2007.06.21).
- (4). 목단피 추출물을 유효성분으로 함유하는 구취 억제용 구강 조성물. 국내특허 번호 10-0537834-0000 (2005.12.13).
- (5). 오배자 및 목단피 추출물을 함유하는 돼지 유행성 설사바이러스의 치료 및 예방용 조성물. 국내특허 번호 10-0839099-0000 (2008.06.11).
- (6). 목단피추출물과 자귀나무추출물을 함유하는 노화방지화장료 조성물. 국내특허 번호 10-0443588-0000 (2004.07.28).
- (7). 목단피 추출물 또는 이로부터 분리된 화합물들을 포함하는항균조성물. 국내특허 번호 10-0757219-0000 (2007.09.04).
- (8). 목단피 추출물을 함유하는 치주염 치료용 조성물. 국내특허 번호 10-0829519-0000 (2008.05.07).
- (9). 항균 효과를 갖는 목단피의 추출물로부터 분리된 신규구조의 6'-오-바닐릴옥시피에오니플로린 화합물을유효성분으로 함유하는 조성물. 국내특허 번호 10-0822781-0000 (2008.04.10).
- (10). 멜라닌 생성을 억제하는 등대풀, 목단피, 알로에혼합추출물을 함유하는 미백 화장료 조성물. 국내특허 번호 10-0614467-0000 (2006.08.14).

## 제2장 총괄연구개발과제의 최종 연구개발 내용 및 방법

### 가. 계지 및 목단피로부터 생리활성물질 분리

계지 및 목단피 시료를 확보하여 에탄올을 가하여 80℃에서 3회 환류 추출한 후 여과한다. 여과액을 40~45℃에서 감압 농축하여 에탄올 엑스를 얻은 후, 에탄올 엑스를 증류수 2 리터에 현탁시킨 후 hexane, EtOAc 및 BuOH로 순차적으로 분획한다. 각 분획물들을 농축하여 hexane 분획물, EtOAc 분획물, BuOH 분획물 및 H<sub>2</sub>O 분획물을 얻는다. 각각의 분획물에 대해 각종 chromatography를 반복 실시하여 생리활성성분을 분리한다. 분리한 화합물들의 구조는 각종 분광학적 방법과 문헌과의 비교를 통하여 결정한다.

### 나. 계지 및 목단피의 70% 에탄올 엑스 제조

일정량의 계지의 가는가지와 목단피의 뿌리껍질에 각각 에탄올 (700 ml)와 물 (300 ml)의 혼합용매를 가하여 80℃에서 2번 환류 추출한 후 여과한다. 여과액을 40~45℃에서 감압 농축하여 계지와 목단피의 70% 에탄올 엑스를 각각 얻는다.

### 다. 효능확인 연구를 위한 생리활성성분 대량 제조

생리활성성분 분석팀 및 효능확인연구팀에 연구용으로 제공하기 위하여 계지 및 목단피로부터 각각 3개의 주성분과 생리활성이 검증된 물질을 10개 이상 확보하여 HPLC로 그 순도를 측정하고 후 생리활성성분 분석팀 및 효능확인연구팀에 연구용으로 제공한다.

### 라. 계지와 목단피의 생리활성성분 분석에 관한 HPLC-UV 및 LC/MS/MS를 활용한 분석법 개발

(1) 계지, 목단피의 기원 및 산지별 20품목 이상의 시료를 확보한다.

- 생약의 분류 전문 연구자인 사업단에서 일부를 제공받으며 나머지는 시중에서 구입함,
- 다른 생육조건과 환경에서 기인한 20품목 이상의 시료 확보

(2) 확보한 생약재료로부터 활성성분의 추출 및 분획을 수행한다.

- 온침, 냉침 및 용매분획을 이용한 최적 추출조건 확립

(3) 생약 성분을 동시에 3종 이상 정성, 정량적으로 검색할 HPLC 조건을 설정한다.

#### HPLC 조건 확립

- 이동상은 유기용매의 종류와 조성, 기울기 용리 유무, 완충용액의 pH, buffer 농도, 유량 등을 변화시켜가며 동시에 유효성분들을 분석할 수 있는 최적의 조건을 결정.

- 컬럼은 C18, C8, CN, NH2 컬럼과 기타 특수 컬럼 등을 검토하여 최고의 감도와 분리능을 보이는 것으로 선정.
- 기타 컬럼 온도와 주입량 등에 따른 분리능 변화도 검토함.

(4) 정확한 정량분석을 위한 validation 방법을 확립한다.

- ICH guideline에 의하면 정확도(accuracy), 정밀도(precision), 재현성(reproducibility), 직선성(linearity), 정량범위(range), 검출한계(limit of detection), 정량한계(limit of quantitation), 완전성(robustness), 안정성(stability) 등을 조사함.

(5) LC-DAD-MS에 의한 화합물의 동정을 수행한다.

- LC-DAD를 이용한 UV 스펙트럼과 LC-MS를 이용한 mass 스펙트럼을 표준품과 비교하여 목단피 및 계지 추출물의 성분을 동정한다.

(6) TLC 패턴 분석으로 한약재 시료 target 생리활성 물질을 모니터링한다.

#### 마. 패턴인식법에 의한 기원별 산지별 분석

(1) 시료의 추출 및 분석

- 목단피 및 계지를 70% 에탄올로 추출하고 여과한 후 추출물을 HPLC-UV로 분석하여 크로마토그램으로부터 피크를 얻는다. 각 피크의 유지시간과 면적을 모든 시료에 대해 표로 정리하고 각 피크의 면적을 내부표준물질의 면적으로 나눈 값을 최종 자료로 하여 통계처리 한다.

(2) 표준품의 평가

- 표준품은 유사도비교, 진위판정, 원산지판정에 중요한 역할을 하므로 제대로 된 표준품을 선택하는 것은 통계분석을 위해 매우 중요하다. 사업단에서 제공한 생약을 표준생약(표준품)으로 간주하고 다변량기각검정법, 유사도비교, 군집분석 등의 다양한 기법을 이용하여 평가한 후 개개의 품질 및 사용여부를 결정 한다.

(3) 표준크로마토그램의 작성

- 통계조사에 사용될 표준품 및 피크가 확정되면 다수의 표준품에 해당하는 각각의 피크를 평균하여 표준크로마토그램을 작성한다. 각 산지에 따른 피크의 종류 및 크기가 다른 경우는 산지별로 각각 표준크로마토그램을 작성할 수도 있다. 표준크로마토그램은 유사도의 계산, 진위판정, 원산지판정 등 대상시료의 크로마토그램과 표준품의 크로마토그램을 비교해야하는 경우에 사용한다.

(4) 표준품에 의한 생약의 진위판정



- 진위가 알려져 있는 시험용시료 (밸리테이션시료) 또는 시험용 미지시료의 크로마토그램을 표준크로마토그램과 비교하여 진위를 판정하는 방법으로 다변량기각검정, 유사도비교, 군집분석 등의 기법을 이용한다. 판정기준은 연구자가 따로 정할 수 있다. 각 산지에 따른 피크의 종류 및 크기가 달라 산지별 구별이 가능한 경우 산지별로 표준크로마토그램을 사용하여 판정한다.

(5) 표준품에 의한 생약의 원산지판정

- 진위가 알려져 있는 시험용시료 (밸리테이션시료) 또는 시험용 미지시료의 크로마토그램을 표준크로마토그램과 비교하여 원산지를 판정하는 방법으로 관별분석, 주성분분석법, 부분최소자승 회귀법 등을 이용한다.

## 제3장 총괄연구개발과제의 최종 연구개발 결과

### 가. 계지 및 목단피로부터 생리활성물질 분리

계지 30 kg에 에탄올을 가하여 80℃에서 3회 환류 추출한 후 여과하였다. 여과액을 40~45℃에서 감압 농축하여 에탄올 엑스 3.5 kg을 얻었다. 에탄올 엑스를 증류수 2 리터에 현탁시킨 후 hexane, EtOAc 및 BuOH로 순차적으로 분획하였다. 각 분획물들을 농축하여 hexane 분획물 (620 g), EtOAc 분획물 (530 g), BuOH 분획물 (420 g) 및 H<sub>2</sub>O 분획물을 얻었다. 각각의 분획들에 대해 각종 chromatography를 반복 실시하여 계지로부터 5종의 신물질인 cassiferaldehyde, cinnacassine, icariside DC, dihydrocinnacasside, cinnacasside와 22종의 알려진 화합물 cinnamaldehyde, eugenol, 2-methoxycinnamaldehyde, coumarin,  $\beta$ -sitosterol, 2-hydroxy cinnamaldehyde, cinnamic acid, coniferaldehyde, cinnamic alcohol, 4-hydroxy benzoic acid, syringaldehyde, daucosterol, amygdalactone, eugenol glucopyranoside, *o*-coumaric acid, rosavin, (+)-lyoniresinol-3a-O- $\beta$ -D-glucopyranoside, (-)-lyoniresinol-3a-O- $\beta$ -D-glucopyranoside, dihydromelilotoside, (+)-lyoniresinol, (-)-lyoniresinol, methyl dihydromelilotoside 등 총 27종의 생리활성성분을 분리하였다. 목단피 20 kg에 에탄올을 가하여 80℃에서 3번 환류 추출한 후 여과하였다. 여과액을 40~50℃에서 감압 농축하여 총 추출물 3 kg을 얻었다. 이 추출액을 헥산과 증류수로 현탁시킨 후 헥산 층을 감압 농축한 결과 헥산 가용부 400 g을 얻었다. 잔류 물 층을 에틸아세테이트와 부탄올로 추출하여 에틸아세테이트 가용부 600 g과 부탄올 가용부 200 g 얻었다. 목단피로부터는 2종의 신물질인 4-*O*-*n*-butylpaeniflorin, 5-hydroxy-3-hydroxymethylene-6-methyl-2,3-dihydrobenzofuran와 25종의 알려진 화합물인 paeonol,  $\beta$ -sitosterol, ursolic acid, betulinic acid, daucosterol, benzoic acid, oleanolic acid, Palbinone, apiopaeonoside, paeonoside, 6-methoxypaeoniflotrigenone, benzoylpaeniflorin, methylgallate, kaempferol, paeoniflorin,  $\alpha$ -benzoyloxypaeoniflorin,  $\beta$ -benzoyloxypaeoniflorin, galloylpaeniflorin, (+)-catechin, gallic acid, paeonolide, paeoniflorigenone, 30-norhederagenin, oxypaeniflorin, mudanpinoside H 등 총 27종의 생리활성성분을 분리하였다. 분리한 화합물들의 구조는 각종 분광학적 방법과 문헌과의 비교를 통하여 결정하였다.

### 나. 계지 및 목단피의 70% 에탄올 엑스 제조

계지의 가는가지 500 g과 목단피의 뿌리껍질 500 g에 각각 에탄올 (700 ml)와 물 (300 ml)의 혼합용매를 가하여 80℃에서 2번 환류 추출한 후 여과한다. 여과액을 40~45℃에서 감압 농축하여 계지의 70% 에탄올 엑스 (32.5 g, 6.5%)와 목단피의 70% 에탄올 엑스 (75 g, 15%)를 얻었다.

### 다. 효능확인 연구를 위한 생리활성성분 대량 제조

계지의 지표성분을 coumarin, 2-hydroxycinnamaldehyde, cinnamyl alcohol, cinnamic acid,

cinnamaldehyde, 2-methoxycinnamaldehyde, eugenol으로 설정하였고, 목단피의 지표성분은 paeonol, paeoniflorin, benzoyl paeoniflorin으로 설정하여 생리활성성분 분석팀에 제공하였고, 주요생리활성 성분 10종 이상을 확보하여 효능확인 연구팀에 연구용으로 제공하였다.

#### 라. 계지의 생리활성성분 분석법 개발

- 1) HPLC 분석조건의 확립: 계지의 생리활성성분인 coumarin, 2-hydroxycinnamaldehyde, cinnamyl alcohol, cinnamic acid, cinnamaldehyde, 2-methoxy cinnamaldehyde, eugenol 등의 7가지 성분을 지표성분으로 설정하여, 이들 7가지 성분을 동시에 분석할 수 있는 조건을 확립하였다. 내부 표준물질로는 retention time과 분리능을 고려하여 bisphenol로 선정하였다.
- 2) 계지 성분의 추출조건: 계지의 지표성분 분석을 위한 최적 추출조건을 70 % MeOH로 설정하였다.
- 3) 계지 성분의 추출방법: 계지의 지표성분 추출방법 중에서는 sonication 방법이 가장 유용한 방법으로 결정하였다.
- 4) 계지 성분의 추출시간: 가장 양호한 추출시간은 60 분 추출의 경우가 지표성분의 함량이 가장 높은 결과를 얻었다.
- 5) 계지 성분의 추출횟수: 추출횟수는 1회 50 ml 로 추출하는 것이 함량의 큰 차이 없이 편리하였다.
- 6) HPLC 분석을 위한 이동상 용매는 gradient condition으로 설정하였다. [0-5 min, A (90 %); 5-20 min, A (90-80 %); 20-40 min, A (80-60 %); 40-60 min, A (60-0 %); 60-65 min, A (0-100 %), 65-70 min, A (100-90 %) (A: 0.01 % phosphoric acid in water, B: acetonitrile)]
- 7) HPLC 분석조건의 validation을 위하여 정확성, 정밀성, 일내 및 일간 재현성, 직선성, 정량범위, 검출한계, 정량한계, 완전성 등을 조사하였다.
- 8) 표준품의 안정성 시험을 수행하여 계지의 지표성분은 30일 동안 유의성 있는 함량변화를 나타내지 않았다.
- 9) 계지의 지표성분은 설정한 HPLC 조건에서 coumarin (S1, 24.86분), 2-hydroxyl cinnamaldehyde (S2, 25.45분), cinnamyl alcohol (S3, 26.97분), cinnamic acid (S4, 28.84분), cinnamaldehyde (S5, 31.03분), 2-methoxy cinnamaldehyde (S6, 33.39분), eugenol (S7, 34.43분), bisphenol은 35.61분의 양호한 분리능을 나타내었다.

10) LC-DAD-MS에 의하여 계지의 성분을 확인하였다.

11) 계지 시료의 HPLC 분석: 사업단과 전국 각지에서 구입한 32개의 계지 시료와 24개의 계피시료를 확보하고, coumarin, 2-hydroxycinnamaldehyde, cinnamyl alcohol, cinnamic acid, cinnamaldehyde, 2-methoxy cinnamaldehyde, eugenol의 함량을 분석하였다.

12) 패턴인식법에 의한 계지, 계피의 평가

- ① 계지, 계피 시료에 대한 coumarin, 2-hydroxyl cinnamaldehyde, cinnamyl alcohol, cinnamic acid, cinnamaldehyde, 2-methoxy cinnamaldehyde 및 eugenol의 함량은 상당히 넓은 범위에 퍼져 있었다. 계지에서는 cinnamic acid, 2-methoxy cinnamaldehyde, eugenol의 함량이, 계피에서는 coumarin, 2-hydroxyl cinnamaldehyde, cinnamyl alcohol, cinnamaldehyde의 함량이 높은 것으로 나타났다.
- ② 계지, 계피 시료 7개의 성분에 대해서 지역별 차이보다는 품목별 차이가 더 컸으며, 계지, 계피에 있어 산지의 차이가 거의 없다는 것이 파악되었다.
- ③ 유클리드 거리, 면적비, 코사인, 상관계수 각각에 대해 계지를 계피로, 또는 계피를 계지로 분류할 수 있는 오분류 확률은 각각 7.1%, 8.9%, 32.1%, 37.5%로 나타나, 표준계지와 시료와의 유사성 척도로 거리나 면적비를 사용하는 것이 효율적일 것으로 판단되었다.
- ④ 성분함량을 기초한 계층적 군집방법에서는 56개의 시료가 크게 두 개의 군집으로 나누어졌다. 제1군집은 35개의 시료로 계지가 주로 포함되었고, 제2군집은 나머지 21개의 계피시료로 구성되었다.
- ⑤ 주성분분석에서 comp.1은 전체변량의 약 97%를 comp.2는 약 3%를 설명하는 것으로 나타났다. 주성분분석에 의한 군집 분류에는 주로 성분 CAL 및 EG 함량의 영향이 큰 것으로 나타났다.
- ⑥ 판별식을 이용하였을 경우 계지, 계피 시료는 약 98%의 정확성을 보였다. 판별식을 이용하여 계지계피의 원산지분석을 실시하였을 경우 약 76%의 낮은 정확성을 보여 판별식을 이용한 원산지 감별이 큰 의미가 없을 것으로 판단되었다.

13) TLC 방법에 의한 계지의 성분 확인: 계지의 지표성분인 cinnamaldehyde와 coumarin의 분리를 위하여 순상 TLC plate에서 hexane : ethylacetate (5:1)의 용매에서 전개하여 각각의 반점을 UV 254, 360 nm에서 확인하고 다시 2,4-dinitrophenylhydrazine 시약으로 발색하여 각각의 반점을 확인하였다.

14) 시료의 DNA 감별결과에 따른 패턴분석의 차이: 제공된 22개의 계지시료의 감별결과 *C. cassia*가 2개, *C. sieboldii*가 20로 나타났다. 각 시료의 패턴분석 파라미터인 distance, area ratio 및 coumarin, 2-hydroxyl cinnamaldehyde, cinnamylalcohol, cinnamic acid, cinnamaldehyde, 2-methoxycinnamaldehyde, eugenol 등의 성분함량을 비교한 결과 P 값이 모두 0.1 이상으로 *C. cassia*와 *C. sieboldii*사이에는 유의한 차이가 보이지 않았다.

#### 마. 목단피의 생리활성성분 분석법 개발

- 1) HPLC 분석조건의 확립: 목단피의 생리활성성분인 paeonol, paeoniflorin, benzoyl paeoniflorin을 지표 물질로 설정하고 이들 3종 화합물의 분석조건을 설정하였다. 내부 표준물질로는 retention time을 고려 하여 bisphenol로 선정하였다.
- 2) 목단피 성분의 추출조건: 목단피의 지표성분인 paeonol, paeoniflorin, benzoyl paeoniflorin의 분석을 위한 최적 추출조건을 70 % EtOH로 설정하였다.
- 3) 목단피 성분의 추출방법: 목단피의 지표성분 추출방법 중에서는 sonication 방법이 가장 유용한 방법으로 결정하였다.
- 4) 목단피 성분의 추출시간: 가장 양호한 추출시간은 60 분 추출의 경우가 지표성분의 함량이 가장 높은 결과를 얻었다.
- 5) 목단피 성분의 추출횟수: 목단피의 지표성분인 paeonol, paeoniflorin, benzoyl paeoniflorin을 sonication으로 추출할 경우 가장 양호한 추출횟수는 1회 50 ml 로 추출하는 것이 가장 편리하였다.
- 6) HPLC 분석을 위한 이동상 용매는 gradient condition으로서 0-20 min, A (10-20%); 20-30 min, A (20-40%); 30-50 min, A (40%); 50-60 min, A (40-100%); 60-70 min, A (100-10%); 70-80 min, A (10%)의 조건으로 분석하는 것이 가장 양호한 분석능을 나타내었다 (A: acetonitrile, B: 0.05% formic acid in water).
- 7) HPLC 분석조건의 validation을 위하여 정확성, 정밀성, 일내 및 일간 재현성, 직선성, 정량범위, 검출한계, 정량한계, 완전성 등을 조사하였다.
- 8) 표준품의 안정성 시험을 수행하여 목단피의 지표성분은 15일 동안 유의성 있는 함량변화를 나타내지 않았다.
- 9) 목단피의 지표성분은 설정한 HPLC 조건에서 paeonol (S1, 40.66분), paeoniflorin (S2, 18.96분), benzoyl paeoniflorin (S3, 34.47분)은 양호한 분리능을 나타내었고, 그 외에 gallic acid는 4.40분에서, (+)-catechin은 14.25분에서, galloyl paeoniflorin은 26.08분에서, 내부표준물질로 사용한 bisphenol은 43.82분에서 분리되었다.
- 10) LC-DAD-MS에 의하여 목단피의 성분을 확인한 결과 지표물질로 사용된 paeonol, paeoniflorin,

benzoylpaeoniflorin 이외에 gallic acid, catechin, methylgallate, galloylpaeoniflorin, benzoic acid, quercetin, paeoniflorigenone, kaempferol, paeonol 등도 확인되었다.

11) 목단피 시료의 HPLC 분석: 시중에서 20개의 시료를 구입하고, paeonol, paeoniflorin, benzoyl paeoniflorin의 함량을 분석하였다.

12) 패턴인식법에 의한 목단피의 기원별 산지별 분석

① 표준품의 평가: 사업단에서 제공한 표준품 7개(S10-S16)에 대해 다변량기각검정법, 유사도비교, 군집분석 등의 다양한 기법을 이용하여 평가한 결과 목단피의 국산, 중국산의 분류는 통계적으로 큰 의미가 없는 것으로 판단되었다.

② 목단피와 작약시료의 HPLC 크로마토그램을 다변량기각검정, 유사도비교, 군집분석 등을 수행한 결과 목단피와 작약은 확연히 구별되는 것을 알 수 있었다.

③ 목단피 시료에 대한 판별분석으로 국산과 중국산의 구별은 가능하나 국산 시료의 수가 너무 적어 통계적으로 신뢰도는 높지 않을 것으로 판단된다.

13) TLC 방법에 의한 목단피의 성분 확인: 목단피의 지표성분인 paeonol, paeoniflorin, benzoylpaeoniflorin의 분리를 위하여 역상 TLC (MeOH : H<sub>2</sub>O = 2 : 1, UV254 nm, 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 와 순상 TLC의 조건을 확립하였다 [paeoniflorin, benzoylpaeoniflorin → CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O (5:1:0.1), paeonol → hexane:EtOAc (7:1)].

14) 목단피와 작약의 성분을 HPLC로 비교 분석한 결과 작약의 경우는 paeoniflorin의 함량이 가장 높고, benzoyl paeoniflorin이 높으며, paeonol의 경우는 목단피에 비하여 상대적으로 낮은 것을 알 수 있었다.

15) 시료의 DNA 감별결과에 따른 패턴분석의 차이: 제공된 20개의 시료의 감별결과 16개 시료는 모두 기원이 확인된 목단과 100% 일치하여 목단의 약재로 확인되었으며, 4개 시료는 2-8bp 차이를 나타내어 98-99%의 유사성을 보였다. 기원이 확실한 16개 시료와 그렇지 않은 4개의 시료를 분리하여 패턴분석 파라미터인 distance, area ratio 및 Paeonol, Paeoniflorin, Benzoylpaeoniflorin 등의 성분함량을 비교한 결과 P 값이 모두 0.1 이상으로 두 그룹의 차이점이 나타나지 않아 20개의 시료 모두가 목단피인 것으로 추정된다.

## 제4장 총괄연구개발과제의 연구결과 고찰 및 결론

### 1. 계지 및 목단피로부터 생리활성물질 분리

계지로부터 5종의 신물질인 cassiferaldehyde, cinnacassine, icariside DC, dihydrocinnacasside, cinnacasside와 22종의 알려진 화합물 cinnamaldehyde, eugenol, 2-methoxycinnamaldehyde, coumarin,  $\beta$ -sitosterol, 2-hydroxy cinnamaldehyde, cinnamic acid, coniferaldehyde, cinnamic alcohol, 4-hydroxy benzoic acid, syringaldehyde, daucosterol, amygdalactone, eugenol glucopyranoside, *o*-coumaric acid, rosavin, (+)-lyoniresinol-3a-O- $\beta$ -D-glucopyranoside, (-)-lyoniresinol-3a-O- $\beta$ -D-glucopyranoside, dihydromelilotoside, (+)-lyoniresinol, (-)-lyoniresinol, methyl dihydromelilotoside 등 총 27종의 생리활성성분을 분리하였으며, 이 중 coumarin, 2-hydroxycinnamaldehyde, cinnamyl alcohol, cinnamic acid, cinnamaldehyde, 2-methoxy cinnamaldehyde, eugenol 등의 화합물이 주성분이었다. 목단피로부터는 2종의 신물질인 4-*O-n*-butylpaeoniflorin, 5-hydroxy-3-hydroxymethylene-6-methyl-2,3-dihydrobenzofuran와 25종의 알려진 화합물인 paeonol,  $\beta$ -sitosterol, ursolic acid, betulinic acid, daucosterol, benzoic acid, oleanolic acid, Palbinone, apiopaeonoside, paeonoside, 6-methoxypaeoniflotrigenone, methylgallate, benzoylpaeoniflorin, kaempferol, paeoniflorin, *a*-benzoyloxypaeoniflorin,  $\beta$ -benzoyloxypaeoniflorin, galloylpaeoniflorin, (+)-catechin, gallic acid, paeonolide, paeoniflorigenone, 30-norhederagenin, oxypaeoniflorin, mudanpinoside H 등 총 27종의 생리활성성분을 분리하였다. 이 중 paeoniflorin, paeonol, benzoyl paeoniflorin 등이 주 생리활성물질이라 사료된다. 분리된 주요 화합물 및 주성분들을 바탕으로 시중에 유통되고 있는 한약재 및 한약제제의 품질관리 및 검사에 활용될 수 있으리라 기대된다.

### 2. 계지 및 목단피의 생리활성성분 분석법 개발

계지의 생리활성성분인 coumarin, 2-hydroxycinnamaldehyde, cinnamyl alcohol, cinnamic acid, cinnamaldehyde, 2-methoxy cinnamaldehyde, eugenol 등의 7가지 성분을 지표성분으로 설정하고, 이들 7가지 성분을 동시에 분석할 수 있는 HPLC 분석조건을 확립하였다. 계지 성분의 최적 추출조건을 70% MeOH로 설정하였고, 계지의 지표성분 추출방법 중에서는 sonication 방법이 가장 유용한 방법으로 결정하였다. HPLC 분석조건을 validation을 위하여 정확성, 정밀성, 일내 및 일간 재현성, 직선성, 정량범위, 검출한계, 정량한계, 완전성 등을 조사하였다. 패턴인식법에 의한 계지, 계피의 평가 결과 coumarin, 2-hydroxyl cinnamaldehyde, cinnamyl alcohol, cinnamic acid, cinnamaldehyde, 2-methoxy cinnamaldehyde 및 eugenol의 함량은 상당히 넓은 범위에 퍼져 있는 것을 확인할 수 있었는데, 계지에서는 cinnamic acid, 2-methoxy cinnamaldehyde, eugenol의 함량이, 계피에서는 coumarin, 2-hydroxyl cinnamaldehyde, cinnamyl alcohol, cinnamaldehyde의 함량이 높은 것으로 나타났다. 계지, 계피 시료 7개의 성분에 대해서 지역별 차이보다는 품목별 차이가 더 컸으며, 계지, 계피에 있어 산지의 차이가 거의 없다는 것이 파악되었다. 유클리드 거리, 면적비, 코사인, 상관계수 각각에 대해 계지를 계피로, 또는

계피를 계지로 분류할 수 있는 오분류 확률은 각각 7.1%, 8.9%, 32.1%, 37.5%로 나타나, 표준계지와 시료와의 유사성 척도로 거리나 면적비를 사용하는 것이 효율적일 것으로 판단되었다. 성분함량을 기초한 계층적 군집방법에서는 56개의 시료가 크게 두 개의 군집으로 나누어졌다. 제1군집은 35개의 시료로 계지가 주로 포함되었고, 제2군집은 나머지 21개의 계피시료로 구성되었다. 주성분분석에 의한 군집 분류에는 주로 성분 CAL 및 EG 함량의 영향이 큰 것으로 나타났다. 판별식을 이용하였을 경우 계지, 계피 시료는 약 98%의 정확성을 보였다. 판별식을 이용하여 계지계피의 원산지분석을 실시하였을 경우 약 76%의 낮은 정확성을 보여 판별식을 이용한 원산지 감별이 큰 의미가 없을 것으로 판단되었다.

목단피의 생리활성성분인 paeonol, paeoniflorin, benzoyl paeoniflorin을 지표 물질로 설정하고 이들 3종 화합물의 HPLC 분석조건을 확립하였다. 목단피 성분의 최적 추출조건을 70 % EtOH로 설정하였고, 지표성분 추출방법 중에서는 sonication 방법이 가장 유용한 방법으로 결정하였다. HPLC 분석조건 validation을 위하여 정확성, 정밀성, 일내 및 일간 재현성, 직선성, 정량범위, 검출한계, 정량한계, 완전성 등을 조사하였으며, 표준품의 안정성 시험을 수행하여 목단피의 지표성분은 15일 동안 유의성 있는 함량변화를 나타내지 않음을 확인할 수 있었다. 패턴인식법에 의한 목단피의 기원별 산지별 분석에서는 사업단에서 제공한 표준품 7개(S10-S16)에 대해 다변량기각검정법, 유사도비교, 군집분석 등의 다양한 기법을 이용하여 평가한 결과 목단피의 국산, 중국산의 분류는 통계적으로 큰 의미가 없는 것으로 판단되었다. 목단피와 작약시료의 HPLC 크로마토그램을 다변량기각검정, 유사도비교, 군집분석 등을 수행한 결과 목단피와 작약은 확연히 구별되는 것을 알 수 있었다. 목단피 시료에 대한 판별분석으로 국산과 중국산의 구별은 가능하나 국산 시료의 수가 너무 적어 통계적으로 신뢰도는 높지 않을 것으로 판단된다.

시중에 유통되고 있는 계지와 목단피 생약시료의 품질관리를 위하여 활성성분에 대하여 다양한 크로마토그래피 조건하에서의 함량분석 기초실험을 완료하고 이를 바탕으로 효율적인 동시 정성 및 정량분석법을 개발하였다. 각각의 HPLC 분석결과를 패턴인식법에 의하여 분석하여 기원별, 산지별 분석을 완료하였다. 본 연구과제에서 설정된 계지와 목단피의 지표성분 분석조건과 validation 등은 대한약전 또는 약전의 한약(생약)규격집의 확인시험이나 정량법에 활용될 수 있을 것으로 기대되며, 패턴인식법에 의한 결과 등은 한약재의 진위판정 및 원산지의 판정에 활용될 수 있을 것으로 기대된다. 특히 목단피와 작약의 구별, 계지와 계피의 구별, 중국산과 베트남산의 구별에 활용될 수 있을 것이다.



## 제5장 총괄연구개발과제의 연구성과

### 5.1 활용성과

총괄과제명	계지 및 목단피의 생리활성 성분 분리 및 분석 연구
총괄과제책임자	배기환 / 충남대학교 / 천연물화학

#### 가. 연구논문

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

#### 나. 학술발표

번호	발표제목	발표형태	발표자	학회명	연월일	발표지	국내/국제
1	Phytochemical study on the ethanol extract of twig of <i>Cinnamomum cassia</i>	포스터	잔민덕, 이익수, 트란만홍, 도티하, 윤의중, 배기환	한국식물과 학협의회	2007.11.01	충북 청주	국제
2	Isolation of bioactive compounds from mountain root bark ( <i>Paeonia suffruticosa</i> Andr.)	포스터	도티하, 잔민덕, 윤의중, 배기환	한국식물과 학협의회	2007.11.01	충북 청주	국제
3	Quality evaluation of Moutan Cortex Radicis by HPLC.	포스터	딩안, 오은기 원후통 박상혁 년수언 넵량춘 강종성 박경래 배기환 김영호	한국생약학 회	2007.11	서울	국내
4	Pattern analysis of Cortex Moutan by HPLC-DAD-MS	포스터	오은기 딩안 김영호 강종성	대한약학회	2008.4.30	제주	국내
5	Quality evaluation of Ramulus Cinnamomi by HPLC.	포스터	딩안 오은기 량춘 강종성 박경래 배기환 김영호	충남대 국제심포지 움	2008.10.30	대전	국내

### 다. 지식재산권

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

### 라. 정책활용

- 본 연구과제에서 설정된 목단피와 계지의 지표성분 분석조건과 validation 등은 대한약전 또는 약전의 한약(생약)규격집의 확인시험이나 정량법에 활용될 수 있음.
- 본 연구과제에서 수행된 패턴인식법에 의한 결과 등은 한약재의 진위판정 및 원산지의 판정에 활용될 수 있음. 특히 목단피와 작약의 구별, 계지와 계피의 구별, 중국산과 베트남산의 구별에 활용될 수 있음.

### 마. 타연구/차기연구에 활용

- 본 연구에서 수행된 HPLC 분석기술, MS에 의한 동정기술, validation 기술, 패턴인식분석기술 등은 생약(한약) 관련된 타연구나 차기의 한약재 과학화 사업 등에 활용될 수 있음.

### 바. 언론홍보 및 대국민교육

- ※ 언론홍보 및 대국민교육 내용, 일자 등을 간략히 기술함.

## 사. 기타

### R 패키지를 이용한 생약패턴분석 워크샵

일시: 2008년 6월 25일 8:30-20:00

장소: 충남대학교 약학대학 1층 삼남홀

주최: 충남대학교의약품개발연구소

강사: 김주한 (충남대 통계학과), 강종성(충남대 약학과), 이은주(충남대 의약품개발연구소)

## 5.2 활용계획

가. 한약재 유효성분 분석법 개발 및 유효성분 표준품 확보.

나. 유효성분 중심의 한약재 관리로 한약 및 한약제제의 품질수준 향상 및 안전성 제고

다. 한약 및 한약제제 품질관리 기반기술 구축

라. 본 연구결과는 대한약전이나 약전의 한약(생약)규격집의 확인시험이나 정량법의 개정이나 보완 등에 활용한다

마. 과제에서 설정된 목단피와 계지의 지표성분 분석조건과 validation 등은 한약재의 표준화와 품질평가에 활용한다

바. 본 연구과제에서 수행된 패턴인식법에 의한 결과 등은 한약재의 진위판정 및 원산지의 판정에 활용한다.

사. HPLC 분석에 의한 패턴인식으로 목단피와 작약의 구별에 활용한다

아. HPLC 분석과 패턴인식법에 의하여 계지와 계피의 구별에 활용할 수 있으며, 중국산과 베트남산의 구별에 활용한다.

자. 본 연구에서 수행된 HPLC 분석기술, MS에 의한 동정기술, validation 기술, 패턴인식분석기술 등은 생약(한약) 관련된 타연구나 차기의 한약재 과학화 사업등에 활용한다.

## 제6장 기타 중요변경사항

○ 처음 선정 시와 비교하여 변경된 내용을 명시

## 제7장 참고문헌

- 1) Choi, J., Lee, K. T., Ka, H., Jung, W. T., Jung, H. J., Park, H. J., Constituents of the essential oil of the *Cinnamomum cassia* stem bark and the biological properties. *Arch. Pharm. Res.*, **24**, 418-423 (2001).
- 2) Lee, H. K., Lee, H. S., Ahn, Y. J., Antignawing Factor Derived from *Cinnamomum cassia* Bark Against Mice. *J. Chem. Ecol.*, **25**, 1131-1139 (1999).
- 3) Jayaprakasha, G. K., Rao, L. J., Sakariah, K. K., Chemical and antitubercular constituents from the stem wood of *Cinnamomum kotoense*. *Tianran Chanwu Yanjiu Yu Kaifa*, **14**, 14-17 (2002).
- 4) Geirsson, Jon K. F., Arnadottir, L., and Jonsson, S., Short and stereoselective synthesis of polysubstituted cyclohexanones., *Tetrahedron*, **60**, 9149-9153 (2004).
- 5) Choi, J., Lee, K. T., Ka, H., Jung, W. T., Jung, H. J., Park, H. J., Constituents of the essential oil of the *Cinnamomum cassia* stem bark and the biological properties. *Arch. Pharm. Res.*, **24**, 418-423 (2001).
- 6) Cussans, N. J., and Huckerby, T. N., Carbon-13 NMR spectroscopy of heterocyclic compounds - II : A 20 MHz study of chemical shifts and carbon-proton coupling constants for coumarin and some bromocoumarins. *Tetrahedron*, **31**, 2587-2590 (1975).
- 7) Chang, I. M., Yun, H. S., and Yamasaki, K., Revision of <sup>13</sup>C NMR assignments of  $\beta$ -sitosterol-3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside isolated from *Plantago asiatica* seed. *Kor. J. Pharmacogn.*, **12**, 12-24 (1981).
- 8) Huong, D. T. L., Jo, Y. S., Lee, M. K., Bae, K. H., Kim, Y. H., Monoamine Oxidase Inhibitors from *Cinnamomi Cortex*, *Natural Product Science*, **6**, 16-19 (2000).
- 9) Sy, L. K., and Brown, G. D., Coniferaldehyde derivatives from tissue culture of *Artemisia annua* and *Tanacetum parthenium*. *Phytochemistry*, **50**, 781-785 (1999).
- 10) Mohammad, M., Mojtahedi, E. A., Sharifi, R., and Abaee, M. S., Lithium Bromide as a Flexible, Mild, and Recyclable Reagent for Solvent-Free Cannizzaro, Tishchenko, and Meerwein-Ponndorf-Verley Reactions. *Organic Letters*, **9**, 2791-2793 (2007).
- 11) Pyo, M. K., Koo, Y. K., Choi, Y., Hye, S., Anti-platelet Effect of the Phenolic Constituents Isolated from the Leaves of *Magnolia obovata*. *Natural Product Sciences*, **8**, 147-151 (2002).
- 12) Steinbeiss, S., Schmidt, C. M., Heide, K., and Gleixner, G., <sup>13</sup>C values of pyrolysis products from cellulose and lignin represent the isotope content of their precursors. *J. Anal. Appl. Pyrolysis.*, **75**, 19 - 26 (2006).
- 13) Aydin Tavman., Synthesis, spectral characterisation of

- 2-(5-methyl-1H-benzimidazol-2-yl)-4-bromo/nitro-phenols and their complexes with zinc(II) ion, and solvent effect on complexation. *Spectrochimica. Acta. Part A.*, **61**, 3087 - 3096 (2005).
- 14) Chang, I. M., Yun, H. S., and Yamasaki, K., Revision of  $^{13}\text{C}$  NMR assignments of  $\beta$ -sitosterol-3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside isolated from *Plantago asiatica* seed. *Kor. J. Pharmacogn.*, **12**, 12-24 (1981).
- 15) Fujita, T. and Nakayama, M., Perilloside a, a monoterpene glucoside from *Perilla frutescens*. *Phytochemistry*, **50**, 781-785 (1999).
- 16) Schwab, W., Scheller, G., and Schreier, P., Glycosidically bound aroma components from sour cherry. *Phytochemistry*, **29**, 607-612 (1990).
- 17) Dad, G., Corbani, A., Manitto, P., Speranza, G., and Lunazzi L., Lignan Glycosides from the Heartwood of European Oak *Quercus petraea*, *J. Nat. Prod.*, **52**, 1327-1330 (1989).
- 18) Otsuka, H., Takeuchi, M., Inoshiri, S., Sato, T., and Yamasaki, K., Phenolic compounds from *Coix lachryma-jobi* var. *Ma-yuen*. *Phytochemistry*, **28**, 883-886 (1989).
- 19) Aldrich library of  $^{13}\text{C}$  and  $^1\text{H}$  FT NMR spectra, 1992 (2) 1046A, 1046B (nmr).
- 20) Achenbach, H., Löwel, M., Waibel, R., Gupta, M., and Solis, P., New lignan glucosides from *Stemmadenia minima*. *Planta Med.*, **58**, 270 - 272 (1992).
- 21) Yang, Y. L., Chang, F. R., and Wu, Y. C., Squadinorlignoside: A Novel 7,9-Dinorlignan from the Stems of *Annona squamosa*. *Helvetica Chimica Acta*, **88**, 2731 - 2737 (2005).
- 22) Ono, M., Yoshida, A., Ito, Y., and Nohara, T., Phenethyl alcohol glycosides and isopentenol glycoside from fruit of *Bupleurum falcatum*. *Phytochemistry*, **51**, 819 - 823 (1999).
- 23) Miyase, T., Ueno, A., Takizawa, N., Kobayashi, H., and Oguchi, H., Studies on the glycosides of *Epimedium grandiflorum*: II. *Chem. Pharm. Bull.*, **35**, 3713 - 9371 (1987).
- 24) Taskova, R. M., Gotfredsen, C. H., and Jensen, S. R., Chemotaxonomic markers in *Digitalideae* (*Plantaginaceae*). *Phytochemistry*, **66**, 1440 - 1447 (2005).
- 25) Malakov, P. Y., Papanov, G. Y., De La Torre, M. C., and Rodriguez, B. Constituents of *Ajuga laxmanii*. *Fitoterapia*, **69**, 552-554 (1998).
- 26) Kishida, M., and Akita, H., Synthesis of rosavin and its analogues based on a Mizoroki-Heck type reaction. *Tetrahedron: Asymmetry*, **16**, 2625 - 2630 (2005).
- 27) Yagi, A., Tokubuchi, N., Nohara, T., Nonake, G., Nishioka, I., and Koda, A., The constituents of cinnamomi cortex. I. Structures of cinnassiol A and Its Glucoside. *Chem. Pharm. Bull.*, **28**, 1432 - 1436 (1980).
- 28) Fukuhara, Y. and Yoshida, D. Paeonol: A Bio-antimutagen Isolated from a Crude Drug, Moutan Cortex. *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 1441 - 1442 (1987).
- 29) Zhu, W. M., He, H. P., Fan, L. M., Shen, Y. M., Zhou, J., Hao, X. J. Components of Stem Barks

- of *Winchia calophylla* and Their Bronchodilator Activities. *J. Intergrative Plant Biology*, **47**, 892 - 896 (2005).
- 30) Ecap, M. D., Onaco, I., and Reviter, L. Stigmasterols from *Typha latifolia*. *J. Nat. Prod.*, **53**, 1430-433 (1990).
- 31) Kovganko, N. V., Kashkan, Z. N., and Borisov, E. V., <sup>13</sup>NMR Spectra of Functionally Substituted 3 $\beta$ -Chloroderivatives of Cholesterol and  $\beta$ -Sitosterol. *Chem. Nat. Comp.*, **36**, 595-599 (2000).
- 32) Thuong, P. T., Jin, W. Y., Lee, J. P., Seong, R. S., Lee, Y. M., Seong, Y. H., Song, K. S., and Bae, K. H., Inhibitory Effect on TNF-Induced IL-8 Production in the HT29 Cell of Constituents from the Leaf and Stem of *Weigela subsessilis*. *Arch. Pharm. Res.*, **28**, 1135-1141 (2005).
- 33) Siddiqui, S., Hafeez, F., Begum, S., Siddiqui, B. S., Oleanderol, a New Pentacyclic Triterpene from the Leaves of *Nerium oleander*. *J. Nat. Prod.*, **51**, 229-231 (1988).
- 34) Chang, I. M., Yun-Choi, H. S., and Yamasaki, K., Revision of <sup>13</sup>C-NMR assignment of  $\beta$ -sitosterol and  $\beta$ -sitosteryl-3-O- $\beta$ -D glucopyranoside isolated from *Plantago asiatica* seed. *Kor. J. Pharmacogn.*, **12**, 12-24 (1981)
- 35) Seebacher, W., Simic, N., Weis, R., Saf, R., and Kunert, O., Complete assignments of <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR resonances of oleanolic acid, 18-oleanolic acid, ursolic acid and their 11-oxo derivatives. *Magn. Reson. Chem.*, **41**, 636-639 (2003).
- 36) Kadota, S., Terashima, S., Basnet, P., Kikuchi, T., namba, T. Palbinone, a Novel Terpenoid from *Peonia albiflora* Potent Inhibitory Activity on 3 $\alpha$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase. *Chem. Pharm. Bull.*, **41**, 487 - 489 (1993).
- 37) Matsuda, H., Ohta, T., Kawaguchi, A., and Yoshikawa, M. Bioactive Constituents of Chinese Natural Medicines. VI. Moutan Cortex. (2): Structures and Radical Scavenging Effects of Suffruticosides A, B, C, D, and E and Galloyl-oxypaeoniflorin. *Chem. Pharm. Bull.*, **49**, 69 - 72 (2001).
- 38) Zhong, X.-N., Otsuka, H., Ide, T., Hirata, E., Takushi, A., and Takeda, Y., Hydroquinone glycosides from leaves of *Myrsine seguinii*. *Phytochemistry*, **49**, 2149 - 2153 (1998).
- 39) Kuwajima, H., Shibano, N., Baba, T., Takaishi, K., Inoue, K., and Shingu, T., An acetophenone glycoside from *Exacum affine*. *Phytochemistry*, **41**, 289 - 292 (1996).
- 40) Shimizu, M., hayashi, T., Morita, N., Kiuchi, F., Noguchi, H., Iltaka, Y., and Sankawa, U., The Structure of Paeoniflorigenone, A New Monoterpene isolated from *Paeoniae Radix*. *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 577 - 583 (1983).
- 41) Yoshikawa, M., Ohta, T., Kawaguchi, A., and Matsuda, H., Bioactive Constituents of Chinese Natural Medicines. V. Radical Scavenging Effect of Moutan Cortex. (1): Absolute Stereostructures of

- Two Monoterpenes, Paeonisuffrone and Paeonisuffral. *Chem. Pharm. Bull.*, **48**, 1327 - 1331 (2000).
- 42) Kaneda, M., Iitaka, Y., and Shibata, S., Chemical studies on the oriental plant drugs—XXXIII: The absolute structures of paeoniflorin, albiflorin, oxypaeoniflorin and benzoylpaeoniflorin isolated from chinese paeony root. *Tetrahedron*, **28**, 4309 - 4011 (1972).
- 43) Lemmich, J., Monoterpene and coumarin glucosides of *Cnidium silaifolium*. *Phytochemistry*, **41**, 1337 - 1340 (1996).
- 44) Ma, X., Wu, L., Ito, Y., and Tian, W., Application of preparative high-speed counter-current chromatography for separation of methyl gallate from *Acer truncatum* Bunge. *J. Chromatography A*, **1076**, 212 - 217 (2005).
- 45) Kane, C. J., Menna, J. H., and Yeh, Y.-C., Methyl gallate, methyl-3,4,5-trihydroxy-benzoate, is a potent and highly specific inhibitor of herpes simplex virus in vitro. I. Purification and characterization of methyl gallate from *Sapium sebiferum*. *Bioscience Reports*, **8**, 85 - 94 (1988).
- 46) Budzianowski, J., Six flavonol glucuronides from *Tulipa gesneriana*. *Phytochemistry*, **30**, 1679 - 1682 (1991).
- 47) Hayesa, P. Y., Lehmannb, R., Penmanb, K., Kitchinga, W., and De Vossa, J. J., Sodium paeoniflorin sulfonate, a process derived artefact from paeoniflorin. *Tet. Lett.*, **46**, 2615 - 2618 (2005).
- 48) Ryu, G., Park, E. K., Joo, J. H., Lee, B. H., Choi, B. W., Jung, D. S., Lee, N. H., A new antioxidant monoterpene glycoside, alpha-benzoyloxypaeoniflorin from *Paeonia suffruticosa*. *Arch. Pharm. Res.*, **24**, 105 - 108 (2001).
- 49) Ding, H. Y., Wu, Y. C., Lin, H. C., Chan, Y. Y., Wu, P. L., and Wu, T. S., Glycosides from *Paeonia suffruticosa*. *Chem. Pharm. Bull.*, **47**, 652 - 655 (1999).
- 50) Kang, S. S., Shin, K. H., and Chi, H. J., Galloylpaeoniflorin, a new acylated monoterpene glucoside from paeony root. *Arch. Pharm. Res.*, **14**, 52 - 4 (1991).
- 51) Schmeda-Hirschmann, G., Rodriguez, J. A., Theoduloz, C., Astudillo, S. L., Feresin, G. E., and Tapia A., Free-radical Scavengers and Antioxidants from *Peumus boldus* Mol. ("Boldo"). *Free Radic. Res.*, **37**, 447 - 452 (2003).
- 52) Lin, W. H., Deng, Z. W., Lei, H. M., Fu, H. Z., and Li, J., Polyphenolic compounds from the leaves of *Koelreuteria paniculata* Laxm. *J. Asian Nat. Prod. Res.*, **4**, 287 - 295 (2002).
- 53) Cha, B. C., Lee, H. W., and Cho, M. Y., Antioxidative and antimicrobial effects of nut species. *Kor. J. Pharmacogn.*, **29**, 3 - 5 (1998).
- 54) Ikuta, A. and Itokawa, H., Triterpenoids of *Paeonia japonica* callus tissue. *Phytochemistry*, **9**, 2813 - 2815 (1988).
- 55) Ikuta, A. and Itokawa, H., 30-Noroleanane saponins from callus tissues of *Akebia quinata*. *Phytochemistry*, **28**, 2663 - 2665 (1989).

- 56) Wu, S.-H., Chen, Y.-W., Yang, L.-Y., Li, S.-L., and Li, Z.-Y., Monoterpene glycosides from *Paeonia delavayi*. *Fitoterapia*, **78**, 76 - 78 (2007).
- 57) Shu, Y.-Z., Hattori, M., Akao, T., Kobashi, K., Kagei, K., Fukuyama, K., Tsukihara T., and Namba, T., *Chem. Pharm. Bull.*, **35**, 3726 - 3733 (1987).
- 58) Ishida, H., Takamatsu M., Tsuji K., Kosuge T., Studies on active substances in herb susedforoketsu("stagnant blood") in Chinese medicine; on the anticoagulative principle in *Paeoniae Radix*. *Chem. Pharm. Bull.*, **35**, 849-52 (1987).
- 59) Kim S. H., Kim S. A., Park M. K., Kim S. H., Park Y. D., Na H. J., Kim H. M., Shin M. K., Ahn K. S., *Int. J. Immunopharmacol.*, **4**, 279-287 (2004).
- 60) Kwon, O. G., Kim, S. H., Chun, B. Y., Park, C. K., and Son, K. H., Isolation of antimicrobial components from Moutan cortex. *Kor. J. Pharmacogn.*, **30**, 340-344 (1999).
- 61) Shinichi T., Tamaki M., Tetsuya A., Li X., Toshiaki M., Seiji I., *Neurosci.Lett.*, **370**, 130-134 (2004).
- 62) Yoshikawa M., Uchida E., Kawaguchi A., Kitagawa I., Yamahara J., Galloyl-oxypaeoniflorin, suffruticosides A, B, C, and D, five new antioxidative glycosides, and suffruticoside E, a paeonolglycoside, from Chinese Moutan cortex. *Chem. Pharm. Bull.*, **40**, 2248-250 (1992).
- 63) Chen, Q., Zhao, J., Vittayapadung, S., Identification of the green tea grade level using electronic tongue and pattern recognition. *Food Res. Int.*, **41**, 500 (2008).
- 64) Alcazar, A., Ballesteros, O., Jurado, J. M., Pablos, F., Martin, M. J., Vilches, J. L., Navalon, A., Differentiation of Green, White, Black, Oolong, and Pu-erh Teas According to Their Free Amino Acids Content. *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 5960 (2007).
- 65) Chen, Q., Zhao, J., Zhang, H., Liu, M., Fang, M., Qualitative identification of tea by near infrared spectroscopy based on soft independent modelling of class analogy pattern recognition. *J. Near Infrared Spectroscopy*, **13**, 327 (2005).
- 66) Yang, J., Chen, L., Zhang, Q., Lai, M., Wang, Q., Quality assessment of Cortex cinnamomi by HPLC chemical fingerprint, principle component analysis and cluster analysis. *J. Sep. Sci.*, **30**(9), 1276-1283 (2007).
- 67) He, Z. Qiao, C. Han, Q. Cheng, C. Xu, H. Jiang, R. But, P. P. Shaw, P., Authentication and quantitative analysis on the chemical profile of cassia bark (cortex cinnamomi) by high-pressure liquid chromatography. *J. Agricult. Food Chem.*, **53**(7), 2424-2428 (2005).
- 68) Gong, F. Liang, Y. Fung, Y. Chau, F., Correction of retention time shifts for chromatographic fingerprints of herbal medicines. *J. Chromatogr. A.*, **1029**(1-2), 173-183(2004).
- 69) Xie, Y. Jiang, Z. Zhou, H. Cai, X. Wong, Y. Liu, Z. Bian, Z. Xu, H. Liu, L., Combinative method using HPLC quantitative and qualitative analyses for quality consistency assessment of a herbal



medicinal preparation. J. Pharm. Biomed. Anal., **43**(1), 204-212 (2007).

70) He, Q. Ge, Z. Song, Y. Cheng, Y., Quality evaluation of cortex moutan by high performance liquid chromatography coupled with diode array detector and electrospray ionization tandem mass spectrometry. Chem. Pharm. Bull., **54**(9), 1271-1275 (2006).

71) Xie, P. Chen, S. Liang, Y. Wang, X. Tian, R. Upton, R., Chromatographic fingerprint analysis—a rational approach for quality assessment of traditional Chinese herbal medicine. J. Chromatogr. A., **1112**(1-2), 171-180(2006).

## 제8장 첨부서류

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

편집순서 7 : 세부연구과제의 연구결과

## 제 1 세부연구개발과제 연구결과

**세부과제명** : 계지 및 목단피의 생리활성 성분 분리

**세부과제책임자** : 배기환/충남대학교

## 제1장 세부연구개발과제의 최종 연구개발 목표

### 1.1 세부연구개발과제의 목표

목단피는 모란 *Paeonia suffruticosa*의 뿌리껍질이다. 우리나라를 비롯하여 중국과 일본 모두 기원이 동일하나 후박의 경우는 다양하다. 우리나라를 비롯하여 중국과 일본에서 유통되는 목단피는 그 기원식물이 동일하고 실제로 시장에 유통되는 한약재의 형태와 품질이 거의 일정하다. 하지만 재배환경 및 채취시기에 따라 유효성분의 함량이 다를 수 있으므로 이화학적으로 검토가 필요하다. 계지는 *Cinnamomum cassia*의 작은가지가 대부분이거나 변종인 var. *macrophyll*의 작은가지도 유통되고 있다고 한다 (초배근, 중약지, 2002년, 북경). 이화학적 방법으로 품질이 안정하게 공급되고 있는지 검토한 뒤 표준 재료로 이용하고자 한다.

따라서, 본 연구에서는 한약재의 유효성분 중심의 관리를 위하여 한약재(목단피, 계지)의 생리활성성분 분리(각 10종 이상) 및 연구용 시료를 제공, 유효성분 정량용 표준품을 제조, 분리된 성분들의 패턴인식법에 의한 기원별, 산지별 한약재 정부를 구축하고자 한다.

### 1.2 세부연구개발과제의 목표달성도

가. 계지 및 목단피에 함유되어 있는 유효성분들을 중심으로 한약재규격관리에 요구되는 10종 이상의 생리활성성분 분리에 성공하였다. 즉, 계지로부터는 5종의 신물질인 cassiferaldehyde, cinnacassine, icariside DC, dihydrocinnacasside, cinnacasside와 22종의 알려진 화합물 cinnamaldehyde, eugenol, 2-methoxycinnamaldehyde, coumarin,  $\beta$ -sitosterol, 2-hydroxy cinnamaldehyde, cinnamic acid, coniferaldehyde, cinnamic alcohol, 4-hydroxy benzoic acid, syringaldehyde, daucosterol, amygdalactone, eugenol glucopyranoside, *o*-coumaric acid, rosavin, (+)-lyoniresinol-3 $\alpha$ -O- $\beta$ -D-glucopyranoside, (-)-lyoniresinol-3 $\alpha$ -O- $\beta$ -D-glucopyranoside, dihydromelilotoside, (+)-lyoniresinol, (-)-lyoniresinol, methyl dihydromelilotoside 등 총 27종의 생리활성성분을 분리하였고, 목단피로부터는 2종의 신물질인 4-O-*n*-butylpaeniflorin, 5-hydroxy-3-hydroxymethylene-6-methyl-2,3-dihydrobenzofuran와 25종의 알려진 화합물인 paeonol,  $\beta$ -sitosterol, ursolic acid, betulinic acid, daucosterol, benzoic acid, oleanolic acid, Palbinone, apiopaenoside, paeonoside, 6-methoxypaeoniflotrigenone, benzoylpaeniflorin, methylgallate, kaempferol, paeoniflorin,  $\alpha$ -benzoyloxypaeoniflorin,  $\beta$ -benzoyloxypaeoniflorin, galloylpaeniflorin, (+)-catechin, gallic acid, paeonolide, paeoniflorigenone, 30-norhederagenin, oxypaeniflorin, mudanpinoside H 등 총 27종의 생리활성성분을 분리하였다. 대량분리를 통해 계지로부터 coumarin, 2-hydroxycinnamaldehyde, cinnamyl alcohol, cinnamic acid, cinnamaldehyde, 2-methoxy cinnamaldehyde, eugenol 등의 7종, 목단피로부터 paeoniflorin, paeonol, benzoyl paeoniflorin 등의 3종의 유효성분을 확보하였으며, 확보된 유효성분들을 식약청에 제출하였다.

나. 분리 정제된 10종 이상의 생리활성성분을 생리활성성분 분석팀 및 효능확인연구팀에 연구용으로 제공하였다.

다. 목단피와 계지의 중국산은 서울 경동시장, 대구약령시장 및 금산생약시장에서 구입하였고, 국내산은 생산지를 방문하여 구입하였다. 이들 자료들을 약전(8개정)규정대로 각각 5종 이상의 시료에 대해 70% 에탄올로 추출하여 용매를 유거하고 표준엑스를 제조하여 효능연구진에게 제공하였다.

### 1.3 국내·외 기술개발 현황

#### 가. 계지

##### 특허

- (1). 식물성 정유 및 정유 성분을 유효성분으로 포함하는 살선충성 조성물. 국내특허 번호 10-0750750-0000 (2007.08.13).
- (2). 계지 추출물을 포함하는 골절의 예방 및 치료용 조성물. 국내특허 번호 10-0700481-0000 (2007.03.21).
- (3). 천연 모기 기피제 조성물. 국내특허 번호 10-0484887-0000 (2005.04.13).
- (4). BHH 17 복합생약추출물을 유효성분으로 함유하는 골절 질환의 예방 및 치료용 조성물. 국내특허 번호 10-0851783-0000 (2008.08.06).
- (5). 신부전 예방 및 치료용 약제학적 조성물. 국내특허 번호 10-0770634-0000 (2007.10.22).
- (6). 나노입자화된 계피 추출물을 함유하는 구강위생 증진용 조성물. 국내특허 번호 10-0489267-0000 (2005.05.03).
- (7). 학습능력을 향상시키는 약제 조성물 및 그 제조방법. 국내특허 번호 10-0530213-0000 (2005.11.15).
- (8). 계피 추출물을 유효성분으로 함유하는 장내 균총 개선 및면역기능 증진용 조성물. 국내특허 번호 10-0842053-0000 (2008.06.23).
- (9). 해충억제효과가 있는 베개의 제조방법. 국내특허 번호 10-0851883-0000 (2008.08.06).
- (10). 신나밀알콜을 포함하는 항진균제 조성물. 국내특허 번호 10-0437576-0000 (2004.06.16).

#### 나. 목단피

##### 특허

- (1). 목단피 추출물을 유효성분으로 함유하는 당뇨병 치료용 조성물. 국내특허 번호 10-0626357-0000 (2006.09.13).
- (2). 목단피 추출물을 유효성분으로 포함하는 조성물. 국내특허 번호 10-0536550-0000 (2005.12.07).
- (3). 목단피 추출물 또는 이로부터 분리된 활성성분을 포함하는 혈압강하용 조성물. 국내특허 번호 10-0732886-0000 (2007.06.21).

- (4). 목단피 추출물을 유효성분으로 함유하는 구취 억제용 구강 조성물. 국내특허 번호 10-0537834-0000 (2005.12.13).
- (5). 오배자 및 목단피 추출물을 함유하는 돼지 유행성 설사바이러스의 치료 및 예방용 조성물. 국내특허 번호 10-0839099-0000 (2008.06.11).
- (6). 목단피추출물과 자귀나무추출물을 함유하는 노화방지화장료 조성물. 국내특허 번호 10-0443588-0000 (2004.07.28).
- (7). 목단피 추출물 또는 이로부터 분리된 화합물들을 포함하는향균조성물. 국내특허 번호 10-0757219-0000 (2007.09.04).
- (8). 목단피 추출물을 함유하는 치주염 치료용 조성물. 국내특허 번호 10-0829519-0000 (2008.05.07).
- (9). 향균 효과를 갖는 목단피의 추출물로부터 분리된 신규구조의 6'-오-바닐릴옥시파에오니플로린 화합물을유효성분으로 함유하는 조성물. 국내특허 번호 10-0822781-0000 (2008.04.10).
- (10). 멜라닌 생성을 억제하는 등대풀, 목단피, 알로에혼합추출물을 함유하는 미백 화장료 조성물. 국내특허 번호 10-0614467-0000 (2006.08.14).

## 제2장 세부연구개발과제의 최종 연구개발 내용 및 방법

### 1. 계지로부터 생리활성물질 분리

#### 가. 추출 및 분리

계지 30 kg에 메탄올을 가하여 80℃에서 3회 환류 추출한 후 여과하였다. 여과액을 40~45℃에서 감압 농축하여 메탄올 엑스 3.5 kg을 얻었다. 메탄올 엑스를 증류수 2 리터에 현탁시킨 후 hexane, EtOAc 및 BuOH로 순차적으로 분획하였다. 각 분획물들을 농축하여 hexane 분획물 (620 g), EtOAc 분획물 (530 g), BuOH 분획물 (420 g) 및 H<sub>2</sub>O 분획물을 얻었다.

Hexane 분획물(620 g)을 silica gel column에 걸어 hexane-EtOAc을 전개용매로 하여 극성을 높이면서 chromatography를 실시하여 7개의 소분획 (H.1~7)으로 나누었다. H2 분획물을 silica gel column에 걸어 hexane-EtOAc(25:1)을 전개용매로 chromatography하여 5개의 분획으로 나누고, H2.3를 다시 YMC column에 걸어 MeOH-H<sub>2</sub>O (60:40)을 전개용매로 하여 compound 1 (6 g), 2 (300 mg) 과 3 (1 g)을 분리하였다. H4를 silica gel column에 걸어 hexane-EtOAc(20:1)을 전개용매로 chromatography하여 3개의 분획으로 나누고, H4.2를 다시 silica gel column에 걸어 hexane-EtOAc (15:1~12:1)을 전개용매로 하여 compound 4 (1.2 g)과 5 (300 mg)를 분리하였다. H6 분획물을 다시 silica gel column에 걸어 hexane-EtOAc(25:1)을 전개용매로 chromatography하여 4개의 분획으로 나누고, H6.3를 다시 YMC column에 걸어 MeOH-H<sub>2</sub>O (60:40)을 전개용매로 하여 compound 6 (5 g)을 분리하였다. H7를 다시 MPLC ODS column에 걸어 MeOH-H<sub>2</sub>O (60:40)을 전개용매로 하여 compound 7 (1.2 g)을 분리하였다.

EtOAc 분획물(530 g)을 silica gel column에 걸어 hexane-EtOAc을 전개용매로 하여 극성을 높이면서 chromatography를 실시하여 8개의 소분획 (H.1~8)으로 나누고, E2을 다시 silica gel column에 걸어 hexane: ethyl acetate (10:1~2:1)을 전개용매로 하여 chromatography하여 3개의 분획으로 나누고, E2.3를 다시 HPLC ODS column에 걸어 MeOH-H<sub>2</sub>O (40:60)을 전개용매로 하여 compound 8 (2 mg) 과 9 (2 mg)을 분리하였다. E4을 silica gel column에 걸어 hexane:ethyl acetate (4:1~2:3)을 전개용매로 하여 chromatography하여 4개의 분획으로 나누고, E4.4 를 다시 HPLC ODS column에 걸어 MeOH-H<sub>2</sub>O (60:40)을 전개용매로 하여 compounds 10 (2 mg), 11 (70 mg)과 12 (15 mg)를 분리하였다. E5을 silica gel column에 걸어 hexane:ethyl acetate (4:1~2:3)을 전개용매로 하여 compounds 13 (30 mg), 17 (25 mg) 과 18 (36 mg). E7을 silica gel column에 걸어 hexane:ethyl acetate (2:1~1:2)을 전개용매로 chromatography하여 4개의 분획으로 나누고, E7.3 를 다시 MPLC ODS column에 걸어 MeOH-H<sub>2</sub>O (30:70)을 전개용매로 하여 compound 14 (2 mg) 과 15 (2 mg)를 분리하였다. E8를 다시 MPLC ODS column에 걸어 MeOH-H<sub>2</sub>O (50:50)를 전개용매로 compound 16 (5mg)을 분리하였다.

BuOH 분획물(135 g)을 Dianion LH-20 column에 걸어 H<sub>2</sub>O-MeOH을 전개용매로 하여 극성을 높이면서 chromatography를 실시하여 9개의 소분획 (Bu.1~9)으로 나누었다. Bu5을 다시 silica gel column에

걸어 MeOH-CH<sub>3</sub>Cl (10:1~1:10)을 전개용매로 하여 chromatography하여 9개의 분획으로 나누고, B5.5를 다시 Sephadex LH-20 column에 걸어 MeOH-H<sub>2</sub>O (1:5)을 전개용매로 하여 compounds 19 (200 mg), 20 (25mg), 21 (137 mg), 과 22 (22.5 mg)을 분리하였다. B5.6을 YMC ODS column에 걸어 MeOH-H<sub>2</sub>O (1:5)을 전개용매로 chromatography하여 전개용매로 하여 compound 23 (15.3 mg), 24 (10.2 mg), 25 (40.3 mg), 26 (2.5 mg) 과 27 (100 mg)를 얻었다 (그림 1). 분리한 화합물들의 구조는 그림 2와 같다.

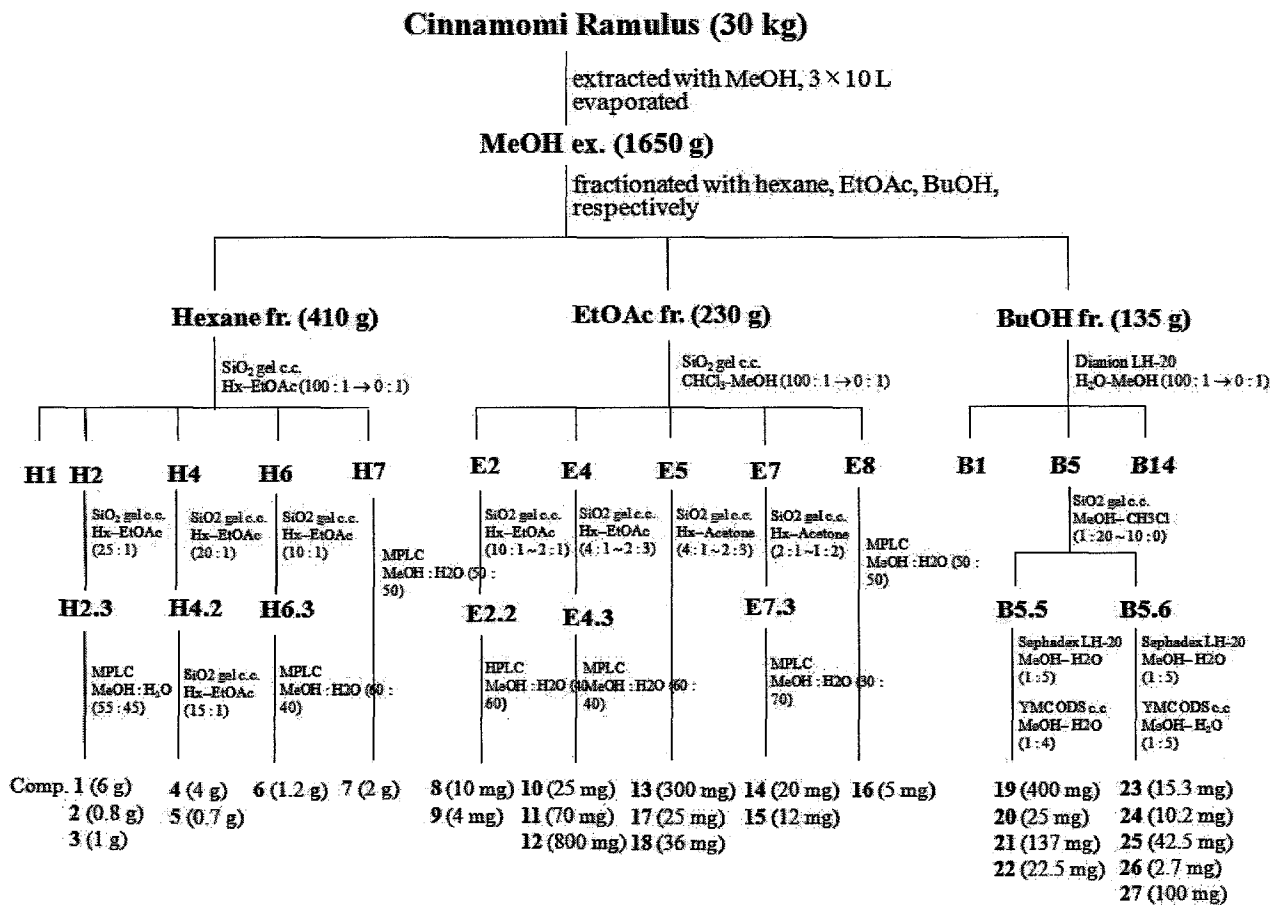
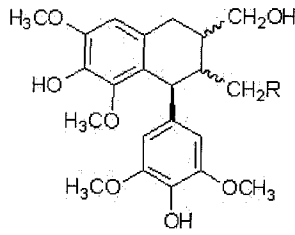
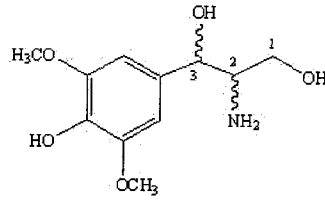


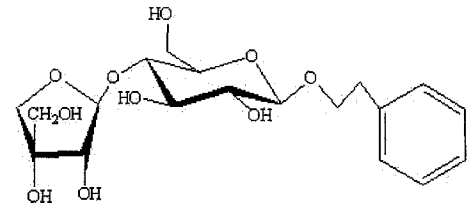
그림 1. 계지로부터 추출, 성분 분리 도표



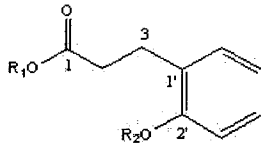
(+)-Lyoniresinol (16) R  
 (-)-Lyoniresinol (24) H  
 (+)-Lyoniresinol-3a-O-β-D-glucopyranoside (19) Glc  
 (+)-Lyoniresinol-3a-O-β-D-glucopyranoside (22) Glc



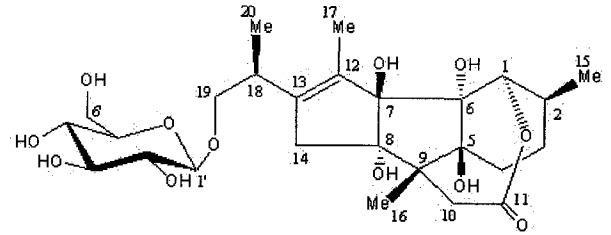
Cinnacassine (17)



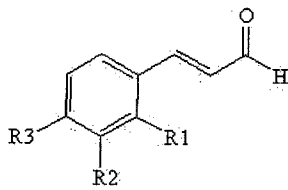
Icariside DC (21)



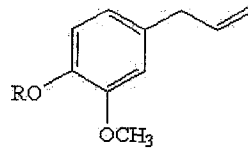
Dihydromethylotoside (23) R<sub>1</sub> R<sub>2</sub>  
 Methyl dihydromethylotoside (25) H Glc  
 Dihydrocinnacasside (26) CH<sub>3</sub> Glc  
 Dihydrocinnacasside (26) Glc H



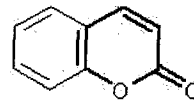
Cinnacasside A (27)



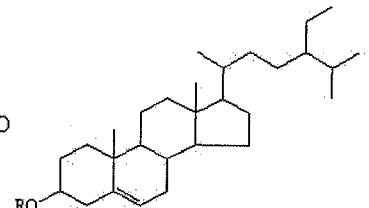
Cinnamaldehyde (1) R<sub>1</sub> R<sub>2</sub> R<sub>3</sub>  
 2-methoxy cinnamaldehyde (3) H H H  
 2-hydroxy cinnamaldehyde (6) OCH<sub>3</sub> H H  
 Coniferaldehyde (8) OH H H  
 Cassiferaldehyde (9) H OCH<sub>3</sub> OH  
 Cassiferaldehyde (9) OCH<sub>3</sub> OH H



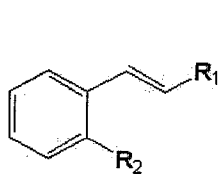
Eugenol (2) R  
 Eugenyl glucoside (15) H  
 Eugenyl glucoside (15) Glc



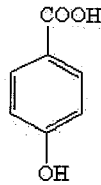
Coumarin (4)



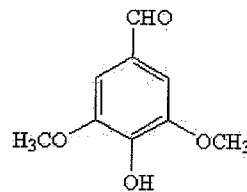
β-sitosterol (5) R  
 Daucosterol (13) H  
 Daucosterol (13) Glc



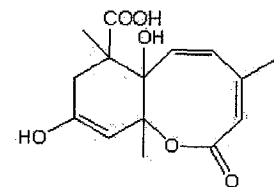
cinnamic acid (7) R<sub>1</sub> R<sub>2</sub>  
 Cinnamic alcohol (10) COOH H  
 o-Coumaric acid (18) OH H  
 Rosavin (25) COOH OH  
 Rosavin (25) Glc<sup>4</sup>-Rham H



4-hydroxybenzoic acid (11)



Syringaldehyde (12)



Amygdalactone (14)

그림 2. 계지에서 분리한 성분들의 화학구조

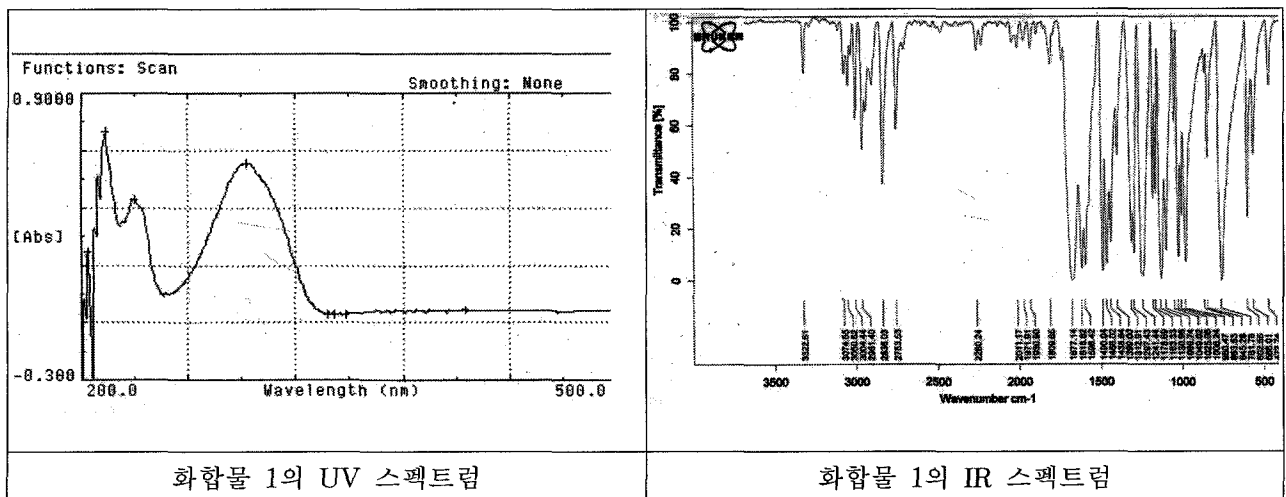


## 나. 계지로부터 분리된 물질 분석

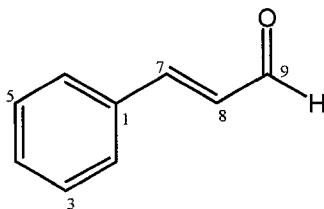
분리한 화합물의 용점은 Electrothermal apparatus를 사용하여 측정하였고, 선광도는 JASCO DIP-370 digital polarimeter를 이용하여 측정하였다. UV 스펙트럼은 JASCO V-550 UV/VISspectrometer를 이용하여 측정하였으며, IR 스펙트럼은 JASCO 100 IR spectrometer를 이용하여 측정하였다. Mass 스펙트럼은 JEOL JMS-DX 300를 이용하여 측정하였으며,  $^1\text{H}$  NMR과  $^{13}\text{C}$  NMR 스펙트럼은 Bruker DRX-300 spectrometer를 이용하여 측정하였다.

### 화합물 1

무색의 액체로, EIMS 스펙트럼에서  $m/z$  132  $[\text{M}]^+$ 에서 이온 피크가 관찰되었다. IR 스펙트럼에서는  $2920\text{ cm}^{-1}$ 에서 olefinic group의 존재를,  $1680\text{ cm}^{-1}$ 에서는 C=O group의 존재를 확인하였으며, 1630, 1130,  $980\text{ cm}^{-1}$ 에서 aromatic ring의 존재를 확인하였다.  $^1\text{H}$ -NMR에서 9.70 ppm에서 알데하이드 기, 7.36, 6.72 ppm에서 olefinic proton을 확인하였으며, 7.24 - 7.36 ppm에서 5개의 aromatic proton을 확인하였다. 이상의 data는 기존문헌<sup>1,2)</sup>에서 보고한 것과 동일하였으므로, cinnamaldehyde로 동정하였다.

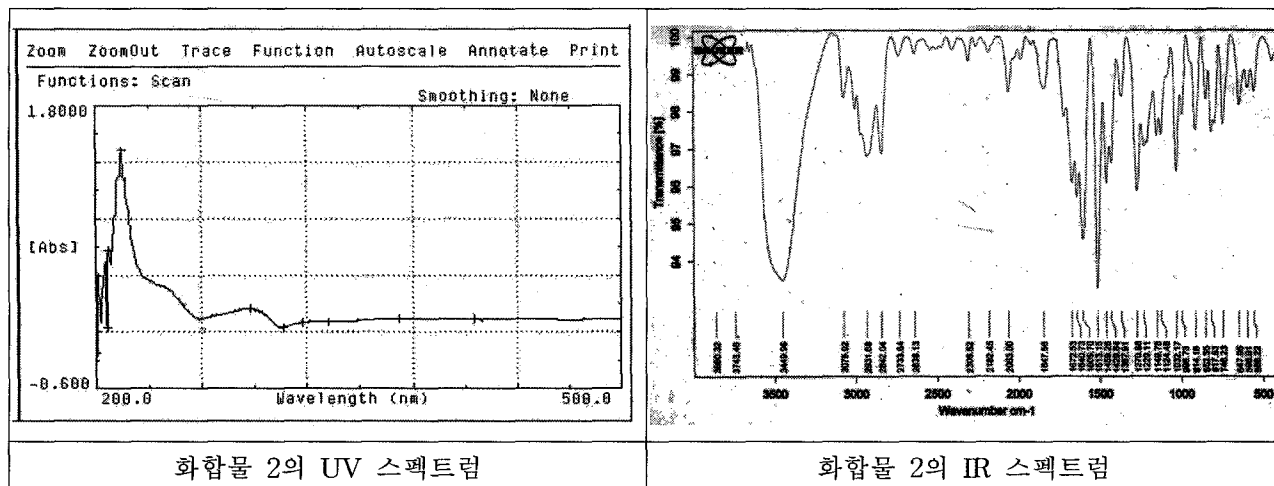


Colorless oil. UV  $\lambda_{\text{max}}$  (MeOH) 214 (2.23), 230 (1.38), 293 (1.84) nm; IR (KBr)  $\text{max}$ : 2920 (olefinic,  $-\text{CH}=\text{CH}-$ ), 1680 (C=O), 1630, 1130, 980 (aromatic  $-\text{CH}=\text{CH}-$ )  $\text{cm}^{-1}$   $^1\text{H}$ -NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 9.70 (1H, d,  $J = 7.7$  Hz, H-9), 7.24 (3H, m, H-3, 4, 5), 7.36 (2H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-2, 6), 6.72 (1H, dd,  $J = 7.7, 15.9$  Hz, H-8), 7.23 (1H, overlap, H-7);  $^{13}\text{C}$ -NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 133.4 (C-1), 127.9 (C-2, 6), 128.4 (C-3, 5), 127.7 (C-4), 151.9 (C-7), 130.5 (C-8), 192.8 (C-9); EIMS  $m/z$  132  $[\text{M}]^+$ , 131  $[\text{M} - \text{H}]^+$ .

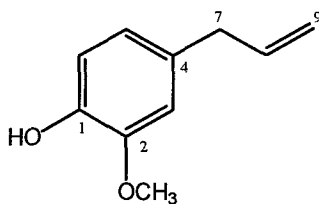


## 화합물 2

황색의 액체로서, EIMS 스펙트럼에서  $m/z$  164  $[M]^+$ 에서 이온 피크가 관찰되었다. IR 스펙트럼에서  $3450\text{ cm}^{-1}$ 에서 -OH의 존재를,  $2930\text{ cm}^{-1}$ 에서 olefinic group의 존재를 확인하였으며, 1640, 1510, 1270, 1030,  $980\text{ cm}^{-1}$ 에서 aromatic ring의 존재를 확인하였다.  $^1\text{H-NMR}$ 에서 5.97 5.08 ppm에서 olefinic proton을, 6.85 - 6.70 ppm에서 3개의 aromatic proton을 확인하였으며, 3.57 ppm에서는 methoxy 기의 존재를 확인하였다. 이상의 data는 기존문헌<sup>3)</sup>에서 보고한 것과 동일하였으므로, eugenol로 동정하였다.



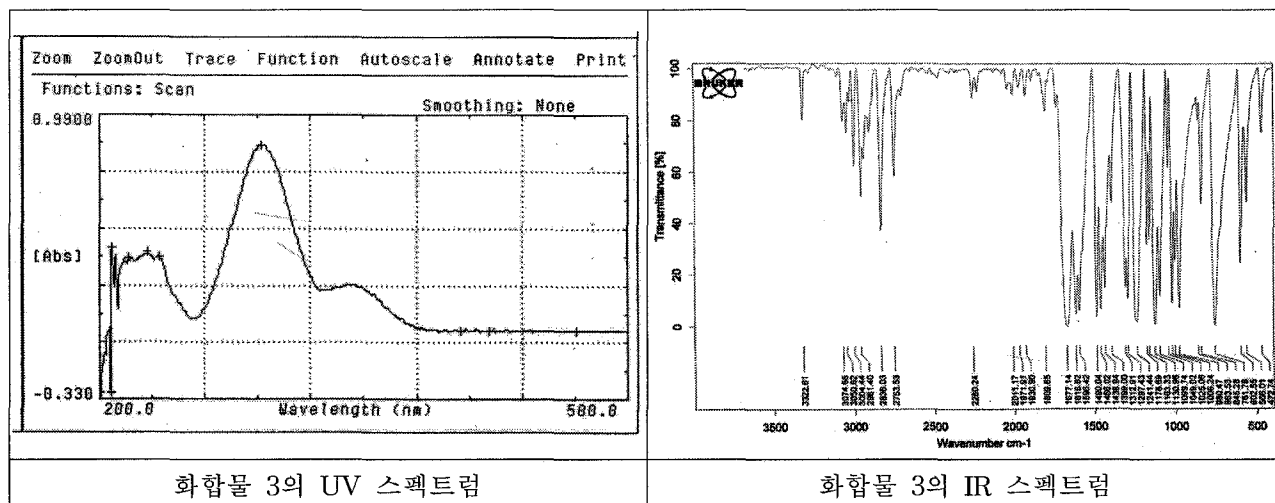
Yellow oil. UV  $\lambda_{\text{max}}$  (MeOH) 215 (7.09), 250 (0.50) nm; IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$ : 3450 (-OH), 2930 (olefinic -CH=CH-), 1640, 1510, 1270, 1030, 980 (aromatic -CH=CH-)  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 6.85 (1H, d,  $J = 7.2$  Hz, H-6), 6.70 (2H, dd,  $J = 2.7, 7.2$  Hz, H-3, 5), 5.97 (1H, m, H-8), 5.08 (2H, m, H-9), 3.33 (2H, d,  $J = 6.6$  Hz, H-7), 3.57 (3H, s, H-10);  $^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 144.1 (C-1), 146.6 (C-2), 111.3 (C-3), 132.1 (C-4), 121.4 (C-5), 114.4 (C-6), 40.1 (C-7), 138.0 (C-8), 115.7 (C-9), 56.1 (C-10) EIMS  $m/z$  164  $[M]^+$ , 131, 103.



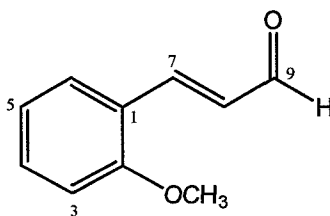
## 화합물 3

황색의 분말로서, EIMS 스펙트럼에서  $m/z$  162  $[M]^+$ 에서 이온 피크가 관찰되었고, IR 스펙트럼에서  $2836\text{ cm}^{-1}$ 에서 olefinic group의 존재를,  $1677\text{ cm}^{-1}$ 에서는 C=O group의 존재를 확인하였으며, 1620, 1490,

1279 - 750  $\text{cm}^{-1}$ 에서 aromatic ring의 존재를 확인하였다.  $^1\text{H-NMR}$ 에서 9.70 ppm에서 알데하이드 기를, 7.89, 7.70 ppm에서 olefinic proton을, 7.47 - 6.81 ppm에서 4개의 aromatic proton을 확인하였으며, 3.95 ppm에서는 methoxy 기의 존재를 확인하였다. 이상의 data는 기존문헌<sup>4)</sup>에서 보고한 것과 동일하였으므로, 2-methoxycinnamaldehyde로 동정하였다.



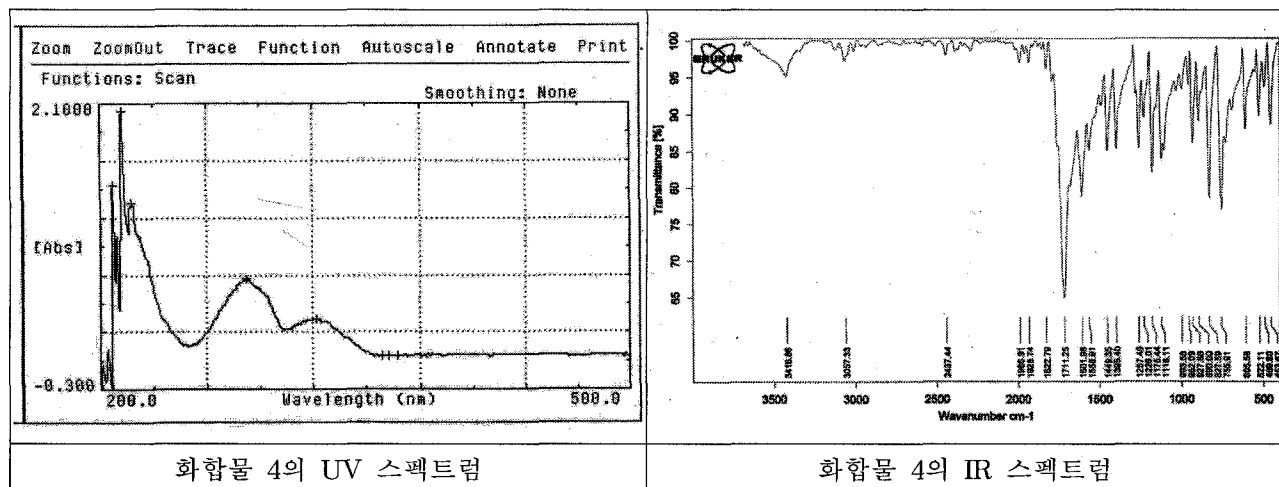
Yellowish powder. mp 146 - 147  $^{\circ}\text{C}$ ; UV  $\lambda_{\text{max}}$  (MeOH) 208 (1.24), 292 (2.82) nm; IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$ : 2836 (olefinic  $-\text{CH}=\text{CH}-$ ), 1677 (C=O), 1620, 1490, 1279 - 750 (aromatic,  $-\text{CH}=\text{CH}-$ )  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz, acetone- $d_6$ )  $\delta$ : 9.70 (1H, d,  $J = 7.8$  Hz, H-9), 7.89 (1H, d,  $J = 16.2$  Hz, H-7), 7.70 (1H, dd,  $J = 1.8, 7.8$  Hz, H-6), 7.47 (1H, dt,  $J = 1.8, 7.8$  Hz, H-4), 7.12 (1H, d,  $J = 7.8$  Hz, H-3), 7.03 (1H, t,  $J = 7.8$  Hz, H-5), 6.81 (1H, dd,  $J = 16.2, 7.8$  Hz, H-8), 3.95 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ );  $^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz, acetone- $d_6$ )  $\delta$ : 123.9 (C-1), 159.4 (C-2), 112.6 (C-3), 133.6 (C-4), 121.8 (C-5), 130.0 (C-6), 148.5 (C-7), 130.2 (C-8), 194.6 (C-9), 56.2 ( $\text{OCH}_3$ ); EIMS  $m/z$  162 [ $\text{M}$ ] $^+$ , 131, 119, 91.



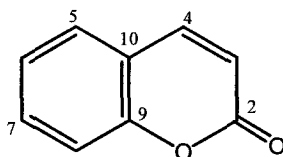
#### 화합물 4

무색의 결정으로서, EIMS 스펙트럼에서  $m/z$  146 [ $\text{M}$ ] $^+$ 에서 이온 피크가 관찰되었다. IR 스펙트럼에서는 1711  $\text{cm}^{-1}$ 에서 C=O group의 존재를 확인하였고, 1257 - 750  $\text{cm}^{-1}$ 에서 aromatic ring의 존재를 확인하였다.  $^1\text{H-NMR}$ 에서 7.97 (1H, d,  $J = 9.6$  Hz), 6.41 (1H, d,  $J = 9.6$  Hz) ppm에서의 2개의 특징적인 olefinic proton들로부터 coumarin 구조를 예상할 수 있었고, 7.68 - 6.41 ppm에서 4개의 aromatic proton을 확인 할 수 있었다. 이상의 data는 기존문헌<sup>5,6)</sup>에서 보고한 것과 동일하였으므로, coumarin으로 동정

하였다.



Colorless crystal. mp 70 - 72 °C; UV  $\lambda_{\max}$  (MeOH) 283 (3.14), 322 (1.46) nm; IR (KBr)  $\nu_{\max}$ : 1711 (C=O), 1257 - 750 (aromatic -CH=CH-)  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7.97 (1H, d,  $J = 9.6$  Hz, H-4), 7.68 (1H, dd,  $J = 1.5, 8.1$  Hz, H-5), 7.61 (1H, dt,  $J = 1.5, 7.8, 8.1$  Hz, H-6), 6.35 (1H, dd,  $J = 0.9, 7.8$  Hz, H-8), 7.33 (1H, br d,  $J = 7.8$  Hz, H-7), 6.41 (1H, d,  $J = 9.6$  Hz, H-3);  $^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 160.6 (C-2), 155.2 (C-9), 144.6 (C-4), 132.8 (C-5), 129.3 (C-7), 125.3 (C-6), 120.1 (C-10), 117.4 (C-3), 117.3 (C-8); EIMS  $m/z$  146  $[\text{M}]^+$ , 118, 90, 63.

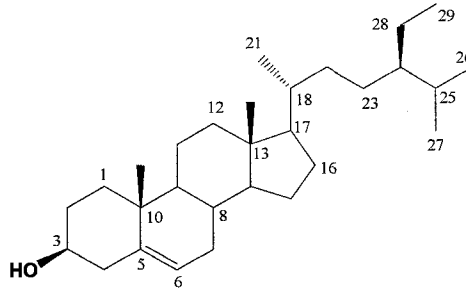


## 화합물 5

흰색의 침상으로서, ESIMS 스펙트럼에서  $m/z$  437  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 에서 이온 피크가 관찰되었다. IR 스펙트럼에서는  $3410 \text{ cm}^{-1}$ 에서 -OH기의 존재를,  $2938 \text{ cm}^{-1}$ 에서 olefinic group의 존재를 확인하였다.  $^1\text{H-NMR}$ 에서 1.10 - 0.85 ppm에서의 특징적인 6개의 methyl기로부터 sterol 구조를 예상할 수 있었으며, 5.35 ppm에서 olefinic proton, 3.53 ppm에서 oxygenated methine proton의 존재를 확인하였다.  $^{13}\text{C-NMR}$ 에서는 총 29개의 피크를 확인할 수 있었다. 이상의 data는 기존문헌<sup>7)</sup>에서 보고한 것과 동일하였으므로,  $\beta$ -sitosterol로 동정하였다.

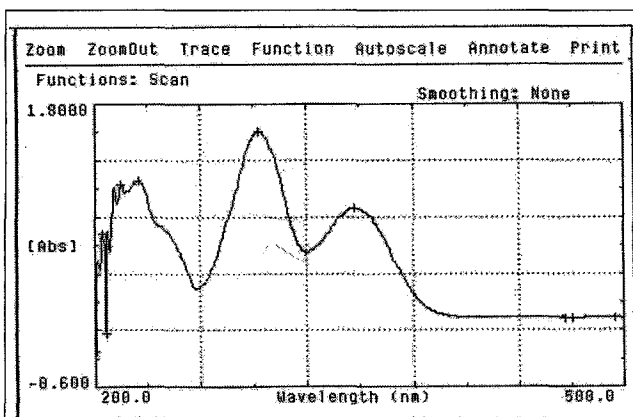
White needless. mp 137 - 139 °C; UV  $\lambda_{\max}$  ( $\text{CHCl}_3$ ) 216 nm; IR (KBr)  $\nu_{\max}$ : 3400 (OH), 2938 (olefinic -CH=CH-), 1460, 1380, 1060  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 5.35 (1H, brd, H-6), 3.53 (1H, m, H-3), 1.01 (3H, s, H-19), 0.69 (3H, s, H-20), 0.92 (3H, d,  $J = 6.8$  Hz, H-21), 0.83 (3H, d,  $J = 1.6$  Hz, H-26), 0.81 (3H, br s, H-27), 0.85 (3H, br s, H-29);  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 37.2 (C-1), 31.6 (C-2), 71.7 (C-3), 42.2 (C-4), 140.7 (C-5), 121.7 (C-6), 31.8 (C-7), 31.9 (C-8), 50.0 (C-9), 36.4

(C-10), 21.0 (C-11), 39.7 (C-12), 42.2 (C-13), 56.7 (C-14), 24.3 (C-15), 28.2 (C-16), 55.9 (C-17), 11.8 (C-18), 19.4 (C-19), 36.1 (C-20), 18.7 (C-21), 33.9 (C-22), 25.9 (C-23), 45.8 (C-24), 29.1 (C-25), 19.8 (C-26), 18.9 (C-27), 23.0 (C-28), 11.0 (C-29); ESIMS  $m/z$  437  $[M + Na]^+$ , 381, 353, 319.

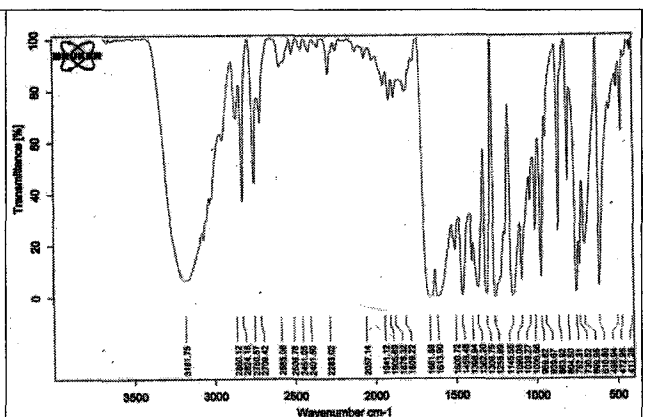


## 화합물 6

빛나는 결정으로서, EIMS 스펙트럼에서  $m/z$  148  $[M]^+$ 에서 이온 피크가 관찰되었고, IR 스펙트럼에서는  $3181\text{ cm}^{-1}$ 에서 -OH기의 존재를,  $1662\text{ cm}^{-1}$ 에서는 C=O group의 존재를 확인하였으며,  $1459$ ,  $1360\text{--}610\text{ cm}^{-1}$ 에서 aromatic ring의 존재를 확인하였다.  $^1\text{H-NMR}$ 에서 9.69 ppm에서 알데하이드 기, 7.90, 7.64 ppm에서 olefinic proton을, 7.31 - 6.85 ppm에서 4개의 aromatic proton을 확인하였다. 이상의 data는 기존문헌<sup>8)</sup>에서 보고한 것과 동일하였으므로, 2-hydroxycinnamaldehyde로 동정하였다.

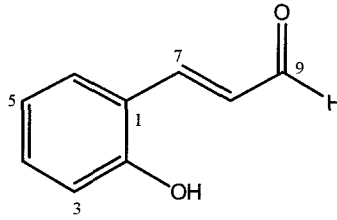


화합물 6의 UV 스펙트럼



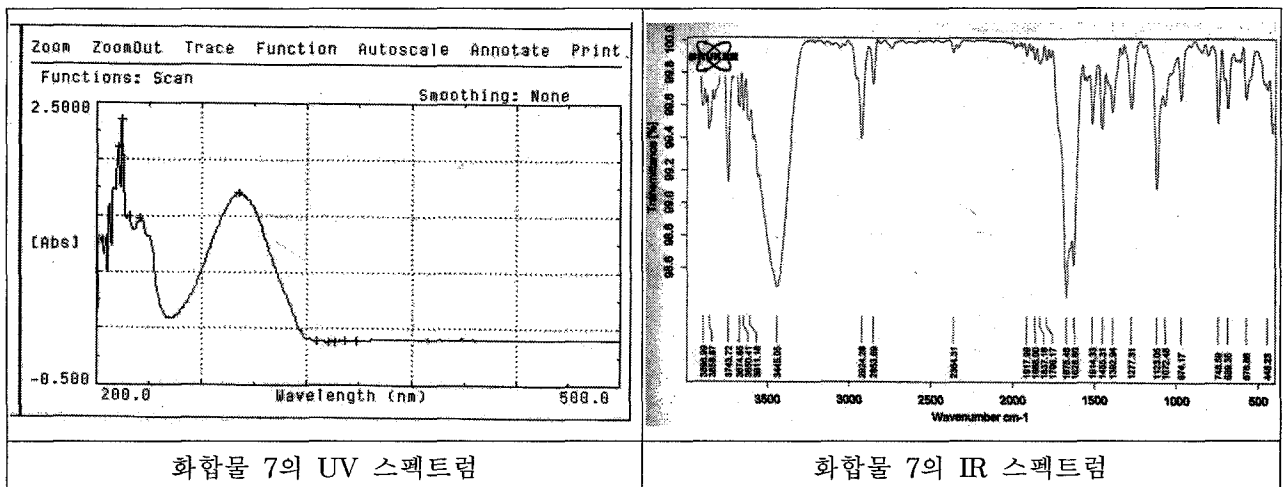
화합물 6의 IR 스펙트럼

Shiny crystal. mp  $131\text{--}132\text{ }^\circ\text{C}$ ; UV  $\lambda_{\text{max}}$  (MeOH) 215 (5.59), 225 (5.74), 285, 293 (7.80), 347 (4.57) nm; IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$ : 3181 (-OH), 2824 (olefinic -CH=CH-), 1662 (C=O), 1459, 1360-610 (aromatic -CH=CH-)  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz, acetone- $d_6$ )  $\delta$ : 9.69 (1H, d,  $J = 7.8\text{ Hz}$ , H-9), 7.90 (1H, d,  $J = 16.2\text{ Hz}$ , H-7), 7.64 (1H, dd,  $J = 7.8, 1.8\text{ Hz}$ , H-6), 7.31 (1H, dt,  $J = 1.8, 7.5\text{ Hz}$ , H-4), 7.00 (1H, dd,  $J = 1.8, 7.5\text{ Hz}$ , H-3), 6.93 (1H, t,  $J = 7.8\text{ Hz}$ , H-5), 6.85 (1H, dd,  $J = 16.2, 7.8\text{ Hz}$ , H-8);  $^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz, acetone- $d_6$ )  $\delta$ : 122.4 (C-1), 157.6 (C-2), 117.2 (C-3), 130.2 (C-4), 121.1 (C-5), 129.7 (C-6), 149.0 (C-7), 133.4 (C-8), 194.7 (C-9); EIMS  $m/z$  148  $[M]^+$ , 147, 131, 103, 91.

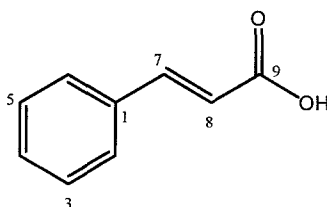


### 화합물 7

백색 분말로서, ESIMS 스펙트럼에서  $m/z$  119  $[M - H]^-$ 에서 이온 피크가 관찰되었다. IR 스펙트럼에서는  $3445\text{ cm}^{-1}$ 에서 -OH기의 존재를,  $1675\text{ cm}^{-1}$ 에서는 C=O group의 존재를 확인하였고,  $1625, 1545\text{ cm}^{-1}$ 에서 aromatic ring의 존재를 확인하였다.  $^1\text{H-NMR}$ 에서 7.83, 6.48 ppm에서 olefinic proton을, 7.55 - 7.39 ppm에서 5개의 aromatic proton을 확인하였다. 이상의 data는 기존문헌<sup>9)</sup>에서 보고한 것과 동일하였으므로, cinnamic acid로 동정하였다

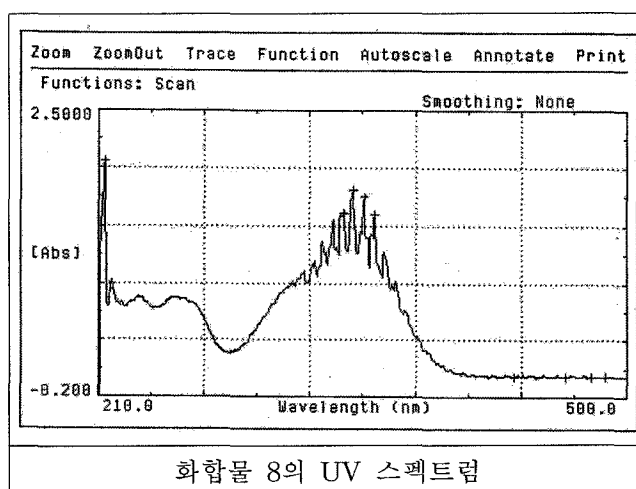


White powder. mp 125 - 126 °C; UV  $\lambda_{\text{max}}$  (MeOH): 215 (11.61), 225 (6.32), 281 (7.71) nm; IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$ : 3445 (OH), 2924 (olefinic -CH=CH-), 1675 (COOH), 1625, 1545 (aromatic -CH=CH-)  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7.83 (1H, d,  $J = 15.9\text{ Hz}$ , H-7), 7.55-7.59 (2H, m, H-2, 6), 7.39-7.45 (3H, m, H-3, 4, 5), 6.48 (1H, d,  $J = 15.9\text{ Hz}$ , H-8);  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 134.3 (C-1), 128.6 (C-2, 6), 129.2 (C-3, 5), 131.0 (C-4), 147.3 (C-7), 117.5 (C-8), 172.8 (C-9); ESIMS  $m/z$  147  $[M - H]^-$ , 119.

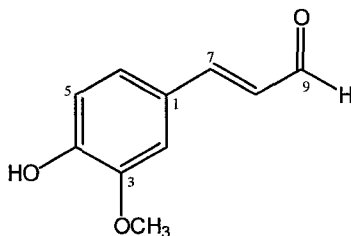


## 화합물 8

백색 분말로서, ESIMS 스펙트럼에서  $m/z$  177  $[M - H]^-$ 에서 이온 피크가 관찰되었다. IR 스펙트럼에서는  $3381\text{ cm}^{-1}$ 에서 -OH기의 존재를,  $1675\text{ cm}^{-1}$ 에서는 C=O group의 존재를 확인하였고, 1662, 1459,  $1360 - 610\text{ cm}^{-1}$ 에서 aromatic ring의 존재를 확인하였다.  $^1\text{H-NMR}$ 에서 9.64 ppm에서 알데하이드 기의 존재를, 7.57, 6.65 ppm에서 olefinic proton을, 7.38 - 6.91 ppm에서 3개의 aromatic proton을 확인하였으며, 3.93 ppm에서는 methoxy 기의 존재를 확인하였다. 이상의 data는 기존문헌<sup>10)</sup>에서 보고한 것과 동일하였으므로, coniferaldehyde로 동정하였다.



White powder. mp  $82 - 84\text{ }^\circ\text{C}$ ; UV  $\lambda_{\text{max}}$  350 nm; IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$ : 3381 (OH), 2930 (olefinic -CH=CH-), 1675 (C=O), 1662, 1459, 1360 - 610 (aromatic -CH=CH-)  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H-NMR}$  (900 MHz, acetone- $d_6$ )  $\delta$ : 9.64 (1H, d,  $J = 8.1\text{ Hz}$ , H-9), 7.57 (1H, d,  $J = 16.2\text{ Hz}$ , H-7), 7.38 (1H, s, H-2), 7.21 (1H, d,  $J = 8.1\text{ Hz}$ , H-6), 6.91 (1H, d,  $J = 8.1\text{ Hz}$ , H-5), 6.65 (1H, dd,  $J = 16.2, 8.1\text{ Hz}$ , H-8), 3.93 (3H, s, OCH<sub>3</sub>);  $^{13}\text{C-NMR}$  (225 MHz, acetone- $d_6$ )  $\delta$ : 127.5 (C-1), 111.6 (C-2), 151.0 (C-3), 148.9 (C-4), 116.3 (C-5), 124.9 (C-6), 154.2 (C-7), 127.1 (C-8), 193.5 (C-9), 56.5 (OCH<sub>3</sub>); ESIMS  $m/z$ : 177  $[M - H]^-$ , 162, 119.

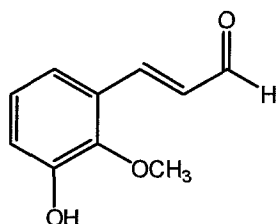


## 화합물 9

무색 분말로서, ESIMS 스펙트럼에서  $m/z$  178  $[M]^+$ 에서 이온 피크가 관찰되었고, IR 스펙트럼에서는  $3280\text{ cm}^{-1}$ 에서 -OH기의 존재를,  $1673\text{ cm}^{-1}$ 에서는 C=O group의 존재를 확인하였고, 1586, 1331, 1206,

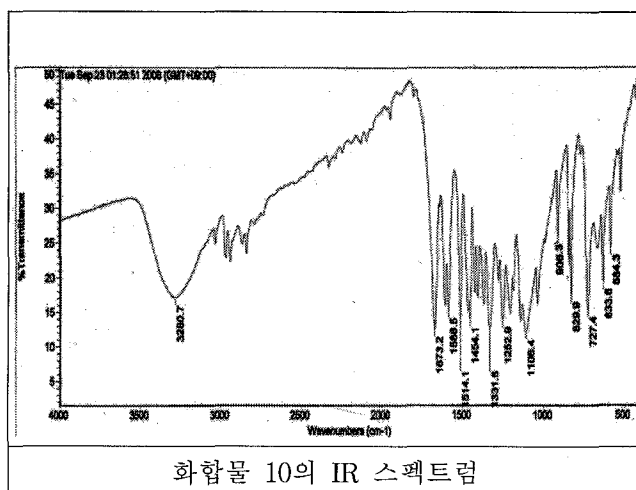
1106  $\text{cm}^{-1}$ 에서 aromatic ring의 존재를 확인하였다.  $^1\text{H-NMR}$ 에서 9.67 ppm에서 알데하이드 기를, 7.90, 6.79 ppm에서 olefinic proton을, 7.17 - 6.95 ppm에서 3개의 aromatic proton을 확인하였으며, 3.86 ppm에서는 methoxy 기의 존재를 확인하였다. 이상의 data를 기존문헌<sup>10)</sup>과 비교하여, cassiferaldehyde로 동정하였다.

Colorless amorphous powder; mp 78 - 80 °C; UV  $\lambda_{\text{max}}$  (MeOH, log  $\epsilon$ ): 214 (3.30), 350 (3.24) nm; IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$ : 3280, (OH), 1673 (C=O), 1586, 1331, 1206, 1106 (aromatic -CH=CH-), 727  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz, MeOD)  $\delta$ : 9.67 (1H, d,  $J$  = 8.0 Hz, H-9), 7.90 (1H, d,  $J$  = 16.5 Hz, H-7), 7.17 (1H, dd,  $J$  = 1.5, 8.0 Hz, H-6), 7.00 (1H, t,  $J$  = 8.0 Hz, H-5), 6.95 (1H, dd,  $J$  = 1.5, 8.0 Hz, H-4), 6.79 (1H, dd,  $J$  = 8.0, 16.5 Hz, H-8), 3.86 (3H, s, OCH<sub>3</sub>);  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz, MeOD)  $\delta$ : 129.5 (C-1), 148.9 (C-2), 152.1 (C-3), 120.9 (C-4), 125.5 (C-5), 120.1 (C-6), 150.1 (C-7), 130.6 (C-8), 196.6 (C-9), 61.8 (OCH<sub>3</sub>); ESIMS  $m/z$  178 [M]<sup>+</sup>.



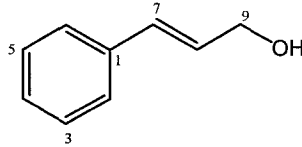
## 화합물 10

황색의 액체로서, EIMS 스펙트럼에서  $m/z$  134 [M]<sup>+</sup>에서 이온 피크가 관찰되었고, IR 스펙트럼에서는 3380  $\text{cm}^{-1}$ 에서 -OH기의 존재를, 1500, 1490, 1110, 750  $\text{cm}^{-1}$ 에서 aromatic ring의 존재를 확인하였다.  $^1\text{H-NMR}$ 에서 6.79, 6.63 ppm에서 olefinic proton을, 7.42 - 7.22 ppm에서 5개의 aromatic proton을 확인하였으며, 4.25 ppm에서는 oxygenated methylene 기의 존재를 확인하였다. 이상의 data는 기존문헌<sup>11)</sup>에서 보고한 것과 동일하였으므로, cinnamic alcohol로 동정하였다.



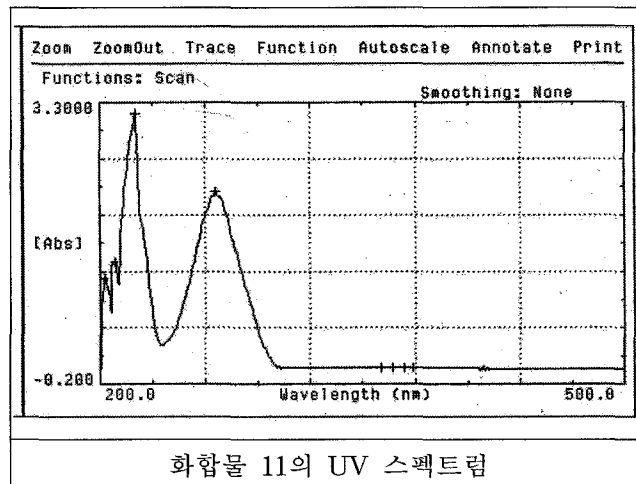


Yellowish oil.  $[\alpha]_D^{23} + 17.2^\circ$  ( $c$  0.5, EtOH); UV  $\lambda_{\max}$ : 228, 280, 300 nm; IR (KBr)  $\nu_{\max}$ : 3380 (OH), 2862 (olefinic  $-\text{CH}=\text{CH}-$ ), 1500, 1490, 1110, 750 (aromatic  $-\text{CH}=\text{CH}-$ )  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, acetone- $d_6$ )  $\delta$ : 7.42 (2H, br d,  $J = 7.6$  Hz, H-2, 6), 7.31 (2H, dd,  $J = 7.2, 7.6$  Hz, H-3, 5), 7.22 (1H, t,  $J = 7.2$  Hz, H-4), 6.79 (1H, dt,  $J = 5.2, 16.0$  Hz, H-8), 6.63 (1H, d,  $J = 16$  Hz, H-7), 4.25 (2H, d,  $J = 5.2$  Hz, H-9);  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz, acetone- $d_6$ )  $\delta$ : 138.3 (C-1), 127.1 (C-2, 6), 129.4 (C-3, 5), 128.1 (C-4), 131.1 (C-7), 130.0 (C-8), 63.2 (C-9); EIMS  $m/z$  134  $[\text{M}]^+$ , 105, 92, 78.

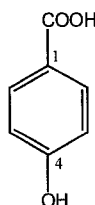


### 화합물 11

흰색의 분말로서, EIMS 스펙트럼에서  $m/z$  138  $[\text{M}]^+$ 에서 이온 피크가 관찰되었다. IR 스펙트럼에서는  $3400 \text{ cm}^{-1}$ 에서  $-\text{OH}$ 기의 존재를,  $1765 \text{ cm}^{-1}$ 에서는  $\text{C}=\text{O}$  group의 존재를 확인하였고, 1665, 1460, 1380,  $1060 \text{ cm}^{-1}$ 에서 aromatic ring의 존재를 확인하였다.  $^1\text{H-NMR}$ 에서 7.87 - 6.81 ppm에서 4개의 aromatic proton을 확인하였다. 이상의 data는 기존문헌<sup>12)</sup>에서 보고한 것과 동일하였으므로, 4-hydroxybenzoic acid로 동정하였다.

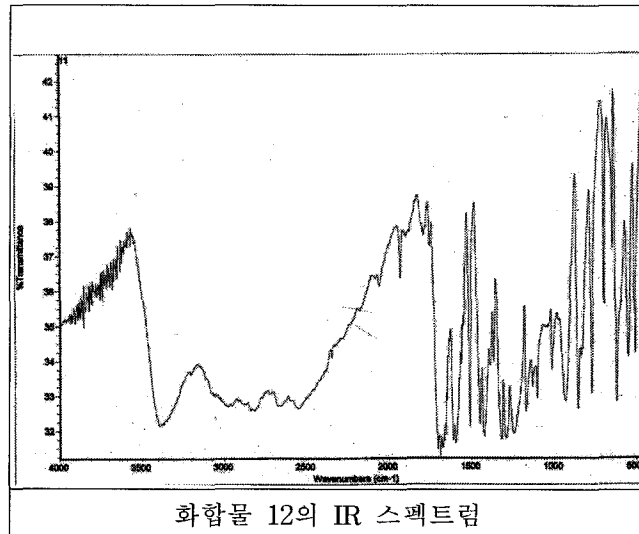


White powder. mp 217 - 219 °C; UV ( $\text{CHCl}_3$ )  $\lambda_{\max}$  252 nm; IR (KBr)  $\nu_{\max}$ : 3400 (OH), 1765 ( $\text{C}=\text{O}$ ), 1665, 1460, 1380 and 1060 (aromatic  $-\text{CH}=\text{CH}-$ )  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz, MeOH)  $\delta$ : 7.87 (2H, dd,  $J = 2.1, 8.7$  Hz, H-2, 6), 6.81 (2H, dd,  $J = 2.1, 8.7$  Hz, H-3, 5);  $^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz, MeOD)  $\delta$ : 170.2 ( $-\text{COOH}$ ), 163.5 (C-4), 133.1 (C-2, 6), 122.9 (C-1), 116.1 (C-3, 5); EIMS  $m/z$  138  $[\text{M}]^+$ .

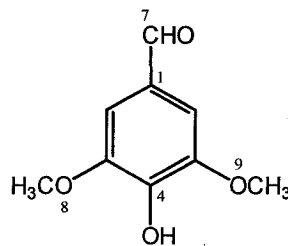


## 화합물 12

흰색의 분말로서, EIMS 스펙트럼에서  $m/z$  181  $[M]^+$ 에서 이온 피크가 관찰되었다. IR 스펙트럼에서는  $3380\text{ cm}^{-1}$ 에서 -OH기의 존재를,  $1750\text{ cm}^{-1}$ 에서는 C=O group의 존재를 확인하였고, 1500, 1490, 1110,  $750\text{ cm}^{-1}$ 에서 aromatic ring의 존재를 확인하였다.  $^1\text{H-NMR}$ 에서 9.73 ppm에서 알데하이드 기를, 7.20 ppm에서 2개의 겹쳐지는 aromatic proton을 인하였으며, 3.90 ppm에서 2개의 methoxy 기의 존재를 확인하였다. 이상의 data는 기존문헌<sup>13,14)</sup>에서 보고한 것과 동일하였으므로, syringaldehyde로 동정하였다.



White powder. mp  $110\text{--}113\text{ }^\circ\text{C}$ , UV  $\lambda_{\text{max}}$ : 218 nm; IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$ : 3380 (OH), 1750 (C=O), 1500, 1490, 1110, 750 (aromatic -CH=CH-)  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, MeOD)  $\delta$ : 9.73 (1H, s, H-7), 7.20 (2H, br s, H-2, 6), 3.90 (6H, s, H-8, H-9);  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz, MeOD)  $\delta$ : 128.3 (C-1), 107.1 (C-2, 6), 148.4 (C-3, 5), 142.1 (C-4), 55.6 (C-8, 9); EIMS  $m/z$  181  $[M]^+$ , 151, 121.

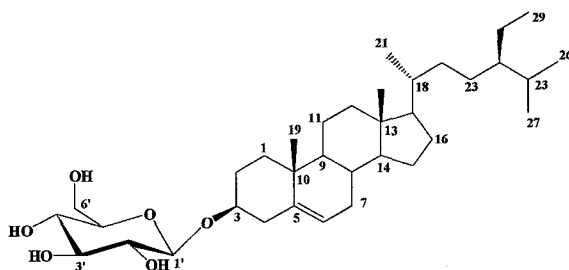


## 화합물 13

백색 분말로서, IR 스펙트럼에서는  $3400\text{ cm}^{-1}$ 에서 -OH기의 존재를,  $2950\text{ cm}^{-1}$ 에서 olefinic group의 존재를 확인하였다.  $^1\text{H-NMR}$ 에서 1.01 - 0.85 ppm에서의 특징적인 6개의 methyl기와, 5.36 ppm에서 olefinic proton, 3.97 ppm에서 oxygenated methine 및 5.07 - 3.97 ppm에서의 특징적인 피크로부터  $\beta$ -sitosterol을 aglycone으로 한 배당체임을 확인할 수 있었다. 치환된 당은 기존문헌과의 비교를 통해 D-glucose로 확인할 수 있었고, 저자장 이동된 3.97 ppm에서의 oxygenated methine의 신호로부터 당의

위치는  $\beta$ -sitosterol의 3번 탄소임을 확인할 수 있었다. 이상의 data는 기존문헌<sup>15)</sup>에서 보고한 것과 동일 하였으므로, daucosterol로 동정하였다.

White powder. mp 290 - 294 °C;  $[\alpha]_D^{23}$  - 28.5° (*c* 0.4, CHCl<sub>3</sub>); UV (CHCl<sub>3</sub>)  $\lambda_{max}$  244, 276 nm; IR (KBr)  $\nu_{max}$ : 3400 (OH), 2950 (olefinic -CH=CH-), 1460, 1380, 1060 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, Pyridine-*d*<sub>5</sub>)  $\delta$ : 5.36 (1H, br d, H-6), 3.97 (1H, m, H-3), 1.01 (3H, s, H-19), 0.67 (3H, s, H-20), 0.92 (3H, d, *J* = 6.8 Hz, H-21), 0.83 (3H, d, *J* = 1.6 Hz, H-26), 0.81 (3H, brs, H-27), 0.85 (3H, brs, H-29), Glu: 5.07 (1H, d, *J* = 7.2 Hz, H-1'), 4.59 (1H, dd, *J* = 2.4, 11.7 Hz, H-6'), 4.43 (1H, dd, *J* = 5.7, 11.7 Hz, H-6'), 4.30 (2H, m, H-3', 5'), 4.06 (1H, m, H-4'), 3.97 (1H, m, H-2'); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, Pyridine-*d*<sub>5</sub>)  $\delta$ : 37.2 (C-1), 31.6 (C-2), 71.7 (C-3), 42.2 (C-4), 140.7 (C-5), 121.7 (C-6), 31.8 (C-7), 31.9 (C-8), 50.0 (C-9), 36.4 (C-10), 21.0 (C-11), 39.7 (C-12), 42.2 (C-13), 56.7 (C-14), 24.3 (C-15), 28.2 (C-16), 55.9 (C-17), 11.8 (C-18), 19.4 (C-19), 36.1 (C-20), 18.7 (C-21), 33.9 (C-22), 25.9 (C-23), 45.8 (C-24), 29.1 (C-25), 19.8 (C-26), 18.9 (C-27), 23.0 (C-28), 11.0 (C-29), Glc: 102.9 (C-1'), 79.0 (C-3'), 78.9 (C-5'), 75.7 (C-2'), 72.1 (C-4'), 63.3 (C-6').

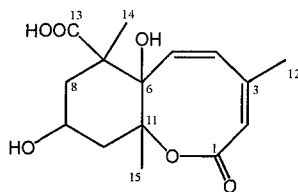


#### 화합물 14

백색 분말로서, EIMS 스펙트럼에서  $m/z$  296 [M]<sup>+</sup>에서 이온 피크가 관찰되었다. IR 스펙트럼에서는 3400 cm<sup>-1</sup>에서 -OH기의 존재를, 2891 cm<sup>-1</sup>에서 olefinic group의 존재를 확인하였다. <sup>1</sup>H-NMR에서 8.00, 5.83, 6.43 ppm에서 3개의 olefinic proton을, 3.85 ppm에서 oxygenated methine proton을, 2.09, 1.08, 1.35 ppm에서 3개의 methyl기를 확인할 수 있었다. <sup>13</sup>C-NMR에서는 170 ppm에서 1개의 COOH를, 150.4 - 121.0 ppm에서 4개의 olefinic carbon을 포함한 총 15개의 피크를 관찰할 수 있었다. 이상의 data는 기존문헌<sup>16)</sup>에서 보고한 것과 동일하였으므로, amygdalacton로 동정하였다.

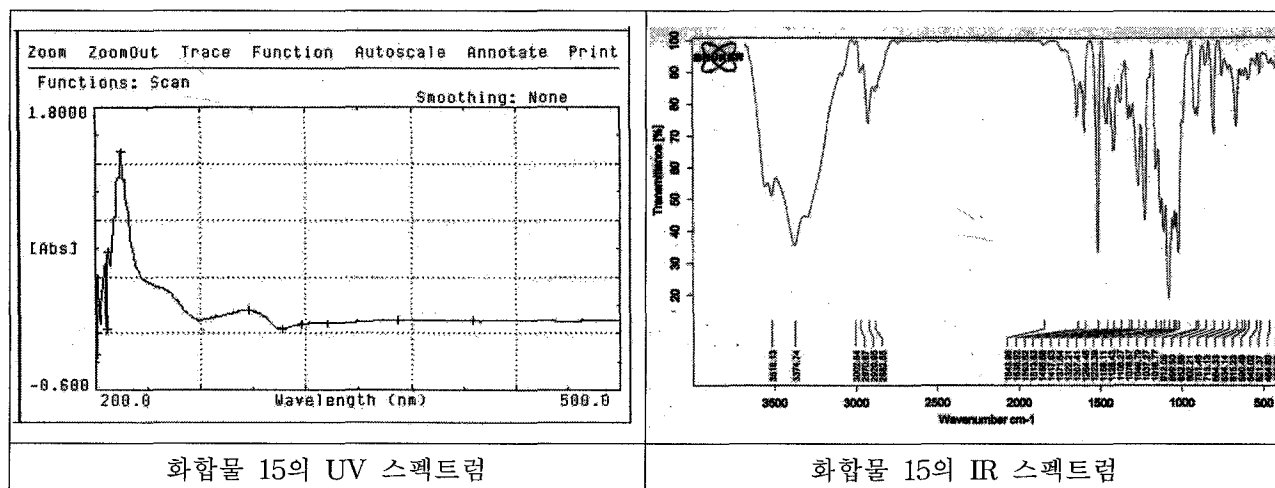
White powder. mp 128 - 130 °C;  $[\alpha]_D^{23}$  - 42.0° (*c* 0.15, MeOH); UV  $\lambda_{max}$  (MeOH) 278 nm; IR (KBr)  $\nu_{max}$ : 3400 (OH), 2891 (olefinic -CH=CH-), 1765, 1665, 1510, 1440, 1260, 1210, 1065 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 8.00 (1H, d, *J* = 16.0 Hz, H-4), 5.83 (1H, s, H-2), 6.43 (1H, d, *J* = 16.0 Hz, H-5), 1.91 (1H, ddd, *J* = 1.0, 7.0, 13.5 Hz, H-8), 1.73 (1H, dd, *J* = 11.0, 13.5 Hz, H-8'), 3.85 (1H, m, H-9), 2.27 (1H, ddd, *J* = 1.0, 7.0, 14.0 Hz, H-10), 1.85 (1H, dd, *J* = 11.0, 14.0 Hz, H-10'), 2.09 (3H,

s, H-12), 1.08 (3H, s, H-14), 1.35 (3H, s, H-15);  $^{13}\text{C}$ -NMR (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 170.0 (C-1), 121.0 (C-2), 150.4 (C-3), 133.4 (C-4), 132.1 (C-5), 82.9 (C-6), 53.7 (C-7), 41.1 (C-8), 65.4 (C-9), 42.4 (C-10), 90.0 (C-11), 21.2 (C-12), 181.2 (C-13), 14.7 (C-14), 18.6 (C-15); EIMS  $m/z$  296  $[\text{M}]^+$ .



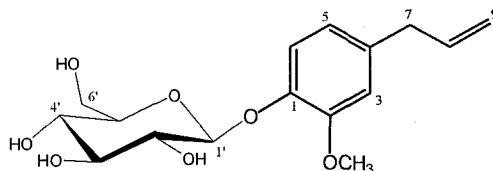
### 화합물 15

백색 분말로서, ESI-MS 스펙트럼에서  $m/z$  349.4  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 에서 이온 피크가 관찰되었다. IR 스펙트럼에서  $3374\text{ cm}^{-1}$ 에서 -OH의 존재를,  $2920\text{ cm}^{-1}$ 에서 olefinic group의 존재를 확인하였으며, 1440, 1260, 1210,  $1065\text{ cm}^{-1}$ 에서 aromatic ring의 존재를 확인하였다.  $^1\text{H}$ -NMR에서 5.95, 5.00-5.10 ppm에서 olefinic proton을, 6.82 - 5.95 ppm에서 3개 aromatic proton을, 3.83 ppm에서는 methoxy 기의 존재를 확인할 수 있었으며, 3.23 - 3.49 ppm에서의 겹쳐진 신호들로부터 당의 존재를 확인할 수 있었다. 이상의 data는 기존 문헌<sup>17)</sup>에서 보고한 것과 동일하였으므로, eugenyl glucoside로 동정하였다.



White powder. mp 124 - 126 °C;  $[\alpha]_{\text{D}}^{23}$  -44.8° ( $c$  0.15, MeOH); UV  $\lambda_{\text{max}}$  (MeOH) 278 nm; IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$ : 3374 (OH), 2920 (olefinic -CH=CH-), 1440, 1260, 1210, 1065 (aromatic -CH=CH-)  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$ -NMR (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 7.08 (1H, d,  $J$  = 8.1 Hz, H-6), 6.82 (1H, d,  $J$  = 1.8 Hz, H-3), 6.72 (1H, dd,  $J$  = 1.8, 8.1 Hz, H-5), 5.95 (1H, m, H-8), 5.00-5.10 (2H, m, H-9), 3.35 (1H, overlap, H-7), 4.89 (1H, d,  $J$  = 7.8 Hz, H-1'), 3.86 (1H, dd,  $J$  = 2.0, 11.5 Hz, H-6'), 3.83 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 3.68 (1H, dd,  $J$  = 5.0, 11.5 Hz, H-6'), 3.23 - 3.49 (4H, overlap, H-2', 3', 4', 5');  $^{13}\text{C}$ -NMR (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 150.9 (C-1), 146.5 (C-2), 114.3 (C-3), 136.6 (C-4), 122.2 (C-5), 118.50 (C-6), 40.9 (C-7), 139.1

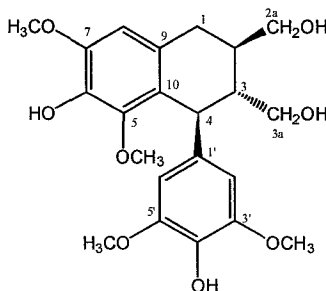
(C-8), 116.0 (C-9), 56.9 (C-10), Glc 103.2 (C-1'), 75.1 (C-2'), 78.3 (C-3'), 71.5 (C-4'), 77.9 (C-5'), 62.8 (C-6'); ESI-MS  $m/z$  349.4  $[M + Na]^+$ .



## 화합물 16

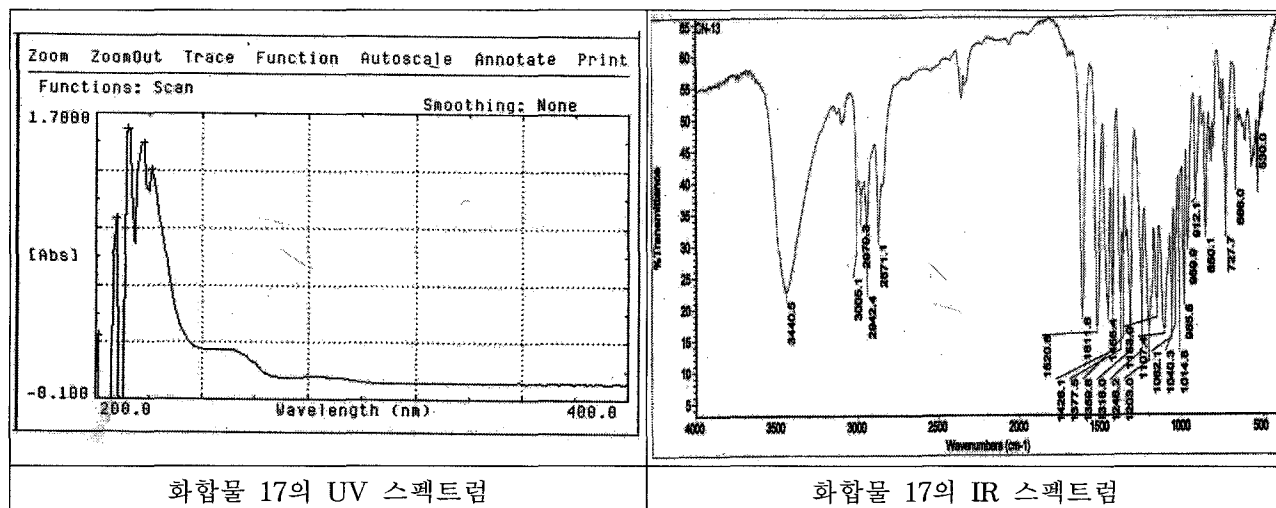
백색 분말로서, EIMS 스펙트럼에서  $m/z$  420  $[M]^+$ 에서 이온 피크가 관찰되었고, 선광도( $[\alpha]_D^{25}$ )는  $+68.2^\circ$ 이었다. IR 스펙트럼에서는  $3380\text{ cm}^{-1}$ 에서 -OH기의 존재를, 1598, 1490, 1463 1295, 1195  $\text{cm}^{-1}$ 에서 aromatic ring의 존재를 확인하였다.  $^1\text{H-NMR}$ 에서 6.48, 6.32 ppm에서 3개의 aromatic proton을, 3.59 - 3.46 ppm에서 oxygenated methylene proton들을, 3.84, 3.74, 3.30 ppm에서 3개의 methoxy 기를 확인할 수 있었다.  $^{13}\text{C-NMR}$ 에서는 147.8 - 106.1 ppm에서 12개의 aromatic carbon을 포함한 총 22개의 피크를 관찰할 수 있었다. 이상의 data는 기존문헌<sup>18)</sup>에서 보고한 것과 동일하였으므로, (+)-lyoniresinol로 동정하였다.

White powder. mp 176 - 179 °C;  $[\alpha]_D^{23} + 68.2^\circ$  ( $c$  0.1, MeOH); UV  $\lambda_{\text{max}}$ : 219, 278 nm; IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$ : 3380 (OH), 1598, 1490, 1463 1295, 1195 (aromatic -CH=CH-)  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3 + \text{MeOD}$ )  $\delta$ : 6.48 (1H, s, H-8), 6.32 (2H, br s, H-2', 6'), 4.11 (1H, d,  $J = 6.3$  Hz, H-4), 3.84 (3H, s, 7-OCH<sub>3</sub>), 3.74 (6H, s, 3', 5'-OCH<sub>3</sub>), 3.59 (1H, dd,  $J = 5.4, 11.1$  Hz, H-2a), 3.56 (2H, t,  $J = 6.0$  Hz, H-3a), 3.46 (1H, dd,  $J = 5.4, 11.1$  Hz, H-2a'), 3.30 (3H, s, 5-OCH<sub>3</sub>), 2.64 (1H, dd,  $J = 5.4, 15.0$  Hz, H-1), 2.54 (1H, br d,  $J = 15.0$  Hz, H-1'), 1.99 (1H, m, H-3), 1.65 (1H, m, H-2);  $^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3 + \text{MeOD}$ )  $\delta$ : 147.8 (C-3', 5'), 147.4 (C-5), 146.5 (C-7), 138.6 (C-6), 137.9 (C-1'), 133.5 (C-4'), 129.4 (C-9), 125.6 (C-10), 107.0 (C-8), 106.1 (C-6', 2'), 66.7 (C-2a), 63.9 (C-3a), 60.0 (7-OCH<sub>3</sub>), 56.6 (3', 5'-OCH<sub>3</sub>), 56.4 (5-OCH<sub>3</sub>), 49.1 (C-3), 42.5 (C-4), 40.6 (C-2), 33.4 (C-1); EIMS  $m/z$  420  $[M]^+$ .

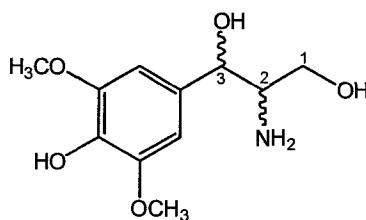


### 화합물 17

백색 분말로서, ESI-MS 스펙트럼에서  $m/z$  243  $[M]^+$ 에서 이온 피크가 관찰되었고, IR 스펙트럼에서  $3340\text{ cm}^{-1}$ 에서 -OH의 존재를, 2942, 2871에서  $\text{NH}_2$ 의 존재를,  $2920\text{ cm}^{-1}$ 에서 1611, 1520, 1246, 1203, 1065,  $985\text{ cm}^{-1}$ 에서 aromatic ring의 존재를 확인하였다.  $^1\text{H-NMR}$ 에서 6.70 ppm에서 2개의 aromatic proton을, 4.68 - 3.84 ppm에서는 oxygenated proton들을, 3.81 ppm에서 2개의 methoxy 기를 확인할 수 있었다. 이상의 data를 기준문헌<sup>19)</sup>과 비교하여, cinnacassine로 동정하였다.



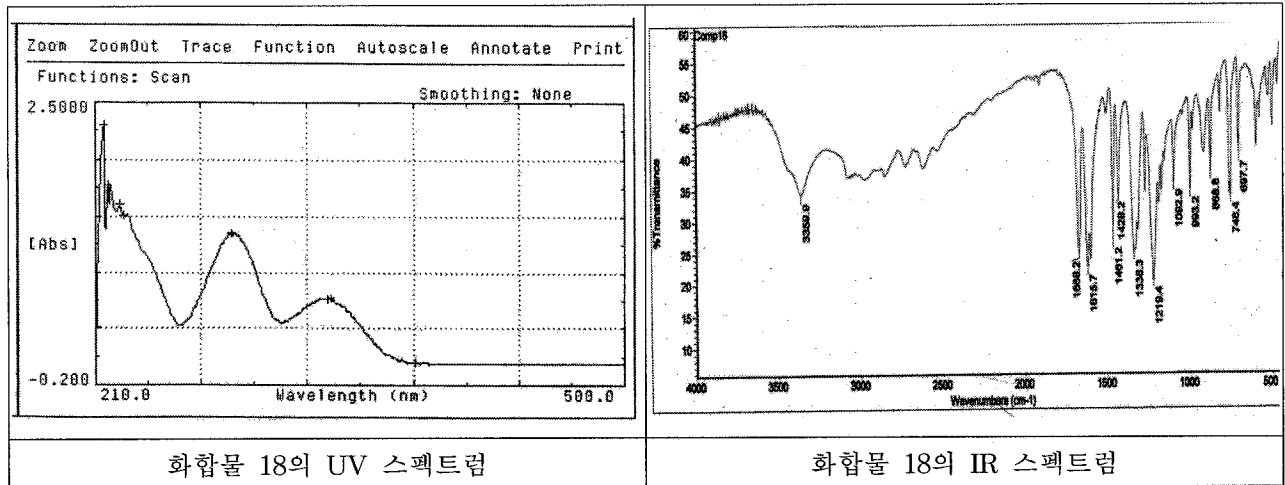
White powder; mp 170-171 °C;  $[\alpha]_D^{23} +22.5$  ( $c$  1.3, MeOH); UV  $\lambda_{\text{max}}$  (MeOH, log  $\epsilon$ ): 218 (2.813), 237 (3.243), 249 (2.869), 284 (2.024) nm; IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$ : 3340 (OH), 2942, 2871( $\text{NH}_2$ ), 1611, 1520, 1246, 1203, 1065, 985 (aromatic -CH=CH-)  $\text{cm}^{-1}$   $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, acetone- $d_6$ )  $\delta$ : 6.70 (2H, br s, H-5, 9), 4.68 (1H, d,  $J = 4.4$  Hz, H-3), 4.32 (1H, dd,  $J = 4.0, 8.8$  Hz, H-1a), 3.84 (1H, dd,  $J = 4.0, 9.6$  Hz, H-1b), 3.11 (1H, m, H-2), 3.81 (6H, s, H-10, 11);  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz, acetone- $d_6$ )  $\delta$ : 148.8 (C-6, 8), 136.2 (C-7), 133.2 (C-4), 104.5 (C-5, 9), 86.8 (C-3), 72.4(C-1), 56.8 (C-2), 55.3 (C-10, 11); ESI-MS  $m/z$  243  $[M]^+$ .



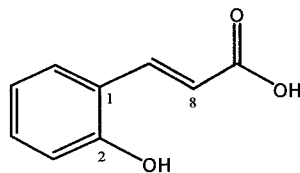
### 화합물 18

백색 분말로서, ESI-MS 스펙트럼에서  $m/z$  163  $[M]^+$ 에서 이온 피크가 관찰되었고, IR 스펙트럼에서  $3354\text{ cm}^{-1}$ 에서 -OH의 존재를,  $1668\text{ cm}^{-1}$ 에서 C=O의 존재를, 1619, 1463, 1316,  $1218\text{ cm}^{-1}$ 에서 aromatic ring의 존재를 확인하였다.  $^1\text{H-NMR}$ 에서 8.02, 6.61 ppm에서 2개의 olefinic proton을, 7.59 - 6.89 ppm에

서 4개의 aromatic proton을 확인할 수 있었다. 이상의 data는 기존문헌<sup>20)</sup>에서 보고한 것과 동일하였으므로, *o*-coumaric acid로 동정하였다.

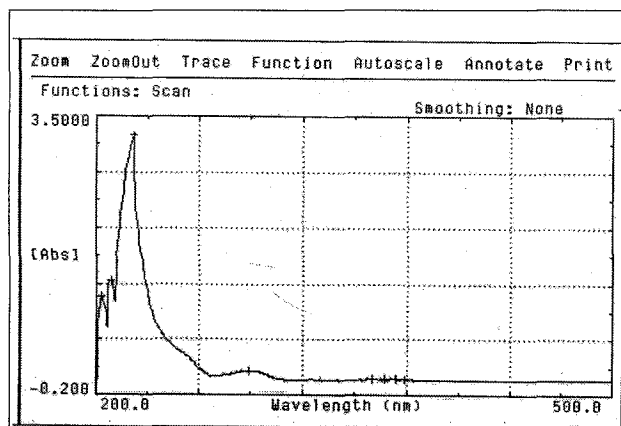


White powder; mp 210 °C; UV  $\lambda_{\max}$  (MeOH, log  $\epsilon$ ): 215 (3.05), 224 (2.88), 285 (2.79), 339 (2.49) nm; IR (KBr)  $\nu_{\max}$ : 3354 (OH), 1668 (C=O), 1619, 1463, 1316, 1218, (aromatic -CH=CH-), 751  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz, acetone- $d_6$ )  $\delta$ : 8.02 (1H, d,  $J$  = 16.2 Hz, H-7), 7.59 (1H, dd,  $J$  = 1.5, 7.2 Hz, H-6), 7.24 (1H, dt,  $J$  = 1.5, 7.2 Hz, H-4), 6.97 (1H, d,  $J$  = 7.2 Hz, H-3), 6.89 (1H, t,  $J$  = 7.2 Hz, H-5), 6.61 (1H, d,  $J$  = 16.2 Hz, H-8);  $^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz, acetone- $d_6$ )  $\delta$ : 168.7 (C-9), 157.4 (C-2), 141.3 (C-7), 132.4 (C-4), 129.8 (C-6), 122.4 (C-1), 120.9 (C-5), 118.9 (C-8), 117.1 (C-3); ESIMS  $m/z$  163  $[\text{M} - \text{H}]^-$ .

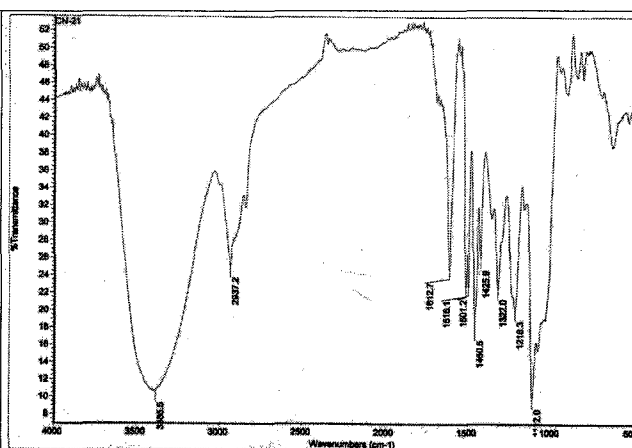


### 화합물 19

백색 분말로서, ESIMS 스펙트럼에서  $m/z$  581  $[\text{M} - \text{H}]^-$ 에서 이온 피크가 관찰되었으며, 선광도( $[\alpha]_D^{25}$ )는  $+23.0^\circ$ 이었다. IR 스펙트럼에서는 3404  $\text{cm}^{-1}$ 에서 -OH기의 존재를, 2937, 1612, 1516, 1458, 1111  $\text{cm}^{-1}$ 에서 aromatic ring의 존재를 확인하였다.  $^1\text{H-NMR}$ 에서 6.48, 6.32 ppm에서 3개의 aromatic proton을, 3.60 - 3.46 ppm에서 oxygenated methylene proton들을, 3.84, 3.74, 3.30 ppm에서 3개의 methoxy 기를 확인할 수 있었으며, 4.21 - 3.49 ppm에서의 겹쳐진 신호들로부터 당의 존재를 확인할 수 있었다. 이상의 data는 기존문헌<sup>21,22)</sup>에서 보고한 것과 동일하였으므로, (+)-Lyoresinol-3a-O- $\beta$ -D-glucopyranoside로 동정하였다.

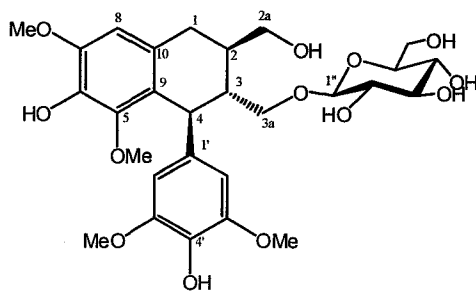


화합물 19의 UV 스펙트럼



화합물 19의 IR 스펙트럼

White amorphous powder; mp 178 - 180 °C;  $[\alpha]_D^{25} +23.0^\circ$  (c 0.14, MeOH); UV  $\lambda_{\max}$  (MeOH, log  $\epsilon$ ): 219 (3.17), 289 (1.84) nm; IR (KBr)  $\nu_{\max}$ : 3404 (OH), 2937, 1612, 1516, 1458, 1111 (aromatic -CH=CH-)  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, acetone- $d_6$ )  $\delta$ : 6.57(1H, s, H-8), 6.41 (2H, br s, H-2', 6'), 4.12 (1H, d,  $J = 7.6$  Hz, H-4), 3.84 (3H, s, 7-OCH<sub>3</sub>), 3.74 (6H, s, 3', 5'-OCH<sub>3</sub>), 3.60 (1H, dd,  $J = 5.2, 11.2$  Hz, H-2a), 3.36 (2H, t,  $J = 6.0$  Hz, H-3a), 3.46 (1H, dd,  $J = 5.2, 11.2$  Hz, H-2a'), 3.30 (3H, s, 5-OCH<sub>3</sub>), 2.69 (2H, d,  $J = 7.6$  Hz, H-1), 2.11 (1H, m, H-3), 1.69 (1H, m, H-2), Glc: 4.21 (1H, d,  $J = 6.8$  Hz, H-1''), 3.86 (1H, dd,  $J = 2.0, 11.2$  Hz, H-6''), 3.23 - 3.49 (4H, overlap, H-2'', 3'', 4'', 5'');  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz, acetone- $d_6$ )  $\delta$ : 149.1 (C-3', 5'), 148.8 (C-5), 147.6 (C-7), 139.6 (C-6), 139.0 (C-1'), 134.7 (C-4'), 130.3 (C-9), 126.4 (C-10), 107.9 (C-8), 107.1 (C-6', 2'), 66.2 (C-2a), 62.8 (C-3a), 60.2 (7-OCH<sub>3</sub>), 57.0 (3', 5'-OCH<sub>3</sub>), 56.9 (5-OCH<sub>3</sub>), 46.7 (C-3), 43.4 (C-4), 41.4 (C-2), 33.9 (C-1), Glc: 104.3 (C-1''), 75.1 (C-2''), 78.3 (C-3''), 71.5 (C-4''), 77.9 (C-5''), 62.8 (C-6''); ESIMS  $m/z$  581  $[\text{M} - \text{H}]^-$ .

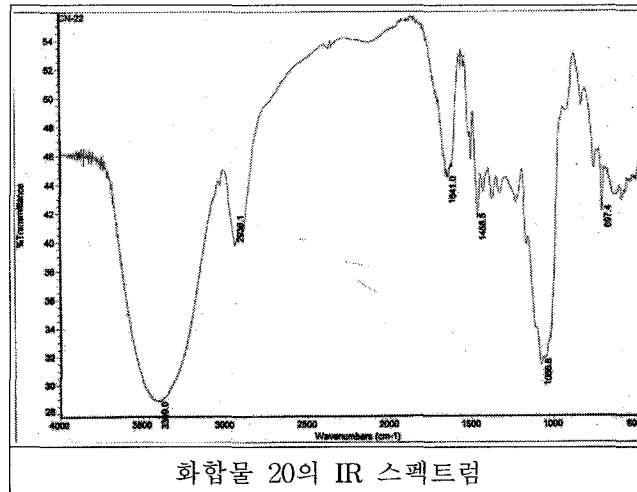


## 화합물 20

무색의 검으로서, ESI-MS 스펙트럼에서  $m/z$  415  $[\text{M} - \text{H}]^+$ 에서 이온 피크가 관찰되었고, IR 스펙트럼에서  $3399 \text{ cm}^{-1}$ 에서 -OH의 존재를, 2936, 1458,  $1066 \text{ cm}^{-1}$ 에서 aromatic ring의 존재를 확인하였다.  $^1\text{H-NMR}$ 에서 7.26 ppm에서 겹쳐진 4개의 aromatic proton을 관찰 할 수 있었으며, 5.38 - 3.41 ppm에서의 겹쳐진 신호들로부터 당의 존재를 확인할 수 있었다. 이상의 data를 기존문헌<sup>23,24</sup>과 비교하여,

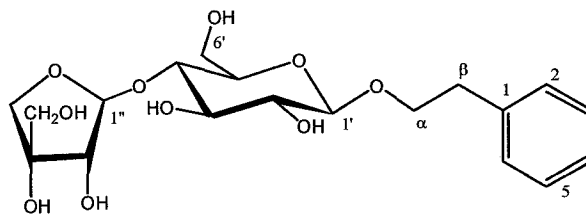


Icariside DC로 동정하였다.



화합물 20의 IR 스펙트럼

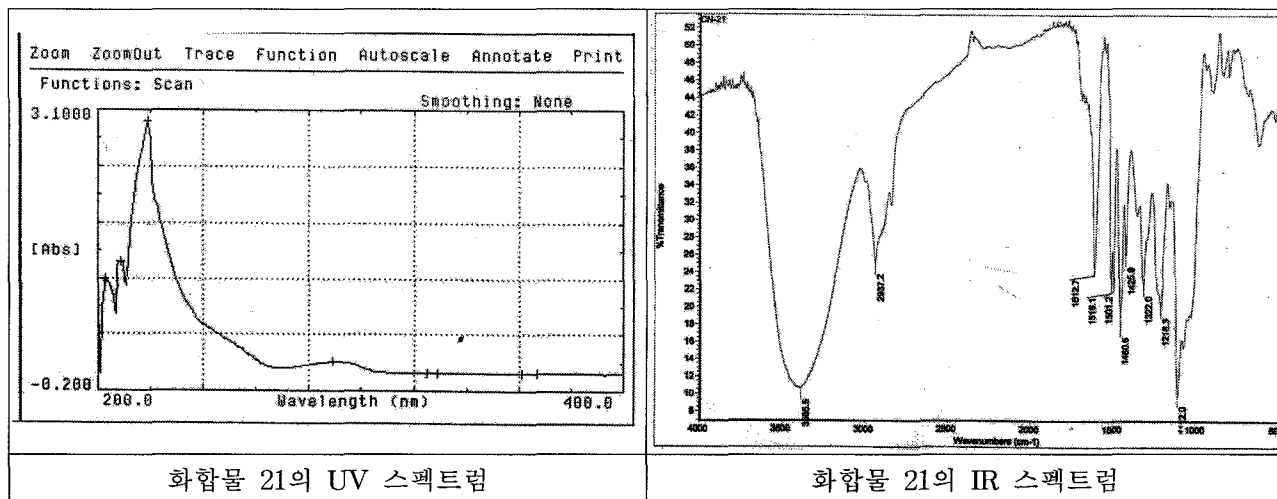
Colorless gum;  $[\alpha]_D^{25} +22.5$  (c 0.24, MeOH); UV  $\lambda_{max}$  (MeOH, log  $\epsilon$ ): 214 (3.00) nm; IR (KBr)  $\nu_{max}$ : 3399 (OH), 2936, 1458, 1066 (aromatic -CH=CH-)  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, MeOD)  $\delta$ : 7.26 (4H, overlap, H-2, 3, 5, 6), 7.16 (1H, m, H-4), 3.74 (1H, dt, 7.2, 9.6 Hz, H- $\alpha$ ), 4.09 (1H, dt,  $J = 7.2, 9.6$  Hz, H- $\alpha'$ ), 2.92 (2H, t,  $J = 7.2$  Hz, H- $\beta$ ), Glc: 4.35 (1H, d,  $J = 7.6$  Hz, H-1'), 3.51 (1H, m, H-2'), 3.42 (1H, m, H-3'), 3.41 (1H, m, H-4'), 3.49 (1H, m, H-5'), 3.96 (1H, d,  $J = 12.6$  Hz, H-6'a), 3.85 (1H, dd,  $J = 2.4, 12.6$  Hz, H-6'b), Api: 5.38 (1H, d,  $J = 1.6$  Hz, H-1''), 3.94 (1H, d,  $J = 1.6$  Hz, H-2''), 3.98 (1H, d,  $J = 9.6$  Hz, H-4''a), 3.69 (1H, d,  $J = 9.6$  Hz, H-4''b), 3.58 (2H, dd,  $J = 11.2, 14.8$  Hz, H-5'');  $^{13}\text{C-NMR}$  (MeOD, 100 MHz)  $\delta$ : 140.2 (C-1), 129.5 (C-2), 130.1 (C-3), 127.3 (C-4), 130.1 (C-5), 129.6 (C-6), 71.7 (C- $\alpha$ ), 37.4 (C- $\beta$ ), Glc: 103.4 (C-1'), 78.7 (C-2'), 78.0 (C-3'), 78.8 (C-4'), 78.0 (C-5'), 62.8 (C-6'), Api: 110.6 (C-1''), 77.9 (C-2''), 80.8 (C-3''), 75.4 (C-4''), 66.3 (C-5''); ESIMS  $m/z$  415  $[\text{M} - \text{H}]^-$ .



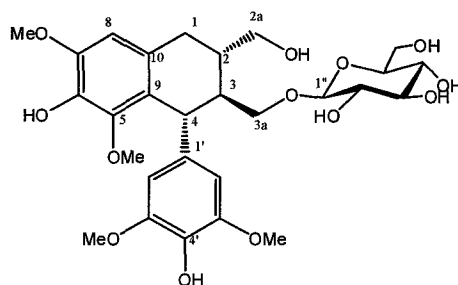
### 화합물 21

백색 분말로서, ESIMS 스펙트럼에서  $m/z$  581  $[\text{M} - \text{H}]^-$ 에서 이온 피크가 관찰되었으며, 선광도( $[\alpha]_D^{25}$ )는  $-23.0^\circ$ 이었다. IR 스펙트럼에서는  $3385 \text{ cm}^{-1}$ 에서 -OH기의 존재를, 2937, 1612, 1516, 1460, 1322,  $1112 \text{ cm}^{-1}$ 에서 aromatic ring의 존재를 확인하였다.  $^1\text{H-NMR}$ 에서 6.56, 6.40 ppm에서 3개의 aromatic proton을, 3.61 - 3.45 ppm에서 oxygenated methylene proton들을, 3.84, 3.74, 3.30 ppm에서 3개의 methoxy 기를 확인할 수 있었으며, 4.21 - 3.49 ppm에서의 겹쳐진 신호들로부터 당의 존재를 확인할 수

있었다. 이상의 data는 기존문헌<sup>21,22)</sup>에서 보고한 것과 동일하였으므로, (-)-Lyoresinol-3a-O- $\beta$ -D-glucopyranoside로 동정하였다.



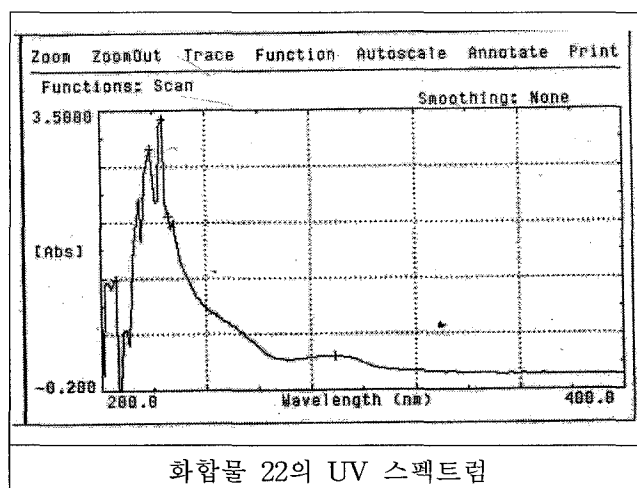
White amorphous powder; mp 175 - 176 °C;  $[\alpha]_D^{25}$  -23.0° (*c* 0.4, MeOH); UV  $\lambda_{max}$  (MeOH, log  $\epsilon$ ): 222 (3.27), 289 (1.84) nm; IR (KBr)  $\nu_{max}$ : 3385 (OH), 2937, 1612, 1516, 1460, 1322, 1112 (aromatic -CH=CH-)  $cm^{-1}$ ;  $^1H$ -NMR (400 MHz, acetone- $d_6$ )  $\delta$ : 6.56 (1H, s, H-8), 6.40 (2H, br s, H-2', 6'), 4.12 (1H, d, *J* = 7.6 Hz, H-4), 3.84 (3H, s, 7-OCH<sub>3</sub>), 3.74 (6H, s, 3', 5'-OCH<sub>3</sub>), 3.61 (1H, d, *J* = 4.8, 11.2 Hz, H-2a), 3.57 (2H, t, *J* = 6.0 Hz, H-3a), 3.45 (1H, dd, *J* = 4.8, 11.2 Hz, H-2a'), 3.30 (3H, s, 5-OCH<sub>3</sub>), 2.66 (2H, d, *J* = 8.0 Hz, H-1), 2.11 (1H, m, H-3), 1.68 (1H, m, H-2), Glc: 4.21 (1H, d, *J* = 6.8 Hz, H-1''), 3.86 (1H, dd, *J* = 2.0, 11.2 Hz, H-6''), 3.23 - 3.49 (4H, overlap, H-2'', 3'', 4'', 5'');  $^{13}C$ -NMR (100 MHz, acetone- $d_6$ )  $\delta$ : 147.8 (C-3', 5'), 147.4 (C-5), 146.5 (C-7), 138.6 (C-6), 137.9 (C-1'), 133.5 (C-4'), 129.4 (C-9), 125.6 (C-10), 107.0 (C-8), 106.1 (C-6', 2'), 66.7 (C-2a), 63.9 (C-3a), 60.0 (7-OCH<sub>3</sub>), 56.6 (3', 5'-OCH<sub>3</sub>), 56.4 (5-OCH<sub>3</sub>), 46.7 (C-3), 43.4 (C-4), 41.3 (C-2), 33.9 (C-1), Glc: 104.3 (C-1''), 75.1 (C-2''), 78.3 (C-3''), 71.5 (C-4''), 77.9 (C-5''), 62.8 (C-6''); ESIMS *m/z* 581 [M - H]<sup>-</sup>.



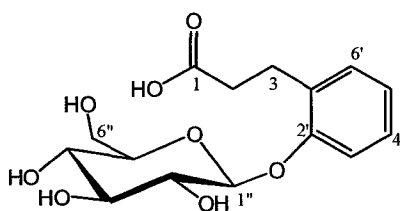
## 화합물 22

백색 분말로서, ESI-MS 스펙트럼에서 *m/z* 351 [M+Na]<sup>+</sup>에서 이온 피크가 관찰되었고, IR 스펙트럼에서 3380  $cm^{-1}$ 에서 -OH의 존재를, 1720  $cm^{-1}$ 에서 C=O의 존재를, 1490, 1463 1295, 1095에서 aromatic

ring의 존재를 확인하였다.  $^1\text{H-NMR}$ 에서 7.13 - 7.19 ppm에서 4개의 aromatic proton을 확인할 수 있었고, 4.91-3.40 ppm 에서의 겹쳐진 신호들로부터 당의 존재를 확인할 수 있었다. 이상의 data는 기존 문헌<sup>25)</sup>에서 보고한 것과 동일하였으므로, dihydromelilotoside로 동정하였다.



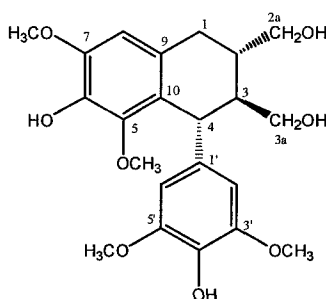
Colorless amorphous powder; mp 198 °C;  $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$  -15.6 (*c* 0.5, MeOH); UV  $\lambda_{\text{max}}$  (MeOH, log  $\epsilon$ ): 212 (2.83) nm; IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$ : 3380 (OH), 2881, 1720 (C=O), 1490, 1463 1295, 1095 (aromatic -CH=CH-)  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz, MeOH)  $\delta$ : 7.13 - 7.19 (3H, overlap, H-4', 5', 6'), 6.93 (1H, dd,  $J$  = 1.6, 6.9 Hz, H-3'), 2.97 (2H, m, H-3), 2.61 (2H, t,  $J$  = 7.5 Hz, H-2), Glc: 4.91 (1H, d,  $J$  = 7.5 Hz, H-1''), 3.89 (1H, d,  $J$  = 12.0 Hz, H-6''a), 3.70 (1H, dd,  $J$  = 4.8, 12.0 Hz, H-6''b), 3.53-3.40 (4H, overlap, H-2'', 3'', 4'', 5'');  $^{13}\text{C-NMR}$  (MeOD, 75 MHz)  $\delta$ : 177.7 (C-1), 157.2 (C-2'), 131.7 (C-6'), 131.1 (C-4'), 128.8 (C-1'), 123.5 (C-5'), 116.5 (C-3'), 102.8 (C-1''), 78.4 (C-5''), 78.3 (C-3''), 75.2 (C-2''), 71.6 (C-4''), 62.7 (C-6''), 35.7 (C-2), 27.2 (C-3); ESIMS  $m/z$  351  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ .



### 화합물 23

백색 분말로서, ESIMS 스펙트럼에서  $m/z$  443  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 에서 이온 피크가 관찰되었고, 선광도 ( $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ )는 -18.9°이었다. IR 스펙트럼에서는 3380  $\text{cm}^{-1}$ 에서 -OH기의 존재를, 1598, 1490, 1463 1295, 1195  $\text{cm}^{-1}$ 에서 aromatic ring의 존재를 확인하였다.  $^1\text{H-NMR}$ 에서 6.56, 6.42 ppm에서 3개의 aromatic proton을, 3.84, 3.74, 3.35 ppm에서 4개의 methoxy 기를 확인할 수 있었다.  $^{13}\text{C-NMR}$ 에서는 148.4 - 107.3 ppm에서 12개의 aromatic carbon을 포함한 총 22개의 피크를 관찰할 수 있었다. 이상의 data는 기존문헌<sup>18)</sup>에서 보고한 것과 동일하였으므로, (-)-lyoniresinol로 동정하였다.

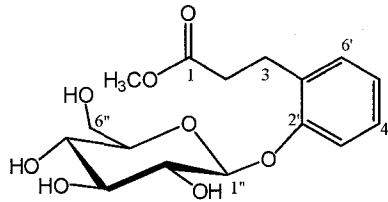
White powder; mp 171 - 172 °C;  $[\alpha]_D^{25}$  -18.9° (*c* 0.2, MeOH); UV  $\lambda_{\max}$  (MeOH, log  $\epsilon$ ): 219 (3.17), 224 (3.22), 289 (2.10) nm; IR (KBr)  $\nu_{\max}$ : 3380 (OH), 1598, 1490, 1463 1295, 1195 (aromatic -CH=CH-)  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, acetone- $d_6$ )  $\delta$ : 6.56 (1H, s, H-8), 6.42 (2H, br s, H-2', 6'), 4.26 (1H, d,  $J$  = 6.4 Hz, H-4), 3.84 (3H, s, 7-OCH<sub>3</sub>), 3.74 (6H, s, 3', 5'-OCH<sub>3</sub>), 3.59 (1H, overlap, H-2a), 3.56 (2H, m, H-3a), 3.46 (1H, dd,  $J$  = 5.2, 11.2 Hz, H-2a'), 3.35 (3H, s, 5-OCH<sub>3</sub>), 2.64 (2H, m, H-1), 1.99 (1H, m, H-3), 1.65 (1H, m, H-2);  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz, acetone- $d_6$ )  $\delta$ : 148.4 (C-3', 5'), 147.7 (C-5), 147.1 (C-7), 139.4 (C-6), 138.6 (C-1'), 134.9 (C-4'), 129.9(C-9), 126.5 (C-10), 107.2 (C-8), 107.3 (C-2', 6'), 66.6 (C-2a), 63.9 (C-3a), 59.5 (7-OCH<sub>3</sub>), 56.8 (3', 5'-OCH<sub>3</sub>), 56.4 (5-OCH<sub>3</sub>), 49.1 (C-3), 42.7 (C-4), 41.3 (C-2), 33.9 (C-1); ESIMS  $m/z$  443 [M+Na]<sup>+</sup>.



#### 화합물 24

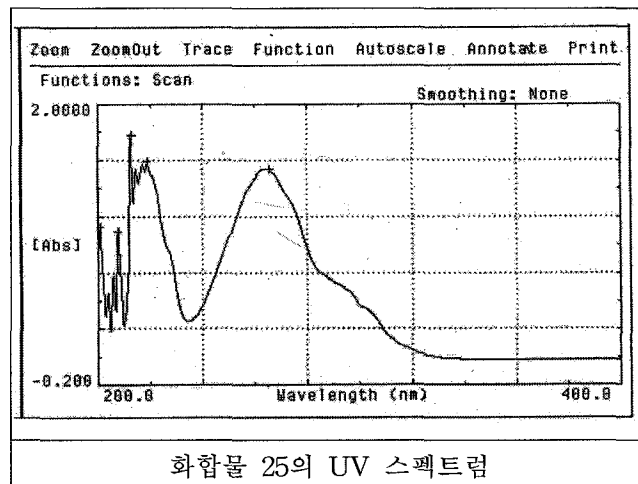
백색 분말로서, ESI-MS 스펙트럼에서  $m/z$  365 [M+Na]<sup>+</sup>에서 이온 피크가 관찰되었고, IR 스펙트럼에서 3380  $\text{cm}^{-1}$ 에서 -OH의 존재를, 1720 $\text{cm}^{-1}$ 에서 C=O의 존재를, 1490, 1463 1295, 1095에서 aromatic ring의 존재를 확인하였다.  $^1\text{H-NMR}$ 에서 7.12 - 7.20 ppm에서 4개의 aromatic proton을, 3.65 ppm에서 methoxy 기를 확인할 수 있었으며, 4.92-3.40 ppm 에서의 겹쳐진 신호들로부터 당의 존재를 확인할 수 있었다. 이상의 data는 기존 문헌<sup>26)</sup>에서 보고한 것과 동일하였으므로, methyl dihydromelilotoside로 동정하였다.

Colorless amorphous powder; mp 186 - 189 °C;  $[\alpha]_D^{25}$  -8.2 (*c* 0.4, MeOH); UV  $\lambda_{\max}$  (MeOH, log  $\epsilon$ ): 212 (2.83) nm; IR (KBr)  $\nu_{\max}$ : 3380 (OH), 2881, 1720 (C=O), 1490, 1463 1295, 1095 (aromatic -CH=CH-)  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz, MeOH)  $\delta$ : 7.12 - 7.20 (3H, overlap, H-4', 5', 6'), 6.92 (1H, dd,  $J$  = 1.6, 6.9 Hz, H-3'), 3.63 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 2.97 (2H, m, H-3), 2.61 (2H, dt,  $J$  = 1.5, 7.5 Hz, H-2), Glc: 4.92 (1H, d,  $J$  = 7.5 Hz, H-1''), 3.89 (1H, d,  $J$  = 12.0 Hz, H-6''a), 3.70 (1H, dd,  $J$  = 4.8, 12.0 Hz, H-6''b), 3.53-3.40 (4H, overlap, H-2'', 3'', 4'', 5'');  $^{13}\text{C-NMR}$  (MeOD, 75 MHz)  $\delta$ : 176.0 (C-1), 157.1 (C-2'), 131.3 (C-6'), 131.1 (C-4'), 128.9 (C-1'), 123.5 (C-5'), 116.5 (C-3'), 102.7 (C-1''), 78.3 (C-5''), 78.13 (C-3''), 75.1 (C-2''), 71.5 (C-4''), 62.7 (C-6''), 52.2 (OCH<sub>3</sub>), 35.3 (C-2), 27.0 (C-3); ESIMS  $m/z$  365 [M+Na]<sup>+</sup>.

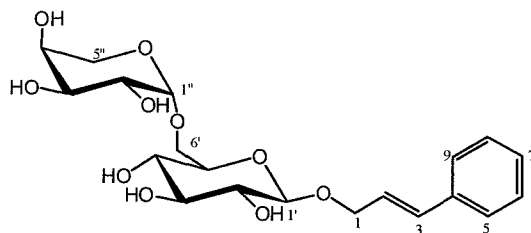


## 화합물 25

무색 분말로서, ESI-MS 스펙트럼에서  $m/z$  451  $[M+Na]^+$ 에서 이온 피크가 관찰되었고, IR 스펙트럼에서  $3380\text{ cm}^{-1}$ 에서 -OH의 존재를,  $1720\text{ cm}^{-1}$ 에서 C=O의 존재를, 1490, 1463 1295, 1095에서 aromatic ring의 존재를 확인하였다.  $^1\text{H-NMR}$ 에서 6.68, 6.36 ppm에서 olefinic proton을, 7.41 - 7.18 ppm에서 5개의 aromatic proton을 확인할 수 있었으며, 4.37-3.20 ppm에서의 겹쳐진 신호들로부터 당의 존재를 확인할 수 있었다. 이상의 data는 기존 문헌<sup>27)</sup>에서 보고한 것과 동일하였으므로, rosavin로 동정하였다.



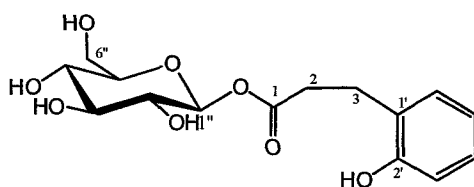
Colorless amorphous powder; mp 97 - 99 °C;  $[\alpha]_D^{25}$  -50.4 ( $c$  0.5, MeOH); UV  $\lambda_{\max}$  (MeOH,  $\log \epsilon$ ): 219 (2.88), 266 (2.87) nm; IR (KBr)  $\nu_{\max}$ : 3380 (OH), 2881, 1490, 1463 1295, 1095 (aromatic -CH=CH-)  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz, MeOD)  $\delta$ : 7.41 (2H, dd,  $J$  = 1.2, 7.8 Hz, H-5, 9), 7.29 (2H, t,  $J$  = 7.8 Hz, H-6, 8), 7.18 (1H, m, H-7), 6.68 (1H, d,  $J$  = 15.9 Hz, H-3), 6.36 (1H, td,  $J$  = 6.0, 15.9 Hz, H-2), 4.51 (1H, dd,  $J$  = 5.7, 13.2 Hz, H-1), 4.37 (1H, d,  $J$  = 7.5 Hz, H-1'), 4.33 (1H, d,  $J$  = 6.6 Hz, H-1''), 4.10 (dt, 1H,  $J$  = 2.1, 11.4 Hz, H-5''a), 3.86 (1H, dd,  $J$  = 3.0, 12.4 Hz, H-6'a), 3.81-3.20 (9H, overlap, H-2', 3', 4', 5', 6' $\beta$ , 2'', 3'', 4'', 5'' $\beta$ );  $^{13}\text{C-NMR}$  (MeOD, 75 MHz)  $\delta$ : 138.3 (C-4), 133.9 (C-3), 129.6 (C-6, 8), 128.8 (C-7), 127.6 (C-5, 9), 126.8 (C-2), 105.3 (C-1''), 103.4 (C-1'), 78.0 (C-3'), 77.0 (C-5'), 75.1 (C'-2), 74.2 (C-3''), 72.4 (C-2''), 71.7 (C'-4), 71.0 (C-1), 69.6 (C-6'), 69.5 (C-4''), 66.8 (C-5''); ESIMS  $m/z$  451  $[M+Na]^+$ .



## 화합물 26

무색 분말로서, ESI-MS 스펙트럼에서  $m/z$  327  $[M - H]^-$ 에서 이온 피크가 관찰되었고, IR 스펙트럼에서  $3506, 3354\text{ cm}^{-1}$ 에서  $-OH$ 의 존재를,  $1735\text{ cm}^{-1}$ 에서  $C=O$ 의 존재를,  $1240, 1087\text{ cm}^{-1}$ 에서 aromatic ring의 존재를 확인하였다.  $^1H$ -NMR에서  $7.17 - 6.94\text{ ppm}$ 에서 4개의 aromatic proton을 확인할 수 있었으며,  $4.92 - 3.49\text{ ppm}$ 에서의 겹쳐진 신호들로부터 당의 존재를 확인할 수 있었다. 이상의 data를 기존 문헌<sup>25,26</sup>과 비교하여, dihydrocinnacasside로 동정하였다.

Colorless amorphous powder; mp  $174 - 175\text{ }^\circ\text{C}$ ;  $[\alpha]_D^{25} - 29.1$  ( $c$  0.4, MeOH); UV  $\lambda_{\text{max}}$  (MeOH, log  $\epsilon$ ):  $214$  (2.55) nm; IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$ :  $3506, 3354$  (OH),  $2900, 1735$  ( $C=O$ ),  $1240, 1087$  (aromatic  $-CH=CH-$ )  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1H$ -NMR (400 MHz, MeOD)  $\delta$ :  $7.17 - 7.15$  (3H, overlap, d,  $J = 7.2\text{ Hz}$ , H-4', 5', 6'),  $6.94$  (1H, dt,  $J = 2.8, 7.2\text{ Hz}$ , H-3'),  $2.97$  (2H, m, H-3),  $2.67$  (2H, t,  $J = 7.6\text{ Hz}$ , H-2), Glc:  $4.92$  (1H, d,  $J = 7.6\text{ Hz}$ , H-1''),  $3.89$  (1H, d,  $J = 12.0\text{ Hz}$ , H-6''a),  $3.71$  (1H, dd,  $J = 5.2, 12.0\text{ Hz}$ , H-6''b),  $3.51$  (1H, m, H-2''),  $3.42$  (1H, m, H-3''),  $3.41$  (1H, m, H-4''),  $3.49$  (1H, m, H-5'');  $^{13}C$ -NMR (100 MHz, MeOD)  $\delta$ :  $177.7$  (C-1),  $35.5$  (C-2),  $27.1$  (C-3),  $131.5$  (C-1'),  $157.1$  (C-2'),  $123.5$  (C-3'),  $128.8$  (C-4'),  $116.6$  (C-5'),  $131.1$  (C-6'), Glc:  $102.7$  (C-1''),  $75.1$  (C-2''),  $78.3$  (C-3''),  $71.5$  (C-4''),  $78.2$  (C-5''),  $62.6$  (C-6''); ESIMS  $m/z$  327  $[M - H]^-$ .

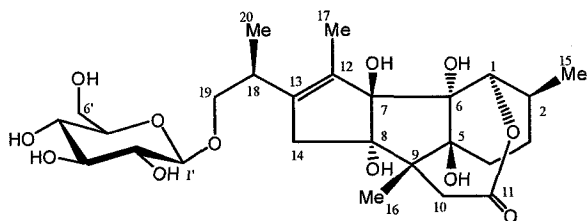


## 화합물 27

무색 분말로서, ESI-MS 스펙트럼에서  $m/z$  567  $[M - H]^-$ 에서 이온 피크가 관찰되었고, 선광도( $[\alpha]_D^{25}$ )는  $+16.5^\circ$ 이었다. IR 스펙트럼에서  $3354\text{ cm}^{-1}$ 에서  $-OH$ 의 존재를,  $1725\text{ cm}^{-1}$ 에서  $C=O$ 의 존재를,  $1240, 1087\text{ cm}^{-1}$ 에서 aromatic ring의 존재를 확인하였다.  $^1H$ -NMR에서  $4.04\text{ ppm}$ 에서 oxygenated methine proton을,  $1.09, 1.04, 1.78, 0.95\text{ ppm}$ 에서 4개의 methyl 기를 확인할 수 있었으며,  $4.24 - 3.17\text{ ppm}$ 에서의 겹쳐진 신호들로부터 당의 존재를 확인할 수 있었다.  $^{13}C$ -NMR과 DEPT 스펙트럼에서  $171.7\text{ ppm}$ 에서의 ester 기와  $137.3, 143.1\text{ ppm}$ 에서의 2개의 olefinic carbon과  $72.9, 73.7, 84.6, 89.3, 96.9, 93.0\text{ ppm}$ 에서의

oxygenated carbon을 포함한 총 26개의 피크를 확인할 수 있었다. 이상의 data를 기존 문헌<sup>28)</sup>과 비교하여, cinnacasside A로 동정하였다.

Colorless amorphous powder; mp 110 °C;  $[\alpha]_D^{25} +16.5$  (*c* 0.4, MeOH); UV  $\lambda_{\max}$  (MeOH, log  $\epsilon$ ): 213 (2.93) nm; IR (KBr)  $\nu_{\max}$ : 3354 (OH), 2900, 1725 (C=O), 1240, 1087 (-CH=CH-), 954, 751  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz, MeOD)  $\delta$ : 4.04 (1H, d,  $J = 10.2$  Hz, H-1), 1.80 (1H, m, H-2), 1.57 (2H, m, H-3), 1.52 (2H, m, H-4), 2.45 (2H, d,  $J = 19.5$  Hz, H-10), 2.68 (1H, d,  $J = 12.7$  Hz, H-14a), 2.18 (1H, d,  $J = 12.7$  Hz, H-14b), 1.09 (3H, d,  $J = 6.3$  Hz, H-15), 1.04 (3H, s, H-16), 1.78 (3H, s, H-17), 2.90 (1H, m, H-18), 3.47 (1H, t,  $J = 9.0$  Hz, H-19a), 3.86 (1H, overlap, H-19b), 0.95 (3H, d,  $J = 6.9$  Hz, H-20), Glc: 4.24 (1H, d,  $J = 7.8$  Hz, H-1'), 3.17 (1H, m, H-2'), 3.26 (1H, m, H-3'), 3.27 (1H, m, H-4'), 3.36 (1H, m, H-5'), 3.67 (1H, dd,  $J = 3.6, 11.7$  Hz, H-6'), 3.87 (1H, overlap, H-6');  $^{13}\text{C-NMR}$  (MeOD, 75 MHz)  $\delta$ : 72.9 (C-1), 35.1 (C-2), 28.9 (C-3), 26.5 (C-4), 84.6 (C-5), 93.0 (C-6), 96.9 (C-7), 89.3 (C-8), 48.3 (C-9), 40.8 (C-10), 171.7 (C-11), 137.3 (C-12), 143.1 (C-13), 37.2 (C-14), 18.9 (C-15), 13.7 (C-16), 12.3 (C-17), 34.4 (C-18), 73.7 (C-19), 14.9 (C-20), Glc: 104.5 (C-1'), 75.2 (C-2'), 78.0 (C-3'), 71.7 (C-4'), 78.1 (C-5'), 62.8 (C-6'); ESIMS  $m/z$  567  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ .



다. 타 연구팀에 제출 시료 목록

Comp. No.	화합물명	분리량 (mg)	제공량 (mg)			순도 (%)
			1차 2007.05.28	2차 2007.10.23	3차 2008.05.27	
1	Cinnamaldehyde	6000	700	3018	868	96.0
2	Eugenol	1600	100	750	572	97.0
3	2-methoxycinnamaldehyde	3000	500	386	1000	96.0
4	2-hydroxycinnamaldehyde	1200	400	462	160	97.0
5	Coumarin	5000	275	3012	750	99.0
6	Cinnamic acid	2000	350	1200	319	99.0
7	$\beta$ -sitosterol	400	180	150	-	98.0
8	Daucosterol	300	120	100	-	96.0
9	Coniferaldehyde	700	-	-	458	98.0
10	4-hydroxybenzoic acid	1000	-	-	948	99.0
11	Syringaldehyde	1000	-	-	800	98.0
12	Lyoniresinol-7a- $\beta$ -D-glucopyranoside	300	-	-	236	96.0

라. 계지의 70% 에탄올엑스 각 5종 이상 제조

계지는 중국에서 수입이 많이 되고 있으며, 경북, 강원도 및 전라도 지방에서 생산되기도 한다. 중국산은 서울 경동시장, 대구약령시장 및 금산생약시장에서 구입하였고, 국내산은 생산지를 방문하여 구입하였다. 이들 자료들을 약전(8개정) 규정대로 70% 에탄올로 추출하여 용매를 유거하고 표준엑스를 제조하여 효능 연구진에게 제공하였다.

(1) 계지로부터 70% 에탄올 엑스의 제조.

계지 (*Cinnamomi ramulus*)의 가는가지 500 g에 에탄올 (700 ml)와 물 (300 ml)의 혼합용매를 가하여 80 °C에서 2번 환류 추출한 후 여과하였다. 여과액을 40~45 °C에서 감압 농축하여 70% 에탄올 엑스 (32.5 g, 6.5%)를 얻었다.

마. 효능확인 연구를 위한 생리활성성분 대량 제조

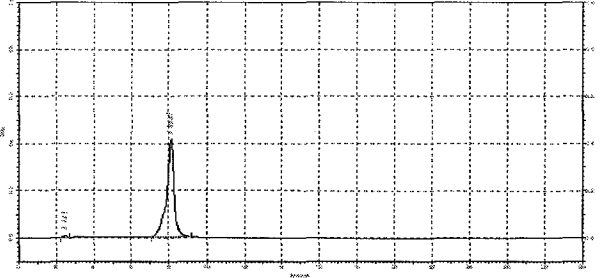
본 연구 과제는 3개의 주성분을 대량으로 분리하는 일과 생리활성이 검증된 물질을 10개 이상 하도록 되어 있다. 용매분획, 재결정, 또는 임계추출법 등을 이용하여 대량 분리법을 확립하여 다음 연구에 활용될 수 있도록 한다.

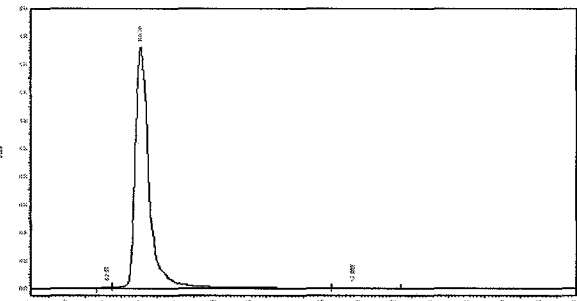


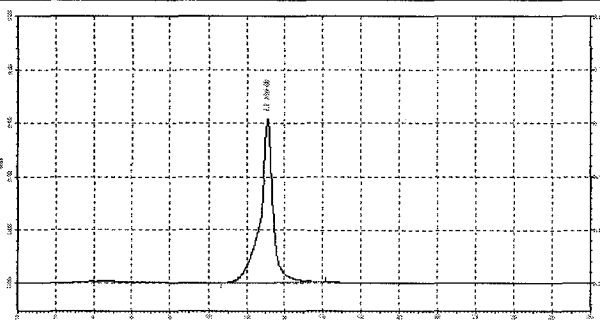
## 바. 식약청 제출 시료 목록

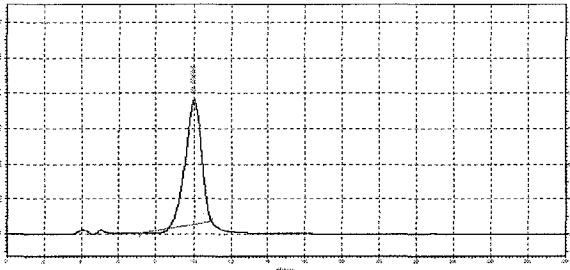
순번	화합물명	분리량(mg)	제출량(mg)	순도(%)
1	Cinnamaldehyde	6000	3018	98.0
2	Eugenol	1600	1210	96.0
3	2-methoxycinnamaldehyde	3000	1000	98.0
4	2-hydroxycinnamaldehyde	1200	462	95.0
5	Coumarin	5000	3012	96.0
6	Cinnamic acid	2000	1200	97.0
7	Coniferaldehyde	700	485	98.0
8	4-hydroxybenzoic acid	1020	800	98.0
9	Syringaldehyde	1012	800	98.0
10	Cinnamic alcohol	860	630	97.0
11	(+)-Lyoresinol-3a-O- $\beta$ -D-glucopyranoside	250	200	98.0
12	Rosavin	85	60	98.0
13	Dihyromelilotoside	15	3.5	98.2
14	(-)-Lyoresinol-3a-O- $\beta$ -D-glucopyranoside	12	2.8	96.4
15	Cinnacasside	20	5.0	98.7
16	O-coumaric acid	15	3.1	96.2
17	Methyl dihydromelilotoside ester	15	5.0	94.6
18	Iricaside DC	22	7.0	98.9

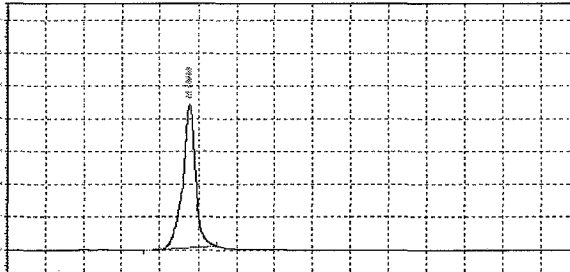
## 사. 식약청 제출 성분의 순도 성적서

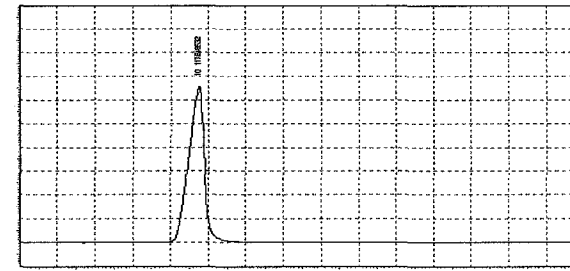
화합물명	<b>Cinnamaldehyde</b>		
제출량	3018 mg		
물성 Data	분자량 (M.W.)	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O(132)	
	용해도(solubility)	CHCl <sub>3</sub> , Ethyl acetate, Acetone, Acetonitril	
순도분석	크로마토그램	분석조건(condition)	순도
		-Column : Nova pack C18 (2.1 × 150 mm) -Mobile phase : ACN : H <sub>2</sub> O (45 : 55), -Flow rate : 0.5 ml/min, -Detector : UV(254 nm)	98.0

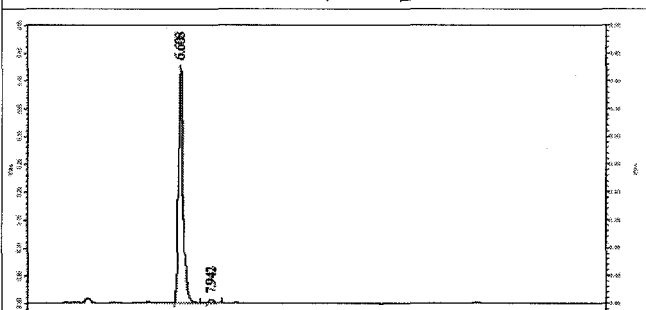
화합물명	<b>Eugenol</b>		
제출량	1210 mg		
물성 Data	분자량 (M.W.)	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub> (164)	
	용해도(solubility)	CHCl <sub>3</sub> , Ethyl acetate, Acetone, Acetonitril	
순도분석	크로마토그램	분석조건(condition)	순도
		-Column : Nova pack C18 (2.1 × 150 mm) -Mobile phase : ACN : H <sub>2</sub> O (65 : 35), -Flow rate : 0.5 ml/min, -Detector : UV(254 nm)	96.0

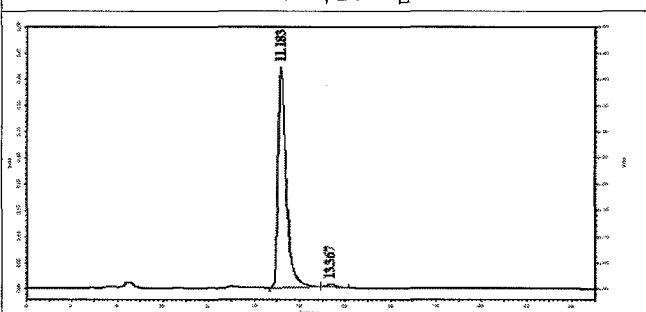
화합물명	<b>2-methoxycinnamaldehyde</b>		
제출량	1000 mg		
물성 Data	분자량 (M.W.)	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub> (162)	
	용해도(solubility)	CHCl <sub>3</sub> , Ethyl acetate, Acetone, Acetonitril	
순도분석	크로마토그램	분석조건(condition)	순도
		-Column : Nova pack C18 (2.1 × 150 mm) -Mobile phase : ACN : H <sub>2</sub> O (45 : 55), -Flow rate : 0.5 ml/min, -Detector : UV(254 nm)	98.0

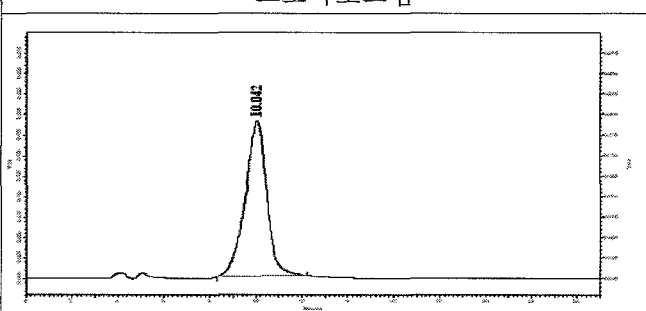
화합물명	<b>2-hydroxycinnamaldehyde</b>		
제출량	462 mg		
물성 Data	분자량 (M.W.)	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub> (148)	
	용해도(solubility)	CHCl <sub>3</sub> , Ethyl acetate, Acetone, Acetonitril	
순도분석	크로마토그램	분석조건(condition)	순도
		-Column : Nova pack C18 (2.1 × 150 mm) -Mobile phase : ACN : H <sub>2</sub> O (65 : 35), -Flow rate : 0.4 ml/min, -Detector : UV(254 nm)	95.0

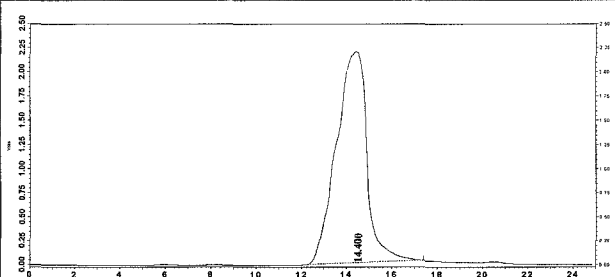
화합물명	<b>Coumarin</b>		
제출량	3012 mg		
물성 Data	분자량 (M.W.)	C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> (146)	
	용해도(solubility)	CHCl <sub>3</sub> , Ethyl acetate, Acetone, Acetonitril	
순도분석	크로마토그램	분석조건(condition)	순도
		-Column : Nova pack C18 (2.1 × 150 mm) -Mobile phase : ACN : H <sub>2</sub> O (65 : 35), -Flow rate : 0.5 ml/min, -Detector : UV(254 nm)	96.0

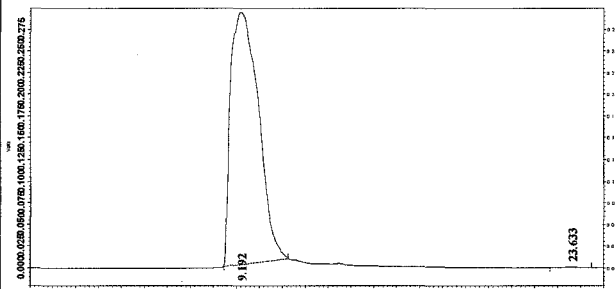
화합물명	<b>Cinnamic acid</b>		
제출량	1200 mg		
물성 Data	분자량 (M.W.)	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub> (148)	
	용해도(solubility)	CHCl <sub>3</sub> , Ethyl acetate, Acetone, Acetonitril	
순도분석	크로마토그램	분석조건(condition)	순도
		-Column : Nova pack C18 (2.1 × 150 mm) -Mobile phase : ACN : H <sub>2</sub> O (65 : 35), -Flow rate : 0.4 ml/min, -Detector : UV(254 nm)	97.0

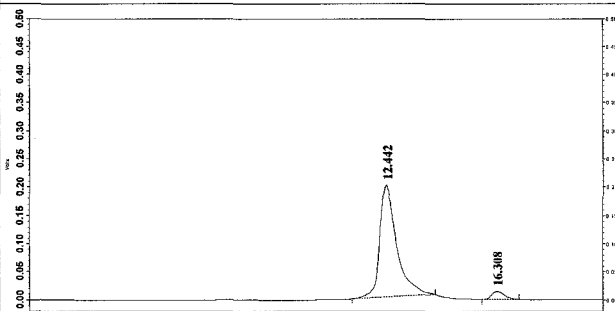
화합물명	<b>Coniferaldehyde</b>		
제출량	485 mg		
물성 Data	분자량 (M.W.)	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub> (178)	
	용해도(solubility)	CHCl <sub>3</sub> , Ethyl acetate, Acetone, Acetonitril	
순도분석	크로마토그램		순도
			분석조건(condition) -Column : Nova pack C18 (2.1 × 150 mm) -Mobile phase : ACN : H <sub>2</sub> O (55 : 45), -Flow rate : 0.5 ml/min, -Detector : UV(254 nm)
			98.0

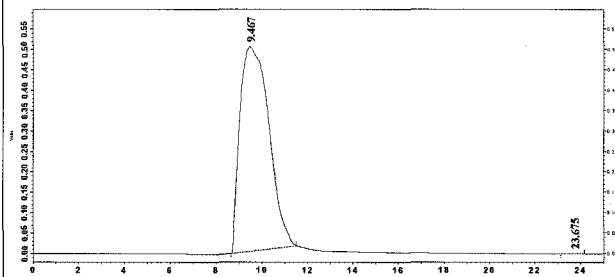
화합물명	<b>Syringaldehyde</b>		
제출량	800 mg		
물성 Data	분자량 (M.W.)	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub> (182)	
	용해도(solubility)	CHCl <sub>3</sub> , Ethyl acetate, Acetone, Acetonitril	
순도분석	크로마토그램		순도
			분석조건(condition) -Column : Nova pack C18 (2.1 × 150 mm) -Mobile phase : ACN : H <sub>2</sub> O (50 : 50), -Flow rate : 0.4 ml/min, -Detector : UV(254 nm)
			98.0

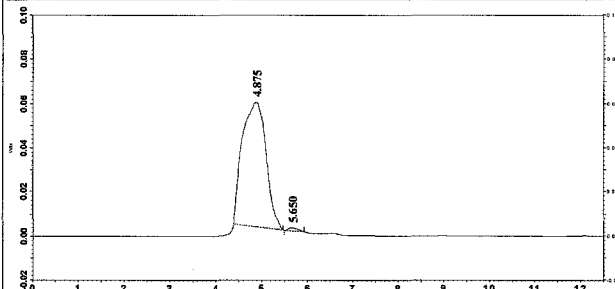
화합물명	<b>4-hydroxy benzoic acid</b>		
제출량	800 mg		
물성 Data	분자량 (M.W.)	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> (138)	
	용해도(solubility)	CHCl <sub>3</sub> , Ethyl acetate, Acetone, Acetonitril	
순도분석	크로마토그램		순도
			분석조건(condition) -Column : Nova pack C18 (2.1 × 150 mm) -Mobile phase : ACN : H <sub>2</sub> O (45 : 55), -Flow rate : 0.5 ml/min, -Detector : UV(254 nm)
			98.0

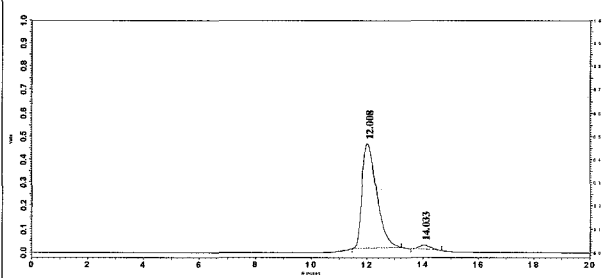
화합물명	<b>Cinnamic alcohol</b>		
제출량	630 mg		
물성 Data	분자량 (M.W.)	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O (134)	
	용해도(solubility)	CHCl <sub>3</sub> , Ethyl acetate, Acetone, Acetonitril	
순도분석	크로마토그램	분석조건(condition)	순도
		-Column : Nova pack C18 (2.1 × 150 mm) -Mobile phase : ACN : H <sub>2</sub> O (45 : 55), -Flow rate : 0.5 ml/min, -Detector : UV(254 nm)	97.0

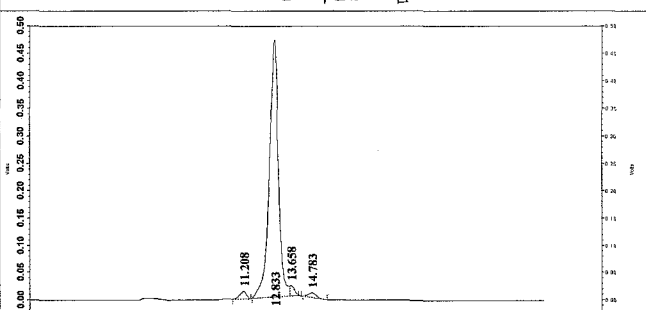
화합물명	<b>(+)-Lyoniresinol-3a-O-β-D-glucopyranoside</b>		
제출량	200 mg		
물성 Data	분자량 (M.W.)	C <sub>28</sub> H <sub>38</sub> O <sub>13</sub> (582)	
	용해도(solubility)	MeOH, H <sub>2</sub> O, Acetonitril, DMSO	
순도분석	크로마토그램	분석조건(condition)	순도
		-Column : Nova pack C18 (2.1 × 150 mm) -Mobile phase : ACN : H <sub>2</sub> O (50 : 50), -Flow rate : 0.5 ml/min, -Detector : UV(254 nm)	98.0

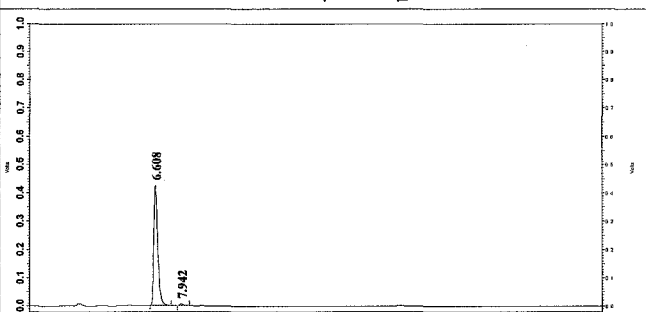
화합물명	<b>(-)-Lyoniresinol-3a-O-β-D-glucopyranoside</b>		
제출량	2.8 mg		
물성 Data	분자량 (M.W.)	C <sub>28</sub> H <sub>38</sub> O <sub>13</sub> (582)	
	용해도(solubility)	MeOH, H <sub>2</sub> O, Acetonitril, DMSO	
순도분석	크로마토그램	분석조건(condition)	순도
		-Column : Nova pack C18 (2.1 × 150 mm) -Mobile phase : ACN : H <sub>2</sub> O (50 : 50), -Flow rate : 0.25 ml/min, -Detector : UV(254 nm)	96.4

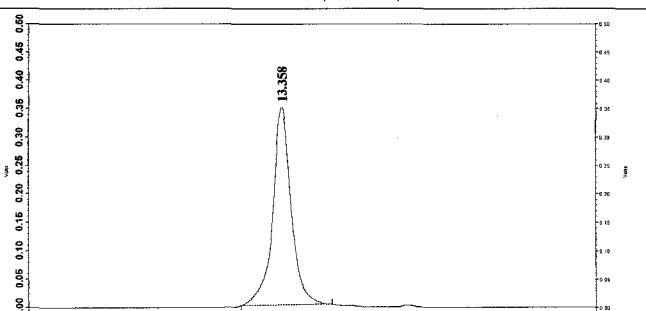
화합물명	<b>Rosavin</b>		
제출량	60 mg		
물성 Data	분자량 (M.W.)	C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O <sub>10</sub> (428)	
	용해도(solubility)	MeOH, H <sub>2</sub> O, Acetonitril, DMSO	
순도분석	크로마토그램	분석조건(condition)	순도
		-Column : Nova pack C18 (2.1 × 150 mm) -Mobile phase : ACN : H <sub>2</sub> O (50 : 50), -Flow rate : 0.25 ml/min, -Detector : UV(254 nm)	98.0

화합물명	<b>Cinnacasside</b>		
제출량	5.0 mg		
물성 Data	분자량 (M.W.)	C <sub>26</sub> H <sub>40</sub> O <sub>12</sub> (544)	
	용해도(solubility)	MeOH, H <sub>2</sub> O, Acetonitril, DMSO	
순도분석	크로마토그램	분석조건(condition)	순도
		-Column : Nova pack C18 (2.1 × 150 mm) -Mobile phase : ACN : H <sub>2</sub> O (50 : 50), -Flow rate : 0.25 ml/min, -Detector : UV(254 nm)	98.7

화합물명	<b>Dihydromelilotoside</b>		
제출량	3.5 mg		
물성 Data	분자량 (M.W.)	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O <sub>8</sub> (328)	
	용해도(solubility)	MeOH, DMSO	
순도분석	크로마토그램	분석조건(condition)	순도
		-Column : Nova pack C18 (2.1 × 150 mm) -Mobile phase : ACN : H <sub>2</sub> O (50 : 50), -Flow rate : 0.25 ml/min, -Detector : UV(254 nm)	98.2

화합물명	<b>Methyl dihydromelilotoside ester</b>		
제출량	5.0 mg		
물성 Data	분자량 (M.W.)	$C_{16}H_{22}O_8$ (342)	
	용해도(solubility)	MeOH, DMSO	
순도분석	크로마토그램	분석조건(condition)	순도
		-Column : Nova pack C18 (2.1 × 150 mm) -Mobile phase : ACN : H <sub>2</sub> O (50 : 50), -Flow rate : 0.25 ml/min, -Detector : UV(254 nm)	94.6

화합물명	<b>O-coumaric acid</b>		
제출량	3.1 mg		
물성 Data	분자량 (M.W.)	$C_9H_8O_3$ (164)	
	용해도(solubility)	MeOH, DMSO	
순도분석	크로마토그램	분석조건(condition)	순도
		-Column : Nova pack C18 (2.1 × 150 mm) -Mobile phase : ACN : H <sub>2</sub> O (50 : 50), -Flow rate : 0.25 ml/min, -Detector : UV(254 nm)	96.2

화합물명	<b>Iricaside DC</b>		
제출량	7.0 mg		
물성 Data	분자량 (M.W.)	$C_{19}H_{28}O_{10}$ (416)	
	용해도(solubility)	MeOH, DMSO	
순도분석	크로마토그램	분석조건(condition)	순도
		-Column : Nova pack C18 (2.1 × 150 mm) -Mobile phase : ACN : H <sub>2</sub> O (50 : 50), -Flow rate : 0.25 ml/min, -Detector : UV(254 nm)	98.9

## 2. 목단피로부터 생리활성물질 분리

### 가. 추출 및 분리

목단피 20 kg에 메탄올 가하여 80 °C에서 3번 환류 추출한 후 여과하였다. 여과액을 40-50°C에서 감압 농축하여 총 추출물 3 kg을 얻었다. 이 추출액을 헥산과 증류수로 현탁 시킨 후 헥산 층을 감압 농축한 결과 헥산 가용부 400 g을 얻었다. 잔류 물 층을 에틸아세테이트와 부탄올로 추출하여 에틸아세테이트 가용부 600 g과 부탄올 가용부 200 g 얻었다.

헥산 가용부를 헥산/에틸에테르 혼합용매를 용출용매로 사용하여 기울기 용리 방식으로 실리카겔 (70-230mesh) 컬럼 크로마토그래피를 실시하여 compound 1 (32000 mg) 과 Fr.1-7 등 7개의 소 분획으로 나누었다. 이 중 Fr.1을 헥산/에틸아세테이트 혼합용매를 사용하여 실리카겔 (70-230mesh) 컬럼 크로마토그래피를 실시하여 compound 2 (200 mg)를 분리하였다. Fr. 4를 헥산/에틸아세테이트 혼합용매를 사용하여 기울기 용리 방식으로 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 실시하여 Fr.4.1-4.8등 8개의 소 분획으로 나누었다. 이 중 Fr.4.1을 농축하고 다세 역상 컬럼 크로마토그래피를 실시하여 compound 3 (300 mg)과 4 (200 mg)를 분리하였다. Fr.4.4는 실리카겔 컬럼 크로마토그래피에서 헥산/에틸아세테이트 사용하여 compound 5 (110 mg), 6 (240 mg), 7 (110 mg)을 정제하였다.

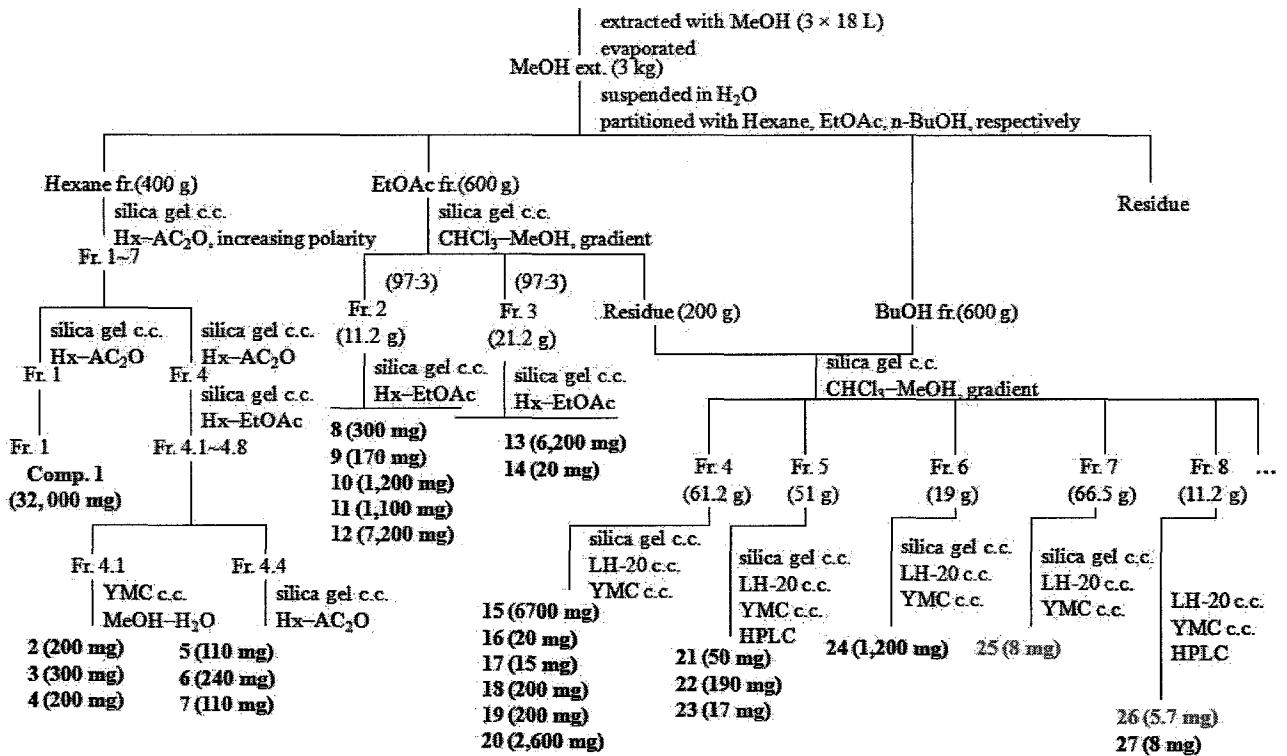
에틸아세테이트 가용부를 클로로포름/메탄올 (97:3) 혼합용매를 용출용매로 사용하여 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 실시하여 Fr.1-4등 4개 소 분획으로 나누었다. 이 중 Fr. 2 분획을 클로로포름/메탄올 (97:3) 혼합용매를 용출용매로 사용하여 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 실시하여 Fr. 2.1-2.5등 5개 소 분획으로 나누었다. Fr. 2.3 분획은 실리카겔 컬럼 크로마토그래피에서 헥산/에틸아세테이트 (5:1)을 이용하여 정제하여 compound 8 (300 mg), 9 (170 mg), 10 (1.2 g)을 분리하였다. Fr. 2.5 분획은 실리카겔 컬럼 크로마토그래피에서 헥산/에틸아세테이트 (4:1)을 이용하여 정제하여 compound 11 (1100 mg), 12 (7200 mg)을 분리하였다. Fr. 3 분획은 LH-20, YMC gel을 사용하여 compound 13 (2.1 g)을 분리하였다. 이 중 Fr. 3 분획을 클로로포름/메탄올 (97:3) 혼합용매를 용출용매로 사용하여 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 실시하여 Fr. 3.1-3.6 등 6개 소 분획으로 나누었다. Fr. 3.2 분획은 실리카겔 컬럼 크로마토그래피에서 헥산/에틸아세테이트 (4:1)을 이용하여 정제하여 compound 13 (6200 mg), 14 (170 mg)을 분리하였다.

부탄올 가용부 200 g 과 에틸아세테이트 가용부를 클로로포름/메탄올 (97:3) 혼합용매를 용출용매로 사용하여 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 실시하여 분리된 Fr.4 (121 g) 분획을 모아 클로로포름/메탄올 혼합용매를 용출용매로 사용하여 기울기 용리 방식으로 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 실시하여 Fr. 1-7등 7개 소분획으로 나누었다. 이 중 Fr. 4 (8 g)을 메탄올/물 (1.5:1)용출액으로 sephadex LH-20 컬럼 크로마토그래피를 실시하여 compound 15 (6700 mg), 16 (20 mg), 17 (15 mg), 18 (200 mg), 19 (200 mg), 20 (2600 mg) 을 분리하였다. Fr. 5 (51 g)을 클로로포름/메탄올/물 (14:1:0.1) 용출액으로 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 실시하여 다시 YMC 컬럼 크로마토그래피에서 메탄올/물 (2:1)을 이용하



여 정제하여 compound 21 (50 mg), 22(190 mg), 23 (17 mg) 을 분리하였다. Fr. 6 (37 g)을 클로로포름/메탄올/물 (9:1:0.1)용출액으로 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 실시하여 다시 YMC 컬럼 크로마토그래피에서 메탄올/물 (1:1)을 이용하여 정제하여 compound 24 (1200 mg), 25 (3.1 mg), 26 (10 mg)을 분리하였다. Fr. 7 (66.5 g)을 클로로포름/메탄올/물 (6:1:0.1) 용출액으로 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 실시하여 다시 YMC 컬럼 크로마토그래피에서 메탄올/물 (1.5:1)을 이용하여 정제하여 compound 27 (72 mg)을 분리하였다 (그림 1). 분리한 화합물들의 구조는 그림 2와 같다.

### Moutan Cortex Radicis (20 kg)



### Extraction and Isolation Scheme

그림 1. 목단피로부터 추출 및 성분 분리 도표

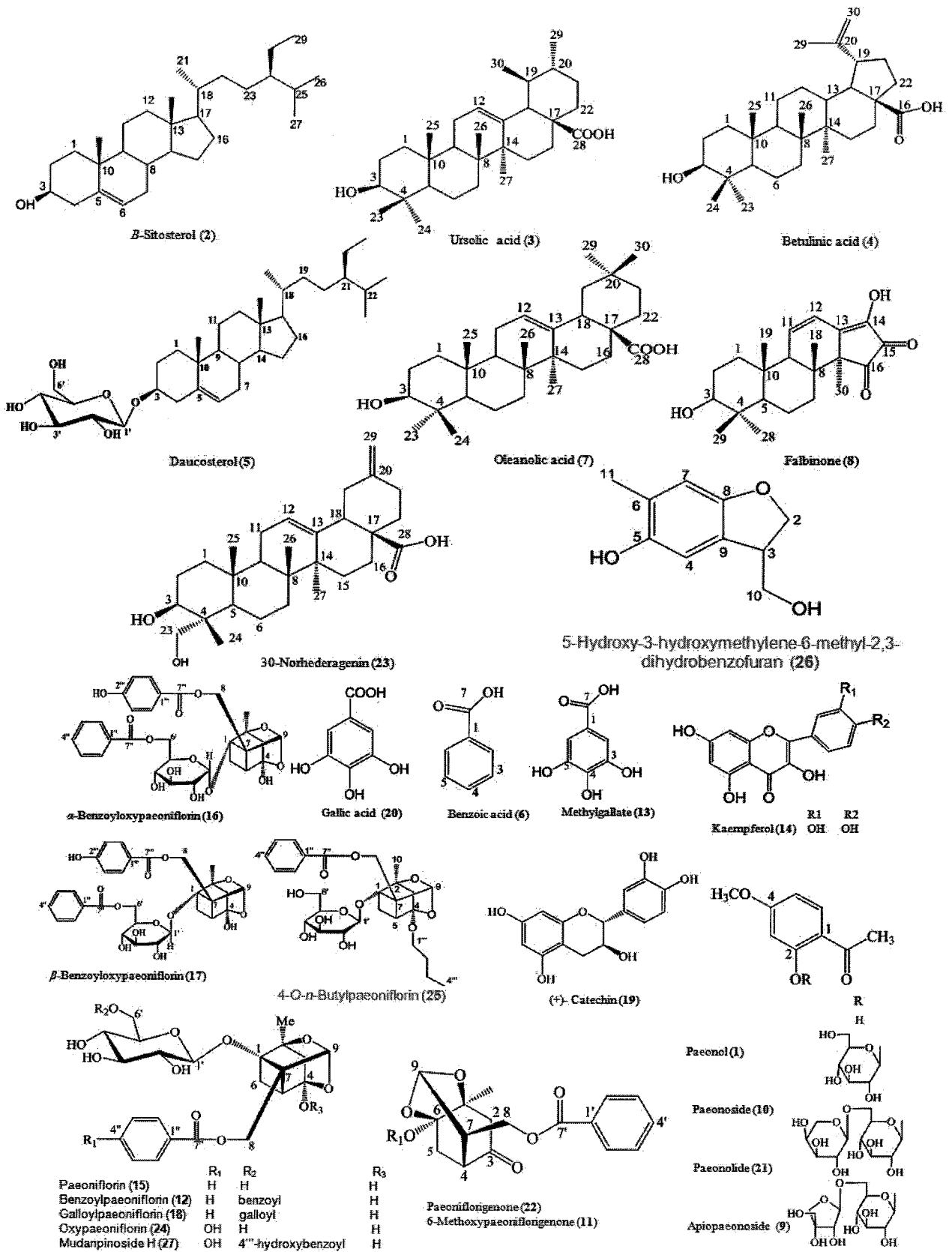


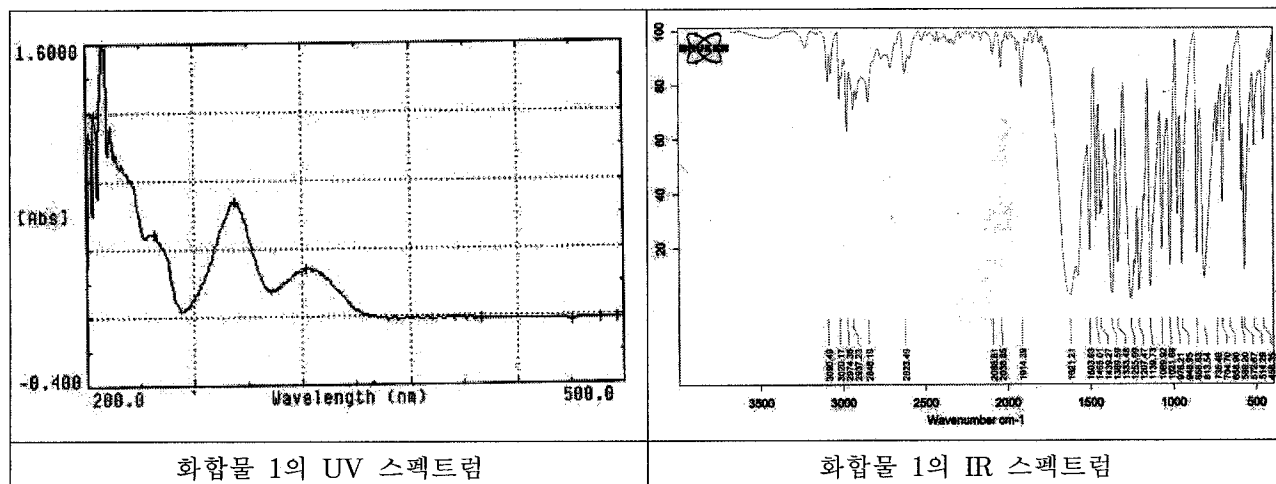
그림 2. 분리한 목단피 성분들의 화학구조

## 나. 목단피에서 분리한 물질의 구조분석

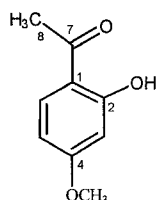
분리한 화합물의 용점은 Electrothermal apparatus를 사용하여 측정하였고, 선광도는 JASCO DIP-370 digital polarimeter를 이용하여 측정하였다. UV 스펙트럼은 JASCO V-550 UV/VISspectrometer를 이용하여 측정하였으며, IR 스펙트럼은 JASCO 100 IR spectrometer를 이용하여 측정하였다. Mass 스펙트럼은 JEOL JMS-DX 300을 이용하여 측정하였으며,  $^1\text{H}$  NMR과  $^{13}\text{C}$  NMR 스펙트럼은 Bruker DRX-300 spectrometer를 이용하여 측정하였다.

### 화합물 1

무색의 결정으로, ESIMS 스펙트럼에서  $m/z$  189  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 에서 이온 피크가 관찰되었다. IR 스펙트럼에서는  $3020\text{ cm}^{-1}$ 에서 -OH기,  $1701\text{ cm}^{-1}$ 에서는 C=O group,  $1621, 1439\text{ cm}^{-1}$ 에서 aromatic ring의 존재를 확인하였다.  $^1\text{H}$ -NMR에서 7.57 - 6.35 ppm에서 3개의 aromatic proton을, 2.50 ppm에서 1개의 methyl 기를, 3.78 ppm에서 1개의 methoxy 기를 확인하였다.  $^{13}\text{C}$ -NMR에서는 202.6 ppm에서의 ketone 기, 166.1 - 100.9 ppm에서 6개의 aromatic carbon을 포함한 총 9개의 피크를 확인하였다. 이상의 data는 기존문헌<sup>29,30</sup>에서 보고한 것과 동일하였으므로, paeonol로 동정하였다.

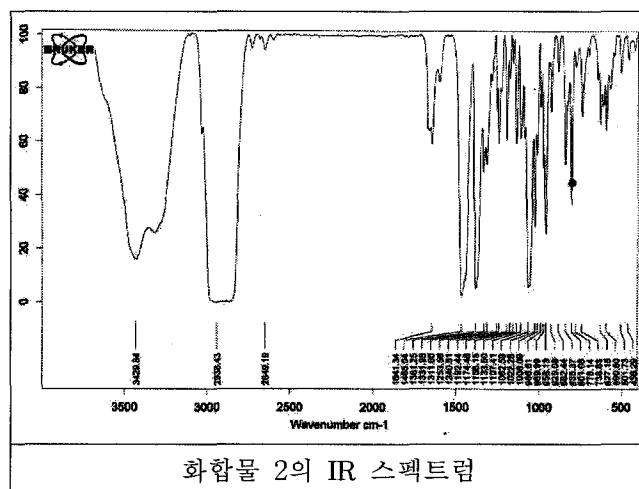


White crystal. mp 52 - 54 °C; IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$ : 3020 (OH), 2623 (C-H), 1701 (C=O) 1621, 1439 (C=C), 1333 (C-O)  $\text{cm}^{-1}$  UV (MeOH, 0.02): 205 (3.9), 210 (4.1), 238 (3.6), 283 (3.7), 322 (3.4) nm;  $^1\text{H}$ -NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 2.50 (3H, s, H-8), 3.78 (3H, s), 6.35 (1H, d,  $J = 2.4$  Hz, H-3), 6.38 (1H, dd,  $J = 8.4, 2.4$  Hz, H-5), 7.57 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-6);  $^{13}\text{C}$ -NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 26.2 (C-8), 55.6 ( $\text{OCH}_3$ ), 100.9 (C-3), 107.5 (C-5), 113.9 (C-1), 132.4 (C-6), 165.3 (C-2), 166.1 (C-4), 202.6 (C-7); ESIMS  $m/z$ : 189.3  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ , 165.3  $[\text{M} - \text{H}]^-$

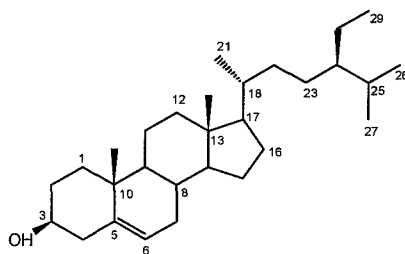


## 화합물 2

백색의 결정으로, ESIMS 스펙트럼에서  $m/z$  437  $[M + Na]^+$ 에서 이온 피크가 관찰되었다. IR 스펙트럼에서는  $3400\text{ cm}^{-1}$ 에서 -OH기의 존재를,  $1460\text{ cm}^{-1}$ 에서 olefinic group의 존재를 확인하였다.  $^1\text{H-NMR}$ 에서 1.10 - 0.81 ppm에서의 특징적인 6개의 methyl기로부터 sterol 구조를 예상할 수 있었으며, 5.35 ppm에서 olefinic proton, 3.53 ppm에서 oxygenated methine proton의 존재를 확인하였다.  $^{13}\text{C-NMR}$ 에서는 총 29개의 피크를 확인할 수 있었다. 이상의 data는 기존문헌<sup>31,32</sup>에서 보고한 것과 동일 하였으므로,  $\beta$ -Sitosterol로 동정하였다.

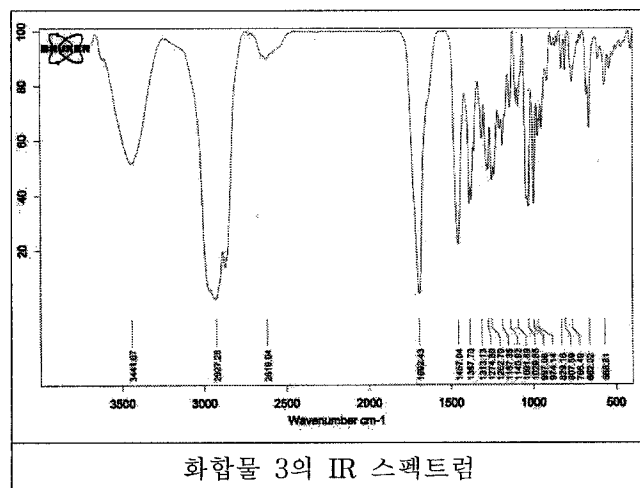


White needles. mp 137 - 139 °C; UV  $\lambda_{\text{max}}(\text{CHCl}_3)$  216 nm; IR (KBr)  $\text{max}$ : 3400 (OH), 2938, 1460 (olefinic C=C), 1380, 1060  $\text{cm}^{-1}$   $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 5.35 (1H, brd, H-6), 3.53 (1H, m, H-3), 1.01 (3H, s, H-19), 0.69 (3H, s, H-20), 0.92 (3H, d,  $J = 6.8$  Hz, H-21), 0.83 (3H, d,  $J = 1.6$  Hz, H-26), 0.81 (3H, br s, H-27), 0.85 (3H, br s, H-29);  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 37.2 (C-1), 31.6 (C-2), 71.7 (C-3), 42.2 (C-4), 140.7 (C-5), 121.7 (C-6), 31.8 (C-7), 31.9 (C-8), 50.0 (C-9), 36.4 (C-10), 21.0 (C-11), 39.7 (C-12), 42.2 (C-13), 56.7 (C-14), 24.3 (C-15), 28.2 (C-16), 55.9 (C-17), 11.8 (C-18), 19.4 (C-19), 36.1 (C-20), 18.7 (C-21), 33.9 (C-22), 25.9 (C-23), 45.8 (C-24), 29.1 (C-25), 19.8 (C-26), 18.9 (C-27), 23.0 (C-28), 11.0 (C-29); ESIMS  $m/z$  437  $[M + Na]^+$ .

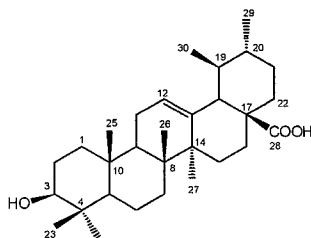


### 화합물 3

백색의 분말로서, ESIMS 스펙트럼에서  $m/z$  455  $[M - H]^-$ 에서 이온 피크가 관찰되었다. IR 스펙트럼에서는  $3441\text{ cm}^{-1}$ 에서 -OH기의 존재를,  $1692\text{ cm}^{-1}$ 에서는 C=O group의 존재를,  $1457\text{ cm}^{-1}$ 에서 olefinic group의 존재를 확인하였다.  $^1\text{H-NMR}$ 에서 1.02 - 1.24 ppm에서의 특징적인 7개의 methyl 기로부터 triterpene 구조를 예상할 수 있었으며, 5.51 ppm에서 olefinic proton, 3.44 ppm에서 oxygenated methine proton의 존재를 확인하였다.  $^{13}\text{C-NMR}$ 에서는 180.3 ppm에서의 COOH, 126.1, 139.7 ppm에서의 olefinic carbon을 포함한 총 30개의 피크를 확인할 수 있었다. 이상의 data는 기존문헌<sup>33)</sup>에서 보고한 것과 동일하였으므로, usoric acid로 동정하였다.

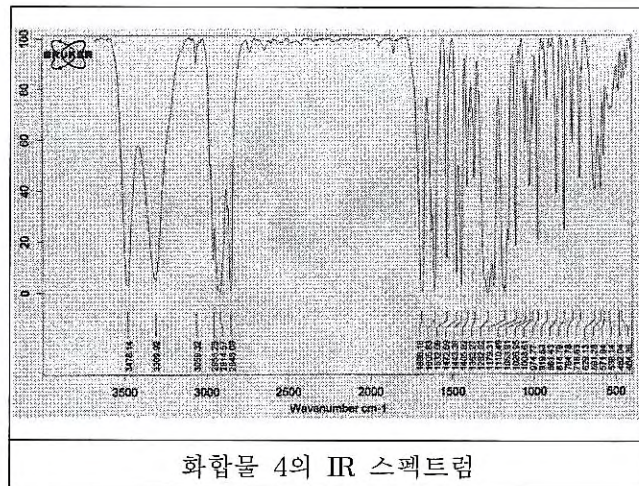


Colorless amorphous powder. mp 259 - 231 °C; IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$ : 3441 (OH), 2927, 2619 (C-H), 1692 (C=O), 1457 (olefinic C=C), 1029 (C-O)  $\text{cm}^{-1}$   $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz, pyridine- $d_5$ )  $\delta$ : 0.88 (1H, d, H-5), 0.93 (3H, s, H-25), 0.97 (3H, s, H-30), 1.00 (1H, m, H-1a), 1.02 (6H, s, H-24, 29), 1.06 (1H, m, H-19b, 26), 1.22 (1H, m, H-15a), 1.24 (6H, s, H-23, 27), 1.39 (1H, m, H-6b, 7b), 1.40 (1H, m, H-21a), 1.49 (1H, H-19a, 21b), 1.58 (1H, m, H-1b), 1.81 (2H, m, H-2a, 2b), 1.58 (1H, m, H-6a), 1.59 (1H, m, H-7a), 1.65 (1H, t, H-9), 1.96 (2H, m, H-11a, 11b), 1.97 (2H, m, H-22a, 22b), 2.01 (1H, m, H-16b), 2.14 (1H, t, H-16a), 2.35 (1H, m, H-15b), 2.65 (1H, d,  $J = 11.1\text{ Hz}$ , H-18), 3.44 (1H, t,  $J = 6.9\text{ Hz}$ , H-3), 5.51 (1H, br s, H-12);  $^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz, pyridine -  $d_5$ )  $\delta$ : 16.1 (C-25), 16.9 (C-24), 17.8 (C-29), 17.9 (C-26), 19.2 (C-6), 21.8 (C-30), 24.0 (C-11), 24.3 (C-27), 25.3 (C-16), 28.5 (C-2), 29.1 (C-15), 29.2 (C-23), 31.5 (C-21), 33.9 (C-7), 37.7 (C-10), 37.9 (C-22), 39.5 (C-1) 39.7 (C-4), 39.8 (C-19), 39.9 (C-20), 40.3 (C-8), 42.9 (C-14), 48.5 (C-9, 17), 54.0 (C-18), 65.2 (C-5), 78.5 (C-3), 126.1 (C-12), 139.7 (C-13), 180.3 (C-28); ESIMS  $m/z$ : 455  $[M - H]^-$ .

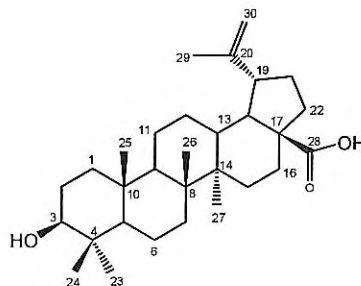


#### 화합물 4

무색의 분말로서, IR 스펙트럼에서는  $3309\text{ cm}^{-1}$ 에서 -OH기의 존재를,  $1692\text{ cm}^{-1}$ 에서는 C=O group의 존재를,  $1421\text{ cm}^{-1}$ 에서 olefinic group의 존재를 확인하였다.  $^1\text{H-NMR}$ 에서 0.71 - 1.69 ppm에서의 특징적인 6개의 methyl 기로부터 triterpene 구조를 예상할 수 있었으며, 4.55, 4.68 ppm에서 olefinic proton, 3.12 ppm에서 oxygenated methine proton의 존재를 확인하였다.  $^{13}\text{C-NMR}$ 에서는 177.6 ppm에서의 COOH, 109.9, 151.2 ppm에서의 olefinic carbon을 포함한 총 30개의 피크를 확인할 수 있었다. 이상의 data는 기존문헌<sup>34)</sup>에서 보고한 것과 동일하였으므로, betulinic acid로 동정하였다.

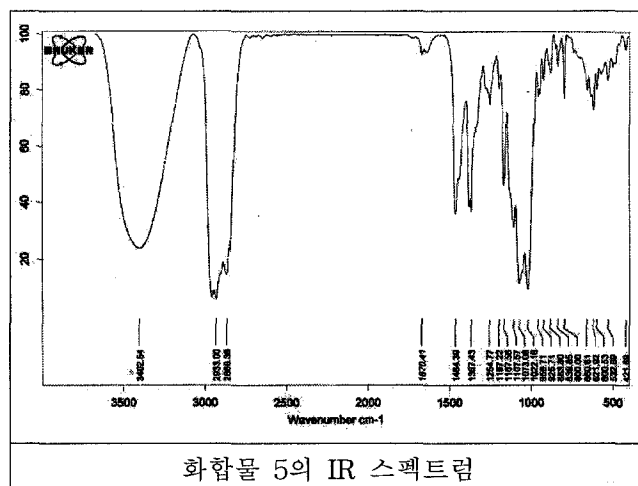


Colorless amorphous powder. mp  $290 - 292\text{ }^\circ\text{C}$ ; IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$ : 3309 (OH), 2955 (olefinic C=C), 2848 (C-H), 1686 (C=O), 1605, 1421 (C=C), 1179,  $1008\text{ cm}^{-1}$  UV (MeOH, 0.02)  $\lambda_{\text{max}}$ : 200 (4.0), 219 (4.3), 226 (4.4), 255 (4.1), 300 (4.2), 337 (4.4), 350 (4.3) nm;  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz, MeOD +  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 0.71 (3H, s, H-25), 0.79 (3H, s, H-23), 0.91 (3H, s, H-26), 0.91 (3H, s, H-27), 0.94 (3H, s, H-24), 1.69 (3H, s, H-29), 1.89 (2H, m, H-22), 2.22 (2H, m, H-16), 2.97 (1H, m, H-19), 3.12 (1H, t, H-3), 4.55 (1H, s, H-30a), 4.68 (1H, s, H-30b);  $^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz, MeOD +  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 15.1 (C-27), 15.8 (C-26), 16.3 (C-25), 16.5 (C-24), 18.8 (C-6), 19.6 (C-29), 21.4 (C-11), 26.1 (C-12), 27.4 (C-2), 28.3 (C-23), 30.2 (C-15), 31.1 (C-21), 32.8 (C-16), 34.9 (C-7), 37.6 (C-22), 37.8 (C-10), 38.8 (C-13), 39.3 (C-4), 39.4 (C-1), 41.2 (C-8), 42.9 (C-14), (C-19), 49.7 (C-18), 51.1 (C-9), 55.9 (C-5), 56.7 (C-17), 79.2 (C-3), 109.9 (C-30), 151.2 (C-20), 177.6 (C-28).

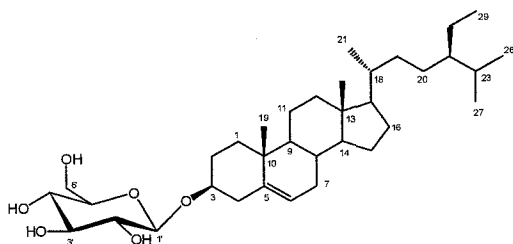


## 화합물 5

백색의 분말로서, IR 스펙트럼에서 3400 cm<sup>-1</sup>에서 -OH기의 존재를, 1460 cm<sup>-1</sup>에서 olefinic group의 존재를 확인하였다. <sup>1</sup>H-NMR에서 1.01 - 0.85 ppm에서의 특징적인 6개의 methyl기와, 5.35 ppm에서 olefinic proton, 3.53 ppm에서 oxygenated methine 및 5.07 - 3.97 ppm에서의 특징적인 피크로부터 β-D-glucose를 aglycone으로 한 배당체임을 확인할 수 있었다. 이상의 data는 기존문헌<sup>35)</sup>에서 보고한 과 동일하였으므로, daucosterol로 동정하였다.

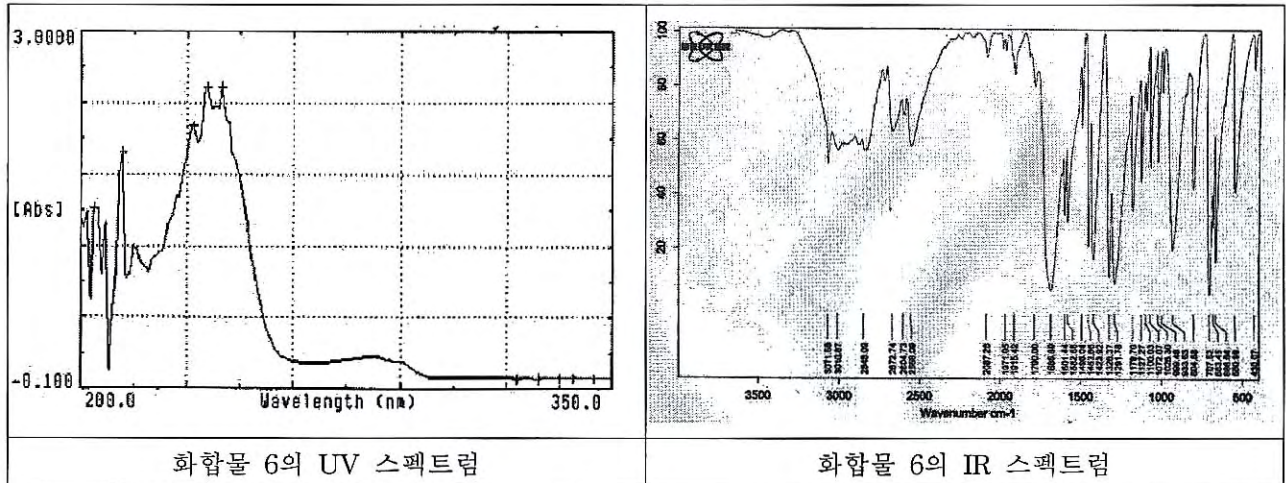


White powder. mp 290 - 294 °C;  $[\alpha]_D^{23}$  -28.5° (*c* 0.4, CHCl<sub>3</sub>); UV (CHCl<sub>3</sub>)  $\lambda_{\max}$  244, 276 nm; IR (KBr)  $\max$ : 3400 (OH), 2950, 1460 (olefinic C=C), 1380, 1060 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, Pyridine-*d*<sub>5</sub>)  $\delta$ : 5.35 (1H, br d, H-6), 3.53 (1H, m, H-3), 1.01 (3H, s, H-19), 0.69 (3H, s, H-20), 0.92 (3H, d, *J* = 6.8 Hz, H-21), 0.83 (3H, d, *J* = 1.6 Hz, H-26), 0.81 (3H, br s, H-27), 0.85 (3H, brs, H-29), Glu: 5.07 (1H, d, *J* = 7.2 Hz, H-1'), 4.59 (1H, dd, *J* = 2.4, 11.7 Hz, H-6'), 4.43 (1H, dd, *J* = 5.7, 11.7 Hz, H-6'), 4.30 (2H, m, H-3', 5'), 4.06 (1H, m, H-4'), 3.97 (1H, m, H-2'); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, Pyridine-*d*<sub>5</sub>)  $\delta$ : 37.2 (C-1), 31.6 (C-2), 71.7 (C-3), 42.2 (C-4), 140.7 (C-5), 121.7 (C-6), 31.8 (C-7), 31.9 (C-8), 50.0 (C-9), 36.4 (C-10), 21.0 (C-11), 39.7 (C-12), 42.2 (C-13), 56.7 (C-14), 24.3 (C-15), 28.2 (C-16), 55.9 (C-17), 11.8 (C-18), 19.4 (C-19), 36.1 (C-20), 18.7 (C-21), 33.9 (C-22), 25.9 (C-23), 45.8 (C-24), 29.1 (C-25), 19.8 (C-26), 18.9 (C-27), 23.0 (C-28), 11.0 (C-29), Glc: 102.9 (C-1'), 79.0 (C-3'), 78.9 (C-5'), 75.7 (C-2'), 72.1 (C-4'), 63.3 (C-6').

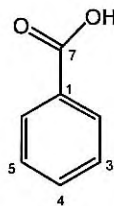


## 화합물 6

무색의 분말로서, ESIMS 스펙트럼에서  $m/z$  121  $[M - H]^-$ 에서 이온 피크가 관찰되었다. IR 스펙트럼에서는  $3071\text{ cm}^{-1}$ 에서 -OH기,  $1686\text{ cm}^{-1}$ 에서는 C=O group,  $1453, 1326, 1291, 933\text{ cm}^{-1}$ 에서 aromatic ring의 존재를 확인하였다.  $^1\text{H-NMR}$ 에서  $8.12 - 7.48\text{ ppm}$ 에서 5개의 aromatic proton을 확인하였다.  $^{13}\text{C-NMR}$ 에서는  $170.8\text{ ppm}$ 에서의 COOH 기를 포함한 총 7개의 피크를 확인하였다. 이상의 data는 기존 문헌<sup>36)</sup>에서 보고한 것과 동일하였으므로, benzoic acid로 동정하였다.



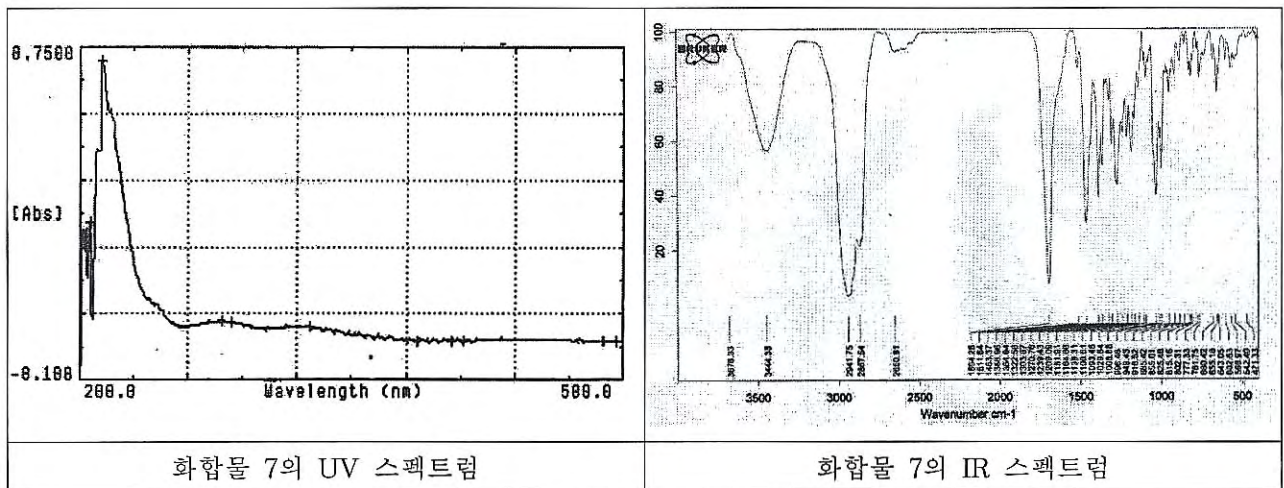
Colorless amorphous powder. mp  $121 - 122\text{ }^\circ\text{C}$ ; IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$ :  $3071$  (OH),  $2848, 2672$  (C-H),  $1686$  (C=O),  $1453, 1326, 1291, 933$  (C=C),  $707\text{ cm}^{-1}$  UV (MeOH, 0.02)  $\lambda_{\text{max}}$ :  $200$  (3.9),  $204$  (4.0),  $212$  (4.1),  $236$  (4.2),  $250$  (3.7) nm;  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, MeOD)  $\delta$ :  $7.48$  (2H, d,  $J = 7.9\text{ Hz}$ , H-3, 5),  $7.62$  (1H, dt,  $J = 7.9, 0.9\text{ Hz}$ , H-4),  $8.12$  (2H, d,  $J = 7.9\text{ Hz}$ , C-2, 6)  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz, MeOD)  $\delta$ :  $128.7$  (C-3, 5),  $121.9$  (C-1),  $134.1$  (C-4),  $130.4$  (C-2, 6),  $170.8$  (C-7); ESIMS  $m/z$ :  $121$   $[M - H]^-$ .



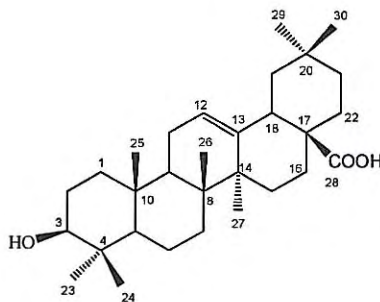
## 화합물 7

무색의 분말로서, IR 스펙트럼에서는  $3444\text{ cm}^{-1}$ 에서 -OH기의 존재를,  $1694\text{ cm}^{-1}$ 에서는 C=O group의 존재를,  $1463\text{ cm}^{-1}$ 에서 olefinic group의 존재를 확인하였다.  $^1\text{H-NMR}$ 에서  $1.96 - 1.82\text{ ppm}$ 에서의 특징적인 7개의 methyl 기로부터 triterpene 구조를 예상할 수 있었으며,  $5.52\text{ ppm}$ 에서 olefinic proton,  $3.32\text{ ppm}$ 에서 oxygenated methine proton의 존재를 확인하였다.  $^{13}\text{C-NMR}$ 에서는  $180.5\text{ ppm}$ 에서의 COOH,  $122.9, 145.2\text{ ppm}$ 에서의 olefinic carbon을 포함한 총 30개의 피크를 확인할 수 있었다. 이상의 data는 기존 문헌<sup>37)</sup>에서 보고한 것과 동일하였으므로, oleanolic acid로 동정하였다.





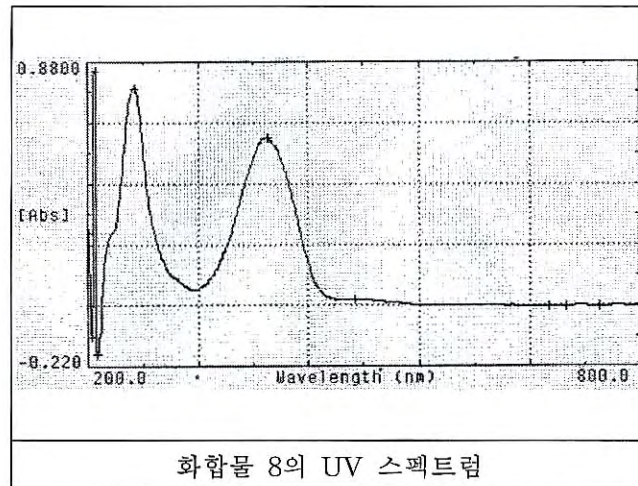
Colorless amorphous powder. mp 312 - 314 °C; IR (KBr)  $\nu_{\max}$ : 3444 (OH), 2941, 1694 (C=O), 1463 (C=C), 1386, 1030  $\text{cm}^{-1}$  UV (MeOH, 0.02)  $\lambda_{\max}$ : 200 (2.5), 206 (3.8), 213 (4.2) nm;  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz, Pyridine- $d_5$ )  $\delta$ : 5.52 (1H, br s, H-12), 3.46 (1H, dd,  $J = 6.6, 10.8$  Hz, H-3), 3.32 (1H, dd,  $J = 4.2, 12.8$  Hz, H-18), 0.92 (3H, s, H-25), 0.97 (3H, s, H-24), 1.03 (3H, s, H-26), 1.04 (6H, s, H-29, 30), 1.25 (3H, s, H-27), 1.30 (3H, s, H-23), 1.32 (1H, H-19b), 1.36 (1H, H-7b), 1.39 (1H, H-6b), 1.46 (1H, H-21a), 1.53 (1H, H-7a), 1.57 (1H, m, H-1b), 1.58 (1H, H-6a), 1.71 (1H, t, H-9), 1.82 (3H, m, H-2a, 2b, 22a), 1.83 (1H, m, H-19a), 1.96 (3H, m, H-11a, 11b, 16b), 2.04 (1H, m, H-22b), 2.12 (1H, m, H-16a), 2.19 (1H, m, H-15b);  $^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz, Pyridine- $d_5$ )  $\delta$ : 15.9 (C-25), 16.9 (C-24), 17.8 (C-26), 18.8 (C-6), 24.1 (C-16, 29), 24.2 (C-11), 26.7 (C-27), 28.5 (C-2), 28.7 (C-15), 29.1 (C-23), 31.3 (C-20), 33.3 (C-22), 33.5 (C-7), 33.6 (C-30), 34.3 (C-21), 37.8 (C-10), 39.4 (C-1), 39.8 (C-4), 40.2 (C-8), 42.4 (C-18), 42.6 (C-14), 46.9 (C-19), 47.0 (C-17), 48.5 (C-9), 56.2 (C-5), 78.5 (C-3), 122.9 (C-12), 145.2 (C-13), 180.5 (C=O); ESIMS  $m/z$ : 455.7 [M - H] $^-$ .



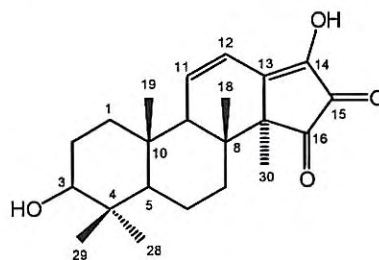
## 화합물 8

적색의 분말로서, IR 스펙트럼에서는 3500  $\text{cm}^{-1}$ 에서 -OH기의 존재를, 1750-1690  $\text{cm}^{-1}$ 에서는 C=O group의 존재를, 1511  $\text{cm}^{-1}$ 에서 olefinic group의 존재를 확인하였다.  $^1\text{H-NMR}$ 에서 1.20 - 0.80 ppm에서 5개의 methyl 기, 6.88, 6.45 ppm에서 olefinic proton, 3.19 ppm에서 oxygenated methine proton의 존재를 확인하였다.  $^{13}\text{C-NMR}$ 에서는 181.7, 202.9 ppm에서의 2개의 ketone기, 120.8, 140.9, 145.7, 152.9

ppm에서의 4개의 olefinic carbon을 포함한 총 22개의 피크를 확인할 수 있었다. 이상의 data는 기존문헌<sup>38)</sup>에서 보고한 것과 동일하였으므로, falbinone로 동정하였다.



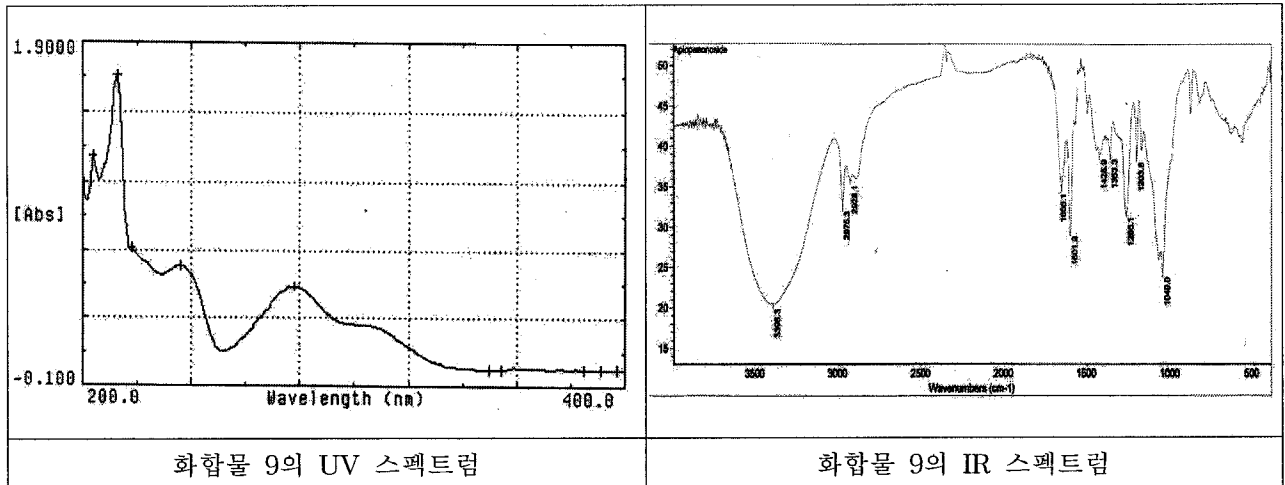
Red amorphous powder. mp 254 - 255 °C; IR (KBr)  $\nu_{\max}$ : 3500 (OH), 1750 (C=O), 1690, 1605, 1511 (C=C)  $\text{cm}^{-1}$  UV  $\lambda_{\max}$  (MeOH, 0.02): 202 (3.6), 209 (4.2), 251 (4.1), 396 (4.0) nm;  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz, MeOD)  $\delta$ : 0.80 (3H, s, H-29), 0.82 (3H, s, H-18), 0.96 (3H, s, H-19), 1.02 (3H, s, H-28), 0.99 (1H, m, H-1 $\beta$ ), 1.20 (3H, s, H-30), 1.53 (1H, dd,  $J = 12.5, 3.2$  Hz, H-6 $\beta$ ), 1.65 (1H, dd,  $J = 9.5, 3.4$  Hz, H-2 $\beta$ ), 1.70 (1H, m, H-7 $\alpha$ ), 1.73 (1H, m, H-6 $\alpha$ ), 1.76 (1H, m, H-2 $\alpha$ ), 1.96 (1H, t,  $J = 3.4$  Hz, H-1 $\alpha$ ), 2.02 (1H, m, H-7 $\beta$ ), 3.19 (1H,  $J = 10.0, 6.5$  Hz, H-3), 6.45 (1H, dd,  $J = 10.2, 2.4$  Hz, H-11), 6.88 (1H, dd,  $J = 10.2, 3.3$  Hz, H-12);  $^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz, MeOD)  $\delta$ : 15.8 (C-29), 18.7 (C-19), 18.8 (C-6), 19.4 (C-18), 19.7 (C-30), 27.8 (C-2), 28.4 (C-28), 34.2 (C-7), 38.0 (C-10), 38.7 (C-1), 39.8 (C-4), 40.5 (C-8), 51.3 (C-14), 55.6 (C-5), 56.6 (C-9), 78.7 (C-3), 120.8 (C-12), 140.9 (C-11), 145.7 (C-13), 152.9 (C-17), 181.7 (C-16), 202.9 (C-15); ESIMS  $m/z$ : 381.5  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ , 357.5  $[\text{M} - \text{H}]^-$ .



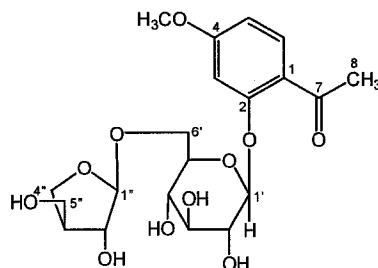
## 화합물 9

무색의 분말로서, ESIMS 스펙트럼에서  $m/z$  459  $[\text{M} - \text{H}]^-$ 에서 이온 피크가 관찰되었다. IR 스펙트럼에서는 3039  $\text{cm}^{-1}$ 에서 -OH기, 1655  $\text{cm}^{-1}$ 에서는 C=O group의 존재를 확인하였다.  $^1\text{H-NMR}$ 에서 7.75 - 6.83 ppm에서 3개의 aromatic proton을, 3.87 ppm에서 1개의 methoxy 기, 2.64 ppm에서 1개의 methyl 기를 확인하였으며, 5.02 - 3.36 ppm 에서의 겹쳐진 신호들로부터 당의 존재를 확인할 수 있었다.

$^{13}\text{C}$ -NMR에서는 200.7 ppm에서의 ester 기를 포함한 총 20개의 피크를 확인하였다. 이상의 data는 기존 문헌<sup>39,40)</sup>에서 보고한 것과 동일하였으므로, apiopaeonoside로 동정하였다.



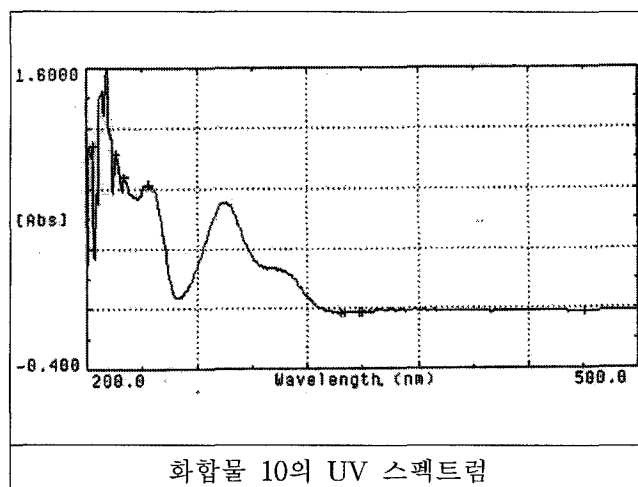
White amorphous powder. IR (KBr)  $\text{max}$ : 3396, 2975, 1655, 1601, 1426, 1363, 1266, 1203, 1049  $\text{cm}^{-1}$   
 UV (MeOH)  $\lambda_{\text{max}}$  (log  $\epsilon$ ): 204 (4.5), 213 (4.6), 218 (4.2), 236 (4.1), 278 (4.1), 300 (3.8) nm;  
 $^1\text{H}$ -NMR (300 MHz, MeOD)  $\delta$ : 2.64 (3H, s, H-8), 3.34 (1H, m, H-2'), 3.36 (1H, br d,  $J = 9.0$  Hz, H-3''), 3.50 (1H, d,  $J = 9.0$  Hz, H-4'), 3.51 (1H, m, H-3'), 3.57 (2H, s, H-5'), 3.61 (1H, dd,  $J = 10.5, 3.3$  Hz, H-5'), 3.66 (1H, dd,  $J = 10.0, 6.6$  Hz, H-6'a), 3.75 (1H, d,  $J = 9.8$  Hz, H-4'a), 3.87 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 3.88 (1H, m, H-2''), 3.97 (1H, d,  $J = 9.8$  Hz, H-4''b), 4.03 (1H, d,  $J = 10.0$  Hz, H-6'b), 4.95 (1H, d,  $J = 2.5$  Hz, H-1''), 5.02 (1H, d,  $J = 7.5$  Hz, H-1'), 6.83 (1H, d,  $J = 2.2$  Hz, H-3), 6.67 (1H, dd,  $J = 8.9, 2.2$  Hz, H-5), 7.75 (1H, d,  $J = 8.9$  Hz, H-6);  $^{13}\text{C}$ -NMR (75 MHz, MeOD)  $\delta$ : 32.3 (C-8), 56.5 (OCH<sub>3</sub>), 65.8 (C-5''), 68.9 (C-6'), 71.6 (C-4'), 75.0 (C-2'), 75.2 (C-4''), 77.3 (C-5'), 78.2 (C-3'), 78.4 (C-2''), 80.6 (C-3''), 102.7 (C-1'), 103.4 (C-3), 111.2 (C-1''), 109.2 (C-5), 122.9 (C-1), 133.2 (C-6), 160.6 (C-2), 166.4 (C-4), 200.7 (C-7); ESIMS  $m/z$ : 459 [M - H]<sup>-</sup>.



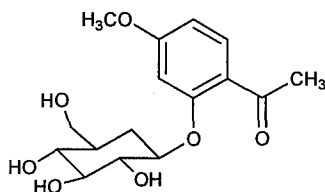
## 화합물 10

무색의 분말로서, ESIMS 스펙트럼에서  $m/z$  351 [M + Na]<sup>+</sup>에서 이온 피크가 관찰되었다. IR 스펙트럼에서는 3420  $\text{cm}^{-1}$ 에서 -OH기, 1655  $\text{cm}^{-1}$ 에서는 C=O group의 존재를 확인하였다.  $^1\text{H}$ -NMR에서 7.74 - 6.65 ppm에서 3개의 aromatic proton을, 3.85 ppm에서 1개의 methoxy 기, 2.59 ppm에서 1개의 methyl

기를 확인하였으며, 5.05 - 3.47 ppm 에서의 겹쳐진 신호들로부터 당의 존재를 확인할 수 있었다.  $^{13}\text{C}$ -NMR에서는 197.7 ppm에서의 ester 기를 포함한 총 15개의 피크를 확인하였다. 이상의 data는 기존 문헌<sup>41)</sup>에서 보고한 것과 동일하였으므로, paeonoside로 동정하였다.



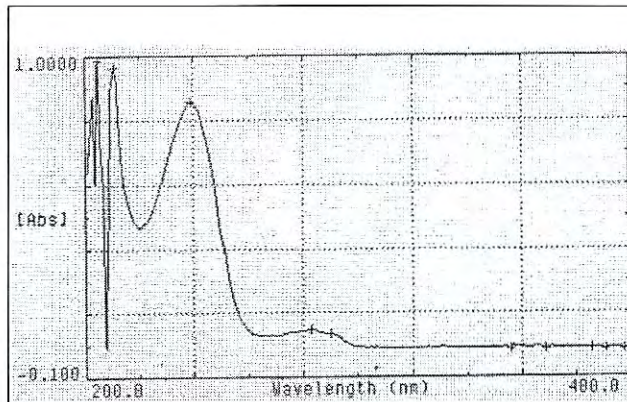
Colorless amorphous powder. IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$ : 3420 (-OH), 1655 (C=O), 1630 (C=C), 1271 (C-O), 1071, 717  $\text{cm}^{-1}$  UV (MeOH, 0.02)  $\lambda_{\text{max}}$ : 204 (4.2), 212 (4.5), 216 (4.2), 221 (4.1), 234 (4.1) nm;  $^1\text{H}$ -NMR (300 MHz, Acetone)  $\delta$ : 2.59 (3H, s, 8), 2.98 (6'-OH), 3.47 (1H, dd,  $J = 9.0, 4.2$  Hz, H-4'), 3.55 (1H, dd,  $J = 9.0, 3.6$  Hz, H-3'), 3.59 (1H, m, H-5'), 3.62 (1H, dd,  $J = 9.0, 7.5$  Hz, H-2'), 3.73 (1H, dd,  $J = 11.5, 4.2$  Hz, H-6'a), 3.85 (3H, s, OMe), 3.91 (1H, dd,  $J = 11.5, 4.2$  Hz, H-6'b), 4.41 (3'-OH), 4.53 (5'-OH), 4.76 (2'-OH), 5.05 (1H, d,  $J = 7.5$  Hz, H-1'), 6.65 (1H, dd,  $J = 8.8, 2.4$  Hz, H-5), 6.88 (1H, d,  $J = 2.4$  Hz, H-3), 7.74 (1H, d,  $J = 8.8$  Hz, H-6)  $^{13}\text{C}$ -NMR (75 MHz, Acetone)  $\delta$ : 32.1 (C-8), 56.1 (4-OCH<sub>3</sub>), 62.7 (C-6'), 71.4 (C-4'), 74.7 (C-2'), 78.2 (C-5'), 78.3 (C-3'), 102.5 (C-1'), 102.6 (C-3), 109.1 (C-5), 122.4 (C-1), 132.6 (C-6), 160.1 (C-2), 165.3 (C-4), 197.7 (C-7); ESIMS  $m/z$ : 351[M + Na]<sup>+</sup>, 327 [M - H]<sup>-</sup>.



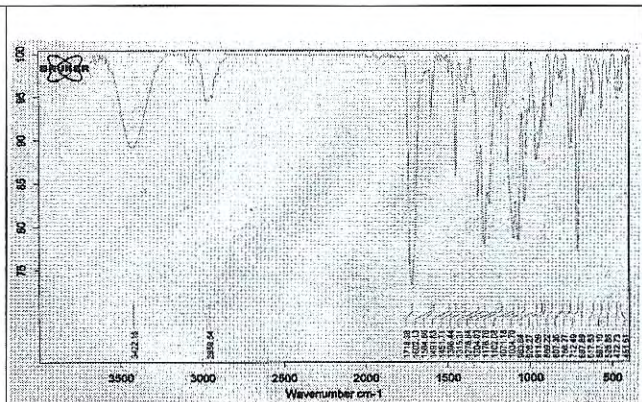
### 화합물 11

무색의 액체로서, IR 스펙트럼에서 3422  $\text{cm}^{-1}$ 에서 -OH기, 1718  $\text{cm}^{-1}$ 에서는 C=O group의 존재를 확인하였다.  $^1\text{H}$ -NMR에서 7.94 - 7.35 ppm에서 5개의 aromatic proton을, 3.40 ppm에서 1개의 methoxy 기, 1.26 ppm에서 1개의 methyl 기를 확인할 수 있었다.  $^{13}\text{C}$ -NMR에서는 166.5, 210.7 ppm에서의 2개의 carbonyl 기와 133.5-128.7 ppm에서 6개의 aromatic carbon을 포함한 총 18개의 피크를 확인하였다. 이

상의 data는 기존문헌<sup>42,43)</sup>에서 보고한 것과 동일하였으므로, 6-methoxypaeoniflorigenone로 동정하였다.

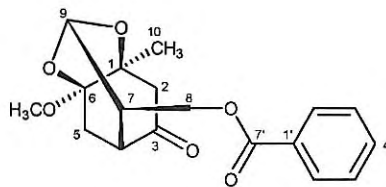


화합물 11의 UV 스펙트럼



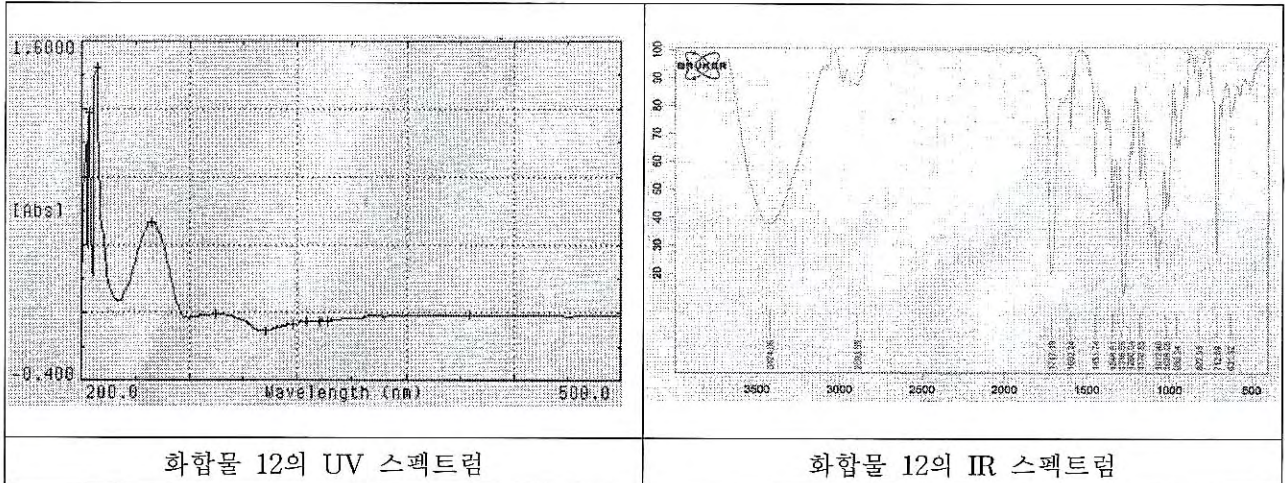
화합물 11의 IR 스펙트럼

Colorless viscous oil. IR (KBr)  $\nu_{\max}$ : 3422 (OH), 2959 (C-H), 1718 (C=O), 1602 (C=C), 1276 (C-O), 1102, 1071  $\text{cm}^{-1}$  UV (MeOH, 0.02)  $\lambda_{\max}$ : 200 (4.0), 211 (4.2), 239 (4.1), 250 (3.8) nm;  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz, acetone- $d_6$ )  $\delta$ : 1.26 (3H, s, H-10), 2.16 (1H, dd,  $J = 2.4, 13.6$  Hz, H-5a), 2.33 (1H, d,  $J = 13.6$  Hz, H-5b), 2.33 (1H, m, H-7), 2.62 (2H, s, H-2), 2.83 (1H, m, H-4), 3.40 (3H, s, 6-OCH<sub>3</sub>), 4.02 (1H, dd,  $J = 5.6, 9.2$  Hz, H-8a), 4.32 (1H, dd,  $J = 5.6, 11.2$  Hz, H-8b), 5.42 (1H, s, H-9), 7.35 (2H, t,  $J = 7.6, 1.2$  Hz, H-3', 5'), 7.49 (1H, t,  $J = 7.6, 1.2$  Hz, H-4'), 7.94 (2H, dd,  $J = 7.6, 1.2$  Hz, H-2', 6');  $^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz, acetone- $d_6$ )  $\delta$ : 21.4 (C-10), 34.5 (C-5), 43.2 (C-4), 46.5 (C-2), 47.1 (C-7), 50.9 (6-OCH<sub>3</sub>), 62.9 (C-8), 78.9 (C-1), 99.8 (C-9), 101.8 (C-6), 128.7 (C-3', 5'), 129.8 (C-1'), 129.9 (C-2', 6'), 133.5 (C-4'), 166.5 (C-7'), 210.7 (C-3).

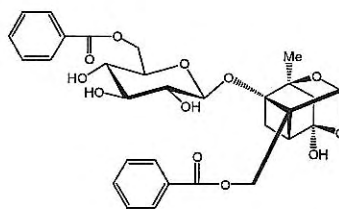


## 화합물 12

무색의 분말로서, ESIMS 스펙트럼에서  $m/z$  607  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 에서 이온 피크가 관찰되었다. IR 스펙트럼에서 3224  $\text{cm}^{-1}$ 에서 -OH기, 1717  $\text{cm}^{-1}$ 에서는 C=O group의 존재를, 1602, 1451  $\text{cm}^{-1}$ 에서 aromatic ring의 존재를 확인할 수 있었다.  $^1\text{H-NMR}$ 에서 8.02 - 7.08 ppm에서 10개의 aromatic proton을, 1.24 ppm에서 1개의 methyl 기를 확인하였고, 4.57 - 3.27 ppm에서의 겹쳐진 신호들로부터 당의 존재를 확인할 수 있었다.  $^{13}\text{C-NMR}$ 에서는 167.8, 168.1 ppm에서의 2개의 carbonyl 기와 134.6-129.8 ppm에서 12개의 aromatic carbon을 포함한 총 30개의 피크를 확인하였다. 이상의 data는 기존문헌<sup>44,45)</sup>에서 보고한 것과 동일하였으므로, benzoylpaeoniflorin로 동정하였다.

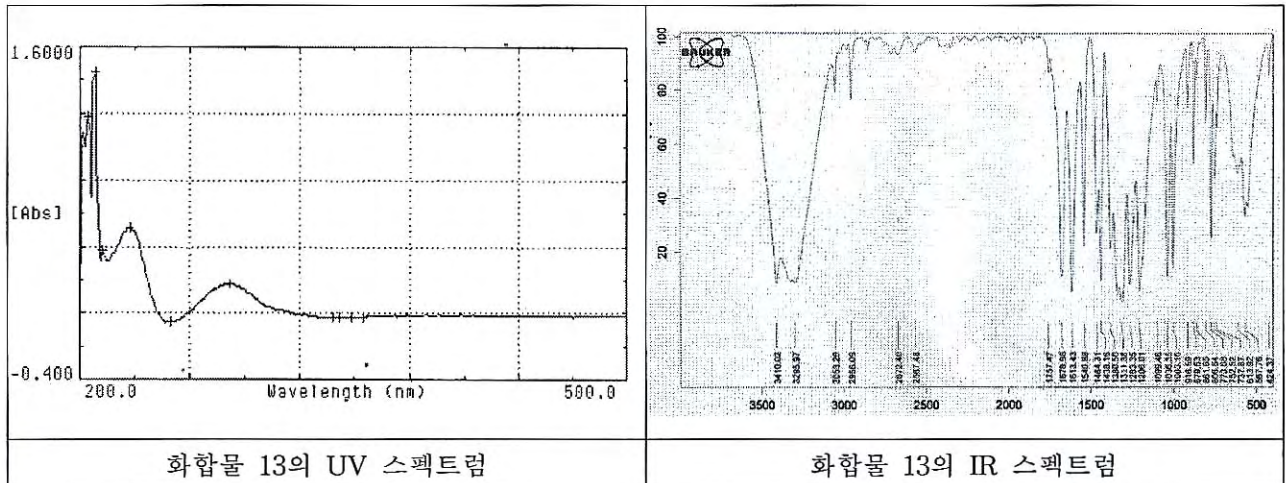


Colorless amorphous powder. IR (KBr)  $\nu_{\max}$ : 3224 (OH), 2893 (C-H), 1717 (C=O), 1602, 1451 (C=C), 1280 (C-O), 1072, 1026 (glycosidic C-O), 956  $\text{cm}^{-1}$  UV  $\lambda_{\max}$  (MeOH, 0.02): 205 (4.5), 209 (4.6), 239 (4.2), 275 (3.7) nm;  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz, MeOD)  $\delta$ : 1.24 (3H, s, 10- $\text{CH}_3$ ), 1.68 (1H, m, H-3a), 1.71 (1H, m, H-7a), 1.85 (1H, d,  $J = 12.6$  Hz, H-3b), 2.45 (1H, d,  $J = 6.9$  Hz, H-7b), 2.50 (1H, m, H-5), 3.27 (1H, m, H-2'), 3.34-3.41 (2H, m, H-3', 4'), 3.59 (1H, ddd,  $J = 10.0, 6.9, 2.2$  Hz, H-5'), 4.49 (1H, dd,  $J = 11.7, 6.9$  Hz, H-6'a), 4.57 (1H,  $J = 7.5$  Hz, H-1'), 4.68 (1H, dd,  $J = 2.2, 10.0$  Hz, H-6'b), 4.70 (2H, br s, H-8a, 8b), 5.38 (1H, s, H-9), 7.08 (2H, s, H-2'', 6''), 7.49 (2H, t,  $J = 7.9$  Hz, H-3''', 5'''), 7.61 (1H, t,  $J = 7.9$  Hz, H-4'''), 8.02 (2H, d,  $J = 7.9$  Hz, H-2''', 6''');  $^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz, MeOD)  $\delta$ : 19.7 (C-10), 23.2 (C-7), 43.6 (C-3), 43.9 (C-5), 61.7 (C-8), 65.3 (C-6'), 72.1 (C-6), 72.2 (C-4'), 75.1 (C-2'), 75.3 (C-5'), 78.0 (C-3'), 87.2 (C-2), 89.4 (C-1), 100.2 (C-1'), 102.3 (C-9), 106.4 (C-4), 129.8 (C-3'', 5'', 3''', 5'''), 130.3 (C-2''', 6'''), 130.7 (C-2'', 6''), 131.3 (C-1'''), 131.5 (C-1''), 134.5 (C-4'''), 134.6 (C-4''), 167.8 (C-7'''), 168.1 (C-7''); ESIMS  $m/z$ : 607 [ $\text{M} + \text{Na}$ ] $^+$ , 583 [ $\text{M} - \text{H}$ ] $^-$ .

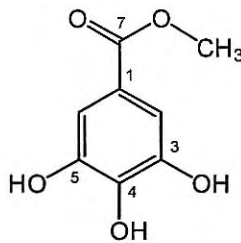


### 화합물 13

무색의 분말로서, ESIMS 스펙트럼에서  $m/z$  183 [ $\text{M} - \text{H}$ ] $^-$ 에서 이온 피크가 관찰되었다. IR 스펙트럼에서는 3410, 3295  $\text{cm}^{-1}$ 에서 -OH기, 1676  $\text{cm}^{-1}$ 에서는 C=O group, 1613, 1540  $\text{cm}^{-1}$ 에서 aromatic ring의 존재를 확인하였다.  $^1\text{H-NMR}$ 에서 7.15 ppm에서 2개의 겹쳐진 aromatic proton을, 3.78 ppm에서 1개의 methoxy 기를 확인하였다.  $^{13}\text{C-NMR}$ 에서는 166.8 ppm에서의 ester 기를 포함한 총 8개의 피크를 확인하였다. 이상의 data는 기존문헌<sup>46,47)</sup>에서 보고한 것과 동일하였으므로, methyl gallate로 동정하였다.

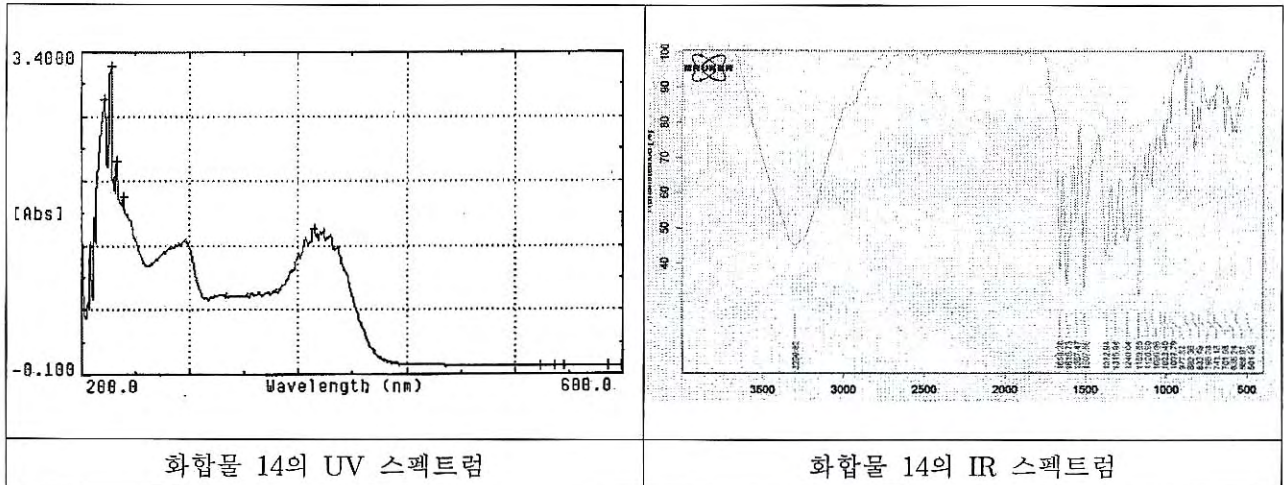


Colorless amorphous powder. IR (KBr)  $\nu_{\max}$ : 3410, 3295 (OH), 1676 (C=O), 1613, 1540 (C=C), 1311, 1206 (C-O), 1036, 1003  $\text{cm}^{-1}$  UV  $\lambda_{\max}$  (MeOH, 0.02): 202 (4.0), 209 (4.1), 213 (3.5), 228 (3.6), 282 (3.3) nm;  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz, acetone- $d_6$ )  $\delta$ : 3.78 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 7.15 (2H, s, H-2, 6), 8.13 (3H, s, 3 x OH, s);  $^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz, acetone- $d_6$ )  $\delta$ : 51.5 (OCH<sub>3</sub>), 109.4 (C-2, 6), 121.3 (C-1), 138.3 (C-4), 145.6 (C-3, 5), 166.8 (C-7); ESIMS  $m/z$ : 183 [M - H]<sup>-</sup>.

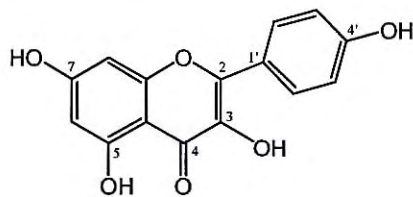


#### 화합물 14

노란색의 분말로서, ESIMS 스펙트럼에서  $m/z$  287 [M + H]<sup>+</sup>에서 이온 피크가 관찰되었다. IR 스펙트럼에서는 3299  $\text{cm}^{-1}$ 에서 -OH기, 1659  $\text{cm}^{-1}$ 에서는 C=O group, 1615, 1507  $\text{cm}^{-1}$ 에서 aromatic ring의 존재를 확인하였다. UV 스펙트럼에서 350, 250 nm의 특징적인 흡수파장과  $^1\text{H-NMR}$ 에서 8.87-6.9 ppm에서 6개의 aromatic proton으로부터 플라보노이드 골격을 확인할 수 있었다.  $^{13}\text{C-NMR}$ 에서는 165.4 ppm에서의 carbonyl 기를 포함한 총 15개의 피크를 확인하였다. 이상의 data는 기존문헌<sup>48)</sup>에서 보고한 것과 동일하였으므로, kaempferol로 동정하였다.



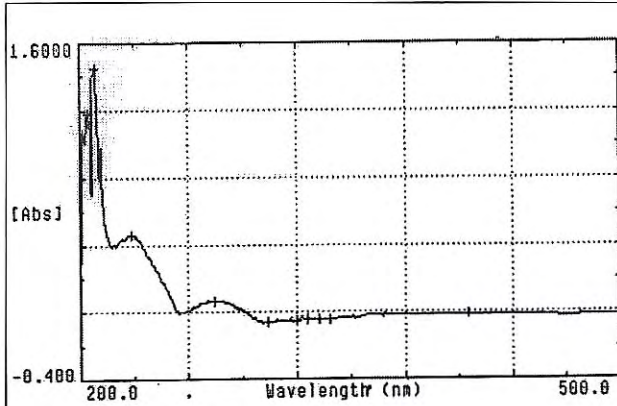
Bright yellow powder. mp 276 - 278 °C; IR (KBr)  $\nu_{\max}$ : 3299 (OH), 1659 (C=O), 1615, 1507 (C=C), 1372, 1315, 1240, 1169, 882  $\text{cm}^{-1}$  UV (MeOH, 0.02)  $\lambda_{\max}$ : 200 (4.3), 218 (4.6), 223 (4.7), 227 (4.5), 232 (4.4), 250 (4.2), 300 (4.0), 350 (4.1), 372 (4.3) nm;  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$  and MeOD)  $\delta$ : 6.9 (1H, d,  $J = 1.8$  Hz, H-6), 7.1 (1H, d,  $J = 1.8$  Hz, H-8), 7.6 (2H, d,  $J = 9.0$  Hz, H-3', 5'), 8.8 (2H, d,  $J = 9.0$  Hz, H-2', 6');  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz, DMSO- $d_6$  and MeOD)  $\delta$ : 94.7 (C-8), 99.4 (C-6), 104.5 (C-10), 116.5 (C-3', 5'), 123.6 (C-1'), 130.8 (C-2', 6'), 137.2 (C-3), 148.0 (C-2), 158.1 (C-9), 160.6 (C-4'), 162.4 (C-5), 165.4 (C-7), 177.3 (C-4); ESIMS  $m/z$ : 287 [M + H] $^+$ , 285 [M - H] $^-$ .



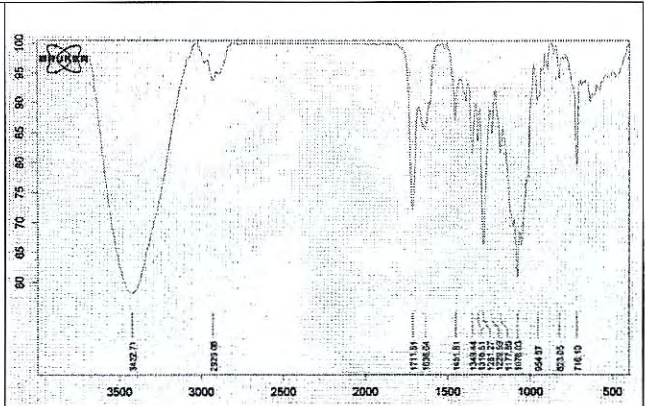
### 화합물 15

무색의 분말로서, ESIMS 스펙트럼에서  $m/z$  503[M + Na] $^+$ 에서 이온 피크가 관찰되었다. IR 스펙트럼에서는 3422  $\text{cm}^{-1}$ 에서 -OH기, 1711  $\text{cm}^{-1}$ 에서는 C=O group, 1636  $\text{cm}^{-1}$ 에서 aromatic ring의 존재를 확인하였다.  $^1\text{H-NMR}$ 에서 8.05-7.48 ppm에서 5개의 aromatic proton을, 1.36 ppm에서 1개의 methyl 기를 확인하였고, 4.55 - 3.19 ppm 에서의 겹쳐진 신호들로부터 당의 존재를 확인할 수 있었다.  $^{13}\text{C-NMR}$ 에서는 168.1 ppm에서의 ester 기를 포함한 총 24개의 피크를 확인하였다. 이상의 data는 기존문헌<sup>45,49)</sup>에서 보고한 것과 동일하였으므로, paeoniflorin로 동정하였다.



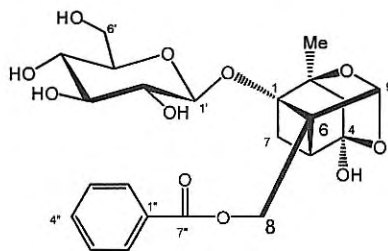


화합물 15의 UV 스펙트럼



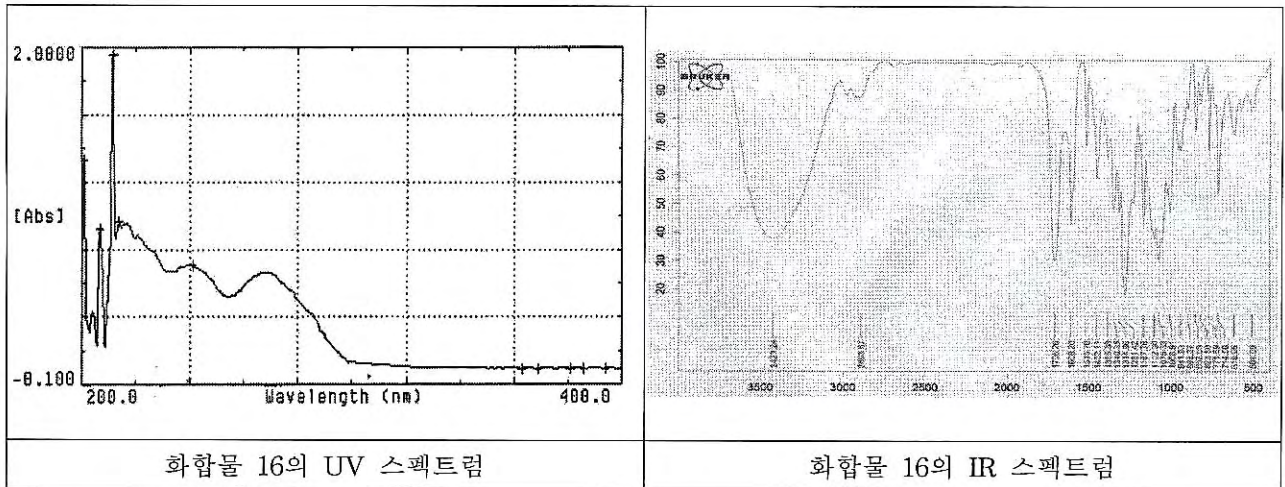
화합물 15의 IR 스펙트럼

Colorless amorphous powder mp 162.5 - 163.5 °C; IR (KBr)  $\nu_{\max}$ : 3422 (OH), 2929 (C-H), 1711 (C=O), 1636 (C=C), 1281 (C-O), 1076 (glycosidic), 716  $\text{cm}^{-1}$  UV  $\lambda_{\max}$  (MeOH): 205 (4.5), 209 (4.6), 229 (4.3), 275 (4.2) nm;  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz, MeOD)  $\delta$ : 1.36 (3H, s, H-10), 1.84 (1H, d,  $J = 12.6$  Hz, H-3a), 1.95 (1H, d,  $J = 10.8$  Hz, H-7a), 2.19 (1H, d,  $J = 12.6$  Hz, H-3b), 2.48 (1H, dd,  $J = 10.8, 6.9$  Hz, H-7b), 2.58 (1H, dd,  $J = 6.9, 1.2$  Hz, H-5), 3.19-3.34 (3H, m, H-2', 3', 4'), 3.62 (1H, ddd,  $J = 10.0, 4.5, 1.4$  Hz, H-5'), 3.84 (1H, m), 3.86 (1H, m, H-6'b), 4.55 (1H, d,  $J = 7.8$  Hz, H-1'), 4.75 (2H, s, H-8a, 8b), 5.43 (1H, s, H-9), 7.48 (2H, t,  $J = 7.9$  Hz, H-3'', 5''), 7.62 (1H, t,  $J = 7.9$  Hz, H-4''), 8.05 (2H, d,  $J = 7.9$  Hz, H-2'', 6'');  $^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz, MeOD)  $\delta$ : 19.7 (C-10), 23.6 (C-7), 44.1 (C-3), 44.7 (C-5), 61.8 (C-8), 62.9 (C-6'), 71.1 (C-6), 72.3 (C-4'), 75.1 (C-2'), 75.3 (C-2'), 78.0 (C-5'), 78.1 (C-3'), 87.3 (C-2), 89.5 (C-1), 100.2 (C-1'), 102.4 (C-9), 106.5 (C-4), 129.7 (C-3'', 5''), 130.8 (C-2'', 6''), 131.3 (C-1''), 134.5 (C-4''), 168.1 (C-7''); ESIMS  $m/z$ : 503  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ , 479  $[\text{M} - \text{H}]^-$ .



## 화합물 16

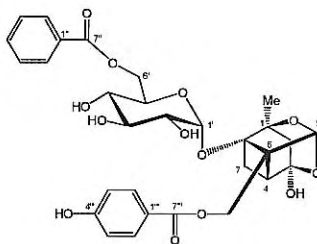
무색의 분말로서, ESIMS 스펙트럼에서  $m/z$  623  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 에서 이온 피크가 관찰되었다. IR 스펙트럼에서는  $3423 \text{ cm}^{-1}$ 에서 -OH기,  $1706 \text{ cm}^{-1}$ 에서는 C=O group,  $1608, 1452 \text{ cm}^{-1}$ 에서 aromatic ring의 존재를 확인하였다.  $^1\text{H-NMR}$ 에서 8.03-6.82 ppm에서 9개의 aromatic proton을, 1.24 ppm에서 1개의 methyl기를 확인하였고, 4.57 - 3.26 ppm에서의 겹쳐진 신호들로부터 당의 존재를 확인할 수 있었다.  $^{13}\text{C-NMR}$ 에서는 167.8, 168.2 ppm에서의 2개의 ester 기를 포함한 총 30개의 피크를 확인하였다. 이상의 data는 기존문헌<sup>50,56)</sup>에서 보고한 것과 동일하였으므로,  $\alpha$ -benzoyloxy paeoniflorin로 동정하였다.



화합물 16의 UV 스펙트럼

화합물 16의 IR 스펙트럼

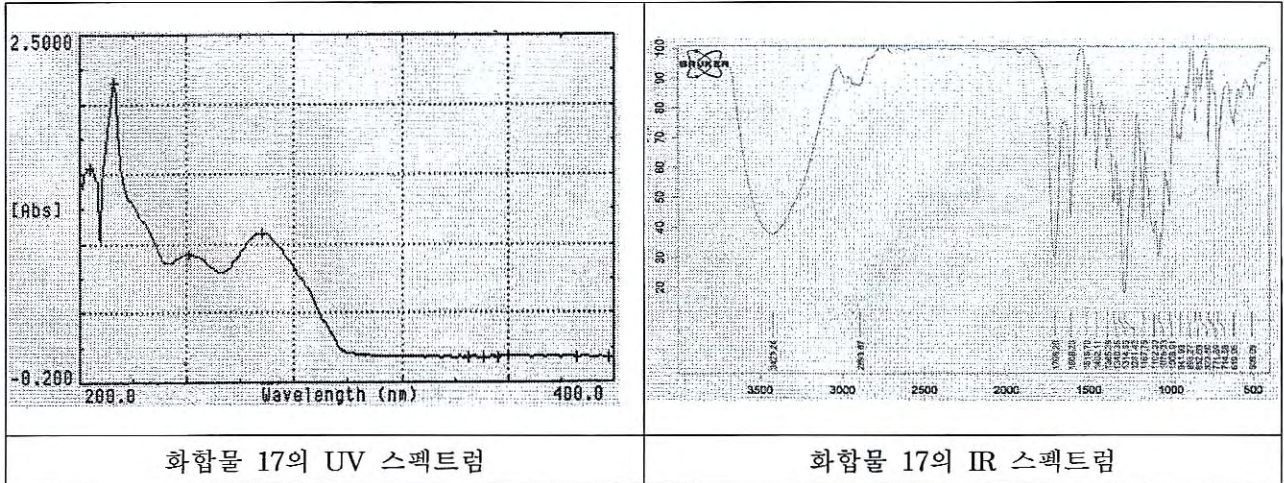
Colorless amorphous powder. IR (KBr)  $\nu_{\max}$ : 3423 (OH), 2893 (C-O), 1706 (C=O), 1608, 1452 (C=C), 1281 (C-O), 1102 (glycosidic C-O), 714  $\text{cm}^{-1}$  UV (MeOH, 0.02)  $\lambda_{\max}$ : 200 (4.6), 204 (4.7), 213 (4.8), 241 (4.4), 250 (4.3), 268 (4.5) nm;  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz, MeOD)  $\delta$ : 1.24 (3H, s, H-10), 1.69 (2H, br d,  $J = 10.2$  Hz, H-7a), 1.71 (1H, d,  $J = 12.6$  Hz, H-3a), 1.85 (1H, d,  $J = 12.6$  Hz, H-3b), 2.42 (1H, m, H-7b), 2.43 (1H, d,  $J = 6.3$  Hz, H-5), 3.26 (1H, t,  $J = 8.3, 7.6$  Hz, H-2'), 3.34 (1H, d,  $J = 6.8$  Hz, H-4'), 3.39 (1H, d,  $J = 8.3, 6.8$  Hz, H-3'), 3.59 (1H, dd,  $J = 7.5, 6.8$  Hz, H-5'), 4.49 (1H, dd,  $J = 11.7, 6.9$  Hz, H-6'a), 4.57 (1H, d,  $J = 7.6$  Hz, H-1'), 4.65 (2H, brs, H-8), 4.67 (1H, dd,  $J = 11.7$  Hz, H-6'b), 5.36 (1H, s, H-9), 6.82 (2H, d,  $J = 8.7$  Hz, H-3''', 5'''), 7.47 (2H, t,  $J = 8.0$  Hz, H-3'', 5''), 7.60 (1H, t,  $J = 8.0$  Hz, H-4''), 7.89 (2H, d,  $J = 8.7$  Hz, H-2''', 6'''), 8.03 (2H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-2'', 6'');  $^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz, MeOD)  $\delta$ : 19.7 (3H, s, 7-CH<sub>3</sub>), 23.2 (C-7), 43.9 (C-3), 44.6 (C-5), 61.3 (C-8), 65.3 (C-6'), 72.1 (C-6), 72.2 (C-4'), 75.1 (C-5'), 75.3 (C-2'), 78.0 (C-3'), 87.2 (C-2), 89.4 (C-1), 100.2 (C-1'), 102.4 (C-9), 106.3 (C-4), 116.3 (C-3''', 5'''), 122.1 (C-1'''), 129.8 (C-3'', 5''), 130.7 (C-2'', 6''), 131.5 (C-1''), 133.1 (C-2''', 6'''), 134.6 (C-4''), 163.9 (C-4'''), 167.8 (C-7'''), 168.2 (C-7''); ESIMS  $m/z$  : 623 [M + Na]<sup>+</sup>, 599 [M - H]<sup>-</sup>.



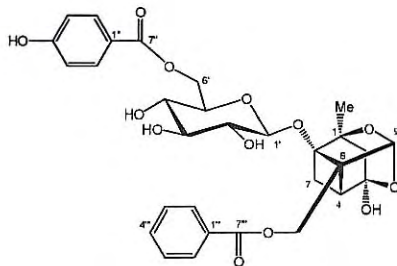
### 화합물 17

무색의 분말로서, ESIMS 스펙트럼에서  $m/z$  623 [M + Na]<sup>+</sup>에서 이온 피크가 관찰되었다. IR 스펙트럼에서는 3423  $\text{cm}^{-1}$ 에서 -OH기, 1706  $\text{cm}^{-1}$ 에서는 C=O group, 1608, 1452  $\text{cm}^{-1}$ 에서 aromatic ring의 존재를 확인하였다.  $^1\text{H-NMR}$ 에서 8.03-6.82 ppm에서 9개의 aromatic proton을, 1.24 ppm에서 1개의 methyl 기를 확인하였고, 4.57 - 3.26 ppm 에서의 겹쳐진 신호들로부터 당의 존재를 확인할 수 있었다.

$^{13}\text{C}$ -NMR에서는 167.8, 168.2 ppm에서의 2개의 ester 기를 포함한 총 30개의 피크를 확인하였다. 이 화합물은 benzoyl 기의 결합위치를 제외한 나머지 구조가 화합물 16과 매우 유사하였으며 2D 스펙트럼을 통해 benzoyl 기의 결합위치를 확인하였다. 이상의 data는 기존문헌<sup>50,56)</sup>에서 보고한 것과 동일하였으므로,  $\beta$ -benzoyloxypaeoniflorin로 동정하였다.



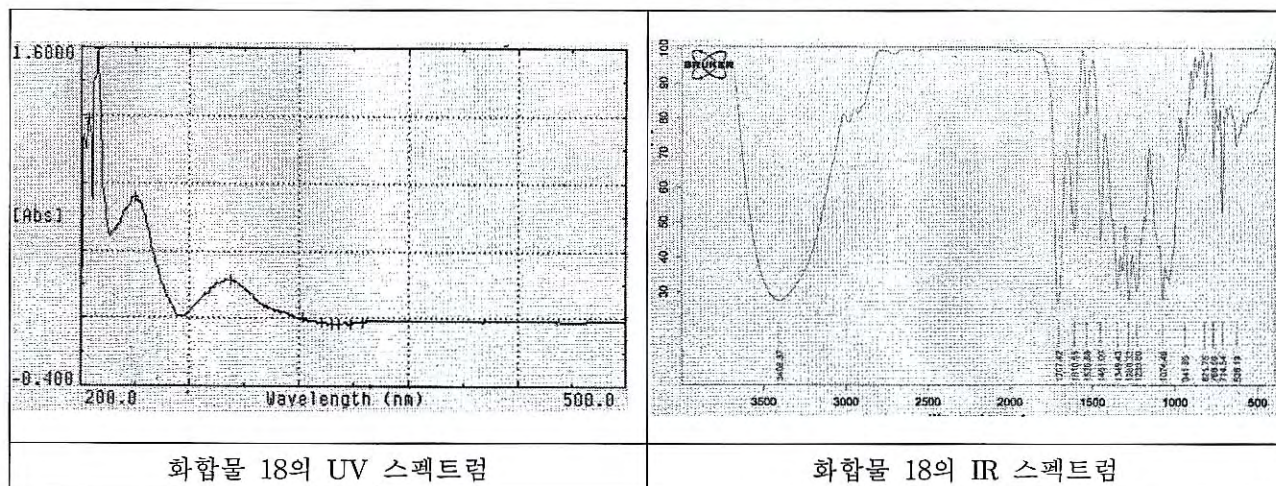
Colorless amorphous powder. IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$ : 3423 (OH), 2893 (C-O), 1706 (C=O), 1608, 1452 (C=C), 1281 (C-O), 1102 (glycosidic C-O), 714  $\text{cm}^{-1}$  UV (MeOH, 0.02)  $\lambda_{\text{max}}$ : 200 (4.6), 204 (4.7), 213 (4.8), 241 (4.4), 250 (4.3), 268 (4.5) nm;  $^1\text{H}$ -NMR (300 MHz, MeOD)  $\delta$ : 1.24 (3H, s, H-10), 1.69 (2H, br d,  $J = 10.2$  Hz, H-7a), 1.71 (1H, d,  $J = 12.6$  Hz, H-3a), 1.85 (1H, d,  $J = 12.6$  Hz, H-3b), 2.42 (1H, m, H-7b), 2.43 (1H, d,  $J = 6.3$  Hz, H-5), 3.26 (1H, t,  $J = 8.3, 7.6$  Hz, H-2'), 3.34 (1H, d,  $J = 6.8$  Hz, H-4'), 3.39 (1H, d,  $J = 8.3, 6.8$  Hz, H-3'), 3.59 (1H, dd,  $J = 7.5, 6.8$  Hz, H-5'), 4.49 (1H, dd,  $J = 11.7, 6.9$  Hz, H-6'a), 4.57 (1H, d,  $J = 7.6$  Hz, H-1'), 4.65 (2H, brs, H-8), 4.67 (1H, dd,  $J = 11.7$  Hz, H-6'b), 5.36 (1H, s, H-9), 6.82 (2H, d,  $J = 8.7$  Hz, H-3''', 5'''), 7.47 (2H, t,  $J = 8.0$  Hz, H-3'', 5''), 7.60 (1H, t,  $J = 8.0$  Hz, H-4''), 7.89 (2H, d,  $J = 8.7$  Hz, H-2''', 6'''), 8.03 (2H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-2'', 6'');  $^{13}\text{C}$ -NMR (75 MHz, MeOD)  $\delta$ : 19.7 (3H, s, 7-CH<sub>3</sub>), 23.2 (C-7), 43.9 (C-3), 44.6 (C-5), 61.3 (C-8), 65.3 (C-6'), 72.1 (C-6), 72.2 (C-4'), 75.1 (C-5'), 75.3 (C-2'), 78.0 (C-3'), 87.2 (C-2), 89.4 (C-1), 100.2 (C-1'), 102.4 (C-9), 106.3 (C-4), 116.3 (C-3''', 5'''), 122.1 (C-1'''), 129.8 (C-3'', 5''), 130.7 (C-2'', 6''), 131.5 (C-1''), 133.1 (C-2''', 6'''), 134.6 (C-4''), 163.9 (C-4'''), 167.8 (C-7'''), 168.2 (C-7''); ESIMS  $m/z$ : 623 [M + Na]<sup>+</sup>, 599 [M - H]<sup>-</sup>.



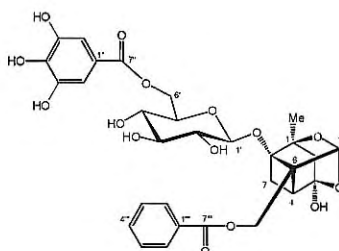
### 화합물 18

무색의 분말로서, ESIMS 스펙트럼에서  $m/z$  655  $[M + Na]^+$ 에서 이온 피크가 관찰되었다. IR 스펙트럼에서는  $3406\text{ cm}^{-1}$ 에서 -OH기,  $1707\text{ cm}^{-1}$ 에서는 C=O group, 1610,  $1451\text{ cm}^{-1}$ 에서 aromatic ring의 존재를 확인하였다.  $^1\text{H-NMR}$ 에서 8.02-7.08 ppm에서 7개의 aromatic proton을, 1.26 ppm에서 1개의 methyl기를 확인하였고, 4.54 - 3.34 ppm에서의 겹쳐진 신호들로부터 당의 존재를 확인할 수 있었다.

$^{13}\text{C-NMR}$ 에서는 168.1, 168.2 ppm에서의 2개의 ester 기를 포함한 총 30개의 피크를 확인하였다. 이상의 data는 기존문헌<sup>52,53)</sup>에서 보고한 것과 동일하였으므로, galloylpaeoniflorin로 동정하였다.



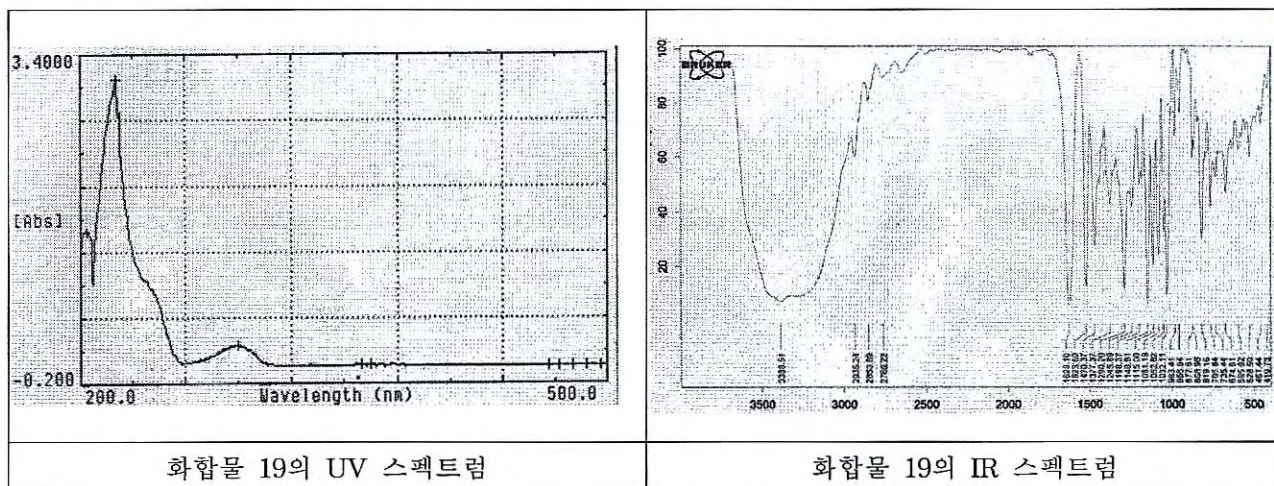
Colorless amorphous powder. IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$ : 3406 (OH), 1707 (C=O), 1610, 1451 (C=O), 1349, 1280, 1230 (C-O), 1074 (glycosidic C-O),  $768\text{ cm}^{-1}$  UV  $\lambda_{\text{max}}$  (MeOH, 0.02): 205 (4.6), 210 (4.7), 230 (4.4), 283 (3.8), 322 (3.7) nm;  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz, MeOD)  $\delta$ : 1.26 (3H, s, H-10), 1.71 (1H, dd,  $J = 12.6$  Hz, H-3a), 1.75 (1H, d,  $J = 10.6$  Hz, H-7a), 1.92 (1H, d,  $J = 12.6$  Hz, H-3b), 2.43 (1H, dd,  $J = 10.6$ , 6.6 Hz, H-7b), 2.52 (1H, d,  $J = 6.6$  Hz, H-5), 3.34 (4 x OH), 3.34-3.36 (3H, m, H-2', 3', 4'), 3.58 (1H, m, H-5'), 4.46 (1H, dd,  $J = 11.7$ , 6.6 Hz, H-6'a), 4.51 (1H, d,  $J = 11.7$  Hz, H-6'b), 4.54 (1H, d,  $J = 7.5$  Hz, H-1'), 4.70 (2H, br s, H-8a, 8b), 5.38 (1H, s, H-9), 7.08 (2H, s, H-2'', 6''), 7.49 (2H, t,  $J = 7.6$  Hz, H-3''', 5'''), 7.61 (2H, t,  $J = 7.6$  Hz, H-4'''), 8.02 (2H, dd,  $J = 7.5$ , 1.2 Hz, H-2''', 6''');  $^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz, MeOD)  $\delta$ : 19.7 (C-10), 23.1 (C-7), 43.9 (C-3), 44.5 (C-5), 61.8 (C-8), 64.8 (C-6'), 72.1 (C-6), 72.2 (C-4'), 75.1 (C-2'), 75.3 (C-5'), 78.0 (C-3'), 87.3 (C-2), 89.5 (C-1), 100.2 (C-1'), 102.3 (C-9), 106.4 (C-4), 110.3 (C-2'', 6''), 121.5 (C-1''), 129.7 (C-3''', 5'''), 130.8 (C-2''', 6'''), 131.3 (C-1'''), 134.5 (C-4'''), 140.1 (C-4''), 146.7 (C-3'', 5'), 168.1 (C-7'''), 168.2 (C-7''); ESIMS  $m/z$ : 655  $[M + Na]^+$ , 631  $[M - H]^-$ .



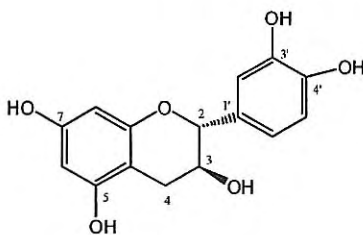
### 화합물 19

백색의 분말로서, ESIMS 스펙트럼에서  $m/z$  289  $[M - H]^-$ 에서 이온 피크가 관찰되었다. IR 스펙트럼에서는  $3300\text{ cm}^{-1}$ 에서 -OH기,  $1659\text{ cm}^{-1}$ 에서는 C=O group, 1600, 1500,  $1440\text{ cm}^{-1}$ 에서 aromatic ring의 존재를 확인하였다.  $^1\text{H-NMR}$ 에서 6.84-5.86 ppm에서 5개의 aromatic proton을 확인할 수 있었다.

$^{13}\text{C-NMR}$ 에서는 12개의 aromatic carbon을 포함한 총 15개의 피크를 확인하였다. 이상의 data는 기존 문헌<sup>54,55</sup>에서 보고한 것과 동일하였으므로, (+)-catechin로 동정하였다.



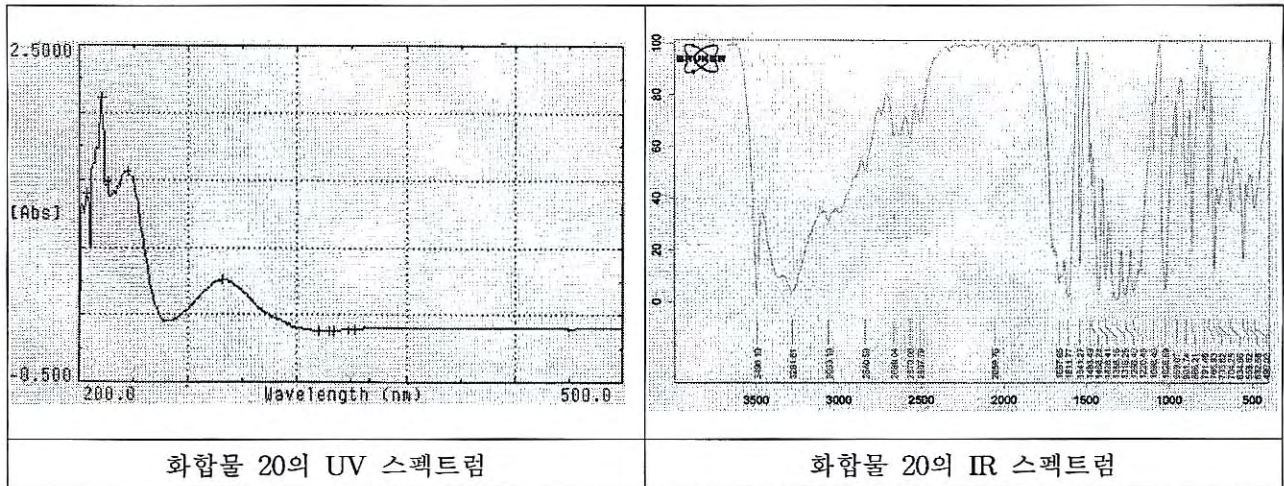
White amorphous powder. mp 173 - 175 °C; IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$ : 3300 (OH), 1600, 1500, 1440 (C=C), 1150, 1138, 1000, 840  $\text{cm}^{-1}$  UV (MeOH, 0.02)  $\lambda_{\text{max}}$ : 200 (4.3), 204 (4.4), 221 (4.7), 250 (3.7), 290 (3.5), 300 (3.3) nm;  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, MeOD)  $\delta$ : 2.51 (1H, dd,  $J = 8.4, 16.0$  Hz, H-4b), 2.85 (1H, dd,  $J = 5.6, 16.0$  Hz, H-4a), 3.98 (1H, m, H-3), 4.58 (1H, d,  $J = 7.2$  Hz, H-2), 5.86 (1H, d,  $J = 2.0$  Hz, H-6), 5.93 (1H, d,  $J = 2.0$  Hz, H-8), 6.72 (1H, dd,  $J = 2.0, 10.0$  Hz, H-6'), 6.75 (1H, dd,  $J = 2.0, 10.0$  Hz, H-5'), 6.84 (1H, d,  $J = 2.0$  Hz, H-2');  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz, MeOD)  $\delta$ : 28.6 (C-4), 68.9 (C-3), 82.9 (C-2), 95.6 (C-8), 96.4 (C-6), 100.5 (C-10), 115.4 (C-5'), 116.2 (C-2'), 120.2 (C-6'), 132.3 (C-1'), 146.3 (C-4'), 146.4 (C-3'), 157.0 (C-7), 157.7 (C-5), 157.9 (C-9); ESIMS  $m/z$ : 289  $[M - H]^-$ .



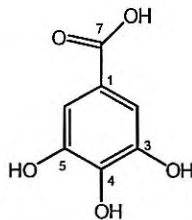
### 화합물 20

무색의 분말로서, ESIMS 스펙트럼에서  $m/z$  169  $[M - H]^-$ 에서 이온 피크가 관찰되었다. IR 스펙트럼에서는  $3496, 3281\text{ cm}^{-1}$ 에서 -OH기,  $1667\text{ cm}^{-1}$ 에서는 C=O group, 1611, 1541,  $1426\text{ cm}^{-1}$ 에서 aromatic ring의 존재를 확인하였다.  $^1\text{H-NMR}$ 에서 7.09 ppm에서 2개의 겹쳐진 aromatic proton을 확인하였다.

$^{13}\text{C}$ -NMR에서는 170.6 ppm에서의 COOH 기를 포함한 총 7개의 피크를 확인하였다. 이상의 data는 기존 문헌<sup>53)</sup>에서 보고한 것과 동일하였으므로, gallic acid로 동정하였다.

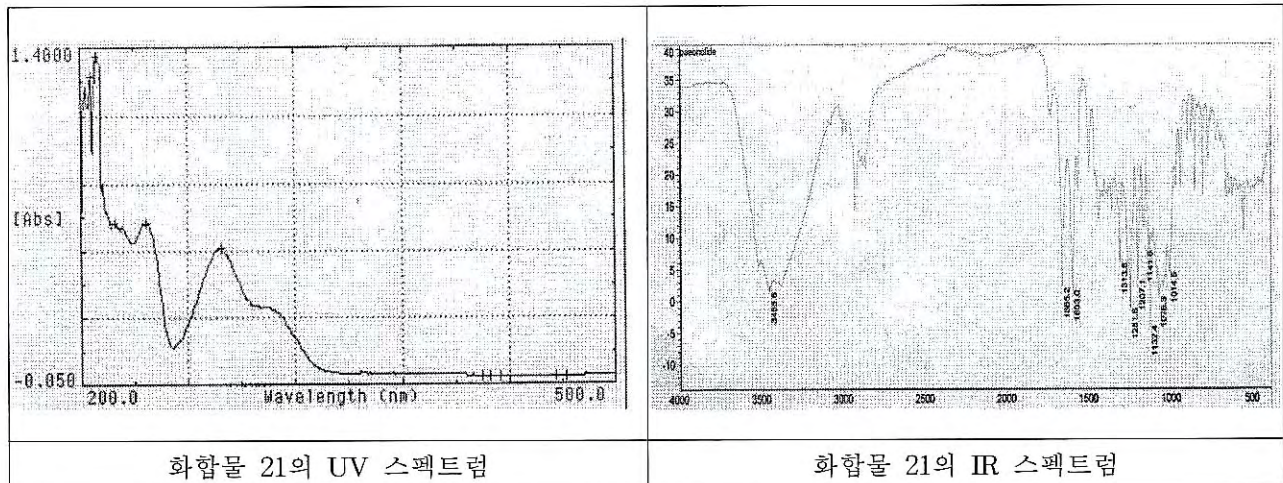


Colorless amorphous powder. mp 250 - 251 °C; IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$ : 3496, 3281 (OH), 3063, 2669 (C-H), 1667 (C=O), 1611, 1541, 1426 (C=C), 1318, 1026, 866, 733  $\text{cm}^{-1}$  UV  $\lambda_{\text{max}}$  (MeOH, 0.02): 205 (4.0), 213 (4.2), 216 (4.0), 227 (4.1), 279 (3.5) nm;  $^1\text{H}$ -NMR (400 MHz, MeOD)  $\delta$ : 7.09 (2H, s, H-2, 6);  $^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz, MeOD)  $\delta$ : 110.5 (C-2, 6), 121.9 (C-1), 139.7 (C-4), 146.4 (C-3, 5), 170.6 (C-7); ESIMS  $m/z$ : 169 [M - H].

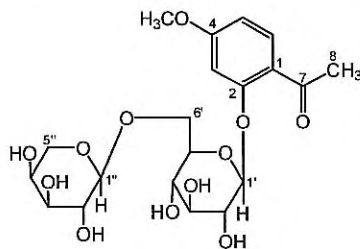


### 화합물 21

무색의 분말로서, ESIMS 스펙트럼에서  $m/z$  459 [M-H]<sup>-</sup>에서 이온 피크가 관찰되었다. IR 스펙트럼에서는 3455  $\text{cm}^{-1}$ 에서 -OH기, 1665  $\text{cm}^{-1}$ 에서는 C=O group, 1603, 1313, 1251, 1132  $\text{cm}^{-1}$ 에서 aromatic ring의 존재를 확인하였다.  $^1\text{H}$ -NMR에서 7.49-6.56 ppm에서 3개의 aromatic proton을, 3.88 ppm에서 1개의 methoxy 기, 2.65 ppm에서 1개의 methyl 기를 확인하였으며, 5.05 - 3.36 ppm에서의 겹쳐진 신호들로부터 당의 존재를 확인할 수 있었다.  $^{13}\text{C}$ -NMR에서는 200.7 ppm에서의 ester 기를 포함한 총 20개의 피크를 확인하였다. 이상의 data는 기존문헌<sup>53)</sup>에서 보고한 것과 동일하였으므로, peanolid로 동정하였다.



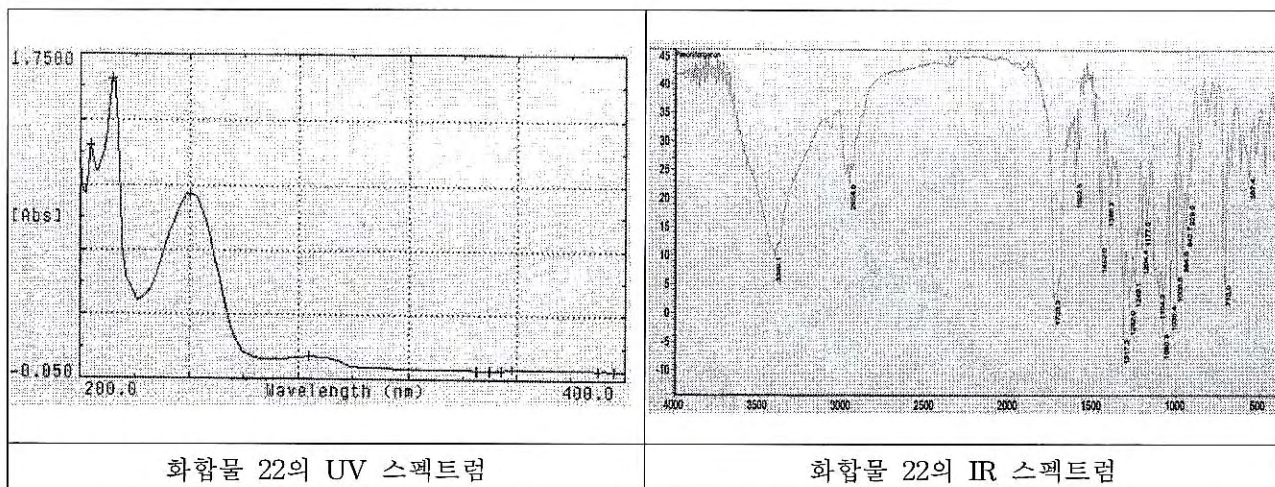
White amorphous powder. mp 157 - 158 °C;  $[\alpha]_D^{20}$  -18.2 (*c* 0.42, MeOH); IR (KBr)  $\nu_{\max}$ : 3455, 1665, 1603, 1313, 1251, 1132, 1078, 1014  $\text{cm}^{-1}$  UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ): 206 (4.4), 209 (4.5), 219 (4.2), 237 (4.2), 279 (4.1), 300 (3.8) nm;  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz, MeOD)  $\delta$ : 2.65 (3H, s, H-8), 3.39 (1H, d,  $J$  = 9.2 Hz, H-4'), 3.45 (1H, dd,  $J$  = 6.3, 2.1 Hz, H-5''a), 3.49 (1H, m, H-3'), 3.52 (1H, m, H-4''), 3.55 (1H, dd,  $J$  = 9.0, 6.3 Hz, H-5''b), 3.56 (1H, t,  $J$  = 8.0 Hz, H-3''), 3.73 (1H, ddd,  $J$  = 9.2, 6.4, 2.0 Hz, H-5'), 3.76 (1H, m, H-2''), 3.78 (1H, m, H-2'), 3.83 (1H, dd,  $J$  = 11.4, 6.4 Hz, H-6'a), 3.88 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 4.12 (1H, dd,  $J$  = 11.4, 2.0 Hz, H-6'b), 4.61 (1H, d,  $J$  = 6.6 Hz, H-1''), 5.05 (1H, d,  $J$  = 7.5 Hz, H-1'), 6.56 (1H, d,  $J$  = 2.1 Hz, H-3), 6.72 (1H, dd,  $J$  = 8.7, 2.1 Hz, H-5), 7.49 (1H, d,  $J$  = 8.7 Hz, H-6);  $^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz, MeOD)  $\delta$ : 32.3 (C-8), 56.6 (OCH<sub>3</sub>), 66.9 (C-5''), 69.6 (C-4''), 70.0 (C-6'), 71.5 (C-2''), 72.6 (C-4'), 74.4 (C-2'), 75.0 (C-3''), 77.6 (C-5'), 78.3 (C-3'), 102.6 (C-1'), 103.2 (C-3), 105.3 (C-1''), 109.5 (C-5), 123.0 (C-1), 133.2 (C-6), 160.6 (C-2), 166.4 (C-4), 200.7 (C-7); ESIMS  $m/z$ : 459 [M-H]<sup>-</sup>.



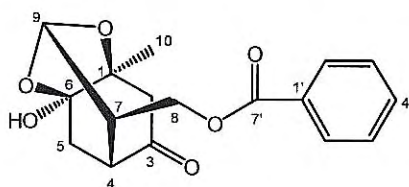
## 화합물 22

무색의 액체로서, ESIMS 스펙트럼에서  $m/z$  318 [M]<sup>+</sup>에서 이온 피크가 관찰되었다. IR 스펙트럼에서는 3399  $\text{cm}^{-1}$ 에서 -OH기, 1728  $\text{cm}^{-1}$ 에서는 C=O group, 1452, 1317, 1282, 1249  $\text{cm}^{-1}$ 에서 aromatic ring의 존재를 확인하였다.  $^1\text{H-NMR}$ 에서 8.01-7.48 ppm에서 5개의 aromatic proton을, 1.26 ppm에서 1개의 methyl 기를 확인하였다.  $^{13}\text{C-NMR}$ 에서는 212.7 ppm에서의 ketone 기, 167.8 ppm에서의 ester 기를 포

함한 총 17개의 피크를 확인하였다. 이상의 data는 기존문헌<sup>44)</sup>에서 보고한 것과 동일하였으므로, peoniflorigenone로 동정하였다.



Colorless viscous oil;  $[\alpha]_D^{25} +4.3$  (*c* 0.69, MeOH); IR (KBr)  $\text{max}$ : 3399, 2912, 1728, 1452, 1317, 1282, 1249, 1204, 1177, 1104, 1080, 1035, 964, 942, 713  $\text{cm}^{-1}$ ; UV (MeOH)  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\log \epsilon$ ): 204 (4.3), 212 (4.4), 240 (4.2), 250 (4.0), 284 (3.1), 300 (2.6) nm;  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz, MeOD)  $\delta$ : 1.26 (3H, s, H-10), 2.26 (1H, dd,  $J = 13.5, 2.7$  Hz, H-5a), 2.34 (1H, dd,  $J = 13.5, 2.7$  Hz, H-5b), 2.40 (1H, m, H-7), 2.54 (1H, d,  $J = 17.6$  Hz, H-2a), (1H, d,  $J = 17.6$  Hz, H-2b), 2.86 (1H, m, H-4), 4.02 (1H, dd,  $J = 11.4, 7.3$  Hz, H-8a), 4.26 (1H, dd,  $J = 11.4, 7.3$  Hz, H-8b), 5.41 (1H, s, H-9), 7.48 (2H, dd,  $J = 7.5, 1.5$  Hz, H-3', 5'), 7.60 (1H, dd,  $J = 7.6, 1.2$  Hz, H-4'), 8.01 (2H, dd,  $J = 7.5, 1.2$  Hz, H-2', 6');  $^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz, MeOD)  $\delta$ : 21.4 (C-10), 34.5 (C-5), 43.2 (C-4), 46.5 (C-2), 47.1 (C-7), 62.9 (C-8), 78.9 (C-1), 99.8 (C-9), 101.8 (C-6), 129.8 (C-3', 5'), 131.3 (C-1'), 130.7 (C-2', 6'), 134.5 (C-4'), 167.8 (C-7'), 212.7 (C-3); ESIMS  $m/z$ : 318  $[\text{M}]^+$ .

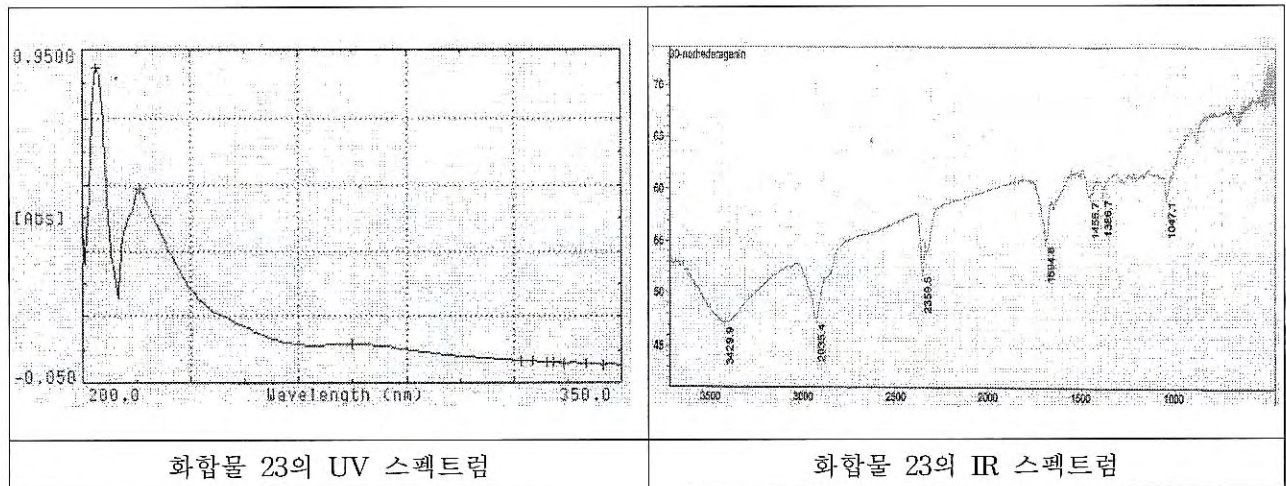


### 화합물 23

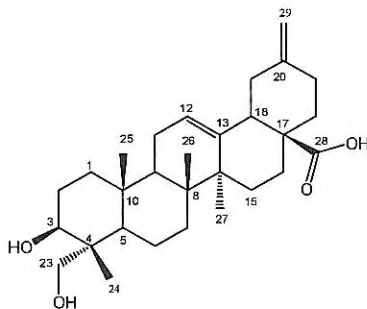
무색의 분말로서, IR 스펙트럼에서는  $3429 \text{ cm}^{-1}$ 에서 -OH기의 존재를,  $1694 \text{ cm}^{-1}$ 에서는 C=O group의 존재를,  $1455 \text{ cm}^{-1}$ 에서 olefinic group의 존재를 확인하였다.  $^1\text{H-NMR}$ 에서 1.21 - 0.71 ppm에서의 특징적인 4개의 methyl 기로부터 triterpene 구조를 예상할 수 있었으며, 5.51, 4.61 ppm에서 olefinic proton, 2.75 ppm에서 oxygenated methine, 3.53, 2.54 ppm에서 쌍을 이룬 oxygenated methylene proton의 존재를 확인하였다.  $^{13}\text{C-NMR}$ 에서는 181.1 ppm에서의 COOH, 107.4, 124.4, 144.8, 149.9, ppm에서의



olefinic carbon, 67.6, 74.1 ppm에서의 oxygenated carbon을 포함한 총 29개의 피크를 확인할 수 있었다. 이상의 data는 기존문헌<sup>54,55)</sup>에서 보고한 것과 동일하였으므로, 30-norhederagenin로 동정하였다.



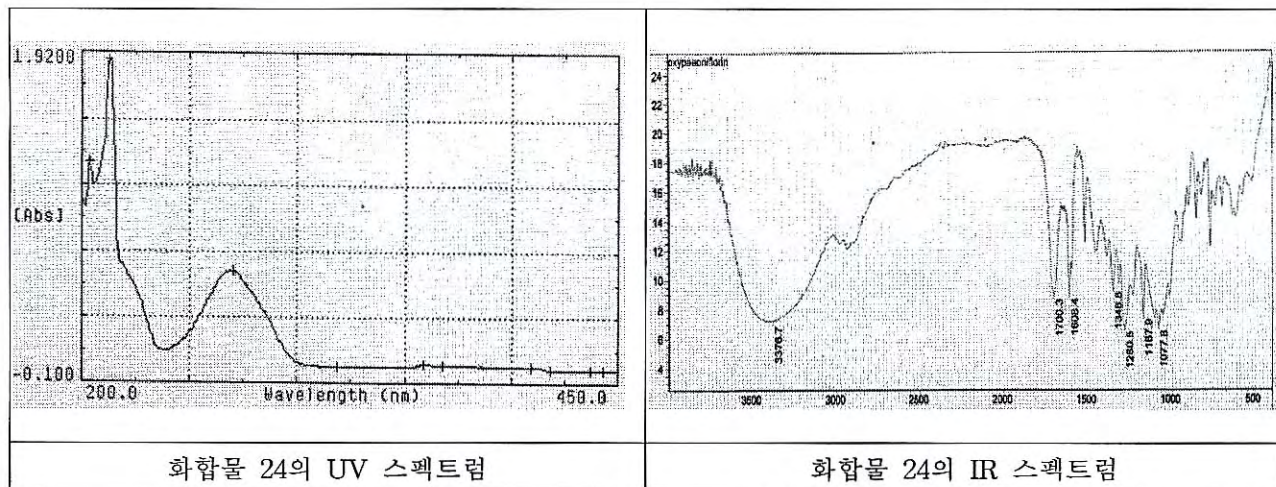
White amorphous powder; mp 249 - 251°C;  $[\alpha]_D^{21} +109.6$  (*c* 0.31, pyridine); IR (KBr)  $\nu_{\max}$ : 3429, 2935, 2359, 1694, 1455, 1386, 1047  $\text{cm}^{-1}$  UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  ( $\log \epsilon$ ): 204 (4.0) nm;  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, MeOD)  $\delta$ : 0.71 (3H, s, H-24), 0.83 (3H, s, H-25), 0.98 (3H, s, H-26), 1.21 (3H, s, H-27), 2.54 (1H, t,  $J = 13.8$  Hz, H-23a), 2.75 (1H, br dd,  $J = 12.6, 3.8$  Hz, H-3), 3.53 (1H, d,  $J = 13.8$  Hz, H-23b), 4.61 (2H, s, H-29), 5.51 (1H, d,  $J = 3.6$  Hz, H-12);  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz, MeOD)  $\delta$ : 12.8 (24-CH<sub>3</sub>), 16.4 (25-CH<sub>3</sub>), 17.9 (26-CH<sub>3</sub>), 19.3 (C-6), 24.4 (C-16), 24.6 (C-11), 26.6 (27-CH<sub>3</sub>), 27.6 (C-2), 29.0 (C-15), 31.1 (C-22), 33.6 (C-7), 38.1 (C-10), 39.3 (C-21), 39.6 (C-1), 40.7 (C-8), 42.8 (C-19), 43.1 (C-14), 43.4 (C-4), 48.9 (C-17), 49.2 (C-18), 49.4 (C-9), 49.7 (C-5), 67.6 (C-23), 74.1 (C-3), 107.4 (C-29), 124.4 (C-12), 144.8 (C-13), 149.9 (C-20), 181.1 (C-28); ESIMS  $m/z$ : 455 [M - H]<sup>-</sup>.



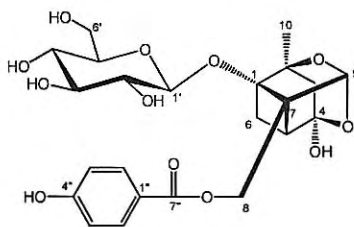
#### 화합물 24

무색의 분말로서, ESIMS 스펙트럼에서  $m/z$  623 [M + Na]<sup>+</sup>에서 이온 피크가 관찰되었다. IR 스펙트럼에서는 3376  $\text{cm}^{-1}$ 에서 -OH기, 1700  $\text{cm}^{-1}$ 에서는 C=O group, 1608, 1348, 1280  $\text{cm}^{-1}$ 에서 aromatic ring의 존재를 확인하였다.  $^1\text{H-NMR}$ 에서 7.91-6.84 ppm에서 4개의 aromatic proton을, 1.78 ppm에서 1개의

methyl 기를 확인하였고, 4.53 - 3.19 ppm 에서의 겹쳐진 신호들로부터 당의 존재를 확인할 수 있었다. 이상의 data는 기존문헌<sup>50,53)</sup>에서 보고한 것과 동일하였으므로, oxypeoniflorin로 동정하였다.



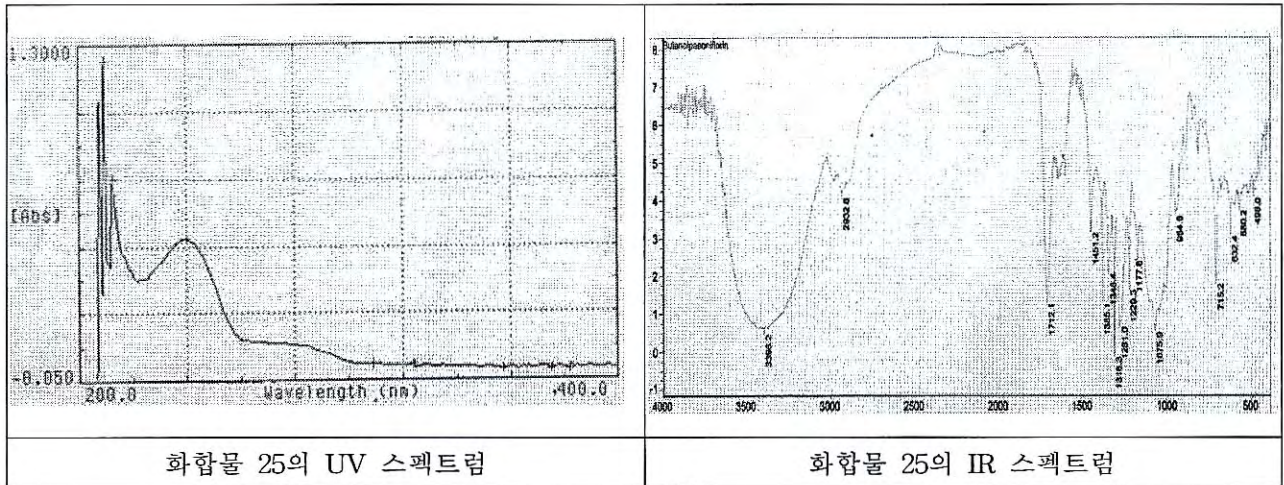
White amorphous powder.  $[\alpha]_D^{22}$  -13.0 (*c* 0.92, MeOH); IR (KBr)  $\text{max}$ : 3376, 1700, 1608, 1348, 1280, 1167, 1077  $\text{cm}^{-1}$  UV (MeOH)  $\lambda_{\text{max}}$  (log  $\epsilon$ ): 204 (4.5), 213 (4.7), 250 (3.7), 270 (4.2), 300 (2.9), 359 (2.7) nm;  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz, MeOD)  $\delta$ : 1.78 (3H, s, H-10), 1.93 (1H, dd,  $J$  = 11.7, 1.2 Hz, H-6a), 1.93 (1H, d,  $J$  = 10.8 Hz, H-3a), 2.15 (1H, d,  $J$  = 10.8 Hz, H-3b), 2.48 (1H, d,  $J$  = 11.7 Hz, H-6b), 2.57 (1H, d,  $J$  = 6.6 Hz, H-5), 3.19 (1H, m, H-2'), 3.22 (1H, m, H-3'), 3.28 (1H, m, H-4'), 3.51 (1H, m, H-6'a), 3.61 (1H, dd,  $J$  = 7.3, 6.9 Hz, H-5'), 3.64 (1H, dd,  $J$  = 11.7, 10.0 Hz, H-6'b), 4.53 (1H, d,  $J$  = 7.5 Hz, H-1'), 4.69 (2H, s, H-8), 5.40 (1H, s, H-9), 6.84 (2H, dd,  $J$  = 9.2, 2.6 Hz, H-3'', 5''), 7.91 (2H, d,  $J$  = 9.2, 2.6 Hz, H-2'', 6'');  $^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz, MeOD)  $\delta$ : 19.7 (C-10), 23.6 (C-6), 44.1 (C-3), 44.7 (C-5), 61.4 (C-8), 63.0 (C-6'), 71.9 (C-7), 72.4 (C-4'), 75.1 (C-2'), 78.2 (C-2'), 78.1 (C-5'), 78.2 (C-3'), 87.4 (C-2), 89.4 (C-1), 100.4 (C-1'), 102.4 (C-9), 116.4 (C-3'', 5''), 133.1 (C-2'', 6''), 122.2 (C-1''), 163.8 (C-4''), 168.2 (C-7''); ESIMS  $m/z$ : 519  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ .



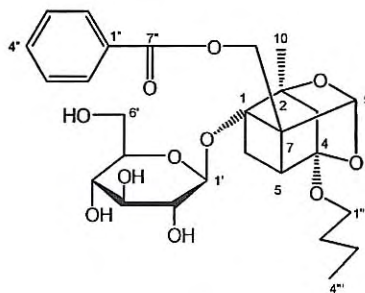
## 화합물 25

무색의 분말로서, ESIMS 스펙트럼에서  $m/z$  536  $[\text{M}]^+$ 에서 이온 피크가 관찰되었다. IR 스펙트럼에서는 3396  $\text{cm}^{-1}$ 에서 -OH기, 1712  $\text{cm}^{-1}$ 에서는 C=O group, 1600, 1451  $\text{cm}^{-1}$ 에서 aromatic ring의 존재를 확인하였다.  $^1\text{H-NMR}$ 에서 8.05-7.40 ppm에서 5개의 aromatic proton을, 1.38 ppm에서 1개의 methyl 기를 확인하였고, 4.56 - 3.22 ppm 에서의 겹쳐진 신호들로부터 당의 존재를 확인할 수 있었다. 이 화합

물은 paeoniflorin과 그 구조가 매우 유사하였으며, 4번 탄소의 -OH기에 치환된 butyl 기는 2D 스펙트럼을 통해 확인하였다. 이상의 data를 기존문헌<sup>45,56)</sup>과 비교하여 4-O-n-butylpaeoniflorin로 동정하였다.

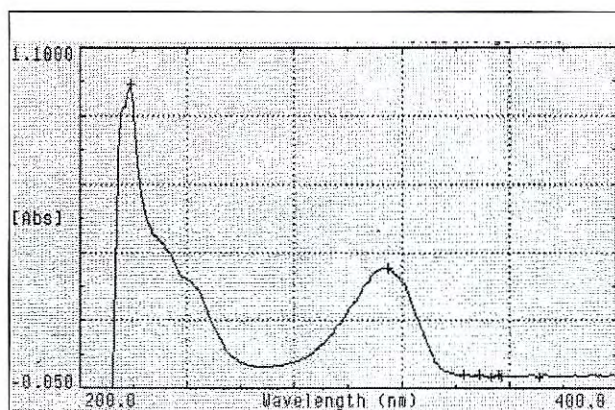


White foam; mp 173 - 175 °C;  $[\alpha]_D^{25}$  -7.8 (*c* 0.14, MeOH); IR (KBr)  $\nu_{\max}$  3396 (OH), 2932, 1712 (C=O), 1600, 1451 (C=C), 1281, 1229 (C-O), 1075, 955 (glycosidic C-O), 715  $\text{cm}^{-1}$  UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ): 200 (4.41), 210 (4.52), 253 (4.31), 240 (3.14), 250 (3.96) nm  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz, MeOD)  $\delta$ : 0.90 (3H, m, H-4'''), 1.32 (2H, m, H-3'''), 1.38 (3H, s, H-10), 1.53 (2H, q,  $J = 6.5$  Hz, H-2'''), 1.93 (1H, d,  $J = 12.2$  Hz, H-3a), 1.93 (1H, d,  $J = 11.2$  Hz, H-6a), 2.15 (1H, d,  $J = 12.2$  Hz, H-3b), 2.49 (1H, d,  $J = 11.2$  Hz, H-6b), 2.77 (1H, dd,  $J = 6.6, 1.2$  Hz, H-5), 3.56 (2H, m, H-1'''), 3.22-3.61 (4H, m, H-2', 3', 4', 5'), 3.64 (1H, dd,  $J = 11.7, 6.3$  Hz, H-6'a), 3.85 (1H, d,  $J = 11.7$  Hz, H-6'b), 4.56 (1H, d,  $J = 7.5$  Hz, H-1'), 4.76 (2H, s, H-8), 5.44 (1H, s, H-9), 7.49 (2H, t,  $J = 8.0$  Hz, H-3'', 5''), 7.62 (1H, t,  $J = 8.0$  Hz, H-4''), 8.05 (2H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-2'', 6'');  $^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz, MeOD)  $\delta$ : 14.3 (C-4'''), 20.2 (C-3'''), 20.8 (C-10), 23.6 (C-6), 33.2 (C-2'''), 64.5 (C-1'''), 41.9 (C-3), 42.9 (C-5), 61.9 (C-6'), 63.1 (C-8), 71.9 (C-7), 72.0 (C-4'), 75.2 (C-5'), 78.2 (C-2'), 78.3 (C-3'), 87.4 (C-2), 89.4 (C-1), 100.4 (C-1'), 102.7 (C-9), 109.5 (C-4), 129.8 (C-3'', 5''), 130.8 (C-2'', 6''), 131.4 (C-1''), 134.6 (C-4''), 168.1 (C-7''); ESIMS  $m/z$ : 536 [M]<sup>+</sup>.

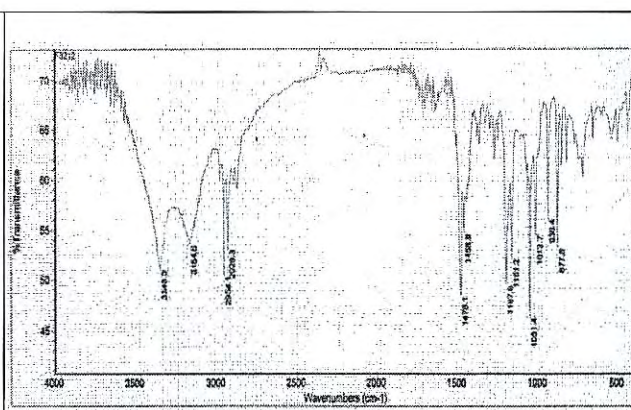


## 화합물 26

백색의 분말로서, ESIMS 스펙트럼에서  $m/z$  180  $[M]^+$ 에서 이온 피크가 관찰되었다. IR 스펙트럼에서는 3348, 3164  $\text{cm}^{-1}$ 에서 -OH기, 1478, 1197, 1161  $\text{cm}^{-1}$ 에서 aromatic ring의 존재를 확인하였다.  $^1\text{H-NMR}$ 에서 6.66-6.46 ppm에서 2개의 aromatic proton을, 2.11 ppm에서 1개의 methyl 기, 3.69, 3.54 ppm에서 쌍을 이룬 2개의 oxygenated methylene proton을 확인하였다.  $^{13}\text{C-NMR}$ 에서는 154.9-111.9 ppm에서의 6개의 aromatic carbon을 포함한 총 10개의 피크를 확인하였다. 이상의 data를 기존문헌<sup>57)</sup>과 비교하여 5-hydroxy-3-hydroxymethylene-2,3-dihydrobenzofuran로 동정하였다.

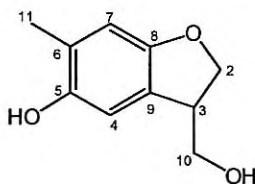


화합물 26의 UV 스펙트럼



화합물 26의 IR 스펙트럼

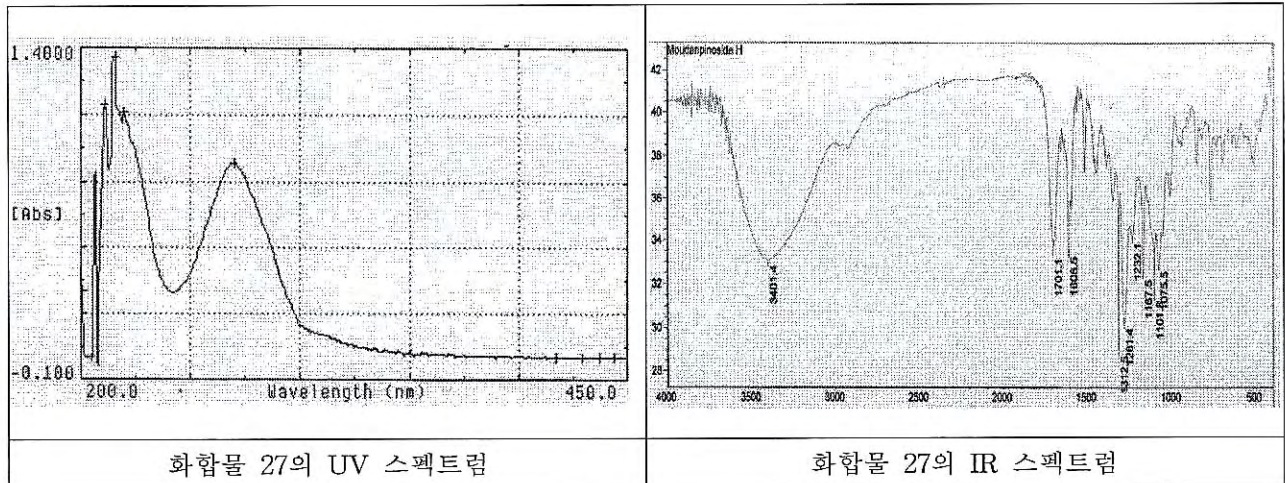
White powder; mp 90-91 °C;  $[\alpha]_D^{25} +6.7$  ( $c$  0.16, MeOH); IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$ : 3348, 3164 (OH), 2954, 1478 (C=C), 1197, 1161, 1051, (C-O), 877  $\text{cm}^{-1}$  UV (MeOH)  $\lambda_{\text{max}}$  (log  $\epsilon$ ): 219 (3.94), 250 (3.17), 300 (3.28), 315 (3.51) nm  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz, MeOD)  $\delta$ : 2.11 (3H, s, H-11), 3.48 (1H, m, H-3), 3.54 (1H, dd,  $J = 10.2, 7.8$  Hz, H-10a), 3.69 (1H, dd,  $J = 10.2, 5.4$  Hz, H-10b), 4.33 (1H, dd,  $J = 8.7, 5.2$  Hz, H-2a), 4.51 (1H, dd,  $J = 9.0, 8.7$  Hz, H-2b), 6.46 (1H, s, H-7), 6.66 (1H, s, H-4);  $^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz, MeOD)  $\delta$ : 16.8 (C-11), 46.7 (C-3), 65.8 (C-10), 75.4 (C-2), 111.9 (C-4), 112.6 (C-7), 125.7 (C-6), 126.8 (C-9), 150.2 (C-5), 154.9 (C-8); ESIMS  $m/z$ : 180  $[M]^+$ .



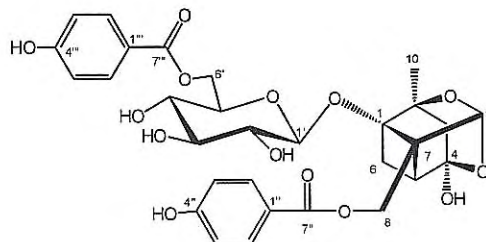
## 화합물 27

무색의 분말로서, ESIMS 스펙트럼에서  $m/z$  615  $[M - H]^-$ 에서 이온 피크가 관찰되었다. IR 스펙트럼에서는 3401  $\text{cm}^{-1}$ 에서 -OH기, 1701  $\text{cm}^{-1}$ 에서는 C=O group, 1608, 1452  $\text{cm}^{-1}$ 에서 aromatic ring의 존재를 확인하였다.  $^1\text{H-NMR}$ 에서 7.89-6.82 ppm에서 8개의 aromatic proton을, 1.25 ppm에서 1개의 methyl

기를 확인하였고, 4.55 - 3.22 ppm 에서의 겹쳐진 신호들로부터 당의 존재를 확인할 수 있었다.  $^{13}\text{C}$ -NMR에서는 167.9, 168.1 ppm에서의 2개의 ester 기를 포함한 총 30개의 피크를 확인하였다. 이상의 data는 기존문헌<sup>45,57)</sup>에서 보고한 것과 동일하였으므로, mudanpinoside H로 동정하였다.



White amorphous powder; mp 159 - 161°C;  $[\alpha]_{\text{D}} -10.5$  ( $c$  0.23, MeOH); IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$ : 3401 (OH), 2893 (C-O), 1701 (C=O), 1608, 1452 (C=C), 1281 (C-O), 1102(glycosidic C-O),  $770\text{ cm}^{-1}$  UV (MeOH)  $\lambda_{\text{max}}$  (log  $\epsilon$ ): 201 (4.0), 211 (4.4), 216 (4.7), 220 (4.5), 250 (4.2), 270 (4.0), 300 (4.1) nm;  $^1\text{H}$ -NMR (300 MHz, MeOD)  $\delta$ : 1.25 (3H, s, H-10), 1.69 (1H, d,  $J$  = 11.6 Hz, H-6a), 1.70 (1H, d,  $J$  = 12.6 Hz, H-3a), 1.88 (1H, d,  $J$  = 12.6 Hz, H-3b), 2.44 (1H, d,  $J$  = 6.6 Hz, H-5), 2.49 (1H, d,  $J$  = 11.6 Hz, H-6b), 3.22-3.38 (3H, m, H-2', 3', 4'), 3.59 (1H, dd,  $J$  = 7.3, 6.9 Hz, H-5'), 4.44 (1H, dd,  $J$  = 11.6, 7.3 Hz, H-6'a), 4.55 (1H, d,  $J$  = 7.2 Hz, H-1'), 4.58 (1H, dd,  $J$  = 11.6, 2.2 Hz, H-6'b), 4.65 (2H, s, H-8), 5.36 (1H, s, H-9), 6.82 (2H, d,  $J$  = 8.7 Hz, H-3''', 5'''), 7.47 (2H, d,  $J$  = 7.9 Hz, H-3'', 5''), 7.89 (2H, d,  $J$  = 8.7 Hz, H-2'', 6''), 7.89 (2H, d,  $J$  = 7.9 Hz, H-2''', 6''');  $^{13}\text{C}$ -NMR (75 MHz, MeOD)  $\delta$ : 19.7 (C-10), 23.2 (C-6), 43.9 (C-3), 44.6 (C-5), 61.8 (C-8), 64.9 (C-6'), 72.1 (C-7), 72.2 (C-4'), 75.4 (C-2'), 75.4 (C-3'), 78.0 (C-5'), 87.3 (C-2), 89.4 (C-1), 100.1 (C-1'), 102.3 (C-9), 106.4 (C-4), 116.4 (C-3''', 5'''), 122.3 (C-1'''), 129.8 (C-3'', 5''), 130.9 (C-2'', 6''), 131.3 (C-1''), 132.9 (C-2''', 6'''), 134.5 (C-4''), 163.8 (C-4'''), 167.9 (C-7'''), 168.1 (C-7''); ESIMS  $m/z$ : 615 [M - H]<sup>-</sup>.



## 다. 타 연구팀에 제출 시료 목록

Comp.No.	화합물명	분리량 (mg)	제공량(mg)			순도 (%)
			2007.05.28	2007.10.24	2008.05.27	
1	Paeonol	32 000	10,000	8450	3512.4	99.2
2	Benzoylpaeoniflorin	7200	600	5000	1787.6	97.8
3	Paeoniflorin	6700	500	3140	1020.0	97.5
4	Paeoniflorigenone	1000	87	980	38.0	98.8
5	Paeonoside	1050	-	990	-	98.6
6	Methylgallate	2100	50	1890	607.5	98.4
7	Gallic acid	2600	1500	1000	1009.0	97.5
8	Galloylpaeoniflorin	200	-	150	44.0	98.5
9	(+)-catechin	120	100	-	-	97.5
10	Quercetin	250	100	140	-	98.6
11	Benzoic acid	540	80	120	323.8	98.6
12	$\beta$ -Sitosterol	200	50	100	34.9	98.5
13	Daucosterol	110	100	-	-	97.5
14	Betulinic acid	200	25	120	-	96.9
15	Oleanolic acid	110	55	28	-	97.3
16	Ursolic acid	300	100	180	-	98.5
17	Falbinone	102	-	-	78.6	98.0
18	6-Methoxy paeoniflorigenone	60	-	-	46.2	98.7
19	Benzoyloxypaeoniflorin	224	-	-	200	98.6

## 라. 목단피의 70% 에탄올엑스 각 5종 이상 제조

목단피는 중국에서 수입이 많이 되고 있으며, 경북, 강원도 및 전라도 지방에서 생산되기도 한다. 중국산은 서울 경동시장, 대구약령시장 및 금산생약시장에서 구입하였고, 국내산은 생산지를 방문하여 구입하였다. 이들 자료들을 약전(8개정)규정대로 70% 에탄올로 추출하여 용매를 유거하고 표준엑스를 제조하여 효능연구진에게 제공하였다.

## (1) 목단피부터 70% 에탄올 엑스의 제조.

목단피 (Moutan Cortex Radicis)의 뿌리껍질 500 g에 에탄올 (700 ml)와 물 (300 ml)의 혼합용매를 가하여 80 °C에서 2번 환류 추출한 후 여과하였다. 여과액을 40~45 °C에서 감압 농축하여 70% 에탄올 엑스 (75 g, 15%)를 얻었다.

## 마. 효능확인 연구를 위한 생리활성성분 대량 제조

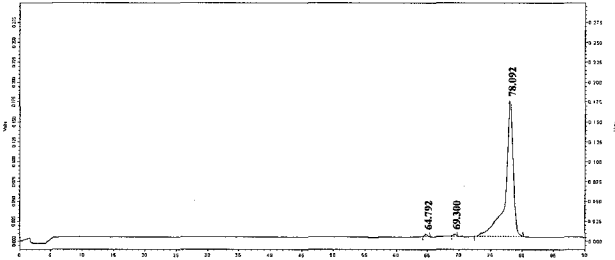
본 연구 과제는 3개의 주성분을 대량으로 분리하는 일과 생리활성이 검증된 물질을 10개 이상 하도록

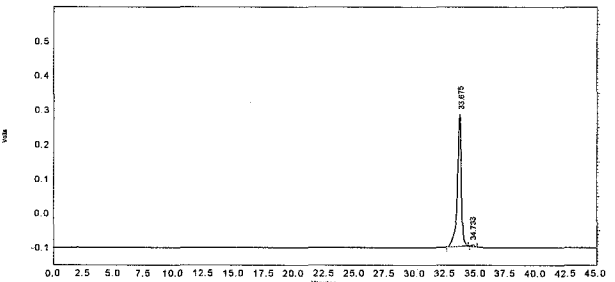
되어 있다. 용매분획, 재결정, 또는 임계추출법 등을 이용하여 대량 분리법을 확립하여 다음 연구에 활용될 수 있도록 한다.

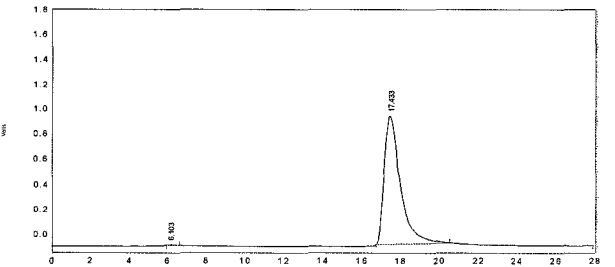
바. 식약청 제출 시료 목록

순번	화합물명	분리량(mg)	제출량(mg)	순도(%)
1	Paeonol	32,000	3,200	98.2
2	Benzoylpaeoniflorin	7,200	3,020	98.7
3	Paeoniflorin	6,700	3,100	98.9
4	Paeoniflorigenone	190	38	99.5
5	6-Methoxypaeoniflorigenone	1,100	46	99.6
6	Methylgallate	6,200	1,000	98.2
7	Gallic acid	2,600	55	99.2
8	Galloylpaeoniflorin	200	49	98.3
9	(+)-catechin	200	68	98.5
10	Quercetin	250	63	98.6
11	Benzoic acid	240	80	98.2
12	Paeonoside	1,200	66	99.4
13	Palbinone	300	78	98.6
14	$\alpha$ -Benzoyloxypaeoniflorin	20	1.0	98.9
15	$\beta$ -Benzoyloxypaeoniflorin	25	1.0	99.4
16	Kaempferol	20	1.2	98.1
17	Apiopaeonoside	170	26	98.6
18	Paeonolide	50	2.7	99.1
19	Oxypaeoniflorin	1,200	50	98.8

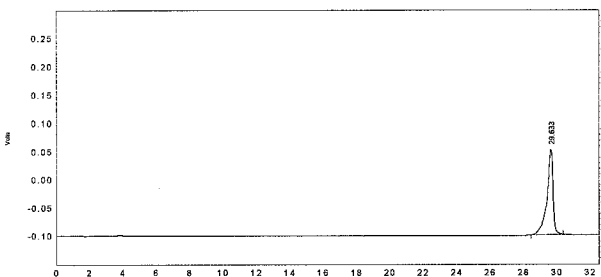
## 사. 식약청 제출 성분의 순도 성적서

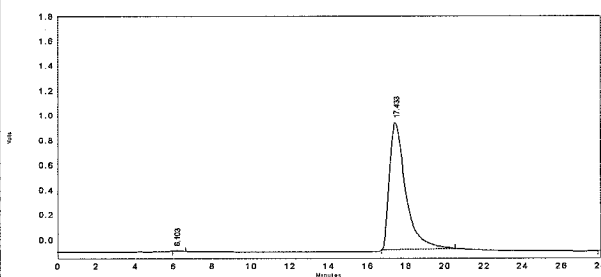
화합물명	<b>Paeonol</b>		
제출량	3,200 mg		
물성 Data	분자량 (M.W.)	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub> (166)	
	용해도(solubility)	CHCl <sub>3</sub> , Ethyl acetate, Acetone, DMSO	
순도분석	크로마토그램	분석조건(condition)	순도
		-Column : Nova pack C18 (2.1 × 150 mm) -Mobile phase : ACN : H <sub>2</sub> O (30 : 70), -Flow rate : 0.5 ml/min, -Detector : UV(230 nm)	98.2

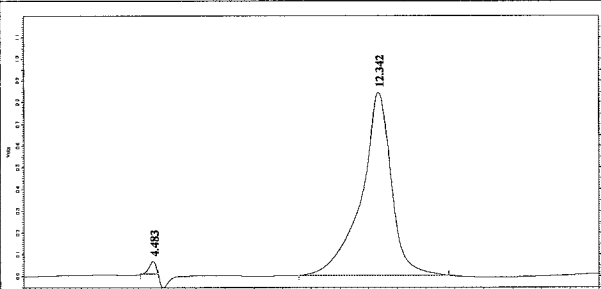
화합물명	<b>Benzoylpaeoniflorin</b>		
제출량	3,020 mg		
물성 Data	분자량 (M.W.)	C <sub>30</sub> H <sub>32</sub> O <sub>12</sub> (584)	
	용해도(solubility)	CHCl <sub>3</sub> , MeOH, Acetone, DMSO	
순도분석	크로마토그램	분석조건(condition)	순도
		-Column : Nova pack C18 (2.1 × 150 mm) -Mobile phase : ACN : H <sub>2</sub> O (30 : 70), -Flow rate : 0.5 ml/min, -Detector : UV(230 nm)	98.7

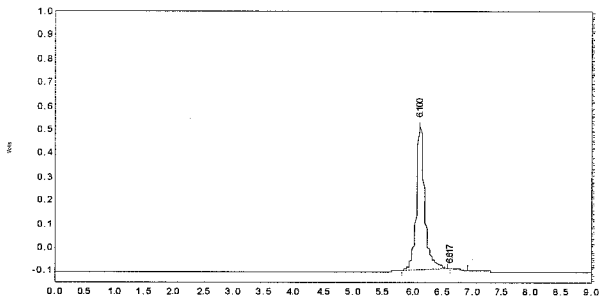
화합물명	<b>Paeoniflorin</b>		
제출량	3,100 mg		
물성 Data	분자량 (M.W.)	C <sub>23</sub> H <sub>28</sub> O <sub>11</sub> (480)	
	용해도(solubility)	CHCl <sub>3</sub> , MeOH, Acetone, DMSO	
순도분석	크로마토그램	분석조건(condition)	순도
		-Column : Nova pack C18 (2.1 × 150 mm) -Mobile phase : ACN : H <sub>2</sub> O (20 : 80), -Flow rate : 0.8 ml/min, -Detector : UV(230 nm)	98.9

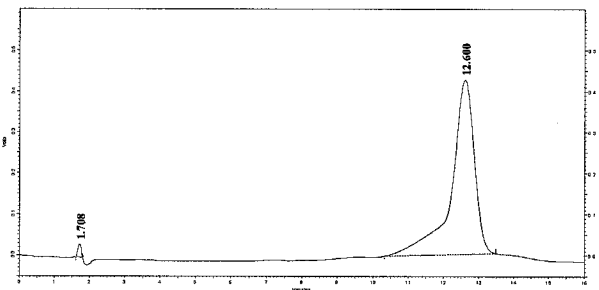


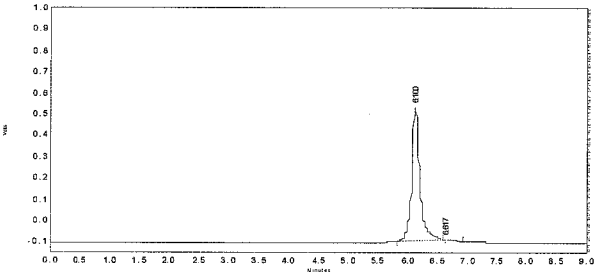
화합물명	Paeoniflorigenone		
제출량	38 mg		
물성 Data	분자량 (M.W.)	C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> O <sub>6</sub> (318)	
	용해도(solubility)	CHCl <sub>3</sub> , MeOH, Acetone, DMSO	
순도분석	크로마토그램	분석조건(condition)	순도
			-Column : Nova pack C18 (2.1 × 150 mm) -Mobile phase : ACN : H <sub>2</sub> O (35 : 65), -Flow rate : 0.5 ml/min, -Detector : UV(230 nm)

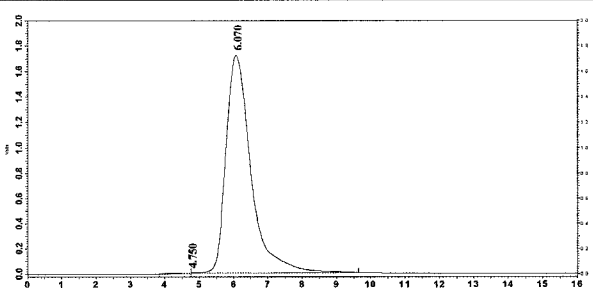
화합물명	6-Methoxypaeoniflorigenone		
제출량	46 mg		
물성 Data	분자량 (M.W.)	C <sub>18</sub> H <sub>20</sub> O <sub>6</sub> (332)	
	용해도(solubility)	CHCl <sub>3</sub> , MeOH, Acetone, DMSO	
순도분석	크로마토그램	분석조건(condition)	순도
			-Column : Nova pack C18 (2.1 × 150 mm) -Mobile phase : ACN : H <sub>2</sub> O (35 : 65), -Flow rate : 0.5 ml/min, -Detector : UV(230 nm)

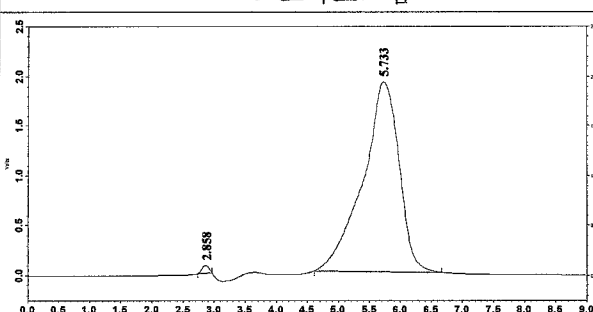
화합물명	Methylgallate		
제출량	1,000 mg		
물성 Data	분자량 (M.W.)	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>5</sub> (184)	
	용해도(solubility)	EtOH, MeOH, CHCl <sub>3</sub> , DMSO	
순도분석	크로마토그램	분석조건(condition)	순도
			-Column : Nova pack C18 (2.1 × 150 mm) -Mobile phase : ACN : H <sub>2</sub> O (15 : 85), -Flow rate : 0.5 ml/min, -Detector : UV(230 nm)

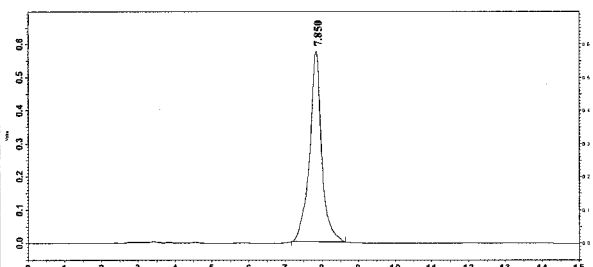
화합물명	<b>Gallic acid</b>		
제출량	55 mg		
물성 Data	분자량 (M.W.)	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub> (170)	
	용해도(solubility)	EtOH, MeOH, DMSO	
순도분석	크로마토그램	분석조건(condition)	순도
		-Column : Nova pack C18 (2.1 × 150 mm) -Mobile phase : ACN : H <sub>2</sub> O (10 : 90), -Flow rate : 0.5 ml/min, -Detector : UV(230 nm)	99.2

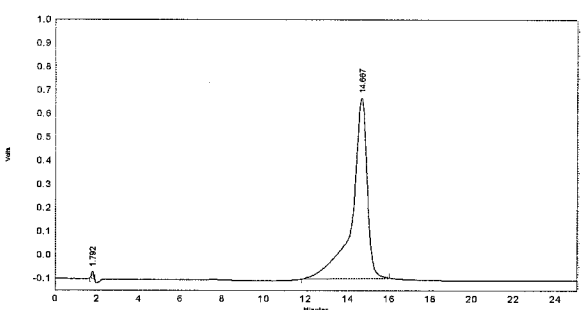
화합물명	<b>Galloylpaeniflorin</b>		
제출량	49 mg		
물성 Data	분자량 (M.W.)	C <sub>30</sub> H <sub>33</sub> O <sub>15</sub> (633)	
	용해도(solubility)	Acetone, MeOH, DMSO	
순도분석	크로마토그램	분석조건(condition)	순도
		-Column : Nova pack C18 (2.1 × 150 mm) -Mobile phase : ACN : H <sub>2</sub> O (40 : 60), -Flow rate : 0.5 ml/min, -Detector : UV(254 nm)	98.3

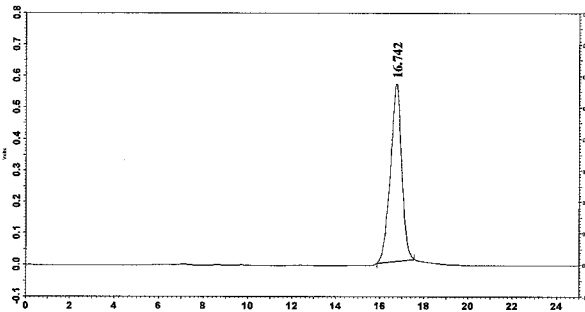
화합물명	<b>(+)-Catechin</b>		
제출량	68 mg		
물성 Data	분자량 (M.W.)	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub> (290)	
	용해도(solubility)	EtOH, MeOH, DMSO	
순도분석	크로마토그램	분석조건(condition)	순도
		-Column : Nova pack C18 (2.1 × 150 mm) -Mobile phase : ACN : H <sub>2</sub> O (15 : 85), -Flow rate : 0.5 ml/min, -Detector : UV(230 nm)	98.5

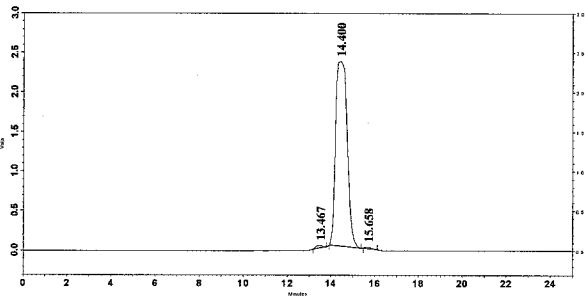
화합물명	<b>Quercetin</b>		
제출량	63 mg		
물성 Data	분자량 (M.W.)	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub> (302)	
	용해도(solubility)	CHCl <sub>3</sub> , Acetone, DMSO	
순도분석	크로마토그램	분석조건(condition)	순도
		-Column : Nova pack C18 (2.1 × 150 mm) -Mobile phase : ACN : H <sub>2</sub> O (45 : 55), -Flow rate : 0.5 ml/min, -Detector : UV(254 nm)	98.6

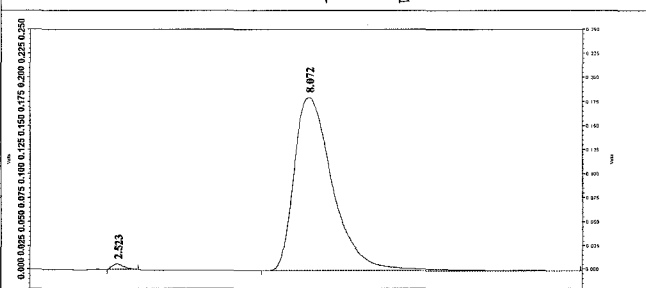
화합물명	<b>Benzoic acid</b>		
제출량	80 mg		
물성 Data	분자량 (M.W.)	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> (122)	
	용해도(solubility)	MeOH, EtOH, DMSO	
순도분석	크로마토그램	분석조건(condition)	순도
		-Column : Nova pack C18 (2.1 × 150 mm) -Mobile phase : ACN : H <sub>2</sub> O (10 : 90), -Flow rate : 0.5 ml/min, -Detector : UV(230 nm)	98.2

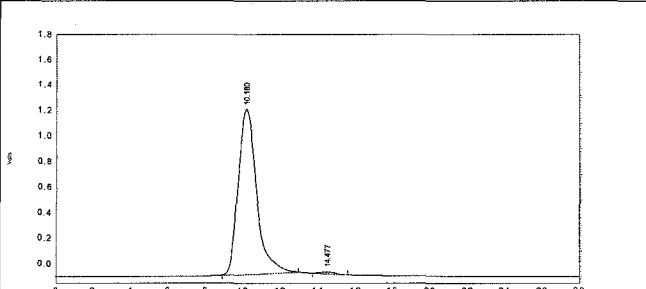
화합물명	<b>Paeonoside</b>		
제출량	66 mg		
물성 Data	분자량 (M.W.)	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O <sub>8</sub> (328)	
	용해도(solubility)	MeOH, EtOH, DMSO	
순도분석	크로마토그램	분석조건(condition)	순도
		-Column : Nova pack C18 (2.1 × 150 mm) -Mobile phase : ACN : H <sub>2</sub> O (15 : 85), -Flow rate : 0.8 ml/min, -Detector : UV(230 nm)	99.4

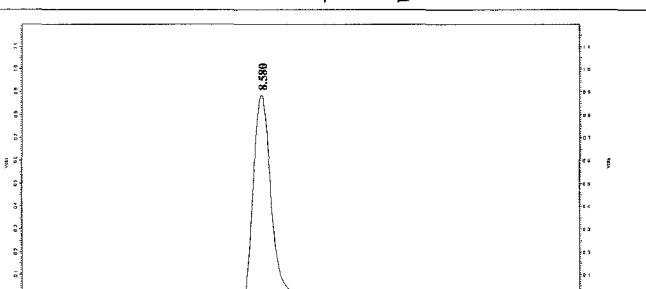
화합물명	<b>Palbinone</b>		
제출량	78 mg		
물성 Data	분자량 (M.W.)	C <sub>22</sub> H <sub>30</sub> O <sub>4</sub> (358)	
	용해도(solubility)	CHCl <sub>3</sub> , Ethyl acetate, Hexane, DMSO	
순도분석	크로마토그램	분석조건(condition)	순도
		-Column : Nova pack C18 (2.1 × 150 mm) -Mobile phase : ACN : H <sub>2</sub> O (70 : 30), -Flow rate : 0.8 ml/min, -Detector : UV(230 nm)	98.6

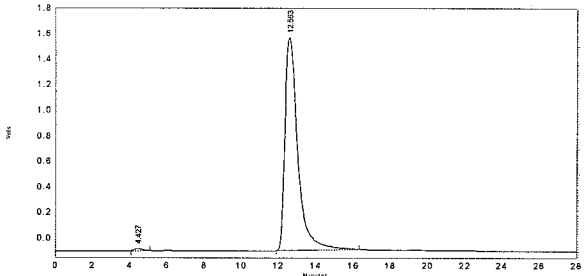
화합물명	<b>β-Benzoyloxypaeoniflorin</b>		
제출량	1.0 mg		
물성 Data	분자량 (M.W.)	C <sub>30</sub> H <sub>32</sub> O <sub>13</sub> (600)	
	용해도(solubility)	MeOH, EtOH, DMSO	
순도분석	크로마토그램	분석조건(condition)	순도
		-Column : Nova pack C18 (2.1 × 150 mm) -Mobile phase : ACN : H <sub>2</sub> O (40 : 60), -Flow rate : 0.8 ml/min, -Detector : UV(230 nm)	99.4

화합물명	<b>α-Benzoyloxypaeoniflorin</b>		
제출량	1.0 mg		
물성 Data	분자량 (M.W.)	C <sub>30</sub> H <sub>32</sub> O <sub>13</sub> (600)	
	용해도(solubility)	MeOH, EtOH, DMSO	
순도분석	크로마토그램	분석조건(condition)	순도
		-Column : Nova pack C18 (2.1 × 150 mm) -Mobile phase : ACN : H <sub>2</sub> O (40 : 60), -Flow rate : 0.8 ml/min, -Detector : UV(230 nm)	98.9

화합물명	<b>Kaempferol</b>		
제출량	1.2 mg		
물성 Data	분자량 (M.W.)	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub> (286)	
	용해도(solubility)	MeOH, EtOH, Acetone, DMSO	
순도분석	크로마토그램	분석조건(condition)	순도
		-Column : Nova pack C18 (2.1 × 150 mm) -Mobile phase : ACN : H <sub>2</sub> O (45 : 55), -Flow rate : 0.5 ml/min, -Detector : UV(254 nm)	98.1

화합물명	<b>Apiopaeonoside</b>		
제출량	26 mg		
물성 Data	분자량 (M.W.)	C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O <sub>12</sub> (460)	
	용해도(solubility)	MeOH, EtOH, DMSO	
순도분석	크로마토그램	분석조건(condition)	순도
		-Column : Nova pack C18 (2.1 × 150 mm) -Mobile phase : ACN : H <sub>2</sub> O (15 : 85), -Flow rate : 0.6 ml/min, -Detector : UV(230 nm)	98.6

화합물명	<b>Paeonolide</b>		
제출량	2.7 mg		
물성 Data	분자량 (M.W.)	C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O <sub>12</sub> (460)	
	용해도(solubility)	MeOH, EtOH, DMSO	
순도분석	크로마토그램	분석조건(condition)	순도
		-Column : Nova pack C18 (2.1 × 150 mm) -Mobile phase : ACN : H <sub>2</sub> O (15 : 85), -Flow rate : 0.8 ml/min, -Detector : UV(230 nm)	99.1

화합물명	Oxypaeoniflorin		
제출량	50 mg		
물성 Data	분자량 (M.W.)	C <sub>23</sub> H <sub>28</sub> O <sub>12</sub> (496)	
	용해도(solubility)	MeOH, EtOH, DMSO	
순도분석	크로마토그램	분석조건(condition)	순도
		-Column : Nova pack C18 (2.1 × 150 mm) -Mobile phase : ACN : H <sub>2</sub> O (15 : 85), -Flow rate : 0.8 ml/min, -Detector : UV(230 nm)	98.8

## 제3장 세부연구개발과제의 최종 연구개발 결과

### 가. 계지 및 목단피로부터 생리활성물질 분리

계지 30 kg에 에탄올을 가하여 80℃에서 3회 환류 추출한 후 여과하였다. 여과액을 40~45℃에서 감압 농축하여 에탄올 엑스 3.5 kg을 얻었다. 에탄올 엑스를 증류수 2 리터에 현탁시킨 후 hexane, EtOAc 및 BuOH로 순차적으로 분획하였다. 각 분획물들을 농축하여 hexane 분획물 (620 g), EtOAc 분획물 (530 g), BuOH 분획물 (420 g) 및 H<sub>2</sub>O 분획물을 얻었다. 각각의 분획들에 대해 각종 chromatography를 반복 실시하여 계지로부터 5종의 신물질인 cassiferaldehyde, cinnacassine, icariside DC, dihydrocinnacasside, cinnacasside와 22종의 알려진 화합물 cinnamaldehyde, eugenol, 2-methoxycinnamaldehyde, coumarin,  $\beta$ -sitosterol, 2-hydroxy cinnamaldehyde, cinnamic acid, coniferaldehyde, cinnamic alcohol, 4-hydroxy benzoic acid, syringaldehyde, daucosterol, amygdalactone, eugenol glucopyranoside, *o*-coumaric acid, rosavin, (+)-lyoniresinol-3a-O- $\beta$ -D-glucopyranosid, (-)-lyoniresinol-3a-O- $\beta$ -D-glucopyranosid, dihydromelilotoside, (+)-lyoniresinol, (-)-lyoniresinol, methyl dihydromelilotoside 등 총 27종의 생리활성성분을 분리하였다.

목단피 20 kg에 에탄올 가하여 80℃에서 3번 환류 추출한 후 여과하였다. 여과액을 40~50℃에서 감압 농축하여 총 추출물 3 kg을 얻었다. 이 추출액을 헥산과 증류수로 현탁시킨 후 헥산 층을 감압 농축한 결과 헥산 가용부 400 g을 얻었다. 잔류 물 층을 에틸아세테이트와 부탄올로 추출하여 에틸아세테이트 가용부 600 g과 부탄올 가용부 200 g 얻었다. 목단피로부터는 2종의 신물질인 4-*O*-*n*-butylpaeniflorin, 5-hydroxy-3-hydroxymethylene-6-methyl-2,3-dihydrobenzofuran와 25종의 알려진 화합물인 paeonol,  $\beta$ -sitosterol, ursolic acid, betulinic acid, daucosterol, benzoic acid, oleanolic acid, Palbinone, apiopaenoside, paeonoside, 6-methoxypaeoniflotrigenone, benzoylpaeniflorin, methylgallate, kaempferol, paeoniflorin,  $\alpha$ -benzoyloxypaeoniflorin,  $\beta$ -benzoyloxypaeoniflorin, galloylpaeniflorin, (+)-catechin, gallic acid, paeonolide, paeoniflorigenone, 30-norhederagenin, oxypaenifloria, mudanpinoside H 등 총 27종의 생리활성성분을 분리하였다. 분리한 화합물들의 구조는 각종 분광학적 방법과 문헌과의 비교를 통하여 결정하였다.

### 나. 계지 및 목단피의 70% 에탄올 엑스 제조

계지의 가는가지 500 g과 목단피의 뿌리껍질 500 g에 각각 에탄올 (700 ml)와 물 (300 ml)의 혼합용매를 가하여 80℃에서 2번 환류 추출한 후 여과한다. 여과액을 40~45℃에서 감압 농축하여 계지의 70% 에탄올 엑스 (32.5 g, 6.5%)와 목단피의 70% 에탄올 엑스 (75 g, 15%)를 얻었다.

#### 다. 효능확인 연구를 위한 생리활성성분 대량 제조

목단피의 지표성분을 paeonol, paeoniflorin, benzoyl paeoniflorin으로 설정하였고, 계지의 지표성분은 coumarin, 2-hydroxycinnamaldehyde, cinnamyl alcohol, cinnamic acid, cinnamaldehyde, 2-methoxy cinnamaldehyde, eugenol으로 설정하여 생리활성성분 분석팀에 제공하였고, 주요생리활성 성분 10종 이상을 확보하여 효능확인 연구팀에 연구용으로 제공하였다.



## 제4장 세부연구개발과제의 연구결과 고찰 및 결론

계지로부터 5종의 신물질인 cassiferaldehyde, cinnacassine, icaricide, dihydrocinnacasside, cinnacasside와 22종의 알려진 화합물 cinnamaldehyde, eugenol, 2-methoxycinnamaldehyde, coumarin,  $\beta$ -sitosterol, 2-hydroxy cinnamaldehyde, cinnamic acid, coniferaldehyde, cinnamic alcohol, 4-hydroxy benzoic acid, syringaldehyde, daucosterol, amygdalactone, eugenol glucopyranoside, *o*-coumaric acid, rosavin, (+)-lyoniresinol-3a-O- $\beta$ -D-glucopyroanosied, (-)-lyoniresinol-3a-O- $\beta$ -D-glucopyroanosied, dihydromelilotoside, (+)-lyoniresinol, (-)-lyoniresinol, methyl dihydromelilotoside 등 총 27종의 생리활성성분을 분리하였으며, 이 중 coumarin, 2-hydroxycinnamaldehyde, cinnamyl alcohol, cinnamic acid, cinnamaldehyde, 2-methoxy cinnamaldehyde, eugenol 등의 화합물이 주성분이었다. 목단피로부터는 2종의 신물질인 4-*O*-*n*-butylpaeniflorin, 5-hydroxy-3-hydroxymethylene-6-methyl-2,3-dihydrobenzofuran 와 25종의 알려진 화합물인 paeonol,  $\beta$ -sitosterol, ursolic acid, betulinic acid, daucosterol, benzoic acid, oleanolic acid, Palbinone, apiopaeonoside, paeonoside, 6-methoxypaeoniflotrigenone, methylgallate, benzoylpaoniflorin, kaempferol, paeoniflorin,  $\alpha$ -benzoyloxypaeoniflorin,  $\beta$ -benzoyloxypaeoniflorin, galloylpaoniflorin, (+)-catechin, gallic acid, paeonolide, paeoniflorigenone, 30-norhederagenin, oxypaeonifloria, mudanpinoside H 등 총 27종의 생리활성성분을 분리하였다. 이 중 paeoniflorin, paeonol, benzoyl paeoniflorin 등이 주 생리활성물질이라 사료된다.

분리된 주요 화합물 및 주성분들을 바탕으로 시중에 유통되고 있는 한약재 및 한약제제의 품질관리 및 검사에 활용될 수 있으리라 기대된다.

## 제5장 제 1세부연구개발과제의 연구성과

## 5.1 활용성과

총괄과제명	계지 및 목단피의 생리활성 성분 분리 및 분석 연구
총괄과제책임자	배기환 / 충남대학교 / 천연물화학

## 가. 연구논문

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

## 나. 학술발표

번호	발표제목	발표형태	발표자	학회명	연월일	발표지	국내/국제
1	Phytochemical study on the ethanol extract of twig of <i>Cinnamomum cassia</i>	포스터	잔민덕, 이익수, 트란만홍, 도티하, 윤의중, 배기환	한국식물과학 협의회	2007.11.01	충북 청주	국제
2	Isolation of bioactive compounds form mountain root bark ( <i>Paeonia suffruticosa</i> Andr.)	포스터	도티하, 잔민덕, 윤의중, 배기환	한국식물과학 협의회	2007.11.01	충북 청주	국제

## 다. 지식재산권

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

## 라. 정책활용

※ 기타 관련정책에 활용 예를 구체적으로 기술함.

## 마. 타연구/차기연구에 활용

※ 타연구 및 차기연구에 활용된 예를 구체적으로 기술함.

## 바. 언론홍보 및 대국민교육

※ 언론홍보 및 대국민교육 내용, 일자 등을 간략히 기술함.

## 사. 기타

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

## 5.2 활용계획

가. 한약재 유효성분 분석법 개발 및 유효성분 표준품 확보.

나. 유효성분 중심의 한약재 관리로 한약 및 한약제제의 품질수준 향상 및 안전성 제고

다. 한약 및 한약제제 품질관리 기반기술 구축

## 제6장 기타 중요변경사항

○ 처음 선정 시와 비교하여 변경된 내용을 명시

## 제7장 참고문헌

- 1) Choi, J., Lee, K. T., Ka, H., Jung, W. T., Jung, H. J., Park, H. J., Constituents of the essential oil of the *Cinnamomum cassia* stem bark and the biological properties. *Arch. Pharm. Res.*, **24**, 418-423 (2001).
- 2) Lee, H. K., Lee, H. S., Ahn, Y. J., Antignawing Factor Derived from *Cinnamomum cassia* Bark Against Mice. *J. Chem. Ecol.*, **25**, 1131-1139 (1999).
- 3) Jayaprakasha, G. K., Rao, L. J., Sakariah, K. K., Chemical and antitubercular constituents from the stem wood of *Cinnamomum kotoense*. *Tianran Chanwu Yanjiu Yu Kaifa*, **14**, 14-17 (2002).
- 4) Geirsson, Jon K. F., Arnadottir, L., and Jonsson, S., Short and stereoselective synthesis of polysubstituted cyclohexanones., *Tetrahedron*, **60**, 9149-9153 (2004).
- 5) Choi, J., Lee, K. T., Ka, H., Jung, W. T., Jung, H. J., Park, H. J., Constituents of the essential oil of the *Cinnamomum cassia* stem bark and the biological properties. *Arch. Pharm. Res.*, **24**, 418-423 (2001).
- 6) Cussans, N. J., and Huckerby, T. N., Carbon-13 NMR spectroscopy of heterocyclic compounds—II : A 20 MHz study of chemical shifts and carbon-proton coupling constants for coumarin and some bromocoumarins. *Tetrahedron*, **31**, 2587-2590 (1975).
- 7) Chang, I. M., Yun, H. S., and Yamasaki, K., Revision of <sup>13</sup>C NMR assignments of  $\beta$ -sitosterol-3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside isolated from *Plantago asiatica* seed. *Kor. J. Pharmacogn.*, **12**, 12-24 (1981).
- 8) Huong, D. T. L., Jo, Y. S., Lee, M. K., Bae, K. H., Kim, Y. H., Monoamine Oxidase Inhibitors from *Cinnamomi Cortex*, *Natural Product Science*, **6**, 16-19 (2000).
- 9) Sy, L. K., and Brown, G. D., Coniferaldehyde derivatives from tissue culture of *Artemisia annua* and *Tanacetum parthenium*. *Phytochemistry*, **50**, 781-785 (1999).
- 10) Mohammad, M., Mojtahedi, E. A., Sharifi, R., and Abaee, M. S., Lithium Bromide as a Flexible, Mild, and Recyclable Reagent for Solvent-Free Cannizzaro, Tishchenko, and Meerwein-Ponndorf-Verley Reactions. *Organic Letters*, **9**, 2791-2793 (2007).
- 11) Pyo, M. K., Koo, Y. K., Choi, Y., Hye, S., Anti-platelet Effect of the Phenolic Constituents Isolated from the Leaves of *Magnolia obovata*. *Natural Product Sciences*, **8**, 147-151 (2002).
- 12) Steinbeiss, S., Schmidt, C. M., Heide, K., and Gleixner, G., <sup>13</sup>C values of pyrolysis products from cellulose and lignin represent the isotope content of their precursors. *J. Anal. Appl. Pyrolysis.*, **75**, 19 - 26 (2006).
- 13) Aydin Tavman., Synthesis, spectral characterisation of 2-(5-methyl-1H-benzimidazol-2-yl)-4-bromo/nitro-phenols and their complexes with zinc(II) ion, and

- solvent effect on complexation. *Spectrochimica Acta. Part A.*, **61**, 3087 - 3096 (2005).
- 14) Chang, I. M., Yun, H. S., and Yamasaki, K., Revision of  $^{13}\text{C}$  NMR assignments of  $\beta$ -sitosterol-3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside isolated from *Plantago asiatica* seed. *Kor. J. Pharmacogn.*, **12**, 12-24 (1981).
- 15) Fujita, T. and Nakayama, M., Perilloside a, a monoterpene glucoside from *Perilla frutescens*. *Phytochemistry*, **50**, 781-785 (1999).
- 16) Schwab, W., Scheller, G., and Schreier, P., Glycosidically bound aroma components from sour cherry. *Phytochemistry*, **29**, 607-612 (1990).
- 17) Dad, G., Corbani, A., Manitto, P., Speranza, G., and Lunazzi L., Lignan Glycosides from the Heartwood of European Oak *Quercus petraea*, *J. Nat. Prod.*, **52**, 1327-1330 (1989).
- 18) Otsuka, H., Takeuchi, M., Inoshiri, S., Sato, T., and Yamasaki, K., Phenolic compounds from *Coix lachryma-jobi* var. *Ma-yuen*. *Phytochemistry*, **28**, 883-886 (1989).
- 19) Aldrich library of  $^{13}\text{C}$  and  $^1\text{H}$  FT NMR spectra, 1992 (2) 1046A, 1046B (nmr).
- 20) Achenbach, H., Löwel, M., Waibel, R., Gupta, M., and Solis, P., New lignan glucosides from *Stemmadenia minima*. *Planta Med.*, **58**, 270 - 272 (1992).
- 21) Yang, Y. L., Chang, F. R., and Wu, Y. C., Squadinorlignoside: A Novel 7,9-Dinorlignan from the Stems of *Annona squamosa*. *Helvetica Chimica Acta*, **88**, 2731 - 2737 (2005).
- 22) Ono, M., Yoshida, A., Ito, Y., and Nohara, T., Phenethyl alcohol glycosides and isopentenol glycoside from fruit of *Bupleurum falcatum*. *Phytochemistry*, **51**, 819 - 823 (1999).
- 23) Miyase, T., Ueno, A., Takizawa, N., Kobayashi, H., and Oguchi, H., Studies on the glycosides of *Epimedium grandiflorum*: II. *Chem. Pharm. Bull.*, **35**, 3713 - 9371 (1987).
- 24) Taskova, R. M., Gotfredsen, C. H., and Jensen, S. R., Chemotaxonomic markers in *Digitalideae* (*Plantaginaceae*). *Phytochemistry*, **66**, 1440 - 1447 (2005).
- 25) Malakov, P. Y., Papanov, G. Y., De La Torre, M. C., and Rodriguez, B. Constituents of *Ajuga laxmanii*. *Fitoterapia*, **69**, 552-554 (1998).
- 26) Kishida, M., and Akita, H., Synthesis of rosavin and its analogues based on a Mizoroki-Heck type reaction. *Tetrahedron: Asymmetry*, **16**, 2625 - 2630 (2005).
- 27) Yagi, A., Tokubuchi, N., Nohara, T., Nonake, G., Nishioka, I., and Koda, A., The constituents of cinnamomi cortex. I. Structures of cinnassiol A and Its Glucoside. *Chem. Pharm. Bull.*, **28**, 1432 - 1436 (1980).
- 28) Fukuhara, Y. and Yoshida, D. Paeonol: A Bio-antimutagen Isolated from a Crude Drug, Moutan Cortex. *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 1441 - 1442 (1987).
- 29) Zhu, W. M., He, H. P., Fan, L. M., Shen, Y. M., Zhou, J., Hao, X. J. Components of Stem Barks of *Winchia calophylla* and Their Bronchodilator Activities. *J. Integrative Plant Biology*, **47**, 892 - 896

(2005).

30) Ecap, M. D., Onaco, I., and Reviter, L. Stigmasterols from *Typha latifolia*. *J. Nat. Prod.*, **53**, 1430-433 (1990).

31) Kovganko, N. V., Kashkan, Z. N., and Borisov, E. V., <sup>13</sup>C-NMR Spectra of Functionally Substituted 3 $\beta$ -Chloroderivatives of Cholesterol and  $\beta$ -Sitosterol. *Chem. Nat. Comp.*, **36**, 595-599 (2000).

32) Thuong, P. T., Jin, W. Y., Lee, J. P., Seong, R. S., Lee, Y. M., Seong, Y. H., Song, K. S., and Bae, K. H., Inhibitory Effect on TNF-Induced IL-8 Production in the HT29 Cell of Constituents from the Leaf and Stem of *Weigela subsessilis*. *Arch. Pharm. Res.*, **28**, 1135-1141 (2005).

33) Siddiqui, S., Hafeez, F., Begum, S., Siddiqui, B. S., Oleanderol, a New Pentacyclic Triterpene from the Leaves of *Nerium oleander*. *J. Nat. Prod.*, **51**, 229-231 (1988).

34) Chang, I. M., Yun-Choi, H. S., and Yamasaki, K., Revision of <sup>13</sup>C-NMR assignment of  $\beta$ -sitosterol and  $\beta$ -sitosteryl-3-O- $\beta$ -D glucopyranoside isolated from *Plantago asiatica* seed. *Kor. J. Pharmacogn.*, **12**, 12-24 (1981)

35) Seebacher, W., Simic, N., Weis, R., Saf, R., and Kunert, O., Complete assignments of <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR resonances of oleanolic acid, 18-oleanolic acid, ursolic acid and their 11-oxo derivatives. *Magn. Reson. Chem.*, **41**, 636-639 (2003).

36) Kadota, S., Terashima, S., Basnet, P., Kikuchi, T., namba, T. Palbinone, a Novel Terpenoid from *Peonia albiflora* Potent Inhibitory Activity on 3 $\alpha$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase. *Chem. Pharm. Bull.*, **41**, 487 - 489 (1993).

37) Matsuda, H., Ohta, T., Kawaguchi, A., and Yoshikawa, M. Bioactive Constituents of Chinese Natural Medicines. VI. Moutan Cortex. (2): Structures and Radical Scavenging Effects of Suffruticosides A, B, C, D, and E and Galloyl-oxypaeoniflorin. *Chem. Pharm. Bull.*, **49**, 69 - 72 (2001).

38) Zhong, X.-N., Otsuka, H., Ide, T., Hirata, E., Takushi, A., and Takeda, Y., Hydroquinone glycosides from leaves of *Myrsine seguinii*. *Phytochemistry*, **49**, 2149 - 2153 (1998).

39) Kuwajima, H., Shibano, N., Baba, T., Takaishi, K., Inoue, K., and Shingu, T., An acetophenone glycoside from *Exacum affine*. *Phytochemistry*, **41**, 289 - 292 (1996).

40) Shimizu, M., hayashi, T., Morita, N., Kiuchi, F., Noguchi, H., Iltaka, Y., and Sankawa, U., The Structure of Paeoniflorigenone, A New Monoterpene isolated from *Paeoniae Radix*. *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 577 - 583 (1983).

41) Yoshikawa, M., Ohta, T., Kawaguchi, A., and Matsuda, H., Bioactive Constituents of Chinese Natural Medicines. V. Radical Scavenging Effect of Moutan Cortex. (1): Absolute Stereostructures of Two Monoterpenes, Paeonisuffrone and Paeonisuffral. *Chem. Pharm. Bull.*, **48**, 1327 - 1331 (2000).

- 42) Kaneda, M., Iitaka, Y., and Shibata, S., Chemical studies on the oriental plant drugs—XXXIII: The absolute structures of paeoniflorin, albiflorin, oxypaeoniflorin and benzoylpaeoniflorin isolated from chinese peony root. *Tetrahedron*, **28**, 4309 - 4011 (1972).
- 43) Lemmich, J., Monoterpene and coumarin glucosides of *Cnidium silaifolium*. *Phytochemistry*, **41**, 1337 - 1340 (1996).
- 44) Ma, X., Wu, L., Ito, Y., and Tian, W., Application of preparative high-speed counter-current chromatography for separation of methyl gallate from *Acer truncatum* Bunge. *J. Chromatography A*, **1076**, 212 - 217 (2005).
- 45) Kane, C. J., Menna, J. H., and Yeh, Y.-C., Methyl gallate, methyl-3,4,5-trihydroxy-benzoate, is a potent and highly specific inhibitor of herpes simplex virus in vitro. I. Purification and characterization of methyl gallate from *Sapium sebiferum*. *Bioscience Reports*, **8**, 85 - 94 (1988).
- 46) Budzianowski, J., Six flavonol glucuronides from *Tulipa gesneriana*. *Phytochemistry*, **30**, 1679 - 1682 (1991).
- 47) Hayesa, P. Y., Lehmann, R., Penman, K., Kitching, W., and De Vossa, J. J., Sodium paeoniflorin sulfonate, a process derived artefact from paeoniflorin. *Tet. Lett.*, **46**, 2615 - 2618 (2005).
- 48) Ryu, G., Park, E. K., Joo, J. H., Lee, B. H., Choi, B. W., Jung, D. S., Lee, N. H., A new antioxidant monoterpene glycoside, alpha-benzoyloxypaeoniflorin from *Paeonia suffruticosa*. *Arch. Pharm. Res.*, **24**, 105 - 108 (2001).
- 49) Ding, H. Y., Wu, Y. C., Lin, H. C., Chan, Y. Y., Wu, P. L., and Wu, T. S., Glycosides from *Paeonia suffruticosa*. *Chem. Pharm. Bull.*, **47**, 652 - 655 (1999).
- 50) Kang, S. S., Shin, K. H., and Chi, H. J., Galloylpaeoniflorin, a new acylated monoterpene glucoside from peony root. *Arch. Pharm. Res.*, **14**, 52 - 4 (1991).
- 51) Schmeda-Hirschmann, G., Rodriguez, J. A., Theoduloz, C., Astudillo, S. L., Feresin, G. E., and Tapia A., Free-radical Scavengers and Antioxidants from *Peumus boldus* Mol. ("Boldo"). *Free Radic. Res.*, **37**, 447 - 452 (2003).
- 52) Lin, W. H., Deng, Z. W., Lei, H. M., Fu, H. Z., and Li, J., Polyphenolic compounds from the leaves of *Koelreuteria paniculata* Laxm. *J. Asian Nat. Prod. Res.*, **4**, 287 - 295 (2002).
- 53) Cha, B. C., Lee, H. W., and Cho, M. Y., Antioxidative and antimicrobial effects of nut species. *Kor. J. Pharmacogn.*, **29**, 3 - 5 (1998).
- 54) Ikuta, A. and Itokawa, H., Triterpenoids of *Paeonia japonica* callus tissue. *Phytochemistry*, **9**, 2813 - 2815 (1988).
- 55) Ikuta, A. and Itokawa, H., 30-Noroleanane saponins from callus tissues of *Akebia quinata*. *Phytochemistry*, **28**, 2663 - 2665 (1989).
- 56) Wu, S.-H., Chen, Y.-W., Yang, L.-Y., Li, S.-L., and Li, Z.-Y., Monoterpene glycosides from

*Paeonia delavayi*. *Fitoterapia*, **78**, 76 - 78 (2007).

57) Shu, Y.-Z., Hattori, M., Akao, T., Kobashi, K., Kagei, K., Fukuyama, K., Tsukihara T., and Namba, T., *Chem. Pharm. Bull.*, **35**, 3726 - 3733 (1987).

## 제8장 첨부서류

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



편집순서 7 : 세부연구과제의 연구결과

## 제 2 세부연구개발과제 연구결과

세부과제명 : 계지, 목단피의 생리활성성분 동시분석

세부과제책임자 : 박경래/충남대 약대

## 제1장 2세부연구개발과제의 최종 연구개발 목표

### 1.1 세부연구개발과제의 목표

- 가. 목단피와 계지의 생리활성성분 분석에 관하여 HPLC-UV 및 LC/MS/MS를 활용한 분석법 개발.
- 나. 목단피와 계지의 생리 활성 물질의 HPLC-UV 및 LC/MS/MS 분석법의 과학적 validation 법의 확립: 직선성, 정량범위, 정확성, 정밀성, 검출한계, 정량한계, 완건성, 안정성 등을 실시.
- 다. 목단피와 계지의 지표물질에 대한 동시 다 성분 분석법 확립.
- 라. 패턴인식법에 의한 기원별, 산지별 분석.

### 1.2 세부연구개발과제의 목표달성도

가. 계지와 목단피의 생리활성성분 동시분석에 관한 연구를 수행하여, 계지와 목단피의 생리 활성 물질의 HPLC-UV 조건을 설정하였다. HPLC 조건의 validation을 위하여 설정한 조건의 직선성, 정량범위, 정확성, 정밀성, 검출한계, 정량한계, 완건성, 안정성 등을 조사하였다.

나. 계지의 경우는 coumarin, 2-hydroxycinnamaldehyde, cinnamyl alcohol, cinnamic acid, cinnamaldehyde, 2-methoxy cinnamaldehyde, eugenol 등의 7개의 지표물질에 대한 동시분석법을 개발하였고, 목단피에 대하여는 paeoniflorin, paeonol, benzoyl paeoniflorin 등의 3종의 지표물질에 대한 동시 다 성분 분석법을 확립하였다. 각각의 HPLC 분석결과를 패턴인식법에 의하여 분석하여 기원별, 산지별 분석을 수행하였으며, TLC와 LC/MS 분석 등을 통하여 주요성분을 확인하였다.

### 1.3 국내·외 기술개발 현황

가. 계지

계지의 경우 대한약전 9개정에도 확인시험만 기재되어 있고 정량법 등은 체계적으로 확립되어 있지 않다. 또한 계지와 계피의 구별 등도 확립되어 있지 않다. 외국의 경우 계지의 분석법에 대한 연구가 일부 논문으로 보고 되었다. 본 연구로 계지와 계피의 HPLC 분석법을 확립하였고 패턴인식으로 계지와 계피의 구별이 가능하게 되었다.

나. 목단피

목단피의 경우 대한약전 9개정에 paeonol에 대한 정량법이 공고되었으나 3가지 성분의 동시 분석법

에 대해서는 기술이 개발되어 있지 않다. 최근 목단피에 대한 HPLC 정량법에 관한 외국논문도 발표되었다. 본 연구를 통한 지표성분 동시 분석기술은 향후 목단피의 정량법 확립에 활용될 수 있다.

## 제2장 세부연구개발과제의 최종 연구개발 내용 및 방법

### 2.1 연구내용

- (1) 추출된 목단피와 계지의 유효성분 표준품의 HPLC-UV 및 LC/MS/MS를 이용한 기원 및 산지별 한약재의 정성 및 성분함량 확인 분석 (기원 및 산지별 한약재 각 20품목 이상 분석).
- (2) 목단피와 계지의 생리활성 성분 정성 및 함량확인을 위한 TLC 패턴 분석으로 한약재 시료 중 target 생리활성 물질 모니터링.
- (3) 정확한 정량분석을 위한 validation 방법 확립 : 직선성, 정량범위, 정확성, 정밀성, 검출한계, 정량한계, 완전성, 안정성 등을 실시.
- (4) HPLC-UV, LC/MS/MS 및 TLC 등을 이용한 생리활성물질의 분석으로 한약재의 기원별, 산지별 분석으로 한약재 평가 실시.
- (5) 패턴인식법에 의한 기원별 산지별 분석

### 2.2 연구방법

- (1) 계지, 목단피의 기원 및 산지별 20품목 이상의 시료를 확보한다.
  - 생약의 분류 전문 연구진인 사업단에서 일부를 제공받으며 나머지는 시중에서 구입함,
  - 다른 생육조건과 환경에서 기인한 20품목 이상의 시료 확보
- (2) 확보한 생약재료로부터 활성성분의 추출 및 분획을 수행한다.
  - 온침, 냉침 및 용매분획을 이용한 최적 추출조건 확립
- (3) 생약 성분을 동시에 3종 이상 정성, 정량적으로 검색할 HPLC 조건을 설정한다.
 

HPLC 조건 확립

  - 이동상은 유기용매의 종류와 조성, 기울기 용리 유무, 완충용액의 pH, buffer 농도, 유량 등을 변화시켜가며 동시에 유효성분들을 분석할 수 있는 최적의 조건을 결정.
  - 컬럼은 C18, C8, CN, NH2 컬럼과 기타 특수 컬럼 등을 검토하여 최고의 감도와 분리능을 보이는 것으로 선정.
  - 기타 컬럼 온도와 주입량 등에 따른 분리능 변화도 검토함.
- (4) MS에 의한 화합물의 동정을 수행한다.
  - LC/MS를 이용하여 화합물의 분자량을 측정한다.

(5) HPLC 분석방법의 validation을 확립한다.

- ICH guideline에 의하면 정확도(accuracy), 정밀도(precision), 재현성(reproducibility), 직선성(linearity), 정량범위(range), 검출한계(limit of detection), 정량한계(limit of quantitation), 완건성 (robustness), 안정성(stability) 등을 조사함.

(6) 패턴인식법에 의한 기원별 산지별 분석을 수행한다.

#### 1) 시료의 추출 및 분석

목단피 약 400 mg을 아래와 같이 70% 에탄올로 추출하고 0.2  $\mu\text{m}$  membrane filter로 여과하였다 (그림 1). 추출물을 표 1과 같은 조건으로 HPLC-UV로 분석하여 크로마토그램으로부터 피크를 얻었다. 각 피크의 유지시간과 면적을 모든 시료에 대해 표로 정리하고 각 피크의 면적을 내부표준물질의 면적으로 나눈 값을 최종 자료로 하여 통계처리 하였다. 통계처리를 원만하게 수행하기 위하여 다수의 피크 중 상대적인 크기 등을 감안하여 중요성이 클 것으로 판단되는 피크를 선택하였다. 통계프로그램으로는 R 프로그램을 이용하였는데, 이는 다양한 통계팩키지를 제공하고 있으며 인터넷에서 무료로 다운로드 사용할 수 있다는 장점이 있다.

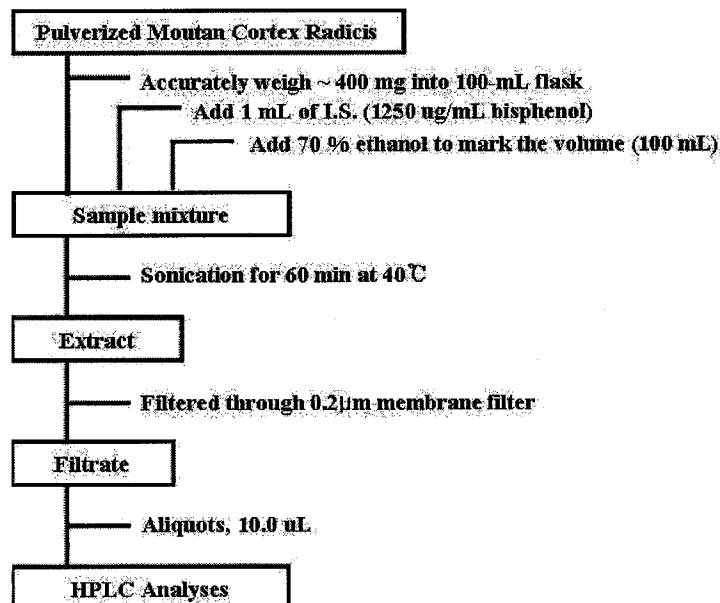


그림 1. 목단피 성분의 HPLC 분석을 위한 추출 방법

표 1. 목단피 시료의 분석을 위한 HPLC 조건

HPLC Model	Gilson
Detector	GilsonUV/VIS-151(wavelength 230 nm)
Column	PhenomenexGemini C18 (250 x 4.60 mm, 5 μm)
Flowrate	1 mL/min
Column temp.	Room temp.
Autosampler	GX-271
Pump	Gilson321pump
Injection volume	10 μL
Mobile Phase	A. 0.05%formicacidinwater B.Acetonitrile Gradient: Time(%B)- 0 min(10%), 20(20), 30(40), 50(40), 60(100), 70(10)

## 2) 표준품의 평가

표준품은 유사도비교, 진위판정, 원산지판정에 중요한 역할을 하므로 제대로 된 표준품을 선택하는 것은 통계분석을 위해 매우 중요하다. 사업단에서 제공한 생약을 표준생약(표준품)으로 간주하고 다변량 기각검정법, 유사도비교, 군집분석 등의 다양한 기법을 이용하여 평가한 후 개개의 품질 및 사용여부를 결정하였다.

## ① 다변량기각검정법을 이용한 평가

다변량기각검정법(multivariate outlier detection)을 동일 그룹내 여러개의 자료 중 소수의 이상치가 존재하는지를 검출하는 방법이다. 이 방법을 이용하면 표준품그룹에서 동떨어진 개체가 있는지를 조사할 수 있다. R 프로그램의 mvoutlier 패키지에서 다변량기각검정법은 sign1과 sign2가 있는데 sign1은 마할라노비스 거리를, sign2는 주성분(principal component)에 근거한 거리를 이용하여 계산한다. 둘다 사용여도 무방하지만 본 연구에서는 후자인 sign2를 주로 사용하였다.

## ② 유사도(similarity index)측정을 이용한 평가

유클리드 거리(d), 코사인(C), 면적비(A), 상관계수(r) 등의 척도로부터 표준품의 평균과 각각의 표준품과의 유사도를 계산하고 비교 평가하였다. 각 유사도의 계산은 다음의 식을 이용하였다.

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

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

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

$$\text{상관계수 } r_{ir} = \frac{\sum_{k=1}^m (X_{ik} - \bar{X}_i)(X_{rk} - \bar{X}_r)}{\sqrt{\sum_{k=1}^m (X_{ik} - \bar{X}_i)^2 \sum_{k=1}^m (X_{rk} - \bar{X}_r)^2}}$$

### ③ 계층적 군집방법을 이용한 표준품의 군집분석

산지가 서로 다른 표준품이 섞여 있을 경우 산지가 같은 개체끼리 서로 묶을 수 있는지를 검토하는 방법으로 원산지 분석이 가능할 지를 알려주는 척도가 된다. 계층적 방법(hierarchical method)은 사전에 군집수를 정하지 않고 단계적으로 군집을 형성하는 방법으로 R 프로그램의 cluster 패키지에서는 agnes (agglomerative nesting), hclust (hierarchical clustering), diana (divisive analysis clustering) 등을 사용할 수 있다. 군집의 표현은 덴드로그램으로 나타난다. 표준품이 산지별로 군집을 제대로 형성하지 않으면 선택된 피크가 산지별 특성을 제대로 대변하고 있지 않거나 시료자체가 산지별 특성이 거의 없는 것으로 원산지판정이 불가능할 경우가 많다.

### ④ 비계층적 군집방법을 이용한 표준품의 군집분석

산지가 서로 다른 표준품이 섞여 있을 경우 산지가 같은 개체끼리 서로 묶을 수 있는지를 검토하는 방법으로 원산지 분석이 가능할 지를 알려주는 척도가 된다. 비계층적 방법(non-hierarchical method)은 사전에 군집수를 정한 후 각 군집의 대표값 또는 대표 객체를 정하고 각 객체를 어느 하나의 군집에 배정하는 방법으로 R 프로그램의 cluster 패키지에서는 kmeans, clara (clustering large applications), fanny (fuzzy analysis clustering), pam (partition around medoids) 등을 사용할 수 있다. 결과의 표현은 군집의 영역과 실루엣그림으로 나타난다. 군집분석의 질을 비교하기 위해서는 실루엣그림을 이용하였다. x축의 실루엣폭이 1에 가까우면 개체가 제대로 분류되었음을 의미하고, -1에 가까우면 잘못 분류되었음을 의미한다. 0에 가까우면 개체가 두 군집 사이에 놓여 있음을 의미한다. 표준품이 산지별로 군집을 제대로 형성하지 않으면 선택된 피크가 산지별 특성을 제대로 대변하고 있지 않거나 시료자체가 산지별 특성이 거의 없는 것으로 원산지판정이 불가능할 경우가 많다.

## 3) 표준크로마토그램의 작성

통계조사에 사용될 표준품 및 피크가 확정되면 다수의 표준품에 해당하는 각각의 피크를 평균하여 표준크로마토그램을 작성한다. 각 산지에 따른 피크의 종류 및 크기가 다른 경우는 산지별로 각각 표준크로마토그램을 작성할 수도 있다. 표준크로마토그램은 유사도의 계산, 진위판정, 원산지판정 등 대상시료의 크로마토그램과와 표준품의 크로마토그램을 비교해야하는 경우에 사용되었다.

#### 4) 표준품에 의한 생약의 진위판정

진위가 알려져 있는 시험용시료 (밸리데이션시료) 또는 시험용 미지시료의 크로마토그램을 표준크로마토그램과 비교하여 진위를 판정하는 방법으로 다변량기각검정, 유사도비교, 군집분석 등의 기법을 이용하였다. 판정기준은 연구자가 따로 정할 수 있다. 각 산지에 따른 피크의 종류 및 크기가 달라 산지별 구별이 가능한 경우 산지별로 표준크로마토그램을 사용하여 판정하였다.

##### ① 다변량기각검정법을 이용한 진위판정

다변량기각검정법을 이용하여 표준품과 시험용시료를 동시에 분석하고 자료 중 소수의 이상치가 존재하는지를 검출하였다. 그 값이 기각역에 있으면 이상치로 보고 위품으로 판정하지만 그 값이 기각역 주위에 있으면 연구자가 판단하였다.

##### ② 유사도(similarity index)측정을 이용한 진위판정

표준품과 시험용시료에 대한 유클리드 거리(d), 코사인(C), 면적비(A), 상관계수(r) 등의 척도를 비교한다. 유사도가 월등히 차이나는 개체는 위품으로 판정하였다.

##### ③ 계층적 군집방법을 이용한 진위판정

표준품 및 시험용시료를 사용하여 군집의 수를 정하지 않고 agnes, hclust, diana 등을 사용 군집 분석을 시행하였을 경우 표준품의 군집에 속하지 않는 시료는 모두 위품으로 판정할 수 있다. 군집이 나누어지기는 하나 표준품이 서로 다른 군집을 형성하는 등 엉성한 군집이 형성되는 경우는 위품이 존재하지 않을 수도 있다. 군집의 기준에 대해서는 연구자가 다른 결과를 참고하여 결정하였다.

##### ④ 비계층적 군집방법을 이용한 진위판정

표준품 및 시험용시료를 사용하여 군집의 수를 2개로 정하고 kmeans, clara, fanny, pam 등을 사용 분집분석을 시행하였을 경우 표준품의 군집에 속하지 않는 시료는 모두 위품으로 판정할 수 있다. 군집이 나누어지기는 하나 표준품이 서로 다른 군집을 형성하는 등 엉성한 군집이 형성되는 경우는 위품이 존재하지 않을 수도 있다. 실루엣그램에서 실루엣폭이 0.7이상이면 대체로 양호한 분석으로 판단할 수 있지만 진위판정은 다른 결과를 참고하여 결정하였다.

#### 5) 표준품에 의한 생약의 원산지판정

진위가 알려져 있는 시험용시료 (밸리데이션시료) 또는 시험용 미지시료의 크로마토그램을 표준크로마토그램과 비교하여 원산지를 판정하는 방법으로 판별분석, 주성분분석법, 부분최소자승회귀법 등을 이용하였다. 표준품의 평가에서 표준품이 산지별로 군집을 제대로 형성하지 않으면 선택된 피크가 산지별 특성을 제대로 대변하고 있지 않거나 시료자체가 산지별 특성이 거의 없는 것으로 원산지판정이 불가능할 경우가 많다.



### ① 주성분분석에 의한 원산지판정

주성분분석은 (principal components analysis)은 다변량자료로부터 변량을 대표하는 총합적 지표를 구하고자 하는 경우 사용된다. R 프로그램의 stats 패키지에서 princomp와 예측을 위한 predict를 이용한다. 이것은 관측된 많은 수의 다차원 변량을 이들의 선형결합으로 표현되는 소수의 합성변량으로 자료의 변동을 설명한다. 표준품을 주성분분석법으로 원산지의 개수와 같은 수의 군집으로 나눈 후 밸리데이션시료 또는 미지시료의 산지를 예측한다. 표준품이 산지별로 군집을 제대로 형성하여야 예측결과가 좋아진다.

### ② 부분최소자승회귀에 의한 원산지판정

부분최소자승회귀법(partial least squares regression)은 supervised grouping으로 관찰 가능한 변수를 이용하여 다른 변수를 예측하기 위한 직선모델을 구하는 방법이다. R 프로그램의 pls 패키지에서 pls와 예측을 위한 predict를 이용한다. 원산지분석을 위하여 표준품을 군집으로 나누고, 예측을 통하여 밸리데이션시료를 각각의 군집에 배정하는 절차를 거치게 된다. 표준품을 군집으로 나누기 위하여 주성분분석의 경우 원산지에 관한 자료를 사용하지 않지만 부분최소자승회귀법의 경우 원산지에 관한 자료를 입력하여야 한다. 원산지분석의 경우 부분최소자승회귀법이 주성분분석보다 효과가 좋다는 것이 알려져 있다. 표준품이 산지별로 군집을 제대로 형성하여야 예측결과가 좋아진다.

### ③ 판별분석에 의한 원산지판정

판별분석(discriminant analysis)은 반응변수가 상호배반적인 몇 개의 군에 속하는 다변량 관측치로부터 특정 개체가 어느 군에 속할지를 나타내는 판별기준을 추정하고, 새로운 관측치를 추정된 판별기준에 의해 각 군에 할당하는 분석기법이다. 자료로부터 구해진 판별기준은 흔히 판별함수(discriminant function)라 불리며 주로 일차(linear) 또는 이차(quadratic)의 판별함수가 사용된다. 판별분석은 일반적으로 두 가지 목적으로 사용된다. 첫 번째는 두 개 이상의 집단을 가장 잘 변별하는 변인을 파악하기 위한 목적으로 사용되는 것으로 기술적 판별분석이라 한다. 두 번째 목적은 소속집단이 불분명한 사례들의 집단을 예측하는 것으로 예측 판별분석이라 한다. 본 실험에서는 원산지가 평가된 표준품을 이용하여 판별함수를 구하고 이를 이용하여 미지시료의 산지를 예측하였다.

## 제3장 세부연구개발과제의 최종 연구개발 결과

### 3.1 계지의 생리활성성분 동시분석

#### 3.1.1. HPLC 분석조건

##### 1) HPLC 분석조건

계지에서는 제1세부과제의 연구결과 아래와 같이 coumarin, 2-hydroxycinnamaldehyde, cinnamyl alcohol, cinnamic acid, cinnamaldehyde, 2-methoxy cinnamaldehyde, eugenol 등의 화합물이 주성분으로 분리 정제되었다 (그림 2). 분석조건은 HPLC pattern 분석을 위한 gradient 조건으로 7가지 성분을 동시에 분석할 수 있는 조건으로 하였다. 또한 분석에 소요되는 시간과 각각 성분의 이론단수, resolution을 비교하면서 gradient 조건으로 분석 조건을 설정하였다 (표 2). 두 가지 용매 조건에 대한 chromatogram을 아래에 나타내었다 (그림 3). 내부 표준물질은 retention time과 분리의 양호성을 고려하여 bisphenol로 선정하였다.

#### Marker compounds and Internal Standard

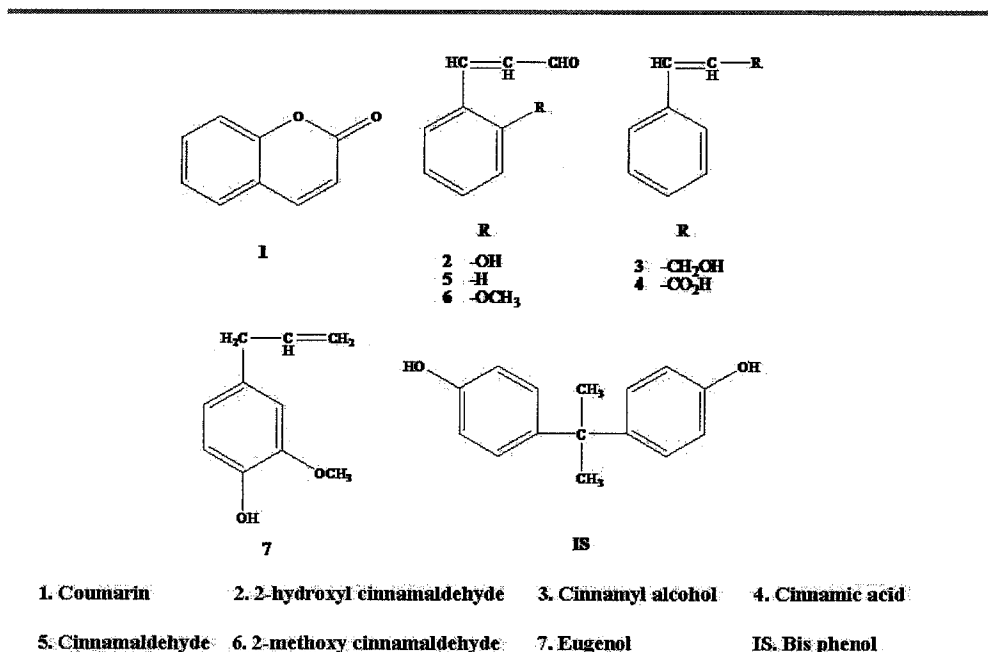
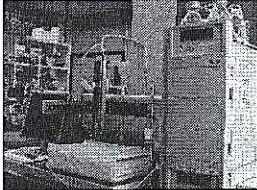


그림 2. 계지의 주요 성분

표 2. 계지 성분의 HPLC 최종 분석 조건

## HPLC conditions

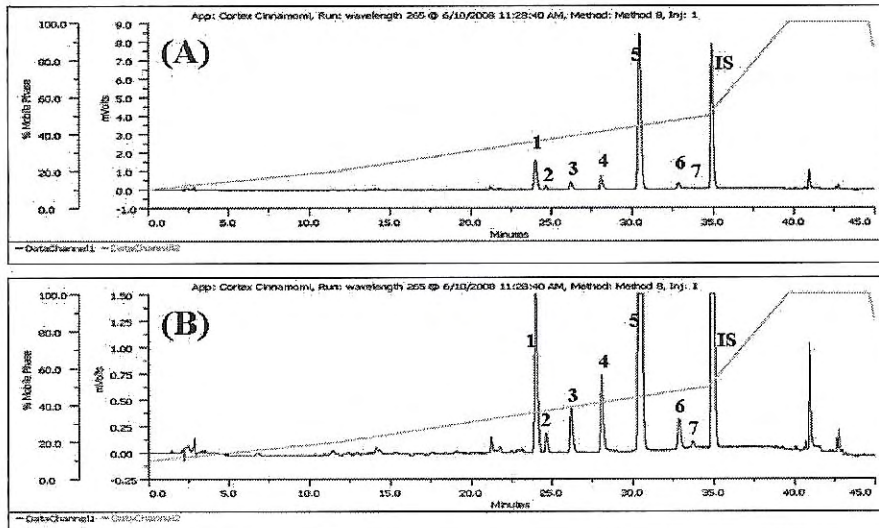
Operation conditions		
HPLC	Gilson	
Detector	Gilson UV/VIS-151 (wavelength 265 nm)	
Column	Phenomenex Gemini 5u C18 (250 × 4.60 mm, 5 μm)	
Flow rate	1 mL/min	
Column temp.	Room temp.	
Auto sampler	GX-271	
Solvent mixing	Gilson 321 pump	
Injection volume	10 μL	



Time (min)	Solvent A (%) <sup>a</sup>	Solvent B (%) <sup>b</sup>
0	90	10
12	30	20
35	50	50
40	0	100
45	0	100
50	90	10

<sup>a</sup> 0.1% Phosphoric acid in water; <sup>b</sup> Acetonitrile

## HPLC chromatogram of 50% Methanol extract (A, B)



1. Coumarin      2. 2-hydroxyl cinnamaldehyde      3. Cinnamyl alcohol      4. Cinnamic acid  
 5. Cinnamaldehyde      6. 2-methoxy cinnamaldehyde      7. Eugenol      IS. Bis phenol

그림 3. 두 가지 용매 조건에서의 HPLC 크로마토그램  
 (A: 0.1% phosphoric acid in water, B: Acetonitrile)

## 2) 계지 성분의 추출조건

계지 성분을 분석하기 위하여 지표물질로 coumarin (1), 2-hydroxyl cinnamaldehyde (2), cinnamyl alcohol (3), cinnamic acid (4), cinnamaldehyde (5), 2-methoxy cinnamaldehyde (6), eugenol (7)을 설정하고, 추출방법은 표준추출법을 준용하면서 추출하는 용매를 50 % EtOH, 75 % EtOH, 100% EtOH, 50% MeOH, 75% MeOH, 100% MeOH 의 용매로 추출하여 분석한 결과, 50 % MeOH로 추출하는 경우 지표성분의 분리가 가장 양호한 결과를 나타내었다 (표 3).

표 3. 추출 용매에 따른 계지 지표성분의 추출 함량

1. Solvent																					
Solvent	Content																				
	Coumarin			2-Hydroxyl cinnamaldehyde			Cinnamyl alcohol			Cinnamic acid			Cinnamaldehyde			2-Methoxy cinnamaldehyde			Eugenol		
	Mea n	SD	RSD	Mea n	SD	RSD	Mea n	SD	RSD	Mea n	SD	RSD	Mea n	SD	RSD	Mea n	SD	RSD	Mea n	SD	RSD
100% MeOH	0.43	0.00	0.10	0.04	0.00	0.38	0.20	0.00	0.44	0.02	0.00	0.11	2.83	0.01	0.17	0.32	0.00	0.28	0.16	0.00	0.27
75% MeOH	0.42	0.00	0.34	0.05	0.00	0.05	0.19	0.00	0.39	0.03	0.00	0.44	2.65	0.02	0.41	0.35	0.00	1.07	0.17	0.00	0.89
50% MeOH	0.41	0.00	0.58	0.04	0.00	0.23	0.20	0.00	0.02	0.03	0.00	0.39	2.69	0.02	0.54	0.36	0.00	3.48	0.15	0.00	0.26
100% EtOH	0.24	0.00	0.74	0.02	0.00	0.10	0.18	0.00	0.04	0.02	0.01	2.05	1.96	0.02	0.58	0.35	0.00	5.04	0.09	0.00	0.34
75% EtOH	0.45	0.00	0.17	0.5	0.00	0.32	0.18	0.00	0.46	0.03	0.00	0.34	2.31	0.00	0.02	0.31	0.00	5.69	0.18	0.00	0.15
50% EtOH	0.38	0.00	0.14	0.03	0.00	0.42	0.21	0.00	0.13	0.03	0.00	1.10	2.82	0.01	0.35	0.35	0.00	2.95	0.16	0.00	0.48

## 3) 계지 성분의 추출방법

계지의 지표성분의 추출방법을 reflux, shaking, sonication의 세 가지 방법을 비교해 본 결과 sonication을 이용하여 추출하는 경우가 가장 지표성분의 함량이 높게 나오는 결과를 얻었다 (표 4).

표 4. 추출 방법에 따른 계지 지표성분의 추출 함량

## 2. Method

Method	Content																				
	Coumarin			2-Hydroxyl cinnamaldehyde			Cinnamyl alcohol			Cinnamic acid			Cinnamaldehyde			2-Methoxy cinnamaldehyde			Eugenol		
	Mean	SD	RSD	Mean	SD	RSD	Mean	SD	RSD	Mean	SD	RSD	Mean	SD	RSD	Mean	SD	RSD	Mean	SD	RSD
Reflux	0.34	0.00	0.66	0.03	0.00	0.23	0.19	0.00	0.76	0.02	0.00	0.39	2.20	0.00	0.04	0.32	0.00	0.78	0.14	0.00	0.26
Shaking	0.35	0.00	0.59	0.03	0.00	0.57	0.19	0.00	0.66	0.02	0.00	0.32	2.36	0.01	0.53	0.31	0.00	0.18	0.13	0.00	0.86
Sonication	0.42	0.00	0.75	0.04	0.00	0.74	0.21	0.00	1.25	0.03	0.00	0.18	2.69	0.01	0.29	0.36	0.00	1.08	0.15	0.01	1.51

## 4) 계지 성분의 추출시간

계지 성분을 sonication으로 추출할 경우 가장 양호한 추출시간을 결정하기 위하여 10, 20, 30, 60, 90 분의 시간대별로 추출해 본 결과 60 분의 경우가 지표성분의 함량이 가장 높은 결과를 얻었다 (표 5).

표 5. 추출 시간에 따른 계지 지표성분의 추출 함량

## 3. Time

Time	Content																				
	Coumarin			2-Hydroxyl cinnamaldehyde			Cinnamyl alcohol			Cinnamic acid			Cinnamaldehyde			2-Methoxy cinnamaldehyde			Eugenol		
	Mean	SD	RSD	Mean	SD	RSD	Mean	SD	RSD	Mean	SD	RSD	Mean	SD	RSD	Mean	SD	RSD	Mean	SD	RSD
10 min	0.43	0.00	0.13	0.02	0.00	0.38	0.16	0.00	0.64	0.02	0.00	0.09	2.30	0.01	0.30	0.26	0.00	1.25	0.09	0.00	0.29
20 min	0.52	0.00	0.36	0.03	0.00	0.04	0.17	0.00	0.34	0.03	0.00	0.42	2.43	0.02	0.63	0.29	0.00	0.75	0.12	0.00	0.83
30 min	0.60	0.00	0.52	0.04	0.00	0.15	0.18	0.00	0.69	0.03	0.00	0.31	2.92	0.02	0.69	0.31	0.00	1.20	0.14	0.00	0.18
60min	0.69	0.00	0.40	0.05	0.00	0.03	0.20	0.00	0.76	0.04	0.00	2.48	3.21	0.02	0.54	0.37	0.00	1.80	0.15	0.00	0.13
90 min	0.71	0.00	0.14	0.05	0.00	0.23	0.21	0.00	0.46	0.04	0.00	0.24	3.27	0.00	0.02	0.39	0.00	1.20	0.15	0.00	0.11

## 5) 계지 성분의 추출횟수

계지의 지표성분을 sonication으로 추출할 경우 가장 양호한 추출횟수를 결정하기 위하여 1회 50 ml, 2회 (30ml 1회, 20 ml 1회), 3회(30ml 1회, 10 ml 2회) 추출한 결과 1회 추출한 경우에도 2회 3회 추출한 것과 큰 차이가 없어 1회 추출하는 것으로 결정하였다 (표 6).

표 6. 추출 횟수에 따른 계지 지표성분의 추출 함량

## 4. Frequency

Frequency	Content																				
	Coumarin			2-Hydroxyl cinnamaldehyde			Cinnamyl alcohol			Cinnamic acid			Cinnamaldehyde			2-Methoxy cinnamaldehyde			Eugenol		
	Mean	SD	RSD	Mean	SD	RSD	Mean	SD	RSD	Mean	SD	RSD	Mean	SD	RSD	Mean	SD	RSD	Mean	SD	RSD
1	0.52	0.00	0.10	0.04	0.00	0.34	0.17	0.00	0.15	0.03	0.00	0.43	2.60	0.01	0.23	0.35	0.00	0.43	0.14	0.00	0.79
2	0.53	0.00	0.35	0.05	0.00	0.70	0.20	0.00	0.03	0.04	0.00	0.34	2.64	0.01	0.43	0.37	0.00	0.75	0.16	0.01	1.11
3	0.56	0.00	0.56	0.05	0.00	0.25	0.22	0.00	0.25	0.04	0.00	0.35	2.70	0.01	0.35	0.38	0.00	0.66	0.17	0.01	1.00

1. (50 mL×1); 2. (30 mL×1, 20 mL×1); 3. (30 mL×1, 10 mL×2)

### 3.1.2 HPLC 조건 Validation

#### 1) 이동상 용액의 validation

최적 이동상 조건을 설정하기 위하여 문헌을 참고하여 이동상의 조건을 설정하였다. 각각의 조건에 대하여 HPLC chromatogram을 얻어서, theoretical number, tailing factor, S/N ration 등을 구하여 HPLC 조건을 validation 하였다. 또한 phosphoric acid와 acetic acid의 분리능을 비교분석한 결과 phosphoric acid의 경우가 acetic acid보다 양호한 결과를 얻었다 (그림 4).

### 1. Effect of mobile phase on HPLC analysis

Condition	Coumarin	2-hydroxyl cinnamaldehyde	Cinnamyl alcohol	Cinnamic acid	Cinnamaldehyde	2-methoxy cinnamaldehyde	Eugenol	
Theoretical number	P	399949.47	406219.40	394839.50	495097.99	395336.22	468450.49	674220.26
	A	288761.22	409048.88	415609.69	475367.39	399603.36	485842.48	727856.59
Tailing factor	P	1.29	1.17	1.19	1.21	1.20	1.12	0.94
	A	1.23	1.16	1.19	1.22	1.19	1.16	1.01
S/N ratio	P	620.66	76.97	163.11	289.40	3460.82	115.64	27.74
	A	329.28	38.15	83.77	138.65	1712.66	57.94	12.16

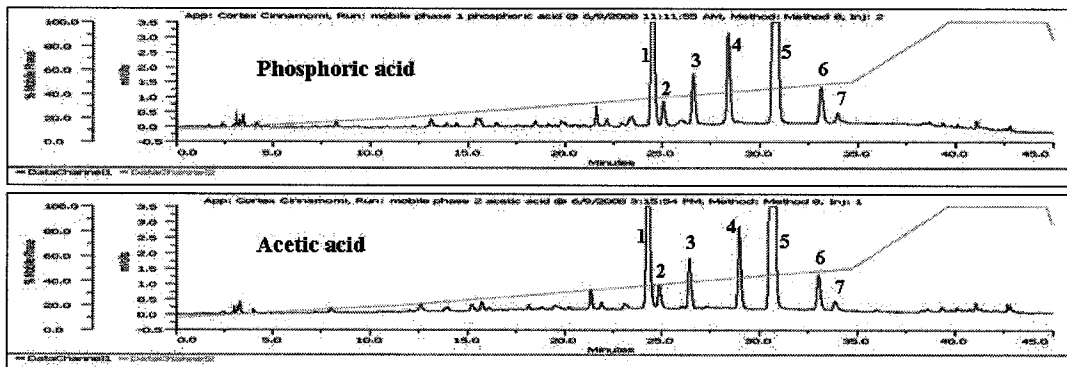


그림 4. 계지 성분의 HPLC 분석을 위한 이동상의 validation



## 2) 이동상의 gradient condition의 validation

이동상의 최적 gradient condition을 선정하기 위하여 여러 가지 조건을 시도한 결과 5번의 용매조건을 이동상으로 할 경우 가장 양호한 분리 결과를 얻었다 (표 7).

표 7. 계지 성분의 HPLC 분석을 위한 이동상의 gradient 조건

**2. Effect of gradient condition on mobile phase**

No.	Coumarin	2-hydroxyl cinnamaldehyde	Cinnamyl alcohol	Cinnamic acid	Cinnamaldehyde	2-methoxy cinnamaldehyde	Eugenol	
Theoretical number	1	173465.18	293021.74	342255.87	528918.34	372581.91	524722.35	810546.12
	2	301825.43	481619.63	541290.20	740571.29	569656.62	699002.70	869873.89
	3	309587.34	426345.85	474699.37	601914.03	547570.92	676999.67	936205.91
	4	133119.21	176117.78	279467.98	439938.00	356576.51	466449.92	671043.12
	5	293966.89	406204.43	401173.20	511710.09	413387.15	475801.92	577570.37
Tailing factor	1	1.11	1.08	1.05	1.16	1.13	1.05	0.89
	2	1.21	1.19	1.12	1.24	1.19	1.16	1.02
	3	1.21	1.13	1.20	1.23	1.22	1.20	1.01
	4	1.23	1.13	1.19	1.28	1.21	1.16	1.03
	5	1.21	1.16	1.16	1.25	1.21	1.11	0.96
Retention time	1	38.44	41.57	45.11	50.33	53.17	58.57	60.89
	2	29.24	30.49	32.11	34.35	36.45	38.94	39.83
	3	27.36	27.89	29.17	30.86	33.13	35.17	35.79
	4	24.46	25.96	28.04	31.03	33.47	36.43	37.55
	5	24.48	25.05	26.58	28.39	30.76	33.14	33.89
No.	Conditions							
1	0-25, A (100-75%); 26-60, A (75-25%); 60-65, A (25%); 65-70, A (25-100%)							
2	0-5, A (98%); 5-20, A (98-80%); 20-40, A (80-60%); 40-60, A (60-0%); 60-65, A (0%); 65-70, A (0-98%)							
3	0-5, A (96%); 5-20, A (96-80%); 20-40, A (80-60%); 40-60, A (60-0%); 60-65, A (0%); 65-70, A (0-96%)							
4	0-5, A (94%); 5-20, A (94-80%); 20-40, A (80%); 40-60, A (80-0%); 60-65, A (0%); 65-70, A (0-94%)							
5	0-5, A (90%); 5-20, A (90-80%); 20-40, A (80-60%); 40-60, A (60-0%); 60-65, A (0-100%); 65-70, A (100-90%)							

## 3) Phosphoric acid의 최적 농도선정

Phosphoric acid의 최적 농도를 설정하기 위하여 0.05 %, 0.1 %, 0.5 % phosphoric acid의 농도를 함유한 이동상을 제조하여 분석능을 조사한 결과 0.1 % phosphoric acid의 농도로 제조한 이동상이 가장 양호한 분석능을 나타내었다 (표 8).

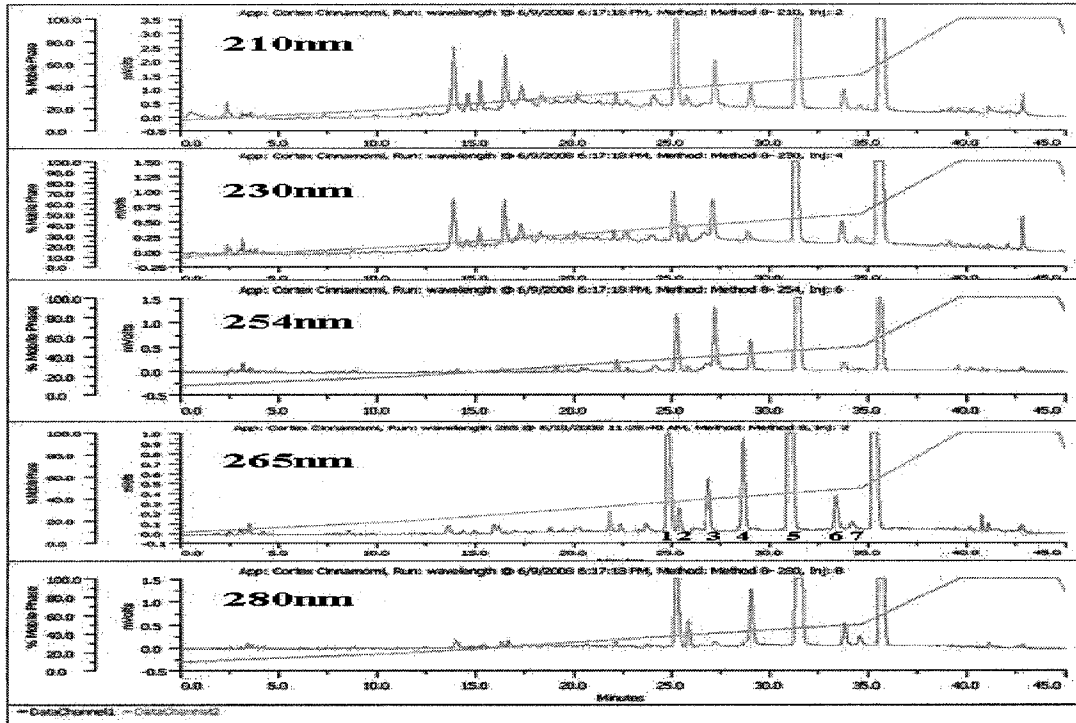
표 8. 계지 성분의 HPLC 분석을 위한 Phosphoric acid의 최적 농도 조건

**3. Effect of the concentration of phosphoric acid (%) on mobile phase**

	Conc. (%)	Coumarin	2-hydroxyl cinnamaldehyde	Cinnamyl alcohol	Cinnamic acid	Cinnamaldehyde	2-methoxy cinnamaldehyde	Eugenol	IS
Theoretical number	0.5	298550.16	410507.00	429848.09	530442.79	427448.65	497857.21	627524.94	833528.23
	0.1	300123.09	414663.97	429832.98	523546.08	429261.28	496262.61	631189.69	840310.18
	0.05	294772.38	415124.27	416408.57	475392.72	421469.76	471084.87	633688.08	796569.48
Tailing factor	0.5	1.21	1.14	1.15	1.17	1.19	1.12	1.00	1.31
	0.1	1.21	1.18	1.16	1.20	1.20	1.13	1.07	1.35
	0.05	1.54	1.19	1.20	1.23	1.22	1.17	1.05	1.35
S/N ratio	0.5	345.50	43.70	96.31	168.77	2054.24	69.38	17.98	1490.24
	0.1	485.53	57.78	127.00	221.21	2623.39	87.52	22.16	1898.83
	0.05	427.15	55.67	109.45	200.71	2393.66	82.63	17.43	1821.19

## 4) 최적 UV 파장의 선정

최적 UV 파장의 조건을 설정하기 위하여 210 nm, 230 nm, 254 nm, 265 nm, 280 nm에서의 분리도를 조사한 결과 265 nm에서 가장 양호한 분리능을 얻을 수 있었다 (그림 5).



## UV wavelength

	s/n ratio				
	210nm	230nm	254nm	265nm	280nm
Standards					
Coumarin (1)	484.71	162.94	236.00	197.00	570.70
2-hydroxyl cinnamaldehyde (2)	37.67	51.22	18.00	22.50	113.75
Cinnamyl alcohol (3)	160.23	122.72	246.14	51.22	25.00
Cinnamic acid (4)	78.32	26.19	120.00	91.05	237.38
Cinnamaldehyde (5)	936.00	1002.26	1024.34	988.99	4486.52
2-methoxy cinnamaldehyde (6)	67.46	69.07	28.70	33.61	93.99
Eugenol (7)	11.75	18.38	11.50	6.50	35.00
Bis phenol (IS)	7044.35	11821.10	726.81	949.85	3733.83

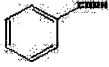
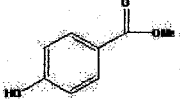
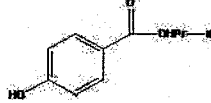
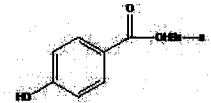
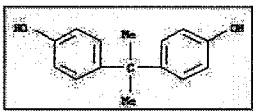
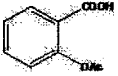
그림 5. 계지 성분의 HPLC 분석을 위한 최적 UV 파장 조건

## 5) 최적 internal standard의 선정

최적 internal standard를 선정하기 위하여 benzoic acid, methyl paraben, propyl paraben, butyl paraben, bisphenol, aspirin 의 6종 화합물에 대한 분리도와 retention time 등을 비교한 결과 bisphenol 의 경우가 다른 peak와 중첩되지 않으면서 가장 양호한 분리능을 보여서 bisphenol을 internal standard 로 선정하였다 (표 9).

표 9. 계지 성분의 HPLC 분석을 위한 최적 internal standard 조건

## 5. Selection of internal standard

	Internal Standard	Structure	Retention time (min)
1	Benzoic acid		22.17
2	Methyl paraben		23.28
3	Propyl paraben		34.00
4	Butyl paraben		38.45
5	Bis phenol		34.61
6	Aspirin		21.26

### 3.1.3 Validation

#### 1) 정확성 (Accuracy)

규정된 범위를 포함하여 최소한 3농도에 대해서 분석법의 전 조작을 적어도 9회 반복 측정 (3농도에 대해서 3회씩 반복 측정)하여 정확성을 측정하였다. 기지량의 coumarin, 2-hydroxyl cinnamaldehyde, cinnamyl alcohol, cinnamic acid, cinnamaldehyde, 2-methoxy cinnamaldehyde, eugenol을 첨가한 검체를 정량하는 경우 회수율(%)로서 정확성을 나타내며 이때 회수율은 98.27-101.70 %의 양호한 수치를 나타내었다 (표 10).

표 10. 계지 성분의 HPLC 분석 조건의 정확성

### 1. Accuracy (Recovery test; n=3)

Compound	Added conc. ( $\mu\text{g/mL}$ )	Cal conc. ( $\mu\text{g/mL}$ )	Recovery (%)	SD	RSD (%)
Coumarin	0.00	19.33	-	-	-
	10.00	29.28	99.83	1.21	1.21
	20.00	39.16	99.57	1.56	1.57
2-hydroxyl cinnamaldehyde	0.00	1.89	-	-	-
	1.00	2.84	98.27	0.95	0.60
	2.00	3.83	98.46	1.18	1.20
Cinnamyl alcohol	0.00	9.17	-	-	-
	5.00	14.19	100.14	0.41	0.41
	10.00	19.25	100.42	0.85	0.85
Cinnamic acid	0.00	1.22	-	-	-
	0.50	1.70	98.84	1.81	1.83
	1.00	2.19	98.65	2.14	2.17
Cinnamaldehyde	0.00	123.31	-	-	-
	50.0	173.53	100.13	1.36	1.36
	100.0	223.69	100.17	2.21	2.20
2-methoxy cinnamaldehyde	0.00	3.79	-	-	-
	1.50	5.38	101.70	0.66	0.65
	3.00	6.89	101.47	1.05	1.03
Eugenol	0.00	4.78	-	-	-
	2.00	6.81	100.44	1.29	1.28
	4.00	8.74	99.54	1.06	1.06

## 2) 정밀성 (Precision)

표준편차, 상대표준편차 (변동계수) 및 표준편차의 신뢰구간으로 정밀성을 확인하였으며 coumarin, 2-hydroxyl cinnamaldehyde, cinnamyl alcohol, cinnamic acid, cinnamaldehyde, 2-methoxy cinnamaldehyde, eugenol 모두 1.35 % 이내의 수치를 나타내었다 (표 11).

표 11. 계지 성분의 HPLC 분석 조건의 정밀성

**2-1. Precision (Reproducibility; n=4)**

Compound	Peak area ratio (peak area/IS area)			Retention time (min)		
	Mean	SD	RSD (%)	Mean	SD	RSD (%)
Coumarin	4.57	0.03	0.70	24.86	0.02	0.08
2-hydroxyl cinnamaldehyde	0.52	0.00	0.72	25.45	0.03	0.13
Cinnamyl alcohol	1.05	0.00	0.12	26.97	0.05	0.17
Cinnamic acid	1.80	0.01	0.51	28.84	0.02	0.07
Cinnamaldehyde	25.29	0.11	0.43	31.03	0.03	0.10
2-methoxy cinnamaldehyde	0.93	0.01	0.33	33.39	0.01	0.03
Eugenol	0.16	0.00	1.35	34.43	0.02	0.04

## 3) 일내 및 일간 재현성

계지 유효성분 분석의 일내 정확성, 정밀성을 확인하기 위하여 3가지 농도에 대하여 하루에 3번 반복 실험하였으며, 일간 정확성, 정밀성을 확인하기 위하여 3일간 반복 실험하였다.

일내, 일간 정밀성은 각 성분과 내부표준물질의 피크 면적비의 표준편차를 각 성분과 내부표준물질의 피크면적비의 평균값으로 나눈 비의 백분율 (%)로서 구하였으며 그 값은 0.11 - 6.33 %와 0.21 - 4.35 % 내에 들었다.

일내, 일간 정확성은 검량선에 의하여 정량한 농도의 평균값을 기지의 농도로 나눈 비의 백분율 (%)로 구하였으며, 그 값은 96.31 - 101.99 %와 96.67 - 104.55 % 이었다 (표 12).

표 12. 계지 성분의 HPLC 분석 조건의 일내 및 일간 재현성

## 2-2. Precision (Intra/Inter-day)

Compound	Spiked conc. ( $\mu\text{g/ml}$ )	Intra day (n=3)				Inter day (n=3)			
		Observed conc. ( $\mu\text{g/ml}$ )	SD	RSD (%)	Accuracy (%)	Observed conc. ( $\mu\text{g/ml}$ )	SD	RSD (%)	Accuracy (%)
Coumarin	5.00	4.89	0.11	2.25	97.81	4.85	0.15	3.09	97.88
	10.00	9.95	0.21	2.11	99.52	10.03	0.35	3.49	100.31
	20.00	19.83	0.26	1.31	99.15	20.10	0.14	0.70	100.56
2-hydroxyl cinnamaldehyde	0.50	0.48	0.02	4.16	96.12	0.49	0.01	2.08	98.58
	1.00	0.97	0.05	4.26	97.09	0.98	0.01	1.02	98.49
	2.00	1.94	0.07	3.61	97.15	2.02	0.03	2.99	100.79
Cinnamyl alcohol	2.50	2.55	0.09	3.53	101.99	2.49	0.08	3.21	99.64
	5.00	5.02	0.11	2.19	100.41	5.04	0.08	1.59	100.84
	10.00	10.08	0.15	1.19	100.88	10.15	0.11	1.08	101.51
Cinnamic acid	0.25	0.24	0.01	4.17	96.31	0.23	0.01	4.35	96.97
	0.50	0.48	0.03	6.25	96.55	0.51	0.01	1.96	102.01
	1.00	0.97	0.02	2.06	97.37	10.04	0.02	1.99	100.40
Cinnamaldehyde	25.00	25.10	0.15	0.60	100.42	24.87	0.13	0.52	99.48
	50.0	50.22	0.16	0.32	100.44	49.83	0.22	0.44	99.60
	100.0	100.38	0.11	0.11	100.38	100.47	0.21	0.21	101.47
2-methoxy cinnamaldehyde	0.75	0.78	0.05	6.33	104.19	0.77	0.02	2.50	102.67
	1.50	1.54	0.06	3.77	102.67	1.45	0.05	3.50	96.67
	3.00	3.10	0.08	2.58	103.33	3.08	0.10	3.25	102.60
Eugenol	1.00	1.02	0.02	1.96	101.89	0.98	0.01	1.02	98.49
	2.00	2.03	0.02	0.99	101.49	2.09	0.02	0.96	104.55
	4.00	3.96	0.06	1.52	99.43	4.03	0.02	0.50	100.75

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

계지 유효성분의 직선성 농도범위를 coumarin 0.10~40.00 µg/mL, 2-hydroxyl cinnamaldehyde 0.05~10.00 µg/mL, cinnamyl alcohol 0.05~10.00 µg/mL, cinnamic acid 0.10~40.00 µg/mL, cinnamaldehyde 1.00~400.00 µg/mL, 2-methoxy cinnamaldehyde 0.05~5.00 µg/mL, eugenol 0.05~10.00 µg/mL 로 하였다. 각 지표성분의 정량범위는 검토한 각 성분의 농도에서 직선성을 나타내는 농도로 표시하였으며 면적비를 이용한 검량선으로 상관계수  $r^2$  를 구하여 양호한 직선성을 나타내는지 확인하였다. 검출한계(LOD)는 신호대 잡음비(S/N) =3을 기준으로 정하였고, 정량한계(LOQ)는 S/N=10을 나타내는 농도로써 표기하였다 (표 13).

표 13. 계지 성분의 HPLC 분석 조건의 직선성, 범위, 검출한계 및 정량한계

**3. Linearity/LOD/LOQ of marked compounds**

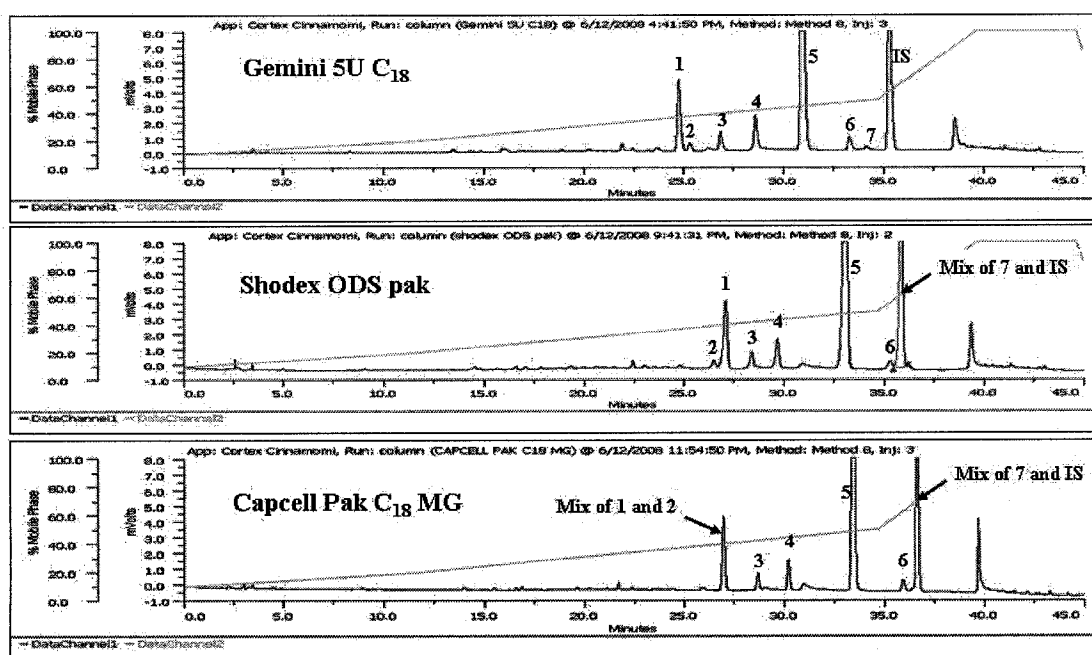
Compound	Linear range (µg/ml)	a	b	$r^2$	LOD (ng/ml)	LOQ (ng/ml)
Coumarin	0.10-40.00	0.2329	0.0673	0.9996	13.2	41.7
2-hydroxyl cinnamaldehyde	0.05-10.00	0.2809	-0.0118	0.9998	20.5	69.8
Cinnamyl alcohol	0.05-10.00	0.1136	0.0086	0.9996	43.3	129.4
Cinnamic acid	0.10-40.00	1.2178	0.3121	0.9996	9.2	17.3
Cinnamaldehyde	1.00-400.00	0.2010	0.5053	0.9997	16.5	53.3
2-methoxy cinnamaldehyde	0.05-5.00	0.2463	-0.0024	1.0000	91.6	304.2
Eugenol	0.05-5.00	0.0329	-0.0003	0.9998	18.3	50.1



## 5) 완건성 (Robustness)

세가지 서로 다른 HPLC column Gemini 5U C18, Shodex ODS pak, Capcell C18 MG로 7개의 계지 화합물을 분리해 본 결과 일부 피크가 중첩되는 경우는 있었으나 거의 동일한 분리 pattern을 나타내었 으며 그중 Gemini 5U C18 column의 경우가 가장 양호한 분리능을 나타내었다 (그림 6).

## 4-2. Robustness (Comparison of Columns)



All columns are those of analytical, 250×4.60mm, 5μm; Gemini 5u C<sub>18</sub> (Phenomenex); Shodex ODSpak; Polaris XRs 5 C<sub>18</sub> (Varian)

그림 6. 계지 성분의 HPLC 분석 조건의 완건성

### 3.1.4 표준품의 안정성 시험

계지의 지표성분의 안정성을 확인하기 위하여 지표성분인 coumarin, 2-hydroxyl cinnamaldehyde, cinnamyl alcohol, cinnamic acid, cinnamaldehyde, 2-methoxy cinnamaldehyde, eugenol을 0.5, 1, 2, 5, 10, 15일 30일 동안 냉장고와 상온에서 방치한 후 함량을 비교한 결과, 2-hydroxyl cinnamaldehyde의 경우 10일, 15일, 30일 상온에 방치한 경우 확인한 경시변화를 보였으며, 냉장 방치한 경우에는 15일, 30일에서 경시변화를 나타내었다. 그 외에 계지의 다른 지표성분은 유의성 있는 함량변화를 보이지 않았다 (그림 7).

## 4. Stability of analytes

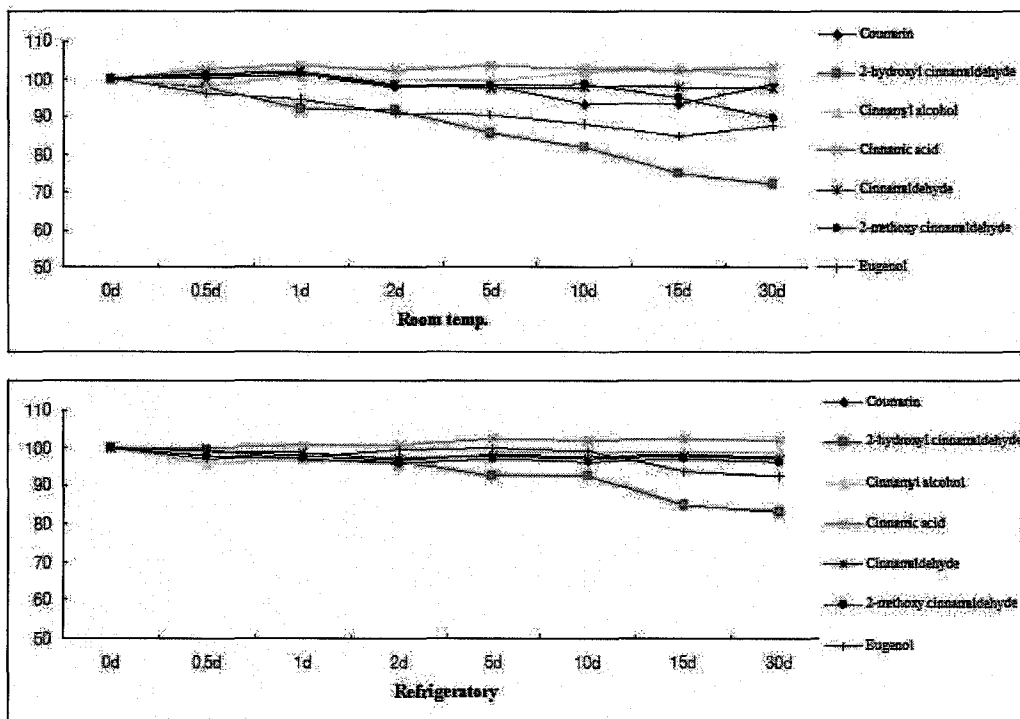
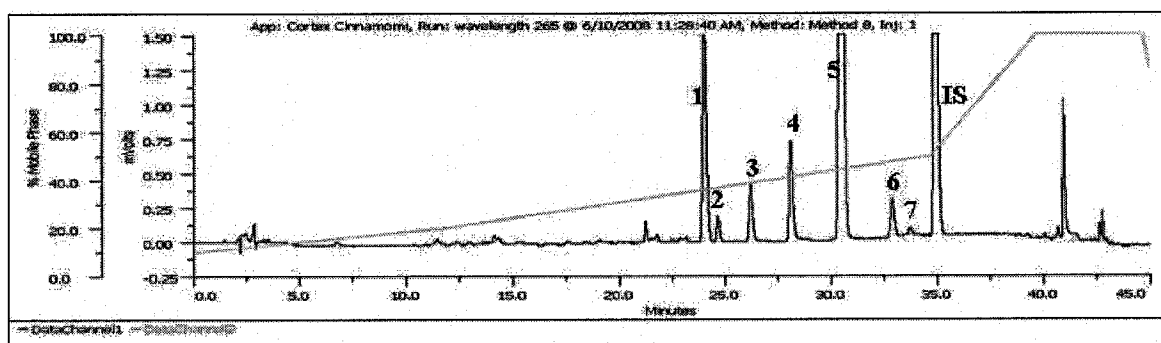


그림 7. 계지 성분의 안정성 시험

### 3.1.5 계지의 성분 확인

HPLC로 분석한 계지 성분의 retention time을 각각의 standard 화합물과 비교한 결과 지표성분으로 설정한 coumarin (S1, 24.86분), 2-hydroxyl cinnamaldehyde (S2, 25.45분), cinnamyl alcohol (S3, 26.97분), cinnamic acid (S4, 28.84분), cinnamaldehyde (S5, 31.03분), 2-methoxy cinnamaldehyde (S6, 33.39분), eugenol (S7, 34.43분)은 양호한 분리능을 나타내었고, 내부 표준물질로 사용한 bisphenol은 35.61분에서 분리되었다 (그림 8).

## HPLC chromatogram of 50% Methanol extract



1. Coumarin      2. 2-hydroxyl cinnamaldehyde      3. Cinnamyl alcohol      4. Cinnamic acid  
 5. Cinnamaldehyde      6. 2-methoxy cinnamaldehyde      7. Eugenol      IS. Bis phenol

그림 8. HPLC 크로마토그램에서 계지 성분의 확인

### 3.1.6 계지 시료의 HPLC 분석

#### 1) 계지 시료의 구입

분석에 사용한 계지는 총 32개의 시료로서 사업단에서 3개의 계피 시료를 제공받았으며, 그 외의 29 개의 시료는 전국 각지에서 구입하였다 (표 14).

표 14. 분석에 사용한 계지 시료 목록

No	학명	품종	기원	수집장소	형태	비고
CC-1	<i>C. cassia</i>	계지	베트남	대전	음편	
CC-2	<i>C. cassia</i>	계지	베트남	대전	음편	
CC-3	<i>C. cassia</i>	계지	베트남	대전	음편	
CC-4	<i>C. cassia</i>	계지	베트남	경북	음편	
CC-5	<i>C. cassia</i>	계지	베트남	부산	음편	
CC-6	<i>C. cassia</i>	계지	베트남	서울	음편	
CC-7	<i>C. cassia</i>	계지	베트남	대전	음편	
CC-8	<i>C. cassia</i>	계지	베트남	서울	음편	사업단
CC-9	<i>C. cassia</i>	계지	베트남	서울	전형	사업단
CC-10	<i>C. cassia</i>	계지	중국	중국	음편	사업단
CC-11	<i>C. cassia</i>	계지	중국	대전	음편	
CC-12	<i>C. cassia</i>	계지	중국	중국	음편	
CC-13	<i>C. cassia</i>	계지	중국	중국	음편	
CC-14	<i>C. cassia</i>	계지	중국	중국	음편	
CC-15	<i>C. cassia</i>	계지	중국	서울	음편	
CC-16	<i>C. cassia</i>	계지	중국	서울	음편	
CC-17	<i>C. cassia</i>	계지	중국	서울	음편	
CC-18	<i>C. cassia</i>	계지	중국	경북	음편	
CC-19	<i>C. cassia</i>	계지	중국	충남	음편	
CC-20	<i>C. cassia</i>	계지	중국	충남	음편	
CC-21	<i>C. cassia</i>	계지	중국	대전	음편	
CC-22	<i>C. cassia</i>	계지	중국	대전	음편	
CC-23	<i>C. cassia</i>	계지	중국	대전	음편	
CC-24	<i>C. cassia</i>	계지	중국	대전	음편	
CC-25	<i>C. cassia</i>	계지	중국	중국	음편	
CC-26	<i>C. cassia</i>	계지	중국	대구	음편	
CC-27	<i>C. cassia</i>	계지	중국	서울	음편	
CC-28	<i>C. cassia</i>	계지	중국	서울	음편	
CC-29	<i>C. cassia</i>	계지	중국	서울	음편	
CC-30	<i>C. cassia</i>	계지	중국	서울	음편	
CC-31	<i>C. cassia</i>	계지	중국	경북	음편	
CC-32	<i>C. cassia</i>	계지	중국	서울	음편	

## 2) 계피 시료의 구입

계지와 계피의 차이를 알아보기 위하여 추가로 24종의 계피 시료를 구입하여 비교분석하였다. 이 중 2종은 사업단에서 제공받았으며, 4종은 직접 베트남에서 구입하였고, 그 외의 시료는 전국각지에서 구입하였다 (표 15).

표 15. 분석에 사용한 계피 시료 목록

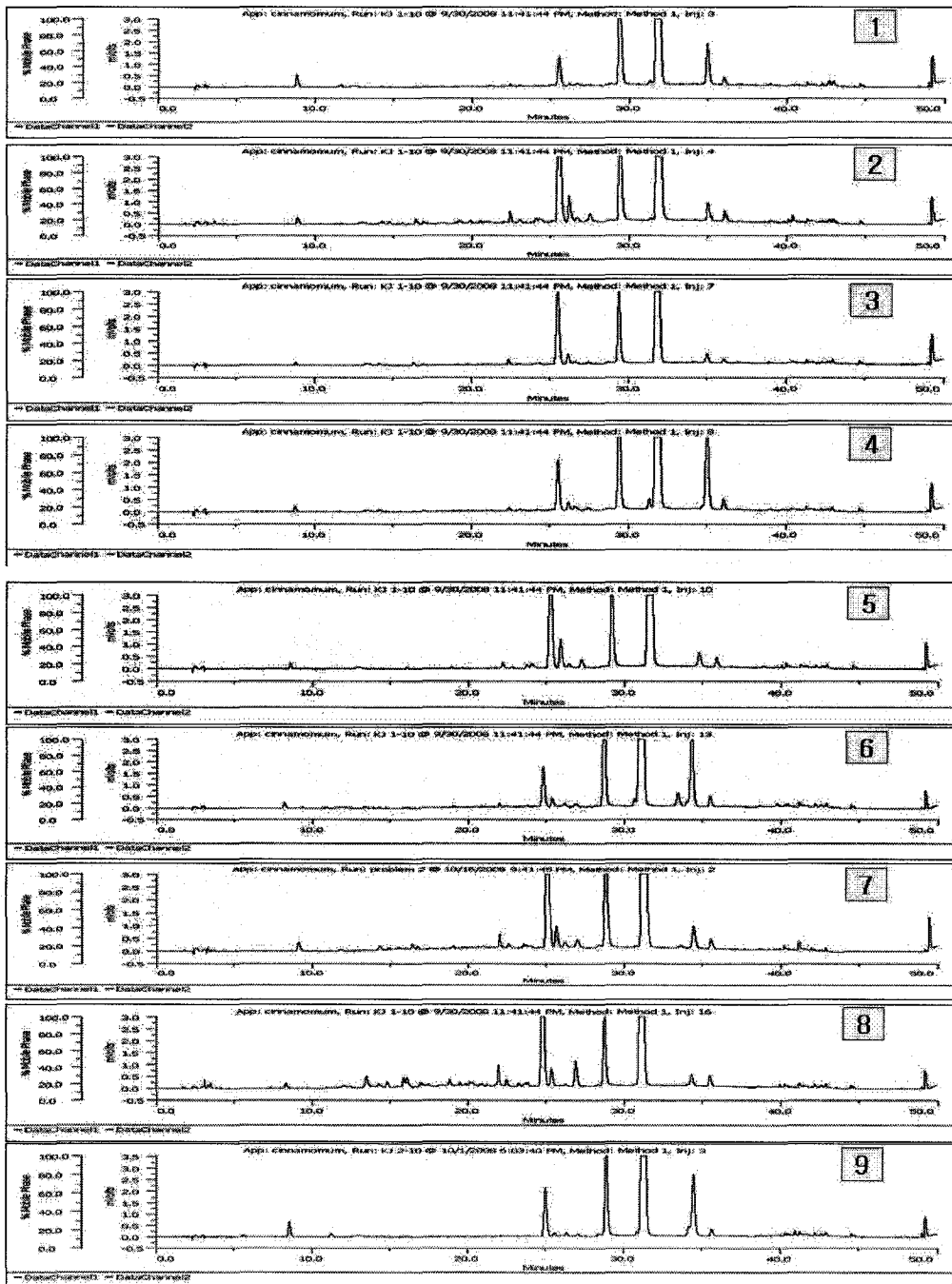
No	학명	품종	기원	수집장소	형태	비고
CC-33	<i>C. burmanii</i> 추정	계피	인도네시아	서울	음편	사업단
CC-34	<i>C. cassia</i>	계피	인도네시아	서울	음편	
CC-35	<i>C. cassia</i>	육계	중국	중국	음편	사업단
CC-36	<i>C. cassia</i>	계피	중국	대전	음편	
CC-37	<i>C. cassia</i>	계피	중국	서울	음편	
CC-38	<i>C. cassia</i>	계피	중국	서울	음편	
CC-39	<i>C. cassia</i>	계피	중국	경북	음편	
CC-40	<i>C. cassia</i>	육계	중국	부산	음편	
CC-41	<i>C. cassia</i>	계피	중국	대전	음편	
CC-42	<i>C. cassia</i>	육계	중국	서울	음편	
CC-43	<i>C. cassia</i>	계피	베트남	대구	음편	
CC-44	<i>C. cassia</i>	계피	베트남	대구	음편	
CC-45	<i>C. cassia</i>	계피	베트남	서울	전형	
CC-46	<i>C. cassia</i>	계피	베트남	서울	음편	
CC-47	<i>C. cassia</i>	계피	베트남	서울	음편	
CC-48	<i>C. cassia</i>	계피	베트남	서울	음편	
CC-49	<i>C. cassia</i>	계피	베트남	서울	음편	
CC-50	<i>C. cassia</i>	계피	베트남	서울	음편	
CC-51	<i>C. cassia</i>	육계	베트남	서울	음편	
CC-52	<i>C. cassia</i>	육계	베트남	부산	음편	
CC-53	<i>C. cassia</i>	계피	베트남	베트남	음편	
CC-54	<i>C. cassia</i>	계피	베트남	베트남	음편	
CC-55	<i>C. cassia</i>	계피	베트남	베트남	음편	
CC-56	<i>C. cassia</i>	계피	베트남	베트남	음편	

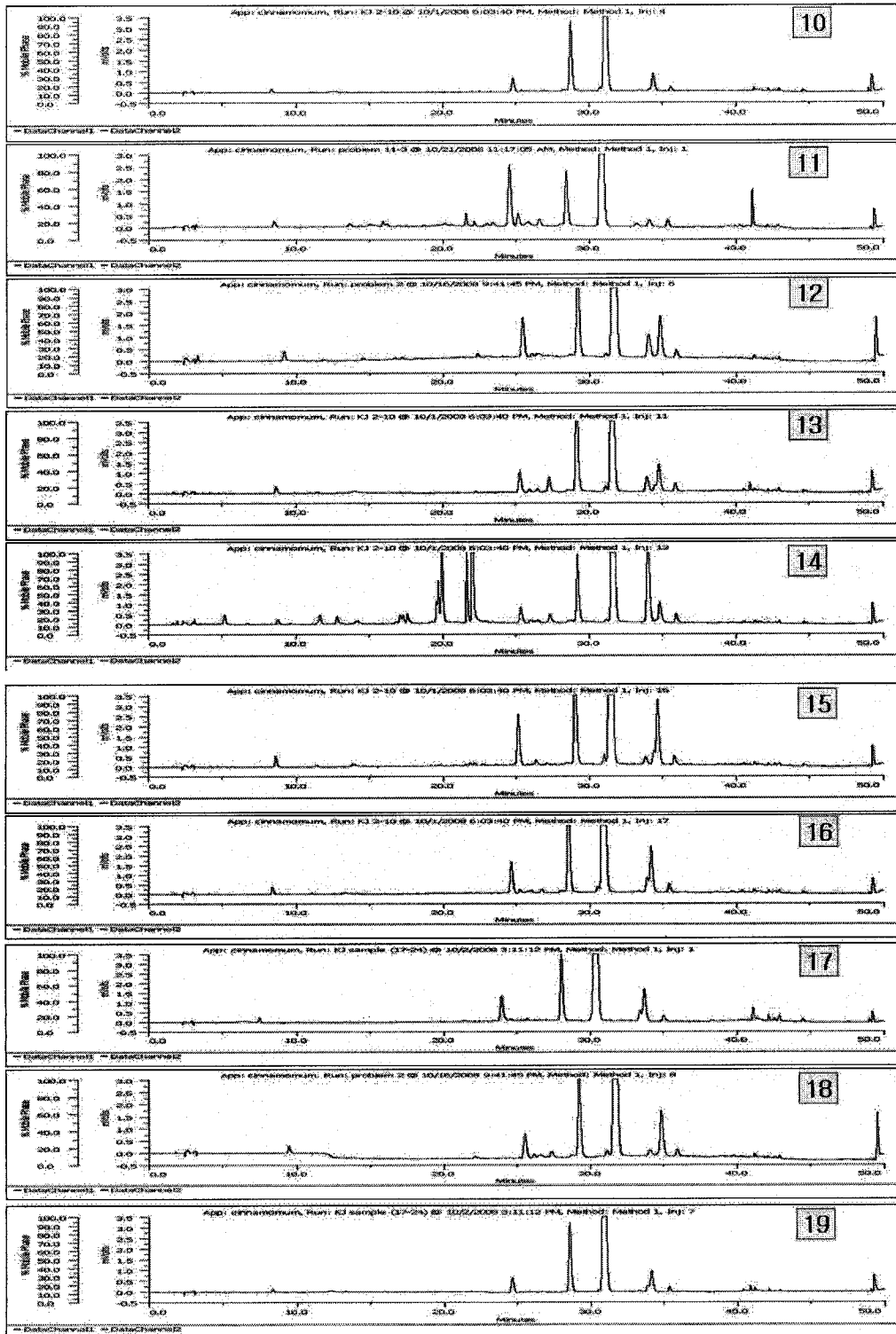
3) 계지와 계피 시료의 HPLC chromatogram 분석

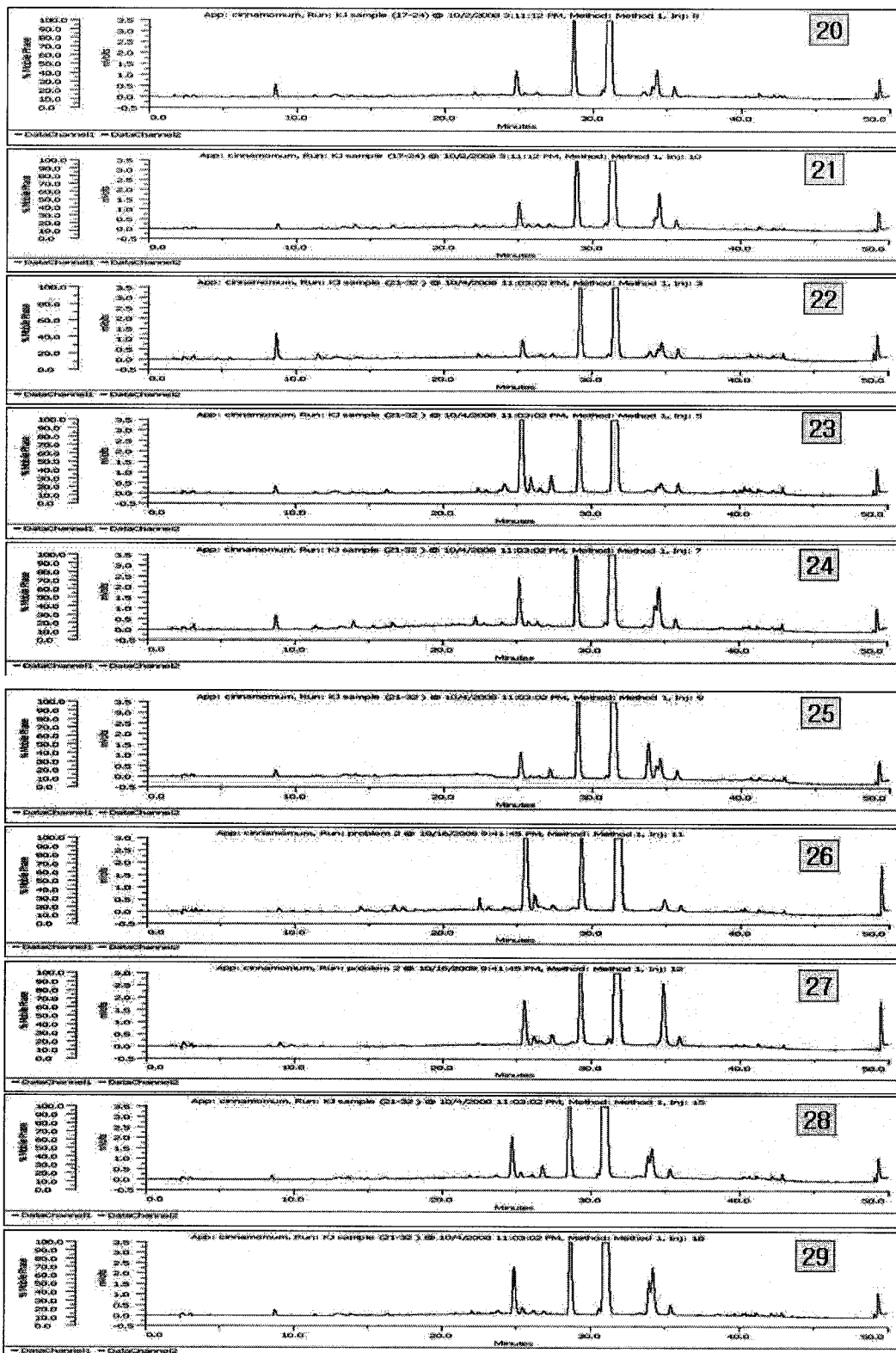
계지와 계피 시료의 HPLC chromatogram은 다음과 같다 (그림 9, 10).

[계지]

**HPLC chromatogram of Ramulus cinnamomi(1-32)**









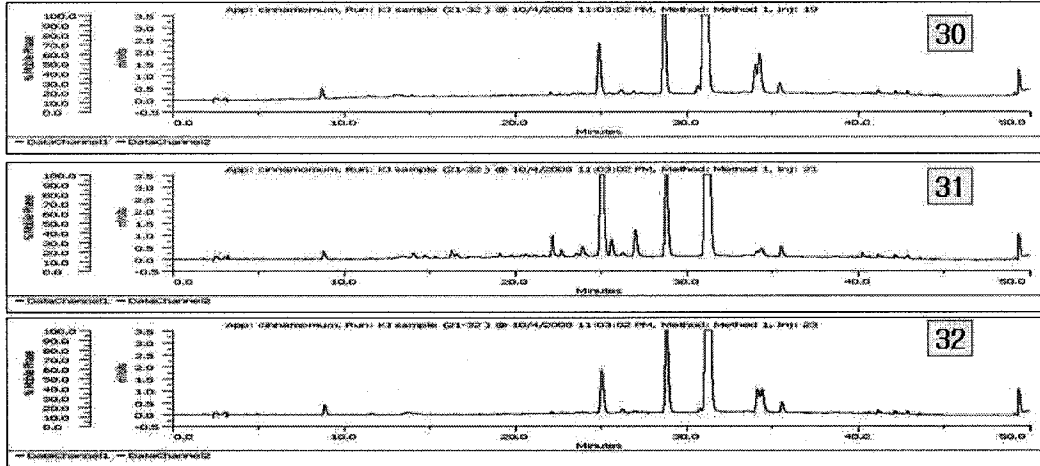
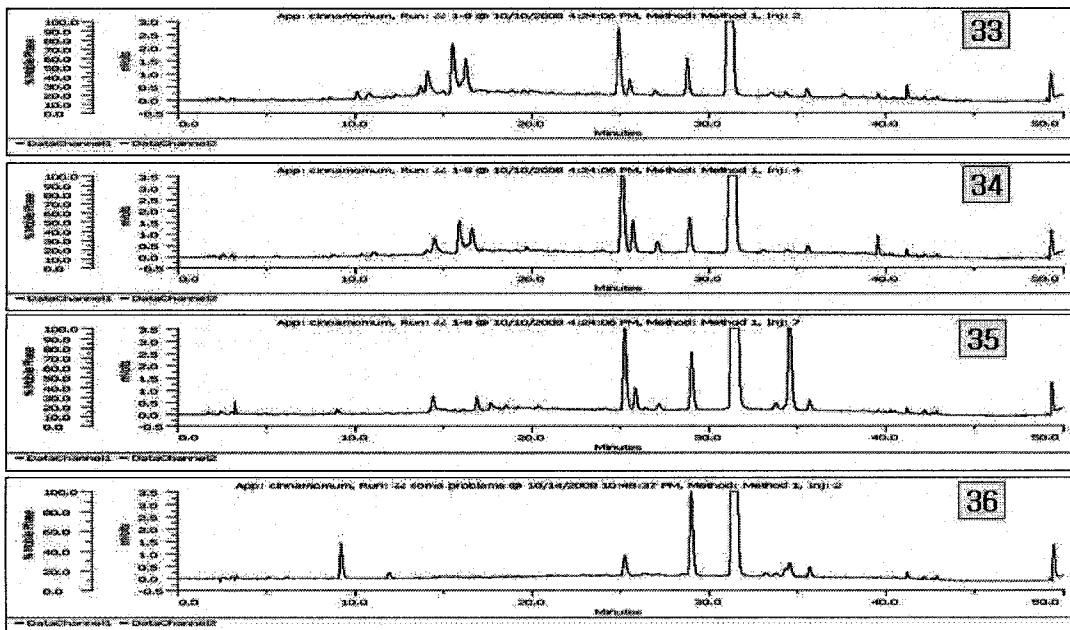
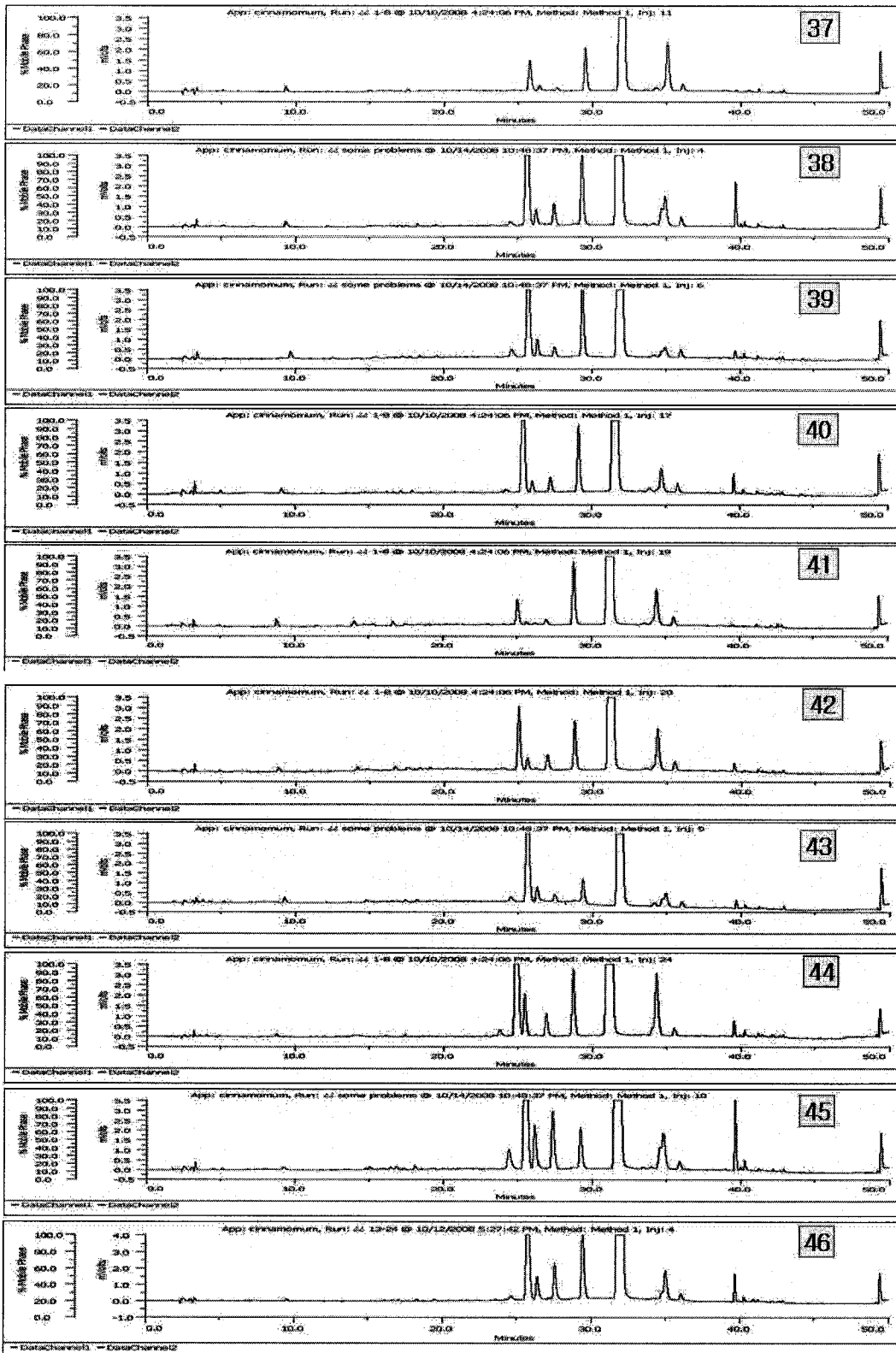


그림 9. 계지 시료의 HPLC chromatogram

[계피]

### HPLC chromatogram of Cortex cinnamomi (33-56)





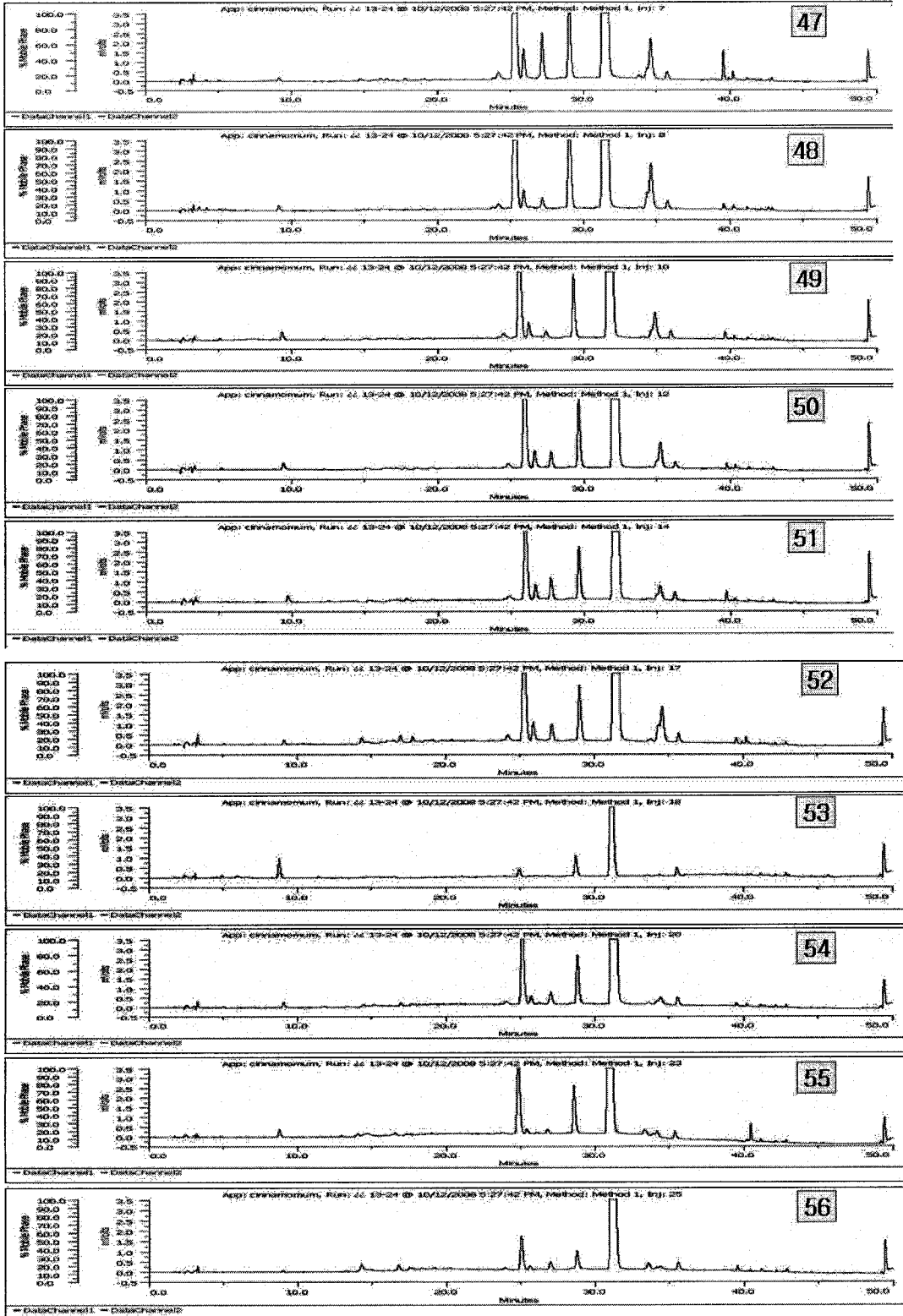


그림 10. 계피 시료의 HPLC chromatogram

### 3.1.7 패턴인식법에 의한 계지, 계피의 확인 및 산지 추정

시판 계지 및 계피로부터 HPLC를 이용하여 coumarin, 2-hydroxyl cinnamaldehyde, cinnamyl alcohol, cinnamic acid, cinnamaldehyde, 2-methoxy cinnamaldehyde 및 eugenol 등 7가지 성분을 분석하고 7가지 성분을 다변량으로 한 패턴인식법에 의해 계지, 계피의 확인 및 산지를 추정하였다. 시료의 추출액을 각각 HPLC로 분석하고 그 크로마토그램으로부터 각 성분의 농도를 계산하였다. 표준계지 및 계피는 시료로 사용된 모든 계지 및 계피의 성분에 대한 중위수로 하였다. 다변량자료는 인터넷으로 제공되는 R 통계 프로그램으로 처리하였으며 유의수준은 0.01 또는 0.05로 하였다.

**유사도의 평가** - 유클리드 거리(d), 코사인(C), 면적비(A), 상관계수(r) 등의 척도를 이용하여 표준 계지 및 계피와 각 시료와의 유사도를 평가하였다.

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

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

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

$$\text{상관계수 } r_{ir} = \frac{\sum_{k=1}^m (X_{ik} - \bar{X}_i)(X_{rk} - \bar{X}_r)}{\sqrt{\sum_{k=1}^m (X_{ik} - \bar{X}_i)^2 \sum_{k=1}^m (X_{rk} - \bar{X}_r)^2}}$$

**계층적 군집방법을 이용한 시료의 군집분석** - 산지 또는 품종(계지 또는 계피)의 정보를 무시하고 성분의 차이만으로 각각의 시료가 어떤 군집을 형성하는지를 관찰하였다. 계층적 방법은 사전에 군집수를 정하지 않고 단계적으로 군집을 형성하는 방법으로 R 프로그램 cluster 패키지의 agnes (agglomerative nesting), hclust (hierarchical clustering), diana (divisive analysis clustering) 등을 사용하였다.

**판별분석에 의한 시료의 품종 및 산지 평가** - 산지 또는 품종의 정보와 성분의 차이를 이용하여 판별식을 계산하고 이로부터 산지 또는 품종을 추정하였다. 판별분석은 R 프로그램 MASS 패키지의 lda (Linear discriminant analysis)를 이용하였다.

## 1) 함량분석 및 평가

계지 및 계피시료로부터 7가지 성분을 HPLC로 분석한 결과는 아래와 같다. 1번부터 32번까지 32개의 시료는 계지이며, 33번부터 56번까지 24개의 시료는 계피이다 . 계지 중 1번부터 9번까지 9개의 시료는 베트남산이며, 10번부터 32번까지 23개의 시료는 중국산이었다. 계피 중 33번, 34번 등 2개의 시료는 인도네시아산이며, 35번부터 42번까지 8개의 시료는 중국산이고, 중 43번부터 56번까지 14개의 시료는 베트남산이었다. 아래의 표에 56개 시료에 대해 coumarin (CM), 2-hydroxycinnamaldehyde (HCAL), cinnamyl alcohol (CALC), cinnamic acid (CA), cinnamaldehyde (CAL), 2-methoxycinnamaldehyde (MCAL) 및 eugenol (EG) 성분의 분석 결과를 표시하였다 (표 16). 분석 결과를 아래 그림 11과 같이 상자그림으로 표현하였다.

표 16. 계지 및 계피 시료의 7가지 성분의 함량

No.	Content (mg/g)						
	Coumarin	2-hydroxyl cinnamaldehyde	Cinnamyl alcohol	Cinnamic acid	Cinnamaldehyde	2-methoxy cinnamaldehyde	Eugenol
1	1.71±0.05	0.12±0.00	0.00±0.00	1.46±0.05	44.86±1.63	0.00±0.00	19.95±0.60
2	11.46±0.11	1.02±0.01	0.73±0.00	1.44±0.01	71.05±0.67	0.00±0.00	7.86±0.04
3	4.99±0.02	0.36±0.00	0.10±0.00	0.76±0.00	32.21±0.12	0.00±0.00	5.36±0.01
4	2.49±0.07	0.28±0.01	0.12±0.01	1.26±0.00	59.33±0.57	0.00±0.00	44.60±0.15
5	9.06±0.04	1.26±0.01	1.14±0.01	0.98±0.00	64.51±0.24	0.00±0.00	6.28±0.03
6	1.96±0.00	0.28±0.00	0.31±0.00	1.27±0.00	66.83±0.10	0.66±0.00	37.66±0.12
7	9.32±0.02	0.78±0.00	1.02±0.01	1.13±0.00	55.15±0.13	0.00±0.00	9.81±0.02
8	6.30±0.04	0.55±0.01	2.15±0.02	0.57±0.00	36.63±0.20	0.00±0.00	4.51±0.03
9	3.72±0.02	0.28±0.00	0.22±0.00	1.19±0.00	75.98±0.27	0.00±0.00	36.11±0.09
10	1.65±0.00	0.08±0.00	0.21±0.00	1.39±0.00	33.98±0.10	0.00±0.00	14.62±0.03
11	3.70±0.01	0.58±0.00	0.76±0.00	0.56±0.00	27.39±0.08	0.28±0.00	5.21±0.01
12	2.52±0.03	0.14±0.00	0.00±0.00	1.21±0.01	56.30±0.41	1.62±0.01	23.87±0.42
13	1.30±0.01	0.11±0.00	1.68±0.01	1.34±0.00	26.79±0.09	0.96±0.01	11.82±0.07
14	0.83±0.00	0.02±0.00	0.82±0.01	0.62±0.00	21.39±0.05	5.34±0.01	8.19±0.01
15	2.77±0.02	0.00±0.00	0.37±0.00	1.21±0.01	50.76±0.46	0.43±0.00	27.94±0.21
16	1.88±0.00	0.13±0.00	0.28±0.01	1.31±0.00	50.76±0.03	0.00±0.00	15.38±0.03
17	2.40±0.03	0.07±0.00	0.31±0.01	1.12±0.01	61.93±0.28	0.00±0.00	21.01±0.20
18	1.53±0.01	0.17±0.00	0.53±0.00	0.94±0.01	36.07±0.25	0.44±0.00	28.24±0.18
19	1.59±0.03	0.10±0.00	0.24±0.00	1.61±0.02	61.39±0.34	0.24±0.00	25.43±0.20
20	1.22±0.02	0.06±0.00	0.16±0.00	0.76±0.01	30.79±0.63	0.24±0.00	13.94±0.15
21	1.47±0.03	0.28±0.00	0.67±0.01	1.15±0.01	43.86±0.26	0.00±0.00	21.21±0.19
22	0.84±0.02	0.06±0.00	0.37±0.02	0.94±0.02	22.79±0.42	0.67±0.01	4.72±0.07
23	8.50±0.04	0.61±0.00	1.69±0.01	0.96±0.00	54.89±0.23	0.13±0.00	3.07±0.05
24	2.41±0.01	0.14±0.00	0.17±0.00	0.88±0.01	57.47±1.07	0.05±0.00	18.55±0.11
25	1.39±0.03	0.11±0.00	0.75±0.01	1.17±0.02	39.17±0.40	2.18±0.04	8.76±0.12
26	9.10±0.01	0.64±0.00	0.89±0.01	0.95±0.00	61.82±0.09	0.14±0.00	6.10±0.02
27	2.30±0.00	0.25±0.00	0.88±0.00	1.00±0.00	51.74±0.12	0.00±0.00	32.15±0.07
28	2.15±0.01	0.20±0.00	1.26±0.01	1.38±0.01	58.67±0.41	0.08±0.00	11.71±0.16
29	2.18±0.06	0.22±0.00	0.17±0.00	1.08±0.00	54.33±0.44	0.05±0.00	16.22±0.13
30	2.19±0.01	0.07±0.00	0.17±0.00	1.09±0.01	50.79±0.37	0.09±0.00	14.24±0.07
31	8.48±0.09	0.55±0.01	2.20±0.03	0.84±0.01	47.80±0.90	0.09±0.00	2.10±0.06
32	1.85±0.02	0.00±0.00	0.22±0.01	0.87±0.01	39.45±0.16	0.04±0.00	8.82±0.15
33	3.85±0.05	0.70±0.01	0.44±0.01	0.35±0.01	87.14±1.33	0.00±0.00	1.39±0.02
34	10.92±0.28	2.33±0.05	1.94±0.03	0.55±0.01	150.48±4.04	0.00±0.00	1.58±0.05
35	3.81±0.06	0.78±0.02	0.83±0.02	0.47±0.01	163.67±4.45	0.34±0.01	45.93±1.14
36	0.94±0.02	0.00±0.00	0.18±0.00	0.69±0.01	45.65±0.59	0.00±0.00	3.95±0.02
37	2.13±0.02	0.25±0.00	0.73±0.00	0.51±0.01	121.18±1.74	0.00±0.00	42.28±0.56
38	13.73±0.27	0.65±0.01	2.29±0.01	0.71±0.01	184.82±4.37	0.11±0.00	5.73±0.07
39	8.27±0.10	0.77±0.01	1.11±0.00	0.78±0.01	110.68±1.35	0.00±0.00	5.49±0.02
40	9.04±0.13	0.44±0.00	1.51±0.01	0.65±0.01	109.04±1.61	0.00±0.00	10.20±0.10
41	1.31±0.01	0.13±0.00	0.56±0.00	0.59±0.01	138.69±1.74	0.00±0.00	13.81±0.13
42	3.49±0.05	0.50±0.02	1.64±0.04	0.46±0.01	125.52±2.54	0.00±0.00	18.33±0.21
43	10.49±0.10	0.70±0.00	1.03±0.00	0.24±0.00	110.74±1.08	0.33±0.00	5.97±0.02
44	19.93±0.20	2.03±0.01	2.89±0.01	0.76±0.01	268.82±2.96	0.00±0.00	29.75±0.18
45	19.60±0.22	2.05±0.02	6.70±0.07	0.42±0.00	215.84±2.46	0.09±0.00	12.32±0.10
46	11.96±0.19	1.27±0.02	4.94±0.07	0.93±0.01	250.55±4.17	0.02±0.01	23.15±0.33
47	19.50±0.16	1.32±0.01	5.00±0.03	0.90±0.01	235.05±1.92	0.23±0.00	23.16±0.16
48	16.52±0.18	0.83±0.01	1.02±0.00	1.48±0.02	190.19±1.81	0.00±0.00	5.83±0.04
49	8.74±0.05	0.73±0.01	0.87±0.00	0.69±0.01	158.55±2.32	0.00±0.00	10.06±0.10
50	11.67±0.25	0.96±0.02	2.20±0.11	0.85±0.03	149.45±2.55	0.00±0.00	11.90±0.05
51	6.89±0.06	0.62±0.00	2.35±0.01	0.50±0.00	111.36±0.96	0.00±0.00	6.18±0.02
52	11.71±0.19	0.80±0.01	1.67±0.01	0.54±0.01	142.04±2.43	0.11±0.01	5.50±0.03
53	0.39±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.19±0.00	13.37±0.14	0.00±0.00	0.00±0.00
54	6.38±0.08	0.36±0.00	1.44±0.01	0.49±0.01	22.25±0.30	0.11±0.00	3.12±0.01
55	5.47±0.03	0.20±0.01	0.60±0.02	0.52±0.00	98.17±0.50	0.35±0.01	3.62±0.07
56	2.05±0.030	0.17±0.01	0.86±0.02	0.18±0.00	80.09±0.260	0.41±0.01	1.41±0.090

Values represent mean±standard deviation (n=3) in mg/g.

No.1-32: Ramulus cinnamomi, No.33-56: Cortex cinnamomi, Origins: Vietnamese (No.1-9 and No.43-56), Chinese (No.10-32 and No. 35-42), Indonesia (No. 33-34).

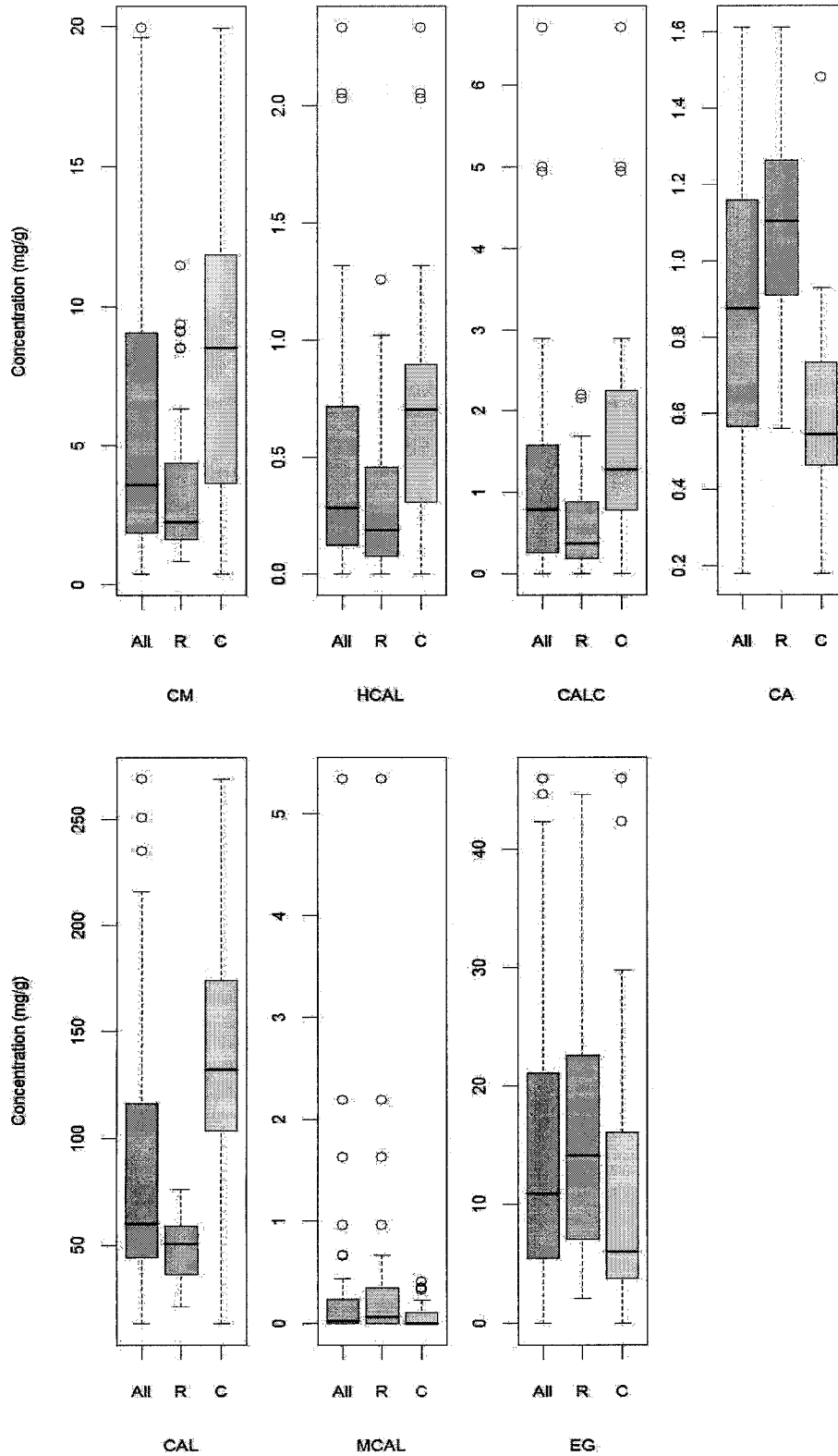


그림 11. 계지 및 계피 시료의 지표성분의 분석결과에 대한 상자그림

CM; coumarin, HCAL; 2-hydroxyl cinnamaldehyde, CALC; cinnamyl alcohol, CA; cinnamic acid, CAL; cinnamaldehyde, MCAL; 2-methoxycinnamaldehyde, EG; eugenol

전체시료, 계피, 계지 각각에 대해 7종 지표성분의 각 성분의 농도 범위를 아래의 표에 정리하였다 (표 17). 각 성분은 상당히 넓은 범위에 퍼져 있었고, 그 범위에 대해 계지 계피의 특징은 없는 것으로 나타났다.

표 17. 계지 및 계피 지표성분의 농도 범위

	CM	HCAL	CALC	CA	CAL	MCAL	EG
All sample	0.39-19.93	0-2.33	0-6.7	0.18-1.61	13.37-268.82	0-5.34	0-45.93
Ramulus Cinnamomi	0.83-11.46	0-1.26	0-2.2	0.56-1.61	21.39-75.98	0-5.34	2.1-44.6
Cortex Cinnamomi	0.39-19.93	0-2.33	0-6.7	0.18-1.48	13.37-268.82	0-0.41	0-45.93

CM; coumarin, HCAL; 2-hydroxyl cinnamaldehyde, CALC; cinnamyl alcohol, CA; cinnamic acid, CAL; cinnamaldehyde, MCAL; 2-methoxycinnamaldehyde, EG; eugenol

시료를 품목, 산지 등으로 그룹화하고 각각에 대해 각 성분의 평균 및 표준편차를 관찰하였다. 아래의 표 18에서 보는 바와 같이 모든 시료에 대한 coumarin, 2-hydroxyl cinnamaldehyde, cinnamyl alcohol, cinnamic acid, cinnamaldehyde, 2-methoxy cinnamaldehyde 및 eugenol의 평균±표준편차는 5.79±5.21, 0.50±0.53, 1.13±1.29, 0.87±0.36, 85.25±62.35, 0.28±0.79, 14.39±11.29로 표준편차가 거의 평균값과 비슷하여 상자그림에서 언급한 바와 같이 자료가 상당히 넓은 범위에 퍼져 있었다. 중국산과 베트남산을 비교해 볼 때 계지의 경우 coumarin, 2-hydroxyl cinnamaldehyde, cinnamic acid, cinnamaldehyde, eugenol 등의 성분이, 계피의 경우 coumarin, 2-hydroxyl cinnamaldehyde, cinnamyl alcohol, cinnamic acid, cinnamaldehyde 등의 성분이 베트남산에서 높게 나타났다. 중국산과 베트남산 모두 계지에서는 cinnamic acid, 2-methoxy cinnamaldehyde, eugenol의 함량이, 계피에서는 coumarin, 2-hydroxyl cinnamaldehyde, cinnamyl alcohol, cinnamaldehyde의 함량이 높은 것으로 나타났다.

표 18. 산지에 따른 지표성분들의 함량 변화

	CM	HCAL	CALC	CA	CAL	MCAL	EG
All samples	5.79±5.21	0.50±0.53	1.13±1.29	0.87±0.36	85.25±62.35	0.28±0.79	14.39±11.29
Ramulus cinnamomi							
from Vietnam	5.86±4.04	0.57±0.46	0.49±0.47	1.19±0.25	56.28±13.65	0.09±0.25	18.79±16.13
from China	2.97±2.43	0.22±0.20	0.69±0.64	1.05±0.26	46.12±14.15	0.52±1.14	15.36±9.58
Cortex cinnamomi							
from Vietnam	10.81±6.35	0.86±0.63	2.26±1.97	0.61±0.35	146.17±79.87	0.12±0.15	10.14±9.09
from China	5.34±4.54	0.44±0.29	1.11±0.68	0.61±0.12	124.91±41.46	0.06±0.12	18.22±16.70
All RC	3.60±3.03	0.29±0.31	0.64±0.60	1.08±0.26	48.34±14.47	0.43±1.02	16.11±11.11
All CC	8.70±6.08	0.78±0.63	1.78±1.65	0.60±0.28	136.81±65.93	0.09±0.14	12.11±12.52

Values represent mean±standard deviation (n=3) in mg/g.

RC; Ramulus cinnamomi, CC; Cortex cinnamomi, CM; coumarin, HCAL; 2-hydroxyl cinnamaldehyde, CALC; cinnamyl alcohol, CA; cinnamic acid, CAL; cinnamaldehyde, MCAL; 2-methoxycinnamaldehyde, EG; eugenol



아래의 표 19에는 각 성분의 t-test 결과를 정리하였다. 전체 시료를 대상으로 계피와 계지를 비교하였을 경우 5개의 성분이 유의한 차이를 보인 반면 중국산과 베트남산에 대해서는 3개의 성분이 유의한 차이를 보였다 ( $p < 0.01$ ). 즉, 7개의 성분에 대해서 지역별 차이보다는 품목별 차이가 더 크다는 것을 알 수 있었다. 계지만을 따로 분리하였을 경우 중국산과 베트남산의 비교에 있어서는 하나의 성분만이 유의적인 차이를 보였고, 계피만을 따로 분리하였을 경우 중국산과 베트남산의 비교에 있어서는 유의적인 차이를 보인 성분은 없었다. 즉, 계지, 계피에 있어 산지의 차이가 거의 없다는 것이 파악되었다. 한편, 베트남산과 중국산 각각에 대해 계지와 계피를 비교하였을 경우 cinnamic acid와 cinnamaldehyde 성분이 유의한 차이를 보였다.

표 19. 산지에 따른 지표성분들의 t-test 결과

	CM	HCAL	CALC	CA	CAL	MCAL	EG
All samples:							
RC vs CC	0.000*	0.000*	0.001*	0.000*	0.000*	0.111	0.213
Vietnames vs Chinese	0.000*	0.000*	0.020	0.245	0.003*	0.149	0.500
Ramulus cinnamomi:							
Vietnames vs Chinese	0.024	0.005*	0.452	0.221	0.101	0.335	0.479
Cortex cinnamomi:							
Vietnames vs Chinese	0.046	0.093	0.130	0.920	0.494	0.333	0.154
Vietnamese:							
RC vs CC	0.077	0.293	0.032	0.001*	0.009*	0.788	0.129
Chinese:							
RC vs CC	0.064	0.022	0.121	0.000*	0.000*	0.261	0.548

RC; Ramulus cinnamomi, CC; Cortex cinnamomi, CM; coumarin, HCAL; 2-hydroxyl cinnamaldehyde, CALC; cinnamyl alcohol, CA; cinnamic acid, CAL; cinnamaldehyde, MCAL; 2-methoxycinnamaldehyde, EG; eugenol. \*  $p < 0.01$

7개의 피크 중에서 coumarin, 2-hydroxyl cinnamaldehyde, cinnamyl alcohol, cinnamic acid, cinnamaldehyde 및 eugenol 등 6개의 피크에 대해서 상관 scatterplot을 관찰하였을 경우 coumarin과 2-hydroxyl cinnamaldehyde이 약간의 상관성을 보였고 나머지는 거의 상관이 없는 것으로 나타났다. 한편, cinnamic acid 대 cinnamaldehyde의 scatterplot에서 계지와 계피의 차이가 가장 두드러지게 나타났다 (그림 12).

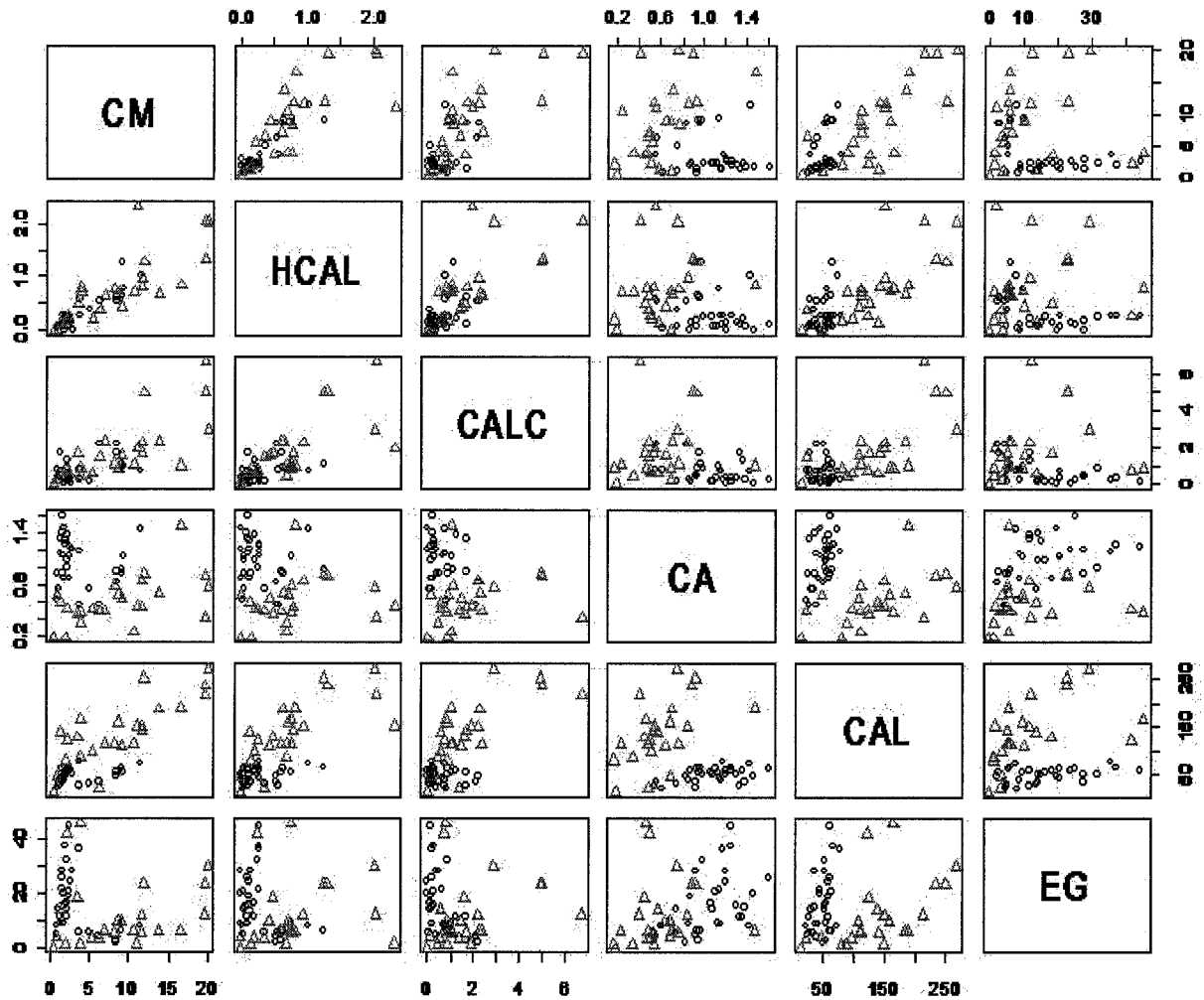


그림 12. 계지 (○) 또는 계피 (△)의 지표성분들의 피크에 따른 상관 scatterplot  
 CM; coumarin, HCAL; 2-hydroxyl cinnamaldehyde, CALC; cinnamyl alcohol, CA; cinnamic acid, CAL; cinnamaldehyde, EG; eugenol

## 2) 폐틴인식법에 의한 다변량분석

### ① 유사성 척도에 의한 계지, 계피의 평가

베트남, 중국, 인도네시아 등지를 원산으로하는 계지 및 계피 56종에 대해서 조사된 coumarin, 2-hydroxyl cinnamaldehyde, cinnamyl alcohol, cinnamic acid, cinnamaldehyde, 2-methoxy cinnamaldehyde 및 eugenol 등의 7개 성분 함량을 변수로 하여 다변량분석을 실시하였다. 32종의 계지의 각 성분 함량의 중위수로부터 표준계지의 성분함량을 구하고 이를 이용하여 각 시료의 유사도를 평가하였다. 아래 그림에서 보는 바와 같이 코사인, 상관계수는 56개 모든 시료에서 0.9 이상으로 계지시료와 계피시료의 동질성이 상당히 높은 것으로 보여주고 있지만 t-test 결과와는 일치하지 않는다. 오히려 계지시료인 S04와 S18의 코사인과 상관계수가 0.95 미만으로 표준계지와 동질성이 타 시료에 비해 낮게 나타나는 것으로 미루어 계지, 계피시료의 동질성 척도로 코사인, 상관계수는 적당하지 않을 것으로 판단된다. 유사성 척도로 거리를 이용하였을 경우 계지시료는 표준계지와 높은 동질성을 나타내었다. 하지만 거리 31을 기준으로 하였을 경우 계지인 S04와 S09는 표준계지와 유사성이 약간 떨어지고, 계피인 S36과 S53은 유사성이 좋은 것으로 나타났다. 유사성 척도로 면적비를 이용하였을 경우도 계지시료는 표준계지와 높은 동질성을 보였다. 하지만 면적비 0.68을 기준으로 하였을 경우 계지인 S11, S14와 S22는 표준계지와 유사성이 약간 떨어지고, 계피인 S36과 S55는 유사성이 좋은 것으로 나타났다. 거리, 면적비, 코사인, 상관계수 각각에 대해 계지를 계피로, 또는 계피를 계지로 분류할 수 있는 오분류 확률은 각각 7.1%, 8.9%, 32.1%, 37.5%로 나타나, 표준계지와 시료와의 유사성 척도로 거리나 면적비를 사용하는 것이 효율적일 것으로 판단되었다 (그림 13).

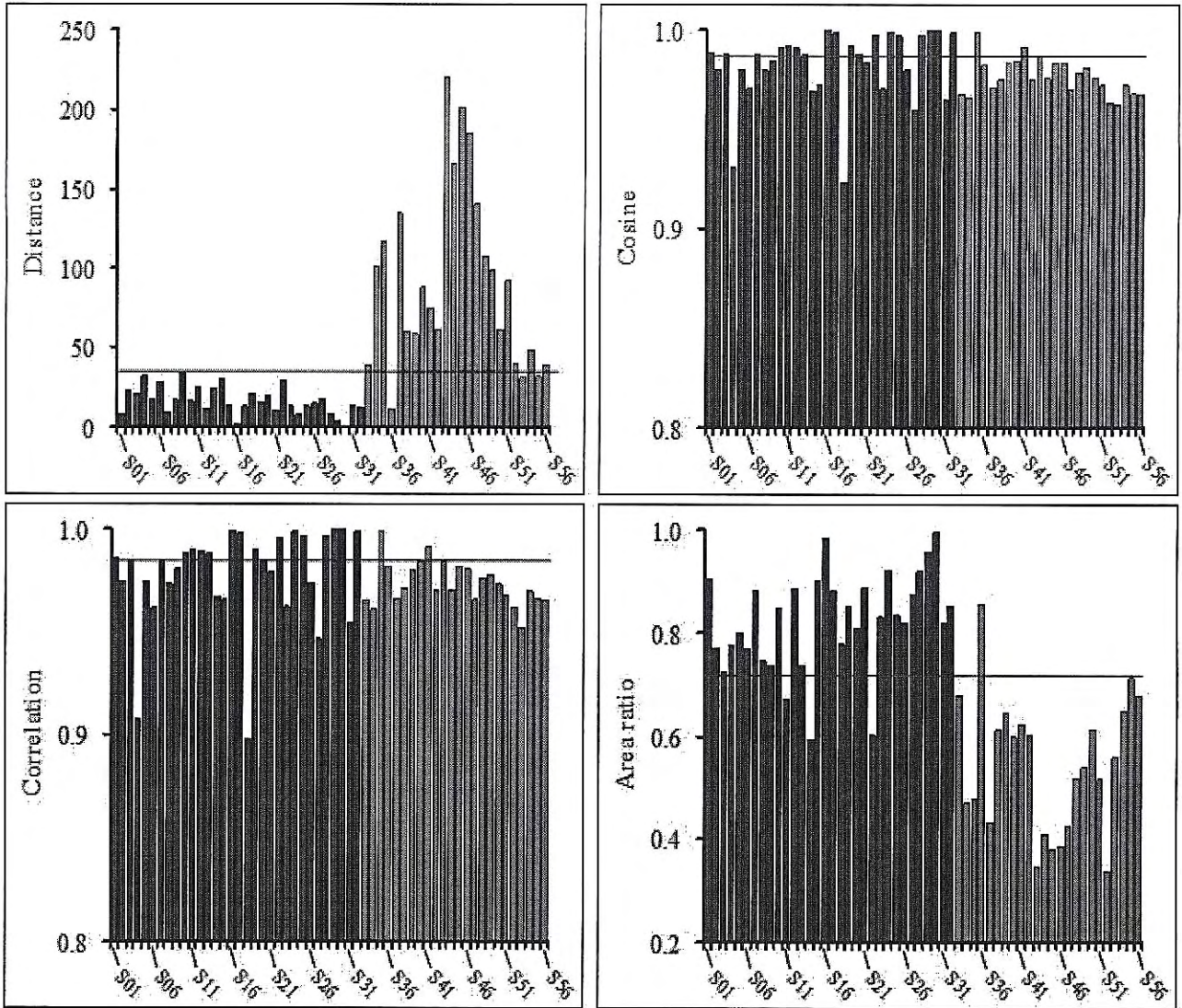


그림 13. 계지와 계피의 거리, 코사인, 상관계수, 면적비

② 계지, 계피의 계층적 군집분석

성분함량을 기초한 계층적 군집방법에서는 56개의 시료가 크게 두 개의 군집으로 나누어졌다. 제1군집은 35개의 시료로 계지가 주로 포함되었고, 제2군집은 나머지 21개의 계피시료로 구성되었다. 제1군집에는 계피 외에도 S36, S52, S53 등과 같은 계피시료도 포함되었는데 이것은 유사성 척도로 거리를 사용하였을 경우와도 어느 정도 일치한다고 볼 수 있다. 이것은 이 군집분류가 거리를 기초로 하고 있기 때문이다 (그림 14).

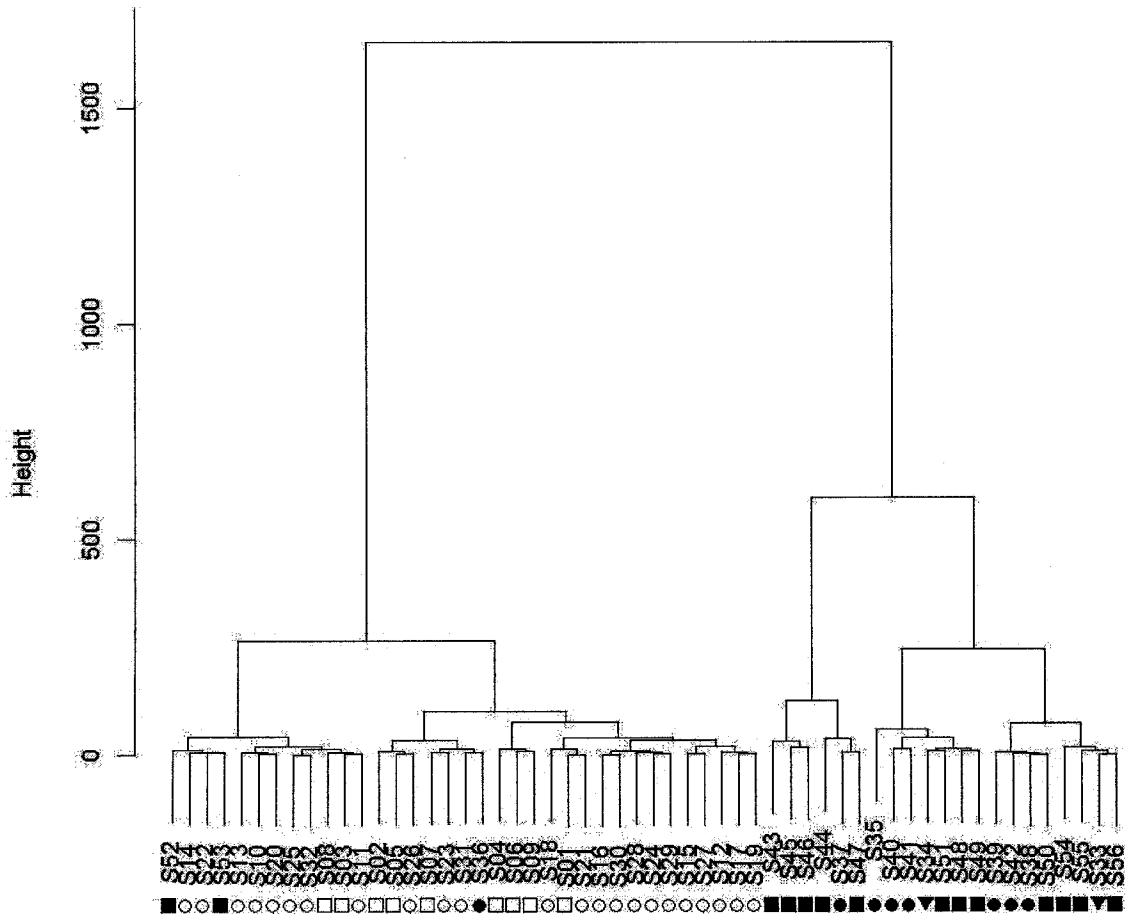


그림 14. 계지 및 계피 시료의 계층적 군집분석

Origin of Vietnam (rectangle), China (circle) or Indonesia (triangle).

The white symbols represent Ramulus cinnamomi (□ and ○) and the black one Cortex cinnamomi (■, ● and ▼)

### ③ 계지, 계피의 주성분분석

주성분분석은 (principal components analysis)은 다변량자료로부터 변량을 대표하는 총합적 지표를 구하고자 하는 경우 사용된다. R 프로그램의 stats 패키지에서 princomp와 예측을 위한 predict를 이용하여 시료의 7개 성분을 이용하여 주성분분석을 시행하였다. 주성분분석에서 comp.1은 전체변량의 약 97%를 comp.2는 약 3%를 설명하는 것으로 나타났다. comp.1과 comp.2의 두 개의 주성분으로 56개의 시료가 두 개의 집단으로 분리되고 있지만 S36, S52, S53 세 개의 계피시료는 여전히 계지시료로 분류되는 경향이 강하였다. 주성분분석에 의한 군집 분류에는 주로 성분 cinnamaldehyde 및 eugenol 함량의 영향이 큰 것으로 나타났다. t-test 결과 Table에서 보는 바와 같이 계지와 계피의 차이를 결정짓는데 있어 cinnamaldehyde 및 eugenol 함량의 P 값이 각각 <0.01 및 <0.1 정도이므로 군집 분류가 어느 정도 신빙성이 있다고 생각 된다 (그림 32).

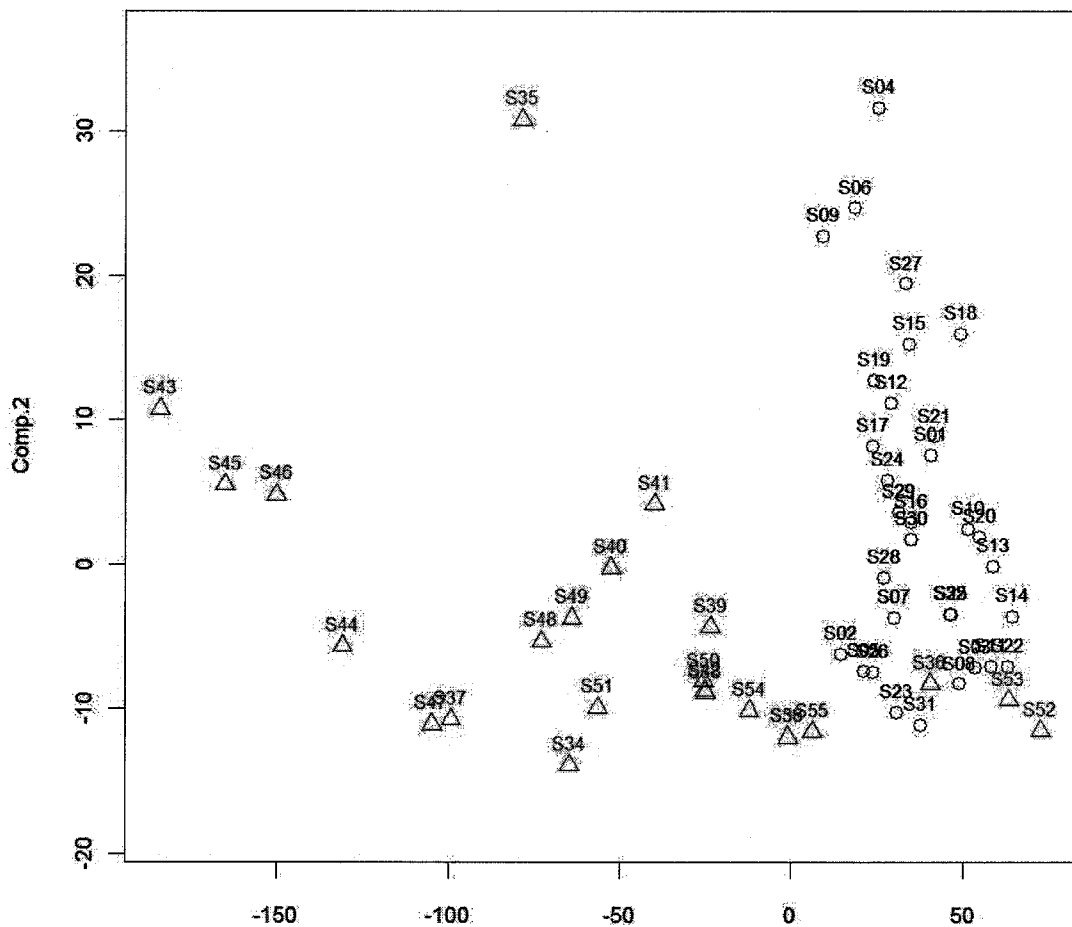


그림 15. 계지(○), 계피(△)의 주성분분석

#### ④ 계지, 계피의 판별분석

알려진 품목(계지 또는 계피) 정보와 성분 함량을 이용하여 판별분석으로부터 품목을 추정하였다. 아래의 그림은 56개의 시료에 대하여 품목과 성분함량으로 판별식을 작성하고 이 판별식을 이용하여 각 시료의 품목을 추정한 것이다. 판별식의 값(Out)이 양수인 것은 계지이고, 음수인 것은 계피이다. 이 판별식을 이용하였을 경우 계지 시료(○)는 모두 양수로, 계피 시료(△)는 S53을 제외하고는 모두 음수로 분류되어 약 98%의 정확성을 보였다. S53의 경우 실제로는 계피이나 판별식에서 뿐 만 아니라 유사도나 주성분분석에서도 계속 계지로 분류되는 것으로 보아 계피에 계지가 섞여있는 시료로 의심된다. 7개의 성분 중 계지, 계피를 구분하는데 가장 영향이 큰 성분은 cinnamic acid와 cinnamaldehyde이었고, 다음이 2-hydroxyl cinnamaldehyde, cinnamyl alcohol 이었다. Eugenol도 약간의 영향을 미치는 것으로 나타났다 (그림 16).

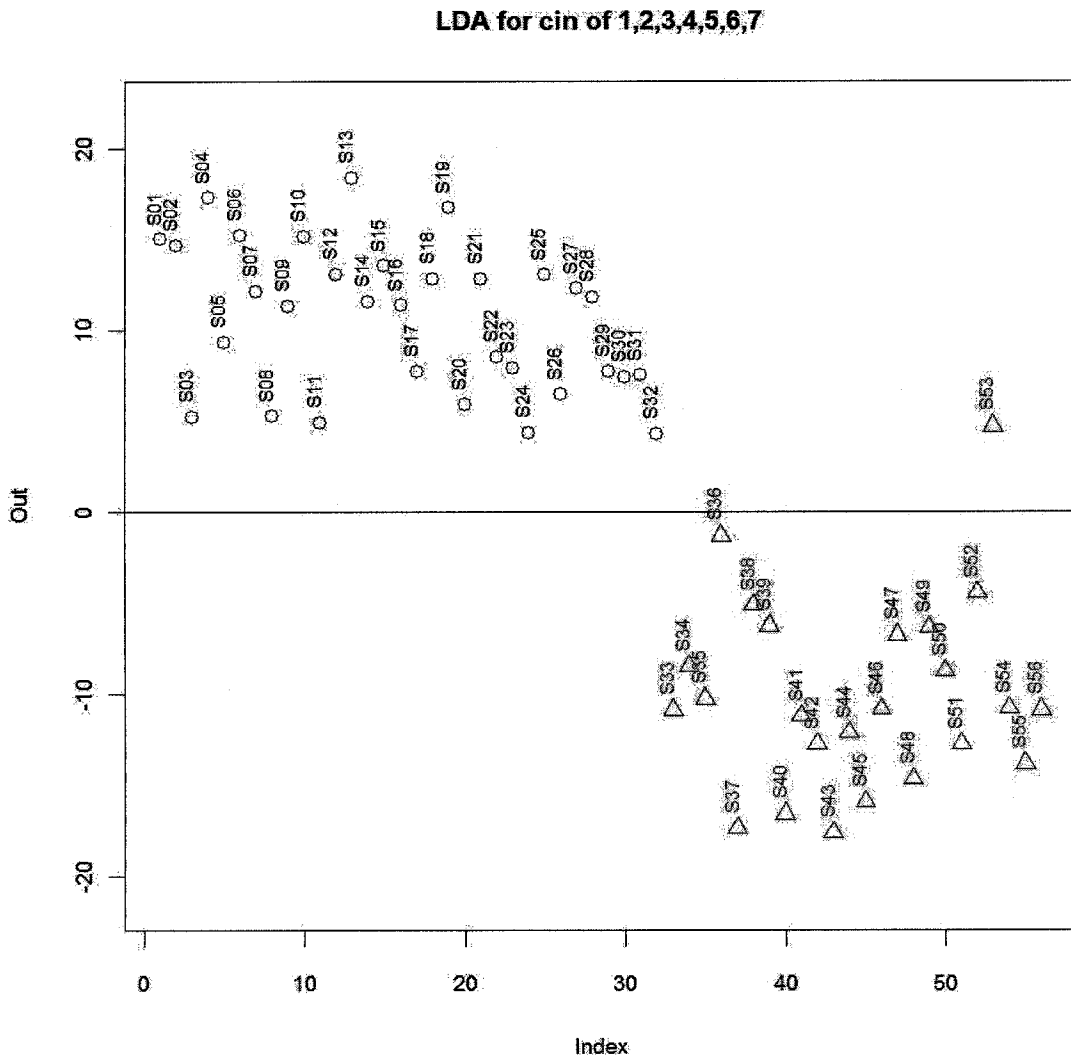


그림 16. 계지(○), 계피(△)의 판별 분석

⑤ 계지, 계피에 대한 원산지의 판별분석

알려진 원산지(중국 또는 베트남) 정보와 성분 함량을 이용하여 판별분석으로부터 품목을 추정하였다. 아래의 그림 17은 54개(총 56개 시료 중 인도네시아 산 시료 2개 제외)의 시료에 대하여 원산지와 성분함량으로 판별식을 작성하고 이 판별식을 이용하여 각 시료의 원산지를 추정한 것이다. 판별식의 값(Out)이 양수인 것은 베트남 산이고, 음수인 것은 중국산이다. 이 판별식을 이용하였을 경우 베트남 산 시료(○) 23개 중 9개가 중국산으로, 중국산 시료(△) 31개 중 4개가 베트남 산으로 분류되어 약 76%의 낮은 정확성을 보였다. 이것은 계지, 계피의 경우 앞의 표 6에서 본 바와 같이 산지에 따른 성분의 특성이 거의 없기 때문인 것으로 풀이되며, 판별식을 이용한 원산지 감별이 큰 의미가 없을 것으로 판단된다.

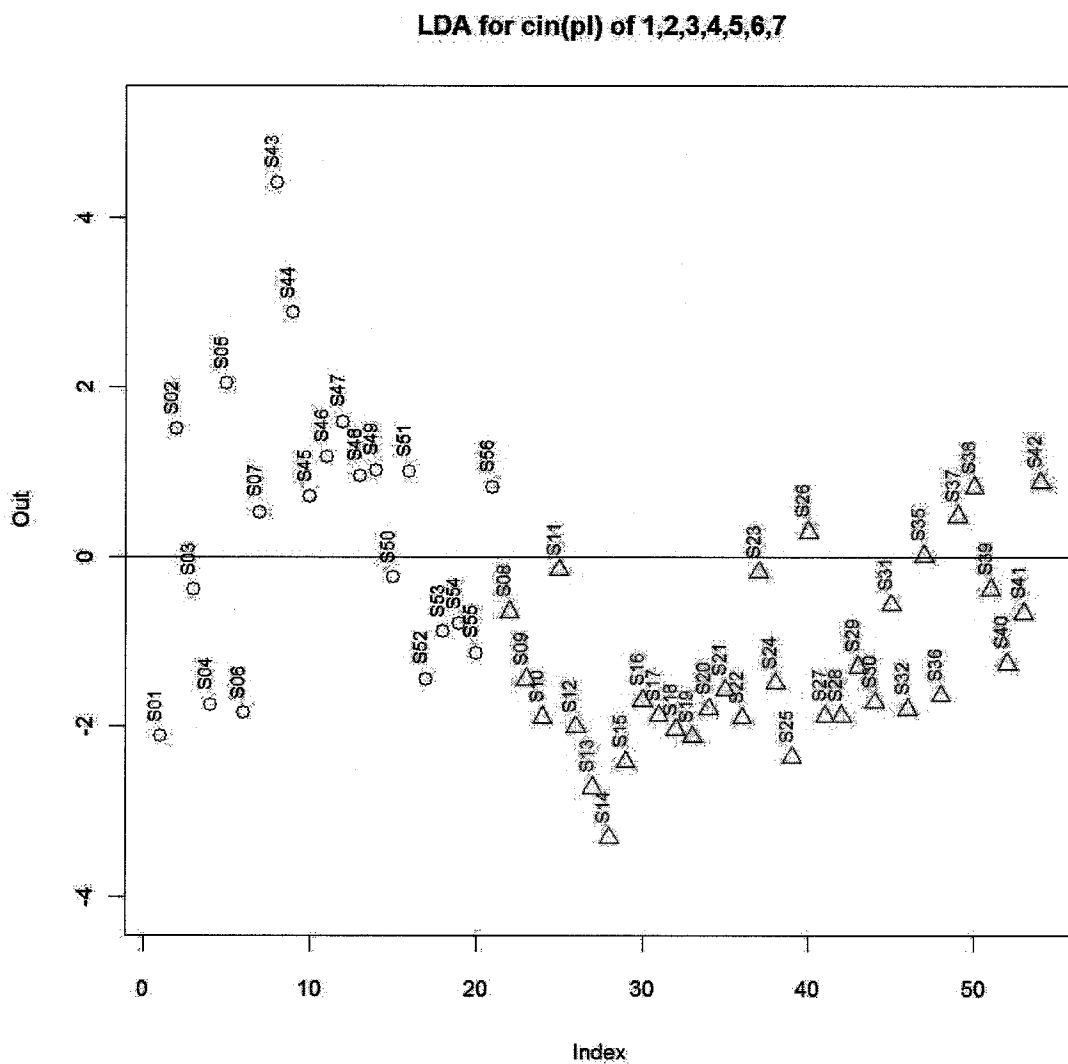


그림 17. 계지, 계피에 대한 원산지의 판별분석 [베트남산 (○), 중국산 (△)]



### 3.1.9 TLC에 의한 계지 성분의 확인

TLC 방법에 의한 계지 성분을 확인하기 위하여 지표물질로 선정된 7개의 성분 중 TLC에서 겹치지 않고 그 구분이 확연한 cinnamaldehyde와 coumarin을 표준품으로 하여 시중에서 구입한 계지와 계피 시료의 TLC 분석을 시도하였다. 각각의 시료는 UV 254 nm와 UV 365 nm, 2,4-dinitrophenylhydrazine 시약으로 발색하여 detection 하였다. 계지와 계피 모두 중국산과 베트남산에서 cinnamaldehyde와 coumarin의 peak를 확인할 수 있었으며 전개용매로는 hexane:ethylacetate (5:1)의 경우에서 양호한 분석을 나타내었다 (그림 18).

## TLC Comparison of *Ramulus cinnamomi* and *Cortex cinnamomi*

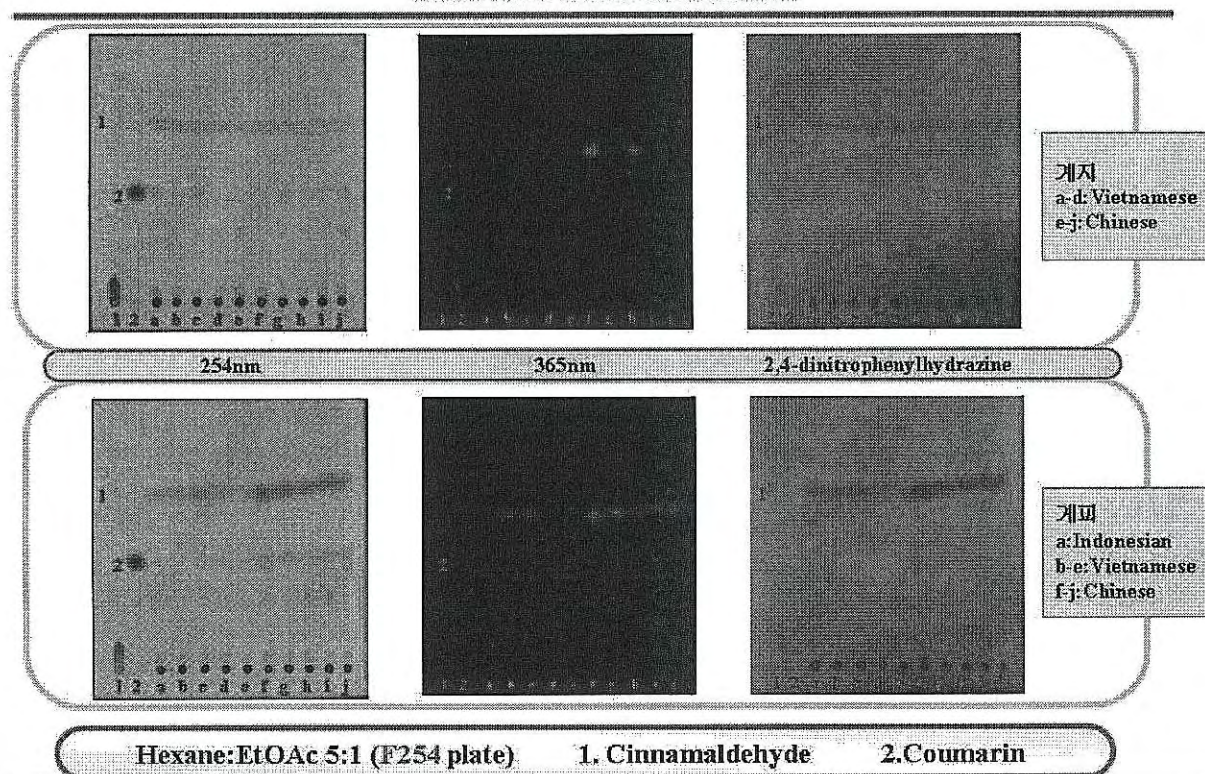


그림 18. 계지, 계피의 지표성분의 TLC 패턴

### 3.1.10 시료의 감별결과에 따른 패턴분석의 차이

제공된 22개의 계지시료의 감별결과 *C. cassia*가 2개, *C. sieboldii*가 20로 나타났다. 각 시료의 패턴분석 파라미터인 distance, area ratio 및 coumarin, 2-hydroxyl cinnamaldehyde, cinnamylalcohol, cinnamic acid, cinnamaldehyde, 2-methoxycinnamaldehyde, eugenol 등의 성분함량을 비교한 결과 P 값이 모두 0.1 이상으로 *C. cassia*와 *C. sieboldii*사이에는 유의한 차이가 보이지 않았다 (표 20, 21).

표 20. DNA에 의한 계지 종감별 및 패턴분석과의 연계성

Lane	시료 No.	채집장소	채집일자	충남대 No	감별결과	Area ratio	Coumarin	Cinnamic acid	Cinnamaldehyde
1	ㄱ-11-15	인도네시아	2007.8.7	CC-33	<i>C. sieboldii</i>	0.78	3.85 ± 0.05	0.35 ± 0.01	87.14 ± 1.33
2	ㄱ-11-18	중국	2007.8.7	CC-36	<i>C. sieboldii</i>	0.80	0.94 ± 0.02	0.69 ± 0.01	45.65 ± 0.59
3	ㄱ-11-14	중국 광서성	2007.8.7	CC-35	<i>C. sieboldii</i>	0.52	3.81 ± 0.06	0.47 ± 0.01	163.67 ± 4.45
4	ㄱ-11-3	중국 광서성	2007.8.7	CC-13	<i>C. cassia</i>	0.68	1.30 ± 0.01	1.34 ± 0.00	26.79 ± 0.09
5	ㄱ-11-4	중국 호북성	2007.8.7	CC-14	<i>C. cassia</i>	0.56	0.83 ± 0.00	0.62 ± 0.00	21.39 ± 0.05
6	ㄱ-11-5	중국	2007.8.7	CC-15	<i>C. sieboldii</i>	0.82	2.77 ± 0.02	1.21 ± 0.01	50.76 ± 0.46
7	ㄱ-11-6	중국	2007.8.7	CC-16	<i>C. sieboldii</i>	0.88	1.88 ± 0.00	1.31 ± 0.00	50.76 ± 0.03
8	ㄱ-11-7	중국	2007.8.7	CC-17	<i>C. sieboldii</i>	0.92	2.40 ± 0.03	1.12 ± 0.01	61.93 ± 0.28
9	ㄱ-11-8	중국	2007.8.7	CC-18	<i>C. sieboldii</i>	0.69	1.53 ± 0.01	0.94 ± 0.01	36.07 ± 0.25
10	ㄱ-11-9	중국	2007.8.7	CC-19	<i>C. sieboldii</i>	0.89	1.59 ± 0.03	1.61 ± 0.02	61.39 ± 0.34
11	ㄱ-11-10	중국	2007.8.7	CC-20	<i>C. sieboldii</i>	0.71	1.22 ± 0.02	0.76 ± 0.01	30.79 ± 0.63
12	ㄱ-11-11	베트남	2007.8.7	CC-8	<i>C. sieboldii</i>	0.73	6.30 ± 0.04	0.57 ± 0.00	36.63 ± 0.20
13	ㄱ-11-12	중국 광서성	2007.8.7	CC-10	<i>C. sieboldii</i>	0.74	1.65 ± 0.00	1.39 ± 0.00	33.98 ± 0.10
14	ㄱ-11-13	베트남	2007.8.7	CC-9	<i>C. sieboldii</i>	0.78	3.72 ± 0.02	1.19 ± 0.00	75.98 ± 0.27
15	ㄱ-11-16	중국	2007.8.7	CC-11	<i>C. sieboldii</i>	0.66	3.70 ± 0.01	0.56 ± 0.00	27.39 ± 0.08
16	ㄱ-11-17	중국	2007.8.7	CC-21	<i>C. sieboldii</i>	0.80	1.47 ± 0.03	1.15 ± 0.01	43.86 ± 0.26
17	ㄱ-11-19	중국	2007.8.7	CC-22	<i>C. sieboldii</i>	0.55	0.84 ± 0.02	0.94 ± 0.02	22.79 ± 0.42
18	ㄱ-11-20	베트남	2007.8.7	CC-1	<i>C. sieboldii</i>	0.81	1.71 ± 0.05	1.46 ± 0.05	44.86 ± 1.63
19	ㄱ-11-21	베트남	2007.8.7	CC-2	<i>C. sieboldii</i>	0.86	11.46 ± 0.11	1.44 ± 0.01	71.05 ± 0.67
20	ㄱ-11-22	중국	2007.8.7	CC-23	<i>C. sieboldii</i>	0.87	8.50 ± 0.04	0.96 ± 0.00	54.89 ± 0.23
21	ㄱ-11-23	베트남	2007.8.7	CC-3	<i>C. sieboldii</i>	0.70	4.99 ± 0.02	0.76 ± 0.00	32.21 ± 0.12
22	ㄱ-11-24	중국	2007.8.7	CC-24	<i>C. sieboldii</i>	0.92	2.41 ± 0.01	0.88 ± 0.01	57.47 ± 1.07

Contents were expressed as mean±S.D. in mg/g

표 21. 감별결과에 따른 분석치의 평균 및 표준편차

Identities	Patten analysis		Contents of components						
	Distance	Area ratio	CM	HCAL	CALC	CA	CAL	MCAL	EG
<i>C. cassia</i>	12.17±12.97	0.86±0.16	1.59±0.41	0.12±0.01	0.98±0.99	1.33±0.02	38.78±16.95	0.48±0.68	13.60±2.52
<i>C. sieboldii</i>	19.32±8.09	0.79±0.09	3.57±3.09	0.32±0.35	0.51±0.51	1.08±0.31	47.66±16.82	0.50±1.21	18.33±12.25
P value	0.264	0.336	0.385	0.446	0.258	0.277	0.485	0.986	0.600

Contents were expressed as mean±S.D. in mg/g, CM; coumarin, HCAL; 2-hydroxyl cinnamaldehyde, CALC; cinnamyl alcohol, CA; cinnamic acid, CAL; cinnamaldehyde, MCAL; 2-methoxycinnamaldehyde, EG; eugenol

## 3.2 목단피의 생리활성성분 동시분석

### 3.2.1. HPLC 분석조건

#### 1). HPLC 분석조건

목단피에서는 제1세부과제의 연구결과 paeonol,  $\beta$ -sitosterol, ursolic acid, betulinic acid, 2,5-dihydroxy-4-methoxy-acetophenone, paeoniflorigenone, benzoic acid, daucosterol, benzoylpaeoniflorin, methyl gallate, galloyl paeoniflorin, kaempferol, quercetin, paoniflorin, (+)-catechin, gallic acid 등의 화합물이 분리 보고 되었다 (그림 1). 분석조건은 HPLC pattern 분석을 위한 gradient 조건으로 3가지 성분을 동시에 분석할 수 있는 조건으로 하였다. 분석조건을 검토한 성분은 목단피의 주요성분인 paeonol, paeoniflorin, benzoyl paeoniflorin으로 설정하고 이들의 분석조건을 조사하였다. 내부 표준물질은 retention time을 고려하여 bisphenol로 선정하였다. 또한 분석에 소요되는 시간과 각각 성분의 이론단수, resolution을 비교하면서 gradient 조건으로 분석 조건을 설정하였다. 최종 분석 조건은 표 1과 같다. 두 가지 용매 조건에서의 표준시료와 70% 에탄올 엑스에 대한 chromatogram을 아래에 나타내었다 (그림 2).

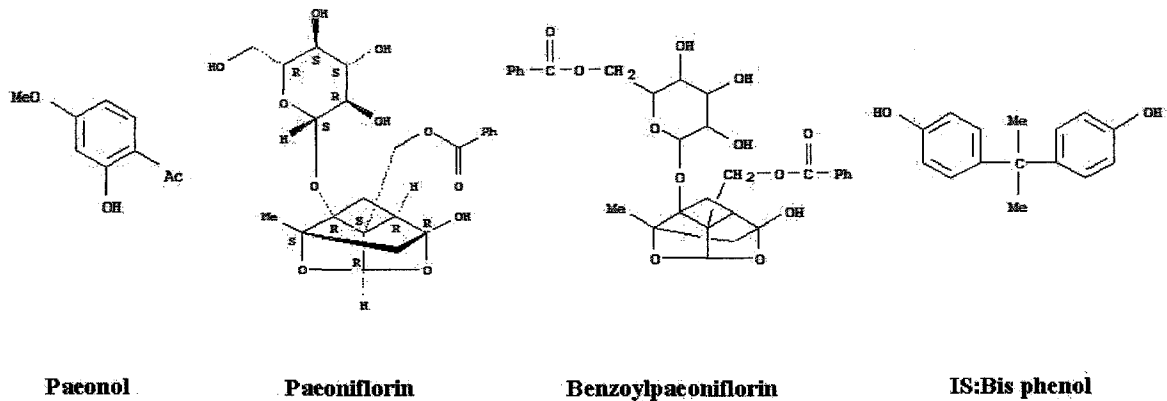


그림 1. 목단피의 주요 성분

표 1. 목단피 성분의 HPLC 최종 분석 조건

**HPLC conditions**

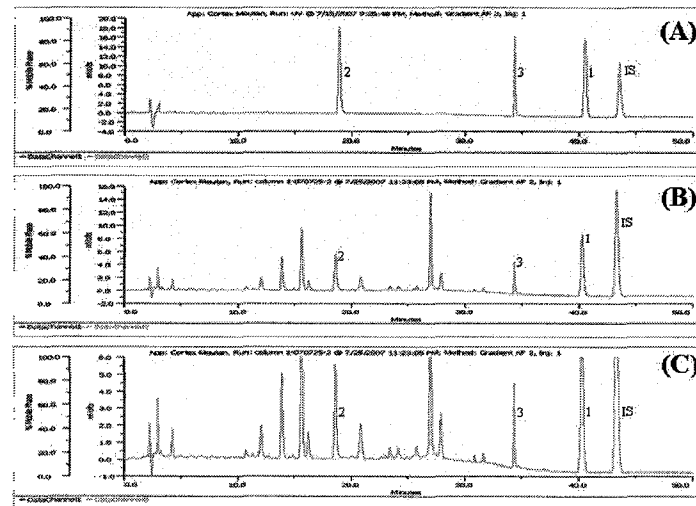
Operation conditions		
HPLC	Gilson	
Detector	Gilson UV/VIS-151 (wavelength 230nm)	
Column	Phenomenex Gemini 5u C18 (250 × 4.60mm, 5µm)	
Flow rate	1 mL/min	
Column temp.	Room temp.	
Auto sampler	GX-271	
Solvent mixing	Gilson 321 pump	
Injection volume	10 µL	

Time (min)	Solvent A (%) <sup>a</sup>	Solvent B (%) <sup>b</sup>
0	10	90
20	20	80
30	40	60
50	40	60
60	100	0
70	10	90

<sup>a</sup> Acetonitrile; <sup>b</sup> 0.05% formic acid in water

**HPLC chromatogram of standard mixture (A)  
and 70% EtOH extract (B, C)**



1: Paconol 2: Peaoniflorin 3: Beazyloxypeoniflorin IS: Bis phenol

그림 2. 두 가지 용매 조건에서의 HPLC 크로마토그램

(A: 0.1% phosphoric acid in water of standard mixture, B: 0.1% phosphoric acid in water of 70% EtOH extract, C: Acetonitrile of 70% EtOH extract)

## 2) 목단피 성분의 추출조건

목단피의 지표성분인 paeonol, paeoniflorin, benzoyl paeoniflorin의 추출조건을 70% EtOH, 100% EtOH, 70% MeOH, 100% MeOH 의 조건으로 추출조건을 분석한 결과 70 % EtOH로 추출하는 경우가 지표성분의 함량이 가장 높은 결과를 나타내었다 (표 2).

표 2. 추출 용매에 따른 목단피 지표성분의 추출 함량

**Studies on Extraction (solvent)**

Solvent	Content (mg/g)								
	Paeonol			Paeoniflorin			Benzoylpaeoniflorin		
	Mean	SD	SEM	Mean	SD	SEM	Mean	SD	SEM
70% EtOH	28.47	0.45	0.26	14.55	0.25	0.14	6.18	0.25	0.14
100% EtOH	19.02	0.27	0.16	3.74	0.05	0.03	5.69	0.17	0.10
70% MeOH	26.36	0.53	0.30	14.40	0.36	0.21	5.81	0.11	0.06
100% MeOH	21.13	0.45	0.26	14.17	0.19	0.11	6.13	0.07	0.04

## 3) 목단피 성분의 추출방법

목단피의 지표성분인 paeonol, paeoniflorin, benzoyl paeoniflorin의 추출방법을 reflux, shaking, sonication의 세가지 방법을 비교해 본 결과 sonication을 이용하여 추출하는 경우가 가장 지표성분의 함량이 높은 결과를 나타내었다 (표 3).

표 3. 추출 방법에 따른 목단피 지표성분의 추출 함량

Methods	Content (mg/g)								
	Paeonol			Paeoniflorin			Benzoylpaeoniflorin		
	Mean	SD	RSD (%)	Mean	SD	RSD (%)	Mean	SD	RSD (%)
Reflux	23.63	0.00	0.02	15.04	0.02	0.13	5.70	0.01	0.12
Shaking	21.61	0.02	0.09	14.37	0.02	0.12	5.41	0.00	0.01
Sonication	27.56	0.02	0.07	15.63	0.00	0.01	5.87	0.00	0.08

## 4) 목단피 성분의 추출시간

목단피의 지표성분인 paeonol, paeoniflorin, benzoyl paeoniflorin을 sonication으로 추출할 경우 가장 양호한 추출시간을 결정하기 위하여 10, 20, 30, 60, 90 분의 시간대별로 추출해 본 결과 60 분의 경우가 지표성분의 함량이 가장 높은 결과를 얻었다 (표 4).

표 4. 추출 시간에 따른 목단피 지표성분의 추출 함량

Time (min)	Content (mg/g)								
	Paeonol			Paeoniflorin			Benzoylpaeoniflorin		
	Mean	SD	RSD (%)	Mean	SD	RSD (%)	Mean	SD	RSD (%)
10min	22.02	0.19	0.85	14.28	0.04	0.24	5.46	0.02	0.45
20min	24.40	0.21	0.86	16.17	0.01	0.01	5.81	0.06	1.01
30min	27.05	0.41	1.51	16.18	0.12	0.76	5.53	0.02	0.38
60min	27.37	0.13	0.46	16.51	0.21	1.27	5.80	0.02	0.33
90min	27.40	0.01	0.04	16.39	0.09	0.52	5.87	0.06	0.97

## 5) 목단피 성분의 추출횟수

목단피의 지표성분인 paeonol, paeoniflorin, benzoyl paeoniflorin을 sonication으로 추출할 경우 가장 양호한 추출횟수를 결정하기 위하여 1회 50 ml, 2회 (30ml 1회, 20 ml 1회), 3회(30ml 1회, 10 ml 2회) 추출한 결과 1회 추출한 경우 2회 3회 추출한 것과 큰 차이가 없어 1회 추출하는 것으로 결정하였다 (표 5).

표 5. 추출 횟수에 따른 목단피 지표성분의 추출 함량

Frequency (Sonication)	Content (mg/g)								
	Paeonol			Paeoniflorin			Benzoylpaeoniflorin		
	Mean	SD	RSD (%)	Mean	SD	RSD (%)	Mean	SD	RSD (%)
1 (50mL×1)	26.48	0.18	0.67	16.08	0.15	0.90	5.47	0.03	0.62
2 (30mL×1, 20mL×1)	27.43	0.15	0.55	16.62	0.06	0.37	6.04	0.06	0.92
3 (30mL×1, 10mL×2)	27.56	0.06	0.21	16.53	0.05	0.30	6.09	0.06	0.99

### 3.2.2. HPLC 조건 Validation

#### 1) 이동상 용액의 validation

최적 이동상 조건을 설정하기 위하여 문헌조사를 한 결과 중국약전에서는 MeOH-H<sub>2</sub>O (45:55)의 이동상으로 paeonol을 분석하였고, 대한약전에서는 water-acetonitrile-glacial acetic acid (65:35:2)의 이동상으로 paeonol을 분석하였으며, Qing He (Chem. Pharm. Bull. 54, 1271-1275, 2006) 등은 acetonitrile-0.1 % formic acid의 gradient 분석조건으로 목단피 성분의 분석연구를 수행하였다. 본 연구에서도 3가지 조건을 각각 실험한 결과 Qing He 등이 사용한 분석조건이 목단피의 성분 분석에 가장 양호한 분석능을 나타내는 것으로 판단되어 이 조건을 응용하여 분석을 수행하였다 (표 6).

표 6. 목단피 성분의 HPLC 분석을 위한 이동상의 validation

#### 1. Effect of mobile phase on HPLC analysis

Con.	Retention time (min)			Theoretical number			Tailing factor		
	Paeonol (1)	Paeoniflorin (2)	Benzoylpaeoniflorin (3)	Paeonol (1)	Paeoniflorin (2)	Benzoylpaeoniflorin (3)	Paeonol (1)	Paeoniflorin (2)	Benzoylpaeoniflorin (3)
1	24.73	5.09	34.33	2475.52	511.52	3436.71	1.18	1.31	1.27
2	18.03	3.43	9.41	2091.33	498.25	7190.65	1.10	1.13	1.26
3	48.69	19.17	34.60	403004.04	159389.16	1471816.09	1.06	1.13	1.24

Conditions	Mobile phase	Flow rate	UV	Temp.	Note
1	MeOH:Water (45/55, v/v)	1ml/min	230nm	Room temp.	Chinese pharmacopoeia
2	Water:Acetonitrile:Glacial acetic acid (65/35/2, v/v/v)	1ml/min	230nm	Room temp.	Korean pharmacopoeia
3	Acetonitrile (A): 0.1%formic acid (B) 0-20, A (5-15%); 20-30, A (15%); 30-75, A (15-25%); 75-90, A (25-45%); 90-95, A (45-70%); 95-105, A (70%)	1ml/min	230nm	Room temp.	Chem. Pharm. Bull. 54(9), 1271-5

## 2) 이동상의 gradient condition의 validation

이동상의 최적 gradient condition을 선정하기 위하여 여러 가지 조건을 시도한 결과 0-20 min, A (10-20%); 20-30 min, A (20-40%); 30-50 min, A (40%); 50-60 min, A (40-100%); 60-70 min, A (100-10%); 70-80 min, A (10%)의 조건으로 분석하는 것이 가장 양호한 분석능을 나타내었다 (표 7).

표 7. 목단피 성분의 HPLC 분석을 위한 이동상의 gradient 조건

**2. Effect of gradient condition in mobile phase**

	Retention time (min)			Theoretical number			Tailing factor		
	Paeonol (1)	Paeoniflorin (2)	Benzoylpaeoniflorin (3)	Paeonol (1)	Paeoniflorin (2)	Benzoylpaeoniflorin (3)	Paeonol (1)	Paeoniflorin (2)	Benzoylpaeoniflorin (3)
1	91.88	30.01	90.12	312943.16	1291360.81	294319.02	1.33	1.36	1.30
2	41.27	19.51	34.63	381158.00	164468.86	1430916.18	1.10	1.13	1.21
3	41.14	19.04	34.07	376262.03	180148.21	1407161.07	1.22	1.23	1.27

No.	conditions
1	0-20, A (5-15%); 20-30, A (15%); 30-75, A (15-25%); 75-90, A (25-45%); 90-95, A (45-70%); 95-105, A (70%)
2	0-20, A (10-20%); 20-30, A (20-40%); 30-50, A (40%); 50-60, A (40-100%); 60-70, A (100-10%); 70-80, A (10%)
3	0-20, A (10-20%); 20-30, A (20-40%); 30-40, A (40%); 40-50, A (40-100%); 50-55, A (100-10%); 55-60, A (10%)



## 3) Formic acid의 최적 농도설정

Formic acid의 최적 농도를 설정하기 위하여 0 %, 0.01 %, 0.05 %, 0.1 % formic acid의 농도를 함유한 이동상을 제조하여 분석능을 조사한 결과 0.05 % formic acid의 농도로 제조한 이동상이 가장 양호한 분석능을 나타내었다 (표 8).

표 8. 목단피 성분의 HPLC 분석을 위한 formic acid의 최적 농도 조건

**3. Effect of the concentration of formic acid (%) in mobile phase**

Formic acid	Retention time (min)			Theoretical number			Tailing factor		
	Paenol (1)	Paeniflorin (2)	Benzoylpaeniflorin (3)	Paenol (1)	Paeniflorin (2)	Benzoylpaeniflorin (3)	Paenol (1)	Paeniflorin (2)	Benzoylpaeniflorin (3)
1 0%	41.17	19.58	35.03	408525.11	177694.03	1299581.55	1.11	1.15	2.35
2 0.01%	41.46	19.70	34.98	401468.96	169002.98	1421993.54	1.11	1.11	1.18
3 0.05%	41.25	19.59	34.97	407260.85	172733.43	1482420.7	1.10	1.11	1.17
4 0.1%	41.27	19.51	34.63	381158.00	164468.86	1430916.18	1.10	1.13	1.21

### 3.2.3 Validation

#### 1) 정확성 (Accuracy)

규정된 범위를 포함하여 최소한 3농도에 대해서 분석법의 전 조작을 적어도 9회 반복 측정 (3농도에 대해서 3회씩 반복 측정)하여 정확성을 측정하였다. 기지량의 paeonol, paeoniflorin, benzoyl paeoniflorin 을 첨가한 검체를 정량하는 경우 회수율(%)로서 정확성을 나타내며 이때 회수율은 99.55-102.85 %의 양호한 수치를 나타내었다 (표 9).

**표 9. 목단피 성분의 HPLC 분석 조건의 정확성**  
**3-1. Accuracy (Recovery test; n=3)**

Compounds	Added conc. (µg/mL)	Cal conc. (µg/mL)	Recovery (%)	SD	SEM
Paeonol	0.0	244.59	-	-	-
	50.0	296.53	101.04	2.36	1.36
	100.0	346.59	100.97	3.21	1.85
Paeoniflorin	0.0	341.12	-	-	-
	150.0	502.63	102.85	3.80	2.19
	300.0	649.04	101.34	1.53	0.89
Benzoylpaeoniflorin	0.0	96.40	-	-	-
	50.0	146.85	100.48	1.38	0.80
	100.0	195.78	99.55	3.10	1.79

## 2) 정밀성 (Precision)

표준편차, 상대표준편차 (변동계수) 및 표준편차의 신뢰구간으로 정밀성을 확인하였으며 paeonol, paeoniflorin, benzoyl paeoniflorin 모두 0.33 % 이내의 수치를 나타내었다 (표 10).

표 10. 목단피 성분의 HPLC 분석 조건의 정밀성

**3-2. Precision (Reproducibility; n=5)**

Compounds	Peak area ratio (peak area/IS area)			Retention time (min)		
	Mean	SD	SEM	Mean	SD	SEM
Paeonol	7.74	0.55	0.32	40.89	0.29	0.17
Paeoniflorin	7.17	0.57	0.33	19.12	0.24	0.14
Benzoylpaeoniflorin	3.87	0.31	0.18	34.42	0.03	0.02

## 3) 일내 및 일간 재현성

목단피 유효성분 분석의 일내 정확성, 정밀성을 확인하기 위하여 3가지 농도에 대하여 하루에 3번 반복실험하였으며, 일간 정확성, 정밀성을 확인하기 위하여 3일간 반복 실험하였다.

일내, 일간 정밀성은 각 성분과 내부표준물질의 피크 면적비의 표준편차를 각 성분과 내부표준물질의 피크면적비의 평균값으로 나눈 비의 백분율 (%)로서 구하였으며 그 값은 0.23 - 1.47 %와 0.56 - 2.34 % 내에 들었다.

일내, 일간 정확성은 검량선에 의하여 정량한 농도의 평균값을 기지의 농도로 나눈 비의 백분율 (%)로 구하였으며, 그 값은 98.20 - 102.60 %와 99.31 - 101.65 % 이었다 (표 11).

표 11. 목단피 성분의 HPLC 분석 조건의 일내 및 일간 재현성

## 3-3. Precision (Intra/Inter-day)

Compound	Spiked conc. (µg/ml)	Intra day (n=3)				Inter day (n=3)			
		Observed conc. (µg/ml)	SD	SEM	Accuracy (%)	Observed conc. (µg/ml)	SD	SEM	Accuracy (%)
Paeonol	22.5	22.10	0.39	0.23	98.20	22.87	1.15	0.67	101.65
	45	45.58	0.71	0.41	101.28	44.83	1.35	0.78	99.61
	90	90.72	1.30	0.75	100.80	91.47	1.94	1.12	101.64
Paeoniflorin	67.5	68.80	1.22	0.70	101.93	67.46	3.46	2.00	99.93
	135	134.71	2.54	1.47	99.78	136.05	4.06	2.34	100.78
	270	270.08	3.24	1.87	100.03	271.43	0.97	0.56	100.53
Benzoylpaeoniflorin	22.5	22.80	1.16	0.67	101.32	22.35	1.68	0.97	99.31
	45	44.61	1.03	0.60	99.14	45.06	1.68	0.97	100.14
	90	92.34	1.65	0.95	102.60	91.43	2.11	1.22	101.59

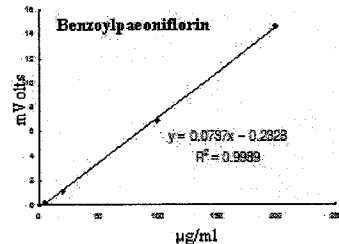
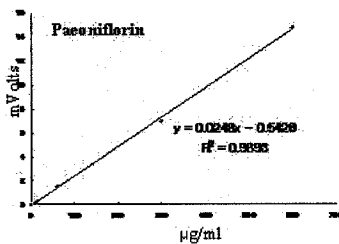
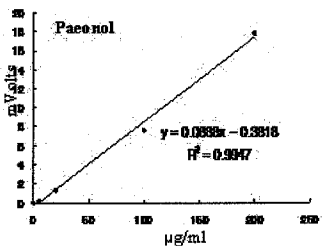
## 4) 직선성, 범위, 검출한계 및 정량한계 (Linearity, range, LOD and LOQ)

목단피 유효성분의 직선성 농도범위를 paenol; 5~200 µg/mL, paeoniflorin; 15~600 µg/mL 및 benzoyl paeoniflorin; 5~200 µg/mL로 하였다. 각 지표성분의 정량범위는 검토한 각 성분의 농도에서 직선성을 나타내는 농도로 표시하였으며 면적비를 이용한 검량선으로 상관계수  $r^2$  를 구하여 양호한 직선성을 나타내는지 확인 하였다. 검출한계(LOD)는 신호대 잡음비(S/N) =3을 기준으로 정하였고, 정량한계(LOQ)는 S/N=10을 나타내는 농도로써 표기하였다 (표 12).

표 12. 목단피 성분의 HPLC 분석 조건의 직선성, 범위, 검출한계 및 정량한계

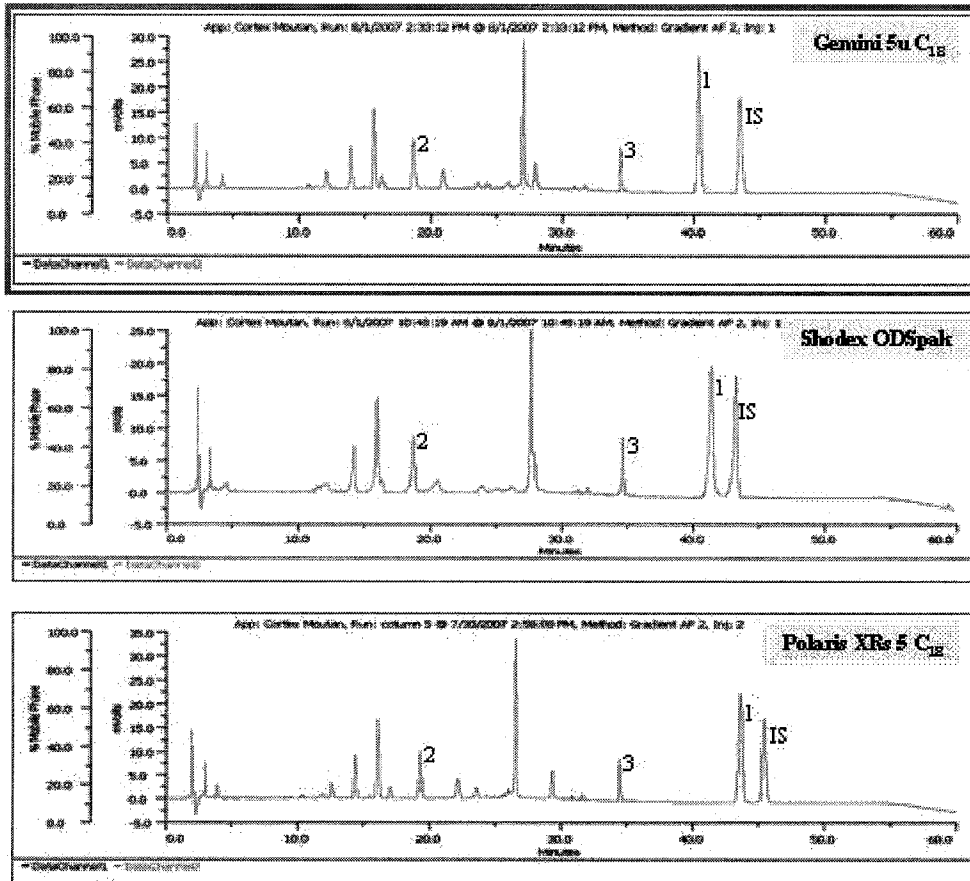
## 3-4. Linearity/LOD/LOQ of marker compounds

Compound	Linear range (µg/ml)	a	b	$r^2$	LOD (µg/ml)	LOQ (µg/ml)
Paenol	5.00 ~ 200.00	0.0888	-0.3818	0.9947	5.3	7.7
Paeoniflorin	15.00 ~ 600.00	0.0248	-0.5426	0.9893	24.3	29.9
Benzoylpaeoniflorin	5.00 ~ 200.00	0.0737	-0.2328	0.9989	5.2	9.9



## 5) 완전성 (Robustness)

세가지 서로 다른 HPLC column Gemini 5U C18, Shodex ODS pak, Capcell C18 MG로 3개의 목단피 화합물을 분리해 본 결과 거의 동일한 분리 pattern을 나타내었으며 그중 Gemini 5U C18 column의 경우가 가장 양호한 분리능을 나타내었다 (그림 3).



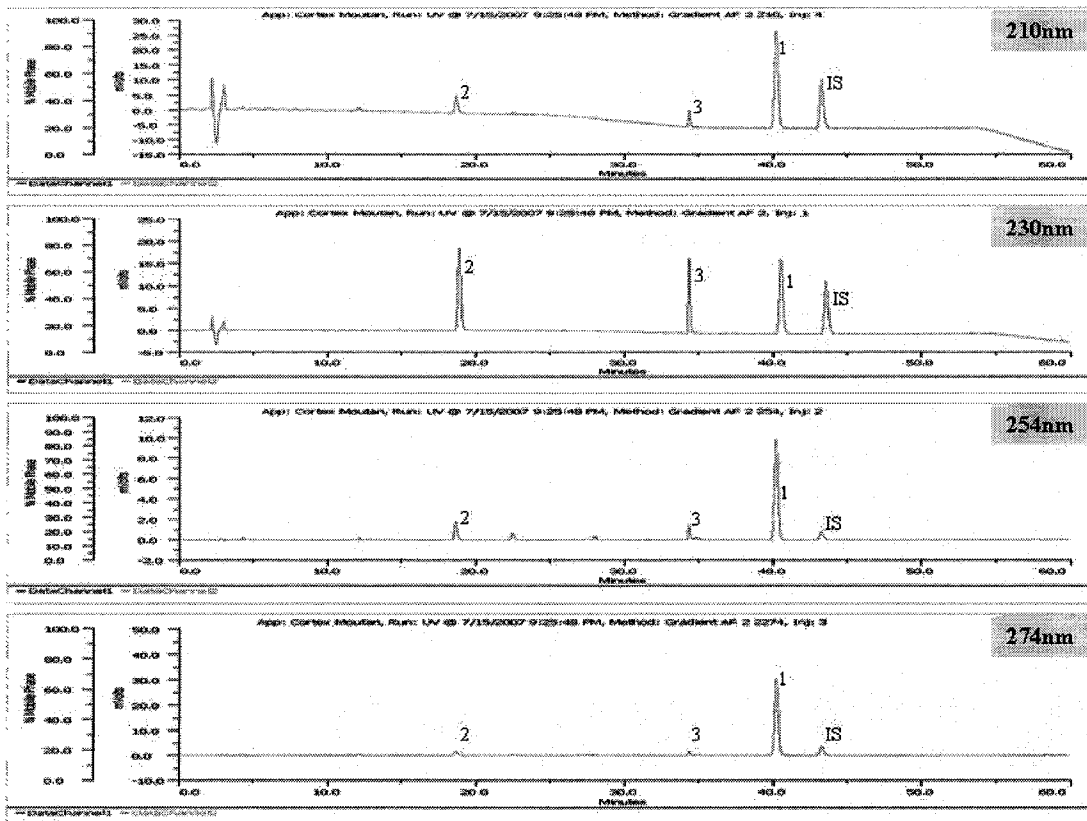
All columns are those of analytical, 250 x 4.60mm, 5 $\mu$ m; Gemini 5u C<sub>18</sub> (Phenomenex); Shodex ODSpak; Polaris XRs 5 C<sub>18</sub> (Varian)

그림 3. 목단피 성분의 HPLC 분석 조건의 완전성

## 6) 파장의 선택

paenol, paeniflorin, benzoyl paeniflorin과 internal standard로 사용한 bisphenol의 파장선택성을 조사하기 위하여 검출기의 파장을 210 nm, 230 nm, 254 nm, 274 nm로 분석한 결과 230 nm로 검출한 경우가 가장 양호한 peak의 모양을 나타내어 230 nm에서 분석을 수행하였다 (그림 4).

### 3-4. Robustness (Comparison of UV wavelength)



1: Paenol 2: Paeniflorin 3: Benzoylpaeniflorin IS: Bisphenol

그림 4. 목단피 성분의 HPLC 분석을 위한 최적 UV 파장 조건

### 3.2.4 표준품의 안정성 시험

목단피의 지표성분의 안정성을 확인하기 위하여 지표성분인 paeonol, paeoniflorin, benzoylpaeoniflorin을 0.5, 1, 2, 5, 10, 15일 동안 냉장고와 상온에서 방치한 후 함량을 비교한 결과 목단피의 지표성분은 유의성 있는 함량변화를 보이지 않았다 (그림 5).

#### Stability of analytes

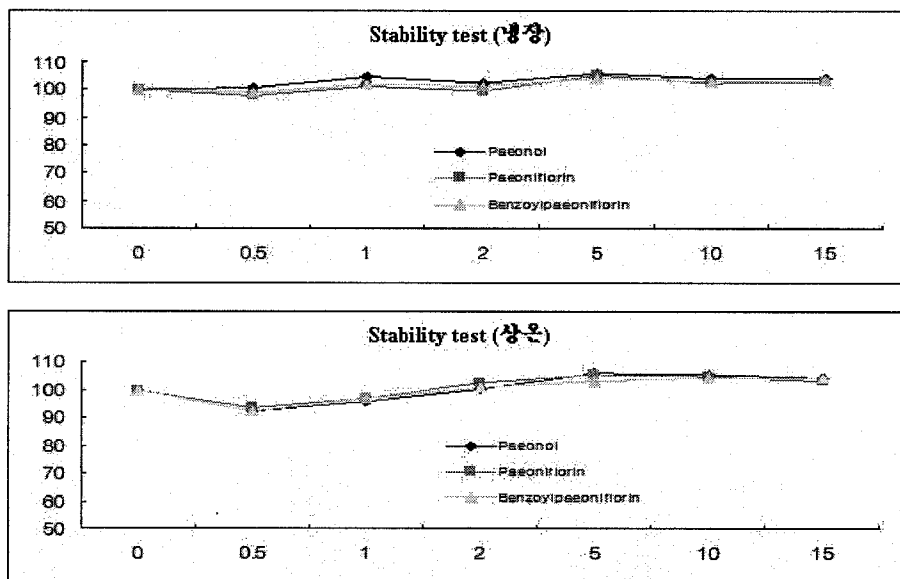
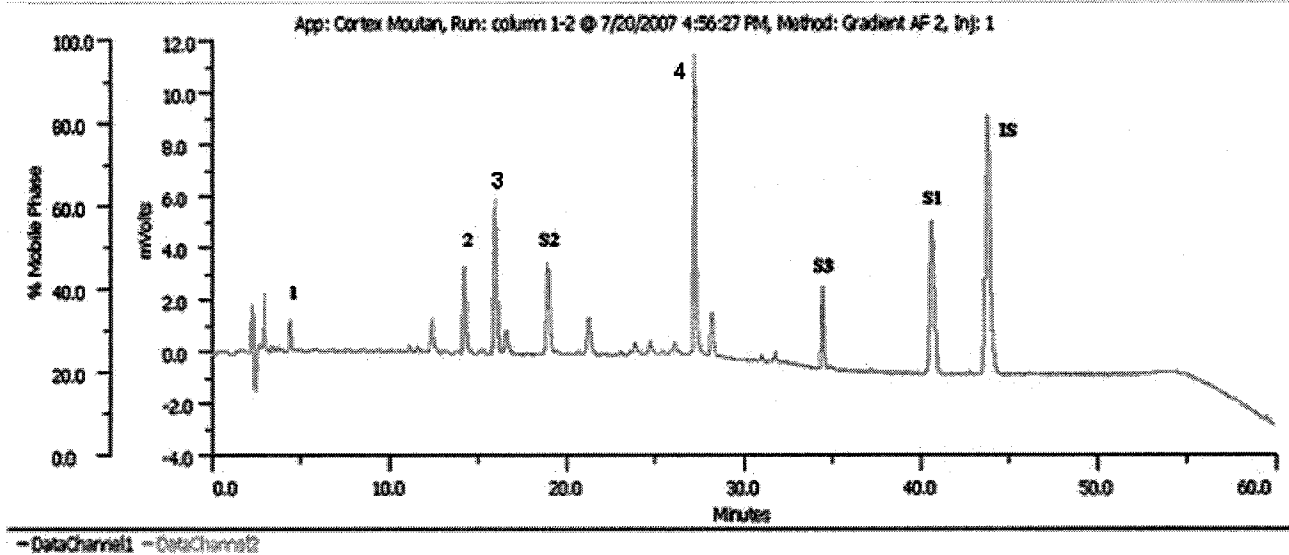


그림 5. 목단피 성분의 안정성 시험



### 3.2.5 목단피의 성분 확인

HPLC로 분석한 목단피 성분의 retention time을 각각의 standard 화합물과 비교한 결과 지표성분으로 설정한 paeonol (S1, 40.66분), paeoniflorin (S2, 18.96분), benzoyl paeoniflorin (S3, 34.47분)은 양호한 분리능을 나타내었고, 그 외에 gallic acid는 4.40분에서, (+)-catechin은 14.25분에서, methyl gallate는 16.12분에서, galloyl paeoniflorin은 26.08분에서, 내부표준물질로 사용한 bisphenol은 43.82분에서 분리되었다 (그림 6).



1. Gallic acid; 2. (+)-Catechin; 3. Methyl gallate; 4. Galloylpaeoniflorin;  
S1. Paeonol; S2. Paeonoflorine; S3. Benzoyl paeoniflorin; IS. Bis phenol

그림 6. HPLC 크로마토그램에서 목단피 성분의 확인

### 3.2.6 LC-DAD-MS에 의한 목단피의 성분 동정

LC-DAD를 이용한 UV 스펙트럼과 LC-MS를 이용한 mass 스펙트럼을 표준품과 비교하여 목단피 추출물의 성분을 동정하였다. 그림 7에서는 목단피 추출물과 11개의 표준품에 대한 HPLC 크로마토그램을 나타내었고 그림 8에서는 이에 대한 3-D 크로마토그램을 나타내었다. 목단피 추출물에서는 지표물질로 사용된 paeonol(11), paeoniflorin(4), benzoylpaeoniflorin(8) 이외에 gallic acid(1), catechin(2), methylgallate(3), galloylpaeoniflorin(5), quercetin(7), paeoniflorigenone(9), kaempferol(10), paeonol(11) 등이 확인되었다. quercetin은 목단피로부터 분리되는 되었으나 시료의 크로마토그램에서는 확인되지 않았다. LC-MS를 이용한 성분 동정 결과는 그림 9와 같았다.

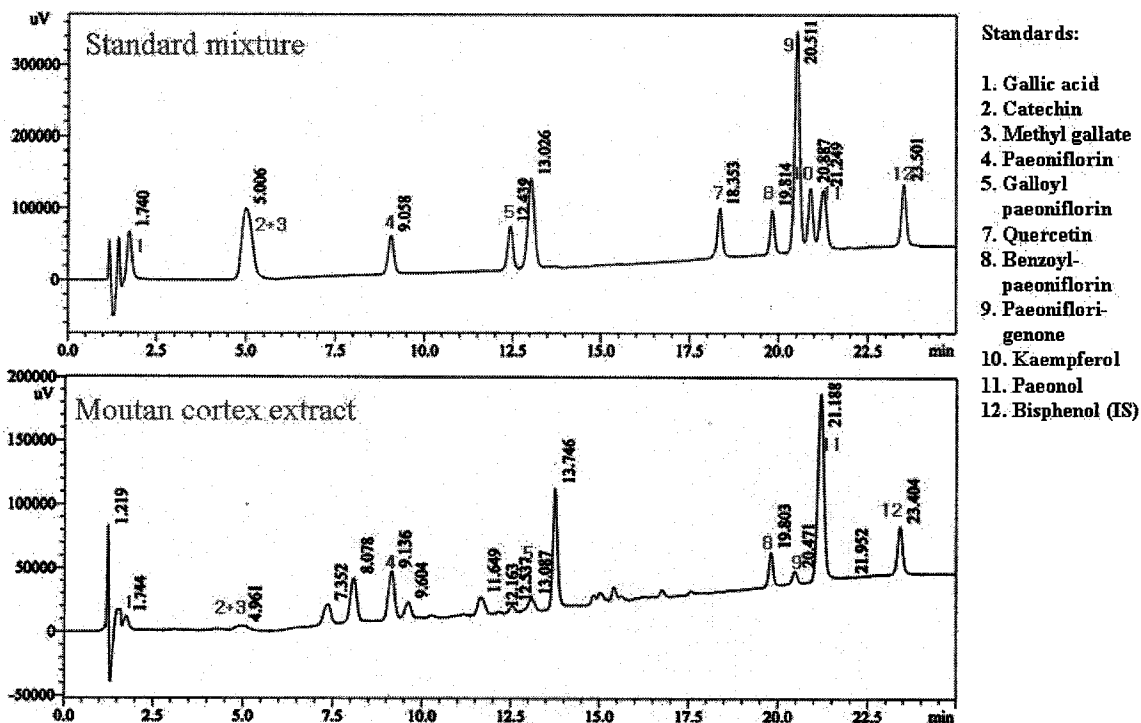


그림 7. 목단피 추출물과 12개의 표준품에 대한 HPLC 크로마토그램

HPLC conditions: HPLC: Shimadzu LC-10AD VP, Detector: Shimadzu SPD-10A VP UV-VIS Detector, Column: Phenomenex Prodigy C18 (2.00 x 150 mm, 5 $\mu$ m), Flow rate: 0.4 mL/min, Auto sampler: Shimadzu prominence SIL-20A, Injection volume: 5  $\mu$ L, Detective wavelength: 230 nm  
Eluent: A: 0.05% Formic acid in 10% Acetonitrile, B: 0.05% Formic acid in 90% Acetonitrile, Gradient 0 min 0%B, 10 min 12.5%B, 20 min, 37.5%B, 25 min 37.5%B, 27.5 min 100%B, 32.5 min 100%)

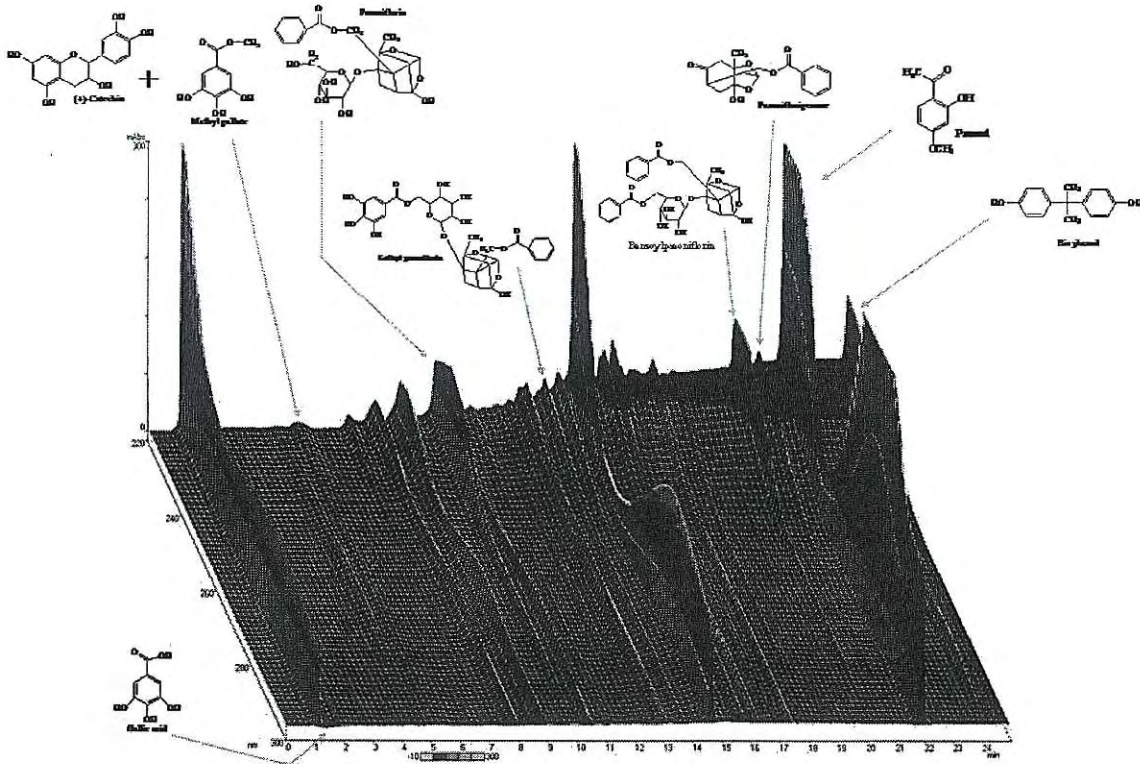
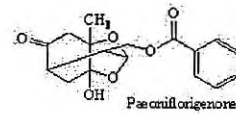
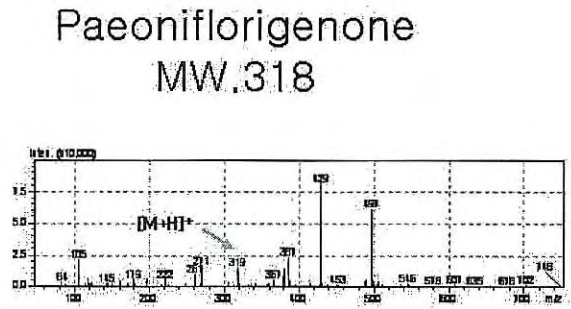
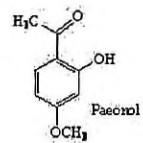
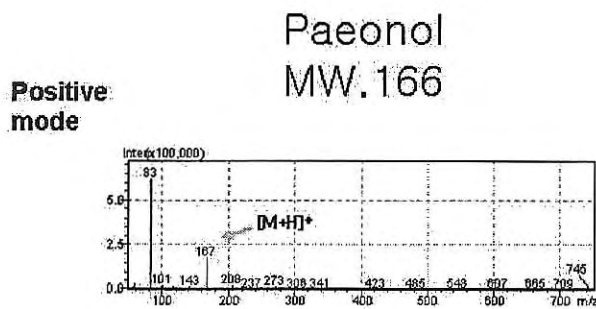


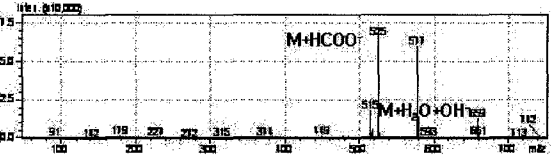
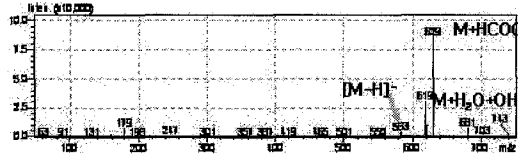
그림 8. 목단피 추출물 속 지표성분의 3-D chromatogram



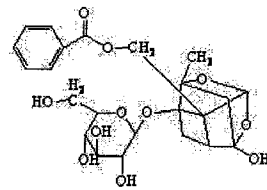
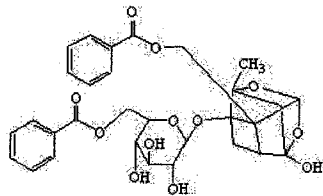
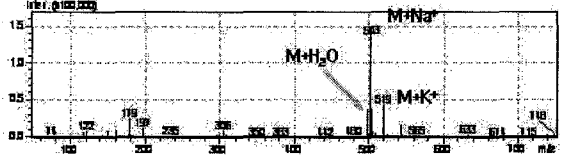
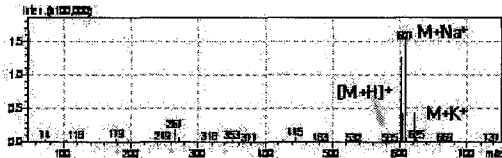
Benzoylpaeoniflorin  
MW. 584

Paeoniflorin  
MW.480

Negative mode



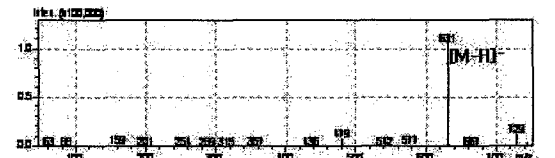
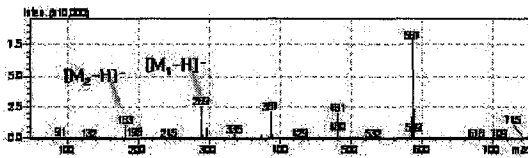
Positive mode



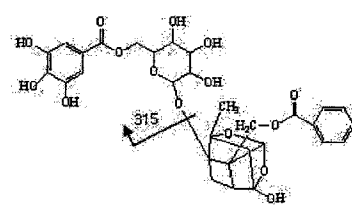
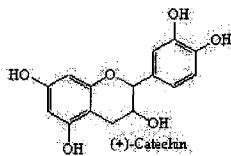
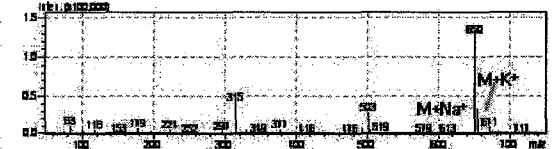
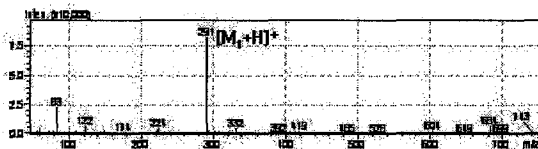
Catechin+Methyl gallate  
MW.290/184

Galloyl paeoniflorin  
MW.632

Negative mode

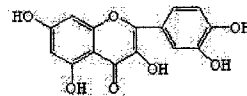
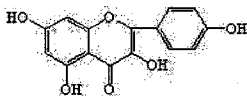
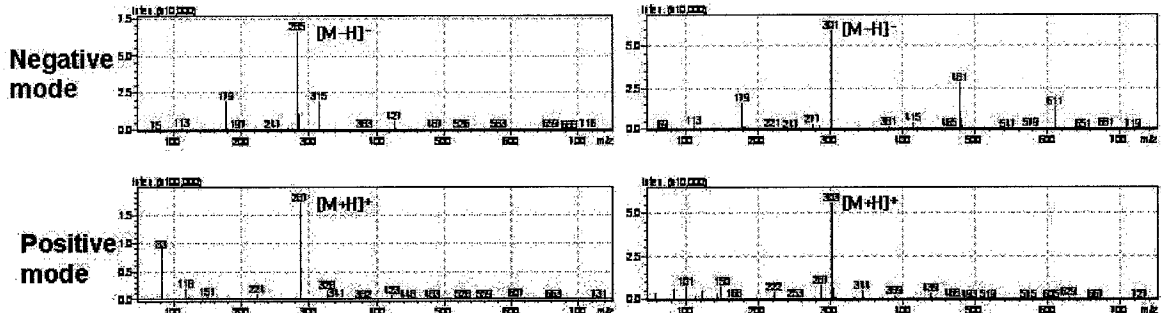


Positive mode



Kaempferol  
MW.286

Quercetin  
MW.302



Gallic acid  
MW.170

Negative  
mode

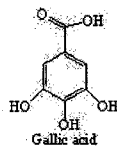
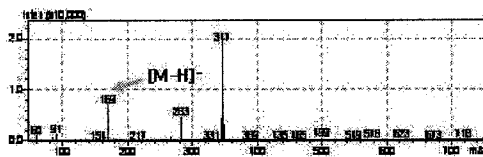


그림 9. 목단피 지표성분의 LC-MS 스펙트럼

LC-MS conditions: MS: Shimadzu LCMS-2010-EV (ESI), Data acquisition and analyze: LCMS Solution workstation, Operating mode: Negative / Positive ionization mode, Nebulizing gas flow: 1.4 L/min, CDL temperature: 250 °C, Heat block temperature: 200 °C, Detector voltage: 1.50 kV, CDL voltage: 15.0 V, Molecular weight data acquisition: from m/z 50 to 750

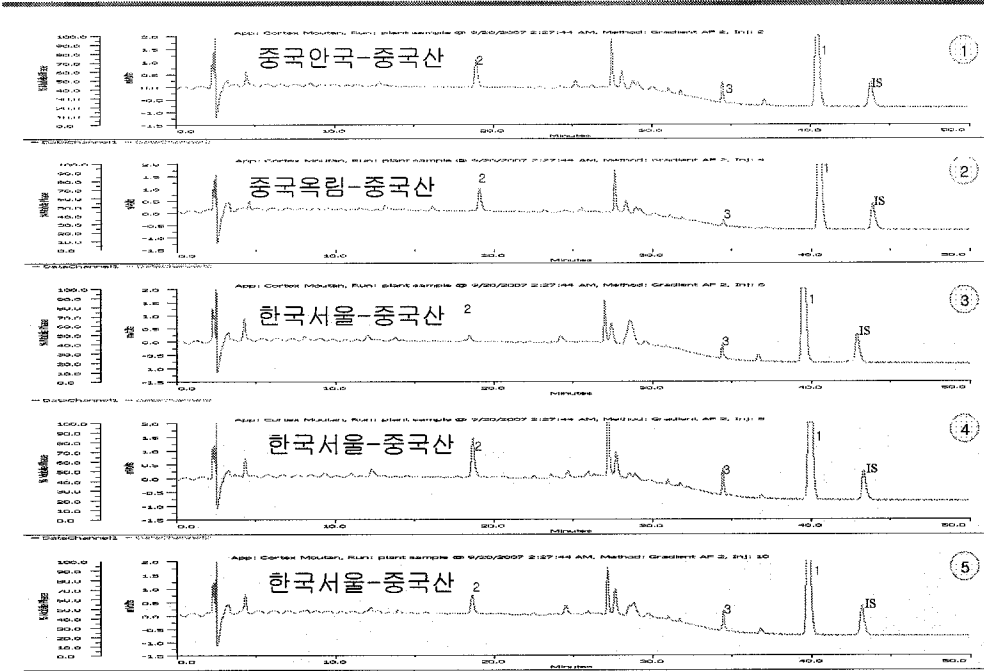
### 3.2.7 목단피 시료의 HPLC 분석

시중에서 20개의 시료를 구입하고 (표 13), paeonol, paeoniflorin, benzoyl paeoniflorin의 함량을 분석하였으며 (표 14), 각 시료의 분석 크로마토그램을 아래에 나타내었다 (그림 10).

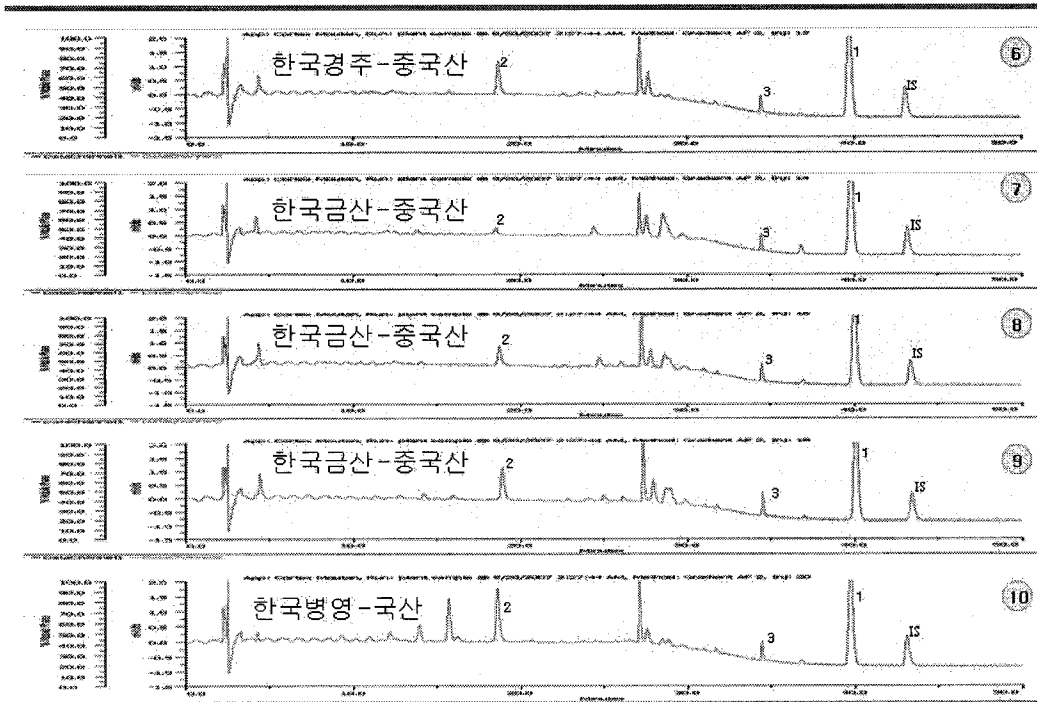
표 13. 분석에 사용한 목단피 시료 목록

번호	기원	구입일시	장소	산지	비고
1	<i>Paeonia suffruticosa</i>	2007.05	중국 안국	중국산	
2	<i>Paeonia suffruticosa</i>	2007.05	중국 옥림	중국산	
3	<i>Paeonia suffruticosa</i>	2007.07	서울 제기동	중국산	
4	<i>Paeonia suffruticosa</i>	2007.07	서울 제기동	중국산	
5	<i>Paeonia suffruticosa</i>	2007.07	서울 제기동	중국산	
6	<i>Paeonia suffruticosa</i>	2007.08	경북 경주	중국산	
7	<i>Paeonia suffruticosa</i>	2007.08	충남 금산	중국산	
8	<i>Paeonia suffruticosa</i>	2007.08	충남 금산	중국산	
9	<i>Paeonia suffruticosa</i>	2007.08	충남 금산	중국산	
10	<i>Paeonia suffruticosa</i>	2007.09	전남 병영	한국산	사업단제공
11	<i>Paeonia suffruticosa</i>	2007.09	전남 여수	한국산	사업단제공
12	<i>Paeonia suffruticosa</i>	2007.09	서울	한국산	사업단제공
13	<i>Paeonia suffruticosa</i>	2007.09	경북 영천	중국산	사업단제공
14	<i>Paeonia suffruticosa</i>	2007.09	서울	중국산	사업단제공
15	<i>Paeonia suffruticosa</i>	2007.08	중국 안국	중국산	사업단제공
16	<i>Paeonia delavayi</i> var <i>lutea</i>	2007.09	서울	중국산	사업단제공
17	<i>Paeonia suffruticosa</i>	2007.07	대전	중국산	
18	<i>Paeonia suffruticosa</i>	2007.07	대전	중국산	
19	<i>Paeonia suffruticosa</i>	2007.07	대전	중국산	
20	<i>Paeonia suffruticosa</i>	2007.01	대전	중국산	

### 5-1. HPLC Chromatogram of *Moutan Cortex Radicis* (1-5)



### 5-1. HPLC Chromatogram of *Moutan Cortex Radicis* (6-10)



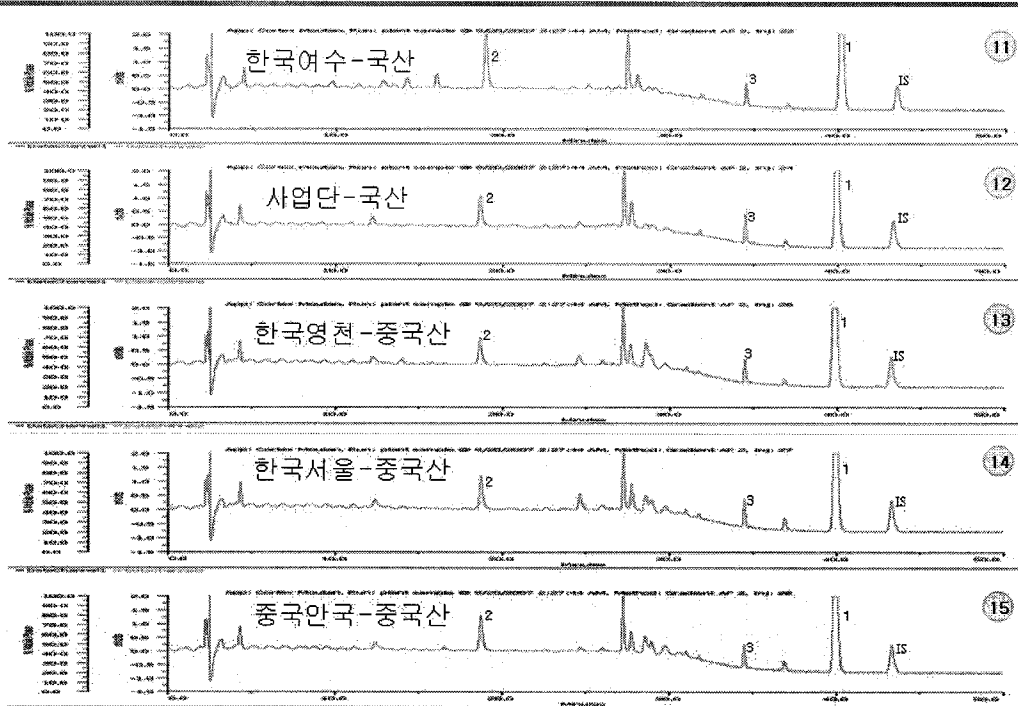
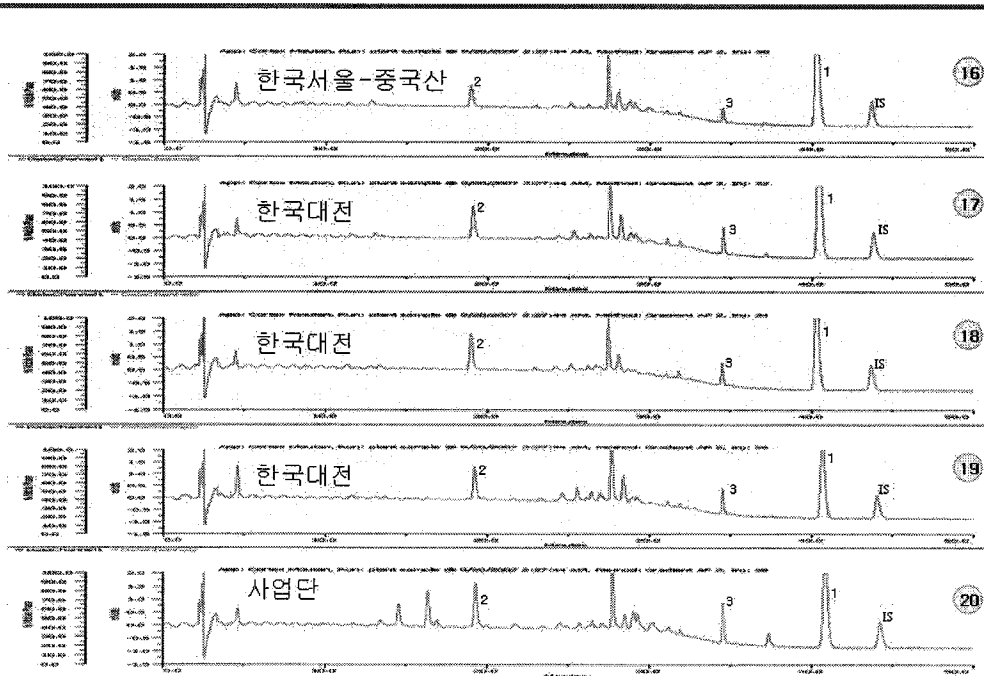
5-1. HPLC Chromatogram of *Moutan Cortex Radicis* (11-15)5-1. HPLC Chromatogram of *Moutan Cortex Radicis* (16-20)

그림 10. 목단피 시료 (1-20)의 HPLC chromatogram



표 14. 목단피 지표 성분의 함량

## Content (mg/g) of the marker compounds of Moutan Cortex Radicis

Samples	Content (mg/g)								
	Paeonol			Paeoniflorin			Benzoylpaeoniflorin		
	Mean	SD	RSD (%)	Mean	SD	RSD (%)	Mean	SD	RSD (%)
1	13.80	0.14	0.98	8.41	0.02	0.29	2.54	0.01	0.43
2	14.29	0.08	0.55	6.23	0.08	1.31	0.96	0.00	0.15
3	16.51	0.09	0.53	1.68	0.00	0.07	1.64	0.01	0.38
4	20.51	0.10	0.50	9.63	0.10	1.00	2.57	0.04	1.65
5	18.02	0.08	0.45	4.20	0.03	0.81	2.16	0.02	1.09
6	13.10	0.20	1.55	8.26	0.11	1.28	1.63	0.02	1.04
7	15.78	0.15	0.98	1.36	0.01	0.86	1.84	0.02	1.26
8	14.44	0.24	1.69	5.63	0.03	0.61	2.41	0.03	1.10
9	14.44	0.12	0.83	8.93	0.12	1.30	2.94	0.04	1.49
10	11.03	0.10	0.92	12.89	0.08	0.61	1.98	0.03	1.46
11	17.07	0.00	0.02	17.46	0.01	0.08	2.57	0.05	1.39
12	15.76	0.18	1.12	8.93	0.05	0.60	3.27	0.04	1.17
13	20.15	0.07	0.36	7.38	0.02	0.29	2.47	0.02	0.84
14	17.78	0.22	1.24	8.11	0.03	0.37	2.92	0.02	0.67
15	19.44	0.10	0.53	9.43	0.07	0.75	2.89	0.01	0.33
16	17.89	0.13	0.72	5.82	0.06	1.03	1.89	0.00	0.02
17	19.20	0.18	0.92	9.29	0.07	0.81	3.09	0.00	0.10
18	14.29	0.09	0.65	10.53	0.11	1.03	2.53	0.01	0.40
19	10.59	0.15	1.41	9.69	0.09	0.90	3.10	0.01	0.31
20	15.17	0.07	0.46	12.21	0.06	0.51	4.53	0.03	0.70

### 3.2.8 폐턴인식법에 의한 기원별 산지별 분석

#### 1) 목단피 추출 및 HPLC에 의한 분석

목단피 시료 20개에 코드를 부여하였다. 그 중 S10부터 S12까지 3개는 국산, S13부터 S16까지 4개는 중국산으로 사업단에서 제공하였고, 나머지는 목단피 벨리테이션시료(S1-9, S17-20)로 전국 각처에서 구입한 중국산이었다. 따로 작약시료 2개를 (J1, J2)는 목단피와 비교하기 위하여 시중에서 구입하였다. 각 시료를 앞의 방법으로 추출하고 추출액을 HPLC-UV로 분석하였다. 각 시료는 세 번 분석하여 평균하였다. 추출액의 크로마토그램으로부터 약 30개의 피크를 얻었고 각각의 피크에 번호를 부여하였다 (그림 11). 각 피크의 유지시간과 면적을 모든 시료에 대해 표로 정리하고 각 피크의 면적을 내부표준물질의 면적으로 나눈 값을 최종 자료로 하여 통계처리 하였다 (표 15).

#### 2) 피크의 선택

30개의 피크 중 상대적인 크기 등을 감안하여 중요성이 클 것으로 판단되는 피크 1, 4, 5, 10, 12, 14, 15, 17, 18, 23, 24, 25, 28, 29 등 14개를 1차로 선택하여 분석에 사용하였다. 자료는 위쪽에서 아래쪽으로 국산 및 중국산 목단피, 작약, 그리고 각 피크의 유지시간(RT) 순서로 나열하였다. 맨 오른쪽에는 산지에 대한 정보를 국산(1), 중국산(2), 미지 또는 벨리테이션(3), 그 외(4)로 하여 입력하였다. 각 자료는 탭으로 분리하였다. 선택 피크 중 p1-gallic acid, p10-paeoniflorin, p17-galloylpaeniflorin, p18-benzoic acid, p24-quercetin, p25-benzoylpaeniflorin, p28-paeoniflorigenone, p29-paenol 등 8개의 피크는 표준품의 유지시간으로 성분을 확인하였고, 나머지 6개의 피크는 미확인 성분이었다. 확인된 8개의 성분 중 paeoniflorin, benzoylpaeniflorin, paenol은 목단피의 지표성분으로 사용될 것이다.

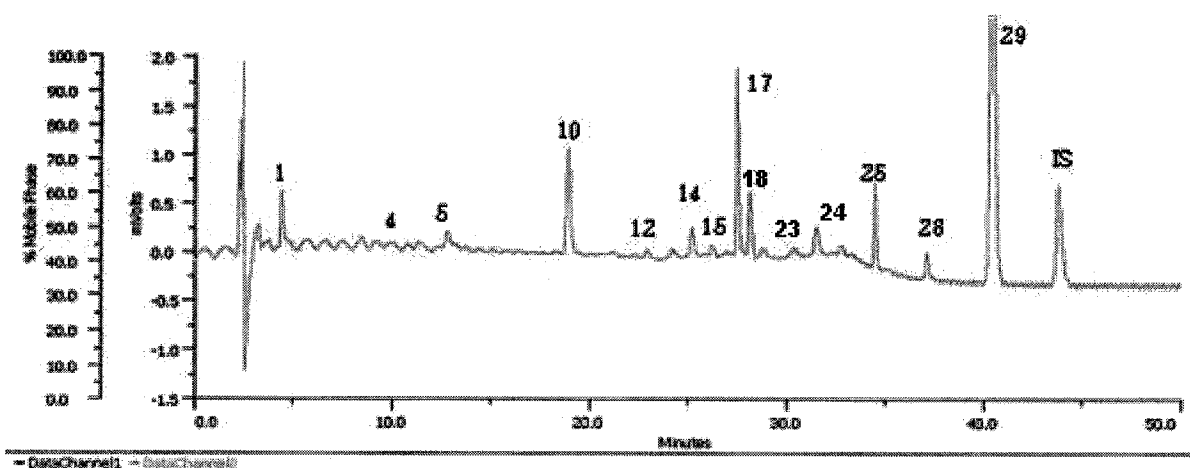


그림 11. 목단피 추출물의 HPLC 크로마토그램

Peak identification: p1-gallic acid, p10-paeoniflorin, p17-galloylpaeniflorin, p18-benzoic acid, p24-quercetin, p25-benzoylpaeniflorin, p28-paeoniflorigenone, p29-paenol, others-not identified

표 15. 통계 분석을 위한 피크의 data coding

	p1	p4	p5	p10	p12	p14	p15	p17	p18	p23	p24	p25	p28	p29	origin
S10	0.107	0.088	0.199	1.326	0.046	0.000	0.000	0.951	0.322	0.023	0.061	0.311	0.073	3.633	1
S11	0.545	0.121	0.190	1.726	0.066	0.121	0.000	1.789	0.475	0.028	0.073	0.385	0.129	5.660	1
S12	0.440	0.043	0.253	0.790	0.071	0.126	0.054	1.113	0.625	0.023	0.088	0.462	0.143	4.625	1
S01	0.326	0.029	0.115	0.744	0.058	0.152	0.065	0.745	0.465	0.065	0.153	0.358	0.158	3.986	2
S02	0.140	0.046	0.150	0.621	0.050	0.109	0.000	0.719	0.325	0.044	0.042	0.102	0.029	4.649	2
S03	0.570	0.131	0.110	0.164	0.046	0.231	0.033	0.720	0.529	0.000	0.000	0.234	0.165	5.324	2
S04	0.291	0.057	0.205	0.977	0.062	0.156	0.112	1.681	0.607	0.072	0.064	0.385	0.078	6.719	2
S05	0.322	0.077	0.158	0.458	0.049	0.240	0.057	0.727	0.585	0.055	0.047	0.320	0.144	5.370	2
S06	0.400	0.000	0.080	0.817	0.050	0.067	0.038	1.269	0.546	0.025	0.050	0.271	0.038	4.406	2
S07	0.242	0.000	0.109	0.127	0.035	0.236	0.000	0.678	0.497	0.024	0.000	0.265	0.201	5.101	2
S08	0.459	0.079	0.078	0.580	0.048	0.271	0.095	1.068	0.500	0.059	0.040	0.320	0.124	4.337	2
S09	0.630	0.000	0.051	0.843	0.051	0.128	0.066	1.133	0.599	0.034	0.049	0.434	0.071	4.463	2
S13	0.329	0.000	0.179	0.679	0.042	0.259	0.089	1.062	0.531	0.054	0.043	0.332	0.136	5.936	2
S14	0.497	0.106	0.205	0.795	0.052	0.382	0.094	0.947	0.694	0.075	0.066	0.421	0.250	5.504	2
S15	0.533	0.101	0.122	0.993	0.051	0.104	0.082	1.018	0.552	0.056	0.062	0.422	0.243	6.224	2
S16	0.629	0.085	0.133	0.582	0.048	0.104	0.068	1.034	0.509	0.027	0.048	0.276	0.036	5.795	2
S17	0.416	0.106	0.110	0.898	0.064	0.179	0.102	1.423	0.652	0.100	0.000	0.473	0.053	5.947	2
S18	0.230	0.052	0.000	1.034	0.068	0.145	0.081	1.236	0.475	0.046	0.111	0.393	0.000	4.556	2
S19	0.875	0.106	0.000	0.947	0.062	0.307	0.198	2.445	0.734	0.075	0.078	0.488	0.000	3.335	2
S20	0.471	0.123	0.000	0.899	0.046	0.126	0.156	1.813	0.394	0.062	0.093	0.739	0.360	5.136	2
J1	2.277	0.789	3.742	59.293	1.188	0.653	1.648	7.769	6.287	0.000	0.000	4.186	0.388	0.232	3
J2	2.210	0.682	3.675	59.018	1.208	0.682	1.572	7.971	6.194	0.000	0.000	4.172	0.332	0.151	3

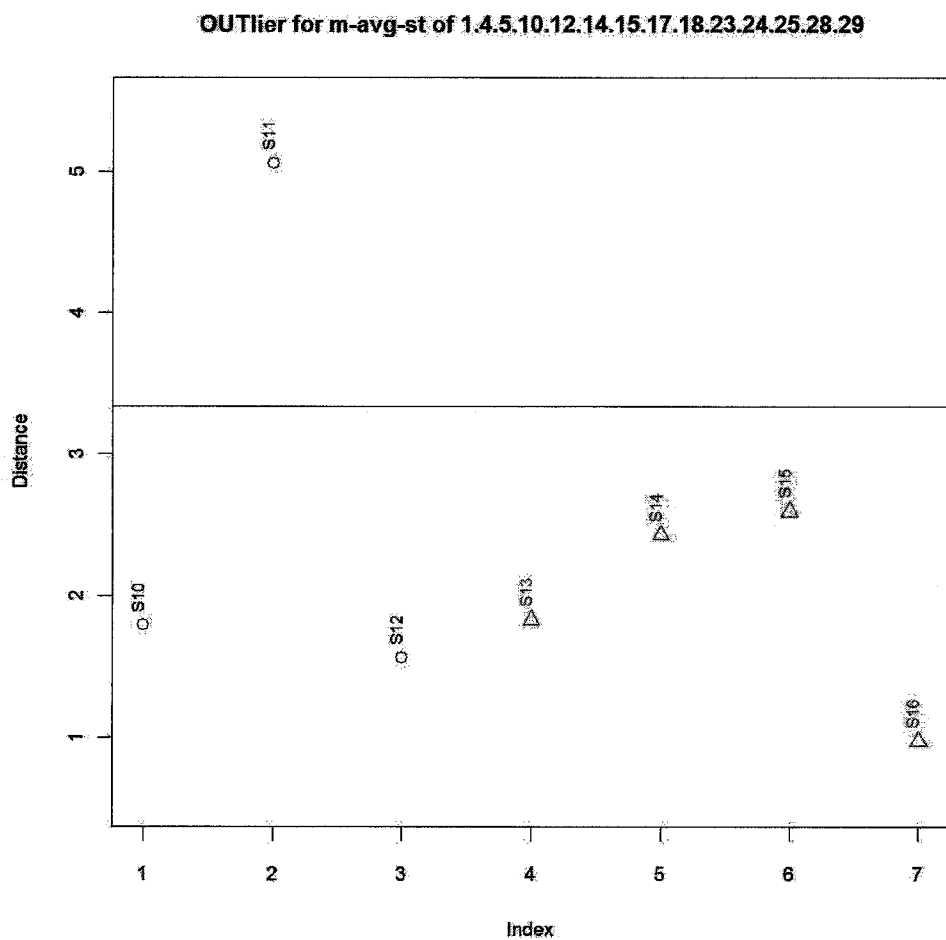
Data were presented as the area ratio of peaks for selected compound and internal standard (bisphenol) from the chromatogram of Moutan Cortex (S01-S20) and Paeoniae Radix (J1, J2). Origin denotes the origin of Moutan Cortex for Korean (1) or Chinese (2). Peak identification: p1-gallic acid, p10-paeoniflorin, p17-galloylpaeoniflorin, p18-benzoic acid, p24-quercetin, p25-benzoylpaeoniflorin, p28-paeoniflorigenone, p29-paeonol, others-not identified.

### 3) 표준품의 평가

사업단에서 제공한 표준품 7개(S10-S16)에 대해 다변량기각검정법, 유사도비교, 군집분석 등의 다양한 기법을 이용하여 평가하였다.

#### ① 다변량기각검정법을 이용한 표준품의 평가

주성분(principal component)에 근거한 거리를 기초로 한 다변량기각검정법을 이용하여 표준품을 평가한 결과 S11 표준품은 다른 시료와는 구별이 되는 것으로 밝혀졌다. 하지만 전체 자료의 수가 7개로 통계적인 유의성은 크지 않을 것으로 판단되었다 (그림 12).



**그림 12. 목단피 시료의 다변량기각검정**  
S10-12; Korean, S13-16; Chinese samples supplied by KFDA

② 유사도(similarity index)측정을 이용한 평가

표준크로마토그램과 표준품의 크로마토그램과의 유사도, 유클리드 거리(d), 코사인(C), 면적비(A), 상관계수(r) 등을 계산하였다. 계산된 표준품 각각의 측정된 유사도를 표 16에 나타내었다. 그 중 S10의 유클리드 거리, 코사인, 면적비, 상관계수는 각각 1.804, 0.984, 0.809, 0.980으로 타 표준품에 비해 유사도가 약간 낮았으나 표준품에서 제외할 정도는 아니라고 생각되었다. 그림으로 표현된 유사도는 아래와 같다 (그림 13).

표 16. 목단피의 유사도 (S10-12; Korean, S13-16; Chinese samples supplied by KFDA)

No.	Distance	Cosine	Area ratio	Correlation
S10	1.804±0.053	0.984±0.001	0.809±0.004	0.98±0.002
S11	1.068±0.154	0.989±0.003	0.897±0.011	0.987±0.004
S12	0.762±0.019	0.998±0	0.925±0.001	0.998±0
S13	0.701±0.085	0.997±0	0.926±0.005	0.997±0
S14	0.464±0.067	0.997±0	0.934±0.012	0.996±0
S15	0.911±0.186	0.998±0	0.928±0.009	0.998±0
S16	0.675±0.097	0.996±0	0.920±0.006	0.995±0

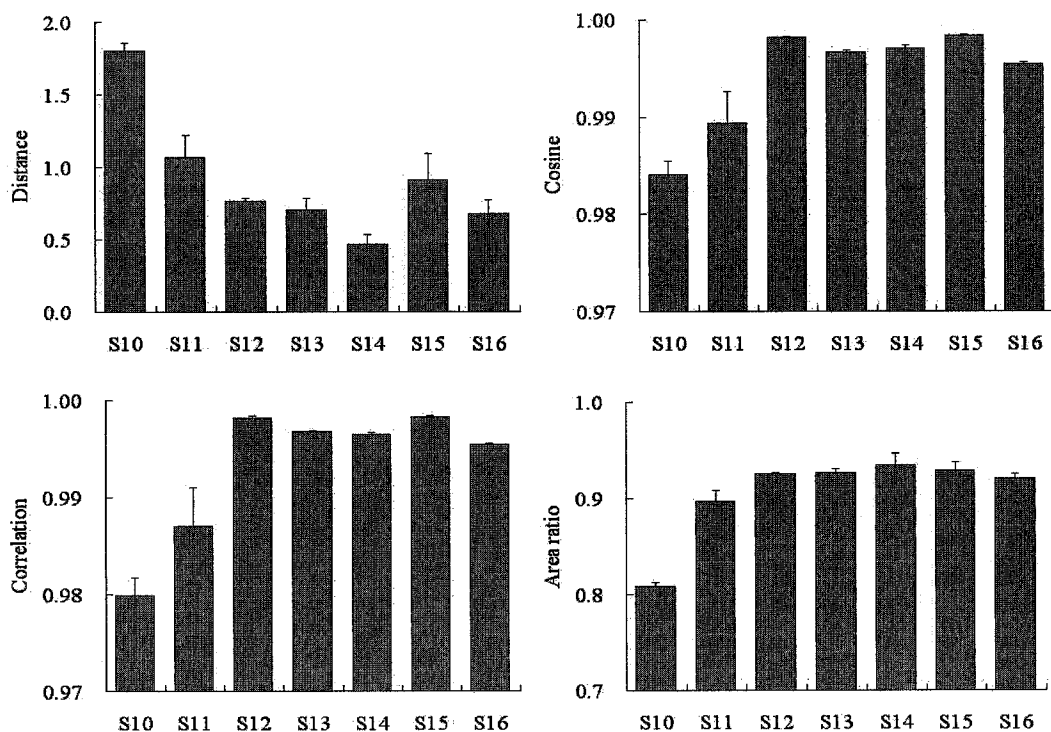
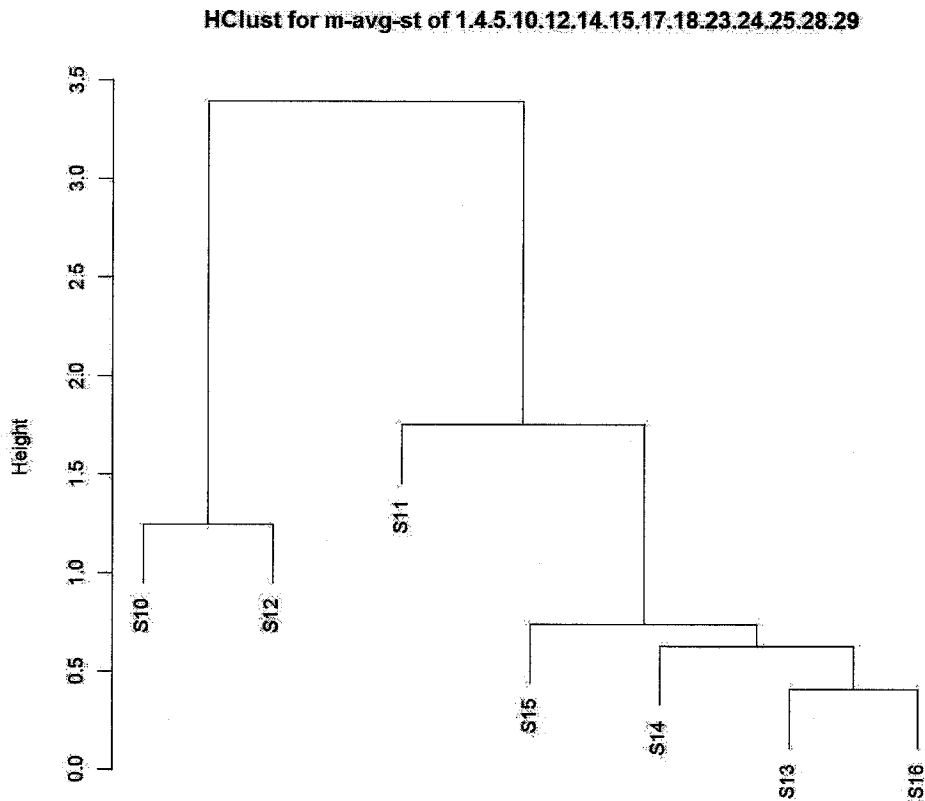


그림 13. 목단피 시료의 거리, 코사인, 상관계수, 면적비

S10-12; Korean, S13-16; Chinese samples supplied by KFDA. Error bars stand for the standard deviation of three measurements

### ③ 계층적 군집방법을 이용한 표준품의 군집분석

사용된 표준품은 국산(S10-12)과 중국산(S13-16)으로 구성된다. 본 방법은 국산과 중국산을 혼합시켜서 군집으로 나누어지는지를 관찰하였다. HClust를 이용하여 군집을 분석하였을 경우 중국산은 대체적으로 하나의 군집을 형성하는 것으로 나타났다. 하지만 군집을 두개로 나눈다면 국산인 S11이 중국산군에 들어가게 되어 성분을 이용한 사업단제공 목단피의 국산, 중국산의 분류는 통계적으로 큰 의미가 없을 것으로 판단되었다 (그림 14).



**그림 14. 목단피 시료의 계층적 군집분석**  
(S10-12; Korean, S13-16; Chinese samples supplied by KFDA)

## 4) 목단피의 표준크로마토그램의 작성

선택된 14개의 피크를 기본으로 하여 표준크로마토그램을 작성하였다. 선택된 14개의 피크에는 목단피의 함량분석에 사용된 paeoniflorin(10번), benzoylpaeoniflorin(25번), paeonol(29번) 등도 포함 시켰다. 표준크로마토그램으로 표준품을 산지별로 따로 구별한 산지별 표준크로마토그램(a, b)과 산지구분을 하지 않은 총표준크로마토그램(c)을 작성하였다(a, b). 시험에 사용된 표준품의 경우 각 산지별 특징이 뚜렷하지 않았기 때문에 진위판정에는 모든 표준품을 합친 총표준크로마토그램을 사용하였다 (그림 15).

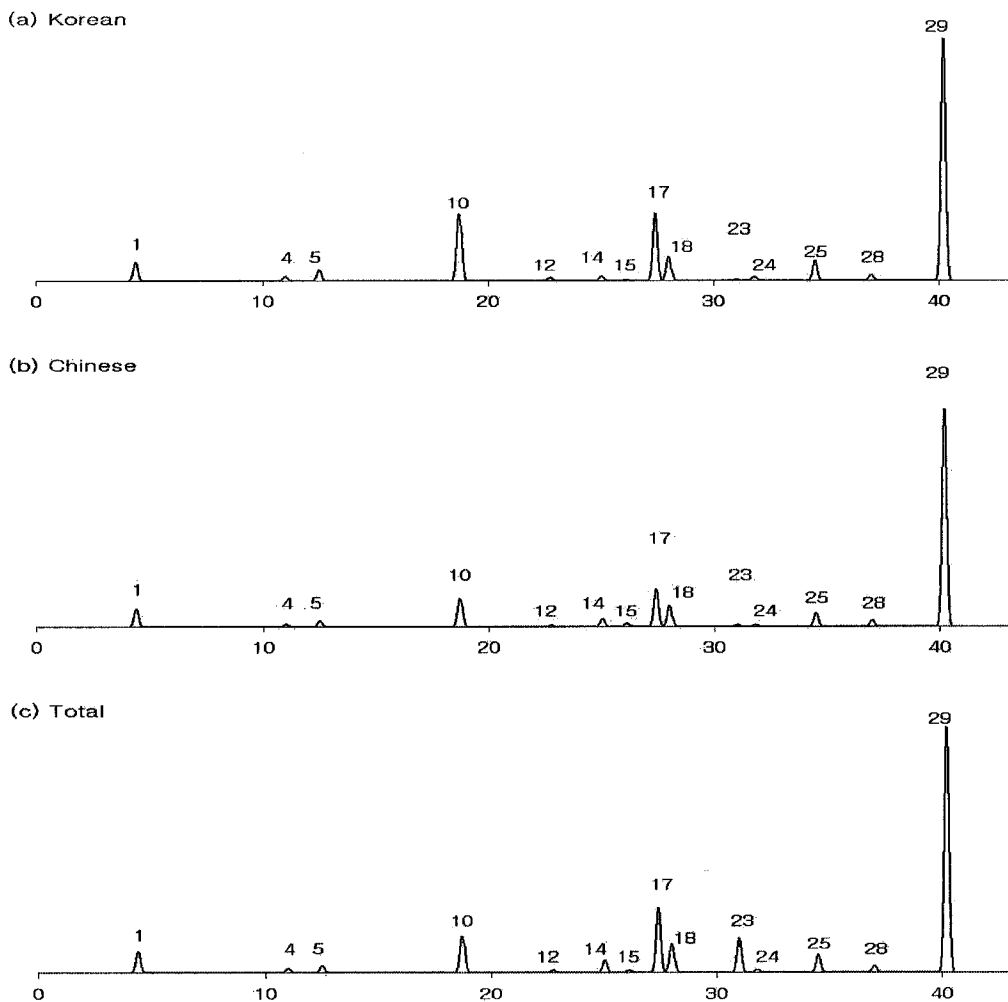


그림 15. 식약청에서 제공받은 목단피의 표준 크로마토그램

(a) Korean samples, (b) Chinese samples and (c) total standards. Peak identification: p1-gallic acid, p10-paeoniflorin, p17-galloylpaeoniflorin, p18-benzoic acid, p24-quercetin, p25-benzoylpaeoniflorin, p28-paeoniflorigenone, p29-paeonol, others-not identified)

## 5) 표준품에 의한 생약의 진위판정

목단피로 인정되는 벨리데이션시료와 HPLC 크로마토그램에서 목단피와 유사성이 있는 작약으로 인정되는 생약시료(J1, J2)를 대상으로 진위판별을 시도하였다. 아래 그림 16에서 보는 바와 같이 목단피와 작약의 크로마토그램은 상당히 유사하다. 진위판정에는 다변량기각검정, 유사도비교, 군집분석 등을 이용하였다.

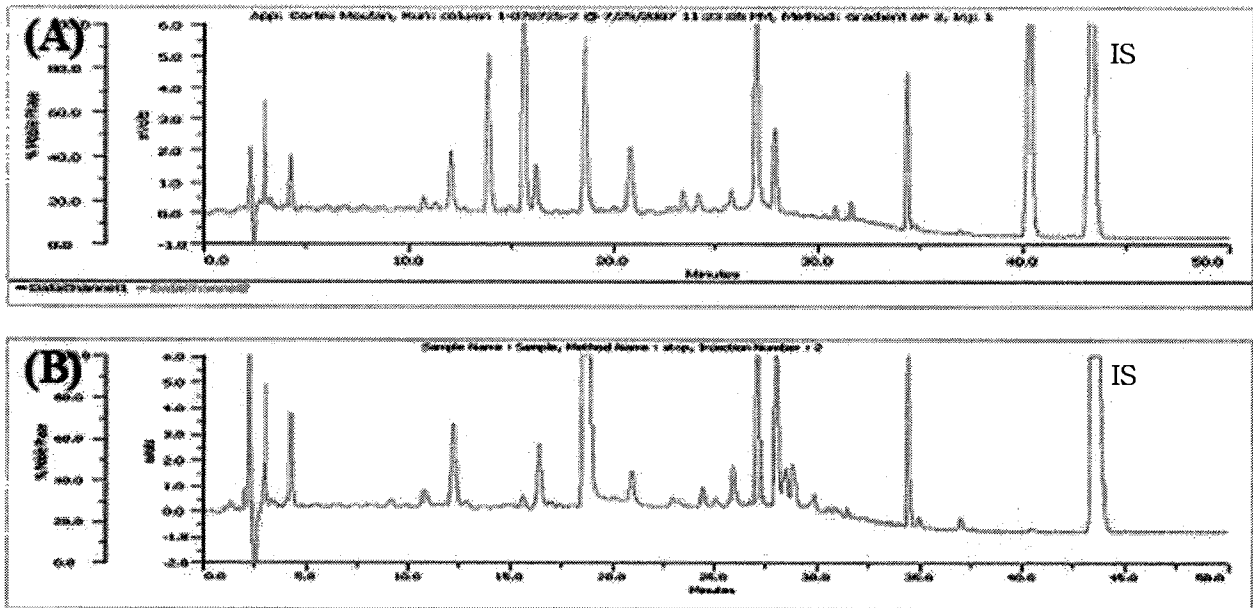


그림 16. 목단피 (A) 및 작약 (B)의 표준 크로마토그램



① 다변량기각검정법을 이용한 진위판정

다변량기각검정법을 이용하여 목단피 시료와 작약시료를 분석하였을 경우 총 작약 시료인 J1, J2 두 개의 시료는 표준품과 상당히 떨어져 있었으므로 위품으로 판정할 수 있었다. 기각된 두 개의 시료는 HPLC 크로마토그램이 목단피와 상당히 유사하였지만 실제로는 작약으로 위품판정이 올바른 것이라고 판단되었다 (그림 17).

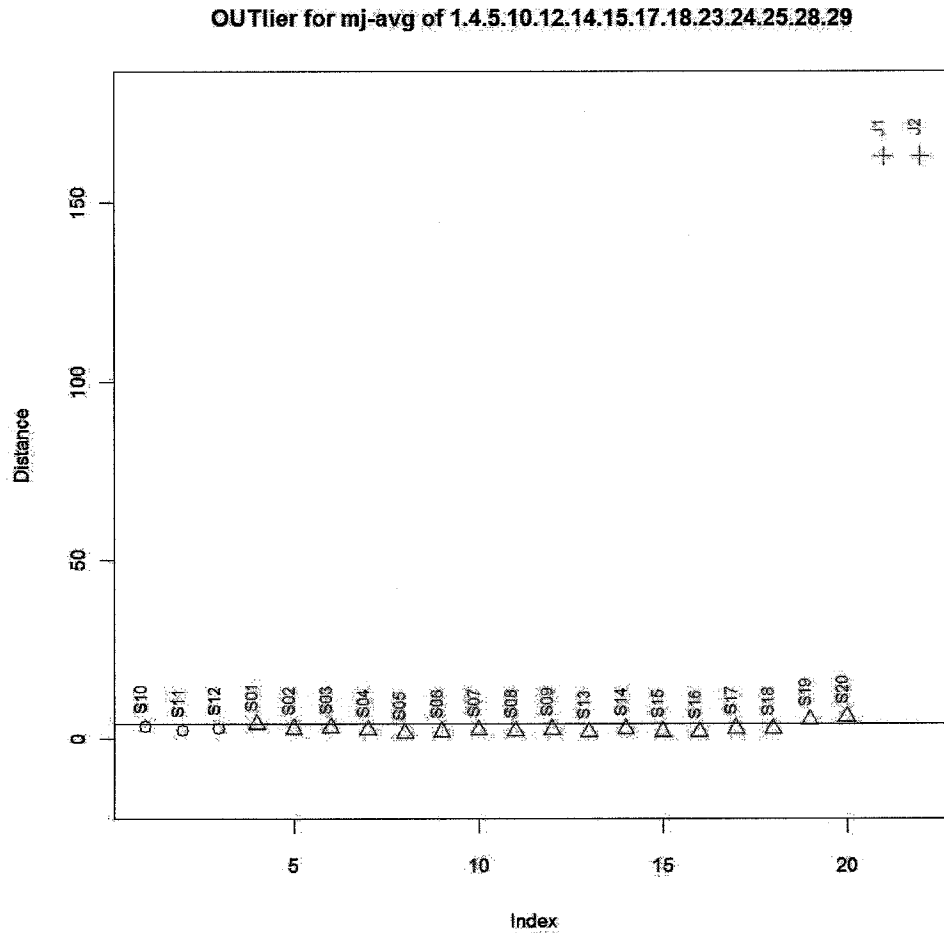


그림 17. 목단피 (circle; korean, triangle; chinese) 및 작약 (cross)의 다변량기각검정

② 유사도(similarity index)측정을 이용한 진위판정

표준크로마토그램과 표준품, 표준크로마토그램과 밸리데이션시료의 유사도를 아래의 표 17에 표시하였다. 시중구입 목단피 밸리데이션 시료는 유사도가 표준품과 거의 비슷하므로 진품으로, J계열 시료는 유사도 떨어지므로 위품으로 판정할 수 있었다. 목단피 중 S19는 유사도가 약간 떨어지지만 J계열의 유사도에 비해서는 양호하고, 다른 판정법의 결과를 고려하여 진품인 목단피로 판정할 수 있었다.

표 17. 목단피 (S)와 작약(J)의 유사도 (Std: average of Moutan Cortex supplied by KFDA)

	Distance	Cosine	Area ratio	Correlation
Std	0.919±0.424	0.994±0.005	0.905±0.043	0.993±0.007
S01	1.442±0.022	0.999±0.000	0.855±0.004	0.999±0.000
S02	1.005±0.108	0.995±0.000	0.846±0.015	0.996±0.000
S03	0.980±0.007	0.986±0.001	0.883±0.009	0.984±0.001
S04	1.500±0.120	0.998±0.000	0.885±0.007	0.997±0.000
S05	0.699±0.026	0.992±0.001	0.922±0.009	0.992±0.001
S06	0.984±0.014	0.997±0.000	0.896±0.003	0.996±0.000
S07	1.039±0.022	0.984±0.000	0.864±0.006	0.985±0.000
S08	1.100±0.093	0.997±0.001	0.891±0.012	0.996±0.001
S09	0.931±0.158	0.997±0.000	0.906±0.011	0.996±0.000
S17	0.725±0.184	0.998±0.000	0.917±0.010	0.998±0.000
S18	0.859±0.174	0.996±0.001	0.906±0.011	0.995±0.001
S19	2.469±0.019	0.905±0.000	0.749±0.001	0.884±0.000
S20	1.033±0.144	0.983±0.005	0.872±0.021	0.980±0.008
J1	59.484±0.000	0.222±0.000	0.089±0.000	0.054±0.000
J2	59.226±0.000	0.221±0.000	0.088±0.000	0.053±0.000

### ③ 계층적 군집방법을 이용한 진위판정

사용된 표준품 및 시료를 사용하여 군집의 수를 정하지 않고 분집분석을 시행하였을 경우 모든 시료는 명백한 두 개의 군집을 형성하는 것을 알 수 있었다. 목단피 시료인 S계열의 시료가 높이 97% 수준에서 한 개의 군을 형성하는 반면 작약 시료인 J계열의 시료는 목단피와 다른 군을 형성하여 위품으로 판정할 수 있었다 (그림 18).

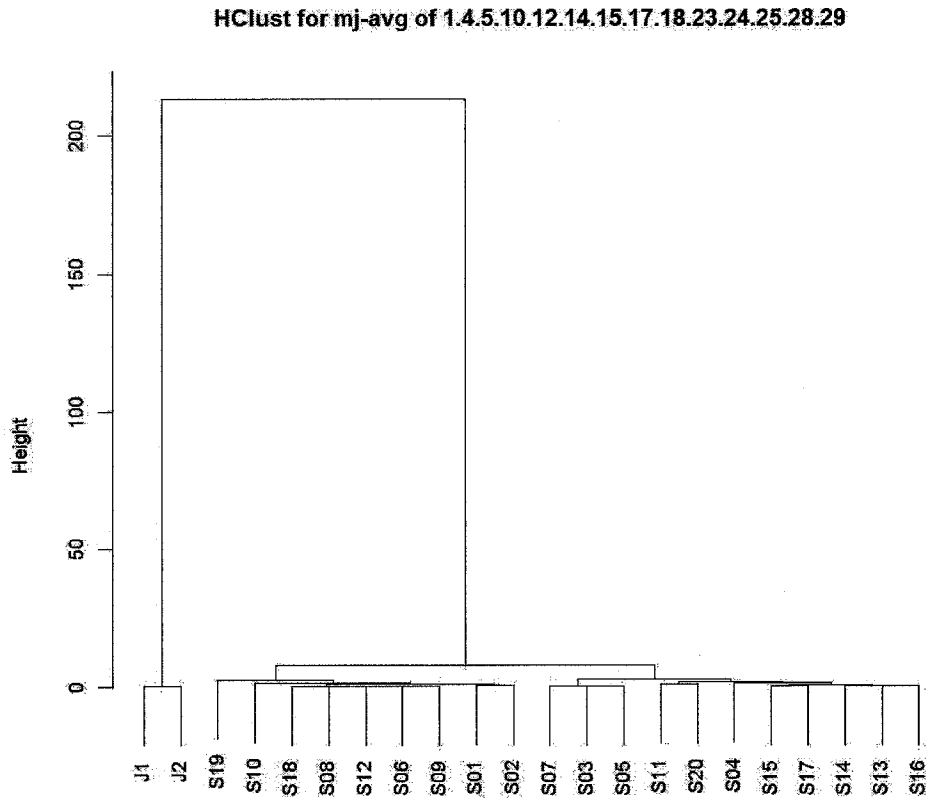


그림 18. 목단피 (S)와 작약 (J)의 계층적 군집분석

④ 비계층적 군집방법을 이용한 진위판정

사용된 표준품 및 밸리데이션시료는 군집의 수를 2로 하여 비계층적 군집분석을 시행하였다. 비계층적 군집분석에서 자료는 평균실루엣 폭 98%로 두 개의 군집으로 뚜렷이 분리되었고, 목단피 시료가 한 개의 군을 형성하였고 J계열의 시료는 목단피와는 다른 군을 형성하여 위품으로 판정할 수 있었다 (그림 19).

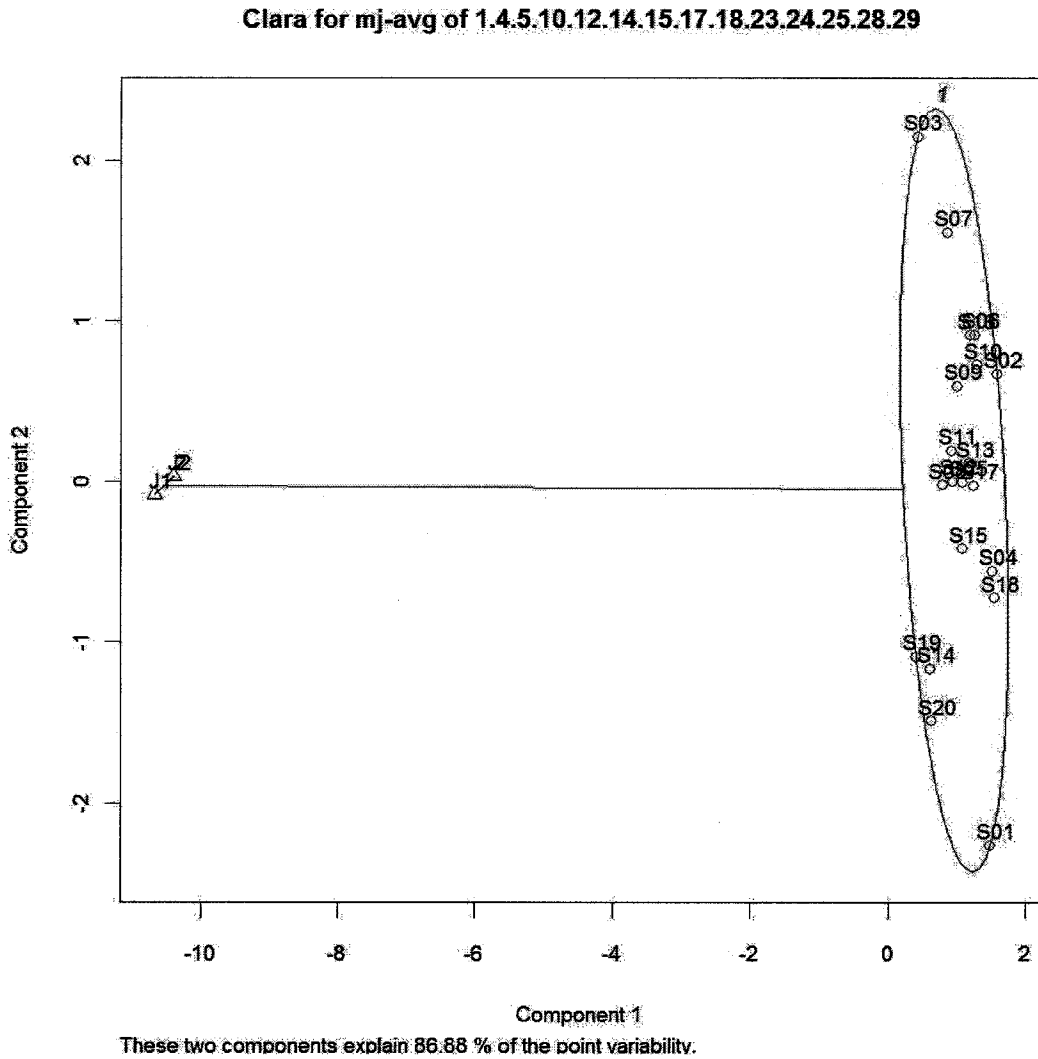


그림 19. 목단피 (S)와 작약 (J)의 비계층적 군집분석

## 6) 목단피의 원산지판정

## ① 자료의 통계분석

목단피 시료의 원산지를 판정하기 위하여 얻어진 각 성분 자료를 분석하여 통계적으로 의미가 있는 성분이 있는지를 파악하였다. 전체시료, 국산, 중국산 각각에 대해 14개 피크성분의 면적비율 범위를 표 12에 정리하였다. 각 성분은 상당히 넓은 범위에 퍼져 있었고, 그 범위에 대한 국산 및 중국산의 특징은 없는 것으로 나타났다. 국산을 중국산과 비교해 볼 때 5번 피크의 경우 P 값이 0.05미만에서, 10번 피크의 경우 0.01미만에서 유의성이 있는 차이를 보였다 (표 18).

표 18. 목단피의 전체시료, 국산, 중국산 시료의 피크성분의 면적비율 범위

All samples														
Peaks	p1	p4	p5	p10	p12	p14	p15	p17	p18	p23	p24	p25	p28	p29
min	0.107	0.000	0.000	0.127	0.035	0.000	0.000	0.678	0.322	0.000	0.000	0.102	0.000	3.335
max	0.875	0.131	0.253	1.726	0.071	0.382	0.198	2.445	0.734	0.100	0.153	0.739	0.360	6.719
mean	0.423	0.068	0.122	0.800	0.053	0.172	0.070	1.179	0.531	0.047	0.058	0.370	0.122	5.035
stdev	0.184	0.044	0.073	0.357	0.009	0.091	0.052	0.456	0.108	0.024	0.037	0.128	0.093	0.889
Korean samples														
Peaks	p1	p4	p5	p10	p12	p14	p15	p17	p18	p23	p24	p25	p28	p29
min	0.107	0.043	0.190	0.790	0.046	0.000	0.000	0.951	0.322	0.023	0.061	0.311	0.073	3.633
max	0.545	0.121	0.253	1.726	0.071	0.126	0.054	1.789	0.625	0.028	0.088	0.462	0.143	5.660
mean	0.364	0.084	0.214*	1.281 <sup>#</sup>	0.061	0.082	0.018	1.284	0.474	0.025	0.074	0.386	0.115	4.639
stdev	0.229	0.039	0.034	0.470	0.013	0.071	0.031	0.444	0.152	0.003	0.014	0.076	0.037	1.014
Chinese samples														
Peaks	p1	p4	p5	p10	p12	p14	p15	p17	p18	p23	p24	p25	p28	p29
min	0.140	0.000	0.000	0.127	0.035	0.067	0.000	0.678	0.325	0.000	0.000	0.102	0.000	3.335
max	0.875	0.131	0.205	1.034	0.068	0.382	0.198	2.445	0.734	0.100	0.153	0.739	0.360	6.719
mean	0.433	0.065	0.106	0.715	0.052	0.188	0.079	1.160	0.541	0.051	0.056	0.367	0.123	5.105
stdev	0.182	0.046	0.066	0.270	0.008	0.086	0.050	0.469	0.102	0.024	0.039	0.136	0.100	0.880

\*  $p < 0.05$  and <sup>#</sup>  $p < 0.01$ , when compared with Chinese samples. Peak identification: p1-gallic acid, p10-paeoniflorin, p17-galloylpaeoniflorin, p18-benzoic acid, p24-quercetin, p25-benzoylpaeoniflorin, p28-paeoniflorigenone, p29-paeonol, others-not identified.

분석 결과를 상자그림으로 표현하였을 경우 p17, p24, p25 등의 피크에서 약간의 이상치가 발견되었다. 국산과 중국산에 대한 자료분포의 유의적인 차이는 p5, p10, p15 등의 피크에서 나타났는데 이것은 국산과 중국산의 평균의 t-test 결과와도 거의 일치하였다 (그림 20).

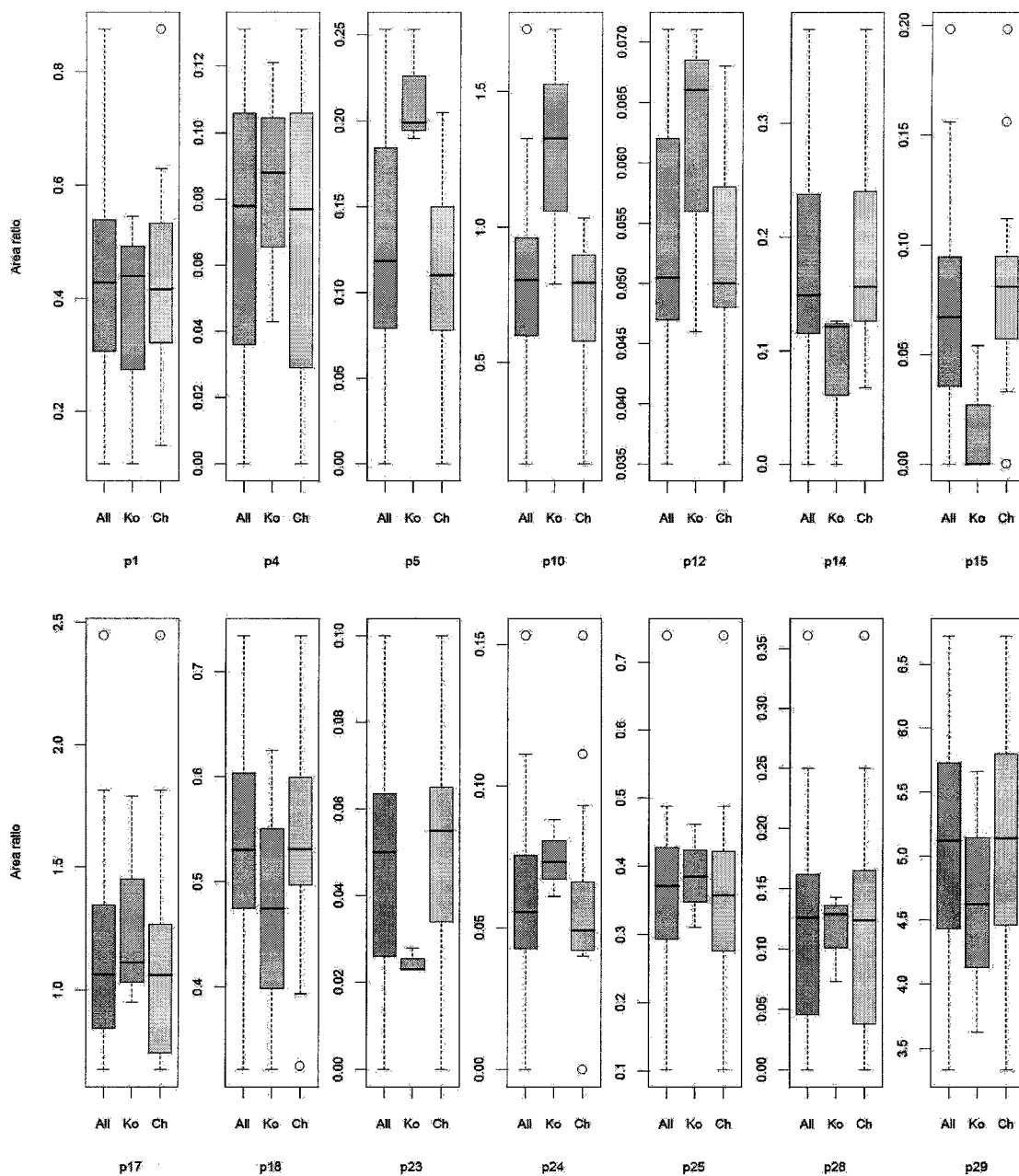


그림 20. 전체시료 (20), 국산 시료 (3), 중국시료 (17) 분석의 상자그림  
Peak identification: p1-gallic acid, p10-paeoniflorin, p17-galloylpaeoniflorin, p18-benzoic acid, p24-quercetin, p25-benzoylpaeoniflorin, p28-paeoniflorigenone, p29-paeonol.

14개의 피크 중에서 p5, PF(paeoniflorin), p14, p15, BPF (benzoyl paeoniflorin), paeonol 등 6개의 피크에 대해서 상관 scatterplot을 관찰하였을 경우 p15와 BPF가 약간의 상관성을 보였고 나머지는 거의 상관성이 없는 것으로 나타났다. 한편, p5 대 PF, p5 대 p15의 plot에서 중국산과 국산의 차이가 가장 두드러지게 나타났다. 현재 목단피의 지표물질로 사용되고 있는 paeoniflorin, benzoylpaeoniflorin, paeonol의 함량은 국산과 중국산을 구분 짓는 데는 크게 효과가 없었다 (그림 21).

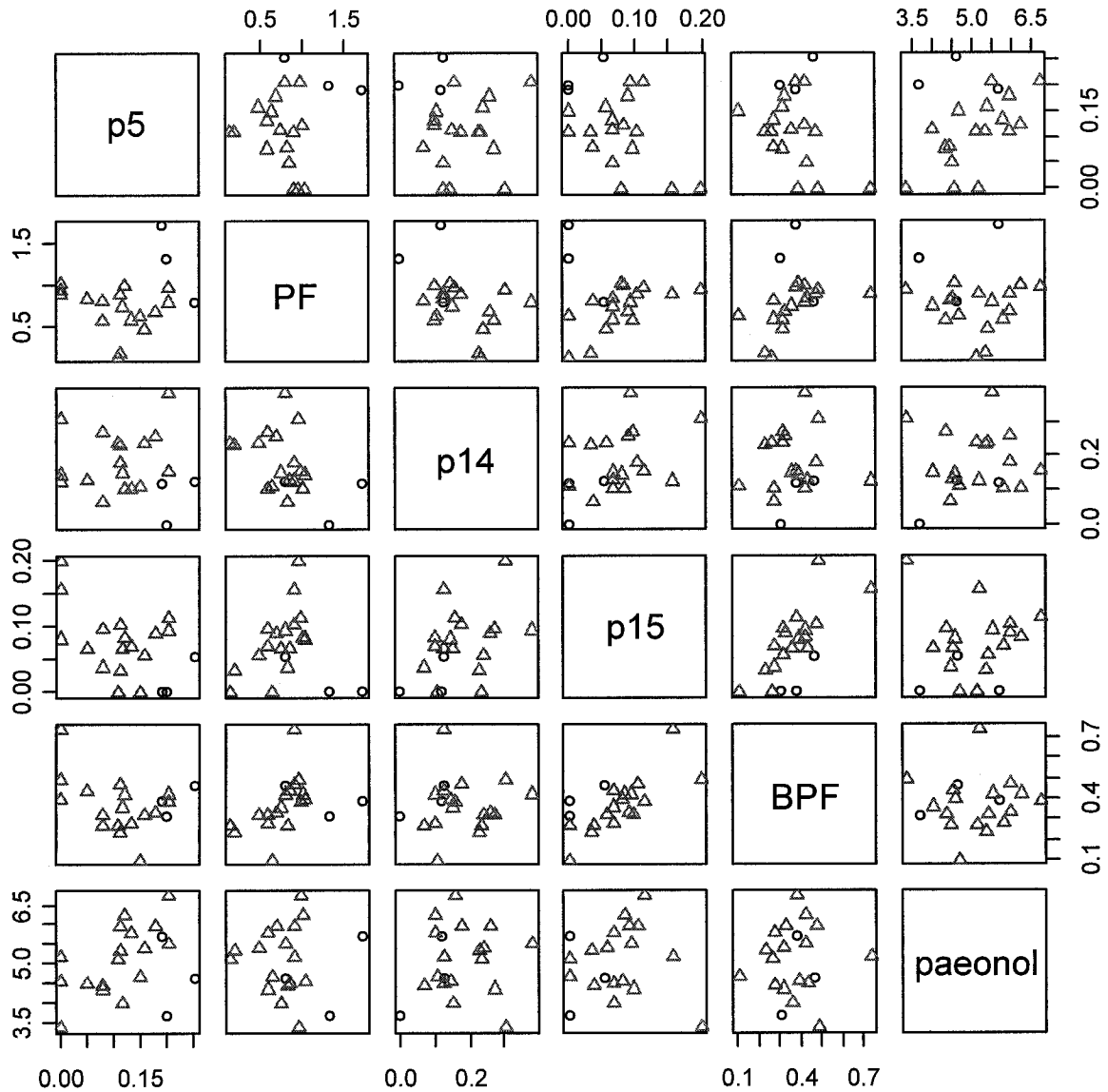


그림 21. p5, PF(paeoniflorin), p14, p15, BPF (benzoyl paeoniflorin), paeonol 피크에 대한 상관 scatterplot

3 Korean samples (○) and 17 Chinese samples (△) of Moutan Cortex

## ② 주성분분석에 의한 원산지판정

주성분분석으로 시료의 분포를 분석하였을 경우 아래의 그림 22와 같이 국산과 중국산의 차이가 뚜렷하지 않았다. 이것은 국산의 시료 개수가 작다는 이유도 있겠지만 목단피의 성분함량에 있어 국산과 중국산의 구별이 거의 없다는 것을 의미한다. 이것은 이미 표준품의 평가에서 관찰한 바와 같이 실험에 사용된 목단피의 표준품은 개수가 작을 뿐 아니라 특히 국산의 경우 그 자료가 매우 넓은 범위에 퍼져있어 하나의 독립된 군집을 형성하기가 어려웠으므로 주성분분석에서도 분석의 어려움이 예측된 바 있다. 목단피 성분의 변량은 국산 중국산을 구분하지 않고 p29 paeonol에 의해 65% 정도가 설명되고, p1 gallic acid, p10 paeoniflorin, p17 galloylpaeniflorin, p25 benzoylpaeniflorin 등에 의해 23% 정도가 설명되어 이들 네가지 성분에 의해 총 88% 정도를 설명할 수 있는 것으로 나타나 목단피에 있어 paeonol, paeoniflorin, benzoylpaeniflorin이 지표물질로 제대로 설정 되었다고 할 수 있다. 하지만 이러한 성분으로도 국산과 중국산을 구별하기는 어려울 것으로 예측되었다.

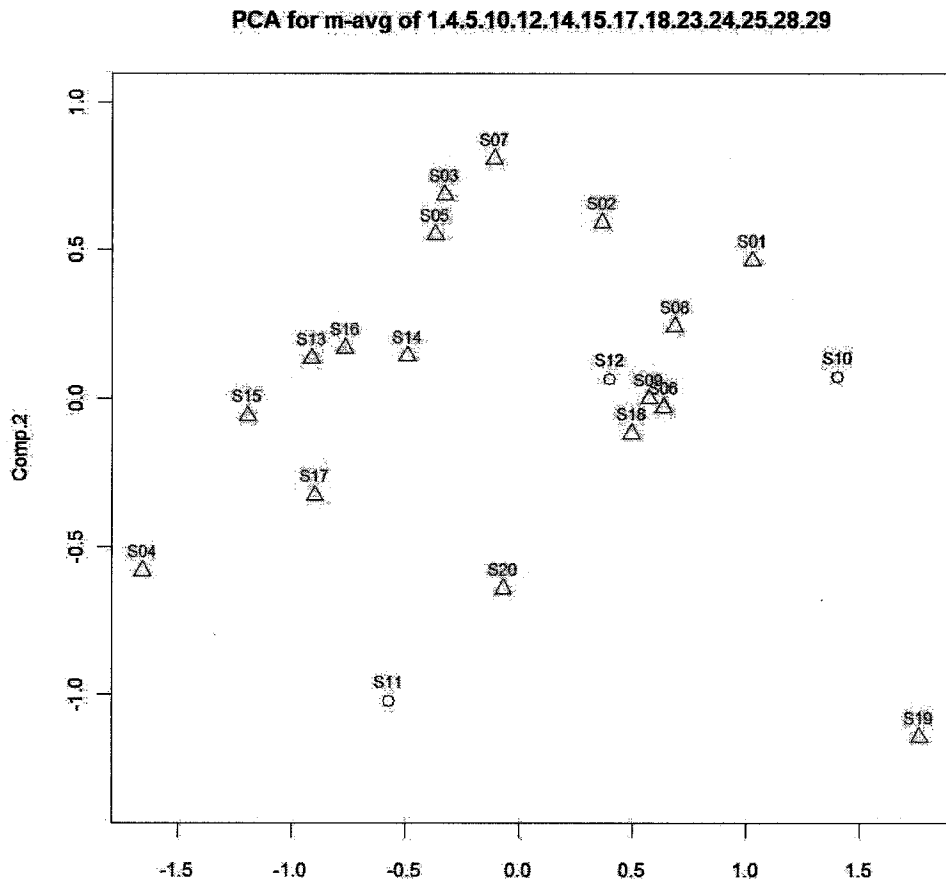


그림 22. 20가지 목단피 시료의 주성분 분석  
Circle: Korean samples, triangle: Chinese samples



### ③ 선정된 피크에 의한 목단피의 패턴분석

Table의 t-test 결과와 상자그림의 결과로부터 국산과 중국산을 구별하는 데 유리할 것으로 인식되는 피크인 p5, p10, p14, p15, p24를 선정하여 주성분 분석을 하였다. 국산 자료의 개수가 3개로 통계적인 유의성이 없기는 하지만 피크의 선정을 달리함으로써 전체 피크를 사용하는 것보다 유리한 결과를 얻을 수 있음을 알 수 있었다 (그림 23).

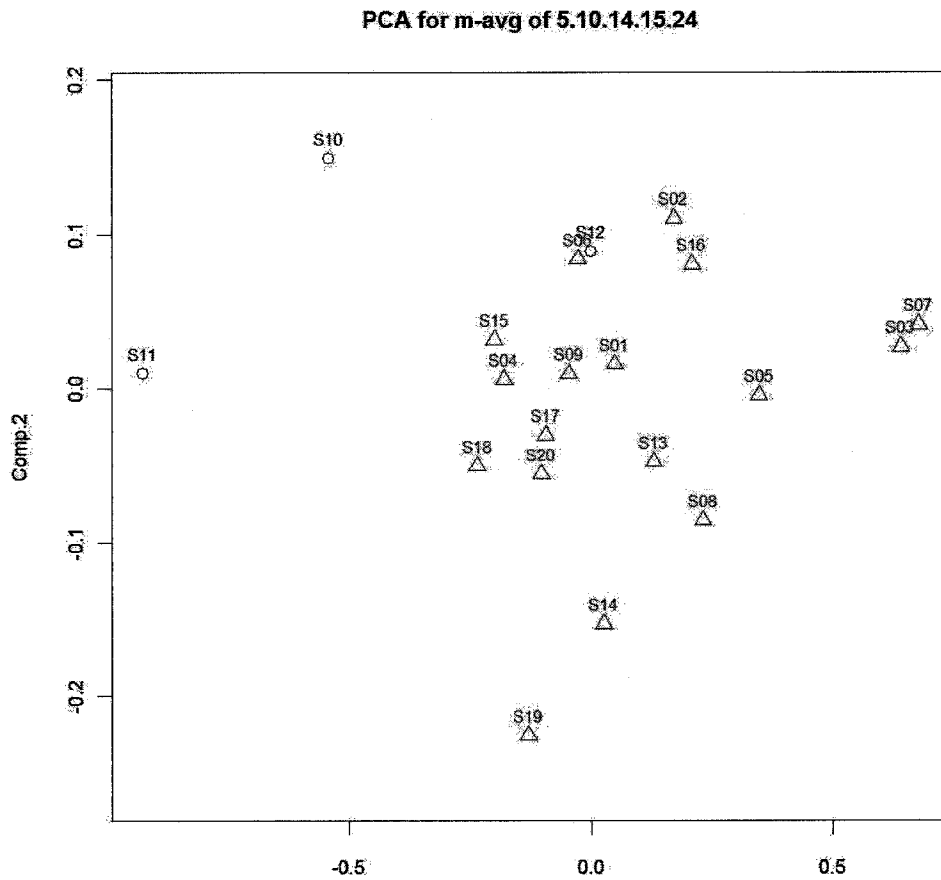


그림 23. 20가지 목단피 시료의 패턴 분석  
Circle: Korean samples, triangle: Chinese samples

## ④ 판별분석에 의한 원산지분석

14개의 피크 중 5개의 피크를 선정하여 판별분석으로 그림 24와 같이 원산지분석을 시도하였다. 판별분석을 실시 한 결과를 이용하여 산지를 추정한 그림에서 볼 때 산지는 제대로 추정되고 있으나 국산의 시료가 3개 밖에 되지 않아 통계적인 신뢰도가 있다고 보기는 어렵다. 이 경우에 있어서도 자료의 개수를 늘여야 할 것으로 판단된다.

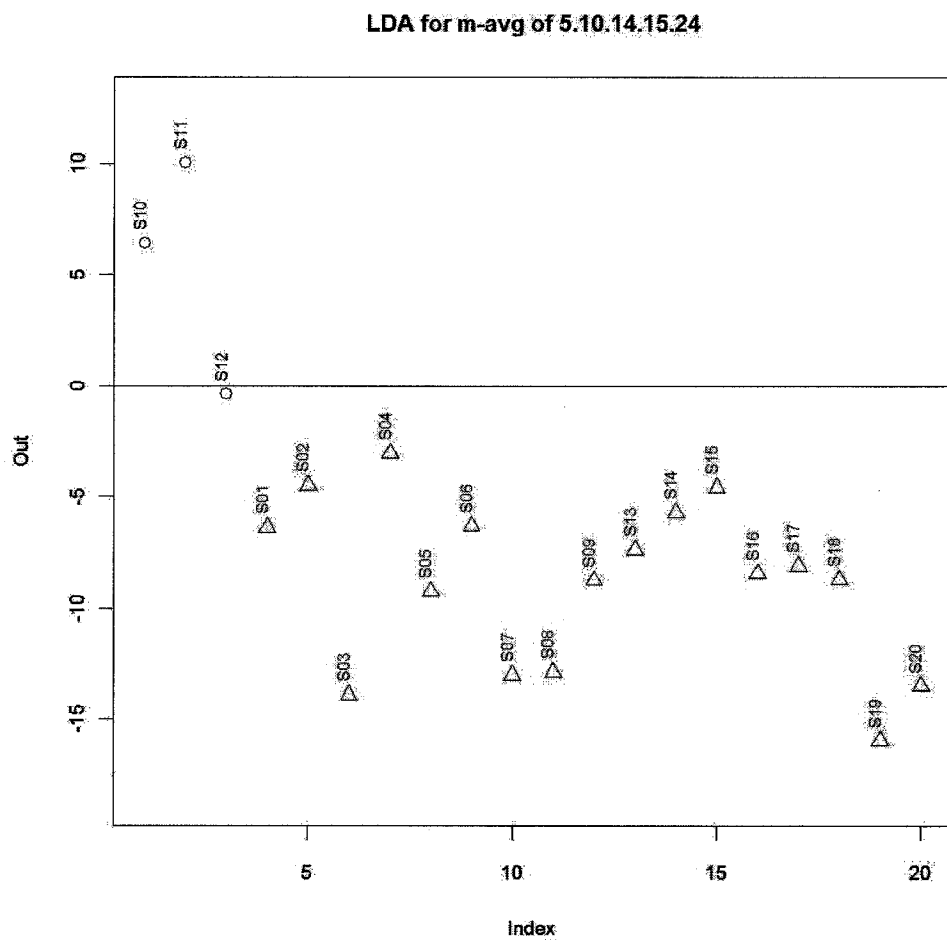


그림 24. 20가지 목단피 시료의 판별 분석  
Circle: Korean samples, triangle: Chinese samples

### 3.2.9 TLC에 의한 목단피 성분의 확인

TLC 방법에 의한 목단피 성분을 확인하기 위하여 지표물질로 선정된 paeonol, paeoniflorin, benzoylpaeoniflorin standard의 혼합물과 시중에서 구입한 목단피 시료 1, 3, 7, 10, 17, 20번의 시료와 TLC를 수행하여 화합물을 비교하였다. Reversed phase TLC에서는 paeonol, paeoniflorin, benzoylpaeoniflorin의 3가지 화합물이 잘 분리가 되었으며, UV254 nm와 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 발색한 결과 명확하게 반점을 확인할 수 있었다. 순상 TLC의 경우는 3가지 화합물이 동시에 분리되기는 어려워 paeoniflorin, benzoylpaeoniflorin을 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O의 조건에서 분석하고 paeonol은 hexane:EtOAc의 조건에서 분석하여 그 결과를 아래 그림 25에 나타내었다.

### TLC Comparison of Moutan Cortex Raccis from different Markets

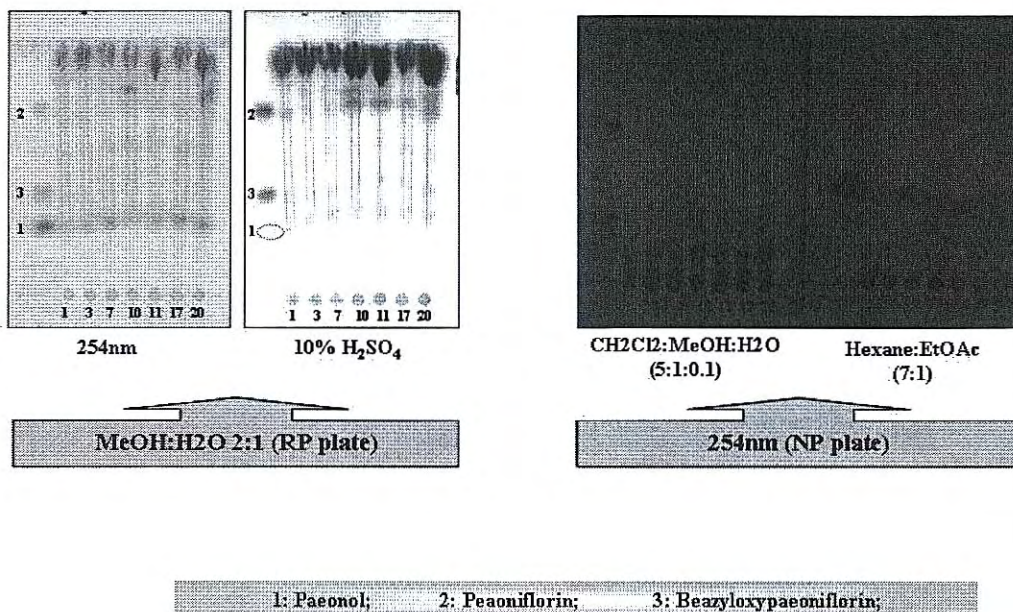
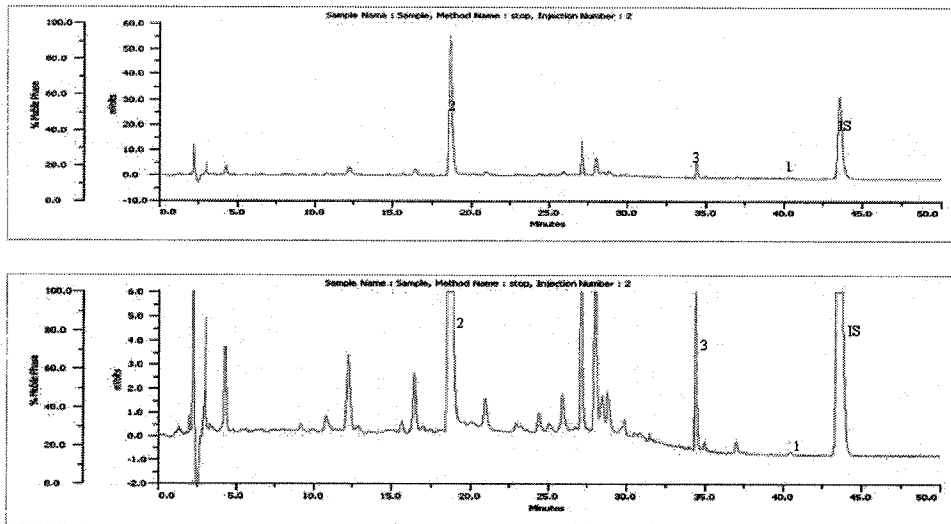


그림 25. 산지에 따른 목단피 성분의 TLC 패턴

### 3.2.10 목단피와 작약의 성분 비교

작약 성분을 HPLC로 분석한 결과, 작약의 경우는 paeoniflorin의 함량이 가장 높고, benzoyl paeoniflorin이 높으며, paeonol의 경우는 목단피에 비하여 상대적으로 낮은 것을 알 수 있었다 (그림 26). 이에 대한 표는 아래와 같다 (표 19). 작약의 70% 에탄올 추출물 속의 정확한 지표성분의 함량 분석을 위해서는 더 많은 작약 시료와의 비교가 요구된다.

#### HPLC chromatogram of 70% EtOH extract of Paeoniae Radix



1: paeonol 2: paeoniflorin 3: beazyloypaeoniflorin IS: Bis phenol

그림 26. 작약의 70% 에탄올 추출물의 HPLC chromatogram

표 19. 작약의 70% 에탄올 추출물 속의 지표 성분 함량

Content (mg/g) of the marker compounds in 70% EtOH extract of Paeoniae Radix

Compounds	Content (mg/g)		
	Mean	SD	RSD (%)
Paeonol	0.26	0.01	0.65
Paeoniflorin	227.23	3.23	1.42
Benzoylpaeoniflorin	9.31	0.00	1.07

### 3.2.11 시료의 감별결과에 따른 패턴분석의 차이

충남대 시료 20개에 대해 염기서열 분석한 결과, 16개 시료는 모두 기원이 확인된 목단과 100% 일치하여 목단의 약재로 확인되었으며, 4개 시료는 2-8bp 차이를 나타내어 98-99%의 유사성을 보였다. 기원이 확실한 16개 시료와 그렇지 않은 4개의 시료를 분리하여 패턴분석 파라미터인 distance, area ratio 및 Paeonol, Paeoniflorin, Benzoylpaeoniflorin 등의 성분함량을 비교한 결과 P 값이 모두 0.1 이상으로 두 그룹의 차이점이 나타나지 않아 20개의 시료 모두가 목단피인 것으로 추정된다 (표 20, 21).

표 20. DNA에 의한 목단피 종감별 및 패턴분석과의 연계성

	충남대 No.	No.	채집장소	Identities	distance	Area Ratio	Paeonol	Paeoniflorin	Benzoylpaeoniflorin
1	S01	□-3-17	중국안국 충남대 약대	<i>Paeonia suffruticosa</i> 99% (5,0)	1.19	0.88	13.8	8.41	2.54
2	S02	□-3-18	중국옥립 충남대 약대	<i>Paeonia suffruticosa</i> 99% (2,0)	0.77	0.87	14.29	6.23	0.96
3	S04	□-3-20	서울제기동 충남대 약대	<i>Paeonia suffruticosa</i> 98% (8,0)	0.69	0.91	14.29	10.53	2.53
4	S18	□-3-34	대전 충남대 약대	<i>Paeonia suffruticosa</i> 99% (4,0)	1.73	0.86	20.51	9.63	2.57
5	S03	□-3-19	서울제기동 충남대 약대	<i>Paeonia suffruticosa</i> 100%	0.57	0.92	18.02	4.2	2.16
6	S05	□-3-21	서울제기동 충남대 약대	<i>Paeonia suffruticosa</i> 100%	0.76	0.92	13.1	8.26	1.63
7	S06	□-3-22	경북경주 충남대 약대	<i>Paeonia suffruticosa</i> 100%	0.83	0.89	15.78	1.36	1.84
8	S07	□-3-23	충남금산 충남대 약대	<i>Paeonia suffruticosa</i> 100%	0.83	0.92	14.44	5.63	2.41
9	S08	□-3-24	충남금산 충남대 약대	<i>Paeonia suffruticosa</i> 100%	0.71	0.92	14.44	8.93	2.94
10	S09	□-3-25	충남금산 충남대 약대	<i>Paeonia suffruticosa</i> 100%	1.64	0.81	11.03	12.89	1.98
11	S10	□-3-26	전남병영 충남대 약대	<i>Paeonia suffruticosa</i> 100%	1.30	0.87	17.07	17.46	2.57
12	S11	□-3-27	전남여수 충남대 약대	<i>Paeonia suffruticosa</i> 100%	0.53	0.94	15.76	8.93	3.27
13	S12	□-3-28	서울 충남대 약대	<i>Paeonia suffruticosa</i> 100%	0.85	0.93	20.15	7.38	2.47
14	S13	□-3-29	경북영천 충남대 약대	<i>Paeonia suffruticosa</i> 100%	0.53	0.93	17.78	8.11	2.92
15	S14	□-3-30	서울 충남대 약대	<i>Paeonia suffruticosa</i> 100%	1.14	0.91	19.44	9.43	2.89
16	S15	□-3-31	중국안국 충남대 약대	<i>Paeonia suffruticosa</i> 100%	0.75	0.92	17.89	5.82	1.89
17	S16	□-3-32	서울 충남대 약대	<i>Paeonia suffruticosa</i> 100%	0.93	0.91	19.2	9.29	3.09

18	S17	□-3-33	대전 충남대 약대	<i>Paeonia suffruticosa</i> 100%	0.79	0.90	16.51	1.68	1.64
19	S19	□-3-35	대전 충남대 약대	<i>Paeonia suffruticosa</i> 100%	2.33	0.75	10.59	9.69	3.1
20	S20	□-3-36	대전 충남대 약대	<i>Paeonia suffruticosa</i> 100%	0.90	0.90	15.17	12.21	4.53

표 21. 감별결과에 따른 분석치의 평균 및 표준편차

Identities	Patten analysis		Contents of components		
	Distance	Area ratio	Paeonol	Paeoniflorin	Benzoylpaeoniflorin
<i>Paeonia suffruticosa</i> <100%	1.10±0.48	0.88±0.02	15.72±3.20	8.70±1.86	2.15±0.79
<i>Paeonia suffruticosa</i> 100%	0.96±0.46	0.90±0.05	16.02±2.82	8.20±4.07	2.58±0.75
P value	0.614	0.578	0.854	0.818	0.322

## 제4장 세부연구개발과제의 연구결과 고찰 및 결론

### 4.1. 계지의 생리활성성분 동시분석

- 1) HPLC 분석조건의 확립: 계지의 생리활성성분인 coumarin, 2-hydroxycinnamaldehyde, cinnamyl alcohol, cinnamic acid, cinnamaldehyde, 2-methoxy cinnamaldehyde, eugenol 등의 7가지 성분을 지표물질로 설정하여, 이들 7개의 성분을 동시에 분석할 수 있는 조건을 확립하였다. 내부 표준물질로는 retention time과 분리능을 고려하여 bisphenol로 선정하였다.
- 2) 계지 성분의 추출조건: 계지의 지표성분 분석을 위한 최적 추출조건을 70 % MeOH로 설정하였다.
- 3) 계지 성분의 추출방법: 계지의 지표성분 추출방법 중에서는 sonication 방법이 가장 유용한 방법으로 결정하였다.
- 4) 계지 성분의 추출시간: 가장 양호한 추출시간은 60 분 추출의 경우가 지표성분의 함량이 가장 높은 결과를 얻었다.
- 5) 계지 성분의 추출횟수: 추출횟수는 1회 50 ml 로 추출하는 것이 함량의 큰 차이 없이 편리하였다.
- 6) HPLC 분석을 위한 이동상 용매는 gradient condition으로 설정하였다. [0-5 min, A (90 %); 5-20 min, A (90-80 %); 20-40 min, A (80-60 %); 40-60 min, A (60-0 %); 60-65 min, A (0-100 %), 65-70 min, A (100-90 %) (A: 0.01 % phosphoric acid in water, B: acetonitrile)]
- 7) HPLC 분석조건의 validation을 위하여 정확성, 정밀성, 일내 및 일간 재현성, 직선성, 정량범위, 검출 한계, 정량한계, 완전성 등을 조사하였다.
- 8) 표준품의 안정성 시험을 수행하여 계지의 지표성분은 30일 동안 유의성 있는 함량변화를 나타내지 않았다.
- 9) 계지의 지표성분은 설정한 HPLC 조건에서 coumarin (S1, 24.86분), 2-hydroxyl cinnamaldehyde (S2, 25.45분), cinnamyl alcohol (S3, 26.97분), cinnamic acid (S4, 28.84분), cinnamaldehyde (S5, 31.03분), 2-methoxy cinnamaldehyde (S6, 33.39분), eugenol (S7, 34.43분), bisphenol은 35.61분의 양호한 분리

능을 나타내었다.

10) LC-DAD-MS에 의하여 계지의 성분을 확인하였다.

11) 계지 시료의 HPLC 분석: 사업단과 전국 각지에서 구입한 32개의 계지 시료와 24개의 계피시료를 확보하고, coumarin, 2-hydroxycinnamaldehyde, cinnamyl alcohol, cinnamic acid, cinnamaldehyde, 2-methoxy cinnamaldehyde, eugenol의 함량을 분석하였다.

12) 패턴인식법에 의한 계지, 계피의 평가

- ① 계지, 계피 시료에 대한 coumarin, 2-hydroxycinnamaldehyde, cinnamyl alcohol, cinnamic acid, cinnamaldehyde, 2-methoxy cinnamaldehyde, eugenol의 함량은 상당히 넓은 범위에 퍼져 있었다. 계지에서는 cinnamic acid, 2-methoxy cinnamaldehyde, eugenol의 함량이, 계피에서는 coumarin, 2-hydroxycinnamaldehyde, cinnamyl alcohol, cinnamaldehyde의 함량이 높은 것으로 나타났다.
- ② 계지, 계피 시료 7개의 성분에 대해서 지역별 차이보다는 품목별 차이가 더 컸으며, 계지, 계피에 있어 산지의 차이가 거의 없다는 것이 파악되었다.
- ③ 유클리드 거리, 면적비, 코사인, 상관계수 각각에 대해 계지를 계피로, 또는 계피를 계지로 분류할 수 있는 오분류 확률은 각각 7.1%, 8.9%, 32.1%, 37.5%로 나타나, 표준계지와 시료와의 유사성 척도로 거리나 면적비를 사용하는 것이 효율적일 것으로 판단되었다.
- ④ 성분함량을 기초한 계층적 군집방법에서는 56개의 시료가 크게 두 개의 군집으로 나누어졌다. 제1군집은 35개의 시료로 계지가 주로 포함되었고, 제2군집은 나머지 21개의 계피시료로 구성되었다.
- ⑤ 주성분분석에서 comp.1은 전체변량의 약 97%를 comp.2는 약 3%를 설명하는 것으로 나타났다. 주성분분석에 의한 군집 분류에는 주로 성분 cinnamaldehyde 및 eugenol 함량의 영향이 큰 것으로 나타났다.
- ⑥ 판별식을 이용하였을 경우 계지, 계피 시료는 약 98%의 정확성을 보였다. 판별식을 이용하여 계지계피의 원산지분석을 실시하였을 경우 약 76%의 낮은 정확성을 보여 판별식을 이용한 원산지 감별이 큰 의미가 없을 것으로 판단되었다.

13) TLC 방법에 의한 계지의 성분 확인: 계지의 지표성분인 cinnamaldehyde와 coumarin의 분리를 위하여 순상 TLC plate에서 hexane : ethylacetate (5:1)의 용매에서 전개하여 각각의 반점을 UV 254, 360 nm에서 확인하고 다시 2,4-dinitrophenylhydrazine 시약으로 발색하여 각각의 반점을 확인하였다.

14) 시료의 DNA 감별결과에 따른 패턴분석의 차이: 제공된 22개의 계지시료의 감별결과 *C. cassia*가 2개, *C. sieboldii*가 20로 나타났다. 각 시료의 패턴분석 파라미터인 distance, area ratio 및 coumarin, 2-hydroxyl cinnamaldehyde, cinnamylalcohol, cinnamic acid, cinnamaldehyde,



2-methoxycinnamaldehyde, eugenol 등의 성분함량을 비교한 결과 P 값이 모두 0.1 이상으로 *C. cassia*와 *C. sieboldii*사이에는 유의한 차이가 보이지 않았다.

## 4.2. 목단피의 생리활성성분 동시분석

- 1) HPLC 분석조건의 확립: 목단피의 생리활성성분인 paeonol, paeoniflorin, benzoyl paeoniflorin을 지표 물질로 설정하고 이들 3종 화합물의 분석조건을 설정하였다. 내부 표준물질로는 retention time을 고려하여 bisphenol로 선정하였다.
- 2) 목단피 성분의 추출조건: 목단피의 지표성분인 paeonol, paeoniflorin, benzoyl paeoniflorin의 분석을 위한 최적 추출조건을 70 % EtOH로 설정하였다.
- 3) 목단피 성분의 추출방법: 목단피의 지표성분 추출방법 중에서는 sonication 방법이 가장 유용한 방법으로 결정하였다.
- 4) 목단피 성분의 추출시간: 가장 양호한 추출시간은 60 분 추출의 경우가 지표성분의 함량이 가장 높은 결과를 얻었다.
- 5) 목단피 성분의 추출횟수: 목단피의 지표성분인 paeonol, paeoniflorin, benzoyl paeoniflorin을 sonication으로 추출할 경우 가장 양호한 추출횟수는 1회 50 ml 로 추출하는 것이 가장 편리하였다.
- 6) HPLC 분석을 위한 이동상 용매는 gradient condition으로서 0-20 min, A (10-20%); 20-30 min, A (20-40%); 30-50 min, A (40%); 50-60 min, A (40-100%); 60-70 min, A (100-10%); 70-80 min, A (10%)의 조건으로 분석하는 것이 가장 양호한 분석능을 나타내었다 (A: acetonitrile, B: 0.05% formic acid in water).
- 7) HPLC 분석조건의 validation을 위하여 정확성, 정밀성, 일내 및 일간 재현성, 직선성, 정량범위, 검출한계, 정량한계, 완전성 등을 조사하였다.
- 8) 표준품의 안정성 시험을 수행하여 목단피의 지표성분은 15일 동안 유의성 있는 함량변화를 나타내지 않았다.

9) 목단피의 지표성분은 설정한 HPLC 조건에서 paeonol (S1, 40.66분), paeoniflorin (S2, 18.96분), benzoyl paeoniflorin (S3, 34.47분)은 양호한 분리능을 나타내었고, 그 외에 gallic acid는 4.40분에서, (+)-catechin은 14.25분에서, galloyl paeoniflorin은 26.08분에서, 내부표준물질로 사용한 bisphenol은 43.82분에서 분리되었다.

10) LC-DAD-MS에 의하여 목단피의 성분을 확인한 결과 지표물질로 사용된 paeonol, paeoniflorin, benzoylpaeoniflorin 이외에 gallic acid, catechin, methylgallate, galloylpaeoniflorin, benzoic acid, quercetin, paeoniflorigenone, kaempferol, paeonol 등도 확인되었다.

11) 목단피 시료의 HPLC 분석: 시중에서 20개의 시료를 구입하고, paeonol, paeoniflorin, benzoyl paeoniflorin의 함량을 분석하였다.

12) 패턴인식법에 의한 목단피의 기원별 산지별 분석

① 표준품의 평가: 사업단에서 제공한 표준품 7개(S10-S16)에 대해 다변량기각검정법, 유사도비교, 군집분석 등의 다양한 기법을 이용하여 평가한 결과 목단피의 국산, 중국산의 분류는 통계적으로 큰 의미가 없는 것으로 판단되었다.

② 목단피와 작약시료의 HPLC 크로마토그램을 다변량기각검정, 유사도비교, 군집분석 등을 수행한 결과 목단피와 작약은 확연히 구별되는 것을 알 수 있었다.

③ 목단피 시료에 대한 판별분석으로 국산과 중국산의 구별은 가능하나 국산 시료의 수가 너무 적어 통계적으로 신뢰도는 높지않을 것으로 판단된다.

13) TLC 방법에 의한 목단피의 성분 확인: 목단피의 지표성분인 paeonol, paeoniflorin, benzoylpaeoniflorin의 분리를 위하여 역상 TLC (MeOH : H<sub>2</sub>O = 2 : 1, UV254 nm, 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 와 순상 TLC의 조건을 확립하였다 [paeoniflorin, benzoylpaeoniflorin → CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O (5:1:0.1), paeonol → hexane:EtOAc (7:1)].

14) 목단피와 작약의 성분을 HPLC로 비교 분석한 결과 작약의 경우는 paeoniflorin의 함량이 가장 높고, benzoyl paeoniflorin이 높으며, paeonol의 경우는 목단피에 비하여 상대적으로 낮은 것을 알 수 있었다.

15) 시료의 DNA 감별결과에 따른 패턴분석의 차이: 제공된 20개의 시료의 감별결과 16개 시료는 모두 기원이 확인된 목단과 100% 일치하여 목단의 약재로 확인되었으며, 4개 시료는 2-8bp 차이를 나타내어 98-99%의 유사성을 보였다. 기원이 확실한 16개 시료와 그렇지 않은 4개의 시료를 분리하여 패턴분석 파라미터인 distance, area ratio 및 Paeonol, Paeoniflorin, Benzoylpaeoniflorin 등의 성분함량을 비교한

결과 P 값이 모두 0.1 이상으로 두 그룹의 차이점이 나타나지 않아 20개의 시료 모두가 목단피인 것으로 추정된다.

## 제5장 제2 세부연구개발과제의 연구성과

## 5.1 활용성과

총괄과제명	
총괄과제책임자	박경래 / 충남대학교 / 천연물화학

## 가. 연구논문

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

## 나. 학술발표

번호	발표제목	발표형태	발표자	학회명	연월일	발표지	국내/국제
1	Quality evaluation of Moutan Cortex Radicis by HPLC.	포스터	딩안, 오은기 원후통 박상혁 닌수언 범 량춘 강종성 박경래 배기환 김영호	한국생약학회	2007.11	서울	국내
2	Pattern analysis of Cortex Moutan by HPLC-DAD-MS	포스터	오은기 딩안 김영호 강종성	대한약학회	2008.4.30	제주	국내
3	Quality evaluation of Ramulus Cinnamomi by HPLC.	포스터	딩안 오은기 량춘 강종성 박경래 배기환 김영호	충남대 국제심포지 움	2008.10.3 0	대전	국내

## 다. 지식재산권

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

## 라. 정책활용

※ 기타 관련정책에 활용 예를 구체적으로 기술함.

- 본 연구과제에서 설정된 목단피와 계지의 지표성분 분석조건과 validation 등은 대한약전 또는 약전의 한약(생약)규격집의 확인시험이나 정량법에 활용될 수 있음.
- 본 연구과제에서 수행된 패턴인식법에 의한 결과 등은 한약재의 진위판정 및 원산지의 판정에 활용될 수 있음. 특히 목단피와 작약의 구별, 계지와 계피의 구별, 중국산과 베트남산의 구별에 활용될 수 있음.

## 마. 타연구/차기연구에 활용

※ 타연구 및 차기연구에 활용된 예를 구체적으로 기술함.

- 본 연구에서 수행된 HPLC 분석기술, MS에 의한 동정기술, validation 기술, 패턴인식분석기술 등은 생약(한약) 관련된 타연구나 차기의 한약재 과학화 사업 등에 활용될 수 있음.

## 바. 언론홍보 및 대국민교육

※ 언론홍보 및 대국민교육 내용, 일자 등을 간략히 기술함.

## 사. 기타

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

### **R 패키지를 이용한 생약패턴분석 워크샵**

일시: 2008년 6월 25일 8:30-20:00

장소: 충남대학교 약학대학 1층 삼남홀

주최: 충남대학교의약품개발연구소

강사: 김주한 (충남대 통계학과), 강종성(충남대 약학과), 이은주(충남대 의약품개발연구소)

## 5.2 활용계획

- 본 연구결과는 대한약전이나 약전의 한약(생약)규격집의 확인시험이나 정량법의 개정이나 보완 등에 활용한다
- 과제에서 설정된 목단피와 계지의 지표성분 분석조건과 validation 등은 한약재의 표준화와 품질평가에 활용한다
- 본 연구과제에서 수행된 패턴인식법에 의한 결과 등은 한약재의 진위판정 및 원산지의 판정에 활용한다.
- HPLC 분석에 의한 패턴인식으로 목단피와 작약의 구별에 활용한다
- HPLC 분석과 패턴인식법에 의하여 계지와 계피의 구별에 활용할 수 있으며, 중국산과 베트남산의 구별에 활용한다.
- 본 연구에서 수행된 HPLC 분석기술, MS에 의한 동정기술, validation 기술, 패턴인식분석기술 등은 생약(한약) 관련된 타연구나 차기의 한약재 과학화 사업등에 활용한다.

## 제6장 기타 중요변경사항

- 처음 선정 시와 비교하여 변경된 내용을 명시  
없음

## 제7장 참고문헌

- 1) Ishida, H., Takamatsu M., Tsuji K., Kosuge T., Studies on active substances in herb susedforoketsu("stagnant blood") in Chinese medicine; on the anticoagulative principle in Paeoniae Radix. *Chem. Pharm. Bull.*, **35**, 849-52 (1987).
- 2) Kim S. H., Kim S. A., Park M. K., Kim S. H., Park Y. D., Na H. J., Kim H. M., Shin M. K., Ahn K. S., *Int. J. Immunopharmacol.*, **4**, 279-287(2004).
- 3) Kwon, O. G., Kim, S. H., Chun, B. Y., Park, C. K., and Son, K. H., Isolation of antimicrobial components from Moutan cortex. *Kor. J. Pharmacogn.*, **30**, 340-344 (1999).
- 4) Shinichi T., Tamaki M., Tetsuya A., Li X., Toshiaki M., Seiji I., *Neurosci.Lett.*, **370**, 130-134 (2004).
- 5) Yoshikawa M., Uchida E., Kawaguchi A., Kitagawa I., Yamahara J., Galloyl-oxypaeoniflorin, suffruticosides A, B, C, and D, five new antioxidative glycosides, and suffruticoside E, a paeonolglycoside, from Chinese Moutan cortex. *Chem. Pharm. Bull.*, **40**, 2248-250 (1992).
- 6) Chen, Q., Zhao, J., Vittayapadung, S., Identification of the green tea grade level using electronic tongue and pattern recognition. *Food Res. Int.*, **41**, 500 (2008).
- 7) Alcazar, A., Ballesteros, O., Jurado, J. M., Pablos, F., Martin, M. J., Vilches, J. L., Navalon, A., Differentiation of Green, White, Black, Oolong, and Pu-erh Teas According to Their Free Amino Acids Content. *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 5960 (2007).
- 8) Chen, Q., Zhao, J., Zhang, H., Liu, M., Fang, M., Qualitative identification of tea by near infrared spectroscopy based on soft independent modelling of class analogy pattern recognition. *J. Near Infrared Spectroscopy*, **13**, 327 (2005).
- 9) Yang, J., Chen, L., Zhang, Q., Lai, M., Wang, Q., Quality assessment of Cortex cinnamomi by HPLC chemical fingerprint, principle component analysis and cluster analysis. *J. Sep. Sci.*, **30**(9), 1276-1283 (2007).
- 10) He, Z. Qiao, C. Han, Q. Cheng, C. Xu, H. Jiang, R. But, P. P. Shaw, P., Authentication and quantitative analysis on the chemical profile of cassia bark (cortex cinnamomi) by high-pressure liquid chromatography. *J. Agricult. Food Chem.*, **53**(7), 2424-2428 (2005).
- 11) Gong, F. Liang, Y. Fung, Y. Chau, F., Correction of retention time shifts for chromatographic fingerprints of herbal medicines. *J. Chromatogr. A.*, **1029**(1-2), 173-183(2004).
- 12) Xie, Y. Jiang, Z. Zhou, H. Cai, X. Wong, Y. Liu, Z. Bian, Z. Xu, H. Liu, L., Combinative method using HPLC quantitative and qualitative analyses for quality consistency assessment of a herbal medicinal preparation. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **43**(1), 204-212 (2007).

- 13) He, Q. Ge, Z. Song, Y. Cheng, Y., Quality evaluation of cortex moutan by high performance liquid chromatography coupled with diode array detector and electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Chem. Pharm. Bull.*, **54**(9), 1271-1275 (2006).
- 14) Xie, P. Chen, S. Liang, Y. Wang, X. Tian, R. Upton, R., Chromatographic fingerprint analysis—a rational approach for quality assessment of traditional Chinese herbal medicine. *J. Chromatogr. A.*, **1112**(1-2), 171-180(2006).

## 제8장 첨부서류

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



편집순서 8 : 연구과제요약

### 총괄 연구과제 요약

과제번호	08182한약재257		공개가능여부	비공개
단위과제명	한약재 생리활성성분 분리 및 분석 연구			
과제명	한약재의 생리활성성분 분리 및 분석연구 (계지, 목단피)			
연구책임자	성명	배기환	주민등록번호 (앞번호만 기재)	
	소속 기관명	충남대학교		
	전자우편		전화번호	

#### ○ 연구목표 (400~600자)

- 한약재의 유효성분 중심의 관리를 위하여 한약재(목단피, 계지) 생리활성성분 분리(각 10종 이상) 및 연구용 시료를 제공하여 분리된 성분들의 패턴 인식법에 의한 기원별, 산지별 한약재 정부를 구축하고자 한다.
- 목단피와 계지의 생리활성성분 분석에 관하여 HPLC-UV 및 LC/MS를 활용한 분석법 개발.
- 목단피와 계지의 생리 활성 물질의 HPLC-UV 및 LC/MS 분석법의 과학적 validation 법의 확립 : 직선성, 정량범위, 정확성, 정밀성, 검출한계, 정량한계, 완전성, 안정성 등을 실시.
- 목단피와 계지의 지표물질에 대한 동시 다 성분 분석법 확립.
- 패턴인식법에 의한 기원별, 산지별 분석

## ○ 연구내용 (1000~1200자)

계지 및 목단피 시료를 확보하여 에탄올을 가하여 80℃에서 3회 환류 추출하고 여과한 후 에탄올 엑스를 얻은 후, 에탄올 엑스를 증류수 2 리터에 현탁시킨 후 hexane, EtOAc 및 BuOH로 순차적으로 분획하였다. 각 분획물들을 농축하여 hexane 분획물, EtOAc 분획물, BuOH 분획물 및 H<sub>2</sub>O 분획물을 얻은 후 각각의 분획들에 대해 각종 chromatography를 반복 실시하여 생리활성성분을 분리하였다. 분리한 화합물들의 구조는 각종 분광학적 방법과 문헌과의 비교를 통하여 결정하였다.

계지로부터 coumarin, 2-hydroxycinnamaldehyde, cinnamyl alcohol, cinnamic acid, cinnamaldehyde, 2-methoxy cinnamaldehyde, eugenol 등의 7개의 주성분과 목단피로부터 paeonol, paeoniflorin, benzoyl paeoniflorin 등의 3개의 주성분을 확보하고, 계지와 목단피로부터 생리활성이 검증된 물질을 각각 10개 이상 확보하여 HPLC로 그 순도를 측정 후 생리활성성분 분석팀 및 효능확인연구팀에 연구용으로 제공하였다.

계지의 생리활성성분인 coumarin, 2-hydroxycinnamaldehyde, cinnamyl alcohol, cinnamic acid, cinnamaldehyde, 2-methoxy cinnamaldehyde, eugenol 등의 7개의 화합물을 지표물질로 설정하고 이들 7종의 화합물의 HPLC 분석조건을 설정하였다. validation을 위하여 정확성, 정밀성, 일내 및 일간 재현성, 직선성, 정량범위, 검출한계, 정량한계, 완전성, 안정성 등을 조사하였으며, 시중에서 32개의 계지시료와 24개의 계피 시료를 구입하여 주요성분의 함량을 분석하였다. 분석결과를 패턴인식법에 의한 기원별 산지별 분석을 수행하였으며, 계지와 계피 성분을 비교 분석하였다. TLC에 의하여 계지의 성분을 확인하였으며, 이를 MS에 의하여 각 주요성분의 분자량을 확인하였다.

목단피의 생리활성성분인 paeonol, paeoniflorin, benzoyl paeoniflorin을 지표물질로 설정하고 이들 3종 화합물의 HPLC 분석조건을 설정하였다. validation을 위하여 정확성, 정밀성, 일내 및 일간 재현성, 직선성, 정량범위, 검출한계, 정량한계, 완전성, 안정성 등을 조사하였으며, 시중에서 20개의 시료를 구입하여 주요성분의 함량을 분석하였다. 분석결과를 패턴인식법에 의한 목단피의 기원별 산지별 분석을 수행하였으며, 목단피와 작약 성분을 비교 분석하였다. TLC에 의하여 목단피의 성분을 확인하였으며, 이를 MS에 의하여 각 주요성분의 분자량을 확인하였다.

## ○ 연구성과(응용분야 및 활용범위포함) (400~600자)

계지로부터 5종의 신물질인 cassiferaldehyde, cinnacassine, icaraside DC, dihydrocinnacasside, cinnacasside와 22종의 알려진 화합물 cinnamaldehyde, eugenol, 2-methoxycinnamaldehyde, coumarin,  $\beta$ -sitosterol, 2-hydroxy cinnamaldehyde, cinnamic acid, coniferaldehyde, cinnamic alcohol, 4-hydroxy benzoic acid, syringaldehyde, daucosterol, amygdalactone, eugenol glucopyranoside, *o*-coumaric acid, rosavin, (+)-lyoniresinol-3a-O- $\beta$ -D-glucopyroanosied, (-)-lyoniresinol-3a-O- $\beta$ -D-glucopyroanosied, dihydromelilotoside, (+)-lyoniresinol, (-)-lyoniresinol, methyl dihydromelilotoside 등 총 27종의 생리활성성분을 분리하였다. 목단피로부터는 2종의 신물질인 4-*O-n*-butylpaeniflorin, 5-hydroxy-3-hydroxymethylene-6-methyl-2,3-dihydrobenzofuran와 25종의 알려진 화합물인 paeonol,  $\beta$ -sitosterol, ursolic acid, betulinic acid, daucosterol, benzoic acid, oleanolic acid, Palbinone, apiopaeonoside, paeonoside, 6-methoxypaeoniflotrigenone, methylgallate, benzoylpaeniflorin, kaempferol, paeoniflorin,  $\alpha$ -benzoyloxypaeoniflorin,  $\beta$ -benzoyloxypaeoniflorin, galloylpaeniflorin, (+)-catechin, gallic acid, peanolide, paeoniflorigenone, 30-norhederagenin, oxypaenifloria, mudanpinoside H등 총 27종의 생리활성성분을 분리하였다. 분리된 주요 화합물 및 주성분들을 바탕으로 시중에 유통되고 있는 한약재 및 한약제제의 품질관리 및 검사에 활용될 수 있으리라 기대된다.

계지와 목단피의 생리활성성분 동시분석에 관한 연구를 수행하여, 계지와 목단피의 생리 활성 물질의 HPLC-UV 조건을 설정하였다. HPLC 조건의 validation을 위하여 설정한 조건의 직선성, 정량범위, 정확성, 정밀성, 검출한계, 정량한계, 완전성, 안정성 등을 조사하였다. 또한 계지의 경우는 coumarin, 2-hydroxycinnamaldehyde, cinnamyl alcohol, cinnamic acid, cinnamaldehyde, 2-methoxy cinnamaldehyde, eugenol 등의 7개의 지표물질에 대한 동시분석법을 개발하였고, 목단피에 대하여는 paeonol, paeoniflorin, benzoyl paeoniflorin등의 3종의 지표물질에 대한 동시 다 성분 분석법을 확립하였다. 각각의 HPLC 분석결과를 패턴인식법에 의하여 분석하여 기원별, 산지별 분석을 수행하였으며, TLC와 LC/MS 분석 등을 통하여 주요성분을 확인하였다. 이러한 결과는 대한약전 또는 약전의 한약(생약)규격집의 확인시험이나 정량법에 활용될 수 있으며, 패턴인식법에 의한 결과 등은 한약재의 진위판정 및 원산지의 판정에 활용될 수 있다.

## ○ 총괄 참여연구원

성 명	주민등록번호(앞번호만 기재)	성 명	주민등록번호(앞번호만 기재)
배기환		박순혜	
김홍진		취에수언취	
진전성		이규선	
이익수		정명수	
잔민덕		진윤서	
도티하			
임남희			
박경래			
김영호			
강중성			
덩안			
오은기			
박상혁			
원후통			

<b>Keywords</b> (5개 내외)	<b>한글</b>	계지, 목단피, 생리활성 성분 분리, 밸리데이션, 패턴인식
	<b>영문</b>	Ramulus Cinnamomi, Moutan Cortex Radicis, Isolation of bioactive components, Validation, Pattern Analysis

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

## 세부 연구과제 요약

과제번호	08182한약재257	공개가능여부	비공개
단위과제명	한약재 생리활성성분 분리 및 분석 연구		
제1세부과제명	계지 및 목단피의 생리활성 성분 분리		
연구책임자	성명	배기환	주민등록번호 (앞번호만 기재)
	소속 기관명	충남대학교	
	전자우편		전화번호

### ○ 연구목표 (400~600자)

목단피는 모란 *Paeonia suffruticosa*의 뿌리껍질이다. 우리나라를 비롯하여 중국과 일본 모두 기원이 동일하나 후박의 경우는 다양하다. 우리나라를 비롯하여 중국과 일본에서 유통되는 목단피는 그 기원식물이 동일하고 실제로 시장에 유통되는 한약재의 형태와 품질이 거의 일정하다. 하지만 재배환경 및 채취시기에 따라 유효성분의 함량이 다를 수 있으므로 이화학적으로 검토가 필요하다. 계지는 *Cinnamomum cassia*의 작은가지가 대부분이거나 변종인 *var. macrophyll*의 작은가지도 유통되고 있다고 한다 (초배근, 중약지, 2002년, 북경). 이화학적 방법으로 품질이 안정하게 공급되고 있는지 검토한 뒤 표준 재료로 이용하고자 한다.

따라서, 본 연구에서는 한약재의 유효성분 중심의 관리를 위하여 한약재(목단피, 계지)의 생리활성성분 분리(각 10종 이상) 및 연구용 시료를 제공, 유효성분 정량용 표준품을 제조, 분리된 성분들의 패턴인식법에 의한 기원별, 산지별 한약재 정부를 구축하고자 한다.

## ○ 연구내용 (1000~1200자)

### 가. 계지 및 목단피로부터 생리활성물질 분리

계지 및 목단피 시료를 확보하여 에탄올을 가하여 80℃에서 3회 환류 추출한 후 여과하였다. 여과액을 40~45℃에서 감압 농축하여 에탄올 엑스를 얻은 후, 에탄올 엑스를 증류수 2 리터에 현탁시킨 후 hexane, EtOAc 및 BuOH로 순차적으로 분획한 후 각 분획물들을 농축하여 hexane 분획물, EtOAc 분획물, BuOH 분획물 및 H<sub>2</sub>O 분획물을 얻었다. 각각의 분획들에 대해 각종 chromatography를 반복 실시하여 생리활성성분을 분리하였다. 분리한 화합물들의 구조는 각종 분광학적 방법과 문헌과의 비교를 통하여 결정하였다.

### 나. 계지 및 목단피의 70% 에탄올 엑스 제조

일정량의 계지의 가는 가지와 목단피의 뿌리껍질에 각각 에탄올 (700 ml)와 물 (300 ml)의 혼합용매를 가하여 80 °C에서 2번 환류 추출한 후 여과하였다. 여과액을 40~45 °C에서 감압 농축하여 계지와 목단피의 70% 에탄올 엑스를 각각 얻었다.

### 다. 효능확인 연구를 위한 생리활성성분 대량 제조

생리활성성분 분석팀 및 효능확인연구팀에 연구용으로 제공하기 위하여 계지 및 목단피로부터 각각 3종 이상의 주성분과 생리활성이 검증된 물질을 10개 이상 확보하여 HPLC로 그 순도를 측정한 후 생리활성성분 분석팀 및 효능확인연구팀에 연구용으로 제공하였다.

## ○ 연구성과(응용분야 및 활용범위포함) (400~600자)

계지로부터 5종의 신물질인 cassiferaldehyde, cinnacassine, icariside DC, dihydrocinnacasside, cinnacasside와 22종의 알려진 화합물 cinnamaldehyde, eugenol, 2-methoxycinnamaldehyde, coumarin,  $\beta$ -sitosterol, 2-hydroxy cinnamaldehyde, cinnamic acid, coniferaldehyde, cinnamic alcohol, 4-hydroxy benzoic acid, syringaldehyde, daucosterol, amygdalactone, eugenol glucopyranoside, *o*-coumaric acid, rosavin, (+)-lyoniresinol-3a-O- $\beta$ -D-glucopyroanosied, (-)-lyoniresinol-3a-O- $\beta$ -D-glucopyroanosied, dihydromelilotoside, (+)-lyoniresinol, (-)-lyoniresinol, methyl dihydromelilotoside 등 총 27종의 생리활성성분을 분리하였다. 목단피로부터는 2종의 신물질인 4-*O-n*-butylpaeniflorin, 5-hydroxy-3-hydroxymethylene-6-methyl-2,3-dihydrobenzofuran와 25종의 알려진 화합물인 paeonol,  $\beta$ -sitosterol, ursolic acid, betulinic acid, daucosterol, benzoic acid, oleanolic acid, Palbinone, apiopaenoside, paeonoside, 6-methoxypaeoniflotrigenone, methylgallate, benzoylpaeniflorin, kaempferol, paeoniflorin,  $\alpha$ -benzoyloxypaeoniflorin,  $\beta$ -benzoyloxypaeoniflorin, galloylpaeniflorin, (+)-catechin, gallic acid, peanolide, paeoniflorigenone, 30-norhederagenin, oxypaenifloria, mudanpinoside H 등 총 27종의 생리활성성분을 분리하였다. 분리된 주요 화합물 및 주성분들을 바탕으로 시중에 유통되고 있는 한약재 및 한약제제의 품질관리 및 검사에 활용될 수 있으리라 기대된다.

## ○ 참여연구원

성 명	주민등록번호(앞번호만 기재)	성 명	주민등록번호(앞번호만 기재)
배기환			
김홍진			
진전성			
이익수			
잔민덕			
도티하			
임남희			

<b>Keywords</b> (5개 내외)	<b>한글</b>	계지, 목단피, 생리활성 성분 분리
	<b>영문</b>	Ramulus Cinnamomi, Moutan Cortex Radicis, Isolation of bioactive components

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



## 세부 연구과제 요약

과제번호	07092한약재326	공개가능여부	비공개
단위과제명	목단피 및 계지의 생리활성 성분 분리 및 분석 연구		
제2 세부과제명	계지, 목단피의 생리활성성분 동시분석		
연구책임자	성 명	박경래	주민등록번호 (앞번호만 기재)
	소속 기관명	충남대학교 약학대학	
	전자우편		전화번호

### ○ 연구목표 (400~600자)

<ol style="list-style-type: none"> <li>1) 목단피와 계지의 생리활성성분 분석에 관하여 HPLC-UV 및 LC/MS를 활용한 분석법 개발.</li> <li>2) 목단피와 계지의 생리 활성 물질의 HPLC-UV 및 LC/MS 분석법의 과학적 validation 법의 확립 :직선성, 정량범위, 정확성, 정밀성, 검출한계, 정량한계, 완전성, 안정성 등을 실시.</li> <li>3) 목단피와 계지의 지표물질에 대한 동시 다 성분 분석법 확립.</li> <li>4) 패턴인식법에 의한 기원별, 산지별 분석</li> </ol>
--

## ○ 연구내용 (1000~1200자)

- 1) 계지의 생리활성성분 동시분석: 계지의 생리활성성분인 coumarin, 2-hydroxycinnamaldehyde, cinnamyl alcohol, cinnamic acid, cinnamaldehyde, 2-methoxy cinnamaldehyde, eugenol 등의 7개의 화합물을 지표물질로 설정하고 이들 7종의 화합물의 HPLC 분석조건을 설정하였다. validation을 위하여 정확성, 정밀성, 일내 및 일간 재현성, 직선성, 정량범위, 검출한계, 정량한계, 완건성, 안정성 등을 조사하였으며, 시중에서 32개의 계지시료와 24개의 계피 시료를 구입하여 주요성분의 함량을 분석하였다. 분석결과를 패턴인식법에 의한 기원별 산지별 분석을 수행하였으며, 계지와 계피 성분을 비교 분석하였다. TLC에 의하여 계지의 성분을 확인하였으며, 이를 MS에 의하여 각 주요성분의 분자량을 확인하였다.
- 2) 목단피의 생리활성성분 동시분석: 목단피의 생리활성성분인 paeonol, paeoniflorin, benzoyl paeoniflorin을 지표물질로 설정하고 이들 3종 화합물의 HPLC 분석조건을 설정하였다. validation을 위하여 정확성, 정밀성, 일내 및 일간 재현성, 직선성, 정량범위, 검출한계, 정량한계, 완건성, 안정성 등을 조사하였으며, 시중에서 20개의 시료를 구입하여 주요성분의 함량을 분석하였다. 분석결과를 패턴인식법에 의한 목단피의 기원별 산지별 분석을 수행하였으며, 목단피와 작약 성분을 비교 분석하였다. TLC에 의하여 목단피의 성분을 확인하였으며, 이를 MS에 의하여 각 주요성분의 분자량을 확인하였다.

## ○ 연구성과(응용분야 및 활용범위포함) (400~600자)

계지와 목단피의 생리활성성분 동시분석에 관한 연구를 수행하여, 계지와 목단피의 생리 활성 물질의 HPLC-UV 조건을 설정하였다. HPLC 조건의 validation을 위하여 설정한 조건의 직선성, 정량범위, 정확성, 정밀성, 검출한계, 정량한계, 완건성, 안정성 등을 조사하였다. 또한 계지의 경우는 coumarin, 2-hydroxycinnamaldehyde, cinnamyl alcohol, cinnamic acid, cinnamaldehyde, 2-methoxy cinnamaldehyde, eugenol 등의 7개의 지표물질에 대한 동시분석법을 개발하였고, 목단피에 대하여는 paeonol, paeoniflorin, benzoyl paeoniflorin 등의 3종의 지표물질에 대한 동시 다 성분 분석법을 확립하였다. 각각의 HPLC 분석결과를 패턴인식법에 의하여 분석하여 기원별, 산지별 분석을 수행하였으며, TLC와 LC/MS 분석 등을 통하여 주요성분을 확인하였다. 이러한 결과는 대한약전 또는 약전의 한약(생약)규격집의 확인시험이나 정량법에 활용될 수 있으며, 패턴인식법에 의한 결과 등은 한약재의 진위판정 및 원산지의 판정에 활용될 수 있다.

## ○ 참여연구원

성 명	주민등록번호(앞번호만 기재)	성 명	주민등록번호(앞번호만 기재)
박경래			
김영호			
강종성			
딩안			
오은기			
박상혁			
원후통			
박순혜			
뉘에수연뉘			
이규선			
정명수			
진윤서			

<b>Keywords</b> (5개 내외)	<b>한글</b>	목단피, 계지, 고속액체크로마토그래피, 밸리테이션, 패턴인식
	<b>영문</b>	Moutan Cortex Radicies, Cinnamomi Cortex, HPLC, Validation, Pattern Analysis

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