

최종보고서

한약재의 생리활성성분 분리 및 분석 연구 (황련, 독활)

Isolation and Quantitative Analysis of Bioactive Components from  
*Coptis Rhizoma* and *Araliae Radix*

주관연구기관 : 부경대학교

식품의약품안전청

[별지 제12호 서식]

용역연구개발과제 최종보고서			
과제번호	08182한약재254		
단위과제명	한약재 생리활성성분 분리 및 분석 연구		
과제명	국문	한약재의 생리활성성분 분리 및 분석 연구 (황련, 독활)	
	영문	Isolation and Quantitative Analysis of Bioactive Components from <i>Coptis Rhizoma</i> and <i>Araliae Radix</i>	
주관 연구기관	기관명	소재지	대표
	부경대학교	부산 남구 대연3동 599-1	박맹언
주관 연구책임자	성명	소속 및 부서	전공
	최재수	부경대학교 식품생명공학	천연물 화학
총연구기간	2007년 2월 28일 - 2008년 11월 30일(1년 5.6개월)		
총연구개발비	320,000천원		
연구년차	연구기간	연구개발비	
1차년도	2007. 02. 28 - 2007. 11. 10	160,000천원	
2차년도	2008. 03. 13 - 2008. 11. 13	160,000천원	
총참여연구원	10명 (책임연구원: 2명, 연구원: 2명, 연구보조원: 3명, 보조원: 3명)		
<p>2008년도 용역연구개발과제에 의하여 수행중인 연구과제의 최종보고서를 붙임과 같이 제출합니다.</p> <p style="text-align: right;">2008년 11월 30일</p> <p style="text-align: center;">주관연구책임자 최재수 (인 또는 서명)</p> <p style="text-align: center;">주관연구기관장 박맹언 (직인)</p>			
식품의약품안전청장 귀하			

# 제 출 문

## 식품의약품안전청장 귀하

이 보고서를 “한약재의 생리활성성분 분리 및 분석 연구- 황련, 독활 (부경대학교/최재수)”과제의 최종보고서로 제출합니다.

2008. 11.

주관연구기관명 : 부경대학교

주관연구책임자 : 최 재 수

제 1세부과제명 : 황련과 독활의 생리활성성분 분리  
(제 1세부연구기관/세부과제책임자):부경대학교/최재수

제 2세부과제명 : 황련과 독활의 생리활성성분 분석법 개발  
(제 2세부연구기관/세부과제책임자): 대구가톨릭대학교/민병선

## 목 차

### I. 연구개발결과 요약문

(한글) .....	4
(영문) .....	6

### II. 총괄연구개발과제 연구결과

제1장 총괄연구개발과제의 최종 연구개발 목표 .....	9
제2장 총괄연구개발과제의 최종 연구개발 내용 및 방법 .....	11
제3장 총괄연구개발과제의 최종 연구개발 결과 .....	12
제4장 총괄연구개발과제의 연구결과 고찰 및 결론 .....	14
제5장 총괄연구개발과제의 연구 성과 .....	18
제6장 기타 주요변경사항 .....	19
제7장 참고문헌 .....	19
제8장 첨부서류 .....	22

### III. 제1 세부연구개발과제 연구결과

제1장 제1 세부연구개발과제의 최종 연구개발 목표 .....	24
제2장 제1 세부연구개발과제의 연구대상 및 방법 .....	25
제3장 제1 세부연구개발과제의 최종 연구개발 결과 .....	25
제4장 제1 세부연구개발과제의 연구결과 고찰 및 결론 .....	46
제5장 제1 세부연구개발과제의 연구 성과 .....	47
제6장 기타 주요변경사항 .....	48
제7장 참고문헌 .....	48
제8장 첨부서류 .....	51

### IV. 제2 세부연구개발과제 연구결과

제1장 제2 세부연구개발과제의 최종 연구개발 목표 .....	53
제2장 제2 세부연구개발과제의 연구대상 및 방법 .....	56

제3장 제2 세부연구개발과제의 최종 연구개발 결과 .....	63
제4장 제2 세부연구개발과제의 연구결과 고찰 및 결론 .....	94
제5장 제2 세부연구개발과제의 연구 성과 .....	96
제6장 기타 주요변경사항 .....	97
제7장 참고문헌 .....	97
제8장 첨부서류 .....	99

## 최종보고서 요약문

<b>과 제 명</b>	한약재의 생리활성성분 분리 및 분석 연구 (황련, 독활)		
<b>중심단어</b>	생리활성성분, 함량분석, 패턴인식법, 지문인식, 표준품		
<b>주관연구기관</b>	부경대학교	<b>주관연구책임자</b>	최 재 수
<b>연구기간</b>	2007. 2. 28. ~ 2008. 11. 30.		
<p>황련 및 독활의 유효성분 분리 · 분석 연구를 수행하여 황련으로부터 coptisine (1430 mg), pinosresinol (11.3 mg), isolariciresinol (4.7 mg), epiberberine (605 mg), jateorrhizine (4.5 mg), berberine (12010 mg), palmatine (3560 mg), magnoflorine (50 mg), groenlandicine (101 mg), <math>\beta</math>-sitosterol (121 mg), ferulic acid methyl ester (15 mg), 3-(3',4'-dihydroxyphenyl)lactic acid methylester (15 mg)을 분리하였고, 독활로부터 <i>ent</i>-pimara-8(14),15-diene-19-oic acid (continentalic acid, 10145 mg), 7<math>\beta</math>-hydroxy-<i>ent</i>-pimara-8(14),15-diene-19-oic acid (38.95 mg), 7-oxo-<i>ent</i>-pimara-8(14),15-diene-19-oic acid (20.49 mg), 16<math>\alpha</math>-methoxy-17-hydroxy-<i>ent</i>-kauran-19-oic acid (7.85 mg), 15<math>\alpha</math>,16<math>\alpha</math>-epoxy-17-hydroxy-<i>ent</i>-kauran-19-oic acid (35.87 mg), 17-Hydroxy-<i>ent</i>-kaur-15-en-19-oic acid (20 mg), 16<math>\alpha</math>,17-dihydroxy-<i>ent</i>-kauran-19-oic acid (18.25 mg), mixture (3:2) 형태의 stigmasta-5-en-3<math>\beta</math>-ol (<math>\beta</math>-sitosterol) 과 stigmasta-5,22-dien-3<math>\beta</math>-ol (stigmasterol) (500 mg), mixture (9:1) 형태의 daucosterol (<math>\beta</math>-sitosterol glucoside) 과 stigmasterol glucoside (1000 mg), 7-dehydroabietanone (4 mg), 16<math>\alpha</math>-hydroxy-17-isovaleryloxy-<i>ent</i>-kauran-19-oic acid (40 mg), <i>ent</i>-kaur-16-en-19-oic acid (kaurenoic acid, 736 mg), <i>ent</i>-pimara-8(14),15-diene-19-ol (<i>ent</i>-pimarol, 20 mg), 8<math>\alpha</math>-Hydroxy-<i>ent</i>-pimara-15-en-19-ol (<i>ent</i>-thermarol, 15 mg), 4<math>\beta</math>-hydroxy-19-nor(-)-pimara-8(14),15-diene (7 mg), 4-epiruilopezol (7 mg), lignoceric acid (80 mg), (+)-spathulenol (5 mg), dehydrofaltarindiol(10 mg), D-fructose (100 mg), chlorogenic acid (5-caffeoylquinic acid, 500 mg), 3,5-di-<i>O</i>-caffeoylquinic acid (10 mg), neochlorogenic acid (3-caffeoylquinic acid, 10 mg), sucrose (100 mg), caffeic acid (10 mg), cryptochlorogenic acid (4-caffeoylquinic acid, 10 mg), 1-kestose [<i>O</i>-<math>\beta</math>-D-fructofuranosyl-(2<math>\rightarrow</math>1)-<math>\beta</math>-D-fructofuranosyl-(2<math>\rightarrow</math>1)-<math>\alpha</math>-D-glucopyranoside, 260 mg], methyl-<math>\alpha</math>-D-fructofuranoside (210 mg), protocatechuic acid (200 mg), thymidine (20 mg), uridine (20 mg) 그리고 methyl-<math>\beta</math>-D-fructofuranoside (30 mg)을 분리하였으며, 분리된 화합물의 구조는 분광학적 분석에 의거하여 동정하였다. 또한 황련과 독활의 산지별 비교를 하고자 총 13종의 황련과 독활을 추출, 제조하여 분석팀 및 효능확인연구팀에 연구용 시료로 제공하였다. 황련의 주요 생리활성 성분으로 알려진 berberine, palmatine, coptisine과 독활의 주요 성분인 <i>epi</i>-continentalic acid, kaurenoic acid 및 continentalic acid의 물질을 동시에 정량할 수 있는 HPLC-UV 동시 정량법을 설정하고 HPLC 방법의 validation을 수행하여 함량 분석법을 확립하였다. 황련과 독활의 간단한 화학적 확인 방법으로 TLC 분석의 방법도 확립하였고, LC-MS/MS을 이용한 분석법 설정과 정량성을 확립하였다. 시중에 유통되고 황련과 속이 다른 호황련, 조황련 및 독활의 국내생산품과 중국산 천독활을 포함하는 각각의 국내유통 수입한약재 등을 포함한 유통품의 각각 20종의 제품 모니터링을 통하여 황련과 독활 주요성분의 함량분석을 하고, 함량분석을 통한 패턴인식 및 지문인식으로 기원별, 산지별 한약재 평가하였다.</p>			

## 주관연구책임자 의견

연구의 범위	<ul style="list-style-type: none"> <li>•황련 알칼로이드, 리그난 화합물과 독활 디테르페노이드, 스테로이드 화합물 분리.</li> <li>•황련의 주요 생리활성 성분으로 알려진 berberine, palmatine, coptisine과 독활의 주요성분 <i>epi</i>-continentalic acid, kaurenoic acid 및 continentalic acid의 물질을 동시에 정량할 수 있는 동시 정량법을 설정.</li> <li>•한약재의 생리활성성분 분리 및 분석연구(황련, 독활)의 연구과제제안서(RFP)에 적합한 연구.</li> </ul>
연구의 한계점	<ul style="list-style-type: none"> <li>•황련은 리그난과 알칼로이드 성분이 혼합되어 있어 선택적 용매 분획 방법이 용이하지 않고 주성분 berberine 과 palmatine 함량이 높아서 타성분의 분리가 쉽지 않음.</li> <li>•독활 주성분인 continentalic acid 와 sterol 및 sterol 배당체는 다량으로 분리 할 수 있으나 타성분의 분리가 쉽지 않음.</li> </ul>
인용시 주의사항	
주관부서 연락처	식품의약품안전청 위해성평가과 (☎ 380 ~ 1826)

## Summary

<b>Title of Project</b>	Isolation and Quantitative Analysis of Bioactive Components from <i>Coptis Rhizoma</i> and <i>Araliae Radix</i>		
<b>Key Words</b>	<i>Coptis chinensis</i> , <i>Aralia continentalis</i> , diterpenoids, alkaloids, HPLC		
<b>Institute</b>	Pukyong National University	<b>Project Leader</b>	Choi Jae Sue
<b>Project Period</b>	2007. 2. 28. ~ 2008. 11. 30.		
<p>Forty-four biological active compounds were isolated from the roots of <i>Coptis chinensis</i> and <i>Aralia continentalis</i>. Structural identification of these compounds was performed by analysis of 1D and 2D NMR spectra data, and by comparisons with published literatures. The isolated compounds were as follows; coptisine (1430 mg), pinoresinol (11.3 mg), isolariciresinol (4.7 mg), epiberberine (605 mg), jateorrhizine (4.5 mg), berberine (12010 mg), palmatine (3560 mg), magnoflorine (50 mg), groenlandicine (101 mg), <math>\beta</math>-sitosterol (121 mg), ferulic acid methyl ester (15 mg), 3-(3',4'-dihydroxyphenyl)lactic acid methylester (15 mg) from <i>C. chinensis</i>; <i>ent</i>-pimara-8(14),15-diene-19-oic acid (continentalic acid, 10145 mg), 7<math>\beta</math>-hydroxy-<i>ent</i>-pimara-8(14),15-diene-19-oic acid (38.95 mg), 7-oxo-<i>ent</i>-pimara-8(14),15-diene-19-oic acid (20.49 mg), 16<math>\alpha</math>-methoxy-17-hydroxy-<i>ent</i>-kauran-19-oic acid (7.85 mg), 15<math>\alpha</math>,16<math>\alpha</math>-epoxy-17-hydroxy-<i>ent</i>-kauran-19-oic acid (35.87 mg), 17-Hydroxy-<i>ent</i>-kaur-15-en-19-oic acid (20 mg), 16<math>\alpha</math>,17-dihydroxy-<i>ent</i>-kauran-19-oic acid (18.25 mg), mixture (3:2) of stigmasta-5-en-3<math>\beta</math>-ol (<math>\beta</math>-sitosterol) and stigmasta-5,22-dien-3<math>\beta</math>-ol (stigmasterol) (500 mg), mixture (9:1) of daucosterol (<math>\beta</math>-sitosterol glucoside) and stigmasterol glucoside (1000 mg), 7-dehydroabietanone (4 mg), 16<math>\alpha</math>-hydroxy-17-isovaleryloxy-<i>ent</i>-kauran-19-oic acid (40 mg), <i>ent</i>-kaur-16-en-19-oic acid (kaurenoic acid, 736 mg), <i>ent</i>-pimara-8(14),15-diene-19-ol (<i>ent</i>-pimarol, 20 mg), 8<math>\alpha</math>-Hydroxy-<i>ent</i>-pimara-15-en-19-ol (<i>ent</i>-thermarol, 15 mg), 4<math>\beta</math>-hydroxy-19-nor(-)-pimara-8(14),15-diene (7 mg), 4-epiruillopezol (7 mg), lignoceric acid (80 mg), (+)-spathulenol (5 mg), dehydrofalcariindiol (10 mg), D-fructose (100 mg), chlorogenic acid (5-caffeoylquinic acid, 500 mg), 3,5-di-<i>O</i>-caffeoylquinic acid (10 mg), neochlorogenic acid (3-caffeoylquinic acid, 10 mg), sucrose (100 mg), caffeic acid (10 mg), cryptochlorogenic acid (4-caffeoylquinic acid, 10 mg), 1-kestose [<i>O</i>-<math>\beta</math>-D-fructofuranosyl-(2<math>\rightarrow</math>1)-<math>\beta</math>-D-fructofuranosyl-(2<math>\rightarrow</math>1)-<math>\alpha</math>-D-glucopyranoside, 260 mg], methyl-<math>\alpha</math>-D-fructofuranoside (210 mg), protocatechuic acid (200 mg), thymidine (20 mg), uridine (20 mg) and methyl-<math>\beta</math>-D-fructofuranoside (30 mg) in <i>A. continetalis</i>, respectively. HPLC-UV analytical method have developed for determining berberine, palmatine and coptisine form <i>Coptidis Rhizoma</i>, and <i>epi</i>-continentalic acid, kaurenoic acid and continentalic acid from <i>Araliae Continentalis Radix</i>. Calibration graph showed good linearity across wide concentration ranges of the marker compounds. The HPLC-UV procedure has shown good accuracy and precision, and therefore is proposed an efficient method for fingerprinting analysis as well as quality control of the crude drugs. Furthermore, we have developed the simple TLC and LC-MS/MS procedure for analysis of the two crude drugs. Quantities of marker compounds from collected samples of <i>Coptidis Rhizoma</i> and <i>Araliae Continentalis Radix</i> were assayed. Two crude drugs estimated their origin and cultivated area by quantitative analysis together with R-program.</p>			



## Opinion of Project Manager

<b>Scope</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Alkaloids, lignans, diterpenoids and steroids were isolated from the roots of <i>Coptis chinensis</i> and <i>Aralia continentalis</i>.</li> <li>•HPLC-UV analytical method have developed for determining berberine, palmatine and coptisine from <i>Coptidis Rhizoma</i>, and <i>epi</i>-continentalic acid, kaurenoic acid and continentalic acid from <i>Araliae Radix</i>. Calibration graph showed good linearity across wide concentration ranges of the marker compounds.</li> <li>•Research is suitable to RFP for isolation and quantitative analysis of bioactive components from <i>Coptis Rhizoma</i> and <i>Araliae Radix</i>.</li> </ul>
<b>Limitation</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Because berberine and palmatine content was high, isolation of other minor compounds was not easy.</li> <li>•Continentalic acid and sterols and sterol glycosides can be isolated in vast quantity as major components of <i>Aralia continentalis</i>, however, separation of other compounds was not easy.</li> </ul>
<b>Direction For Citation</b>	
<b>Supervisory Office</b>	KFDA Risk assessment division (☎ 380 ~ 1826)

총괄연구개발과제 연구결과

# 제1장 총괄연구개발과제의 최종 연구개발 목표

## 1.1 총괄연구개발과제의 목표

구 분	최종 연구개발 목표
총괄연구과제	<p><b>1차년도 연구목표</b> 한약재의 유효성분 중심의 관리를 위하여 한약재(황련, 독활) 생리활성성분 분리(각 10 종 이상) 및 연구용 시료를 제공하고, 분리된 성분들의 분석법을 개발하고자 한다.</p> <p><b>2차년도 연구목표</b> 한약재의 유효성분 중심의 관리를 위하여 한약재(황련, 독활) 생리활성성분 분리(각 10 종 이상) 및 연구용 시료를 제공, 유효성분 정량용 표준품을 제조, 분리된 성분들의 패턴인식법에 의한 기원별, 산지별 한약재 정보를 구축하고자 한다.</p>
제 1 세부과제	<p><b>1차년도 연구목표</b> 한약재의 유효성분 중심의 관리를 위하여 한약재(황련, 독활) 생리활성성분 분리(각 10 종 이상) 및 연구용 시료를 제공하고자 함.</p> <p><b>2차년도 연구목표</b> 한약재의 유효성분 중심의 관리를 위하여 한약재(황련, 독활) 생리활성성분 분리(각 10 종 이상) 및 연구용 시료를 제공, 유효성분 정량용 표준품을 제조하고자 함.</p>
제 2 세부과제	<ul style="list-style-type: none"> <li>·한약재(황련, 독활) 성분들의 분석법을 개발</li> <li>·한약재(황련, 독활) 성분들의 HPLC, LC/MS/MS을 이용한 분석법 및 TLC를 이용한 패턴 인식법에 의한 기원별, 산지별 한약재 정보 구축</li> </ul>

## 1.2 총괄연구개발과제의 목표달성도

구분	연구 내용	달성도(%)
제1세부과제	한약재(황련, 독활)의 수집	100
	한약재(황련, 독활)의 추출, 분획	100
	한약재(황련, 독활) 성분의 분리, 정제	100
	한약재(황련, 독활) 성분의 화학구조 결정	100
제2세부과제	한약재(황련, 독활) 성분들의 분석법을 개발	100
	한약재(황련, 독활) 성분들의 HPLC, LC/MS/MS을 이용한 분석법 및 TLC를 이용한 패턴 인식법에 의한 기원별, 산지별 한약재 정보 구축	100

## 1.3 국내·외 기술개발 현황

### 가. 국외연구동향

#### (1) 황련

*Coptis Rhizoma* (*Coptis japonica*, Ranunculaceae)는 중국의 전통적인 한약재로 1000년 이상 당뇨병치료에 사용되어져 왔으며, 위장염, 설사, 항종양, 항균활성 등을 치료하는 데에도 사용되어져 왔다 (Iizuka *et al.*, 2000; Hwang *et al.*, 2003). *Coptis Rhizoma*는 현재 여드름, 신경성피부염, 그리고 피부 궤양 등의 여러 가지 피부질환에 사용되어져 왔고 (Higaki *et al.*, 1996) 지질과산화와 콜레스테롤 수치를 감소시켜 관상 동맥 질환의 위험을 줄이고 과다콜레스테롤혈증 동맥경화에 대한 대체요법 등이 보고되어져 있다 (Yokozawa *et al.*, 2003). 뿌리줄기에 berberine 3~8%, 기타 jateorrhizine, worenine, coptisine, palmatine, sanguinarine, norsanguinarine, oxysanguinarine, 6-acetonsyl-5,6-dihydrosanguinarine 그리고 magnoflorine 등 여러 가지 alkaloid가 분리 보고 되어있다 (Yahara *et al.*, 1985; Otsuka *et al.*, 1981; Schmeller *et al.*, 1997). 또한 pinoresinol, isolariciresinol, dihydrobenzofuran neolignans, woorenogenin, woorenosides I-V (Yoshikawa *et al.*, 1995)와 앞에서 분리한 flavonoids 화합물 coptiside I, 그리고 coptiside II 가 분리 보고 되어있다 (Fujiwara *et al.*, 1976). 또 황련 추출물이 acyl-CoA:cholesterol acyltransferase (ACAT) 활성억제 (Yotsumoto *et al.*, 1997) 및 5-fluorouracil 세포막 투과 활성화작용 (Namba *et al.*, 1995) 등의 다양한 생리활성이 보고되어있다. 이들 생리활성물질의 동시분석 방법으로는 alkaloid가 연구 되어 있고 HPLC-UV 방법(column: C18; detector: 254 nm, 270 nm; mobil ephase: acetonitrile-0.02 M acetic ammonium; acetonitrile-0.5% acetic acid; 0.05 M phosphate buffer) (Feng *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2006), HPLC-PDA (photodiode array detector) 방법 (Chen *et al.*, 2006), chiral HPLC 방법 (Zgai *et al.*, 2006), HPLC-MS 방법 (Sheng *et al.*, 2006) 및 HPLC-MS/MS 방법 (Li *et al.*, 2006) 등이 보고되어있다.

#### (2) 독활

땀두릅의 어린잎으로부터 여러 가지 정유성분과 terpenes 등이 분리 보고되어있다 (Kawai *et al.*, 1989; Yoshihara and Hirose, 1973; Ito *et al.*, 1978; Sawamura *et al.*, 1989; Okugawa *et al.*, 1990). 뿌리에서 분리한 diterpenes 성분들은 진통제와 항염증제에 대한 활성을 가진다고 보고되어 있다 (Okuyama *et al.*, 1991)

### 나. 국내연구동향

#### (1) 황련

황련의 생리활성 성분인 berberine의 항균활성에 대한 특성이 보고되어 있다 (Lee *et al.*, 2003; Yu *et al.*, 2005). 황련은 현재 여드름, 신경성피부염, 그리고 피부 궤양 등 여러 가지 피부질환의 사용에 대해서 보고된 바 있다 (Nam *et al.*, 2003). 황련의 생리활성성분으로 분리된 화합물은 berberine, jateorrhizine, worenine, coptisine, palmatine, 그리고 magnoflorine 등 여러 가지 alkaloid가 보고 되어있다 (Kim *et al.*, 2000). 또 황련 추출물이 항말라리아작용 (Park *et al.*, 2003) 및 SNU-688 세포의 apoptosis 활성화 (Park *et al.*, 2005) 등의 다양한 생리활성이 보고되어있다. 그 중 berberine 등의 isoquinoline alkaloid는 rat lens aldose reductase 억제작용 (Lee, 2002), human intestinal bacteria 성장억제작용 (Chae *et al.*, 1999), catecholamine biosynthesis 억제작용 (Lee and Kim, 1996), tumor cell line에 대한 cytotoxic activity (Min *et al.*, 2006) 및 항산화작용 (Kim *et al.*, 2000) 등이 알려져있고, lignan계 화합물로는 neolignan인 woorenoside가 항염증작용 (Cho *et al.*, 2000), pinoresinol, woorenoside V 및 lariciresinol glycoside가 tumor necrosis factor 활성 억제작용 (Cho *et al.*, 1998) 등이 보고되어져있다.

## (2) 독활

독활은 두릅나무과 (Araliaceae)에 속하는 다년생 초본인 땃두릅 (*Aralia continentalis* Kitagawa)의 뿌리로서 한방에서 진통, 부종, 해열, 치통, 관절염 등의 치료에 사용되는 생약재이며 (이창복, 1989), 어린 잎과 줄기는  $\alpha$ -pinene과 sabinene의 특유한 정유성분 향을 가지고 있다. 독활은 항염증작용 (Han *et al.*, 1983, 1985), 혈소판응집억제작용과 해열작용 (Park *et al.*, 2005) 등이 알려져 있으며, 그 활성 성분은 (—)-pimara-8(14), 15-dien-19-oic acid (continentalic acid), (—)-kaur-16-en-19-oic acid인 diterpene이며 함량은 약 0.39% 이다.

최근, continentalic acid는 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*에 대하여 항균활성을 나타낸다고 알려져 있다 (Jeong *et al.*, 2006). 또한 항산화 flavonoid 성분 (Kim *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 1998), 지상부에 triterpenoid, saponin 성분 (Kim and Kang, 1998) 등이 보고되어 있다. 그 중 독활의 diterpene과 triterpene계 화합물이 암세포에 세포독성과 cyclooxygenase 억제활성이 있으며 (Dang *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2006), 독활의 MeOH 추출물이 골다공증에 관련된 apoptosis 억제작용이 알려져 있다 (Baek *et al.*, 2006).

## 제2장 총괄연구개발과제의 최종 연구개발 내용 및 방법

### <1세부 과제>

#### (가) 연구내용

- ① 국내 황련과 독활의 수집 (기원별, 산지별)
- ② 황련과 독활 추출, 분획
- ③ 칼럼크로마토그래피를 이용한 황련과 독활의 성분 분리, 정제
- ④ 황련과 독활 성분의 화학구조 결정
- ⑤ 효능확인 연구를 위한 생리활성성분 대량 제조
- ⑥ 유효성분으로 확인된 3성분 이상에 대하여 정량용 표준품 제조 및 표준품 규격서 작성

#### (나) 연구방법

- ① 국내 자생하는 황련과 독활을 수집 (기원별, 산지별)
- ② 황련과 독활의 추출 및 분획
  - 70% EtOH 추출, 각각  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , EtOAc, *n*-BuOH 및  $\text{H}_2\text{O}$  fraction로 분획
- 3) 황련과 독활 화합물의 화학구조 결정
  - Mass Spectrometry, IR Spectrophotometry, UV Spectrophotometry,  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$  등의 분광학적 분석을 통하여 구조 동정
- 4) 황련과 독활 70% EtOH 추출물과 분리된 화합물들을 효능 유전자 확인 연구에 이용

### <2세부 과제>

#### (가) 연구내용

- 1) 추출된 황련과 독활의 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) 황련과 독활의 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, 시스템적합성 시험등을 실시.

- 4) 기타 세부과제에서 분리된 황련과 독활 생리활성 물질의 확인 (분자량 및 구조) 및 생리활성 물질에 대한 구조학적 정보 확보.
- 5) HPLC-UV, LC/MS/MS 및 TLC 등을 이용한 생리활성물질의 분석으로 한약재의 기원별, 산지별 분석으로 한약재 평가 실시.

#### (나) 연구방법

황련과 독활 중 생리활성 물질의 분석법 확립을 위하여 HPLC-UV, LC/MS/MS 및 TLC를 활용한 생리활성 성분의 확인 방법을 확립함.

- 동시 다분석을 위한 HPLC-UV, LC/MS/MS 및 TLC를 이용한 한약재 생리활성 성분의 정성 정량 분석조건 확립.
  - 황련과 독활의 생리활성 물질의 분석을 위한 HPLC-UV 조건 확립
    - 다양한 구조를 갖는 화합물의 분석을 위한 컬럼 선정.
    - 다양한 구조를 갖는 화합물의 분석을 위한 용매 조건의 확립.
    - 화합물의 동시분석을 위한 검출과장 확립.
    - 생리활성 성분의 분석을 위한 추출법 확립.
  - 황련과 독활의 생리활성 물질의 분석을 위한 TLC 조건 확립
    - 활성물질의 분석을 위한 TLC조건 설정(극성에 따른 다양한 조건 확립).
    - 활성물질의 TLC검출을 위한 검출방법 설정.
  - 황련과 독활의 생리활성 물질의 구조 정보를 활용한 LC-MS/MS 조건 확립
    - LC/MS의 특성을 감안한 휘발성 용매 조건의 확립
    - 최적의 microbore column의 선정 및 관련 조건 확립
    - Single mass spectrometry condition 확립
    - Tandem mass spectrometry 조건 확립
  - 패턴인식/지문인식법에 의한 한약재 평가 (기원별, 산지별 분석)
    - 활성성분을 중심으로 한 성분 패턴분석.

### 제3장 총괄연구개발과제의 최종 연구개발 결과

#### (가) 황련과 독활의 생리활성성분 분리

국내산 황련과 독활을 기원별(산지별)로 수집하여 잘 건조한 후 세절하고 70% EtOH로 총 13종 추출, 제조하여 분석팀 및 효능확인연구팀에 연구용 시료로 제공하였다 (표1). 화합물의 분리를 위해 황련 10 kg MeOH 추출액과 독활 12 kg MeOH 추출액을 회전 농축기로 농축하여 엑스를 H<sub>2</sub>O를 가하여 현탁시켰다. 다음과 같이 용매의 극성증가 순으로 분획을 실시하여 황련 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> fraction (230 g), *n*-BuOH fraction (1100 g) 및 H<sub>2</sub>O fraction (840 g)의 각 분획물과 독활 hexane fraction (360 g), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> fraction (22 g), EtOAc fraction (20 g), *n*-BuOH fraction (237 g) 및 H<sub>2</sub>O fraction (2600 g) 을 얻었다(Scheme 1, 2). 이들 분획물을 SiO<sub>2</sub>, Sephadex LH-20, RP-18, MCI gel 등을 이용한 column chromatography 및 HPLC를 이용하여 황련으로부터 coptisine (1430 mg), pinoresinol (11.3 mg), isolariciresinol (4.7 mg), epiberberine (605 mg), jateorrhizine (4.5 mg), berberine (12010 mg), palmatine (3560 mg), magnoflorine (50 mg), groenlandicine (101 mg), β-sitosterol (121 mg), ferulic acid methyl ester (15 mg), 3-(3',4'-dihydroxyphenyl)lactic acid methylester (15 mg) 그리고 독활로부터 *ent*-pimara-8(14),15-diene-19-oic acid (continentalic acid, 10145 mg), 7β-hydroxy-*ent*-pimara-8(14),15-diene-19-oic acid (38.95 mg), 7-oxo-*ent*-pimara-8(14),15-diene-19-oic

acid (20.49 mg), 16 $\alpha$ -methoxy-17-hydroxy-*ent*-kauran-19-oic acid (7.85 mg), 15 $\alpha$ ,16 $\alpha$ -epoxy-17-hydroxy-*ent*-kauran-19-oic acid (35.87 mg), 17-Hydroxy-*ent*-kaur-15-en-19-oic acid (20 mg), 16 $\alpha$ ,17-dihydroxy-*ent*-kauran-19-oic acid (18.25 mg), mixture (3:2) 형태의 stigmasta-5-en-3 $\beta$ -ol ( $\beta$ -sitosterol) 과 stigmasta-5,22-dien-3 $\beta$ -ol (stigmasterol) (500 mg), mixture (9:1) 형태의 daucosterol ( $\beta$ -sitosterol glucoside) 과 stigmasterol glucoside (1000 mg), 7-dehydroabietanone (4 mg), 16 $\alpha$ -hydroxy-17-isovaleryloxy-*ent*-kauran-19-oic acid (40 mg), *ent*-kaur-16-en-19-oic acid (kaurenoic acid, 736 mg), *ent*-pimara-8(14),15-diene-19-ol (*ent*-pimarol, 20 mg), 8 $\alpha$ -Hydroxy-*ent*-pimara-15-en-19-ol (*ent*-thermarol, 15 mg), 4 $\beta$ -hydroxy-19-nor(-)-pimara-8(14),15-diene (7 mg), 4-epiruillopezol (7 mg), lignoceric acid (80 mg), (+)-spathulenol (5 mg), dehydrofalcariindiol(10 mg), D-fructose (100 mg), chlorogenic acid (5-caffeoylquinic acid, 500 mg), 3,5-di-*O*-caffeoylquinic acid (10 mg), neochlorogenic acid (3-caffeoylquinic acid, 10 mg), sucrose (100 mg), caffeic acid (10 mg), cryptochlorogenic acid (4-caffeoylquinic acid, 10 mg), 1-kestose [*O*- $\beta$ -D-fructofuranosyl-(2 $\rightarrow$ 1)- $\beta$ -D-fructofuranosyl-(2 $\rightarrow$ 1)- $\alpha$ -D-glucopyranoside, 260 mg], methyl- $\alpha$ -D-fructofuranoside (210 mg), protocatechuic acid (200 mg), thymidine (20 mg), uridine (20 mg) 그리고 methyl- $\beta$ -D-fructofuranoside (30 mg)을 분리하였다. 분리 정제된 생리활성성분을 생리활성성분 분석팀 및 효능확인연구팀에 연구용 시료로 제공하였다.

#### (나) 황련과 독활의 생리활성성분 분석법 개발

분리된 물질의 구조 데이터를 통하여 동시정량이 가능한 HPLC에 적합한 컬럼과 이동상을 결정하여 분리된 물질들의 최적의 동시분석법을 개발하고 validation을 통하여 동시 정량법을 개발하였으며 시판되고 있는 한약재를 구입하여 지표성분함량을 정량하였다. TLC 분석법 및 LC-MS/MS 분석법도 검토하였고, HPLC의 성분함량을 기초로 data 처리로 기원별, 산지별 분석을 실시하였다.

##### ▷ 황련과 독활의 생리활성물질의 동시분석법 개발

황련에 함유된 berberine, palmatine, coptisine, *epi*-berberine 및 독활의 생리활성물질 *epi*-continentalic acid, kaurenoic acid, continentalic acid의 정량조건을 HPLC-UV 법으로 설정하였다. HPLC-UV법으로 황련 및 독활의 column은 C-18을 이동상은 각각 10 mM hexansulfonic acid-acetonitrile과 0.1% TFA-acetonitrile; UV는 254 nm와 205 nm로 정량법을 설정하였다.

##### ▷ 황련과 독활의 생리활성물질의 동시분석법 검증 (validation)

황련과 독활에 함유된 생리활성물질의 동시 정량법에 대한 HPLC/UV 방법의 validation을 다음 항목에 대해 실시함으로써 동시분석법에 대한 타당성을 입증하였다.

- 재현성 (Reproducibility)
- 정확도 및 정밀도 (Accuracy and Precision)
- 회수율(Recovery)
- 완전성 (Robustness)
- 안정성 (Stability)

##### ▷ 황련과 독활의 시중 유통품의 생리활성성분 함량 측정

황련과 독활의 시중 유통품 및 식의약청 제공 황련과 독활의 유사 생약에 대한 생리활성성분의 함량을 측정하였다. *Coptis chinensis*는 황련의 주요성분 4가지가 모두 함유되어 있었으나 호황련 (*Picrorrhiza kurroa*)와 조황련 (*Jeffersonia dubia*)에는 황련의 4가지 성분이 검출되지 않았다. 또한 독활은 *Aralia cordata*는 diterpene계 성분이 검출되었으나 천독활 (*Angelica pubescens*)은 diterpene계 성분이 검출되지 않았다.

#### ▷ 황련과 독활의 TLC 분석 및 LC-MS/MS 분석법 개발

황련의 alkaloid계 성분과 독활의 diterpene계 성분의 간편한 분석방법인 TLC 방법으로 silica gel plate와 용매는 각각  $n$ -propanol : formic acid :  $H_2O$  = 90 : 1 : 9 및 hexane : EtOAc (5% formic acid) = 5 : 1로 분석이 가능하였다. 황련과 독활 지표성분의 LC-MS/MS의 분석이 가능하였다.

▷ HPLC로 분석한 황련과 독활의 활성성분을 중심으로 R-program을 이용한 패턴분석을 실시하였다. 각각의 생약의 기원별 성분 분류가 가능하였다.

## 제4장 총괄연구개발과제의 연구결과 고찰 및 결론

1. 국내산 황련과 독활을 기원별(산지별)로 수집하여 잘 건조한 후 세절하고 70% EtOH로 총 13종 추출, 제조하여 분석팀 및 효능확인연구팀에 연구용 시료로 제공하였다.
2. 화합물의 분리를 위해 황련 10 kg MeOH 추출액을 회전 농축기로 농축하여 엑스를  $H_2O$ 를 가하여 현탁시켰다. 다음과 같이 용매의 극성증가 순으로 분획을 실시하여  $CH_2Cl_2$  fraction (230 g),  $n$ -BuOH fraction (1100 g) 및  $H_2O$  fraction (840 g)을 얻었다.
3. 독활 12 kg MeOH 추출액을 회전 농축기로 농축하여 엑스를  $H_2O$ 를 가하여 현탁시켰다. 다음과 같이 용매의 극성증가 순으로 분획을 실시하여 독활 hexane fraction (360 g),  $CH_2Cl_2$  fraction (22 g), EtOAc fraction (20 g),  $n$ -BuOH fraction (237 g) 및  $H_2O$  fraction (2600 g)을 얻었다.
4. 황련으로부터 coptisine (1430 mg), pinoresinol (11.3 mg), isolariciresinol (4.7 mg), epiberberine (605 mg), jateorrhizine (4.5 mg), berberine (12010 mg), palmatine (3560 mg), magnoflorine (50 mg), groenlandicine (101 mg),  $\beta$ -sitosterol (121 mg), ferulic acid methyl ester (15 mg), 그리고 3-(3',4'-dihydroxyphenyl)lactic acid methylester (15 mg)을 분리·동정하였다.
5. 독활로부터 *ent*-pimara-8(14),15-diene-19-oic acid (continentalic acid, 10145 mg), 7 $\beta$ -hydroxy-*ent*-pimara-8(14),15-diene-19-oic acid (38.95 mg), 7-oxo-*ent*-pimara-8(14),15-diene-19-oic acid (20.49 mg), 16 $\alpha$ -methoxy-17-hydroxy-*ent*-kauran-19-oic acid (7.85 mg), 15 $\alpha$ ,16 $\alpha$ -epoxy-17-hydroxy-*ent*-kauran-19-oic acid (35.87 mg), 17-Hydroxy-*ent*-kaur-15-en-19-oic acid (20 mg), 16 $\alpha$ ,17-dihydroxy-*ent*-kauran-19-oic acid (18.25 mg), mixture (3:2) 형태의 stigmasta-5-en-3 $\beta$ -ol ( $\beta$ -sitosterol) 과 stigmasta-5,22-dien-3 $\beta$ -ol (stigmasterol) (500 mg), mixture (9:1) 형태의 daucosterol ( $\beta$ -sitosterol glucoside) 과 stigmasterol glucoside (1000 mg), 7-dehydroabietanone (4 mg), 16 $\alpha$ -hydroxy-17-isovaleryloxy-*ent*-kauran-19-oic acid (40 mg), *ent*-kaur-16-en-19-oic- acid (kaurenoic acid, 736 mg), *ent*-pimara-8(14),15-diene-19-ol (*ent*-pimarol, 20 mg), 8 $\alpha$ -Hydroxy-*ent*-pimara-15-en-19-ol (*ent*-thermarol, 15 mg), 4 $\beta$ -hydroxy-19-nor(-)-pimara-8(14),15-diene (7 mg), 4-epiruillopezol (7 mg), lignoceric acid (80 mg), (+)-spathulenol (5 mg), dehydrofaltarindiol(10 mg), D-fructose (100 mg), chlorogenic acid (5-caffeoylquinic acid, 500 mg), 3,5-di-*O*-caffeoylquinic acid (10 mg), neochlorogenic acid



(3-caffeoylquinic acid, 10 mg), sucrose (100 mg), caffeic acid (10 mg), cryptochlorogenic acid (4-caffeoylquinic acid, 10 mg), 1-kestose [*O*-β-D-fructofuranosyl-(2→1)-β-D-fructofuranosyl-(2→1)-α-D-glucopyranoside, 260 mg], methyl-α-D-fructofuranoside (210 mg), protocatechuic acid (200 mg), thymidine (20 mg), uridine (20 mg) 그리고 methyl-β-D-fructofuranoside (30 mg)을 분리하였다.

6. 황련 중의 berberine, coptisine, palmatine을 지표성분으로 HPLC-UV 분석방법을 검토하였다. 각각의 성분은 C18 column과 10 mM hexanesulfonic acid - acetonitrile (15% → 80% in ACN, 40 min) 용매, UV 254 nm에서 분석이 가능하였고, 성분의 정량을 위한 내부표준물질은 butylparaben을 사용하여 30분 내로 분석이 가능하였다.
7. 상기의 HPLC 분석조건의 validation 검토로 직선성은 berberine, coptisine, palmatine은 2 µg/mL ~ 100 µg/mL 농도에서 직선성 보였고 각각의 검출한계와 정량한계는 0.1 µg/ml과 0.25 µg/ml로 검출되었다. 또한 각각의 성분의 상관계수는 0.9994, 0.9992 및 0.9987로 높은 직선성을 확인할 수 있었다. 3성분에 대한 재현성을 직선성 범위내의 농도에서 실험결과 일간 및 일내 정밀도가 0.1% 이내였고, 회수율은 98.5% 이상으로 높은 회수율을 나타내었다.
8. 설정된 HPLC 조건의 완전성 검토로 Eclipse XDS-C18 (Agilent Co.), Hydrosphere C18 (YMC Co.) 및 Xterra RP18 (Water Co.)의 3회사의 column에 대한 황련의 3가지 성분에 대한 HPLC 용매 조건으로 theoretical plate number (N), capacity factor (k'), resolution (R)을 검토하였으나 유사한 결과를 얻었고, 상기 HPLC 조건으로 column을 고정하고 온도 및 hexanesulfonic acid를 변화시켜 분석한 결과 chromatography 상수에 변화가 없어 설정한 HPLC 조건은 황련의 함량 분석에 적합한 분석방법임을 확인하였다.
9. 황련의 HPLC 분석을 위한 시료의 추출방법은 sonication 혹은 reflux 방법으로 1시간 추출로 추출이 가능하였다. 3가지 성분에 대한 안전성은 실온과 냉장보관에서 45일간 안정하였다.
10. 시중유통 16종 황련과 식의약청 제공 7종의 황련에 대해 설정한 추출조건과 HPLC 분석방법으로 berberine, *epi*-berberine, coptisine, palmatine의 함량이 측정이 가능하였다. 시중에서 구입한 16종의 황련 중 6종의 시료는 berberine의 함량이 4.5% 이하로 대한약전 규격에 적합하지 않았고, 식의약청에서 제공한 시료 중 호황련(*Picrorrhiza kurrooa*) 과 조황련(*Jeffersonia dubia*)은 berberine 등 황련의 alkaloid계 성분이 검출되지 않았다.
11. 황련의 성분확인을 위한 TLC 방법으로 berberine, coptisine, palmatine, epiberberine의 분리가 가능하였고 황련의 확인방법으로 간편하였다. LC-MS/MS 방법으로 황련의 4가지 성분확인이 가능하

였고, 4가지 성분에 대한 검량선도 작성하였다.

12. HPLC으로 분석한 황련의 alkaloid계 성분을 중심으로 R-program을 이용한 패턴분석을 실시하였다. dendrogram과 partitioning 모두 성분의 함량에 따른 pattern으로 분석되었다.
13. 독활 중의 *epi*-continentalic acid, kaurenoic acid 및 continentalic acid를 지표성분으로 HPLC-UV 분석방법을 검토하였다. 각각의 성분은 C18 column과 0.1% TFA (trifluoroacetic acid) - acetonitrile (30 : 70, 40 min) 용매, UV 205 nm에서 분석이 가능하였고, 성분의 정량을 위한 내부 표준물질은 3-oxo-23-hydroxyolean-12-en-27-oic acid를 사용하여 30분 내 분석이 가능하였다.
14. 상기의 HPLC 분석조건의 validation 검토로 직선성은 *epi*-continentalic acid, kaurenoic acid 및 continentalic acid 각각 8 µg/mL ~ 132 µg/mL 농도에서 직선성 보였고, *epi*-continentalic acid와 kaurenoic acid의 검출한계와 정량한계는 1 µg/ml과 2.5 µg/ml로 검출되었으며 continentalic acid는 0.5 µg/ml과 1.25 µg/ml로 확인되었다. 또한 *epi*-continentalic acid, kaurenoic acid 및 continentalic acid 성분의 상관계수는 0.9987, 0.9983 및 0.9986으로 높은 직선성을 확인할 수 있었다. 3성분에 대한 재현성을 직선성 범위내의 농도에서 실험결과 일간 및 일내 정밀도가 0.1% 이내였고, 회수율은 각각의 성분 6.7, 13.3, 23.3 98.5% µg/ml 농도에서 95% 이상으로 높은 회수율을 나타내었다.
15. 설정된 HPLC 조건의 완전성 검토로 Eclipse XDS-C18 (Agilent Co.), Hydrosphere C18 (YMC Co.) 및 Xterra RP18 (Water Co.)의 3회사의 column에 대한 독활의 3가지 성분에 대한 HPLC 용매 조건으로 theoretical plate number (N), capacity factor (k'), resolution (R), selectivity (α) 등을 검토하였으나 유사한 결과를 얻었고, 상기 HPLC 조건으로 column을 고정하고 온도를 변화시켜 분석한 결과 chromatography 상수에 변화가 없어 설정한 HPLC 조건은 독활의 diterpene계 성분 함량 분석에 적합한 분석 방법임을 확인하였다.
16. 독활의 HPLC 분석을 위한 시료의 추출방법은 sonication 방법으로 1시간 추출로 추출이 가능하였다. 3가지 성분에 대한 안전성은 실온과 냉장보관에서 30일간 안정하였다.
17. 시중유통 14종 독활과 식의약청 제공 6종의 독활과 유사생약에 대해 설정한 추출조건과 HPLC 분석방법으로 *epi*-continentalic acid, kaurenoic acid 및 continentalic acid의 함량 측정이 가능하였다. 시험에 사용한 독활 중 *Aralia*속 독활의 diterpene 함량은 *epi*-continentalic acid가 0.06 - 0.75 µg/ml, kaurenoic acid 1.09 - 6.10 µg/ml 및 continentalic acid 2.69 - 9.08 µg/ml로 확인 되었고, 식의약청에서 제공한 시료 중 *Angelica*속의 천독활은 diterpene계 성분이 검출되지 않아 독활로 사용은 생리활성의 검토가 필요하다.

18. 독활의 성분확인을 위한 TLC 방법으로 *epi*-continentalic acid, kaurenoic acid 및 continentalic acid의 분리가 가능하였고 독활의 diterpene계 성분의 확인방법으로 간편하였다. LC-MS/MS 방법으로 독활의 3가지 성분확인이 가능하였고, 3가지 성분에 대한 검량선도 작성하였다.
  
19. HPLC으로 분석한 독활의 *epi*-continentalic acid, kaurenoic acid 및 continentalic acid계 성분을 중심으로 R-program을 이용한 패턴분석을 실시하였다. dendrogram과 partitioning 모두 성분의 함량에 따른 pattern으로 분석되었다.

## 제5장 총괄연구개발과제의 연구성과

### 5.1 활용성과

총괄과제명	한약재의 생리활성성분 분리 및 분석 연구 (황련, 독활)
총괄과제책임자	최재수 / 부경대학교 / 천연물화학

#### 가. 연구논문

번호	논문제목	저자명	저널명	집(권)	페이지	Impact factor	국내/국외	SCI 여부
1	Protective effect of magnoflorine isolated from <i>Coptidis Rhizoma</i> on Cu <sup>2+</sup> -induced oxidation of human low density lipoprotein	민병선 외 8명	Planta Medica	73	1281-1284	1.848	국외	SCI
2	Magnoflorine from <i>Coptidis Rhizoma</i> protects high density lipoprotein during oxidant stress	민병선, 최재수 외 7인	Bio. pharm. Bull.	30	1157-1160	1.614	국외	SCI
3	Quantitative determination of protoberberines from the roots of <i>Coptis chinensis</i>	민병선, 최재수	Natural Product Sciences	14	68-72		국내	
4	Inhibitory Activities of the Alkaloids from <i>Coptidis Rhizoma</i> against Aldose Reductase	최재수, 민병선 외 3인	Archives of Pharmacal Research	31(11)	1405-12	1.085	국내	SCIE

#### 나. 학술발표

번호	발표제목	발표형태	발표자	학회명	연월일	발표지	국내/국제
1							
2							

#### 다. 지적재산권

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

#### 라. 정책활용

※ 기타 관련정책에 활용 예를 구체적으로 기술함.
-----------------------------

#### 마. 타연구/차기연구에 활용

※ 타연구 및 차기연구에 활용된 예를 구체적으로 기술함.

## 바. 언론홍보 및 대국민교육

※ 언론홍보 및 대국민교육 내용, 일자 등을 간략히 기술함.

## 사. 기타

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

## 5.2 활용계획

- 유효 성분 중심의 한약재 관리에 필요한 황련, 독활별 생리활성성분의 분리 후 확인 및 분석법개발
- 한약재의 생리 활성 물질의 과학적 정량법의 확립
- 한약재 유효 성분의 분석법 개발 후 품질 관리 기반 기술 구축
- 한약재 관련 정부 및 연구기관의 공식 표준분석법으로 보급 활용
- 한약재 품질 수준 향상 및 안전성 제고

## 제6장 기타 중요변경사항

## 제7장 참고문헌

- 이창복, 대한식물도감, p.575, 향문사, 서울 1989.
- Baek, Y. H., Huh, J. E., Lee, J. D., Choi, D. Y. and Park, D. S., Effect of *Aralia cordata* extracts on cartilage protection and apoptosis inhibition. *Biol. Pharm. Bull.*, 29, 1423-1430 (2006)
- Chae, S. H., Jeong, I. H., Choi, D. H., Oh, J. W. and Ahn, Y. J., Growth-inhibiting effects of *Coptis japonica* root-derived isoquinoline alkaloids on human intestinal bacteria. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 934-938 (1999)
- Chen, L., Wang, Q. and Liu, J., Simultaneous analysis of nine active components in Gegen Qinlian preparations by high-performance liquid chromatography with diode array detection. *J Sep Sci*, 29, 2203-2210 (2006)
- Cho, J. Y., Baik, K. U., Yoo, E. S., Yoshikawa, K. and Park, M. H., In vitro antiinflammatory effects of neolignan woorenosides from the rhizomes of *Coptis japonica*. *J. Nat. Prod.*, 63, 1205-1209 (2000)
- Cho, J. Y., Park, J. Yoo, E. S., Baik, K. U., Yoshikawa, K., Lee, J. and Park, M. H., Inhibitory Effect of Lignans from the Rhizomes of *Coptis japonica* var. *dissecta* on Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Production in Lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 Cells. *Arch. Pharm. Res.*, 21, 12-16 (1998)

- Dang, N. H., Zhang, X., Zheng, M., Son, K. H., Chang, H. W., Kim, H. P., Bae, K. and Kang, S. S., Inhibitory constituents against cyclooxygenases from *Aralia cordata* Thunb. *Arch. Pharm. Res.*, 28, 28-33 (2005)
- Feng, Y. L., Yu, B. Y. and Dong, X. P., Simultaneous determination of three kinds of components in sanhuang tablets by high-performance liquid chromatography. *Yao Xue Xue Bao*, 41, 285-288 (2006)
- Fujiwara, H., Nonaka, G., Yagi, A. and Nishioka, I., Studies on the components of the leaves of *Coptis japonica* Makino. I. The structures of Coptiside I and II. *Chem. Pharm. Bull.*, 24, 407-413 (1976)
- Han, B. H., Han, Y. N., Han, K. A., Park, M. H. and Lee, E. O., Studies on the Anti-inflammatory activity of *Aralia continentalis* (I). *Arch. Pharm. Res.*, 6, 17-23 (1983)
- Han, B. H., Woo, E. R., Park, M. H. and Han, Y. N., Studies on the Anti-inflammatory activity of *Aralia continentalis* (III). *Arch. Pharm. Res.*, 8, 59-65 (1985)
- Higaki, S., Nakamura, M., Morohashi, M., Hasegawa, Y. and Yamagishi, T., Activity of eleven kampo formulations and eight kampo crude drugs against *Propionibacterium acnes* isolated from acne patients: retrospective evaluation in 1990 and 1995. *J. Dermatol.*, 23, 871-875 (1996)
- Huang, X. P., Li, L. Y., Qu, X. Y. and Cui, G. L., Fingerprints of Rhizoma *Coptidis* from Shizhu by HPLC. *Zhong Yao Cai*, 29, 666-669 (2006)
- Hwang, B. Y., Roberts, S. K., Chadwick, L. R., Wu, C. D. and Kinghorn, A. D., Antimicrobial constituents from goldenseal (the Rhizomes of *Hydrastis canadensis*) against selected oral pathogens. *Plant. Med.*, 69, 623-627 (2003)
- Iizuka, N., Miyamoto, K., Hazama, S., Yoshino, S., Yoshimura, K., Okita, K., Fukumoto, T., Yamamoto, S., Tangoku, A. and Oka, M., Anticachectic effects of *Coptidis rhizoma*, an anti-inflammatory herb, on esophageal cancer cells that produce interleukin 6. *Cancer Lett.*, 158, 35-41 (2000)
- Ito, T., Tsukiji, K. and Odagiri, S., Constituents of the head space gas of Udo (*Aralia cordata* Thunb.). *Nippon Nogeikagaku kaishi*, 52, 223-224 (1978)
- Jeong, S. I., Han, W. S., Yun, Y. H. and Kim, K. J., Continentalic acid from *Aralia continentalis* shows activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Phytother. Res.*, 20, 511-514 (2006)
- Kawai, H., Nishida, M., Tashiro, Y., Kuroyanagi, M., Ueno, A. and Satake, M., Studies on the structures of Udosaponins A, B, C, D, E and F from *Aralia cordata* Thunb. *Chem. Pharm. Bull.*, 37, 2318-2321 (1989)
- Kim, J. P., Jung, M. Y., Kim, J. P. and Kim, S. Y., Antiphotooxidative activity of protoberberines derived from *Coptis japonica* Makino in the chlorophyll-sensitized photooxidation of oil. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 1058-1063 (2000)
- Kim, J. S. and Kang, S. S., Saponins from the aerial parts of *Aralia continentalis*. *Nat. Prod. Sci.*, 4, 45-50 (1998)
- Kim, J. S., Kang, S. S., Choi, J. S., Lee, M. W. and Lee, T. S., Antioxidant components from *Aralia continentalis*. *Kor. J. Pharmacogn.*, 29, 13-17 (1998)
- Kim, J. S., Kang, S. S., Lee, M. W. and Kim, O. K., Isolation of flavonoids from the leaves of *Aralia continentalis*. *Kor. J. Pharmacogn.*, 26, 239-243 (1995)
- Lee D. U., Kang Y. J., Park M. K., Lee Y. S., Seo H. G., Kim T. S., Kim C. H. and Chang K. C., Effects of 13-alkyl-substituted berberine alkaloids on the expression of COX-II, TNF- $\alpha$ , iNOS, and IL-12 production in LPS-stimulated macrophages. *Life Sci.*, 73, 1401-1412 (2003)
- Lee, H. S., Rat lens aldose reductase inhibitory activities of *Coptis japonica* root-derived isoquinoline alkaloids. *J. Agri. Food Chem.*, 50, 7013-7016 (2002)

- Lee, I. S., Jin, W., Zhang, X., Hung, T. M., Song, K., S., Seong, Y. H. and Bae, K., Cytotoxic and COX-2 inhibitory constituents from the aerial parts of *Aralia cordata*. *Arch. Pharm. Res.*, 29, 548-555 (2006)
- Lee, M. K. and Kim, H. S., Inhibitory effects of protoberberine alkaloids from the roots of *Coptis japonica* on catecholamine biosynthesis in PC12 cells. *Planta Med.*, 62, 31-34 (1996)
- Li, H. L., Zhang, W. D., Liu, R. H., Zhang, C., Han, T., Wang, X. W., Wang, X. L., Zhu, J. B. and Chen, C. L., Simultaneous determination of four active alkaloids from a traditional Chinese medicine *Corydalis saxicola* Bunting. (Yanhuanglian) in plasma and urine samples by LC-MS-MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 831, 140-146 (2006)
- Min, Y. D., Yang, M. C., Lee, K. H., Kim, K. R., Choi, S. U. and Lee, K. R., Protoberberine alkaloids and their reversal activity of P-gp expressed multidrug resistance (MDR) from the rhizome of *Coptis japonica* Makino. *Arch. Pharm. Res.*, 29, 757-761 (2006)
- Nam, C., Kim, S, Sim, Y. and Chang, I., Anti-acne effects of Oriental herb extracts: a novel screening method to select anti-acne agents. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.*, 16, 84-90 (2003)
- Namba, T., Sekiya, K., Toshinal, A., Kadota, S., Hatanaka, T., Katayama, K. and Koizumi, T., Study on with crude drug. II: the effects of Coptidis Rhizoma extracts as skin permeation the rhizomes of *Coptis japonica* var. *dissecta*. *Chem. Pharm. Bull.*, 43, 578-581 (1995)
- Okugawa, H., Moriyasu, M., Matsushita, S., Saiki, K., Hashimoto, Y., Matsumoto, K., Fujioka, A. and Kato, A., Evaluation of crude drugs by a combination of Enflourage and chromatography(V). On flavor components in rhizoma of *Notopterygium* sp., and in roots of *Angelica pubescens* and *Aralia cordata*. *Shoyakugaku Zasshi*, 44, 11-16 (1990)
- Okuyama, E., Nishimura, S. and Yamazaki, M., Analgesic principles from *Aralia cordata* Thunb. *Chem. Pharm. Bull.*, 39, 405-407 (1991)
- Otsuka, H., Fujimura, H., Sawada, T. and Goto, M., *Yakuzaku Zasshi*, 101, 883-890 (1981)
- Park, H. J., Hong, M. S., Lee, J. S., Leem, K. H., Kim, C. J., Kim, J. W. and Lim, S., Effects of *Aralia continentalis* on hyperalgesia with peripheral inflammation. *Phytother. Res.*, 19, 511-513 (2005)
- Park, H. J., Kim, Y. J., Leem, K., Park, S. J., Seo, J. C., Kim, H. K. and Chung, J. H., *Coptis japonica* root extract induces apoptosis through caspase-3 activation in SNU-668 human gastric cancer cells. *Phytother. Res.*, 19, 189-192 (2005)
- Park, H., Kim, M. S., Jeon, B. H., Kim, T. K., Kim, Y. M., Ahn, J., Kwon, D. Y., Takaya, Y., Wataya, Y. and Kim, H. S., Antimalaria activity of herbal extracts used in traditional medicine in Korea. *Biol. Pharm. Bull.*, 26, 1623-1624 (2003)
- Sawamura, M., Lee-Kim, M. S., Shichiri, K. I., Tsuji, T. and Machida, K., Volatile constituents of Japanese and Korean Udo (*Aralia cordata* Thunb.) and Butterbur (*Petasites japonica* Miq.). Research Reports of the Kochi University, 38, 1-12 (1989)
- Schmeller T., Latz-Bruning B. and Wink M., Biochemical activities of berberine, palmatine and sanguinarine mediating chemical defence against microorganism and herbivores *Phytochemistry*, 44, 257-266 (1997)
- Sheng, Y. X., Zhang, J. L., Sun, S. Q. and Xu, J. T., Quality analysis and evaluation of Rhizoma *Coptidis* under different cultivation conditions. *Yao Xue Xue Bao*, 41, 1010-1014 (2006)
- Sun, J., Ma, J. S., Jin, J., Wang, H. S., Wen, Q. H., Zgang H. G. and Zhou, Q. L., Qualitative and quantitative determination of the main components of huanglianjiadu decoction by HPLC-UV/MS. *Yao Xue Xue Bao*, 41, 380-384 (2006)

- Yahara, S., Satoshiro, M., Nishioka, I., Nagasawa, T. and Oura, H., *Chem. Pharm. Bull.*, 43, 527-531 (1985)
- Yokozawa, T., Ishida, A., Cho, E. J. and Nakagawa, T., The effects of Coptidis Rhizoma extract on a hypercholesterolemic animal model. *Phytomedicine*, 10, 17-22 (2003)
- Yoshihara, K. and Hirose, Y., Terpenes from *Aralia* species. *Phytochemistry*, 12, 468 (1973)
- Yoshikawa, K., Kinoshita, H., Kan, Y. and Arihara, S., Neolignans and phenylpropanoids from effects of oren-gedoku-to and its components on cholesteryl ester synthesis in cultured human hepatocyte HepG2 cells: evidence from the cultured HepG2 cells and in vitro assay of ACAT. *Planta Med*, 63, 141-145 (1997)
- Yotsumoto, H., Yanagita, T., Yamamoto, K., Ogawa, Y., Cha, J. Y. and Mori, Y., Inhibitory enhancer. *Yakugaku Zasshi*, 115, 618-625 (1995)
- Yu H. H., Kim K. J., Cha J. D., Kim H. K., Lee Y. E., Choi N. Y. and You Y. O., Antimicrobial activity of berberine alone and in combination with ampicillin or oxacillin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Med. Food*, 8, 454-461 (2005)
- Zgai, Z. D., Shi, Y. P., Wu, X. M. and Luo, X. P., Chiral high-performance liquid chromatographic separation of the enantiomers of tetrahydropalmatine and tetrahydroberberine, isolation from *Corydalis yanhusuo*. *Anal Bional Chem*, 384, 939-945 (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.



## 제 1 세부연구개발과제 연구결과

세부과제명 : 황련과 독활의 생리활성성분 분리

세부과제책임자 : 최재수 / 부경대학교

# 제1장 세부연구개발과제의 최종 연구개발 목표

## 1.1 세부연구개발과제의 목표

### [1차년도 연구목표]

한약재의 유효성분 중심의 관리를 위하여 한약재(황련, 독활) 생리활성성분 분리(각 10 종 이상) 및 연구용 시료를 제공하고자 함.

### [2차년도 연구목표]

한약재의 유효성분 중심의 관리를 위하여 한약재(황련, 독활) 생리활성성분 분리(각 10 종 이상) 및 연구용 시료를 제공, 유효성분 정량용 표준품을 제조하고자 함.

## 1.2 세부연구개발과제의 목표달성도

연구 내용	달성도(%)
한약재(황련, 독활)의 수집	100
한약재(황련, 독활)의 추출, 분획	100
한약재(황련, 독활) 성분의 분리, 정제	100
한약재(황련, 독활) 성분의 화학구조 결정	100

## 1.3 국내·외 기술개발 현황

**황련** (*Coptis japonica*, *Coptis rhizoma*)은 미나리아재비과 (Ranunculaceae)에 속하는 다년생초본으로서 뿌리줄기는 노란색이고 구슬이 잇닿은 것 같다 하여 황련이라 불린다. 중국의 전통적인 한약재로 1000년 이상 당뇨병치료에 사용되어져 왔으며, 위장염, 설사, 항종양, 항균활성 등을 치료하는 데에도 사용되어져 왔다. 또한 동의치료에서 뿌리줄기를 산련풀뿌리와 같이 쓴맛건위약, 진정약, 염증약으로 충혈 및 염증성 질병, 가슴두근거림과 정신불안, 배아픔, 설사, 이질, 출혈 등의 증상을 치료하는데 효과를 가지고 있다. 황련은 현재 여드름, 신경성피부염, 그리고 피부 궤양 등의 여러 가지 피부질환에 사용되고, 지질과산화와 콜레스테롤 수치를 감소시켜 관상 동맥 질환의 위험을 줄이고 과다콜레스테롤혈증 동맥경화에 대한 대체요법 등이 보고되어져 있다. 뿌리줄기에 berberine 3~8%, 기타 jateorrhizine, worenine, coptisine, palmatine, sanguinarine, norsanguinarine, oxysanguinarine, 6-acetonsyl-5,6-dihydroshagnarine 그리고 magnoflorine 등 여러 가지 alkaloid가 있다. 또한 pinosresinol, isolariciresinol, flavonoids 화합물인 coptiside I, 그리고 II 가 분리 보고 되어있다. Berberine은 장내 세균에 술폰제와 비슷한 정도의 증식억제작용이 있다. 또한 진경작용, 동맥경화 예방 및 항염증작용, 열물 및 취액분비 촉진작용, 진정작용이 있다. Tetrahydroberberine은 중추신경 억제작용이 있다.

**독활**은 두릅나무과 (Araliaceae)에 속하는 다년생 초본인 땃두릅 (*Aralia continentalis* Kitagawa)의 뿌리로서 한방에서 진통, 부종, 해열, 치통, 관절염 등의 치료에 사용되는 생약재이며, 어린잎과 줄기는  $\alpha$ -pinene과 sabinene의 특유한 정유성분 향을 가지고 있다. 독활은 항염증작용, 혈소판응집억제작용과 해열작용 등이 알려져 있으며, 그 활성 성분은 (—)-pimara-8(14), 15-dien-19-oic acid (continentalic acid), (—)-kaur-16-en-19-oic acid인 diterpene이며 함량은 약 0.39% 이다. 또한

17-hydroxy-*ent*-kaur-15-en-19-oic acid, 7 $\alpha$ -hydroxy-(—)pimar-8(14), 15-dien-19-oic acid, 16 $\alpha$ ,17-dihydroxy-(—)-kauran-19-oic acid, 16-hydroxy-17-isovaleroyloxy-*ent*-kauran-19-oic acid, faltarindiol, dehydrofaltarindiol, dehydrofaltarindiol-8-acetate, faltarindiol-8-acetate, alpha-mono palmitin, stigmasterol, 그리고 daucosterol 등이 분리 보고 되어있다. 최근, continentalic acid는 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*에 대하여 항균활성을 나타낸다고 알려져 있다.

따라서 다양한 활성을 가지는 한약재인 황련과 독활을 대상으로 한약재의 오용 및 저질 한약재 유통에 따른 부작용 발생 근절을 위하여 유효성분 중심의 한약재 기준규격 설정으로 품질 및 안전성, 유효성을 확보할 필요가 있다. 또한 한약재는 기원별, 산지별로 다양한 성분을 함유하고 있어 현행 1종의 지표성분으로 평가하는데 한계가 있으므로 다성분 다변량 분석 등으로 전환 필요, 한약재 생리활성성분의 동시분석 및 효능확인연구를 위한 생리활성성분 제공 및 정량용 표준품의 대량 확보가 필요, 분리정제된 생리활성성분 및 70% 에탄올엑스를 생리활성성분 분석팀 및 효능확인연구팀에 연구용으로 제공할 필요가 있다.

## 제2장 세부연구개발과제의 최종 연구개발 내용 및 방법

### (가) 연구내용

- ① 국내 황련과 독활의 수집 (기원별, 산지별)
- ② 황련과 독활 추출, 분획
- ③ 칼럼크로마토그래피를 이용한 황련과 독활의 성분 분리, 정제
- ④ 황련과 독활 성분의 화학구조 결정
- ⑤ 효능확인 연구를 위한 생리활성성분 대량 제조
- ⑥ 유효성분으로 확인된 3성분 이상에 대하여 정량용 표준품 제조 및 표준품 규격서 작성

### (나) 연구방법

- ① 국내 자생하는 황련과 독활을 수집 (기원별, 산지별)
- ② 황련과 독활의 추출 및 분획
  - 70% EtOH 추출, 각각 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, EtOAc, *n*-BuOH 및 H<sub>2</sub>O fraction로 분획
- 3) 황련과 독활 화합물의 화학구조 결정
  - Mass Spectrometry, IR Spectrophotometry, UV Spectrophotometry, <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR 등의 분광학적 분석을 통하여 구조 동정
- 4) 황련과 독활 70% EtOH 추출물과 분리된 화합물들을 효능 유전자 확인 연구에 이용

## 제3장 세부연구개발과제의 최종 연구개발 결과

### (가) 황련과 독활의 수집, 대량 추출 및 분획

국내산 황련과 독활을 기원별(산지별)로 수집하여 잘 건조한 후 세절하고 70% EtOH로 총 13종 추출, 제조하여 분석팀 및 효능확인연구팀에 연구용 시료로 제공하였다 (표1). 화합물의 분리를 위해 황련 10 kg MeOH 추출액과 독활 12 kg MeOH 추출액을 회전 농축기로 농축하여 엑스를 H<sub>2</sub>O를 가하여 현탁시켰다. 다음과 같이 용매의 극성증가 순으로 분획을 실시하여 황련 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> fraction (230 g),

*n*-BuOH fraction (1100 g) 및 H<sub>2</sub>O fraction (840 g)의 각 분획물과 독활 hexane fraction (360 g), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> fraction (22 g), EtOAc fraction (20 g), *n*-BuOH fraction (237 g) 및 H<sub>2</sub>O fraction (2600 g) 을 얻었다(Scheme 1, 2). 이들 분획물을 SiO<sub>2</sub>, Sephadex LH-20, RP-18, MCI gel 등을 이용한 column chromatography 및 HPLC를 이용하여 황련으로부터 coptisine (1430 mg), pinoresinol (11.3 mg), isolariciresinol (4.7 mg), epiberberine (605 mg), jateorrhizine (4.5 mg), berberine (12010 mg), palmatine (3560 mg), magnoflorine (50 mg), groenlandicine (101 mg), β-sitosterol (121 mg), ferulic acid methyl ester (15 mg), 3-(3',4'-dihydroxyphenyl)lactic acid methylester (15 mg) 그리고 독활로부터 *ent*-pimara-8(14),15-diene-19-oic acid (continentalic acid, 10145 mg), 7β-hydroxy-*ent*-pimara-8(14),15-diene-19-oic acid (38.95 mg), 7-oxo-*ent*-pimara-8(14),15-diene-19-oic acid (20.49 mg), 16α-methoxy-17-hydroxy-*ent*-kauran-19-oic acid (7.85 mg), 15α,16α-epoxy-17-hydroxy-*ent*-kauran-19-oic acid (35.87 mg), 17-Hydroxy-*ent*-kaur-15-en-19-oic acid (20 mg), 16α,17-dihydroxy-*ent*-kauran-19-oic acid (18.25 mg), mixture (3:2) 형태의 stigmasta-5-en-3β-ol (β-sitosterol) 과 stigmasta-5,22-dien-3β-ol (stigmasterol) (500 mg), mixture (9:1) 형태의 daucosterol (β-sitosterol glucoside) 과 stigmasterol glucoside (1000 mg), 7-dehydroabietanone (4 mg), 16α-hydroxy-17-isovaleryloxy-*ent*-kauran-19-oic acid (40 mg), *ent*-kaur-16-en-19-oic acid (kaurenoic acid, 736 mg), *ent*-pimara-8(14),15-diene-19-ol (*ent*-pimarol, 20 mg), 8α-Hydroxy-*ent*-pimara-15-en-19-ol (*ent*-thermarol, 15 mg), 4β-hydroxy-19-nor(-)-pimara-8(14),15-diene (7 mg), 4-epiruillopezol (7 mg), lignoceric acid (80 mg), (+)-spathulenol (5 mg), dehydrofalcariindiol (10 mg), D-fructose (100 mg), chlorogenic acid (5-caffeoylquinic acid, 500 mg), 3,5-di-*O*-caffeoylquinic acid (10 mg), neochlorogenic acid (3-caffeoylquinic acid, 10 mg), sucrose (100 mg), caffeic acid (10 mg), cryptochlorogenic acid (4-caffeoylquinic acid, 10 mg), 1-kestose [*O*-β-D-fructofuranosyl-(2→1)-β-D-fructofuranosyl-(2→1)-α-D-glucopyranoside, 260 mg], methyl-α-D-fructofuranoside (210 mg), protocatechuic acid (200 mg), thymidine (20 mg), uridine (20 mg) 그리고 methyl-β-D-fructofuranoside (30 mg)을 분리하였다 (Scheme 3, 4). 분리 정제된 생리활성성분을 생리활성성분 분석팀 및 효능확인연구팀에 연구용 시료로 제공하였다(표 1-3).

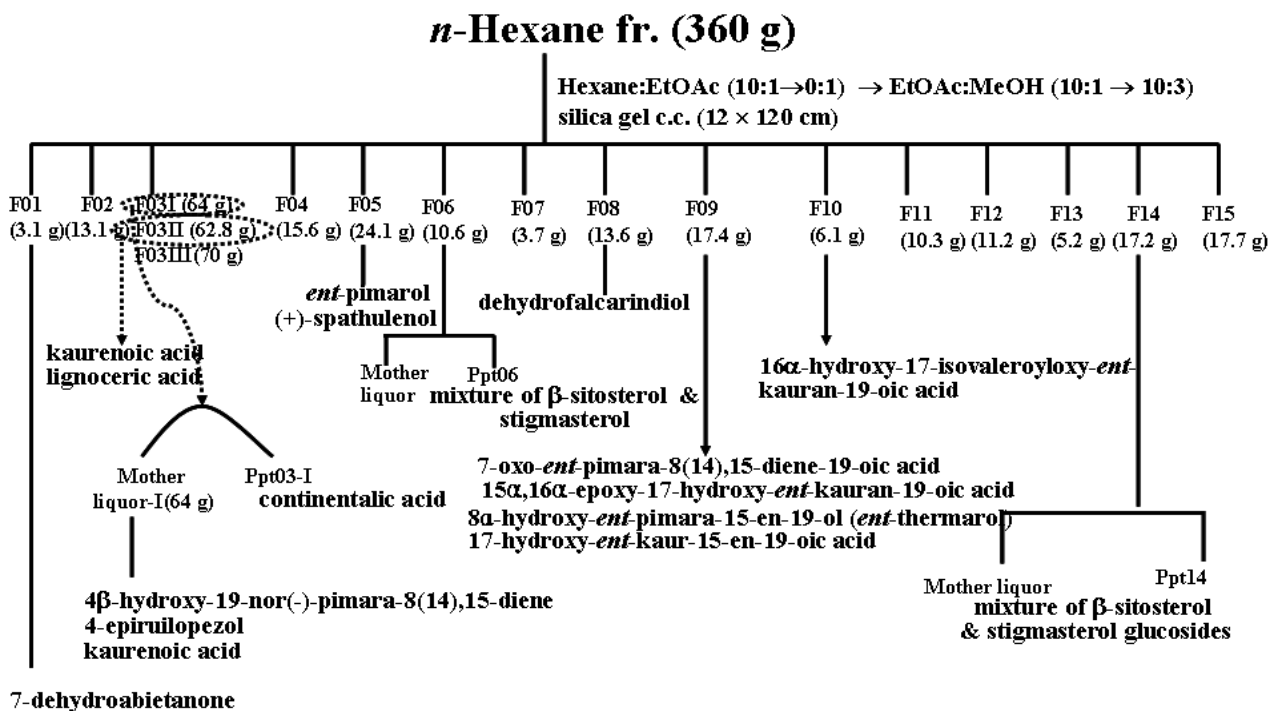
#### (나) 활성 화합물의 화학구조 결정

순수 분리된 성분들의 물리화학적 성질을 검토하면서 Mass Spectrometry, IR Spectrophotometry, UV Spectrophotometry, <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR등의 각종 분광학적 방법에 의해 얻은 스펙트럼을 분석하였다. 특히 NMR을 이용한 측정을 통해 화학구조를 결정하였다. 그리고 가수분해, acetylation 및 methylation등의 반응을 통해 유도체를 만들어 화학구조를 결정하는데 이용하였다.

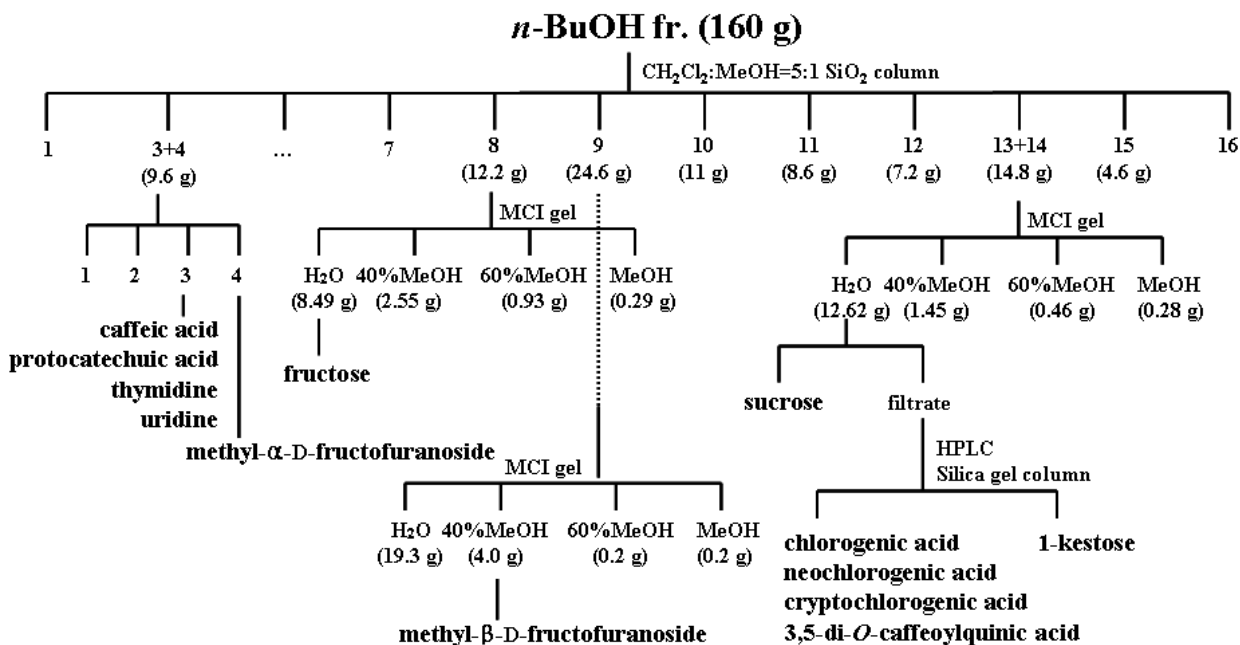
표 1. 산지별/기원별 수집한 황련, 독활의 70% EtOH 추출물

	기원식물학명	산지	수율 (%)
No. 1	<i>Aralia contimemtalis</i> Kitagawa.	전북 무주	2006년산 19.8
No. 2	<i>Angelica pubescens</i> f. <i>biserrata</i> .	중국	서녕시장 30.6
No. 3	<i>Angelica pubescens</i> f. <i>biserrata</i> .	중국 호북성	안국시장 20.6
No. 4	<i>Angelica pubescens</i> f. <i>biserrata</i> .	중국	영천시장 13.9
No. 5	<i>Aralia contimemtalis</i> Kitagawa.	전북 진안	서울시장 11.3
No. 6	<i>Aralia contimemtalis</i> Kitagawa.	전북 임실	서울시장 16.2
No. 7	<i>Picrorrhiza kurrooa</i> . (호황련)	중국 서장	안국시장 20.6
No. 8	<i>Coptis chinensis</i> . (모황련)	중국 사천	서울시장 5.9
No. 9	<i>Coptis chinensis</i> . (황련)	중국 사천	서울시장 9.5
No. 10	<i>Coptis chinensis</i> . (황련)	중국 사천	안국시장 10.8
No. 11	<i>Coptis chinensis</i> . (황련)	중국 사천	안국시장 14.9
No. 12	<i>Coptis chinensis</i> . (황련)	중국 사천	서녕시장 10.3
No. 13	<i>Jeffersonia dubia</i> . (조황련)	-	영천시장 10.2





Scheme 3. Isolation of compounds from the *n*-hexane fraction of *Aralia continentalis*.



Scheme 4. Isolation of compounds from the *n*-BuOH fraction of *Aralia continentalis*.

표 2. 효능확인용 사업단 제공 현황

화 합 물 명	제공한 무게 (mg)
coptisine	1430
pinoresinol	11.3
isolariciresinol	4.7
epiberberine	595
jateorrhizine	4.5
berberine	12000
palmatine	3560
magnoflorine	40
groenlandicine	91
$\beta$ -sitosterol	111
ferulic acid methyl ester	10
3-(3',4'-dihydroxyphenyl)lactic acid methylester	10
<i>ent</i> -pimara-8(14),15-diene-19-oic acid (continentalic acid)	10145
7 $\beta$ -hydroxy- <i>ent</i> -pimara-8(14),15-diene-19-oic acid	38.95
7-oxo- <i>ent</i> -pimara-8(14),15-diene-19-oic acid	20.49
16 $\alpha$ -methoxy-17-hydroxy- <i>ent</i> -kauran-19-oic acid	7.85
15 $\alpha$ ,16 $\alpha$ -epoxy-17-hydroxy- <i>ent</i> -kauran-19-oic acid	35.87
16 $\alpha$ ,17-dihydroxy- <i>ent</i> -kauran-19-oic acid	18.25
mixture (3:2) of stigmasta-5-en-3 $\beta$ -ol ( $\beta$ -sitosterol) and stigmasta-5,22-dien-3 $\beta$ -ol (stigmasterol)	500
mixture (9:1) of daucosterol ( $\beta$ -sitosterol glucoside) and stigmasterol glucoside	1000
7-dehydroabietanone	4
16 $\alpha$ -hydroxy-17-isovaleryloxy- <i>ent</i> -kauran-19-oic acid	40
<i>ent</i> -kaur-16-en-19-oic-acid (kaurenoic acid)	736
<i>ent</i> -pimara-8(14),15-diene-19-ol ( <i>ent</i> -pimarol)	20
4 $\beta$ -hydroxy-19-nor(-)-pimara-8(14),15-diene	7
4-epiruilopezol	7
lignoceric acid	20
(+)-spathulenol	5
dehydrofalcarindiol	5
17-Hydroxy- <i>ent</i> -kaur-15-en-19-oic acid	5
8 $\alpha$ -Hydroxy- <i>ent</i> -pimara-15-en-19-ol ( <i>ent</i> -thermarol)	5
D-fructose	100
chlorogenic acid (5-caffeoylquinic acid)	100
3,5-di-O-caffeoylquinic acid	10
neochlorogenic acid (3-caffeoylquinic acid)	10
sucrose	100
caffeic acid	10
cryptochlorogenic acid (4-caffeoylquinic acid)	10
1-kestose [ <i>O</i> - $\beta$ -D-fructofuranosyl-(2 $\rightarrow$ 1)- $\beta$ -D-fructofuranosyl-(2 $\rightarrow$ 1)- $\alpha$ -D-glucopyranoside]	20
methyl- $\alpha$ -D-fructofuranoside	20
protocatechuic acid	50
methyl- $\beta$ -D-fructofuranoside	10
thymidine	10
uridine	10



표 3. HPLC 분석팀 제공 화합물 현황

화합물명	무게 (mg)
coptisine	10
palmatine	10
berberine	10
magnoflorine	10
epiberberine	10
groenlandicine	10
<i>ent</i> -pimara-8(14),15-diene-19-ol ( <i>ent</i> -pimarol)	5
16 $\alpha$ -hydroxy-17-isovaleryloxy- <i>ent</i> -kauran-19-oic acid	5
<i>ent</i> -pimara-8(14),15-diene-19-oic acid (continentalic acid)	10

표 4. 식품의약품안전청 제출 시료

화 합 물 명	제공한 무게 (mg)	순도 (%)
coptisine	40	95.4
pinoresinol	10	95.0
epiberberine	10	95.0
jateorrhizine	10	95.0
berberine	3000	98.1
palmatine	3000	95.4
magnoflorine	10	95.4
groenlandicine	10	99.4
$\beta$ -sitosterol	10	99.8
ferulic acid methyl ester	10	99.8
<i>ent</i> -pimara-8(14),15-diene-19-oic acid (continentalic acid)	3000	99.8
16 $\alpha$ -hydroxy-17-isovaleryloxy- <i>ent</i> -kauran-19-oic acid	10	95.4
<i>ent</i> -kaur-16-en-19-oic-acid (kaurenoic acid)	3000	99.8
lignoceric acid	10	99.8
chlorogenic acid (5-caffeoylquinic acid)	10	99.4
3,5-di-O-caffeoylquinic acid	10	99.8
neochlorogenic acid (3-caffeoylquinic acid)	10	99.8
caffeic acid	10	99.8
cryptochlorogenic acid (4-caffeoylquinic acid)	10	99.4
1-kestose [O- $\beta$ -D-fructofuranosyl-(2 $\rightarrow$ 1)- $\beta$ -D-fructofuranosyl-(2 $\rightarrow$ 1)- $\alpha$ -D-glucopyranoside]	10	99.8
methyl- $\alpha$ -D-fructofuranoside	10	98.8
protocatechuic acid	10	95.4
methyl- $\beta$ -D-fructofuranoside	10	98.8

(다) 황련으로부터 분리된 화합물의 분광학적 자료

**1. Berberine**

mp 203-204°C; <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) : δ 9.75 (1H, s, H-8), 8.69 (1H, s, H-13), 8.10 (1H, d, *J* = 8.3 Hz, H-11), 7.98 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-12), 7.64 (1H, s, H-1), 6.94 (1H, s, H-4), 6.09 (2H, s, OCH<sub>2</sub>O), 4.91 (2H, t, *J* = 6.4, H-6), 4.18 (3H, s, 9-OCH<sub>3</sub>), 4.09 (3H, s, 10-OCH<sub>3</sub>), 3.24 (2H, t, *J* = 6.4 Hz, H-5); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD) : δ 151.0 (C-10), 150.8 (C-3), 148.7 (C-2), 144.6 (C-9), 145.2 (C-8), 138.5 (C-13a), 134.0 (C-12a), 130.7 (C-4a), 126.8(C-11), 123.3(C-12), 122.1 (C-8a), 120.7 (C-13b), 120.3 (C-13), 108.2 (C-4), 105.3 (C-1), 102.5 (OCH<sub>2</sub>O), 61.3 (C-9, OCH<sub>3</sub>), 56.4 (C-10, OCH<sub>3</sub>), 56.0 (C-6), 27.0 (C-5).

**2. Magnoflorine**

mp 248-249°C; <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 6.65 (1H, d, *J* = 6.5 Hz, H-9), 6.46 (1H, d, *J* = 6.5 Hz, H-8), 6.45 (1H, s, H-3), 3.78 (3H, s, 10-OCH<sub>3</sub>), 3.80 (1H, m, C-6), 3.80 (3H, s, 2-OCH<sub>3</sub>), 3.45 (1H, m, H-5), 3.23 (1H, m, H-5), 3.23 (3H, s, N<sup>+</sup>CH<sub>3</sub>), 3.10 (1H, m, H-4), 2.93 (1H, dd, *J* = 3.2, 12.3 Hz, H-7), 2.77 (3H, s, N<sup>+</sup>CH<sub>3</sub>), 2.58 (1H, m, H-4), 2.42 (1H, br t, *J* = 12.3, 13.6 Hz, H-7); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 151.9 (C-2), 150.5 (C-10), 149.4 (C-1), 148.4 (C-11), 124.8 (C-7a), 122.4 (C-11b), 122.3 (C-11a), 119.8 (C-6b), 115.9 (C-8), 114.7 (C-3a), 109.4 (C-9), 108.3 (C-3), 69.9 (C-6a), 61.12 (C-5), 55.1 (2-OCH<sub>3</sub>), 54.8 (10-OCH<sub>3</sub>), 52.7 (N<sup>+</sup>CH<sub>3</sub>), 42.8 (N<sup>+</sup>CH<sub>3</sub>), 30.5 (C-7), 23.5 (C-4).

**3. Groenlandicine**

mp 175-178°C; <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) : δ 9.62 (1H, s, H-8), 8.69 (1H, s, H-13), 7.86 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-11), 7.82 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-12), 7.60 (1H, s, H-1), 6.83 (1H, s, H-4), 6.43 (2H, s, OCH<sub>2</sub>O), 4.89 (2H, m, H-6), 3.99 (2-OCH<sub>3</sub>), 3.28 (H-5); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD) : δ 150.8 (C-3), 148.5 (C-2), 147.7 (C-10), 144.4 (C-9), 143.9 (C-8), 138.4 (C-13a), 133.5 (C-12a), 129.0 (C-4a), 121.7 (C-12), 121.0 (C-11), 120.6 (C-13), 118.1 (C-13b), 114.7 (C-4), 112.4 (C-8a), 108.6 (C-1), 104.8 (OCH<sub>2</sub>O), 56.2 (C-6), 55.7 (2- OCH<sub>3</sub>), 26.4 (C-5).

**4. Jateorrhizine**

mp 203-205°C; <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) : δ 9.71 (1H, s, H-8), 8.74 (1H, s, H-13), 8.08 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-11), 7.97 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-12), 7.63 (1H, s, H-1), 6.84 (1H, s, H-4), 4.48 (2H, m, H-6), 4.18 (3H, s, 9-OCH<sub>3</sub>), 4.09 (3H, s, 10-OCH<sub>3</sub>), 4.00 (3H, s, 2-OCH<sub>3</sub>), 3.18 (2H, m, H-5); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD) : δ 150.6 (C-9), 150.5 (C-2), 148.4 (C-3), 145.0(C-8), 144.5 (C-10), 139.1 (C-13a), 134.2 (C-12a), 129.1 (C-4a), 126.8 (C-12), 123.1(C-11), 122.0 (C-13b), 119.7 (C-13), 118.2 (C-8a), 114.7 (C-4), 108.8 (C-1), 61.3 (9-OCH<sub>3</sub>), 55.7 (10-OCH<sub>3</sub>), 56.4 (2-OCH<sub>3</sub>), 56.2 (C-6), 26.4 (C-5).

**5. Coptisine**

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) : δ 9.71 (1H, s, H-8), 8.71 (1H, s, H-13), 7.87 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-11), 7.83 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-12), 7.63 (1H, s, H-1), 6.84 (1H, s, H-4), 6.45 (2H, s, OCH<sub>2</sub>O), 6.09 (2H, s, OCH<sub>2</sub>O), 4.89 (2H, m, H-6), 3.23 (2H, m, H-5); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD) : δ 151.0 (C-10), 148.8 (C-3), 148.1 (C-2), 144.6 (C-8), 144.1 (C-9), 137.8 (C-13a), 133.2 (C-12a), 130.6 (C-4a), 121.9 (C-12), 121.6

(C-13b), 120.7 (C-13), 120.7 (C-11), 112.5 (C-8a), 108.2 (C-4), 105.3 (C-1), 105.0 (OCH<sub>2</sub>O), 102.5 (OCH<sub>2</sub>O), 56.0 (C-6), 27.0 (C-5).

## 6. Palmatine

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) : δ 9.78 (1H, s, H-8), 8.88 (1H, s, H-13), 8.10 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-11), 8.00 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-12), 7.63 (1H, s, H-1), 7.03 (1H, s, H-4), 4.87 (2H, m, H-6), 4.19 (3H, s, 9-OCH<sub>3</sub>), 4.08 (3H, s, 10-OCH<sub>3</sub>), 3.97 (3H, s, 2-OCH<sub>3</sub>), 3.92 (3H, s, 3-OCH<sub>3</sub>), 3.52 (2H, m, H-5); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD) : δ 152.6 (C-3), 150.7 (C-10), 149.7 (C-2), 145.2(C-8), 144.5 (C-9), 138.6 (C-13a), 134.0 (C-12a), 128.9 (C-4a), 126.8 (C-12), 123.3(C-11), 122.1 (C-13b), 120.1 (C-13), 119.3 (C-8a), 111.0 (C-4), 108.7 (C-1), 61.3 (9-OCH<sub>3</sub>), 56.4 (10-OCH<sub>3</sub>), 56.1 (2-OCH<sub>3</sub>), 55.8 (3-OCH<sub>3</sub>), 55.4 (C-6), 26.6 (C-5)  
LC-ESI-MS/MS *m/z* 352 [M]<sup>+</sup>, 337, 322, 308.

## 7. Epiberberine

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) : δ 9.70 (1H, s, H-8), 8.81 (1H, s, H-13), 7.88 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-11), 7.83 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-12), 7.63 (1H, s, H-1), 7.03 (1H, s, H-4), 6.45 (2H, s, OCH<sub>2</sub>O), 4.88 (2H, m, H-6), 3.97 (3H, s, 2-OCH<sub>3</sub>), 3.92 (3H, s, 3-OCH<sub>3</sub>), 3.26 (2H, m, H-5); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD) : δ 152.6 (C-3), 149.7 (C-2), 147.9 (C-10), 144.5 (C-9), 144.1 (C-8), 137.9 (C-13a), 133.3 (C-12a), 128.7 (C-4a), 121.8(C-12), 121.1(C-11), 121.0 (C-13), 119.3 (C-13b), 112.5 (C-8a), 111.0 (C-4), 108.5 (C-1), 104.9 (OCH<sub>2</sub>O), 56.2 (C-6), 55.8 (2-OCH<sub>3</sub>), 55.5 (3-OCH<sub>3</sub>), 26.5 (C-5).

## 8. Isolariciresinol

mp 157-158°C; UV max (MeOH): 205, 285 nm; <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) : δ 6.73 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-6'), 6.66 (1H, s, H-2'), 6.64 (1H, s, H-5), 6.60 (1H, d, *J* = 6.0 Hz, C-5'), 6.17 (1H, s, H-2), 3.80 (1H, s, H-7'), 3.80 (3H, s, 3-OCH<sub>3</sub>), 3.79 (3H, s, 3'-OCH<sub>3</sub>), 3.69 (1H, dd, *J* = 4.9, 11.0 Hz, H-9), 3.66 (1H, d, *J* = 4.3 Hz, H-9'), 3.64 (1H, d, *J* = 1.6 Hz, H-9), 3.39 (1H, dd, *J* = 4.0, 11.0 Hz, H-9'), 2.77 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-7), 2.00 (1H, m, H-8); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD) : δ 147.8 (C-3'), 146.0 (C-3), 144.7 (C-4'), 144.1 (C-4), 137.4 (C-1'), , 132.9 (C-6), 127.8 (C-1), 122.0 (C-5'), 116.1 (C-2), 114.8 (C-6), 112.5 (C-2'), 111.1 (C-5), 64.7 (C-9), 60.9 (C-9'), 55.2 (3-OCH<sub>3</sub>), 55.1 (3'-OCH<sub>3</sub>), 48.4 (C-7'), 48.2 (C-8'), 38.8 (C-8), 32.4 (C-7).

## 9. Pinoresinol

mp 120-121°C; UV max (MeOH): 205, 233, 281 nm; <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) : δ 6.93 (2H, d, *J* = 2.0 Hz, H-2 and H-2'), 6.80 (2H, d, *J* = 1.6 Hz, H-5 and H-5'), 6.79 (2H, dd, *J* = 1.6, 4.0 Hz, H-6 and H-6'), 4.82 (2H, s, H-7 and H-7'), 4.21 (2H, dd, *J* = 2.8, 8.0 Hz, H-9a and H-9'a), 3.83 (6H, s, 3-OCH<sub>3</sub> and 3'-OCH<sub>3</sub>), 3.81 (2H, dd, *J* = 4.0, 8.0 Hz, H-9b and H-9'b), 3.12 (2H, *m*, H-8 and H-8'); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD) : δ 146.9 (C-3 and C-3'), 145.4 (C-4 and C-4'), 133.1 (C-1 and C-1'), 119.2 (C-6 and C-6'), 114.5 (C-5 and C-5'), 108.8 (C-2 and C-2'), 86.1 (C-7 and C-7'), 71.9 (C-9 and C-9'), 56.2 (3-OCH<sub>3</sub> and 3'-OCH<sub>3</sub>), 54.4 (C-8 and C-8').

## 10. Stigmasta-5-en-3β-ol (β-sitosterol)

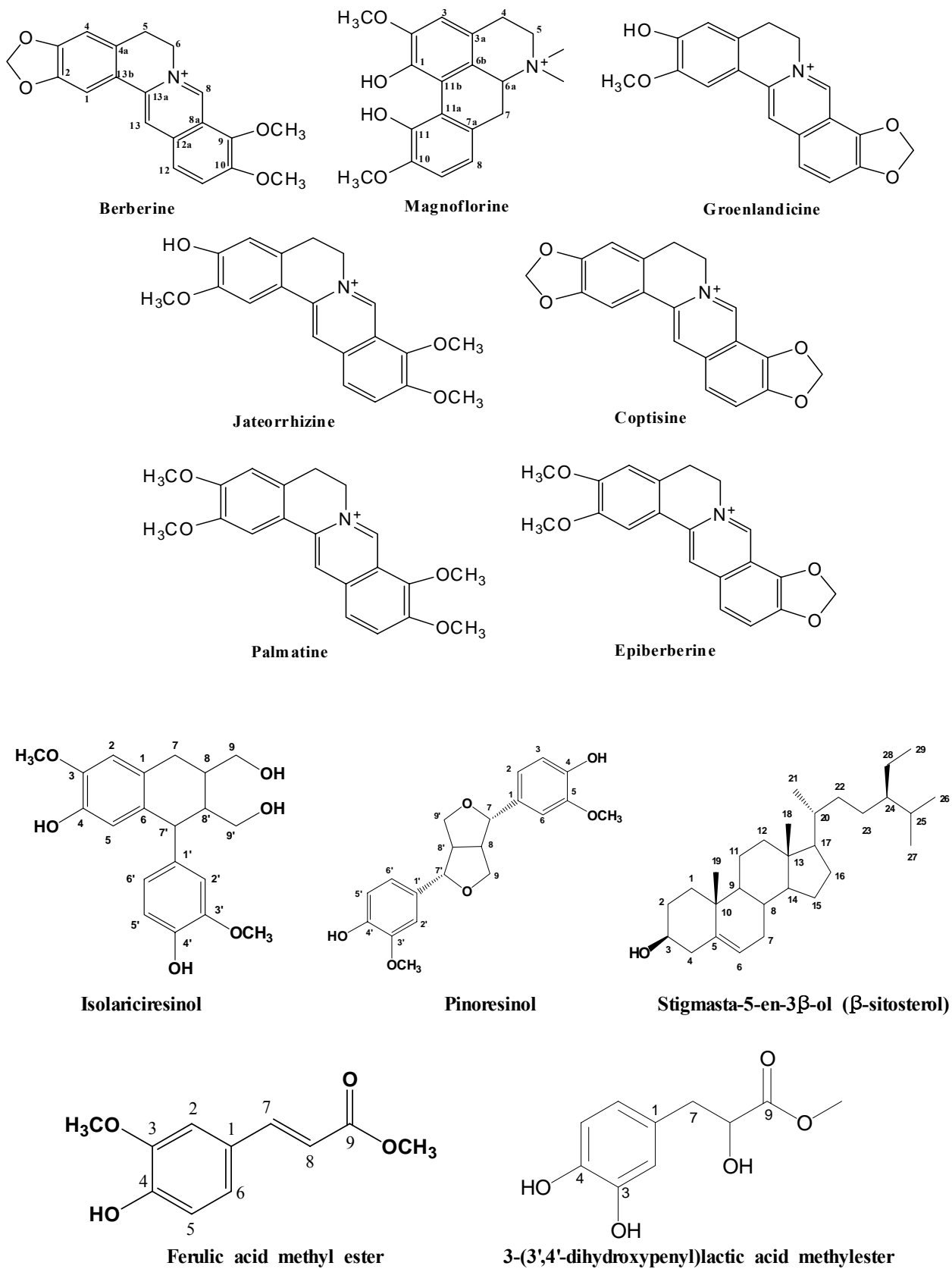
white powder; mp 136-140°C;  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  0.68 (3H, s, H-18), 0.82 (3H, t,  $J = 6.6$  Hz, H-29), 0.83 (3H, d,  $J = 6.8$  Hz, H-26), 0.84 (3H, d,  $J = 6.4$  Hz, H-27), 0.92 (3H, d,  $J = 6.4$  Hz, H-21), 1.01 (3H, s, H-19), 3.52 (1H, m, H-3), 5.35 (1H, br d,  $J = 5.4$  Hz, H-6);  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  11.8 (C-18), 12.0 (C-29), 18.8 (C-21), 19.0 (C-26), 19.4 (C-19), 19.8 (C-27), 21.1 (C-11), 23.0 (C-28), 24.3 (C-15), 26.0 (C-23), 28.2 (C-16), 29.1 (C-25), 31.6 (C-2), 31.9 (C-7), 31.9 (C-8), 33.9 (C-22), 36.1 (C-20), 36.5 (C-10), 37.2 (C-1), 39.8 (C-12), 42.3 (C-4), 42.3 (C-13), 45.8 (C-24), 50.1 (C-9), 56.0 (C-17), 56.7 (C-14), 71.8 (C-3), 121.7 (C-6), 140.7 (C-5); EIMS  $m/z$  (relative intensity) 414 ( $\text{M}^+$ , 74), 396 (32), 381 (23), 329 (37), 303 (23), 255 (47).

#### 11. Ferulic acid methyl ester

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  7.56 (1H, d,  $J=15.8$  Hz, H-7), 7.32 (1H, s, H-5), 7.12 (1H, d,  $J=7.9$  Hz, H-6), 6.79 (1H, d,  $J=8.3$  Hz, H-2), 6.48 (1H, d,  $J=16.3$ , H-8), 3.81 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ ), 3.69 (3H, s,  $-\text{OCH}_3$ );  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  167.1 (C-9), 149.4 (C-4), 147.9 (C-3), 145.1 (C-7), 125.6 (C-1), 123.2 (C-6), 115.5 (C-2), 114.2 (C-8), 111.3 (C-5), 55.7 ( $\text{OCH}_3$ ), 51.3 ( $-\text{OCH}_3$ ).

#### 12. 3-(3',4'-dihydroxyphenyl)lactic acid methylester

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  6.66 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-5), 6.65 (1H, d,  $J = 2.0$  Hz, H-2), 6.49 (1H, dd,  $J = 2.0, 8.0$  Hz, H-6), 4.37 (1H, dd,  $J = 5.0, 7.0$  Hz, H-8), 3.69 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ ), 2.92 (1H, dd,  $J = 5.0, 14.0$  Hz, H-7a), 2.75 (1H, dd,  $J = 7.0, 14.0$  Hz, H-7b);  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  174.7 (C-9), 143.6 (C-3), 142.9 (C-4), 128.4 (C-1), 121.5 (C-6), 116.7 (C-2), 115.5 (C-5), 71.5 (C-8), 52.5 ( $\text{OCH}_3$ ), 39.6 (C-7).



**Fig. 1.** Structure of isolated alkaloids from *Coptis chinensis*.

## (라) 독활로부터 분리된 화합물의 분광학적 자료

### 1. *ent*-Pimara-8(14),15-diene-19-oic acid (continentalic acid)

colorless needles; mp 165-166°C; <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 5.71 (1H, dd, *J* = 10.6, 17.2 Hz, H-15), 5.14 (1H, br d, *J* = 1.2 Hz, H-14), 4.94 (1H, dd, *J* = 2.2, 11.2 Hz, H-16b), 4.91 (1H, dd, *J* = 2.1, 17.1, H-16a), 2.34 (1H, ddd, *J* = 2.4, 4.2, 13.8 Hz, H-12b), 2.17 (1H, br d, *J* = 13.5 Hz, H-3b), 1.98 (1H, td, *J* = 5.1, 13.8, H-12a), 1.84-1.92 (2H, m, H-6), 1.78-1.82 (1H, m, H-2b,11b), 1.74 (1H, m, H-1b), 1.70 (1H, m, H-9), 1.5-1.6 (1H, m, H-7a), 1.46-1.51 (1H, m, H-11a), 1.22-1.32 (1H, m, H-2a), 1.28 (1H, dd, *J* = 3.0, 14.4, H-5), 1.26 (3H, s, H-18), 1.17-1.24 (1H, m, H-7b), 1.05 (1H, dt, *J* = 3.9, 13.5, H-1a, 3a), 1.00 (3H, s, H-17), 0.65 (3H, s, H-20); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 184.6 (COOH), 147.1 (C-15), 137.9 (C-8), 128.0 (C-14), 112.9 (C-16), 56.1 (C-5), 50.5 (C-9), 44.0 (C-4), 39.2 (C-1), 39.2 (C-10), 38.5 (C-13), 37.9 (C-3), 36.4 (C-12), 35.8 (C-7), 29.3 (C-17), 29.2 (C-18), 24.1 (C-6), 19.6 (C-11), 19.2 (C-2), 13.8 (C-20).

### 2. 7-Oxo-*ent*-pimara-8(14),15-diene-19-oic acid

colorless needles; mp 216-218°C; <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, Pyridine-*d*<sub>5</sub>): δ 6.82 (1H, s, H-14), 5.68 (1H, dd, *J* = 10.2, 16.2 Hz, H-15), 5.00 (1H, dd, *J* = 1.4, 10.2 Hz, H-16b), 4.79 (1H, dd, *J* = 1.4, 16.2 Hz, H-16a), 3.71 (1H, dd, *J* = 13.6, 19.2 Hz, H-6b), 3.11 (1H, dd, *J* = 5.1, 19.2 Hz, H-6a), 2.46 (1H, brd, *J* = 13.2 Hz, H-3b), 2.19 (1H, dt, *J* = 3.3, 13.6 Hz, H-2b), 1.99 (1H, m, H-9), 1.74 (1H, brd, *J* = 12.5 Hz, H-1b), 1.71 (1H, brd, *J* = 13.5 Hz, H-5), 1.55-1.60 (1H, m, H-12b), 1.51-1.60 (2H, m, H-11b, H-2a), 1.30 (3H, s, H-18), 1.26-1.32 (1H, m, H-12a), 1.05-1.11 (2H, m, H-1a, H-3a), 1.05 (3H, s, H-17), 0.94 (3H, s, H-20); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, Pyridine-*d*<sub>5</sub>): δ 199.7 (C-7), 179.5 (COOH), 146.1 (C-15), 141.5 (C-14), 137.7 (C-8), 114.1 (C-16), 51.4 (C-5), 50.3 (C-9), 43.9 (C-10), 39.3 (C-6), 39.2 (C-13), 39.0 (C-1), 38.6 (C-3), 37.2 (C-4), 35.0 (C-12), 28.6 (C-18), 28.2 (C-17), 20.2 (C-2), 19.1 (C-11), 13.0 (C-20); EIMS *m/z* 316 [M]<sup>+</sup> (45), 301 [M - CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (14), 288 [M - CO]<sup>+</sup> (3), 270 [M - (COOH + H)]<sup>+</sup> (35), 255 (22), 162 (62), 149 (100), 133 (68), 105 (88), 91 (100).

### 3. 15α, 16α-Epoxy-17-hydroxy-*ent*-kauran-19-oic acid

colorless needles; mp 112-114°C; <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, pyridine-*d*<sub>5</sub>): δ 4.42 (1H, d, *J* = 12.8, H-17b), 4.02 (1H, d, *J* = 12.8, H-17a), 3.08 (1H, s, H-15), 2.55 (1H, brs, H-13), 2.46 (1H, brd, *J* = 12.8 Hz, H-7b), 2.25 (1H, dt, *J* = 3.5, 10.3 Hz, H-2b), 2.02-2.10 (2H, m, H-6b, H-14b), 1.84-1.91 (2H, m, *J* = 3.5, 10.3 Hz, H-6a, H-3b), 1.73-1.76 (1H, m, H-1b), 1.39-1.68 (7H, m, H-12b, H-3a, H-2a, H-11, H-14a, H-12a), 1.34 (3H, s, H-18), 1.18 (3H, s, H-20), 1.04-1.17 (3H, m, H-7a, H-5, H-9), 0.85 (1H, ddd, *J* = 3.6, 13.5, 13.5, H-1a); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, pyridine-*d*<sub>5</sub>): δ 181.0 (COOH), 65.8 (C-16), 65.0 (C-15), 60.0 (C-17), 56.7 (C-5), 49.6 (C-9), 43.9 (C-4), 43.6 (C-8), 40.1 (C-1), 39.7 (C-10), 38.7 (C-3), 36.4 (C-7), 35.9 (C-13), 32.5 (C-14), 29.3 (C-18), 26.9 (C-12), 21.5 (C-6), 19.7 (C-2), 18.6 (C-11), 15.7 (C-20).

### 4. Mixture (3:2) of Stigmasta-5-en-3β-ol (β-sitosterol) and (24E)-Stigmasta-5,22-dien-3β-ol (stigmasterol)

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 0.68 (3H, s, H-18), 0.82 (3H, t, *J* = 6.6 Hz, H-29), 0.83 (3H, d, *J* = 6.8 Hz, H-26), 0.84 (3H, d, *J* = 6.4 Hz, H-27), 0.92 (3H, d, *J* = 6.4 Hz, H-21), 1.01 (3H, s, H-19), 3.52 (1H, m, H-3), 5.35 (1H, br d, *J* = 5.4 Hz, H-6); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 11.8 (C-18), 12.0 (C-29), 18.8 (C-21), 19.0 (C-26), 19.4 (C-19), 19.8 (C-27), 21.1 (C-11), 23.0 (C-28), 24.3 (C-15), 26.0 (C-23), 28.2 (C-16),

29.1 (C-25), 31.6 (C-2), 31.9 (C-7), 31.9 (C-8), 33.9 (C-22), 36.1 (C-20), 36.5(C-10), 37.2 (C-1), 39.8 (C-12), 42.3 (C-4), 42.3 (C-13), 45.8 (C-24), 50.1 (C-9), 56.0 (C-17), 56.7 (C-14), 71.8 (C-3), 121.7(C-6), 140.7 (C-5) EIMS  $m/z$  (relative intensity) 414 ( $M^+$ ,74), 396 (32), 381(23), 329 (37), 303 (23), 255 (47). ( $\beta$ -sitosterol)

$^1\text{H-NMR}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  0.67 (3H, s, H-18), 0.78 (3H, t,  $J = 6.3$  Hz,H-29), 0.83 (3H, d,  $J = 6.8$  Hz, H-26), 0.86 (3H, d,  $J = 6.4$  Hz, H-27), 1.00 (3H, s, H-19), 1.01 (3H, d,  $J = 6.6$  Hz, H-21), 3.53 (1H, m, H-3), 5.35 (1H, br d,  $J = 5.4$  Hz, H-6);  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  12.0 (C-18), 12.2 (C-29), 19.0 (C-26), 19.4 (C-19), 21.0 (C-11), 21.1 (C-27), 21.2 (C-21), 24.3 (C-15), 25.4 (C-28),28.9 (C-16), 31.6 (C-2), 31.9 (C-7), 31.9 (C-8), 31.9 (C-25), 36.5 (C-10), 37.2 (C-1), 39.7 (C-12), 40.5(C-20), 42.2 (C-13), 42.3 (C-4), 50.1 (C-9), 51.2 (C-24), 55.9(C-17),56.9 (C-14), 71.8 (C-3), 121.7 (C-6), 129.2 (C-23), 138.3 (C-22), 140.7 (C-5) EIMS  $m/z$  (relative intensity) 412 ( $M^+$ , 38), 369 (6), 351(11), 300 (15), 255 (47), 213 (48), 105 (76). (stigmasterol)

### 5. Mixture (9:1) of daucosterol ( $\beta$ -sitosterol glucoside) and stigmasterol glucoside

$^1\text{H-NMR}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  0.69 (3H, s, H-18), 0.88 (3H, t,  $J = 7.5$  Hz,H-29), 0.93(3H, d,  $J = 6.8$  Hz, H-26), 0.88 (3H, d,  $J = 6.4$  Hz, H-27), 0.95 (3H, s, H-19), 1.09 (3H, d,  $J = 6.5$  Hz, H-21), 4.32 (1H, m, H-3), 4.85 (1H, d,  $J = 7.6$  Hz, H-1'), 5.37 (1H, m, H-6);  $^{13}\text{C-NMR}$  (100MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  12.2 (C-18), 12.5 (C-29), 19.2 (C-21), 19.4 (C-26), 20.0 (C-19), 21.3 (C-27), 21.5 (C-11), 23.4 (C-28), 25.7 (C-15), 28.6 (C-23), 29.3 (C-16), 29.5 (C-25), 30.3 (C-2), 32.2 (C-7), 32.2 (C-8), 34.2 (C-22), 36.9 (C-10), 37.5 (C-1), 39.4 (C-12), 36.4 (C-20), 42.4 (C-13), 40.0 (C-4), 46.1 (C-24), 51.4 (C-9), 56.2 (C-17),56.9 (C-14), 62.8 (C-6'), 71.7 (C-4'), 75.4 (C-2'), 78.5 (C-5'), 78.6 (C-3), 78.6 (C-3'), 102.6 (C-1'), 121.9 (C-6), 140.9 (C-5). ( $\beta$ -sitosterol glucoside)

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  0.67 (3H, s, H-18), 0.82 (3H, t,  $J = 6.6$  Hz, H-29), 0.83 (3H, d,  $J = 6.8$  Hz, H-26), 0.84 (3H, d,  $J = 7.7$  Hz, H-27), 0.93 (3H, s, H-19), 1.02 (3H, d,  $J = 6.4$  Hz, H-21), 4.32 (1H, m, H-3), 4.89 (1H, d,  $J = 7.9$  Hz, H-1'), 5.35 (1H, m, H-6);  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  12.0 (C-18),12.2 (C-29), 19.0 (C-21), 19.2 (C-27), 19.4 (C-19), 20.0 (C-26), 21.3 (C-11), 24.5 (C-15), 30.0 (C-28), 29.5 (C-16), 26.4(C-25), 28.6 (C-2), 32.1 (C-7), 32.1 (C-8), 36.4 (C-20), 36.9 (C-10), 37.5 (C-1), 39.8 (C-12), 39.4 (C-4), 41.8 (C-13), 42.5 (C-24), 50.4 (C-9), 56.1 (C-17), 56.8 (C-14), 62.8 (C-6'), 71.7 (C-4'), 75.4 (C-2'), 78.1 (C-3), 78.1 (C-5'), 78.5 (C-3'), 102.6 (C-1'), 121.9 (C-6), 129.4 (C-23), 138.8 (C-22), 140.9 (C-5). (stigmasterolglucoside)

### 6. 17-Hydroxy-*ent*-kaur-15-en-19-oic acid

amorphous powder; mp 129-131°C;  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, pyridine- $d_5$ ):  $\delta$  5.61 (1H, s, H-15), 4.47 (1H, d,  $J = 1.5$  Hz, H-17), 2.66 (1H, brs, H-13), 2.45 (1H, brd,  $J = 13.2$  Hz, H-7b), 2.27 (1H, dt,  $J = 3.5, 10.3$  Hz, H-2b), 2.14 (1H, dd,  $J = 3.3, 12.5$  Hz, H-6b), 2.10 (1H, d,  $J = 10.9$  Hz, H-14b), 2.20 (1H, dd,  $J = 2.5, 12.5$  Hz, H-6a), 1.85 (1H, brd,  $J = 12.9$  Hz, H-1b), 1.65-1.70 (1H, m, H-3b), 1.58-1.60 (1H, m, H-12b), 1.55-1.60 (1H, m, H-3a), 1.45-1.52 (1H, m, H-2a, H-11), 1.40-1.48 (1H, m, H-14a), 1.38-1.42(1H, m, H-12a), 1.34 (3H, s, H-18), 1.19 (3H, s, H-20), 1.04-1.10 (3H, m, H-7a, H-5, H-9), 0.83 (1H, ddd,  $J = 4.0, 13.5, 13.5$  Hz, H-1a);  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz, pyridine- $d_5$ ):  $\delta$  180.1 (COOH), 148.0 (C-16), 134.9 (C-15), 60.6 (C-17),

56.8(C-5), 49.2 (C-8), 48.1 (C-9), 44.3 (C-14), 43.9 (C-4), 41.5 (C-13), 41.1 (C-1), 40.2 (C-10), 39.9 (C-3), 38.7 (C-7), 29.3 (C-18), 25.9 (C-12), 21.6 (C-6), 19.9 (C-2), 19.2 (C-11), 15.9 (C-20); EIMS  $m/z$  318 [M]<sup>+</sup> (13), 300 [M - H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> (25), 285 [M - CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (22), 193 (40), 91 (100).

### 7. 7-Dehydroabietanone

colorless solid; mp 85-87°C; <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.87 (1H, d,  $J$  = 1.7 Hz, H-14), 7.39 (1H, dd,  $J$  = 2.2, 8.4 Hz, H-12), 7.29 (1H, d,  $J$  = 8.4 Hz, H-11), 2.92 (1H, m, H-15), 2.73, 2.62 (each 1H, m, H-6), 2.33 (1H, brd,  $J$  = 12.3 Hz, H-1a), 1.88 (1H, dd,  $J$  = 4.3, 13.5 Hz, H-5), 1.77, 1.68 (each 1H, m, H-2), 1.57 (2H, s, H-3), 1.54 (1H, m, H-1b), 1.25, 1.23 (9H, d, H-16, H-17, H-20), 1.00 (3H, s, H-19), 0.93 (3H, s, H-18); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 200.0 (C-7), 153.8 (C-9), 146.6 (C-13), 132.5 (C-12), 130.7 (C-8), 124.8 (C-14), 123.7 (C-11), 49.3 (C-5), 41.3 (C-3), 37.9 (C-1), 37.8 (C-10), 36.3 (C-6), 33.6 (C-15), 33.2 (C-4), 32.5 (C-18), 23.8 (C-16, C-17), 23.4 (C-20), 21.3 (C-19), 18.9 (C-2); EIMS  $m/z$  284 [M]<sup>+</sup> (58), 269 [M - CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (100), 227 (36), 199 (48), 187 (57).

### 8. 16 $\alpha$ -Hydroxy-17-isovaleryloxy-*ent*-kauran-19-oic acid

white needles; mp 188-190°C; <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 4.24, 4.20 (each 1H, s, H-17), 2.22 (2H, d,  $J$  = 6.9 Hz, H-2), 2.13 (1H, m, H-3a), 2.09 (1H, m, H-3), 2.03 (1H, m, H-13), 1.93 (1H, m, H-14a), 1.90 (1H, m, H-6a), 1.82 (3H, m, H-1a, H-2a, H-6b), 1.66 (1H, m, H-7a), 1.63 (1H, m, H-11a), 1.58 (1H, m, H-12b), 1.55 (2H, brd,  $J$  = 6.3 Hz, H-15), 1.48 (3H, m, H-7b, H-11b, H-12a), 1.42 (1H, m, H-2b), 1.21 (3H, s, H-18), 1.05 (1H, m, H-14b), 1.03 (1H, m, H-5), 1.02 (1H, m, H-3b), 0.97 (1H, m, H-9), 0.95 (6H, d,  $J$  = 6.6 Hz, H-4, H-5), 0.92 (3H, s, H-20), 0.78 (1H, m, H-1b); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 184.0 (C-19), 173.3 (C-1), 80.1 (C-16), 68.1 (C-17), 56.7 (C-5), 55.6 (C-9), 52.7 (C-15), 45.8 (C-13), 44.7 (C-8), 43.6 (C-4), 43.3 (C-2), 41.7 (C-7), 40.5 (C-1), 39.6 (C-10), 37.7 (C-3), 37.0 (C-14), 28.9 (C-18), 26.1 (C-12), 25.7 (C-3), 22.4 (C-4, C-5), 22.0 (C-6), 18.9 (C-2), 18.4 (C-11), 15.5 (C-20).

### 9. *ent*-Kaur-16-en-19-oic acid (kaurenoic acid)

colorless crystals; mp 178-180°C; <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 4.66, 4.60 (each 1H, s, H-17), 2.50 (1H, brs, H-13), 1.84-2.02 (4H, m, H-3a, H-6a, H-13, H-14a), 1.69-1.77 (4H, m, H-1a, H-2a, H-6b, H-7a), 1.40-1.48 (4H, H-2b, H-11a, H-12a, H-12b), 1.12 (2H, brd,  $J$  = 6.3 Hz, H-15), 1.11 (3H, s, H-18), 1.00 (1H, dd,  $J$  = 4.6, 7.2 Hz, H-14b), 0.92 (1H, t,  $J$  = 7.0 Hz, H-5), 0.89 (1H, m, H-3b), 0.85 (1H, m, H-9), 0.82 (3H, s, H-20), 0.68 (1H, m, H-1b); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 185.0 (C-19), 155.8 (C-16), 103.0 (C-17), 57.0 (C-5), 55.1 (C-9), 48.9 (C-15), 44.2 (C-8), 43.8 (C-4), 43.7 (C-13), 41.2 (C-7), 40.6 (C-1), 39.7 (C-10), 39.6 (C-14), 37.7 (C-3), 33.1 (C-12), 28.9 (C-18), 21.8 (C-6), 19.1 (C-2), 18.4 (C-11), 15.6 (C-20).

### 10. *ent*-Pimara-8(14),15-diene-19-ol (*ent*-pimarol)

white powder; mp 228-229°C; <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 5.70 (1H, dd,  $J$  = 10.5, 17.1 Hz, H-15), 5.12 (1H, br s, H-14), 4.95 (1H, dd,  $J$  = 2.1, 10.5 Hz, H-16b), 4.90 (1H, dd,  $J$  = 2.1, 17.1 Hz, H-16a), 3.82 and 3.42 (each 1H, d,  $J$  = 10.0 Hz, H-19), 2.31 (1H, ddd,  $J$  = 2.4, 4.2, 13.8 Hz, H-12b), 2.02 (1H, dt,  $J$  = 4.2, 13.8 Hz, H-3b), 1.83 (1H, dd,  $J$  = 5.1, 13.8, H-3a), 1.66-1.68 (3H, m, H-1b, H-6a, H-9), 1.42-1.55 (4H, m,



H-12a, H-11a, H-2), 1.18-1.35 (4H, m, H-6b, H-11b, H-12a, H-5) 1.03 (1H, m, H-1a), 0.98 (6H, s, H-17, H-18), 0.69 (3H, s, H-20);  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  147.3 (C-15), 138.1 (C-8), 128.0 (C-14), 112.8(C-16), 65.2 (C-19), 55.7 (C-5), 51.4 (C-9), 39.1 (C-1), 38.5 (C-10, C-13), 38.2 (C-4), 36.1 (C-7), 35.7 (C-12), 35.3 (C-3), 29.4 (C-17), 27.0 (C-18), 22.4 (C-6), 19.2 (C-11), 18.6 (C-2), 15.8 (C-20); EIMS  $m/z$  288  $[\text{M}]^+$  (10), 273  $[\text{M} - \text{CH}_3]^+$  (4), 257  $[\text{M} - \text{CH}_2\text{OH}]^+$  (100).

#### 11. 4 $\beta$ -Hydroxy-19-nor(-)-pimara-8(14),15-diene

white solid;  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  5.71 (1H, dd,  $J = 10.4, 17.0$  Hz, H-15), 5.15(1H, brs, H-14), 4.95 (1H, dd,  $J = 1.7, 10.4$  Hz, H-16b), 4.90 (1H, dd,  $J = 1.7, 17.0$ , H-16a), 2.35 (1H, dd,  $J = 3.3, 12.5$  Hz, H-7b), 2.08 (1H, m, H-7a), 1.73-1.81 (3H, m, H-9, H-3b, H-6b), 1.56-1.63 (2H, m, H-1b, H-11b), 1.49-1.53 (6H, m, H-2a, H-11a, H-12a, H-6a, H-5, H-3a), 1.16 (3H, s, H-18), 1.05 (1H, m, H-1a), 0.99 (3H, s, H-17), 0.70 (3H, s, H-20);  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  147.3 (C-15), 137.9 (C-8), 128.3 (C-14), 112.8 (C-16), 72.4 (C-4), 56.3 (C-5), 51.1 (C-9), 42.9 (C-3), 39.0 (C-10), 38.6 (C-13), 38.4 (C-1), 35.6 (C-12), 35.4 (C-7), 29.4 (C-17), 23.5 (C-18), 21.5 (C-6), 20.3 (C-2), 19.2 (C-11), 14.3 (C-19); EIMS  $m/z$  274  $[\text{M}]^+$  (23), 259  $[\text{M} - \text{CH}_3]^+$  (17), 241  $[\text{M} - \text{CH}_3 - \text{H}_2\text{O}]^+$  (21), 189 (89), 161 (63), 121 (100).

#### 12. 4-Epinulopezol

white solid;  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  4.80, 4.74 (each 1H, s, H-17), 2.64 (1H, brs, H-13), 2.07 (1H, m, H-15), 1.96 (1H, m, H-14b), 1.76-1.80 (4H, m, H-3b, H-7, H-14a), 1.64 (2H, m, H-11), 1.60 (1H, m, H-12b), 1.56 (2H, m, H-6), 1.53 (4H, m, H-1, H-2), 1.48 (1H, m, H-12a), 1.13 (2H, m, H-9, H-3a), 1.07 (1H, m, H-5), 1.12 (3H, s, H-18), 0.98 (3H, s, H-19);  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  155.8 (C-16), 103.0 (C-17), 72.4 (C-4), 57.7 (C-5), 55.7 (C-9), 49.1 (C-15), 44.1 (C-8), 43.9 (C-13), 42.8 (C-7), 40.5 (C-1), 39.9 (C-10), 39.8 (C-14), 39.6 (C-3), 33.2 (C-12), 22.9 (C-18), 19.7 (C-6), 19.1 (C-2), 18.3 (C-11), 17.0 (C-19); EIMS  $m/z$  274  $[\text{M}]^+$  (16), 259  $[\text{M} - \text{CH}_3]^+$  (8), 241  $[\text{M} - \text{CH}_3 - \text{H}_2\text{O}]^+$  (21), 231 (28), 189 (49), 105 (61), 91 (100).

#### 13. 8 $\alpha$ -Hydroxy-*ent*-pimara-15-en-19-ol (*ent*-thermarol)

white powder;  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  5.94 (1H, dd,  $J = 10.5, 17.1$  Hz, H-15), 5.11 (1H, dd,  $J = 2.1, 17.0$  Hz, H-16b), 5.07 (1H, dd,  $J = 2.1, 10.5$  Hz, H-16a), 3.82 and 3.42 (each 1H, d,  $J = 11.0$  Hz, H-19), 1.98(1H, dt,  $J = 3.0, 14.5$  Hz, H-12b), 1.80 (1H, m, H-3b), 1.75 (1H, dt,  $J = 3.0, 14.5$ , H-7b), 1.65-1.70 (1H, m, H-1b), 1.64 (1H, dd,  $J = 3.0, 13.5$  Hz, H-14b), 1.50-1.60 and 1.37-1.45 (6H, m, H-11, H-6, H-2), 1.20 (1H, m, H-14a), 1.18 (1H, m, H-12a), 1.16 (1H, m, H-7a), 0.92-1.01 (1H, m, H-9), 0.95 (3H, s, H-18), 0.85-0.92 (2H, m, H-3a, H-5), 0.85 (1H, m, H-1a), 0.88 (6H, s, H-17, H-20);  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  147.5 (C-15), 112.0 (C-16), 72.5 (C-8), 65.1 (C-19), 57.2 (C-9), 56.4 (C-5), 53.4 (C-14), 42.3 (C-7), 39.5 (C-1), 38.6 (C-4), 37.1 (C-13), 36.4 (C-10), 36.0 (C-12), 35.5 (C-3), 32.3 (C-17), 27.0 (C-18), 18.1 (C-2, C-6), 17.4 (C-11), 16.1 (C-20); EIMS  $m/z$  306  $[\text{M}]^+$  (4), 288  $[\text{M} - \text{H}_2\text{O}]^+$  (27), 257  $[\text{M} - \text{H}_2\text{O} - \text{CH}_2\text{OH}]^+$  (95), 245 (30), 55 (100).

#### 14. (+)-Spathulenol

colorless oil;  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  4.69 (1H, brs, H-14a), 4.66 (1H, brs, H-14b), 2.42 (1H, m, H-9a), 2.20 (1H, m, H-1), 2.03 (1H, m, H-9b), 1.95 (1H, m, H-8a), 1.88 (1H, m, H-2b), 1.77 (1H, m, H-3a), 1.55 (1H, m, H-3b), 1.68 (1H, m, H-2a), 1.32 (1H, m, H-5), 1.28 (3H, s, H-15), 1.05 (3H, s, H-12), 1.03 (3H, s, H-13), 0.98 (1H, m, H-8b), 0.72 (1H, ddd,  $J = 6.0, 9.4, 11.4$  Hz, H-6), 0.46 (1H, dd,  $J = 9.5, 11.4$  Hz, H-7);  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  153.4 (C-10), 106.2 (C-14), 81.0 (C-4), 54.3 (C-5), 53.4 (C-1), 41.7 (C-3), 38.8 (C-9), 29.9 (C-6), 28.6 (C-12), 27.5 (C-7), 26.7 (C-2), 26.1 (C-15), 24.7 (C-8), 20.2 (C-11), 16.3 (C-13); EIMS  $m/z$  220  $[\text{M}]^+$  (7), 205  $[\text{M} - \text{CH}_3]^+$  (77), 187 (30), 162 (43), 159 (55), 147 (43), 91 (100).

### 15. Dehydrofaltarindiol

$^1\text{H-NMR}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  5.94(1H, dddd,  $J = 5.1, 5.4, 9.9, 10.2$  Hz, H-2), 5.80 (1H, dddd,  $J = 3.3, 10.2, 16.8, 17.1$  Hz, H-16), 5.60 (1H, m, H-10), 5.47 (1H, ddd,  $J = 0.9, 1.2, 10.2$  Hz, H-1a), 5.26 (1H, ddd,  $J = 0.9, 1.5, 10.2$  Hz, H-1b), 5.20 (1H, d,  $J = 8.1$  Hz, H-8), 4.99 (1H, dd,  $J = 1.5, 3.3$  Hz, H-17b), 4.94 (1H, m, H-17a), 2.04 (2H, m, H-11 and H-15), 1.39 (1H, m, H-14), 1.38 (1H, m, H-13), 1.28 (1H, m, H-12);  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  139.0 (C-16), 135.7 (C-2), 134.5 (C-10), 127.7 (C-9), 117.4 (C-1), 114.3 (C-17), 79.8 (C-7), 78.2 (C-4), 70.3(C-5), 68.7 (C-6), 63.5 (C-3), 58.6 (C-8), 33.7 (C-15), 29.1 (C-12), 28.7 (C-13), 28.6 (C-14), 27.6 (C-11).

### 16. Lignoceric acid (tetracosanoic acid)

colorless crystals; mp 82-84°C;  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  2.35 (2H, t,  $J = 7.5$  Hz, H-23), 1.62 (2H, dd,  $J = 7.5, 12.0$  Hz, H-22), 1.25 (40H, brs,  $\text{CH}_2$  20), 0.88 (3H, t,  $J = 6.8$  Hz, H-1);  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  179.0 (COOH), 33.9 (C-23), 31.9 (C-3), 29.7~29.1 ( $\text{CH}_2$ ), 24.7 (C-22), 22.7 (C-2), 14.1 (C-1); EIMS  $m/z$  368  $[\text{M}]^+$ .

### 17. 7 $\beta$ -Hydroxy-ent-pimara-8(14),15-diene-19-oic acid

colorless needles, mp 198-201°C;  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  5.71 (1H, dd,  $J = 10.5, 17.5$  Hz, H-15), 5.48 (1H, br s, H-14), 4.98 (1H, dd,  $J = 1.5, 10.5$  Hz, H-16b), 4.86 (1H, dd,  $J = 1.5, 17.5$  Hz, H-16a), 4.30 (1H, t,  $J = 3.0, 9.0$  Hz, H-7), 2.20(1H, dt,  $J = 14.0$  Hz, H-3b), 2.15 (1H, m, H-9), 2.10-2.13 (2H, m, H-6), 1.86 (1H, dd,  $J = 7.0, 9.0$  Hz, H-5) 1.81(1H, dt,  $J = 3.0, 14.0$  Hz, H-2b), 1.74 (1H, br d,  $J = 13.5$  Hz, H-1b), 1.58-1.61 (1H, m, H-11b,12b) , 1.50 (1H, dq,  $J = 3.0, 14.0$  Hz, H-2a), 1.24-1.37 (1H, m, H-11a, 12a), 1.29 (3H, s, H-18), 1.12 (1H, ddd,  $J = 4.5, 13.5,13.5$  Hz, H-1a), 1.12 (1H, m, H-3a), 1.06 (3H, s, H-17), 0.65 (3H, s, H-20);  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  183.8 (COOH), 146.4 (C-15), 140.1 (C-8), 133.2 (C-14), 113.3 (C-16), 73.2 (C-7), 48.2 (C-5), 45.6 (C-9), 43.6 (C-10), 39.2 (C-4), 38.9 (C-1), 38.5 (C-13), 37.9 (C-3), 35.5 (C-12), 30.5 (C-6), 29.0 (C-17), 28.8 (C-18), 19.5 (C-2), 18.6 (C-11), 13.0 (C-20); EIMS  $m/z$  318  $[\text{M}]^+$  (71), 300  $[\text{M} - \text{H}_2\text{O}]^+$  (40), 285  $[\text{M} - (\text{H}_2\text{O} + \text{CH}_3)]^+$  (37), 275 (10), 255 (16), 239  $[\text{M} - (\text{H}_2\text{O} + \text{CH}_3 + \text{COOH} + \text{H})]^+$  (24), 185 (24), 164 (48), 146 (89), 131 (70), 123 (97), 105 (71), 55 (100).

### 18. 16 $\alpha$ -Methoxy-17-hydroxy-ent-kauran-19-oic acid

amorphous powder;  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  3.75 (2H, br s, H-17), 3.17 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ ), 2.20 (1H, s, H-13), 2.17 (1H, dt,  $J = 3.5, 13.5$  Hz, H-3b), 1.90 (1H, m, H-11), 1.89 (1H, br d,  $J = 11.0, 13.5$  Hz, H-14b), 1.83 (1H,

m, H-1b), 1.82 (2H, overlap, H-6), 1.62 (1H, dt,  $J = 3.0, 13.0$ , H-7b), 1.56 (1H, br d,  $J = 14.0$  Hz, H-15), 1.45-1.50 (1H, m, H-14a), 1.42-1.56 (2H, overlap, H-2), 1.42-1.50 (2H, overlap, H-12), 1.41-1.45 (1H, m, H-7a), 1.45 (1H, m, H-11), 1.25(3H, s, H-18), 1.07 (1H, dd,  $J = 3.0, 11.0$  Hz, H-5), 1.02 (1H, ddd,  $J = 4.5, 13.5, 13.5$  Hz, H-3a), 0.96 (3H, s, H-20), 0.81 (1H, ddd,  $J = 4.5, 13.5, 13.5$  Hz, H-1a);  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  183.6 (COOH), 87.2 (C-16), 60.4 (C-17), 56.8 (C-5), 55.7 (C-9), 48.9 (OCH<sub>3</sub>), 48.7 (C-15), 44.4 (C-8), 43.7 (C-4), 42.0 (C-7), 41.2 (C-13), 40.6 (C-1), 39.7 (C-10), 37.8 (C-3), 36.8 (C-14), 28.9 (C-18), 25.8 (C-12), 22.0 (C-6), 19.0 (C-11), 18.6 (C-2), 15.5 (C-20); EIMS  $m/z$  319  $[\text{M} - \text{CH}_3\text{O}]^+$  (49), 287  $[\text{M} - \text{CH}_3\text{O} + \text{CH}_3\text{OH}]^+$  (15), 241  $[\text{M} - (\text{CH}_3\text{O} + \text{CH}_3\text{OH} + \text{COOH} + \text{H})]^+$  (13), 193 (7), 121 (23), 105 (32), 91 (60), 59 (100); (+)-FABMS  $m/z$  373  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ , 351  $[\text{M} + \text{H}]^+$ , 319  $[(\text{M} + \text{H}) - \text{CH}_3\text{OH}]^+$ , 273 $[(\text{M} + \text{H}) - (\text{CH}_3\text{OH} + \text{COOH} + \text{H})]^+$ ; HRFABMS  $m/z$  351.2540  $[\text{M} + \text{H}]^+$ .

### 19. 16 $\alpha$ ,17-Dihydroxy-*ent*-kauran-19-oic acid

amorphous powder;  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz, pyridine- $d_5$ ):  $\delta$  4.14 (1H, d,  $J = 10.8$ , H-17b), 4.05 (1H, d,  $J = 10.8$ , H-17a), 2.4-2.5 (1H, overlap, H-3b), 2.42 (1H, overlap, H-13), 2.28(1H, dt,  $J = 4.0, 13.8$ , H-6b), 2.24 (1H, overlap, H-2b), 2.0-2.1 (2H, m, H-14), 1.96-2.08 (1H, m, H-6a), 1.79-1.90 (1H, m, H-12b), 1.5-1.9 (2H, m, H-7), 1.86 (1H, d,  $J = 13.8$ , H-15b), 1.82 (1H, br d,  $J = 12.5$ , H-1b), 1.74 (1H, d,  $J = 13.8$ , H-15a), 1.58 (2H, overlap, H-11) 1.50-1.55 (1H, m, H-12a), 1.48 (1H, overlap, H-2a), 1.34 (3H, s, H-18), 1.19 (3H, s, H-20), 1.06-1.12 (1H, m, H-5), 1.06 (1H, overlap, H-3a), 1.03 (1H, br t,  $J = 5.4$ , H-9), 0.84 (1H, ddd,  $J = 3.9, 13.2, 13.2$ , H-1a);  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz, pyridine- $d_5$ ):  $\delta$  180.1 (COOH), 81.7 (C-16), 66.5 (C-17), 57.0 (C-5), 56.3 (C-9), 53.9 (C-15), 45.9 (C-13), 45.0 (C-8), 43.9 (C-4), 42.8 (C-7), 41.0 (C-1), 40.0 (C-10), 38.7 (C-3), 37.8 (C-14), 29.4 (C-18), 26.8 (C-12), 23.0 (C-6), 19.8 (C-2), 19.0 (C-11), 16.0 (C-20); EIMS  $m/z$  336  $[\text{M}]^+$  (1), 305  $[\text{M} - \text{CH}_3\text{O}]^+$  (100), 287  $[\text{M} - (\text{CH}_3\text{O} + \text{H}_2\text{O})]^+$  (36), 269  $[\text{M} - (\text{CH}_3\text{O} + 2\text{H}_2\text{O})]^+$  (4), 259  $[\text{M} - (\text{COOH} + \text{H} + \text{CH}_3\text{O})]^+$  (50), 241  $[\text{M} - (\text{COOH} + \text{H} + \text{CH}_3\text{O} + \text{H}_2\text{O})]^+$  (20), 217 (9), 121 (27), 107 (24), 91 (28).

### 20. Caffeic acid

yellow powder; mp 215-217°C;  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  7.40 (1H, d,  $J = 15.77$  Hz, H-7), 7.01 (1H, d,  $J = 1.66$  Hz, H-2), 6.95 (1H, dd,  $J = 1.46, 8.12$  Hz, H-6), 6.75(1H, d,  $J = 8.30$ , H-5), 6.16 (1H, d,  $J = 15.77$  Hz, H-8), 1.23 (3H, s, 3,4,9-OH);  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  168.0 (C-9), 148.1 (C-4), 145.6 (C-3), 144.4 (C-7), 125.7 (C-1), 121.1 (C-6), 115.7 (C-5), 115.2 (C-8), 114.6 (C-2).

### 21. Protocatechuic acid

colorless powder; mp 196-197°C;  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  6.74 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz H-5), 7.40 (1H, dd,  $J = 1.8, 8.4$  Hz H-6), 7.42 (1H, d,  $J = 1.8$ , H-2);  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  170.2 (C-7), 151.5 (C-4), 146.1 (C-3), 123.9 (C-6), 123.1 (C-1), 117.7 (C-2), 115.74 (C-5).

### 22. 3-Caffeoylquinic acid (Neochlorogenic acid)

amorphous powder; mp 218-219°C;  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  1.85-2.02 (4H, m, H-2 and H-6), 3.54 (1H, d,  $J = 3.7$  Hz, H-4), 3.86 (1H, dd,  $J = 6.0, 12.0$  Hz, H-5), 5.17 (1H, m, H-3), 6.20 (1H, d,  $J = 16.0$  Hz, H-8'), 6.76 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-5'), 6.97 (1H, dd,  $J = 2.0, 8.0$  Hz, H-6'), 7.02 (1H, d,  $J = 2.0$  Hz,

H-2'), 7.46 (1H, d,  $J = 16.0$  Hz, H-7'), 9.14 (1H, s, 3'-OH), 9.53 (1H, s, 4'-OH);  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  176.0 (C-7), 166.1 (C-9'), 148.1 (C-4'), 145.5 (C-7'), 144.4 (C-3'), 125.7 (C-1'), 121.1 (C-6'), 115.8 (C-5'), 115.0 (C-8'), 114.6 (C-2'), 72.9 (C-1), 71.2 (C-4), 71.0 (C-3), 67.2 (C-5), 39.5 (C-6), 35.1 (C-2).

### 23. 4-Caffeoylquinic acid (Cryptochlorogenic acid)

pale brown amorphous powder; mp 182-184°C;  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  2.73-4.00 (4H, m, H-2 and H-6), 4.09 (1H, brs, H-5), 4.67 (1H, dd,  $J = 3, 8$  Hz, H-3), 4.87 (1H, d,  $J = 5$  Hz, H-4), 6.27 (1H, d,  $J = 16$  Hz, H-8'), 6.76 (1H, d,  $J = 8$  Hz, H-5'), 7.00 (1H, dd,  $J = 2, 8$  Hz, H-6'), 7.04 (1H, d,  $J = 2$  Hz, H-2'), 7.49 (1H, d,  $J = 16$  Hz, H-7'), 9.15 (1H, s, 3'-OH), 9.57 (1H, s, 4'-OH);  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  175.4 (C-7), 166.3 (C-9'), 148.3 (C-4'), 145.6 (C-7'), 144.8 (C-3'), 125.6 (C-1'), 121.2 (C-6'), 115.8 (C-5'), 114.7 (C-8'), 114.6 (C-2'), 76.9 (C-4), 74.0 (C-1), 66.4 (C-3), 64.0 (C-5), 40.7 (C-6), 37.8 (C-2).

### 24. 5-Caffeoylquinic acid (Chlorogenic acid)

slightly yellow amorphous powder; mp 209-210°C;  $^1\text{H-NMR}$  (400MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  1.77-2.03 (4H, m, H-2 and H-6), 3.42 (1H, brs, H-4), 3.92 (1H, brs, H-5), 5.06 (1H, dd,  $J = 6, 10$  Hz, H-3), 6.15 (1H, d,  $J = 16$  Hz, H-8'), 6.76 (1H, d,  $J = 8$  Hz, H-5'), 6.98 (1H, dd,  $J = 2, 8$  Hz, H-6'), 7.03 (1H, brs, H-2'), 7.42 (1H, d,  $J = 16$  Hz, H-7'), 9.19 (1H, s, 3'-OH), 9.62 (1H, s, H-4');  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  175.0 (C-7), 165.8 (C-9'), 148.4 (C-4'), 145.6 (C-7'), 145.0 (C-3'), 125.6 (C-1'), 121.4 (C-6'), 115.8 (C-5'), 114.8 (C-8'), 114.3 (C-2'), 73.5 (C-1), 70.9 (C-4), 70.3 (C-5), 68.0 (C-3), 37.2 (C-6), 36.2 (C-2).

### 25. 3,5-Di-O-caffeoylquinic acid

pale yellow amorphous powder;  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, CD $_3$ OD):  $\delta$  7.60, 7.57 (1H each, d,  $J = 15.9$  Hz, H-7, 7), 7.06 (2H, brs, H-2, 2), 6.96 (2H, dd,  $J = 2.1, 8.1$  Hz, H-6, 6), 6.77 (2H, dd,  $J = 1.2, 7.8$  Hz, H-5, 5), 6.35, 6.26 (1H each, d,  $J = 15.9$  Hz, H-8, 8), 5.36-5.45 (2H, m, H-3, 3), 3.96 (1H, dd,  $J = 4.0, 7.8$  Hz, H-4), 2.13-2.35 (4H, m, H-2, 2);  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz, CD $_3$ OD):  $\delta$  177.3 (COOH), 168.9, 168.3 (C-9, 9), 149.6, 149.5 (C-4, 4), 147.3, 147.0 (C-7, 7), 146.8 (C-3, 3), 127.9, 127.8 (C-1, 1), 123.1, 123.0 (C-6, 6), 116.5 (C-5, 5), 115.5, 115.2 (C-8, 8), 115.1 (C-2, 2), 74.7 (C-1), 72.5 (C-3), 72.1 (C-5), 70.5 (C-4), 38.6 (C-6), 36.0 (C-2).

### 26. Mixture(3:1) of $\beta$ -D-fructopyranose and $\beta$ -D-fructofuranose

$\beta$ -D-fructopyranose :  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz, D $_2$ O):  $\delta$  98.2 (C-2), 69.8 (C-4), 69.3 (C-5), 67.6 (C-3), 63.9 (C-1), 63.5 (C-6);  $\beta$ -D-fructofuranose :  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz, D $_2$ O):  $\delta$  101.6 (C-2), 80.0 (C-5), 75.4 (C-3), 74.5 (C-4), 62.7 (C-1), 62.5 (C-6).

### 27. Sucrose

amorphous powder; mp 160-186°C;  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, D $_2$ O):  $\delta$  5.25 (1H, d,  $J = 3.7$  Hz, Glucose H-1), 4.05 (1H, d,  $J = 8.8$  Hz, Fructose H-3), 3.88 (1H, t,  $J = 8.6$  Hz, Fructose H-4), 3.71-3.75 (1H, m, Fructose H-5), 3.68-3.70 (1H, m, Glucose H-5), 3.65-3.66 (4H, m, Fructose H-6 and Glucose H-6), 3.59 (1H, t,  $J = 9.5$  Hz, Glucose H-3), 3.51 (2H, s, Fructose H-1), 3.39 (1H, dd,  $J = 3.6, 9.5$  Hz, Glucose H-2), 3.30 (1H, t,  $J = 9.5$  Hz, Glucose H-4);  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz, D $_2$ O):  $\delta$  103.7 (Fructose C-2), 92.2 (Glucose C-1), 81.4 (Fructose C-5), 76.4 (Fructose C-3), 74.0 (Fructose C-4), 72.6 (Glucose C-3), 72.5 (Glucose, C-5), 71.1 (Glucose C-2), 69.3 (Glucose C-4), 62.4 (Fructose C-6), 61.3 (Fructose C-1), 60.1 (Glucose C-6).

### 28. 1-Kestose [*O*-β-D-fructofuranosyl-(2→1)-β-D-fructofuranosyl-(2→1)-α-D-glucopyranoside]

amorphous powder; <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O): δ 5.29 (1H, d, *J* = 3.8 Hz, Glucose H-1), 4.13 (1H, d, *J* = 8.6 Hz, Fructose H-3'), 4.04 (1H, d, *J* = 8.6 Hz, Fructose H-3''), 3.92 (2H, m, Fructose H-4' and H-4''), 3.72 (3H, m, Glucose H-5, Fructose H-5', and H-5''), 3.71-3.61 (10H, m, Glucose H-6, Fructose H-1', H-6', H-1'', and H-6''), 3.58 (1H, brs, Glucose H-3), 3.39 (1H, dd, *J* = 3.8, 9.9 Hz, Glucose H-2), 3.33 (1H, t, *J* = 12.0 Hz, Glucose H-4); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, D<sub>2</sub>O): δ 103.8 (Fructose C-2''), 103.4 (Fructose C-2'), 92.6 (Glucose C-1), 81.3 (Fructose C-5'), 81.2 (Fructose C-5''), 76.7 (Fructose C-3' and C-3''), 74.6 (Fructose C-4''), 73.9 (Fructose C-4'), 72.7 (Glucose C-3), 72.5 (Glucose, C-5), 71.2 (Glucose C-2), 69.3 (Glucose C-4), 62.4 (Fructose C-6''), 62.3 (Fructose C-6'), 61.0 (Fructose C-1'), 60.5 (Fructose C-1''), 60.2 (Glucose C-6); FABMS *m/z* 527 [M+Na]<sup>+</sup>, 341 [M-H]<sup>-</sup> HRFABMS *m/z* 527.1585 [M+Na]<sup>+</sup> (calcd 527.1588).

### 29. Methyl-α-D-fructofuranoside

amorphous powder; <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O): δ 3.96 (1H, d, *J* = 2.8 Hz, H-3), 3.82 (2H, m, H-4 and H-5), 3.69 (1H, dd, *J* = 1.8, 12.0 Hz, H-6), 3.66 (1H, d, *J* = 12.0 Hz, H-1), 3.56 (1H, dd, *J* = 5.1, 12.0 Hz, H-6), 3.52 (1H, d, *J* = 12.0 Hz, H-1), 3.12 (3H, s, OCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, D<sub>2</sub>O) δ: 108.4 (C-2), 83.5 (C-5), 80.2 (C-3), 77.5 (C-4), 61.4 (C-6), 57.7 (C-1), 48.3 (OCH<sub>3</sub>).

### 30. Methyl-β-D-fructofuranoside

amorphous powder; <sup>1</sup>H-NMR (400MHz, D<sub>2</sub>O): δ 4.09 (1H, d, *J* = 8.2 Hz, H-3), 3.97 (1H, t, *J* = 7.9 Hz, H-4), 3.77 (1H, m, H-5), 3.72 (1H, dd, *J* = 3.0, 12.0 Hz, H-6b), 3.64 (1H, d, *J* = 12.0 Hz, H-1b), 3.56 (2H, m, H-1a and H-6a), 3.24 (3H, s, OCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, D<sub>2</sub>O): δ 103.9 (C-2), 81.4 (C-5), 77.0 (C-3), 75.1 (C-4), 62.8 (C-6), 59.9 (C-1), 49.0 (OCH<sub>3</sub>).

### 31. Thymidine

amorphous powder; mp 186°C; <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>): δ 7.81 (1H, d, *J* = 1.1 Hz, H-6), 6.27 (1H, t, *J* = 6.8 Hz, H-1), 4.39 (1H, m, H-3), 3.90 (1H, m, H-4), 3.78 (2H, m, H-5), 2.22 (2H, m, H-2), 1.87 (3H, d, *J* = 1.3 Hz, CH<sub>3</sub>-5); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>): δ 166.4 (C-4), 152.4 (C-2), 138.2 (C-6), 111.5 (C-5), 88.8 (C-4), 86.2 (C-1), 72.2 (C-3), 62.8 (C-5), 41.2 (C-2), 12.4 (CH<sub>3</sub>).

### 32. Uridine

amorphous powder; mp 163°C; <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O): δ 7.76 (1H, dd, *J* = 1.8, 8.0Hz, H-6), 5.77 (2H, m, H-5, 1), 4.22 (1H, m, H-2), 4.10 (1H, m, H-3), 4.01 (1H, m, H-4), 3.79 (1H, m, H-5), 3.68 (1H, m, H-5); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, D<sub>2</sub>O): δ 166.3 (C-4), 151.8 (C-2), 142.0 (C-6), 102.4 (C-5), 89.5 (C-1), 84.3 (C-4), 73.8 (C-2), 69.5 (C-3), 60.9 (C-5).

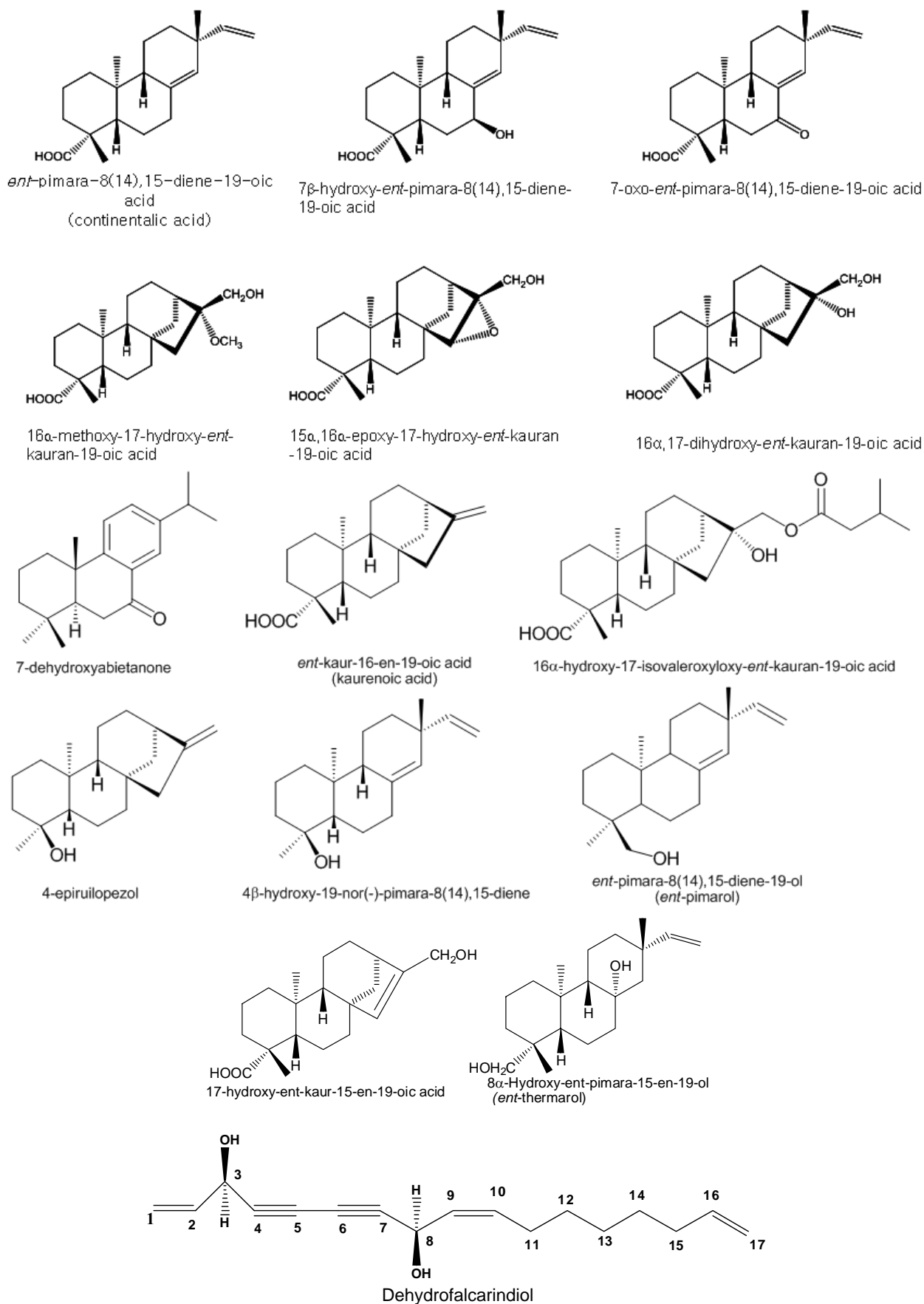


Fig. 2. Structure of isolated compounds from *Aralia continentalis*.

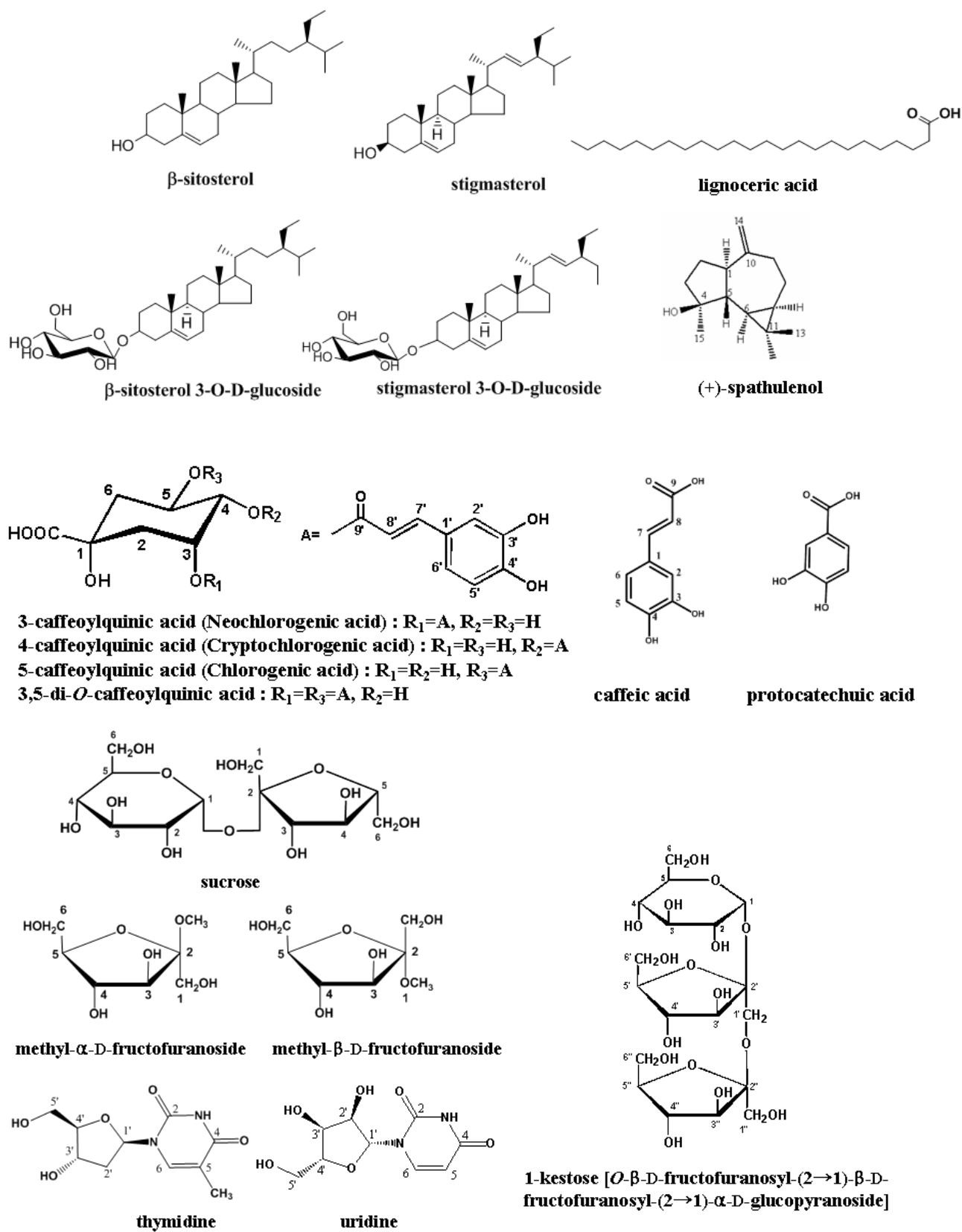


Fig. 3. Structure of isolated compounds from *Aralia continentalis*.

## 제4장 세부연구개발과제의 연구결과 고찰 및 결론

1. 국내산 황련과 독활을 기원별(산지별)로 수집하여 잘 건조한 후 세절하고 70% EtOH로 총 13종 추출, 제조하여 분석팀 및 효능확인연구팀에 연구용 시료로 제공하였다.
2. 화합물의 분리를 위해 황련 10 kg MeOH 추출액을 회전 농축기로 농축하여 엑스를 H<sub>2</sub>O를 가하여 현탁시켰다. 다음과 같이 용매의 극성증가 순으로 분획을 실시하여 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> fraction (230 g), *n*-BuOH fraction (1100 g) 및 H<sub>2</sub>O fraction (840 g)을 얻었다.
3. 독활 12 kg MeOH 추출액을 회전 농축기로 농축하여 엑스를 H<sub>2</sub>O를 가하여 현탁시켰다. 다음과 같이 용매의 극성증가 순으로 분획을 실시하여 독활 hexane fraction (360 g), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> fraction (22 g), EtOAc fraction (20 g), *n*-BuOH fraction (237 g) 및 H<sub>2</sub>O fraction (2600 g)을 얻었다.
4. 황련으로부터 coptisine (1430 mg), pinoresinol (11.3 mg), isolariciresinol (4.7 mg), epiberberine (605 mg), jateorrhizine (4.5 mg), berberine (12010 mg), palmatine (3560 mg), magnoflorine (50 mg), groenlandicine (101 mg),  $\beta$ -sitosterol (121 mg), ferulic acid methyl ester (15 mg), 그리고 3-(3',4'-dihydroxyphenyl)lactic acid methylester (15 mg)을 분리·동정하였다.
5. 독활로부터 *ent*-pimara-8(14),15-diene-19-oic acid (continentalic acid, 10145 mg), 7 $\beta$ -hydroxy-*ent*-pimara-8(14),15-diene-19-oic acid (38.95 mg), 7-oxo-*ent*-pimara-8(14),15-diene-19-oic acid (20.49 mg), 16 $\alpha$ -methoxy-17-hydroxy-*ent*-kauran-19-oic acid (7.85 mg), 15 $\alpha$ ,16 $\alpha$ -epoxy-17-hydroxy-*ent*-kauran-19-oic acid (35.87 mg), 17-Hydroxy-*ent*-kaur-15-en-19-oic acid (20 mg), 16 $\alpha$ ,17-dihydroxy-*ent*-kauran-19-oic acid (18.25 mg), mixture (3:2) 형태의 stigmasta-5-en-3 $\beta$ -ol ( $\beta$ -sitosterol) 과 stigmasta-5,22-dien-3 $\beta$ -ol (stigmasterol) (500 mg), mixture (9:1) 형태의 daucosterol ( $\beta$ -sitosterol glucoside) 과 stigmasterol glucoside (1000 mg), 7-dehydroabietanone (4 mg), 16 $\alpha$ -hydroxy-17-isovaleryloxy-*ent*-kauran-19-oic acid (40 mg), *ent*-kaur-16-en-19-oic acid (kaurenoic acid, 736 mg), *ent*-pimara-8(14),15-diene-19-ol (*ent*-pimarol, 20 mg), 8 $\alpha$ -Hydroxy-*ent*-pimara-15-en-19-ol (*ent*-thermarol, 15 mg), 4 $\beta$ -hydroxy-19-nor(-)-pimara-8(14),15-diene (7 mg), 4-epiruillopezol (7 mg), lignoceric acid (80 mg), (+)-spathulenol (5 mg), dehydrofaltarindiol(10 mg), D-fructose (100 mg), chlorogenic acid (5-caffeoylquinic acid, 500 mg), 3,5-di-*O*-caffeoylquinic acid (10 mg), neochlorogenic acid (3-caffeoylquinic acid, 10 mg), sucrose (100 mg), caffeic acid (10 mg), cryptochlorogenic acid (4-caffeoylquinic acid, 10 mg), 1-kestose [*O*- $\beta$ -D-fructofuranosyl-(2 $\rightarrow$ 1)- $\beta$ -D-fructofuranosyl-(2 $\rightarrow$ 1)- $\alpha$ -D-glucopyranoside, 260 mg], methyl- $\alpha$ -D-fructofuranoside (210 mg), protocatechuic acid (200 mg), thymidine (20 mg), uridine (20 mg) 그리고 methyl- $\beta$ -D-fructofuranoside (30 mg)을 분리하였다.



## 제5장 제1 세부연구개발과제의 연구성과

### 5.1 활용성과

총괄과제명	항련과 독활의 생리활성성분 분리
총괄과제 책임자	최재수 / 부경대학교 / 천연물화학

#### 가. 연구논문

번호	논문제목	저자명	저널명	집(권)	페이지	Impact factor	국내/국외	SCI 여부
1	Magnoflorine from Coptidis Rhizoma protects high density lipoprotein during oxidant stress	민병선, 최재수 외 7인	Bio. pharm. Bull.	30	1157-1160	1.614	국외	SCI
2	Quantitative determination of protoberberines from the roots of <i>Coptis chinensis</i>	민병선, 최재수	Natural Product Sciences	14	68-72		국내	
3	Inhibitory Activities of the Alkaloids from Coptidis Rhizoma against Aldose Reductase	최재수, 민병선 외 3인	Archives of Pharmacal Research	31(11)	1405-12	1.085	국내	SCIE

#### 나. 학술발표

번호	발표제목	발표형태	발표자	학회명	연월일	발표지	국내/국제
1							
2							

#### 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

- 유효 성분 중심의 한약재 관리에 필요한 황련, 독활별 생리활성성분의 분리 후 확인
- 한약재의 생리 활성 물질의 과학적 정량법의 확립
- 한약재 유효 성분의 분석법 개발 후 품질 관리 기반 기술 구축
- 한약재 관련 정부 및 연구기관의 공식 표준분석법으로 보급 활용
- 한약재 품질 수준 향상 및 안전성 제고

## 제6장 기타 중요변경사항

◦처음 선정 시와 비교하여 변경된 내용을 명시

## 제7장 참고문헌

- 이창복, 대한식물도감, p.575, 향문사, 서울 1989.
- Baek, Y. H., Huh, J. E., Lee, J. D., Choi, D. Y. and Park, D. S., Effect of *Aralia cordata* extracts on cartilage protection and apoptosis inhibition. *Biol. Pharm. Bull.*, 29, 1423-1430 (2006)
- Chae, S. H., Jeong, I. H., Choi, D. H., Oh, J. W. and Ahn, Y. J., Growth-inhibiting effects of *Coptis japonica* root-derived isoquinoline alkaloids on human intestinal bacteria. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 934-938 (1999)
- Chen, L., Wang, Q. and Liu, J., Simultaneous analysis of nine active components in Gegen Qinlian preparations by high-performance liquid chromatography with diode array detection. *J Sep Sci*, 29, 2203-2210 (2006)
- Cho, J. Y., Baik, K. U., Yoo, E. S., Yoshikawa, K. and Park, M. H., In vitro antiinflammatory effects of neolignan woorenosides from the rhizomes of *Cotips japonica*. *J. Nat. Prod.*, 63, 1205-1209 (2000)
- Cho, J. Y., Park, J. Yoo, E. S., Baik, K. U., Yoshikawa, K., Lee, J. and Park, M. H., Inhibitory Effect of Lignans from the Rhizomes of *Coptis japonica* var. dissecta on Tumor Necrosis Factor-alpha Production in Lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 Cells. *Arch. Pharm. Res.*, 21, 12-16 (1998)
- Dang, N. H., Zhang, X., Zheng, M., Son, K. H., Chang, H. W., Kim, H. P., Bae, K. and Kang, S. S., Inhibitory constituents against cyclooxygenases from *Aralia cordata* Thunb. *Arch. Pharm. Res.*, 28, 28-33 (2005)
- Feng, Y. L., Yu, B. Y. and Dong, X. P., Simultaneous determination of three kinds of components in sanhuang tablets by high-performance liquid chromatography. *Yao Xue Xue Bao*, 41, 285-288 (2006)
- Fujiwara, H., Nonaka, G., Yagi, A. and Nishioka, I., Studies on the components of the leaves of *Coptis japonica* Makino. I. The structures of Coptiside I and II. *Chem. Pharm. Bull.*, 24, 407-413 (1976)

- Han, B. H., Han, Y. N., Han, K. A., Park, M. H. and Lee, E. O., Studies on the Anti-inflammatory activity of *Aralia continentalis* ( I ). *Arch. Pharm. Res.*, 6, 17-23 (1983)
- Han, B. H., Woo, E. R., Park, M. H. and Han, Y. N., Studies on the Anti-inflammatory activity of *Aralia continentalis* (III). *Arch. Pharm. Res.*, 8, 59-65 (1985)
- Higaki, S., Nakamura, M., Morohashi, M., Hasegawa, Y. and Yamagishi, T., Activity of eleven kampo formulations and eight kampo crude drugs against *Propionibacterium acnes* isolated from acne patients: retrospective evaluation in 1990 and 1995. *J. Dermatol.*, 23, 871–875 (1996)
- Huang, X. P., Li, L. Y., Qu, X. Y. and Cui, G. L., Fingerprints of *Rhizoma Coptidis* from Shizhu by HPLC. *Zhong Yao Cai*, 29, 666-669 (2006)
- Hwang, B. Y., Roberts, S. K., Chadwick, L. R., Wu, C. D. and Kinghorn, A. D., Antimicrobial constituents from goldenseal (the Rhizomes of *Hydrastis canadensis*) against selected oral pathogens. *Plant. Med.*, 69, 623–627 (2003)
- Iizuka, N., Miyamoto, K., Hazama, S., Yoshino, S., Yoshimura, K., Okita, K., Fukumoto, T., Yamamoto, S., Tangoku, A. and Oka, M., Anticachectic effects of *Coptidis rhizoma*, an anti-inflammatory herb, on esophageal cancer cells that produce interleukin 6. *Cancer Lett.*, 158, 35–41 (2000)
- Ito, T. Tsukiji, K. and Odagiri, S., Constituents of the head space gas of Udo (*Aralia cordata* Thunb.). *Nippon Nogeikagaku kaishi*, 52, 223-224 (1978)
- Jeong, S. I., Han, W. S., Yun, Y. H. and Kim, K. J., Continentalic acid from *Aralia continentalis* shows activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Phytother. Res.*, 20, 511-514 (2006)
- Kawai, H., Nishida, M., Tashiro, Y., Kuroyanagi, M., Ueno, A. and Satake, M., Studies on the structures of Udosaponins A, B, C, D, E and F from *Aralia cordata* Thunb. *Chem. Pharm. Bull.*, 37, 2318-2321 (1989)
- Kim, J. P., Jung, M. Y., Kim, J. P. and Kim, S. Y., Antiphototoxidative activity of protoberberines derived from *Coptis japonica* Makino in the chlorophyll-sensitized phototoxidation of oil. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 1058–1063 (2000)
- Kim, J. S. and Kang, S. S., Saponins from the aerial parts of *Aralia continentalis*. *Nat. Prod. Sci.*, 4, 45-50 (1998)
- Kim, J. S., Kang, S. S., Choi, J. S., Lee, M. W. and Lee, T. S., Antioxidant components from *Aralia continentalis*. *Kor. J. Pharmacogn.*, 29, 13-17 (1998)
- Kim, J. S., Kang, S. S., Lee, M. W. and Kim, O. K., Isolation of flavonoids from the leaves of *Aralia continentalis*. *Kor. J. Pharmacogn.*, 26, 239-243 (1995)
- Lee D. U., Kang Y. J., Park M. K., Lee Y. S., Seo H. G., Kim T. S., Kim C. H. and Chang K. C., Effects of 13-alkyl-substituted berberine alkaloids on the expression of COX-II, TNF- $\alpha$ , iNOS, and IL-12 production in LPS-stimulated macrophages. *Life Sci.*, 73, 1401–1412 (2003)
- Lee, H. S., Rat lens aldose reductase inhibitory activities of *Coptis japonica* root-derived isoquinoline alkaloids. *J. Agri. Food Chem.*, 50, 7013-7016 (2002)
- Lee, I. S., Jin, W., Zhang, X., Hung, T. M., Song, K., S., Seong, Y. H. and Bae, K., Cytotoxic and COX-2 inhibitory constituents from the aerial parts of *Aralia cordata*. *Arch. Pharm. Res.*, 29, 548-555 (2006)
- Lee, M. K. and Kim, H. S., Inhibitory effects of protoberberine alkaloids from the roots of *Coptis japonica* on catecholamine biosynthesis in PC12 cells. *Planta Med.*, 62, 31-34 (1996)
- Li, H. L., Zhang, W. D., Liu, R. H., Zhang, C., Han, T., Wang, X. W., Wang, X. L., Zhu, J. B. and Chen, C. L., Simultaneous determination of four active alkaloids from a traditional Chinese medicine

- Corydalis saxicola* Bunting. (Yanhuanglian) in plasma and urine samples by LC-MS-MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 831, 140-146 (2006)
- Min, Y. D., Yang, M. C., Lee, K. H., Kim, K. R., Choi, S. U. and Lee, K. R., Protoberberine alkaloids and their reversal activity of P-gp expressed multidrug resistance (MDR) from the rhizome of *Coptis japonica* Makino. *Arch. Pharm. Res.*, 29, 757-761 (2006)
  - Nam, C., Kim, S, Sim, Y. and Chang, I., Anti-acne effects of Oriental herb extracts: a novel screening method to select anti-acne agents. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.*, 16, 84-90 (2003)
  - Namba, T., Sekiya, K., Toshinal, A., Kadota, S., Hatanaka, T., Katayama, K. and Koizumi, T., Study on with crude drug. II: the effects of Coptidis Rhizoma extracts as skin permeation the rhizomes of *Coptis japonica* var. *dissecta*. *Chem. Pharm. Bull.*, 43, 578-581 (1995)
  - Okugawa, H., Moriyasu, M., Matsushita, S., Saiki, K., Hashimoto, Y., Matsumoto, K., Fujioka, A. and Kato, A., Evaluation of crude drugs by a combination of Enflourage and chromatography(V). On flavor components in rhizoma of *Notopterygium* sp., and in roots of *Angelica pubescens* and *Aralia cordata*. *Shoyakugaku Zasshi*, 44, 11-16 (1990)
  - Okuyama, E., Nishimura, S. and Yamazaki, M., Analgesic principles from *Aralia cordata* Thunb. *Chem. Pharm. Bull.*, 39, 405-407 (1991)
  - Otsuka, H., Fujimura, H., Sawada, T. and Goto, M., *Yakuzaku Zasshi*, 101, 883-890 (1981)
  - Park, H. J., Hong, M. S., Lee, J. S., Leem, K. H., Kim, C. J., Kim, J. W. and Lim, S., Effects of *Aralia continentalis* on hyperalgesia with peripheral inflammation. *Phytother. Res.*, 19, 511-513 (2005)
  - Park, H. J., Kim, Y. J., Leem, K., Park, S. J., Seo, J. C., Kim, H. K. and Chung, J. H., *Coptis japonica* root extract induces apoptosis through caspase-3 activation in SNU-668 human gastric cancer cells. *Phytother. Res.*, 19, 189-192 (2005)
  - Park, H., Kim, M. S., Jeon, B. H., Kim, T. K., Kim, Y. M., Ahnn, J., Kwon, D. Y., Takaya, Y., Wataya, Y. and Kim, H. S., Antimalaria activity of herbal extracts used in traditional medicine in Korea. *Biol. Pharm. Bull.*, 26, 1623-1624 (2003)
  - Sawamura, M., Lee-Kim, M. S., Shichiri, K. I., Tsuji, T. and Machida, K., Volatile constituents of Japanese and Korean Udo (*Aralia cordata* Thunb.) and Butterbur (*Petasites japonica* Miq.). Research Reports of the Kochi University, 38, 1-12 (1989)
  - Schmeller T., Latz-Bruning B. and Wink M., Biochemical activities of berberine, palmatine and sanguinarine mediating chemical defence against microorganism and herbivores *Phytochemistry*, 44, 257-266 (1997)
  - Sheng, Y. X., Zhang, J. L., Sun, S. Q. and Xu, J. T., Quality analysis and evaluation of Rhizoma Coptidis under different cultivation conditions. *Yao Xue Xue Bao*, 41, 1010-1014 (2006)
  - Sun, J., Ma, J. S., Jin, J., Wang, H. S., Wen, Q. H., Zgang H. G. and Zhou, Q. L., Qualitative and quantitative determination of the main components of huanglianjiedu decoction by HPLC-UV/MS. *Yao Xue Xue Bao*, 41, 380-384 (2006)
  - Yahara, S., Satoshiro, M., Nishioka, I., Nagasawa, T. and Oura, H., *Chem. Pharm. Bull.*, 43, 527-531 (1985)
  - Yokozawa, T., Ishida, A., Cho, E. J. and Nakagawa, T., The effects of Coptidis Rhizoma extract on a hypercholesterolemic animal model. *Phytomedicine*, 10, 17-22 (2003)
  - Yoshihara, K. and Hirose, Y., Terpenes from *Aralia* species. *Phytochemistry*, 12, 468 (1973)
  - Yoshikawa, K., Kinoshita, H., Kan, Y. and Arihara, S., Neolignans and phenylpropanoids from effects of oren-gedoku-to and its components on cholesteryl ester synthesis in cultured human hepatocyte HepG2

cells: evidence from the cultured HepG2 cells and in vitro assay of ACAT. *Planta Med*, 63, 141-145 (1997)

- Yotsumoto, H., Yanagita, T., Yamamoto, K., Ogawa, Y., Cha, J. Y. and Mori, Y., Inhibitory enhancer. *Yakugaku Zasshi*, 115, 618-625 (1995)
- Yu H. H., Kim K. J., Cha J. D., Kim H. K., Lee Y. E., Choi N. Y. and You Y. O., Antimicrobial activity of berberine alone and in combination with ampicillin or oxacillin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Med. Food*, 8, 454-461 (2005)
- Zgai, Z. D., Shi, Y. P., Wu, X. M. and Luo, X. P., Chiral high-performance liquid chromatographic separation of the enantiomers of tetrahydropalmatine and tetrahydroberberine, isolation from *Corydalis yanhusuo*. *Anal Bional Chem*, 384, 939-945 (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.

## 제 2 세부연구개발과제 연구결과

세부과제명 : 황련과 독활의 생리활성성분 분석법 개발

세부과제책임자 : 민병선 / 대구가톨릭대학교

# 제1장 세부연구개발과제의 최종 연구개발 목표

## 1.1 세부연구개발과제의 목표

### [1차년도 연구목표]

한약재의 유효성분 중심의 관리를 위하여 한약재 황련의 성분 동시분석을 위한 HPLC, LC-MS/MS, TLC 분석방법의 설정, validation 확립 및 패턴분석을 이용한 시중제품의 기원을 분석 하고자 함.

### [2차년도 연구목표]

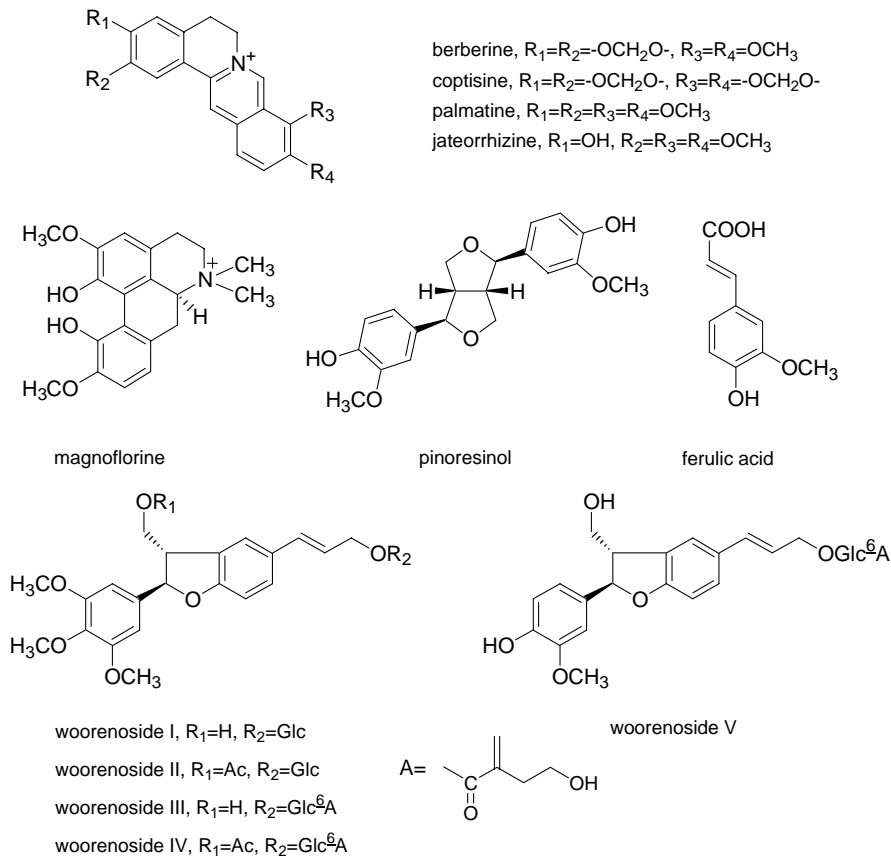
한약재의 유효성분 중심의 관리를 위하여 한약재 독활의 성분 동시분석을 위한 HPLC, LC-MS/MS, TLC 분석방법의 설정, validation 확립 및 패턴분석을 이용한 시중제품의 기원을 분석 하고자 함.

## 1.2 세부연구개발과제의 목표달성도

연구 내용	달성도(%)
한약재(황련, 독활)의 수집	100
한약재(황련, 독활) 성분의 HPLC 분석조건 및 validation	100
한약재(황련, 독활) 성분의 TLC 및 LC-MS/MS 분석	100
한약재(황련, 독활) 성분의 패턴분석에 따른 기원분석	100

## 1.3 국내·외 기술개발 현황

황련(黃連)은 다년생초본으로 *Coptis chinensis*의 뿌리줄기를 사용하며, 높이 50cm 가량이고 꽃은 암수 딴그루 또는 암수 한그루로 꽃대에 1-3개가 달린다. 이약은 주로 11월에 채취하여 말린 후 수염뿌리를 제거하고 코르크층을 약간 긁어 버린 다음 불로 볶은 것을 사용한다. 황련은 포제법(炮製法)에 따라 강황련(薑黃連; 생강즙을 황련에 섞고 약한 불에 볶음), 유황련(萹黃連; 오수유탕액에 황련편을 넣고 볶아 말린 것), 주황련(酒黃連; 황련편에 막걸리를 섞고 볶은 것)이 있다.<sup>1)</sup> 주성분은 alkaloid로 berberine, coptisine, palmatine, jateorrhizine, columbamine, thalifendine, worenine, magnoflorine 등이 있고, lignan 화합물로 woorenosides I-V, pinosresinol, isolariciresinol, syringaresinolglycoside 등이 활성성분으로 알려져 있다.<sup>2)</sup>



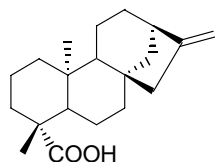
그 중 berberine 등의 isoquinoline alkaloid는 rat lens aldose reductase 억제작용,<sup>3)</sup> human intestinal bacteria 성장억제작용,<sup>4)</sup> catecholamine biosynthesis 억제작용,<sup>5)</sup> tumor cell line에 대한 cytotoxic activity<sup>6)</sup> 및 항산화작용<sup>7)</sup> 등이 알려져 있고, lignan계 화합물로는 neolignan인 woorenoside가 항염증작용,<sup>8)</sup> pinoresinol, woorenoside V 및 lariciresinol glycoside가 tumor necrosis factor 활성억제작용<sup>9)</sup> 등이 보고되어져 있다. 또 황련 추출물이 acyl-CoA:cholesterol acyltransferase (ACAT) 활성억제,<sup>10)</sup> 항말라리아작용,<sup>11)</sup> SNU-688 세포의 apoptosis 활성화<sup>12)</sup> 및 5-fluorouracil 세포막 투과 활성화작용<sup>13)</sup> 등의 다양한 생리활성이 보고되어 있다.

이들 생리활성물질의 동시분석 방법으로는 alkaloid가 연구되어 있고 HPLC-UV 방법 (column: C18; detector: 254 nm, 270 nm; mobil phase: acetonitrile-0.02 M acetic ammonium; acetonitrile-0.5% acetic acid; 0.05 M phosphate buffer)<sup>14-16)</sup>, HPLC-PDA (photodiode array detector) 방법,<sup>17)</sup> chiral HPLC 방법,<sup>18)</sup> HPLC-MS 방법<sup>19)</sup> 및 HPLC-MS/MS 방법<sup>20)</sup> 등이 보고 되어 있다. 그러나 주요성분 중의 하나인 lignan의 분석방법은 보고된 것이 없어 동시 분석을 위한 방법의 설정이 필요하다.

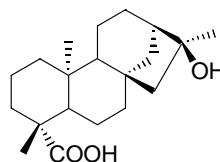
독활(獨活)은 다년생초본 *Aralia cordata* Thunb.의 뿌리를 약용으로 사용한다. 독활은 높이가 약 1.5m가량 전국각지의 산야에서 볼 수 있으며 잎은 어긋나고 2회 깃꼴겹잎이다. 꽃은 암수한그루로 7-8월에 총상으로 갈라진 가지 끝에 둥근 산형 꽃차례로 달린다. 열매는 둥근 모양의 액과로 10월에 익는다. 뿌리는 긴 원주형-막대 모양으로 길이 10-30 cm, 지름 5-20 mm이다. 바깥면은 회백색-회갈색이며 세로주름과 잔뿌리의 자국이 있다. 독활은 거풍, 활혈, 발한, 지통, 소종의 효능이 있어 감모, 두통, 류머티즘, 신경통을 치료한다. 주



요성분으로 kaurane-type diterpene 화합물로 *ent*-kaur-16-en-19-oic acid, 16 $\alpha$ -hydroxy-(-)-kauran-19-oic acid, (-)-kaurenoic acid, (-)-pimara-8(14),15-dien-19-ol, *ent*-pimara-8(14),15-dien-19-oic acid, 17-hydroxy-*ent*-kaur-15-en-19-oic acid 등이 있고, 그 외 polyacetylene, liquid glycerol, sterol 등이 알려져 있다.<sup>2,21-23)</sup>



*ent*-kaur-16-en-19-oic acid



16 $\alpha$ -hydroxy-(-)-kauran-19-oic acid

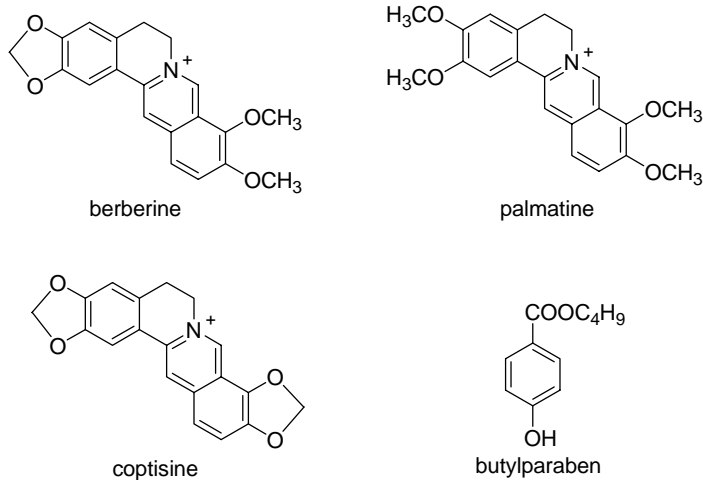
그 중 독활의 diterpene과 triterpene계 화합물이 암세포에 세포독성과 cyclooxygenase 억제활성이 있으며,<sup>21,24)</sup> 독활의 MeOH 추출물이 골다공증에 관련된 apoptosis 억제작용이 알려져 있다.<sup>25)</sup> 독활의 분석에 관한 자료는 없으며 kaurane-type diterpene 유사체인 stevioside의 HPLC-UV (column: NH<sub>2</sub>, acetonitrile-water: 8-2, UV 210 nm; Develosil RPAQUEOUS-AR-5, 0.02 M phosphoric acid-acetonitrile-methanol: 90-55-5, UV 210 nm),<sup>26-27)</sup> HPLC-photodiode detector<sup>28)</sup> 및 LC/ESI-MS<sup>29)</sup> 등이 있고, *Xylopi*a species에서 분리한 kaurane-type diterpene의 분석으로 ODS column과 70% acetonitrile UV 220 nm에서 분석한 자료가 있다.<sup>30)</sup> 그러므로 독활에 관한 분석자료의 설정은 시급히 이루어져만 한다.

## 제2장 세부연구개발과제의 최종 연구개발 내용 및 방법

### 2.1 황련 (Coptis Rhizoma)

#### 가, HPLC 분석조건 설정

황련의 HPLC 분석을 위한 이동상의 조건검토는 황련에는 phenylpropanoid계, lignan계 및 alkaloid계 화합물이 있으나 황련의 주요 생리활성을 갖는 화합물은 alkaloid로 알려져 이들 화합물을 동시에 분석할 수 있는 gradient조건으로 검토하였다. 또한 분석에 소요되는 시간과 각각 성분의 이론단수, resolution을 비교하면서 gradient 조건으로 분석 조건을 연구 검토하였다. HPLC 조건 검토에 사용한 주요활성 성분은 berberine, palamtine 및 coptisine이다.



#### (1), 이동상 buffer용액의 농도와 종류 검토

이동상 설정 실험을 위해서 acetonitrile과 물로 분석조건을 검토하였으나 알칼로이드가 분석되지 않아 buffer 용매를 사용하였다. 검토한 buffer 용액은 20 mM phosphoric acid, 10 mM petanesulfonic acid sodium salt, 10 mM hexanesulfonic acid sodium salt, 10 mM heptanesulfonic acid sodium salt 등이며, 분석 후 황련의 주요성분인 berberine, palmtine, coptisine의 각각의 분석조건에서의 이론단수와 resolution을 검토하였다.

#### (2), 이동상의 ACN 농도설정

10 mM hexanesulfonic acid sodium salt의 용액에서 acetonitrile의 농도는 황련의 상기 지표물질 분리의 적절한 retention time과 효율을 높이기 위하여 2단계로 acetonitrile의 농도를 조절하였다.

#### (3), 내부표준물질 선정

내부표준물질을 선정하기 위해 methylparaben, propylparaben, butylparaben, bisphenol을 10 mM 이동상 분석 조건으로 검토하였다. 황련은 많은 종류의 berberine 유도체가 함유되어 berberine과 충분한 resolution과 retention time을 갖는 butylparaben을 선정하였다.

#### (4), 패턴분석을 위한 자료

상기의 HPLC조건으로 황련 시료의 패턴분석을 위해 70% EtOH 추출물을 분석한 결과 coptisine, palmatine, berberine 및 *epi*-berberine 이 확인되었고, 이들 4가지 성분을 중심으로 HPLC를 이용한 패턴분석을 시도 하였다.

#### (5), HPLC 조건 validation

설정된 황련 성분의 HPLC 조건의 validation을 위해 coptisine, palmatine, berberine 성분의 직선성 범위, 검출한계, 정량한계를 측정하였다. 검량성 범위내 농도에서 coptisine, palmatine, berberine 성분의 HPLC 분석에 의한 일간과 일내의 반복성을 확인하였다. 또한 coptisine, palmatine, berberine 각각의 성분에 대해 1 - 80 µg/ml 농도에서 recovery test를 실시하였다.

#### (6), HPLC 조건의 완전성 검토 (robustness)

설정된 HPLC 조건의 완전성 검토를 위해 coptisine, palmatine 및 berberine에 대해 설정된 HPLC 조건으로 column에 따른 영향을 검토하기 위해 Eclipse XDS-C18 (Agilent Tech., 4.6 x 150 mm, 5 m), Hydrosphere C18 (YMC, 4.6 x 250 mm, 4 m) 및 Xterra RP18 (Waters., 3.9 x 150 mm, 5 m)에 대해 theoretical plate (N), capacity factor ( $k'$ ), resolution ( $R_s$ ) 등 상수를 검토하였다. 또한 Eclipse XDS-C18 (Agilent Tech., 4.6 x 150 mm, 5 m) column을 중심으로 온도에 따른 영향도 검토하였다. Eclipse XDS-C18 (Agilent Tech., 4.6 x 150 mm, 5 m) column에 대해 hexanesulfonate 농도에 따른 각각의 성분의 N,  $k'$ , resolution 등의 영향도 검토 하였다.

#### (7), 황련의 추출조건

황련시료의 추출용매 선정을 위해 70% EtOH, 70% MeOH, 70% EtOH + 1% HCl, 70% MeOH + 1% HCl의 용매조건으로 2시간씩 2회 reflux하여 상기 HPLC 분석조건으로 분석하였다. 용매를 선정하고 추출방법과 추출시간을 검토하였다.

#### (8), 표준품의 안정성

황련의 지표물질로 사용한 coptisine, palmatine, berberine의 안정성을 확인하기 위해 실온과 냉장 조건에서 45일간 안정성 시험을 실시하였다.

#### (9), 시중황련의 함량분석

시중유통 황련 16종: 대구1(CDU-1, 중국산, 화승사 구입, *Coptis chinensis*), 대구2 (CDU-2, 중국산, 현진사 구입, *Coptis chinensis*), 대구3 (CDU-3, 중국산, 경산도매시장 구입, *Coptis chinensis*), 호북성 (CDU-4, 중국산, 호북성 구입, *Coptis chinensis*), 광서성 (CDU-5, 중국산, 광서성 구입, *Coptis chinensis*), 대전1 (CDU-6, 중국산, 백제약품 구입, *Coptis chinensis*), 대전2 (CDU-7, 중국산, 경동약품

구입, *Coptis chinensis*), 대전3 (CDU-8, 중국산, 중도한의원 구입, *Coptis chinensis*), 제기동1 (CDU-9, 중국산, 보수변포장, *Coptis chinensis*), 제기동2 (CDU-10, 중국산, 명인약국 구입, *Coptis chinensis*), 영천1 (CDU-11, 중국산, 경신약품 구입, *Coptis chinensis*), 영천2 (CDU-12, 중국산, 영천약령시장 구입, *Coptis chinensis*), 영천3 (CDU-13, 중국산, 영천약령시장 구입, *Coptis chinensis*), 광주1 (CDU-14, 중국산, 세화당 구입, *Coptis chinensis*), 광주2 (CDU-15, 중국산, 광덕산업 구입, *Coptis chinensis*), 광주3 (CDU-16, 중국산, 조화약국 구입, *Coptis chinensis*)과 식의약청에서 제공한 황련 7종; 호황련 (N-2, *Picrorrhiza kurrooa*), 모황련 (N-3, *Coptis chinensis*, 서울수집), 서울수집 (N-4, *Coptis chinensis*), 안국시장 수집 (N-5, *Coptis chinensis*), 안국시장 수집 (N-6, *Coptis chinensis*), 서녕시장 수집 (N-7, *Coptis chinensis*), 조황련 (N-8, *Jeffersonia dubia*)을 대상으로 상기에서 선정한 추출방법과 HPLC 분석조건으로 alkaloid계 성분의 함량분석을 실시하였다.

#### 나, TLC 분석조건 설정

황련 중의 coptisine, palmatine, berberine 및 *epi-berberine*의 패턴분석과 유사성분의 확인을 위한 방법으로 TLC를 이용하여 시중에서 유통되는 구입한 16종의 황련과 식품의약품안전청에서 제공한 황련, 호황련, 조황련 시료를 70% MeOH + 1% HCl 로 추출액 100  $\mu$ l 와 각각의 표준품 10 ng씩을 spotting한 후 n-propanol : formic acid : Water = 90 : 1 : 9 의 용매로 전개 후 365 nm에서 확인 하였다.

#### 다, pringer print 패턴분석

시장 수집품 16종과 식의약청 제공품 7종에 대한 coptisine, palmatine, berberine, *epi-berberine*의 함량에 대한 R-program을 이용하여 통계처리 하였다. 통계처리는 dendrogram으로 표시되는 agglomerative clustering(AGNES)과 함량 자료를 PCR로 처리하여 partitioning around medoids (PAM) 과 clustering large applications(CLARA) data를 얻었다.

#### 라, LC-MS/MS 동시정량법

##### (1), HPLC 분석조건

HPLC system은 binary pump, autosampler, degasser, column oven 으로 구성된 Agilent 1100 series (Palo Alto, CA, USA)를 이용하였다. 0.06% acetic acid in 1.5 mM ammonium acetate-methanol (60 : 40, v/v)으로 isocratic elution하였고 Agilent ZORBAX SB-C18 3.5  $\mu$ m (2.1 x 150 mm)의 역상 컬럼으로 분리하였다. 컬럼 온도는 40  $^{\circ}$ C로 유지하였으며 유속은 0.2 mL/min으로 하였다.

Table HPLC condition of *Coptis chinensis*

Column	Agilent ZORBAX SB-C18 3.5 $\mu$ m (2.1 x 150 mm)
Column Temp.	A constant temperature of about 40 $^{\circ}$ C
Mobile Phase	A mixture of 0.06% acetic acid in 1.5 mM ammonium acetate-methanol (60 : 40, v/v)
Flow rate	0.2 mL/min ( Total Analytical time within 15min)

## (2), LC-MS 분석조건

MS system은 Sciex API 3000 triple-quadrupole tandem mass spectrometry (Applied Biosystems, MDS Sciex, concord, Canada)를 사용하였다. Ion spray interface는 turbo ion spray로 turbo gas temperature를 400  $^{\circ}$ C에서 4.5 KV로 하여 positive ion detection mode로 측정하였다. 최적 측정 parameter는 모든 성분 혼합물을 flow injection 하여 다음의 최적조건을 구하였다. nebulizing gas flow, 1.46 L/min; auxiliary gas flow, 6.1 l/min; curtain gas flow, 0.95 L/min; orifice voltage, 53 V, ring voltage, 400 V; collision gas (nitrogen) pressure,  $3.58 \times 10^{-5}$  Torr. berberine,  $m/z$  336.9  $\rightarrow$   $m/z$  321.2; *epi*-berberine,  $m/z$  336.9  $\rightarrow$   $m/z$  321.2; palmatine,  $m/z$  352.4  $\rightarrow$   $m/z$  337.0; coptisine,  $m/z$  320.0  $\rightarrow$   $m/z$  292.9로 측정하였다.

## (3), LC-MS/MS 검량선작성

각각의 성분에 대한 LC-MS/MS로 정량성을 확인하기 위하여 100, 200, 500, 1000 ng/ml 농도에서 상기 LC-MS/MS 조건에서 검량선을 작성하였다.

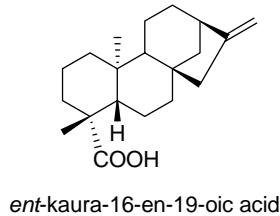
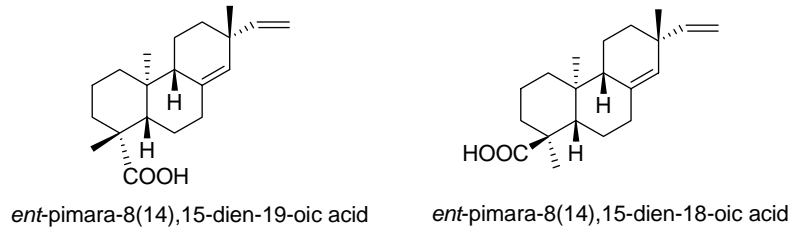
## 2.2 독활 (*Araliae Continentalis Radix*)

### 가, HPLC 분석조건 설정

독활의 생리활성 성분에 대한 정량법을 개발하기 위해 독활의 주요성분인 diterpene계 화합물을 사용하였다. 독활의 주요성분은 kaurane-type과 pimarane-type의 diterpen계 화합물이며, diterpenoid계 화합물의 생리활성으로 진통작용, 진정작용, 항염증작용이 보고되어 있다. 본 연구에서 독활의 주요성분 분석은 *ent*-pimara-8(14),15-dien-19-oic acid (continentalic acid), *ent*-pimara-8(14),15-dien-18-oic acid (*epi*-continentalic acid), *ent*-kaura-16-en-19-oic acid (kaurenoic acid)를 사용하였다.

## (1), 이동상 buffer용액의 농도와 종류 검토

이동상 설정을 위해 acetonitrile과 물로 분석조건을 검토하였으나 diterpene계 화합물은 극성이 아주 낮고 UV chromophore가 없어 분석에 어려움이 있었다. 그러므로 buffer 용매를 사용하였고 검토한 buffer 용액은 20 mM phosphoric acid, 10 mM hexanesulfonic acid sodium salt, 0.1% acetic acid solution, 0.1% TFA (trifluoroacetic acid) solution 등이며 분석 후 독활의 주요성분인 continentalic acid의 분석조건에서 이론단수를 검토하였다.



(2), detector 파장 검토

diterpene계 화합물은 UV chromophore가 없고 분자량이 작아 UV detector 사용에 의한 분석은 어려움이 있어 여러 파장을 검토하였다.

(3), 내부표준물질 선정

HPLC 분석조건에서 표준품과 겹치지 않으며 거의 유사한 분석시간과 UV 흡수를 갖는 화합물을 찾기 위하여 구조적으로 연관성이 있는 화합물을 HPLC로 분석하였다.

분석에 사용한 화합물

- \* paraben계 화합물: methylparaben, ethylparaben, butylparaben, bisphenol.
- \* terpene계 화합물: eudesmol, cryptomeriol, tetralone, 3a,23-dihydroxyolean-12-en-27-oic acid, 3-oxo-23-hydroxyolean-12-en-27-oic acid.
- \* lignan계 화합물: asarone, pinosresinol, laricinresinol. 등을 검토하였다.

(4), 패턴분석을 위한 자료

HPLC조건으로 독활 시료의 패턴분석을 위해 70% EtOH 추출물을 분석한 결과 continentalic acid 와 kaurenoic acid는 다량 함유로 확인이 용이 하였으나, *epi*-continentalic acid는 미량 함유되어 있었다. 이들 3가지 성분을 중심으로 HPLC를 이용한 패턴분석을 시도 하였다.

(5), HPLC 조건 validation

설정된 독활 성분의 HPLC 조건의 validation를 위해 continentalic acid, *epi*-continentalic acid, kaurenoic acid 성분의 직선성 범위, 검출한계, 정량한계를 측정하였다. 검량성 범위내 농도에서 continentalic acid, *epi*-continentalic acid, kaurenoic acid 성분의 HPLC 분석에 의한 일간과 일내의 반복성을 확인하였다. 또한 continentalic acid, *epi*-continentalic acid, kaurenoic acid 각각의 성분에 대해 6.7 - 23.3 µg/ml 농도에서 recovery test를 실시하였다.

(6), HPLC 조건의 완건성 검토 (robustness)

설정된 HPLC 조건의 완건성 검토를 위해 continentalic acid, *epi*-continentalic acid 및 kaurenoic acid에 대해 설정된 HPLC조건으로 column에 따른 영향을 검토하기 위해 Eclipse XDS-C18 (Agilent Tech., 4.6 x 150 mm, 5 m), Hydrosphere C18 (YMC, 4.6 x 250 mm, 4 m) 및 Xterra RP18 (Waters., 3.9 x 150 mm, 5 m)에 대해 theoretical plate (N), capacity factor (k'), resolution (Rs) 등 상수를 검토하였다. 또한 Eclipse XDS-C18 (Agilent Tech., 4.6 x 150 mm, 5 m) column을 중심으로 온도에 따른 영향도 검토하였다.

(7), 독활의 추출조건

독활시료의 추출용매 선정을 위해 70% EtOH, 70% MeOH, EtOH, MeOH의 용매로 1시간씩 1회 sonication하여 상기 HPLC 분석조건으로 분석하였다. 추출용매를 선정하고 추출방법과 추출시간을 검토하였다.

(8), 표준품의 안정성

독활의 지표물질로 사용한 continentalic acid, *epi*-continentalic acid 및 kaurenoic acid의 안정성을 확인하기 위해 실온과 냉장 조건에서 30일간 안정성 시험을 실시하였다.

(9), 시중 독활의 함량분석

식의약청에서 제공한 독활 6종; 독활 (AC-1, *Aralia cordata*, 무주 산), 천독활 (AC-2, *Angelica pubescens*), 천독활 (AC-3, *Angelica pubescens*, 호북성 산), 천독활 (AC-4, *Angelica pubescens*), 독활 (AC-5, *Aralia cordata*, 진안 산), 독활 (AC-6, *Aralia cordata*, 임실 산); 시중유통 독활 14종: 독활 (AC-7, *Aralia cordata*, 임실 산, 광주구입 1), 독활 (AC-8, *Aralia cordata*, 평창 산, 광주구입 2), 독활 (AC-9, *Aralia cordata*, 임실 산, 금산구입 1), 독활 (AC-10, *Aralia cordata*, 임실 산, 금산구입 2), 독활 (AC-11, *Aralia cordata*, 임실 산, 제기동구입 1), 독활 (AC-12, *Aralia cordata*, 임실 산, 영천구입 1), 독활 (AC-13, *Aralia cordata*, 임실 산, 영천구입 2), 독활 (AC-14, *Aralia cordata*, 임실 산, 영천구입 3), 독활 (AC-15, *Aralia cordata*, 안동 산, 대구구입 1), 독활 (AC-16, *Aralia cordata*, 임실 산, 대구구입 2), 독활 (AC-17, *Aralia cordata*, 의성 산, 대구구입 3), 독활 (AC-18, *Aralia cordata*, 임실 산, 대전구입 1), 독활 (AC-19, *Aralia cordata*, 임실 산, 대전구입 2), 독활 (AC-20, *Aralia cordata*, 임실 산, 대전구입 3)을 대상으로 상기에서 선정한 추출방법과 HPLC 분석조건으로 분석을 실시하였다.

나, TLC 분석조건 설정

독활 중의 continentalic acid, *epi*-continentalic acid 및 kaurenoic acid의 패턴분석과 유사성분의 확인을 위한 방법으로 TLC를 이용하여 시중에서 유통되는 구입한 14종의 독활과 식품의약품안전청에서 제공한 6종의 독활 시료를 70% EtOH로 추출액 후, 추출액을 TLC plate에 점적 후 hexane : EtOAc (5% formic acid) = 5 : 1의 용매로 전개 후 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> spray 후 heating하여 각각의 성분을 확인하였

다.

### 다, pringer print 패턴분석

시장 수집품 14종과 식의약청 제공품 6종에 대한 continentalic acid, epi-continentalic acid 및 kaurenoic acid의 함량에 대한 R-program을 이용하여 통계처리 하였다. 통계처리는 dendrogram으로 표시되는 agglomerative clustering(AGNES)과 함량 자료를 PCR로 처리하여 partitioning around medoids (PAM)과 clustering large applications(CLARA) data를 얻었다.

### 라, LC-MS/MS 동시정량법

#### (1), HPLC 분석조건

HPLC system은 binary pump, autosampler, degasser, column oven 으로 구성된 Agilent 1100 series (Palo Alto, CA, USA) 을 이용하였다. 0.1% TFA - acetonitrile (35 : 65, v/v)으로 isocratic elution하였고 Agilent Eclipse XDB-C18 3.5  $\mu$ m (2.1 x 100 mm)의 역상 컬럼으로 분리하였다. 컬럼 온도는 35  $^{\circ}$ C로 유지하였으며 유속은 0.25 mL/min으로 하였다.

Table HPLC condition of *Coptis chinensis*

Column	Agilent Eclipse XDB-C18 3.5 $\mu$ m (2.1 x 100 mm)
Column Temp.	A constant temperature of about 35 $^{\circ}$ C
Mobile Phase	A mixture of 0.1% TFA - acetonitrile (35 : 65, v/v)
Flow rate	0.25 mL/min ( Total Analytical time within 20 min)

#### (2), LC-MS 분석조건

MS system은 Sciex API 3000 triple-quadrupole tandem mass spectrometry (Applied Biosystems, MDS Sciex, concord, Canada)를 사용하였다. Ion spray interface는 turbo ion spray로 turbo gas temperature를 400  $^{\circ}$ C에서 4.5 KV로 하여 negative ion detection mode로 측정하였다. 최적 측정 parameter는 모든 성분 혼합물을 flow injection 하여 다음의 최적조건을 구하였다. nebulizing gas flow, 1.46 L/min; auxiliary gas flow, 6.1 l/min; curtain gas flow, 0.95 L/min; orifice voltage, 53 V, ring voltage, 400 V; collision gas (nitrogen) pressure,  $3.58 \times 10^{-5}$  Torr. 3가지 성분 ion transition은  $m/z$  301.20  $\rightarrow$   $m/z$  301.00로 측정하였다.

#### (3), LC-MS/MS 검량선작성

각각의 성분에 대한 LC-MS/MS로 정량성을 확인하기 위하여 25, 40, 50 ug/ml 농도에서 상기 LC-MS/MS 조건에서 검량선을 작성하였다.



## 제3장 세부연구개발과제의 최종 연구개발 결과

### 3.1 황련 (Coptis Rhizoma)

#### 가, HPLC 분석조건

##### (1), 이동상 buffer용액의 농도와 종류

이동상 실험을 위해서 acetonitrile과 물로 분석조건을 검토하였으나 알칼로이드가 분석되지 않아 buffer 용매를 사용하였다. 검토한 buffer 용액은 20 mM phosphoric acid, 10 mM pentanesulfonic acid sodium salt, 10 mM hexanesulfonic acid sodium salt, 10 mM heptanesulfonic acid sodium salt 등이며, 분석 후 황련의 주요성분인 berberine, palmatine, coptisine 각각의 분석조건에서의 이론단수와 resolution을 검토하였다. 연구에 사용된 buffer solution 중 10 mM hexanesulfonic acid sodium salt가 가장 높은 분석 효율을 보여 분석조건으로 선정하였다.

Table. Effect of buffer solutions on mobil phase

Mobile phase	Retention time (min)			Theoretical number		
	coptisine	palmatine	berberine	coptisine	palmatine	berberine
20 mM phosphoric acid	11.21	12.65	13.46	10041	10326	11691
10 mM pentanesulfonic acid-Na	24.75	27.57	28.24	164786	172371	180851
10 mM hexanesulfonic acid-Na	25.31	28.90	29.51	170042	178935	197483
10 mM heptanesulfonic acid-Na	28.45	33.82	35.56	80143	73962	81768

##### (2), 이동상 용매조성 검토

10 mM hexanesulfonic acid sodium salt의 용액에서 acetonitrile의 농도는 황련의 상기 지표물질 분리의 적절한 retention time과 효율을 높이기 위하여 2단계로 acetonitrile의 농도를 조절하였다. 아래의 Table과 같이 5단계의 조건으로 분석한 결과 약 20분대의 분석시간, 높은 이론단수와 resolution을 갖는 조건 acetonitrile 농도 15% (0 분) → 35% (20 분) → 80% (40 분)의 조건을 분석 용매로 선정하였다.

Table. Effect of Acetonitrile amount (%) in 10 mM hexanesulfonic acid-Na buffer solution

Amount of AcCN on Mobile phase	Retention time (min)		Theoretical number		Resolution
	palmatine	berberine	palmatine	berberine	
15 → 30(20 min) → 75(40 min)	25.82	26.62	66708	70905	2.00
15 → 45(20 min) → 75(40 min)	19.56	20.47	86762	95022	2.50
15 → 30(20 min) → 80(40 min)	25.82	26.55	97010	102573	2.50
15 → 35(20 min) → 80(40 min)	22.53	23.54	115110	125662	2.50
15 → 40(20 min) → 80(40 min)	19.71	20.61	88097	96327	2.00

(3), 내부표준물질 선정

내부표준물질을 선정하기 위해 methylparaben, propylparaben, butylparaben, bisphenol을 상기의 이동상 분석 조건으로 검토하였다. 황련은 많은 종류의 berberine 유도체가 함유되어 **berberine과 충분한 resolution과 retention time을 갖는 butylparaben을 선정하였다.**

Table Retention time for internal standard compounds.

Compound	Retention time (min)
Methylparaben	11.27
Propylparaben	20.33
Butylparaben	27.21
bisphenol	21.01

(4), HPLC 분리조건 설정

최종 분석조건은 Table에 나타내었고 chromatogram을 Fig에 나타내었다. 여러 분석조건을 검토한 결과 용매는 10 mM hexansulfonic acid의 ion pair 시약을 사용하는 것이 가장 효과가 좋았고, isocratic 방법으론 분석시간이 많이 소요되어 gradient system을 사용하였다. 그리고 detector는 UV 254 nm에서 정량이 가능하였으며 column의 온도는 30 °C를 사용하였다. 상기의 분석조건으로 황련의 주요 성분인 berberine, palmatine 및 coptisine을 분석하였다. 내부 표준물질은 retention time을 고려하여 butyl paraben을 선정하였고 전체적인 chromatogram은 아래와 같다.

Table HPLC condition for analysis of Coptidis Rhizoma

Mobile phase	time (min)	A (10 mM hexanesulfonic acid-Na) %	B (Acetonitrile) %
	0	85	15
	20	65	35
	40	20	80
Detector	UV (254 nm)		
Column	Agilent Eclipse XD8-C18 (5 µm, 4.6 X 150 mm)		
Flow rate	1 mL/min		
Column temp.	30 °C		
Injection volume	5 µL		
Device	GILSON 306 PUMP, UV/VIS-156 Detector, 231 XL sampling injector		

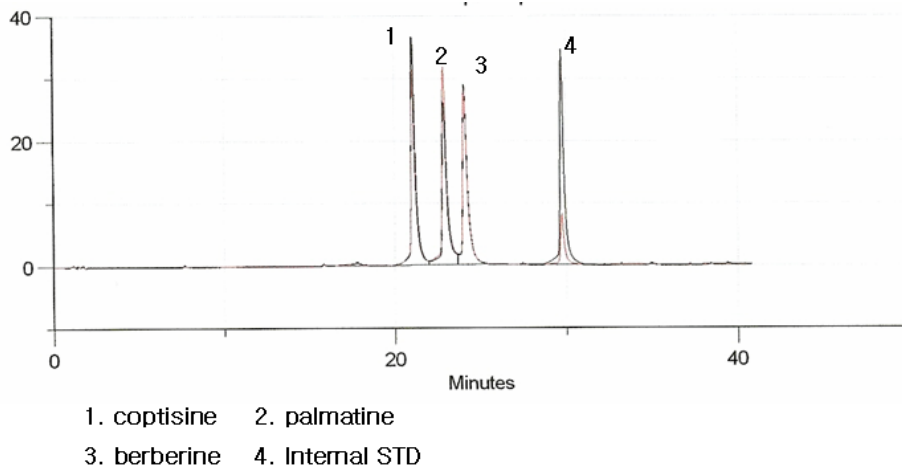


Fig. Typical chromatogram of compounds from Coptidis Rhizoma and Internal standard

(5), 패턴분석을 위한 70% EtOH 추출물 분석자료

상기의 HPLC조건으로 황련 시료의 패턴분석을 위해 70% EtOH 추출물을 분석한 결과 coptisine, palmatine 및 berberine이 확인되었고, 첫 번째 peak는 epi-berberine로 확인되었는데 분석조건을 검토 후에 제1세부과제에서 분리되어 분석법 검토에서는 validation을 하지 못하였다. 그 외 alkaloid peak와 다른 화합물 peak는 확인되지 않았으나, epi-berberine을 포함하는 4가지 alkaloid계 성분은 HPLC를 이용한 패턴분석에서 황련시료 평가의 중요한 지표가 되고, 황백이나 다른 유사 생약에서 검출되지 않는 epi-berberine이 확인되어 다른 유사 생약과도 비교 할 수 있다.

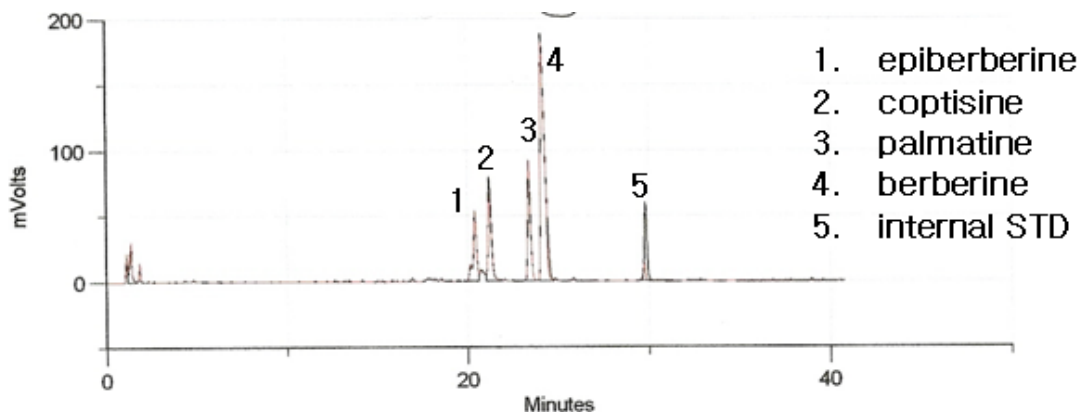


Fig. Typical chromatogram of 70% EtOH extract from Coptidis Rhizoma

(6), HPLC 분석조건 validation

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

황련의 유효성분의 직선성 농도범위를 coptisine; 2~100 µg/mL, palmatine; 2~100 µg/mL 및

berberine; 2~100 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) = 4을 기준으로 정하였고, 정량한계(LOQ)는 S/N = 10을 나타내는 농도로써 표기하였다.

Table, Linearity/LOD/LOQ of marker compounds

compound	linear range (µg/mL)	slope(a)	intercept(b)	correlation coefficient(r)	LOD (µg/mL)	LOQ (µg/mL)
coptisine	2 - 100	-0.02357	0.02938	0.9994	0.1	0.25
palmatine	2 - 100	-0.001	0.02440	0.9992	0.1	0.25
berberine	2 - 100	0.01507	0.02039	0.9987	0.1	0.25

② coptisine, palmatine 및 berberine의 검량선

coptisine, palmatine 및 berberine은 2~100 µg/mL 농도범위에서 각각 correlation coefficient가 0.9994, 0.9992, 0.9987로 높은 직선성을 보였다.

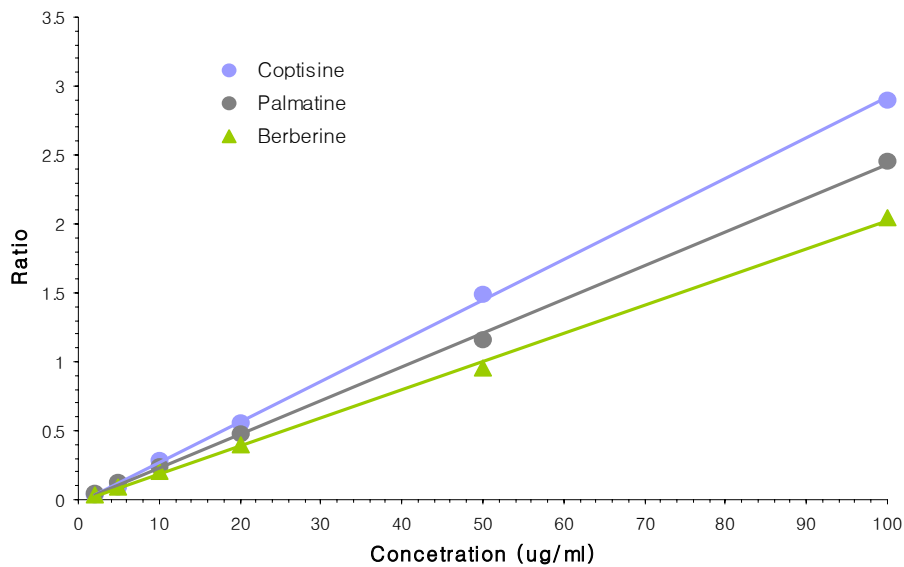


Fig. Calibration curve of marker compounds

③ 재현성(reproducibility)

전 분석과정을 통한 분석결과의 일내 및 일간의 재현성을 확인하기위해 지표성분의 표준물을 분석한 결과를 Table에 나타내었다. 분석결과 일간 및 일내 정밀성은 coptisine, palmatine, berberine 모두 0.1% 이내였다. 표준품의 분석 결과 상기의 HPLC 조건으로 황련의 함유 alkaloid계 성분의 분석은 높은

재현성을 보이며 분석이 가능하였다.

Table, Repeatability of peak area ratio and retention time for standard by HPLC

compound	Intra day (n = 5)			Inter day (n = 3)				
	Peak area ratio (peak area/IS area)	Mean	SD	SEM	Peak area ratio (peak area/IS area)	Mean	SD	SEM
coptisine	8.07	0.07	0.03	8.04	0.04	0.02		
palmatine	6.37	0.07	0.03	6.38	0.07	0.04		
berberine	7.43	0.07	0.03	7.37	0.05	0.03		

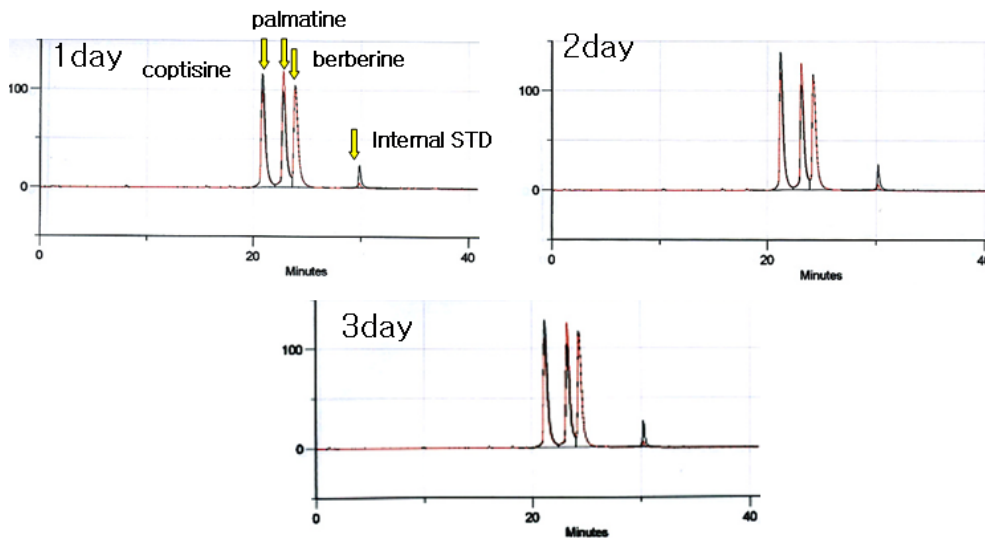


Fig. Typical chromatogram of standard compounds for repeatability test of inter day

#### ④ 회수율 (Recovery test)

균질한 검체 분말을 추출, 여과 등 전처리 조작을 거치는 동안 지표성분의 회수율을 검토하기 위하여 표준물 첨가법에 의한 분석결과로부터 구하였다. 최종 검액 중 spike한 표준물의 농도가 대조검체의 각 성분 대하여 peak 면적에 50~100% 범위에서 (coptisine 40, 80 µg/mL; palmatine: 40, 80 µg/mL; berberine: 50, 100 µg/mL) 첨가한 3 batch의 검액 (QC sample)과 대조검체로 표준물을 첨가하지 않은 검체를 분석하여 회수율을 구한 결과는 Table과 같다. 실험결과는 Table과 같이 coptisine, palamtine, berberine의 세 성분 모두 98에서 102 %의 높은 회수율을 보였는데 본 연구에서 설정한 HPLC 분석조건은 상기의 3가지 성분이 주로 검출되어 황련의 다른 성분에 의한 간섭효과가 없어 높은 회수율을 나타내었다. 이러한 결과는 분석파장(254 nm)의 안정성과 다른 간섭성분이 관찰되지 않아 생약의 분석 중에서는 아주 정밀히 분석이 가능한 시료로 사료된다.

Table Recovery of marker compounds through standard addition

compound	Added conc. ( $\mu\text{g/mL}$ )	Cal conc. ( $\mu\text{g/mL}$ )	Recovery(%)	SD	SEM
coptisine	0.0	77.57	-	-	-
	40.0	120.76	102.71	0.38	0.22
	80.0	158.84	100.81	3.54	2.05
palmatine	0.0	75.06	-	-	-
	40.0	112.86	98.09	0.52	0.30
	80.0	155.79	100.46	1.19	0.69
berberine	0.0	264.53	-	-	-
	50.0	310.55	98.73	0.53	0.31
	100.0	360.38	98.86	6.67	3.85

(7), HPLC 조건의 완전성 검토 (robustness)

① column 종류의 비교

완전성 시험은 coptisine, palamtine 및 berberine의 설정된 HPLC 조건으로 HPLC column에 따른 영향을 Eclipse XDS-C18 (Agilent Tech., 4.6 x 150 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), Luna C18 (YMC, 4.6 x 150 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) 및 Xterra RP18 (Waters., 4.6 x 150 mm, 5  $\mu\text{m}$ )에 대해 **theoretical plate (N)**, **capacity factor (k')**, **resolution (Rs)** 등 상수를 검토한 결과 이론단수 및 분리도는 YMC column 이 제일 크게 나왔고 다른 상수는 큰 차이가 없었다. 이상의 결과로 상기 설정된 HPLC 조건은 어느 column에 적용하여도 황련의 지표성분 분석이 가능할 것으로 판단된다.

Table, Comparison of Columns for Robustness

Columns	Surface Area / $\text{cm}^2$	Pore size ( $\text{\AA}$ )	Analytes		
			coptisine	palmatine	berberine
<u>Theoretical plate (N)</u>					
Eclipse XDB-C18	177	80	124975 $\pm$ 4641	127658 $\pm$ 5561	130280 $\pm$ 5485
Luna C18	400	100	86121 $\pm$ 4933	115254 $\pm$ 17398	135530 $\pm$ 4698
Xterra RP18	177	129	70165 $\pm$ 497	21211 $\pm$ 155	23925 $\pm$ 142
<u>Capacity factor (k')</u>					
Eclipse XDB-C18	177	80	3.82 $\pm$ 0.03	4.32 $\pm$ 0.02	4.51 $\pm$ 0.06
Luna C18	400	100	6.92 $\pm$ 0.12	7.26 $\pm$ 0.12	8.09 $\pm$ 0.09
Xterra RP18	177	129	3.06 $\pm$ 0	3.46 $\pm$ 0.01	3.74 $\pm$ 0
<u>Resolution (R)</u>					
Eclipse XDB-C18	177	80	-	4.12 $\pm$ 0.03	1.98 $\pm$ 0.04
Luna C18	400	100	-	3.03 $\pm$ 0.13	7.51 $\pm$ 0.08
Xterra RP18	177	129	-	3.72 $\pm$ 0.03	2.43 $\pm$ 0.15

② column 온도에 따른 비교

분석에 사용한 column Eclipse XDB-C18의 분석온도 30℃, 35℃, 40℃로 조절하면서 각각의 분석된 chromatography에서 theoretical plate (N), capacity factor (k'), separation factor (α), resolution (Rs) 등 상수를 검토한 결과 온도변화에 따른 이론단수 및 분리도에 관여된 상수는 큰 차이가 없었다. 상기의 HPLC 분석조건은 온도에 따른 영향 없이 황련의 함량분석이 가능하였다.

Table, Comparison of Temperature for Robustness

Temperature (°C)	Analytes		
	coptisine	palmatine	berberine
<u>Theoretical plate (N)</u>			
30	124975 ± 4641	127658 ± 5561	130280 ± 5485
35	123903 ± 476	129767 ± 483	128957 ± 3193
40	123033 ± 217	129171 ± 233	124040 ± 971
<u>Capacity factor (k')</u>			
30	3.82 ± 0.03	4.32 ± 0.02	4.51 ± 0.06
35	3.86 ± 0.10	4.40 ± 0.13	4.45 ± 0.10
40	3.39 ± 0.13	3.92 ± 0.11	4.09 ± 0.14
<u>Resolution (R)</u>			
30	-	4.12 ± 0.03	1.98 ± 0.04
35	-	4.13 ± 0.05	1.88 ± 0.07
40	-	4.35 ± 0.26	1.42 ± 0.06

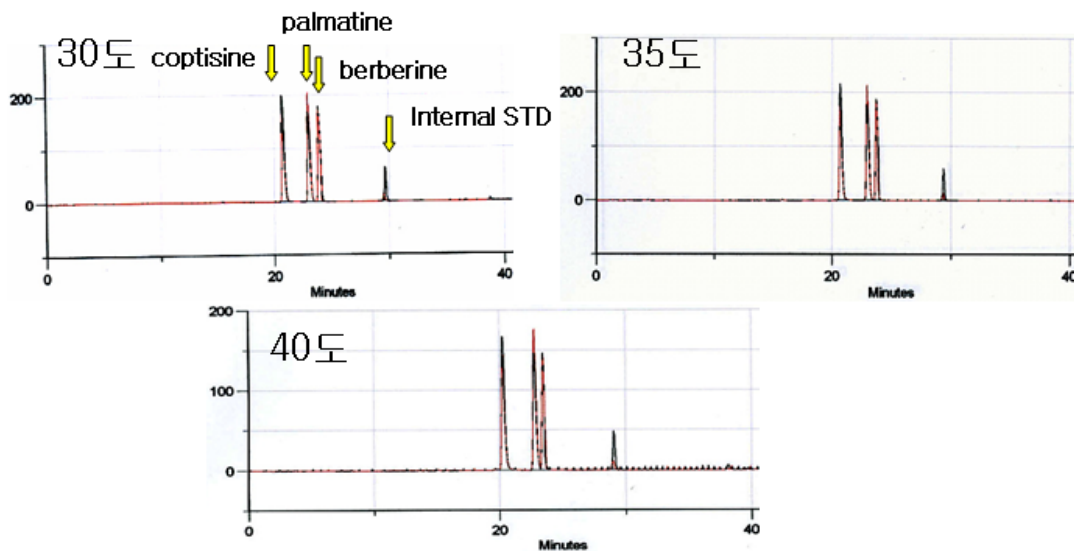


Fig. Typical chromatogram of comparison of temperature for robustness

③ 1-hexansulfonate 농도에 따른 비교

황련의 분석에 사용한 coptisine, palamtine, berberine은 alkaloid계 화합물의 분리도를 높이기 위하여 ion-pair 물질 1-hexansulfonate의 5 mM, 10 mM, 20 mM 농도에 따른 각각의 성분의 theoretical plate (N), capacity factor (k'), separation factor (α), resolution (Rs) 등 상수를 검토한 결과 이론단수

및 분리도 등의 상수는 차이가 없었다. 상기의 HPLC 분석조건은 ion pair 시약으로 사용한 hexanesulfonic acid의 농도에 따른 영향 없이 황련의 함량분석이 가능하였다.

Table, Comparison of 1-hexanfulfonate concentration for Robustness

Temperature (°C)	Analytes		
	coptisine	palmatine	berberine
<u>Theoretical plate (N)</u>			
5	123805 ± 495	129470 ± 172	114314 ± 52
10	124975 ± 4641	127658 ± 5561	130280 ± 5485
20	123033 ± 217	130939 ± 397	133036 ± 298
<u>Capacity factor (k')</u>			
5	3.63 ± 0.07	4.12 ± 0.10	4.35 ± 0.09
10	3.81 ± 0.03	4.32 ± 0.02	4.51 ± 0.06
20	3.88 ± 0.06	3.32 ± 0.05	4.54 ± 0.06
<u>Resolution (R)</u>			
5	-	3.78 ± 0.29	1.41 ± 0.07
10	-	4.23 ± 0.08	1.97 ± 0.04
20	-	4.48 ± 0.24	2.11 ± 0.10

(8), 시료의 추출조건 검토

① 추출용매 (Extraction solvent)

황련 시료 추출 시 추출용매의 선정을 위해 시료 10 g 씩을 각각 70% EtOH, 70% MeOH, 70% EtOH + 1% HCl 및 70% MeOH + 1% HCl로 각각 2시간씩 2회 reflux하여 상기의 HPLC 조건으로 coptisine, palmatine, berberine을 분석하였다. Table과 같이 palmatine과 berberine은 70% MeOH 용매의 추출로 가장 높은 추출을 보였고, coptisine은 70% MeOH + 1% HCl의 추출에서 높은 추출이 확인되었다. 전체적으로 3가지 성분의 추출은 70% MeOH에서 높은 추출이 확인되었고, 각각의 시료의 표준편차, 상대에러도 에러범위가 적절한 용매인 75% 메탄올로 추출용매를 설정하였다.



Table Extraction efficiency (%) vs. extracting solvents

solvent	content (mg/g)								
	coptisine			palmatine			berberine		
	Mean	SD	SEM	Mean	SD	SEM	Mean	SD	SEM
70% EtOH	14.63	0.99	0.58	14.28	0.36	0.21	53.16	2.10	1.21
70% MeOH	17.79	0.31	0.18	16.91	0.65	0.37	60.42	2.36	1.36
70% EtOH + 1% HCl	19.19	1.14	0.65	16.65	1.31	0.75	57.09	3.26	1.88
70% MeOH + 1% HCl	19.52	0.13	0.07	15.85	0.42	0.24	58.67	2.36	1.36

② 추출시간과 추출조건

70% MeOH+1% HCl로 30, 60, 120분 추출 시 추출방법으로 초음파추출, 환류냉각 추출 및 상온에서 추출을 비교하였고 그 결과를 Table에 나타내었다. 추출시간은 60분 이상에서 추출이 되었으며, 추출 방법은 reflux와 sonication 방법에는 차이가 없었다.

Table, Extraction efficiency (%) vs. extracting solvents.

Method (min)	content (mg/g)								
	coptisine			palmatine			berberine		
	Mean	SD	SEM	Mean	SD	SEM	Mean	SD	SEM
<i>Sonication</i>									
30(X 2)	2.00	0.02	0.01	2.19	0.03	0.01	8.23	0.14	0.08
60(X 2)	8.78	0.06	0.03	10.11	0.11	0.06	40.17	0.18	0.10
120(X 2)	9.67	0.19	0.11	10.81	0.48	0.28	43.46	0.16	0.09
<i>Reflux</i>									
30(X 2)	3.24	0.03	0.02	3.63	0.04	0.02	13.78	0.09	0.05
60(X 2)	10.46	0.14	0.08	11.79	0.23	0.13	47.43	0.86	0.50
120(X 2)	10.26	0.05	0.03	10.76	0.06	0.03	47.97	0.11	0.06
<i>Shaking</i>									
30(X 2)	2.35	0.02	0.01	2.83	0.04	0.02	9.68	0.15	0.08
60(X 2)	5.42	0.07	0.04	6.65	0.06	0.04	25.43	0.28	0.16
120(X 2)	7.04	0.19	0.11	8.55	0.22	0.13	33.30	0.68	0.39

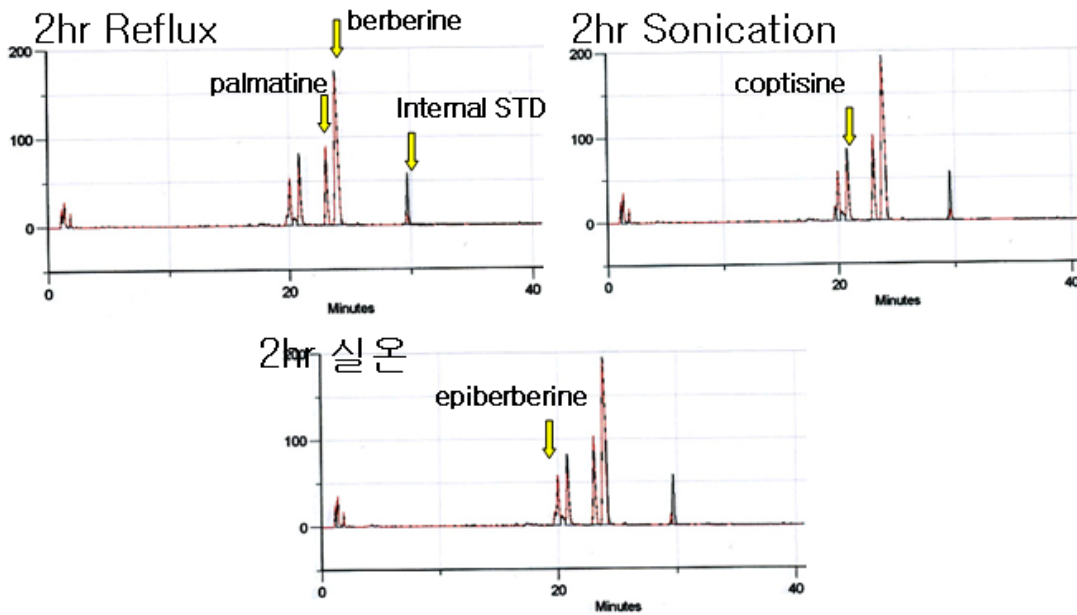
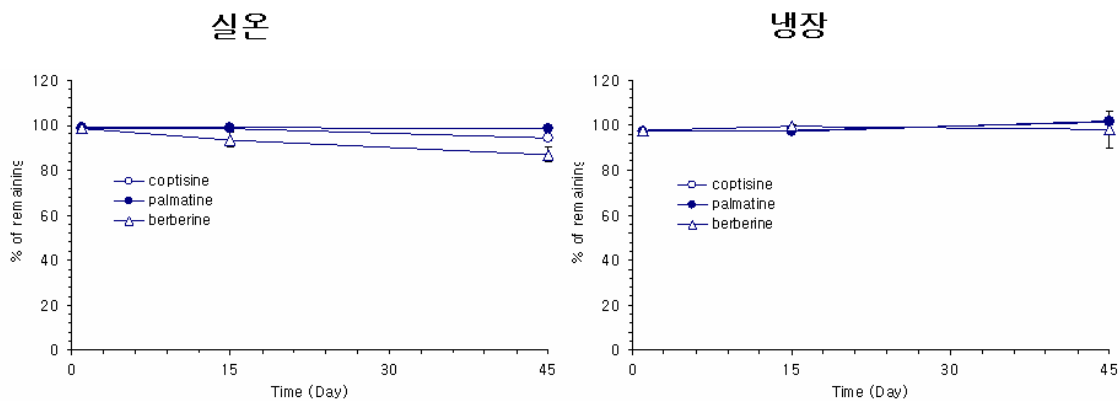


Fig. Typical chromatogram of comparison of extract method

(9), 표준품의 안정성

본 실험에서 표준품의 용액에 대한 안정성은 coptisine, palmatine, berberine의 3 가지 표준품에 대한 상온과 냉장에서 매탄올 용매에서의 안정성을 실험하기 위하여 45 일간 실험한 결과 berberine이 상온에서 용액으로 보관 할 때 약간 함량이 떨어지나, coptisine과 palmatine은 함량변화가 적었고, 냉장 보관에서는 3가지 성분 모두 안정하였다.



(10), 황련의 중 생리활성 성분 함량 분석 (assay)

확립한 분석법에 의해 구입처가 다른 16종의 황련 검체 중 지표성분의 함량을 분석하였다. 시중 황련의 구입처 및 종류에 따른 함량을 검토하기 위하여 국산으로서 대구1 (CDU-1, 중국산, 화승사 구입, *Coptis chinensis*), 대구2 (CDU-2, 중국산, 현진사 구입, *Coptis chinensis*), 대구3 (CDU-3, 중국산, 경산도매시장 구입, *Coptis chinensis*), 호북성 (CDU-4, 중국산, 호북성 구입, *Coptis chinensis*), 광서성 (CDU-5, 중국산, 광서성 구입, *Coptis chinensis*), 대전1 (CDU-6, 중국산, 백제약품 구입, *Coptis*

*chinensis*), 대전2 (CDU-7, 중국산, 경동약품 구입, *Coptis chinensis*), 대전3 (CDU-8, 중국산, 중도한의 원 구입, *Coptis chinensis*), 제기동1 (CDU-9, 중국산, 보수변포장, *Coptis chinensis*), 제기동2 (CDU-10, 중국산, 명인약국 구입, *Coptis chinensis*), 영천1 (CDU-11, 중국산, 경신약품 구입, *Coptis chinensis*), 영천2 (CDU-12, 중국산, 영천약령시장 구입, *Coptis chinensis*), 영천3 (CDU-13, 중국산, 영천약령시장 구입, *Coptis chinensis*), 광주1 (CDU-14, 중국산, 세화당 구입, *Coptis chinensis*), 광주2 (CDU-15, 중국산, 광덕산업 구입, *Coptis chinensis*), 광주3 (CDU-16, 중국산, 조화약국 구입, *Coptis chinensis*) 16종 시료와 식품의약품 안전청에서 제공한 비교 시료 호황련 (N-2, *Picrorrhiza kurrooa*), 모황련 (N-3, *Coptis chinensis*, 서울수집), 서울수집 (N-4, *Coptis chinensis*), 안국시장 수집 (N-5, *Coptis chinensis*), 안국시장 수집 (N-6, *Coptis chinensis*), 서녕시장 수집 (N-7, *Coptis chinensis*), 조황련(N-8, *Jeffersonia dubia*) 7종 총 23종의 시료를 대상으로 *epi*-berberine, *coptisine*, *palmatine*, *berberine*을 분석한 결과는 아래 figure와 같다.

약전에 황련의 *berberine* 함량은 4.5% 이상을 함유하도록 규정되어 있다. 16개의 시중 황련 시료 중 6종의 시료는 *berberine*의 함량이 규격에 적합하지 않았다. 황련에는 *epi*-berberine이 특이하게 확인되고 있으며, 대부분의 시료에서 *palmatine* 성분이 *coptisine*보다 함량이 높은 것으로 확인되었다. 그러나 HPLC 분석에서 황련에 *berberine*, *epi*-berberine, *palmatine*, *coptisine* 외의 alkaloid 성분은 검출되지 않았다.

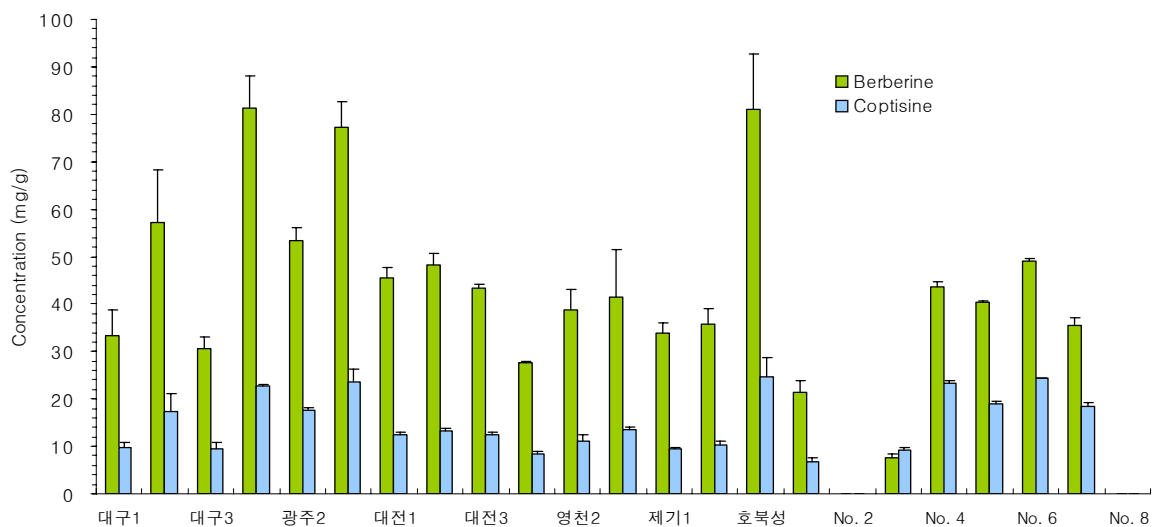


Fig. Analytical results(mg/g) of berberine and coptisine in *Coptidis Rhizoma*.

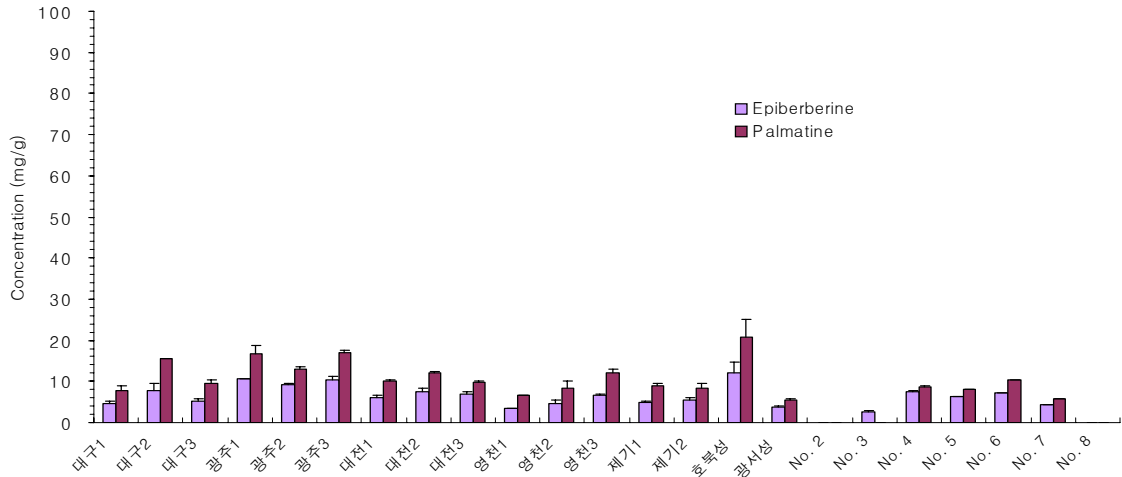


Fig. Analytical results(mg/g) of epiberberine and palmatine in Coptidis Rhizoma.

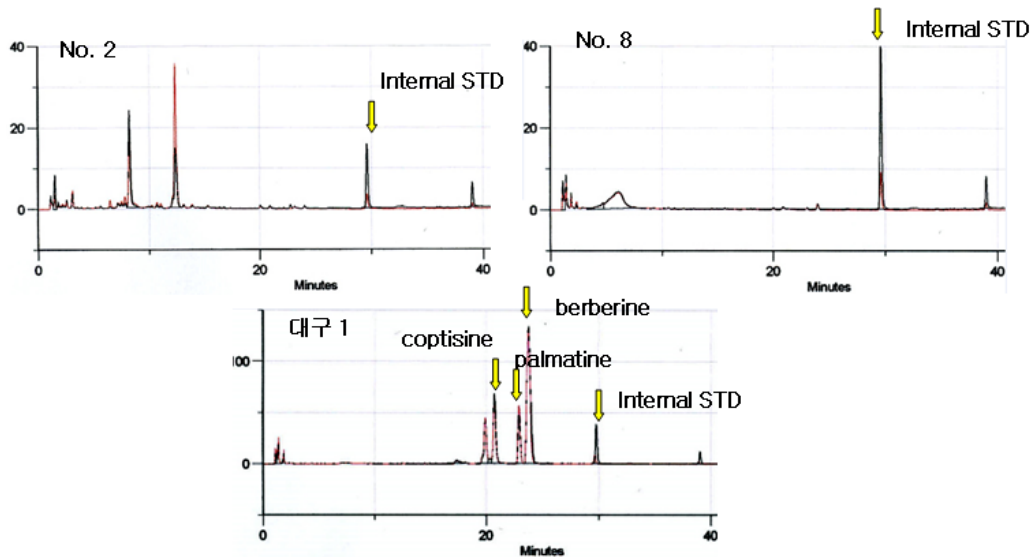


Fig. Typical chromatogram of extract of various Coptidis Rhizoma

### 나, TLC 분석

패턴분석을 위한 방법으로 TLC를 이용하여 상기의 시중에서 구입한 16종의 시료와 식품의약품안전청에서 제공한 7종 시료의 70% MeOH + 1% HCl 로 추출액 100  $\mu$ l 와 각각의 표준품 coptisine, palmatine, berberine, *epi*-berberine 10 ng씩을 spotting 한 후 *n*-propanol : formic acid : water = 90 : 1 : 9 의 용매로 전개 후 TLC scanner 365 nm에서 확인한 그림이다. 황련의 시중 제품은 주로 berberine, *epi*-berberine, coptisine, palmatine의 성분만 주요한 성분으로 확인되었고, 황련에 함유되어 있는 유사 alkaloid계 성분은 상기의 TLC 조건에서 검출되지 않았다. 이상의 결과로 국내 시중에 유통되는 황련은 *Coptis chinensis* 단일 종임을 확인할 수 있었다. 그리고 호황련 (N-2, *Picrorrhiza hkurroa*)과 조황련 (N-8, *Jeffersonia dubia*)에서는 alkaloid계 화합물이 확인되지 않아 황련과 이름이 유사할 뿐 대응으로의 사용은 불허하는 것이 적합하다 사료된다.

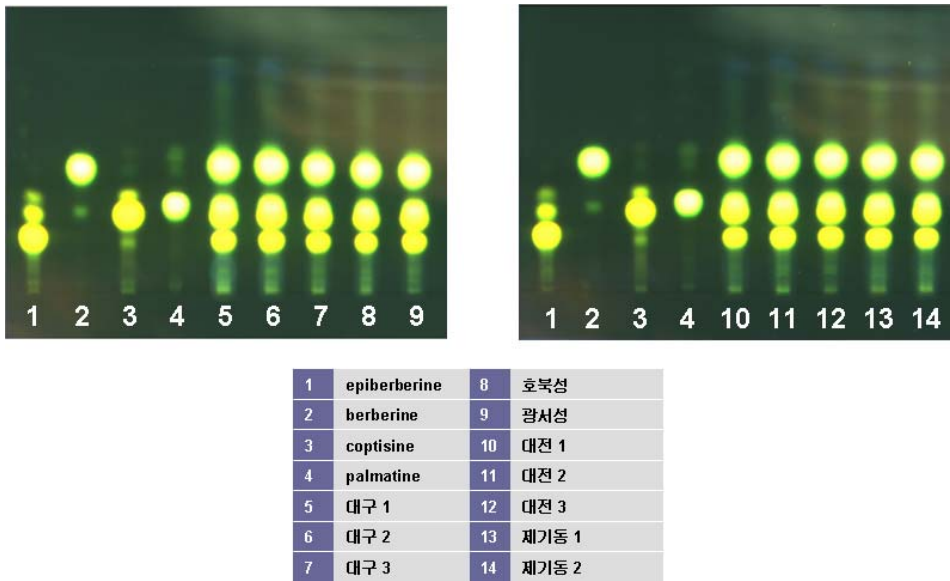


Fig. TLC pattern of compounds from Coptidis Rhizoma

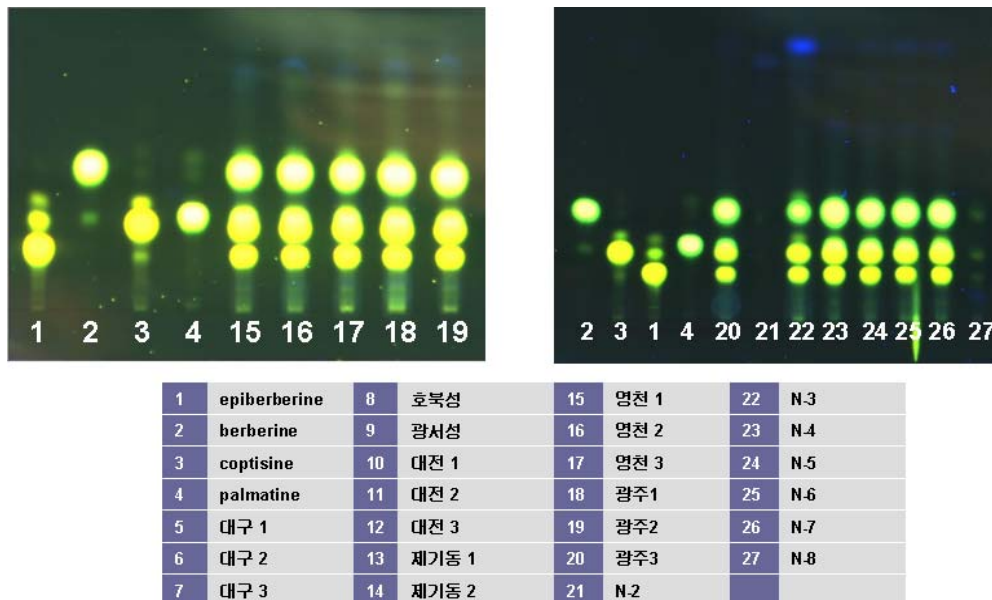


Fig. TLC pattern of compounds from Coptidis Rhizoma

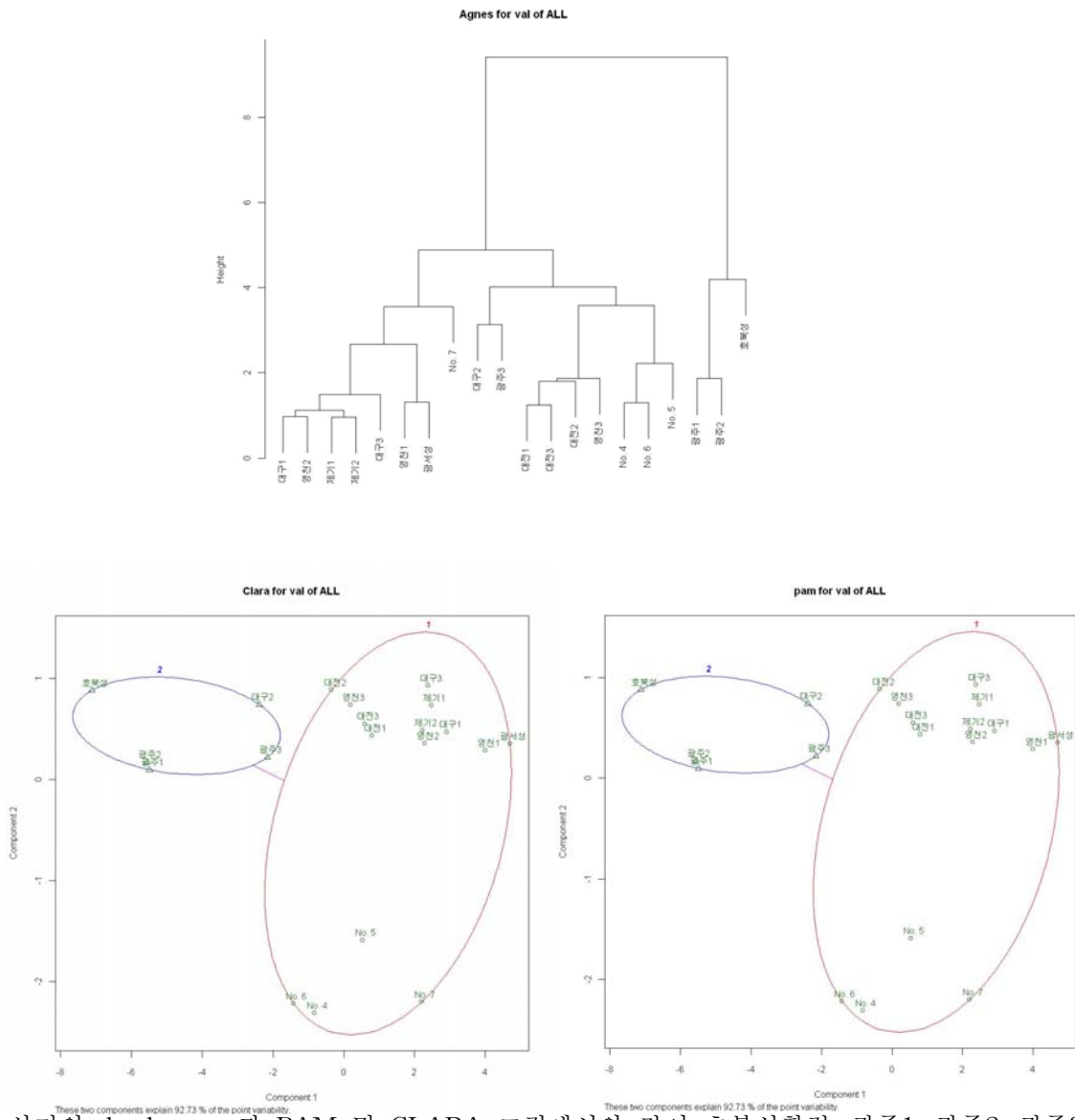
#### 다, HPLC 및 TLC와 DNA 종감별 pattern 분석 비교

시중에서 구입한 황련은 HPLC 및 TLC 분석으로 *Coptis chinensis*임을 확인되었고 식의약청에서 제공한 호황련 (N-2, *Picrorrhiza hkurrooa*)과 조황련 (N-8, *Jeffersonia dubia*)은 alkaloid계 화합물이 확인되지 않아 황련과 이름이 유사할 뿐 대응으로의 사용은 불가능하다. 또한 DNA 종감별 pattern 분석에서도 국내에서 구입한 황련은 *Coptis chinensis*로 확인되어 화학적인 확인 방법과도 일치함을 알 수 있었다.

#### 라, pringer print 패턴분석

시장 수집품 16종과 식의약청 제공품 7종에 대한 coptisine, palmatine, berberine, *epi*-berberine의

함량에 대한 R-program을 이용하여 통계처리 하였다. 통계처리는 dendrogram으로 표시되는 agglomerative clustering (AGNES)과 함량 자료를 PCR로 처리하여 partitioning around medoids (PAM)과 clustering large applications (CLARA) data를 얻었다.



상기의 dendrogram과 PAM 및 CLARA 그림에서와 같이 호북성황련, 광주1, 광주2, 광주3, 대구2 시료가 같은 그룹으로 묶이는 것은 berberine 등의 alkaloid계 성분이 많이 함유한 시료임을 확인할 수 있었다.

## 마, LC-MS/MS 동시정량법

### (1), HPLC 분석조건

HPLC system은 binary pump, autosampler, degasser, column oven 으로 구성된 Agilent 1100 series (Palo Alto, CA, USA) 을 이용하였다. 0.06% acetic acid in 1.5 mM ammonium acetate-methanol (60 : 40, v/v)으로 isocratic elution하였고 Agilent ZORBAX SB-C18 3.5 μm (2.1 x 150 mm)의 역상 컬럼으로 분리하였다. 컬럼 온도는 40 °C로 유지하였으며 유속은 0.2 mL/min으로 하였

다. 다음과 같이 LC에서 *epi-berberine*과 *coptisine*은 같은 retention time을 보였고 *berberine*과 *palmatine*도 같은 retention time을 유지하였지만 MS로 분석이 가능하였다

Table HPLC condition of *Coptis chinensis*

Column	Agilent ZORBAX SB-C18 3.5 μm (2.1 x 150 mm)
Column Temp.	A constant temperature of about 40°C
Mobile Phase	A mixture of 0.06% acetic acid in 1.5 mM ammonium acetate-methanol (60 : 40, v/v)
Flow rate	0.2 mL/min ( Total Analytical time within 15min)

(2), LC-MS 분석조건

MS system은 Sciex API 3000 triple-quadrupole tandem mass spectrometry (Applied Biosystems, MDS Sciex, concord, Canada)를 사용하였다. Ion spray interface는 turbo ion spray로 turbo gas temperature를 400 °C에서 4.5 KV로 하여 positive ion detection mode로 측정하였다. 최적 측정 parameter는 모든 성분 혼합물을 flow injection 하여 다음의 최적조건을 구하였다. nebulizing gas flow, 1.46 L/min; auxiliary gas flow, 6.1 l/min; curtain gas flow, 0.95 L/min; orifice voltage, 53 V, ring voltage, 400 V; collision gas (nitrogen) pressure,  $3.58 \times 10^{-5}$  Torr. *berberine*,  $m/z$  336.9 →  $m/z$  321.2; *epiberberine*,  $m/z$  336.9 →  $m/z$  321.2; *palmatine*,  $m/z$  352.4 →  $m/z$  337.0; *coptisine*,  $m/z$  320.0 →  $m/z$  292.9로 측정하였다. 다음의 그림과 같이 MS로 각각의 성분의 detection 가능하였고, 분자량이 같은 *berberine*과 *epi-berberine*은 LC에서 retention time에 차이가 있어 각각으로 분석이 가능하였다. base line에 따른 영향은 관찰되지 않았다.

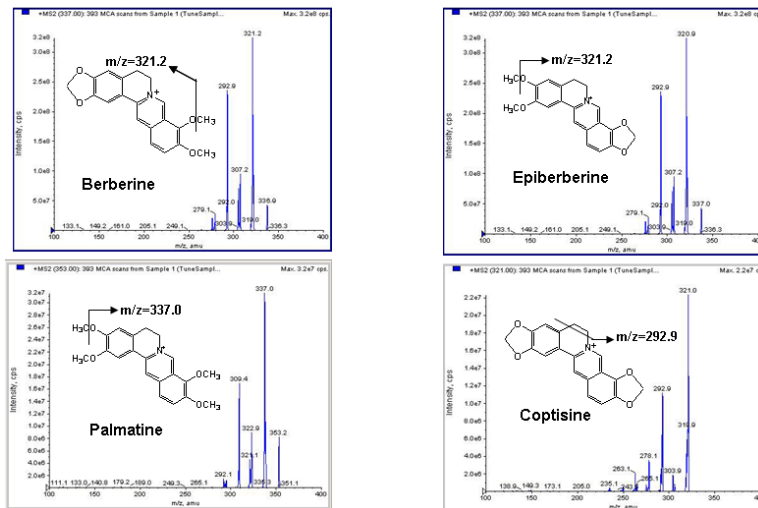


Fig. Tandem MS spectra of the marker compounds

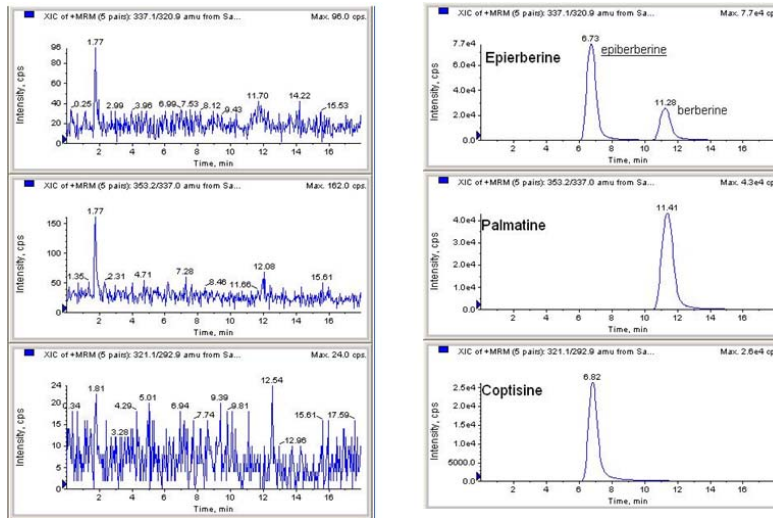


Fig. HPLC-MS chromatogram of standards

### (3), LC-MS 검량선작성

LC-MS/MS에 의한 정량성을 확인하기 위해 berberine, *epi*-berberine, palmatine, coptisine의 검량선을 검토하였는데 농도범위 100 ng/mL ~ 1000 ng/mL에서 직선성을 보였다.

Table. Calibration graphs.

Compound	a	b	R
berberine	6432	46247	0.9997
epiberberine	14423	63155	0.9987
palmatine	18342	149554	0.9992
coptisine	6748	-28135	0.9997

## 3.2 독활 (Araliae Continentalis Radix)

### 가, HPLC 분석조건

#### (1), 이동상 buffer용액의 농도와 종류

이동상 실험을 위해서 acetonitrile과 물로 분석조건을 검토하였으나 diterpene계 화합물은 극성이 아주 낮고 UV chromophore가 없어 아래의 chromatogram과 같이 분리도가 낮았다. buffer 용매를 사용하여 실험하였고 검토한 buffer 용액은 20 mM phosphoric acid, 10 mM hexanesulfonic acid sodium salt, 0.1% acetic acid solution, 0.1% TFA solution 등이며, 분석 후 독활의 주요성분인 continentalic acid의 분석조건에서 이론단수를 검토하였다. 사용한 buffer solution 중 0.1 TFA (trifluoroacetic acid) solution이 가장 높은 이론단수를 보여 buffer solution은 0.1% TFA를 선정하였다. 독활의 주요성분을 이루는 diterpene계 화합물은 carbonyl group을 functional group으로 함유함으로 acid가 없는 용매에서는 tailing 현상이 있어 사용이 불가능하다. 독활의 성분의 HPLC 분석은 mobile phase 중에 acid가 포함되는 용매가 효과적으로 분석이 가능하였다.



Table. Effect of buffer solutions on mobil phase

Mobile phase	Retention time (min)	Theoretical number
	continentalic acid	continentalic acid
H <sub>2</sub> O : ACN (2 : 8)	10.01	2513
0.1% TFA : ACN (2 :8)	12.91	4572

(2), detector 과장 검토

diterpene계 화합물은 UV chromophore가 없고 분자량이 작아 UV detector 사용에 의한 분석은 어려움이 있어 여러 과장을 검토하였다. 사용한 UV 과장 중 205 nm에서 continentalic acid가 검출되어 detector의 과장은 205 nm로 고정하여 측정하였다.

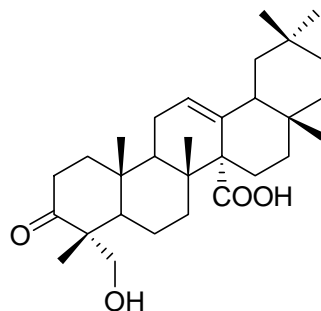
(3), 내부표준물질 선정

내부표준물질을 선정하기 설정된 HPLC 분석조건에서 표준품과 겹치지 않으며 거의 유사한 분석 시간과 UV 흡수를 갖는 화합물을 찾기 위하여 구조적으로 연관성이 있는 화합물을 HPLC로 분석하였다.

분석에 사용한 화합물

- \* paraben계 화합물: methylparaben, ethylparaben, butylparaben, bisphenol.
- \* terpene계 화합물: eudesmol, cryptomeriol, tetralone, 3a,23-dihydroxyolean-12-en-27-oic acid, 3-oxo-23-hydroxyolean-12-en-27-oic acid.
- \* lignan계 화합물: asarone, pinosresinol, laricinresinol.

일반적으로 내부표준물질로 paraben류는 독활의 diterpene계 화합물과 극성 차이가 커 사용이 불가능하였다. 또한 구조적으로 유사한 sesquiterpenes, triterpenes, lignans 등의 화합물을 검토하였는데 분석 화합물 중 돌단풍 (*Aceriphyllum rossii*)에서 분리한 3-oxo-23-hydroxyolean-12-en-27-oic acid 화합물이 UV 205 nm에서 독활의 diterpene계 화합물과 유사한 흡수력과 HPLC의 retention time을 보여 내부표준물질로 선정하였다. 그러나 돌단풍에서 분리한 화합물 3-oxo-23-hydroxyolean-12-en-27-oic acid는 천연에 많이 존재하지 않는 화합물로 다른 화합물로는 **betulinic acid도 내부표준품으로 사용이 가능하였다.**



3-oxo-23-hydroxyolean-12-en-27-oic acid

(4), HPLC 분리조건 설정

최종 분석조건은 Table에 나타내었고 chromatogram을 Fig에 나타내었다. 여러 분석조건을 검토한 결과 용매는 0.1% trifluoroacetic acid (TFA)를 사용하는 것이 가장 효과가 좋았고, 사용이 간편한 isocratic 방법으로도 분석시간이 30분 이내로 가능하였다. 그리고 detector는 UV 205 nm에서 정량이 가능하였으며 column의 온도는 30 °C를 사용하였다. 상기의 분석조건으로 독활의 주요성분인 continentalic acid, *epi*-continentalic acid 및 kaurenoic acid를 분석하였다. 내부 표준물질은 retention time을 고려하여 돌단풍에서 분리한 3-oxo-23-hydroxyolean-12-en-27-oic acid를 선정하였고 전체적인 chromatogram은 아래와 같다. 분석조건인 UV detection은 205 nm에서 측정하여 baseline의 약간 흔들이나 독활의 diterpene계 성분의 정량에는 영향이 없었으며, 분석 조건 validation에서도 각각의 parameter가 모두 분석이 가능한 범위 내에서 분석이 되었다.

독활의 정량법에 사용되는 HPLC 조건은 다음과 같다.

- \*Column: Agilent Eclipse XD8-C18 (5 μm, 4.6 X 150 mm)
- \*Detector: 205nm
- \*Injection Volume: 10 μL
- \*Flow rate: 1 mL/min
- \*Mobile phase:

Time (min)	acetonitrile (%)	0.1% TFA (%)
0	70	30
40	70	30

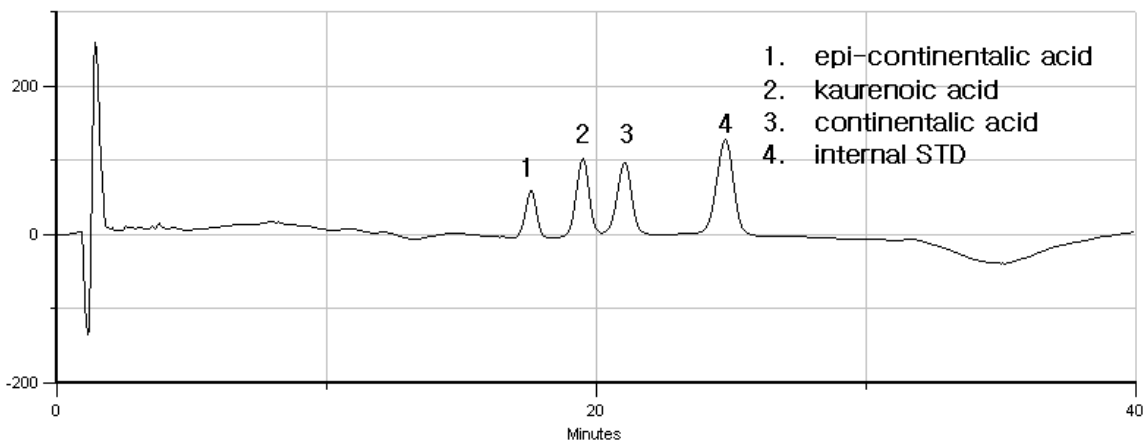


Fig. Typical chromatogram of compounds from *Araliae Continentalis Radix* and Internal standard

(5), 패턴분석을 위한 70% EtOH 추출물 분석자료

상기의 HPLC조건으로 독활 시료의 패턴분석을 위해 70% EtOH 추출물을 분석한 결과 *epi*-continentalic acid, kaurenoic acid 및 continentalic acid가 확인되었고, 첫 번째 peak는

*epi*-continentalic acid는 아주 미량존재 하였고, kaurenoic acid와 continentalic acid가 주요성분으로 확인되었다. 그리고 주요한 다른 화합물 peak는 확인되지 않았으나, *epi*-continentalic acid를 포함하는 3가지 diterpene계 성분은 HPLC를 이용한 패턴분석에서 독활시료 평가의 중요한 지표가 될 것으로 사료된다.

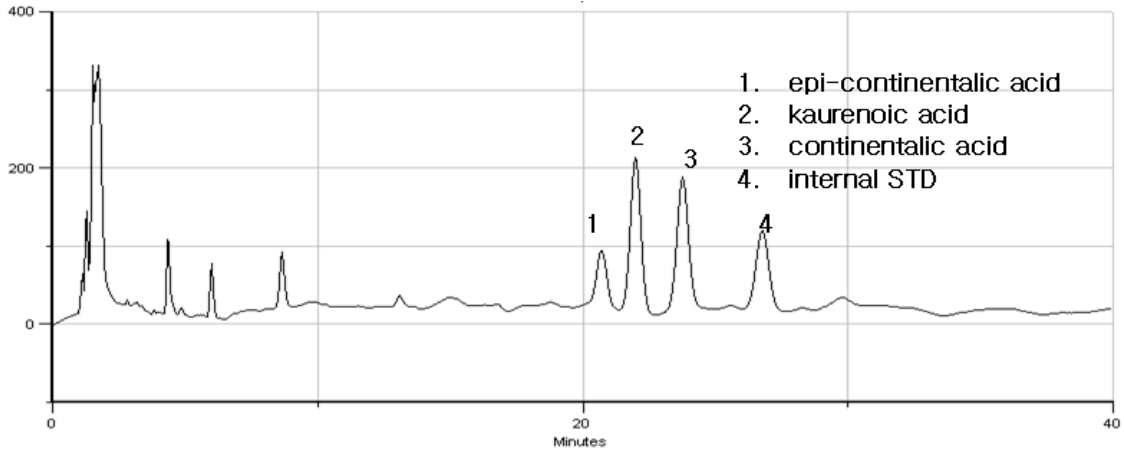


Fig. Typical chromatogram of 70% EtOH extract from *Araliae Continentalis Radix*

(6), HPLC 분석조건 validation

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

독활의 유효성분의 직선성 농도범위를 *epi*-continentalic acid; 8~132 µg/mL, kaurenoic acid; 8~132 µg/mL 및 continentalic acid; 8~132 µg/mL로 하였다. 각 지표성분의 정량범위는 검토한 각 성분의 농도에서 직선성을 나타내는 농도로 표시하였으며 면적비를 이용한 검량선으로 상관관계수  $r^2$  를 구하여 양호한 직선성을 나타내는지 확인하였다. 검출한계(LOD)는 신호대 잡음비(S/N) = 4을 기준으로 정하였고, 정량한계(LOQ)는 S/N=10을 나타내는 농도로써 표기하였다.

Table, Linearity/LOD/LOQ of marker compounds

compound	linear range (µg/mL)	slope(a)	intercept(b)	correlation coefficient( $r^2$ )	LOD (µg/mL)	LOQ (µg/mL)
<i>epi</i> -continentalic acid	8 - 132	0.023614	-0.04008	0.9987	1	2.5
kaurenoic acid	8 - 132	0.024241	-0.08218	0.9983	1	2.5
continentalic acid	8 - 132	0.038075	-0.038075	0.9986	0.5	1.25

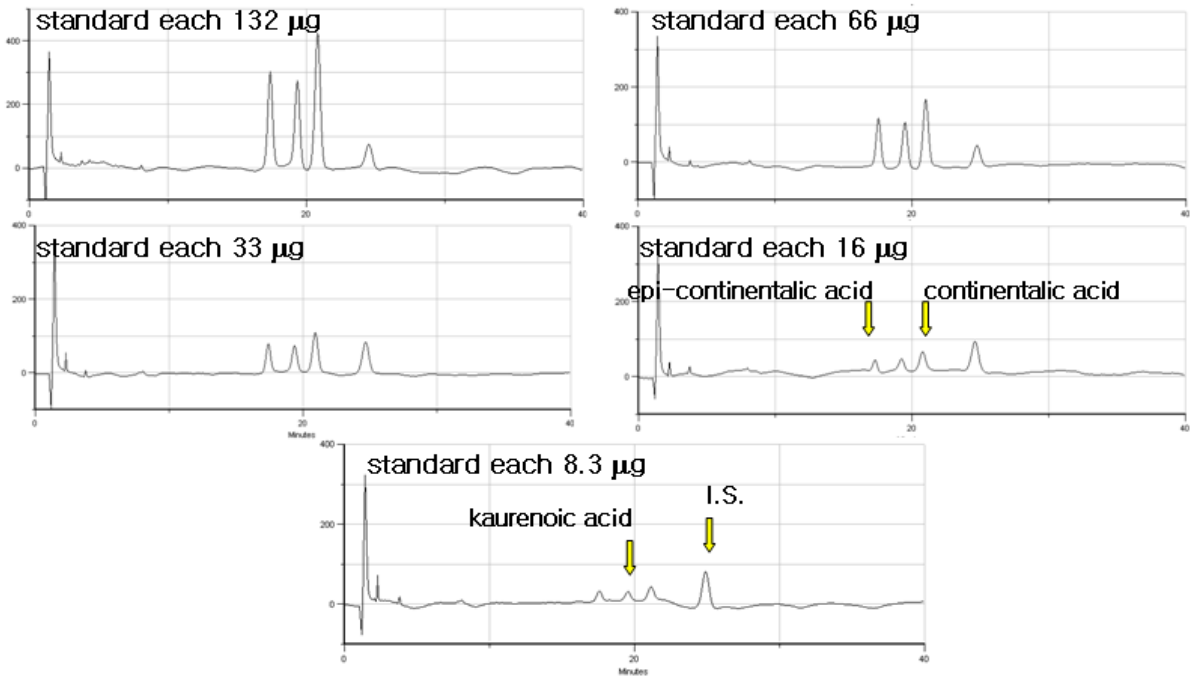


Fig. Typical chromatogram of standard compounds for calibration curve

② *epi*-continentalic acid, kaurenoic acid 및 continentalic acid의 검량선

*epi*-continentalic acid, kaurenoic acid 및 continentalic acid은 2~100 µg/mL 농도범위에서 각각 correlation coefficient가 각각 0.9994, 0.9992, 0.9987로 높은 직선성을 보였다.

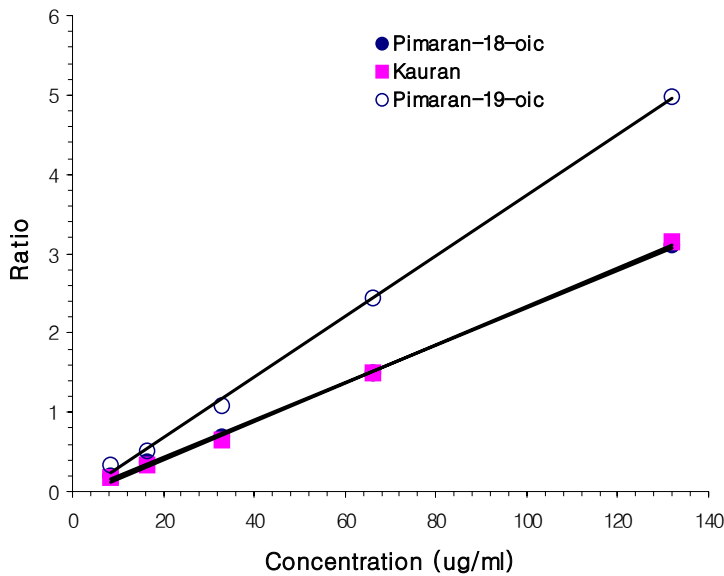


Fig. Calibration curve of marker compounds

\* pimaran-18-oic: *epi*-continentalic acid; kauran: kaurenoic acid; pimaran-19-oic: continentalic acid.

### ③ 재현성(reproducibility)

전 분석과정을 통한 분석결과의 일내 및 일간의 재현성을 확인하기 위해 지표성분의 표준물을 분석하여 구한 결과를 Table에 나타내었다. 분석결과 일간 및 일내 정밀성은 *epi*-continentalic acid, kaurenoic acid, continentalic acid 모두 0.1% 이내였다. 표준품의 분석 결과 상기의 HPLC 조건으로 독활의 함유 diterpene계 화합물의 분석은 높은 재현성을 보이며 분석이 가능하였다.

Table Repeatability of peak area ratio and retention time for standard by HPLC

compound	Intra day (n= 5)			Inter day (n= 3)		
	Peak area ratio (peak area/IS area)			Peak area ratio (peak area/IS area)		
	Mean	SD	SEM	Mean	SD	SEM
<i>epi</i> -continentalic acid	0.948	0.013	0.006	0.943	0.005	0.003
kaurenoic acid	0.752	0.029	0.013	0.749	0.004	0.002
continentalic acid	1.156	0.040	0.017	1.121	0.089	0.051

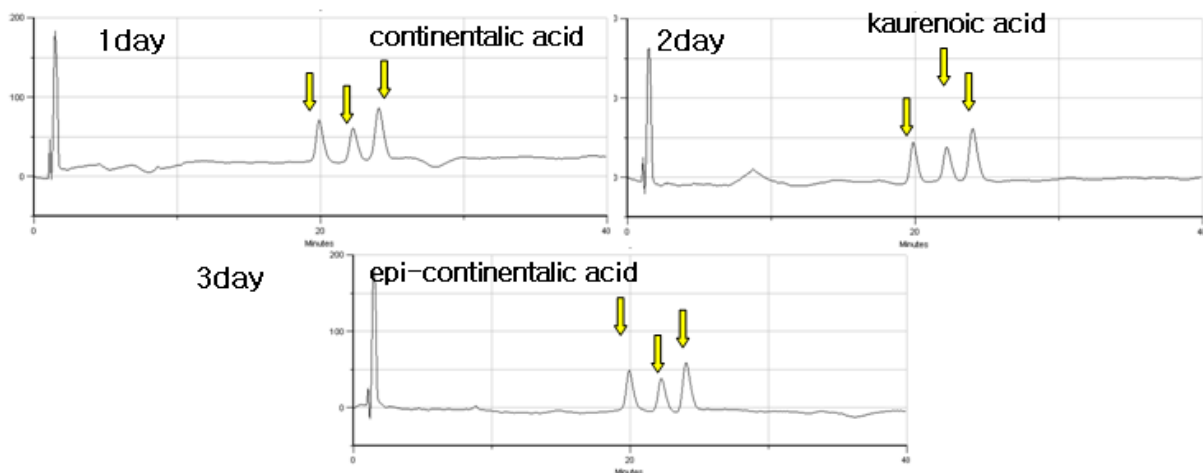


Fig. Typical chromatogram of standard compounds for reproducibility

### ④ 회수율 (Recovery test)

균질한 검체 분말을 추출, 여과 등 전처리 조작을 거치는 동안 지표성분의 회수율을 검토하기 위하여 표준물 첨가법에 의한 분석결과로부터 구하였다. 최종 검액 중 spike한 표준물의 농도가 대조검체의 각 성분에 대하여 peak 면적에 50~100% 범위에서 (*epi*-continentalic acid 6.7, 13.3, 23.3 µg/mL; kaurenoic acid: 6.7, 13.3, 23.3 µg/mL; continentalic acid: 6.7, 13.3, 23.3 µg/mL) 첨가한 3 bash의 검액 (QC sample)과 대조검체로 표준물을 첨가하지 않은 검체를 분석하여 회수율을 구한 결과는 Table과 같다. 실험결과는 Table과 같이 독활에 다량 함유한 kaurenoic acid와 continentalic acid는 3개의농도에서 95% 이상의 높은 회수율을 보였다. 그러나 미량으로 존재하는 *epi*-continentalic acid는 23.3 µg/mL 농도에서 89.8%의 회수율을 보였으나, 6.7 및 13.3 µg/mL 농도에서는 약 99%의 회수율을 보여 본 연구에서 설정한 HPLC 분석조건은 상기의 3가지 성분이 주로 검출되어 독활의 다른 성분에 의한 간섭효과가

적게 분석이 가능하였다. 또한 분석과장이 205 nm임에도 불구하고 아주 정밀히 분석이 가능하였다.

Table Recovery of marker compounds through standard addition

compound	Added conc. ( $\mu\text{g/mL}$ )	Cal conc. ( $\mu\text{g/mL}$ )	Recovery(%)	SD	SEM
	0.0	0.10	-	-	-
<i>epi</i> -continentalic acid	6.7	6.74	99.75	0.19	0.11
	13.3	13.34	99.55	0.59	0.34
	23.3	21.02	89.81	3.80	2.19
	0.0	3.68	-	-	-
kaurenoic acid	6.7	10.04	95.50	0.23	0.13
	13.3	16.79	98.13	0.82	0.47
	23.3	25.92	95.62	2.55	1.47
	0.0	4.99	-	-	-
continentalic acid	6.7	11.25	96.26	0.23	0.20
	13.3	18.11	99.0	0.82	0.75
	23.3	27.04	95.57	2.55	1.52

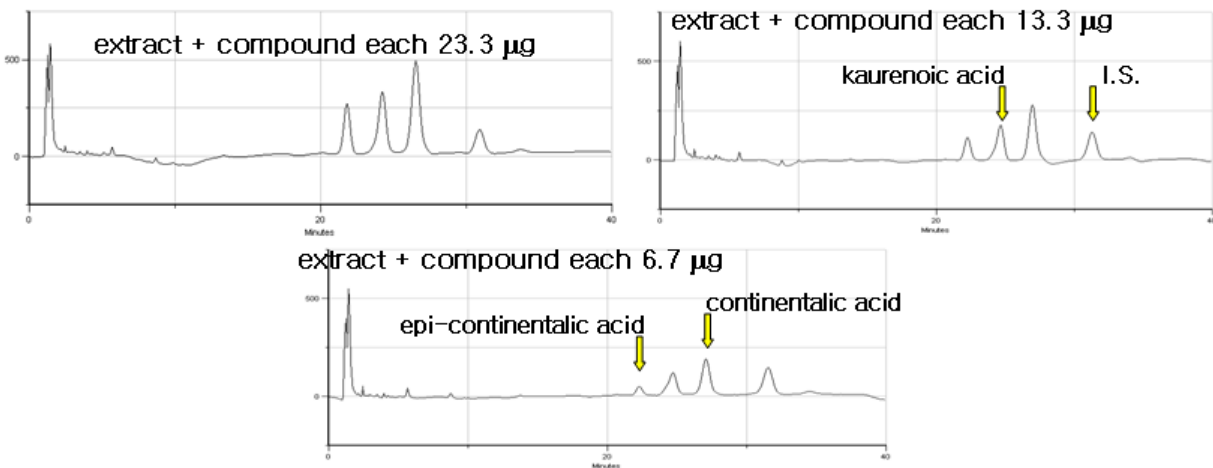


Fig. Typical chromatogram of recovery test with extract of *Araliae Continentalis Radix*

(7), HPLC 조건의 완전성 검토 (robustness)

① column 종류의 비교

완전성은 *epi*-continentalic acid, kaurenoic acid, continentalic acid의 설정된 HPLC 조건으로 HPLC column에 따른 영향을 Eclipse XDS-C18 (Agilent Tech., 4.6 x 150 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), Luna C18 (YMC, 4.6 x 150 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) 및 Xterra RP18 (Waters., 4.6 x 150 mm, 5  $\mu\text{m}$ )에 대해 theoretical plate (N), capacity factor ( $k'$ ), resolution ( $R_s$ ), selectivity ( $\alpha$ ) 등 상수를 검토한 결과 이론단수는 YMC column이, 분리도는 Eclipse XDS-C18 column이 제일 높게 나왔으며 설정된 분석조건은 모든 column에서 분석이 가능하였다.

Table, Comparison of Columns for Robustness

Columns	Surface Area /cm <sup>2</sup>	Pore size (Å)	Analytes		
			<i>epi</i> -continentalic acid	kaurenoic acid	continentalic acid
<u>Theoretical plate (N)</u>					
Eclipse XDB-C18	177	80	8092 ± 157	8058 ± 657	8487 ± 241
Luna C18	400	100	14583 ± 1282	13587 ± 355	12906 ± 547
Xterra RP18	177	129	7016 ± 49	6121 ± 15	6059 ± 575
<u>Capacity factor (k')</u>					
Eclipse XDB-C18	177	80	10.86 ± 0.19	12.18 ± 0.24	13.21 ± 0.29
Luna C18	400	100	5.61 ± 0.44	5.73 ± 0.46	6.23 ± 0.52
Xterra RP18	177	129	13.06 ± 0.07	13.46 ± 0.01	14.24 ± 0.04
<u>Resolution (R)</u>					
Eclipse XDB-C18	177	80	2.26 ± 0.06	1.64 ± 0.04	3.56 ± 0.01
Luna C18	400	100	2.64 ± 0.44	1.96 ± 0.12	3.35 ± 0.19
Xterra RP18	177	129	2.65 ± 0.10	1.44 ± 0.08	2.56 ± 0.11
<u>Selectivity (α)</u>					
Eclipse XDB-C18	177	80	1.45 ± 0.01	1.30 ± 0.00	1.20 ± 0.01
Luna C18	400	100	1.37 ± 0.01	1.24 ± 0.00	1.14 ± 0.01
Xterra RP18	177	129	1.29 ± 0.06	1.44 ± 0.13	1.16 ± 0.03

## ② column 온도에 따른 비교

분석에 사용한 column Eclipse XDB-C18의 분석온도 25°C, 30°C, 35°C, 40°C로 조절하면서 각각의 분석된 chromatography에서 theoretical plate (N), capacity factor (k'), separation factor (α), resolution (Rs) 등 상수를 검토한 결과 온도변화에 따른 이론단수는 높았고 분리도가 낮아졌지만 분석에는 영향이 적었다.

Table, Comparison of Temperature for Robustness

Temperature (°C)	Analytes		
	<i>epi</i> -continentalic acid	kaurenoic acid	continentalic acid
<u>Theoretical plate (N)</u>			
25	9799 ± 594	9768 ± 1142	9786 ± 525
30	8093 ± 157	8570 ± 657	8488 ± 241
35	8526 ± 978	8975 ± 600	8614 ± 231
40	7343 ± 726	7876 ± 856	7509 ± 129
<u>Capacity factor (k')</u>			
25	11.46 ± 0.38	12.91 ± 0.42	14.02 ± 0.44
30	10.86 ± 0.19	12.08 ± 0.23	13.22 ± 0.28
35	10.10 ± 0.28	11.24 ± 0.29	12.26 ± 0.38
40	9.28 ± 0.20	10.31 ± 0.20	11.16 ± 0.21
<u>Resolution (R)</u>			
25	2.47 ± 0.08	2.06 ± 0.51	3.83 ± 0.08
30	2.26 ± 0.05	1.64 ± 0.03	3.56 ± 0.00
35	2.13 ± 0.08	1.60 ± 0.04	3.28 ± 0.26
40	1.93 ± 0.07	1.48 ± 0.03	3.20 ± 0.07

(8), 시료의 추출조건 검토

① 추출용매 (Extraction solvent)

추출 시 추출용매의 선정을 위해 시료 100 mg 씩을 각각 70% MeOH, 70% EtOH, MeOH, EtOH 로 각각 1시간씩 2회 sonication하여 상기의 HPLC 조건으로 *epi*-continentalic acid, kaurenoic acid 및 continentalic acid을 분석하였다. Table과 같이 각각의 성분이 EtOH 추출에서 가장 높은 추출이 확인되었다. 전체적으로 3가지 성분의 추출은 에탄올로 추출용매를 설정하였다.

Table, Extraction efficiency (%) vs. extracting solvents

solvent	content (mg/g)								
	<i>epi</i> -continentalic acid			kaurenoic acid			continentalic acid		
	Mean	SD	SEM	Mean	SD	SEM	Mean	SD	SEM
MeOH	0.04	0.03	0.01	3.07	0.88	0.51	3.80	0.77	0.44
EtOH	0.15	0.05	0.03	4.34	1.11	0.64	5.26	1.14	0.66
70% MeOH	0.08	0.03	0.01	3.32	0.21	0.12	4.16	0.09	0.05
70% EtOH	0.14	0.12	0.07	3.54	1.78	1.03	4.29	2.10	1.21



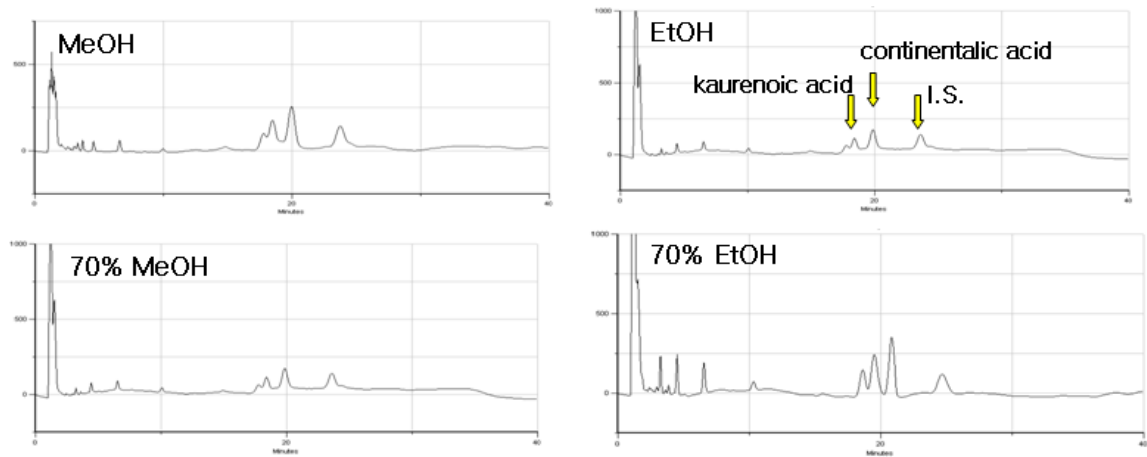


Fig. Typical chromatogram of each solvent extract

② 추출시간과 추출조건

EtOH로 30, 60, 120분 추출 시 추출방법으로 초음파추출, 환류냉각 추출 및 상온에서 추출을 비교하였고 그 결과를 Table에 나타내었다. 추출시간은 60분 이상에서 추출이 되었으며, 추출방법은 sonication 방법에서 높은 추출 수율을 보였다.

Table, Extraction efficiency (%) vs. extracting solvents.

Method (min)	content (mg/g)								
	<i>epi</i> -continentalic acid			kaurenoic acid			continentalic acid		
	Mean	SD	SEM	Mean	SD	SEM	Mean	SD	SEM
<i>Sonication</i>									
30(X 2)	0.08	0.04	0.02	2.71	0.97	0.56	3.75	1.19	0.69
60(X 2)	0.17	0.16	0.09	3.43	0.53	0.31	4.87	0.65	0.38
120 (X 2)	0.15	0.06	0.04	3.47	0.76	0.44	4.74	0.61	0.35
<i>Reflux</i>									
30(X 2)	0.07	0.08	0.05	2.17	0.62	0.36	2.98	0.85	0.49
60(X 2)	0.11	0.06	0.03	2.36	0.49	0.28	3.36	0.76	0.44
120 (X 2)	0.10	0.08	0.05	2.74	0.12	0.07	3.82	0.24	0.14
<i>Shaking</i>									
30(X 2)	0.04	0.04	0.02	2.15	0.64	0.37	2.87	0.52	0.30
60(X 2)	0.09	0.04	0.02	2.95	0.40	0.23	4.19	0.75	0.43
120 (X 2)	0.11	0.05	0.03	3.14	0.26	0.15	4.41	0.41	0.24

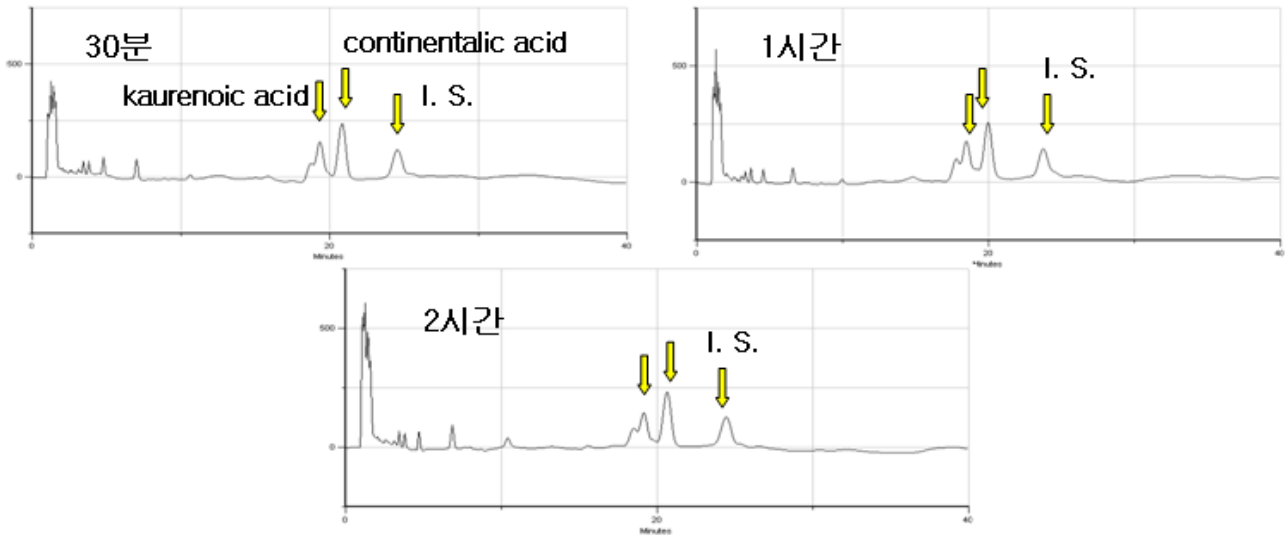
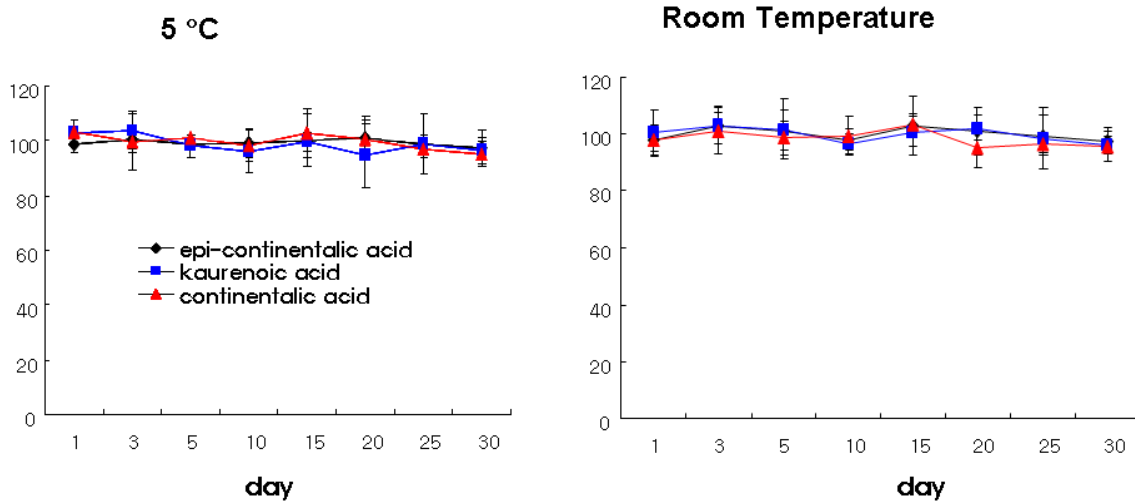


Fig. Typical chromatogram of extracts by sonication

(9), 표준품의 안정성

본 실험에서 표준품의 용액에 대한 안정성은 *epi*-continentalic acid, kaurenoic acid 및 continentalic acid의 3 가지 표준품에 대한 상온과 냉장에서 메탄올 용매에서의 안정성을 실험하기 위하여 30 일간 실험한 결과, 3가지 성분 메탄올 용매에서 30일간 각각 성분의 편차는 있었지만 함량변화는 없어 실온과 냉장보관에서 3가지 성분 모두 안정하였다.

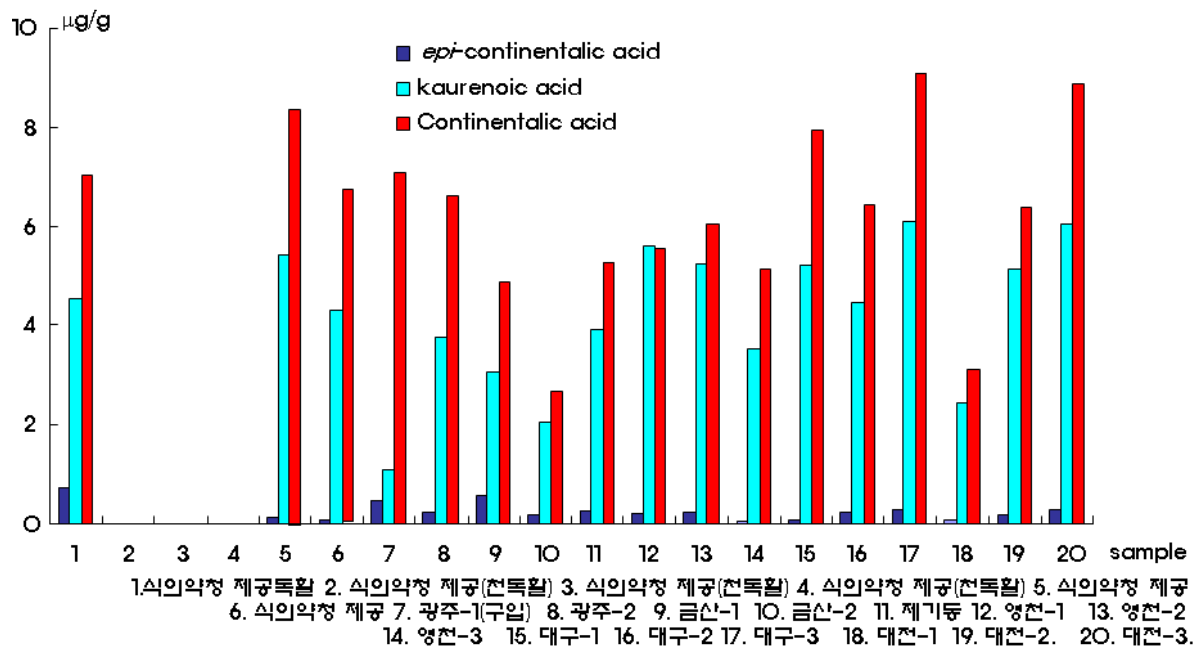


(10), 황련의 중 생리활성 성분 함량 분석 (assay)

식의약청에서 제공한 독활 6종; 독활 (AC-1, *Aralia cordata*, 무주 산), 천독활 (AC-2, *Angelica*

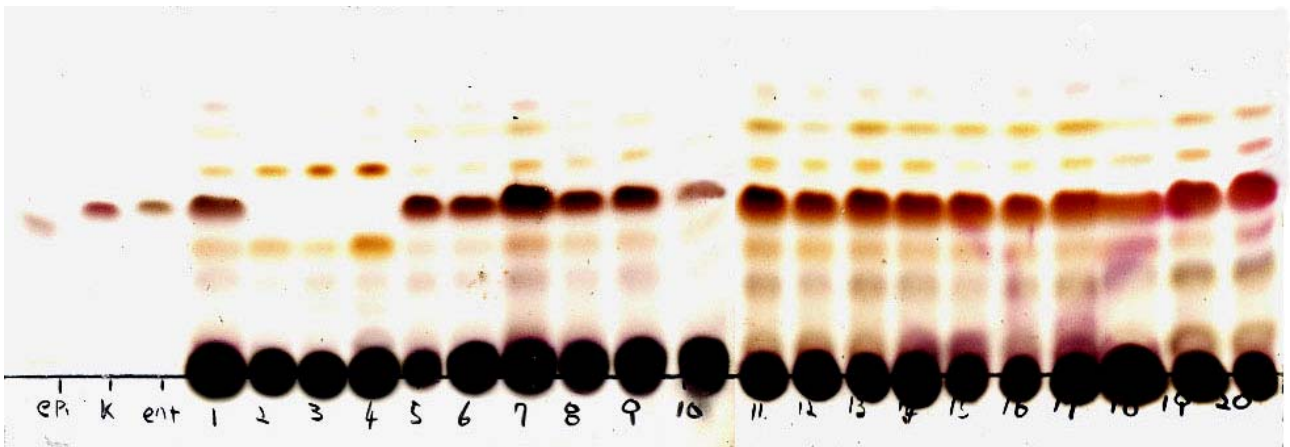
*pubescens*), 천독활 (AC-3, *Angelica pubescens*, 호북성 산), 천독활 (AC-4, *Angelica pubescens*), 독활 (AC-5, *Aralia cordata*, 진안 산), 독활 (AC-6, *Aralia cordata*, 임실 산); 시중유통 독활 14종: 독활 (AC-7, *Aralia cordata*, 임실 산, 광주구입 1), 독활 (AC-8, *Aralia cordata*, 평창 산, 광주구입 2), 독활 (AC-9, *Aralia cordata*, 임실 산, 금산구입 1), 독활 (AC-10, *Aralia cordata*, 임실 산, 금산구입 2), 독활 (AC-11, *Aralia cordata*, 임실 산, 제기동구입 1), 독활 (AC-12, *Aralia cordata*, 임실 산, 영천구입 1), 독활 (AC-13, *Aralia cordata*, 임실 산, 영천구입 2), 독활 (AC-14, *Aralia cordata*, 임실 산, 영천구입 3) 독활 (AC-15, *Aralia cordata*, 안동 산, 대구구입 1), 독활 (AC-16, *Aralia cordata*, 임실 산, 대구구입 2), 독활 (AC-17, *Aralia cordata*, 의성 산, 대구구입 3), 독활 (AC-18, *Aralia cordata*, 임실 산, 대전구입 1), 독활 (AC-19, *Aralia cordata*, 임실 산, 대전구입 2), 독활 (AC-20, *Aralia cordata*, 임실 산, 대전구입 3)을 대상으로 상기에서 선정한 추출방법과 HPLC 분석조건으로 분석을 실시하였다. 총 20종의 시료에 대한 *epi*-continentalic acid, kaurenoic acid 및 continentalic acid을 분석한 결과는 아래 figure와 같다.

독활에 함유되어 있는 diterpene계 성분 중 continentalic acid와 kaurenoic acid가 중요성분으로 각각 0.3% - 1.0%, 0.1% - 6.5% 함유되어 있음을 확인할 수가 있었으며 *epi*-continentalic acid는 미량성분으로 존재하였다. *Angelica*속의 중국 천독활은 독활의 주요한 성분인 diterpene계 성분이 함유하고 있지 않았다. 그리고 *Aralia*속 한국산 독활에서는 모두 diterpene계 성분이 함유하고 있어 독활의 지표 물질로 분석이 가능하다.



나, TLC 분석

패턴분석을 위한 방법으로 TLC를 이용하여 상기의 시중에서 구입한 14종의 독활과 식품의약품안전청에서 제공한 6종 독활에 대해 70% EtOH 추출액 100  $\mu$ l 와 각각의 표준품 *epi*-continentalic acid, kaurenoic acid 및 continentalic acid 10 ng씩을 spotting한 후 hexane : EtOAc (5% formic acid) = 5 : 1의 용매로 전개 후 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> spray 후 heating하여 각각의 성분을 확인하였다. 그러나 kaurenoic acid와 continentalic acid는 극성과 분자량이 같아 TLC에서 분리하는 어려웠지만 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 발색에 의한 각각의 성분의 확인은 가능하였다. *epi*-continentalic acid는 HPLC와 달리 시료에서 미량으로 존재하여 확인이 어려웠고, 중국산 천독활의 시료는 diterpene계 성분이 확인되지 않았다. 그러나 독활과 천독활 TLC상 유사한 성분도 확인되었다.



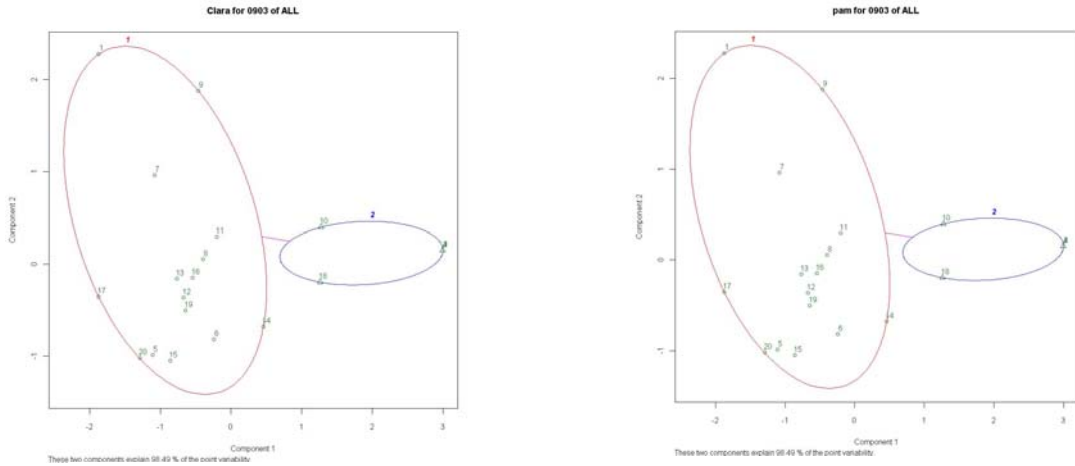
1.식의약청 제공독활 2. 식의약청 제공(천독활) 3. 식의약청 제공(천독활) 4. 식의약청 제공(천독활) 5. 식의약청 제공  
6. 식의약청 제공 7. 광주-1(구입) 8. 광주-2 9. 금산-1 10. 금산-2 11. 제기동 12. 영선-1 13. 영선-2  
14. 영선-3 15. 대구-1 16. 대구-2 17. 대구-3 18. 대전-1 19. 대전-2. 20. 대전-3.

#### 다, HPLC 및 TLC와 DNA 종감별 pattern 분석 비교

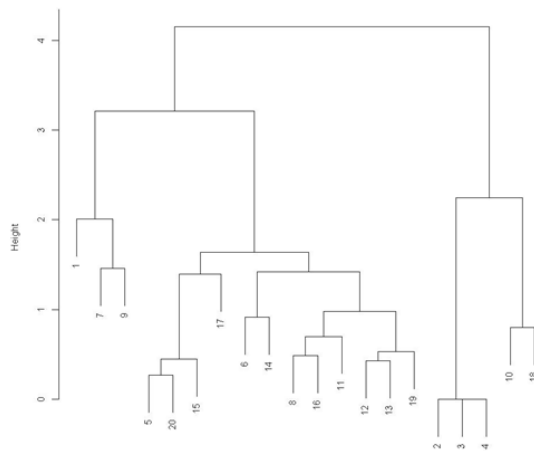
독활의 기원은 *Aralia cordata*와 *Aralia continentalis*는 동일종으로 알려져 있어 이영노 교수님 저 한국식물도감에는 독활에 두 가지의 학명이 동시에 기재되어 있으며, 이창복 교수님의 원색대한식물도감에는 *Aralia cordata*만이 기재되어 있어, *Aralia cordata*와 *Aralia continentalis*의 구분은 의미가 없다. HPLC와 TLC의 pattern에서와 같이 한국에서 유통되는 독활은 동일종으로 확인되었고 *Angelica pubescens* f. *biserrata*는 diterpene계 화합물이 검출이 되지 않아 *Aralia* 속 식물과 구분이 가능하다. 그러므로 한국에서 유통 중인 독활은 *Aralia cordata*이며, 중국에서 유통되는 독활은 *Angelica* 속 식물임을 확인할 수 있었다.

#### 라, pringer print 패턴분석

시장 수집품 독활 14종과 식의약청 제공품 6종에 대한 *epi*-continentalic acid, kaurenoic acid 및 continentalic acid의 함량에 대한 R-program을 이용하여 통계처리 하였다. 통계처리는 dendrogram으로 표시되는 agglomerative clustering(AGNES)과 함량 자료를 PCR로 처리하여 partitioning around medoids (PAM)과 clustering large applications(CLARA) data를 얻었다.



Agnes for 0903 of ALL



1. 식의약청 제공(전독필) 2. 식의약청 제공(전독필) 3. 식의약청 제공(전독필) 4. 식의약청 제공(전독필) 5. 식의약청 제공  
6. 식의약청 제공 7. 광주-1(구입) 8. 광주-2 9. 금산-1 10. 금산-2 11. 제기동 12. 영천-1 13. 영천-2  
14. 영천-3 15. 대구-1 16. 대구-2 17. 대구-3 18. 대전-1 19. 대전-2 20. 대전-3.

상기의 dendrogram과 PAM 및 CLARA 그림에서와 같이 중국산 천독활은 diterpene계 성분이 검출되지 않아 하나의 그룹으로, 분석한 diterpene계 성분의 함량이 낮은 No-10 (금산-2)과 No-18 (대전-1)이 같은 그룹으로 분류되었다. *epi*-continentalic acid 함량이 높은 No-1 (식의약청 제공 시료), No-7 (광주-1), No-9 (금산-1) 시료가 하나의 group으로, *epi*-continentalic acid의 함량이 낮은 No-6 (식의약청 제공 시료)와 No-14 (영천-3)가 하나의 group으로 나누어져 성분 함량에 따른 시료의 분석은 가능하였다.

## 라, LC-MS/MS 동시정량법

### (1), HPLC 분석조건

HPLC system은 binary pump, autosampler, degasser, column oven 으로 구성된 Agilent 1100 series (Palo Alto, CA, USA) 을 이용하였다. 0.1% TFA - acetonitrile (35 : 65, v/v)으로 isocratic elution하였고 Agilent Eclipse XDB-C18 3.5  $\mu$ m (2.1 x 100 mm)의 역상 컬럼으로 분리하였다. 컬럼 온도는 35  $^{\circ}$ C로 유지하였으며 유속은 0.25 mL/min으로 하였다. 3가지 성분의 분자량이  $m/z$  302로 모두 같아 HPLC에서 분리를 하고 MS/MS로 detection 하였다.

Table HPLC condition of *Coptis chinensis*

Column	Agilent Eclipse XDB-C18 3.5 μm (2.1 x 100 mm)
Column Temp.	A constant temperature of about 35 °C
Mobile Phase	A mixture of 0.1% TFA - acetonitrile (35 : 65, v/v)
Flow rate	0.25 mL/min ( Total Analytical time within 20 min)

(2), LC-MS 분석조건

MS system은 Sciex API 3000 triple-quadrupole tandem mass spectrometry (Applied Biosystems, MDS Sciex, concord, Canada)를 사용하였다. Ion spray interface는 turbo ion spray로 turbo gas temperature를 400 °C에서 4.5 KV로 하여 negative ion detection mode로 측정하였다. 최적 측정 parameter는 모든 성분 혼합물을 flow injection 하여 다음의 최적조건을 구하였다. nebulizing gas flow, 1.46 L/min; auxiliary gas flow, 6.1 l/min; curtain gas flow, 0.95 L/min; orifice voltage, 53 V, ring voltage, 400 V; collision gas (nitrogen) pressure,  $3.58 \times 10^{-5}$  Torr. *epi*-continentalic acid, kaurenoic acid 및 continentalic acid의 ion transition은  $m/z$  301.20 →  $m/z$  301.00로 측정하였다. 그러나 독활의 성분 분자량이 같아 HPLC로 분리하고 MS로 detection하여 감도가 낮았다.

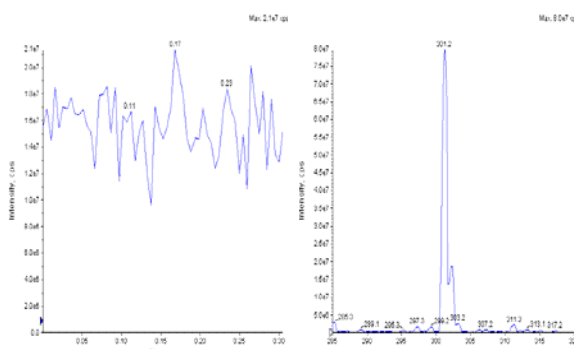
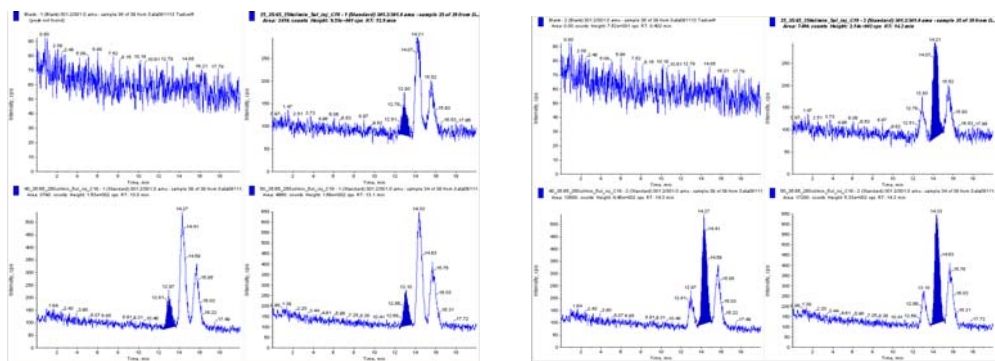
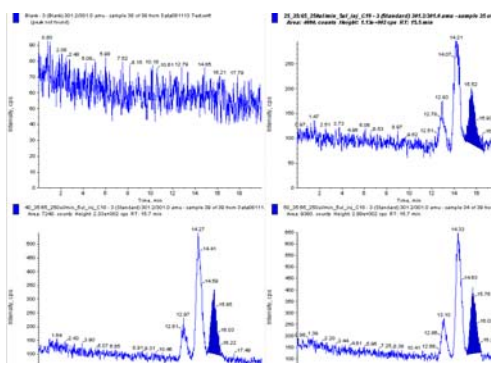


Fig. Tandem MS spectra of the marker compounds



*epi*-continentalic acid

kaurenoic acid



continentalic acid

Fig. HPLC-MS chromatogram of standards

(3), LC-MS 검량선작성

LC-MS/MS에 의한 정량성을 확인하기 위해 *epi*-continentalic acid, kaurenoic acid 및 continentalic acid의 검량선을 검토하였는데 농도범위 20 ug/mL ~ 50 ug/mL에서 직선성을 보였다.

Table. Calibration graphs.

Compound	a	b	R
<i>epi</i> -continentalic acid	97.9	59.3	0.9992
kaurenoic acid	388	0.00215	0.9994
continentalic acid	212	0.00122	1.000

## 제4장 세부연구개발과제의 연구결과 고찰 및 결론

### 4.1 황련

- 가. 황련 중의 berberine, coptisine, palmatine을 지표성분으로 HPLC-UV 분석방법을 검토하였다. 각각의 성분은 C18 column과 10 mM hexanesulfonic acid - acetonitrile (15% → 80% in ACN, 40 min) 용매, UV 254 nm에서 분석이 가능하였고, 성분의 정량을 위한 내부표준물질은 butylparaben을 사용하여 30분 내로 분석이 가능하였다.
- 나. 상기의 HPLC 분석조건의 validation 검토로 직선성은 berberine, coptisine, palmatine은 2 µg/mL ~ 100 µg/mL 농도에서 직선성 보였고 각각의 검출한계와 정량한계는 0.1 µg/ml과 0.25 µg/ml로 검출되었다. 또한 각각의 성분의 상관계수는 0.9994, 0.9992 및 0.9987로 높은 직선성을 확인할 수 있었다. 3성분에 대한 재현성을 직선성 범위내의 농도에서 실험결과 일간 및 일내 정밀도가 0.1% 이내였고, 회수율은 98.5% 이상으로 높은 회수율을 나타내었다.
- 다. 설정된 HPLC 조건의 완전성 검토로 Eclipse XDS-C18 (Agilent Co.), Hydrosphere C18 (YMC Co.) 및 Xterra RP18 (Water Co.)의 3회사의 column에 대한 황련의 3가지 성분에 대한 HPLC 용매 조건으로 theoretical plate number (N), capacity factor (k'), resolution (R)을 검토하였으나 유사한 결과를 얻었고, 상기 HPLC 조건으로 column을 고정하고 온도 및 hexanesulfonic acid를 변화시켜 분석한 결과 chromatography 상수에 변화가 없어 설정한 HPLC 조건은 황련의 함량 분석에 적합한 분석방법임을 확인하였다.
- 라. 황련의 HPLC 분석을 위한 시료의 추출방법은 sonication 혹은 reflux 방법으로 1시간 추출로 추출이 가능하였다. 3가지 성분에 대한 안전성은 실온과 냉장보관에서 45일간 안정하였다.
- 마. 시중유통 16종 황련과 식의약청 제공 7종의 황련에 대해 설정한 추출조건과 HPLC 분석방법으로 berberine, *epi*-berberine, coptisine, palmatine의 함량이 측정이 가능하였다. 시중에서 구입한 16종의 황련 중 6종의 시료는 berberine의 함량이 4.5% 이하로 대한약전 규격에 적합하지 않았고, 식의약청에서 제공한 시료 중 호황련(*Picrorrhiza kurrooa*) 과 조황련(*Jeffersonia dubia*)은 berberine 등 황련의 alkaloid계 성분이 검출되지 않았다.
- 사. 황련의 성분확인을 위한 TLC 방법으로 berberine, coptisine, palmatine, epiberberine의 분리가 가능하였고 황련의 확인방법으로 간편하였다. LC-MS/MS 방법으로 황련의 4가지 성분확인이 가능하였고, 4가지 성분에 대한 검량선도 작성하였다.
- 아. HPLC으로 분석한 황련의 alkaloid계 성분을 중심으로 R-program을 이용한 패턴분석을 실시하였다. dendrogram과 partitioning 모두 성분의 함량에 따른 pattern으로 분석되었다.

### 4.2 독활

- 가. 독활 중의 *epi*-continentalic acid, kaurenoic acid 및 continentalic acid를 지표성분으로 HPLC-UV 분석방법을 검토하였다. 각각의 성분은 C18 column과 0.1% TFA (trifluoroacetic acid) - acetonitrile (30 : 70, 40 min) 용매, UV 205 nm에서 분석이 가능하였고, 성분의 정량을



위한 내부표준물질은 3-oxo-23-hydroxyolean-12-en-27-oic acid를 사용하여 30분 내 분석이 가능하였다.

- 나. 상기의 HPLC 분석조건의 validation 검토로 직선성은 *epi*-continentalic acid, kaurenoic acid 및 continentalic acid 각각 8 µg/mL ~ 132 µg/mL 농도에서 직선성 보였고, *epi*-continentalic acid와 kaurenoic acid의 검출한계와 정량한계는 1 µg/ml과 2.5 µg/ml로 검출되었으며 continentalic acid는 0.5 µg/ml과 1.25 µg/ml로 확인되었다. 또한 *epi*-continentalic acid, kaurenoic acid 및 continentalic acid 성분의 상관계수는 0.9987, 0.9983 및 0.9986으로 높은 직선성을 확인할 수 있었다. 3성분에 대한 재현성을 직선성 범위내의 농도에서 실험결과 일간 및 일내 정밀도가 0.1% 이내였고, 회수율은 각각의 성분 6.7, 13.3, 23.3 98.5% µg/ml 농도에서 95% 이상으로 높은 회수율을 나타내었다.
- 다. 설정된 HPLC 조건의 완전성 검토로 Eclipse XDS-C18 (Agilent Co.), Hydrosphere C18 (YMC Co.) 및 Xterra RP18 (Water Co.)의 3회사의 column에 대한 독활의 3가지 성분에 대한 HPLC 용매 조건으로 theoretical plate number (N), capacity factor (k'), resolution (R), selectivity (α) 등을 검토하였으나 유사한 결과를 얻었고, 상기 HPLC 조건으로 column을 고정하고 온도를 변화시켜 분석한 결과 chromatography 상수에 변화가 없어 설정한 HPLC 조건은 독활의 diterpene계 성분 함량 분석에 적합한 분석 방법임을 확인하였다.
- 라. 독활의 HPLC 분석을 위한 시료의 추출방법은 sonication 방법으로 1시간 추출로 추출이 가능하였다. 3가지 성분에 대한 안전성은 실온과 냉장보관에서 30일간 안정하였다.
- 마. 시중유통 14종 독활과 식의약청 제공 6종의 독활과 유사생약에 대해 설정한 추출조건과 HPLC 분석방법으로 *epi*-continentalic acid, kaurenoic acid 및 continentalic acid의 함량 측정이 가능하였다. 시험에 사용한 독활 중 *Aralia*속 독활의 diterpene 함량은 *epi*-continentalic acid가 0.06 - 0.75 µg/ml, kaurenoic acid 1.09 - 6.10 µg/ml 및 continentalic acid 2.69 - 9.08 µg/ml로 확인되었고, 식의약청에서 제공한 시료 중 *Angelica*속의 천독활은 diterpene계 성분이 검출되지 않아 독활로 사용은 생리활성의 검토가 필요하다.
- 사. 독활의 성분확인을 위한 TLC 방법으로 *epi*-continentalic acid, kaurenoic acid 및 continentalic acid의 분리가 가능하였고 독활의 diterpene계 성분의 확인방법으로 간편하였다. LC-MS/MS 방법으로 독활의 3가지 성분확인이 가능하였고, 3가지 성분에 대한 검량선도 작성하였다.
- 아. HPLC으로 분석한 독활의 *epi*-continentalic acid, kaurenoic acid 및 continentalic acid계 성분을 중심으로 R-program을 이용한 패턴분석을 실시하였다. dendrogram과 partitioning 모두 성분의 함량에 따른 pattern으로 분석되었다.

## 제5장 제2 세부연구개발과제의 연구성과

### 5.1 활용성과

총괄과제명	한약재의 생리활성성분 분리 및 분석 연구- 황련, 독활
총괄과제 책임자	최재수 / 부경대학교 / 천연물화학

#### 가. 연구논문

번호	논문제목	저자명	저널명	집(권)	페이지	Impact factor	국내/국외	SCI 여부
1	Protective effect of magnoflorine isolated from <i>Coptidis Rhizoma</i> on Cu <sup>2+</sup> -induced oxidation of human low density lipoprotein	민병선 외 8명	Planta Medica	73	1281-1284	1.848	국외	SCI
2	Magnoflorine from <i>Coptidis Rhizoma</i> protects high density lipoprotein during oxidant stress	민병선, 최재수 외 7인	Bio. pharm. Bull.	30	1157-1160	1.614	국외	SCI
3	Quantitative determination of protoberberines from the roots of <i>Coptis chinensis</i>	민병선, 최재수	Natural Product Sciences	14	68-72		국내	
4	Inhibitory Activities of the Alkaloids from <i>Coptidis Rhizoma</i> against Aldose Reductase	최재수, 민병선 외 3인	Archives of Pharmacal Research		in press	1.085	국내	SCIE

#### 나. 학술발표

번호	발표제목	발표형태	발표자	학회명	연월일	발표지	국내/국제
1							
2							

#### 다. 지식재산권

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

#### 라. 정책활용

없음
----

#### 마. 타연구/차기연구에 활용

없음
----

#### 바. 언론홍보 및 대국민교육

없음

#### 사. 기타

없음

## 5.2 활용계획

황련과 독활의 HPLC 분석방법의 설정은 황련, 독활의 성분 함량분석 방법 및 품질평가 기준을 설정하였으므로 두가지 생약의 분석방법 및 기준을 공정서 설정 시 활용이 가능하다.

## 제6장 기타 중요변경사항

## 제7장 참고문헌

1. Bae, KH., "The medicinal Plants of Korea," Kyo-Hak Publishing Co., Ltd., Seoul, 2000.
2. Kim, JW., "Pharmacognosy," Dong-Myung Publishing Co., Ltd., Seoul, 2006.
3. Lee, HS., Rat lens aldose reductase inhibitory activities of *Coptis japonica* root-derived isoquinoline alkaloids. *J Agri Food Chem*, 50, 7013-7016 (2002).
4. Chae, SH., Jeong IH., Choi, DH., Oh, JW., Ahn, YJ., Growth-inhibiting effects of *Coptis japonica* root-derived isoquinoline alkaloids on human intestinal bacteria. *J Agric Food Chem*, 47, 934-938 (1999).
5. Lee, MK., Kim, HS., Inhibitory effects of protoberberine alkaloids from the roots of *Coptis japonica* on catecholamine biosynthesis in PC12 cells. *Planta Med*, 62, 31-34 (1996).
6. Min, YD., Yang, MC., Lee, KH., Kim, KR., Choi, SU., Lee, KR., Protoberberine alkaloids and their reversal activity of P-gp expressed multidrug resistance (MDR) from the rhizome of *Cotips japonica* Makino. *Arch Pharm Res*, 29, 757-761 (2006).
7. Kim, JP., Jung, MY., Kim, JP., Kim, SY., Antiphotooxidative activity of protoberberines derived from *Coptis japonica* Makino in the chlorophyll-sensitized photooxidation of oil. *J Agric Food Chem*, 48, 1058-1063 (2000).
8. Cho, JY., Baik, KU., Yoo, ES., Yoshikawa, K., Park, MH., In vitro antiinflammatory effects of neolignan woorenosides from the rhizomes of *Cotips japonica*. *J Nat Prod*, 63, 1205-1209 (2000).
9. Cho, JY., Park, J., Yoo, ES., Yoshikawa, K., Baik, KU., Lee, J., Park, MH., Inhibitory effect of lignans from the rhizomes of *Cotips japonica* var. *dissecta* on tumor necrosis factor-alpha production in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 cells. *Arch Pharm Res*, 21, 12-16 (1998).
10. Yotsumoto, H., Yanagita, T., Yamamoto, K., Ogawa, Y., Cha, JY., Mori, Y., Inhibitory effects of oren-gedoku-to and its components on cholesteryl ester synthesis in cultured human hepatocyte HepG2 cells: evidence from the cultured HepG2 cells and in vitro assay of ACAT. *Planta Med*, 63, 141-145 (1997).
11. Park, H., Kim, MS., Jeon BH., Kim, TK., Kim, YM., Ahnn, J., Kwon, DY., Takaya, Y., Wataya, Y., Kim, HS., Antimalaria activity of herbal extracts used in traditional medicine in Korea. *Biol Pharm Bull*,

- 26, 1623-1624 (2003).
12. Park, HJ., Kim, YJ., Leem, K., Park, SJ., Seo, JC., Kim, HK., Chung, JH., *Coptis japonica* root extract induces apoptosis through caspase-3 activation in SNU-668 human gastric cancer cells. *Phytother Res*, 19, 189-192 (2005).
  13. Namba, T., Sekiya, K., Toshinal, A., Kadota, S., Hatanaka, T., Katayama, K., Koizumi, T., Study on with crude drug. II: the effects of *Coptidis Rhizoma* extracts as skin permeation enhancer. *Yakugaku Zasshi*, 115, 618-625 (1995).
  14. Feng, YL., Yu, BY., Dong, XP., Simultaneous determination of three kinds of components in sanhuang tablets by high-performance liquid chromatography. *Yao Xue Xue Bao*, 41, 285-288 (2006).
  15. Sun, J., Ma, JS., Jin, J., Wang, HS., Wen, QH., Zgang HG., Zhou, QL., Qualitative and quantitative determination of the main components of huanglianjiadu decoction by HPLC-UV/MS. *Yao Xue Xue Bao*, 41, 380-384 (2006).
  16. Huang, XP., Li, LY., Qu, XY., Cui, GL., Fingerprints of *Rhizoma Coptidis* from Shizhu by HPLC. *Zhong Yao Cai*, 29, 666-669 (2006).
  17. Chen, L., Wang, Q., Liu, J., Simultaneous analysis of nine active components in Gegen Qinlian preparations by high-performance liquid chromatography with diode array detection. *J Sep Sci*, 29, 2203-2210 (2006).
  18. Zgai, ZD., Shi, YP., Wu, XM., Luo, XP., Chiral high-performance liquid chromatographic separation of the enantiomers of tetrahydropalmatine and tetrahydroberberine, isolation from *Corydalis yanhusuo*. *Anal Bional Chem*, 384, 939-945 (2006).
  19. Sheng, YX., Zhang, JL., Sun, SQ., Xu, JT., Quality analysis and evaluation of *Rhizoma Coptidis* under different cultivation conditions. *Yao Xue Xue Bao*, 41, 1010-1014 (2006).
  20. Li, HL., Zhang, WD., Liu, RH., Zhang, C., Han, T., Wang, XW., Wang, XL., Zhu, JB., Chen, CL., Simultaneous determination of four active alkaloids from a traditional Chinese medicine *Corydalis saxicola* Bunting. (Yanhuanglian) in plasma and urine samples by LC-MS-MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 831, 140-146 (2006).
  21. Dang, NH., Zhang, X., Zheng, M., Son, KH., Chang, HW., Kim, HP., Bae, K., Kang SS., Inhibitory constituents against cyclooxygenases from *Aralia cordata* Thunb. *Arch Pharm Res*, 28, 28-33 (2005).
  22. Peng, T., Dong, X., Deng, Y., Tu, Y., Li, X., Research on chemical ingredients of the roots from cultivar *Aralia cordata* Thunb. *Zhong Yao Cai*, 28, 996-998 (2005).
  23. Okuyama, E., Nishimura, S., Yamazaki, M., Analgesic principles from *Aralia cordata* Thunb. *Chem Pharm Bull*, 39, 406-407 (1991).
  24. Lee, IS., Jin, W., Zhang, X., Hung, TM., Song, KS., Seong, YH., Bae, K., Cytotoxic and COX-2 inhibitory constituents from the aerial parts of *Aralia cordata*. *Arch Pharm Res*, 29, 548-555 (2006).
  25. Baek, YH., Huh, JE., Lee, JD., Choi, DY., Park, DS., Effect of *Aralia cordata* extracts on cartilage protection and apoptosis inhibition. *Biol Pharm Bull*, 29, 1423-1430 (2006).
  26. Kolb, N., Herrera, JL., Ferreyra, DJ., Uliana RF., Analysis of sweet diterpene glycosides from *Stevia rebaudiana*: improved HPLC method. *J Agric Food Chem*, 49, 4538-4541 (2001).
  27. Sakamaki, N., Matsumoto, H., Hagino, K., Nakazato, M., Yasuda, K., Simultaneous determination of stevioside, rebaudioside A and glycyrrhizic acid in foods by HPLC. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, 45, 81-86 (2004).
  28. Oliveira, BH., Sant'Ana AE., Bastos DZ., Determination of the diterpenoid, kaurenoic acid, in *Annona glabra* by HPLC. *Phytochem Anal*, 13, 368-371 (2002).

29. Koyama, M., Yoshida, K., Uchibori, N., Wada, I., Akiyama, K., Sasaki, T., Analysis of nine kinds of sweeteners in foods by LC/MS. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, 46, 72-78 (2005).
30. de Melo, AC., Cota, BB., de Oliveira, AB., Braga, FC., HPLC quantitation of kaurane diterpenes in *Xylopi*a species. *Fitoterapia*, 72, 40-45 (2001).
31. Lee YN., New Flora of Korea. Kyo-Hak Publishing Co. Ltd., Seoul, Korea, p802 (2006).
32. Lee TB., Coloured Flora of Korea. Hyang-Moon Publishing Co. Ltd., Seoul, Korea, p815 (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.

## 총괄 연구과제 요약

과제번호	08182한약재254		
단위과제명	한약재 생리활성성분 분리 및 분석 연구		
과제명	한약재의 생리활성성분 분리 및 분석 연구 (황련, 독활)		
연구책임자	성명	최재수	주민등록번호 (앞번호만 기재)
	소속기관명	부경대학교 식품생명공학부	

### ○ 연구목표 (400~600자)

황련과 독활을 대상으로 한약재의 오용 및 저질 한약재 유통에 따른 부작용 발생 근절을 위하여 유효 성분 중심의 한약재 기준규격 설정으로 품질 및 안전성, 유효성을 확보할 필요가 있다. 따라서 자생하는 황련과 독활을 대상으로 생리활성 성분을 분리하고 분광학적 분석을 하여 이를 토대로 유효성분의 표준품을 확보, 분리 정제된 생리활성성분 및 70% 에탄올엑스를 생리활성성분 분석팀 및 효능확인연구팀에 연구용으로 제공하고, 효능확인 연구를 위한 생리활성성분을 대량으로 제조, 한약재의 올바른 품질관리를 통해 국민보건을 질적으로 향상시키고자 한다. 또한 기원별, 산지별 패턴인식/지문인식법에 의한 한약재를 평가 한다.

### ○ 연구내용 (1000~1200자)

국내산 황련과 독활을 기원별(산지별)로 수집하여 잘 건조한 후 세절하고 70% EtOH로 각 5종 이상 추출, 제조한다. 추출액을 회전 농축기로 농축하여 엑스를 H<sub>2</sub>O를 가하여 현탁시킨다음 용매의 극성증가 순으로 분획을 실시하여 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> fraction, EtOAc fraction, *n*-BuOH fraction 및 H<sub>2</sub>O fraction의 각 분획물을 얻었다. 이들 분획물을 SiO<sub>2</sub>, Sephadex LH-20, RP-18, MCI gel등을 이용한 column chromatography 및 HPLC를 이용하여 구조 골격이 다양한 화합물들을 분리한다. 순수 분리된 성분들의 물리화학적 성질을 검토하면서 Mass Spectrometry, IR Spectrophotometry, UV Spectrophotometry, <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR등의 각종 분광학적 방법에 의해 얻은 스펙트럼을 분석한다. 특히 NMR을 이용한 측정을 통해 화학구조를 결정한다. 분리 정제된 생리활성성분 및 70% EtOH 추출물을 생리활성성분 분석팀 및 효능확인연구팀에 연구용 시료로 제공한다. 또한 효능연구 확인을 위한 생리활성성분을 대량으로 제조한다. 분리된 물질의 구조 데이터를 통하여 동시정량이 가능한 HPLC에 적합한 컬럼과 이동상을 결정하여 분리된 물질들의 최적의 동시분석법을 개발하고 validation을 통하여 동시 정량법을 개발하였으며 시판되고 있는 한약재를 구입하여 지표성분함량을 정량하였다. TLC 분석법 및 LC-MS/MS 분석법도 검토하였고, HPLC의 성분함량을 기초로 data 처리로 기원별, 산지별 분석을 실시하였다.

### ○ 연구성과(응용분야 및 활용범위포함) (400~600자)

황련 및 독활 500g의 70% EtOH 추출물을 조제하여 효능 및 분석팀에 각각 10 gram 제공하였다. 그리고 황련과 독활의 산지별 비교를 하고자 총 13종의 황련과 독활을 추출, 제조하여 분석팀 및 효능 확인연구팀에 연구용 시료로 제공하였다. 또한 화합물의 분리를 위해 황련 10 kg MeOH 추출액과 독활 12 kg MeOH 추출액을 회전 농축기로 농축하여 엑스를 H<sub>2</sub>O를 가하여 현탁시켰다. 다음과 같이 용매의 극성증가 순으로 분획을 실시하여 황련 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> fraction (230 g), *n*-BuOH fraction (1100 g) 및 H<sub>2</sub>O fraction (840 g)의 각 분획물과 독활 hexane fraction (360 g), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> fraction (22 g), EtOAc fraction (20 g), *n*-BuOH fraction (237 g) 및 H<sub>2</sub>O fraction (2600 g) 을 얻었다. 이들 분획물을 SiO<sub>2</sub>, Sephadex LH-20, RP-18, MCI gel 등을 이용한 column chromatography 및 HPLC를 이용하여 황련으로부터 coptisine, pinoresinol, isolariciresinol, epiberberine, jateorrhizine, berberine, palmatine, magnoflorine, groenlandicine, β-sitosterol, ferulic acid methyl ester, 3-(3',4'-dihydroxyphenyl)lactic acid methylester 그리고 독활로부터 *ent*-pimara-8(14),15-diene-19-oic acid (continentalic acid), 7β-hydroxy-*ent*-pimara-8(14),15-diene-19-oic acid, 7-oxo-*ent*-pimara-8(14),15-diene-19-oic acid, 16α-methoxy-17-hydroxy-*ent*-kauran-19-oic acid, 15α,16α-epoxy-17-hydroxy-*ent*-kauran-19-oic acid, 17-Hydroxy-*ent*-kaur-15-en-19-oic acid, 16α,17-dihydroxy-*ent*-kauran-19-oic acid, mixture (3:2) 형태의 stigmasta-5-en-3β-ol (β-sitosterol) 과 stigmasta-5,22-dien-3β-ol (stigmasterol), mixture (9:1) 형태의 daucosterol (β-sitosterol glucoside) 과 stigmasterol glucoside, 7-dehydroabietanone, 16 α-hydroxy-17-isovaleryloxy-*ent*-kauran-19-oic acid, *ent*-kaur-16-en-19-oic acid (kaurenoic acid), *ent*-pimara-8(14),15-diene-19-ol (*ent*-pimarol), 8α-Hydroxy-*ent*-pimara-15-en-19-ol (*ent*-thermarol), 4β-hydroxy-19-nor(-)-pimara-8(14),15-diene, 4-epiruilopezol, lignoceric acid, (+)-spathulenol, dehydrofaltarindiol, D-fructose, chlorogenic acid (5-caffeoylquinic acid), 3,5-di-*O*-caffeoylquinic acid, neochlorogenic acid (3-caffeoylquinic acid), sucrose, caffeic acid, cryptochlorogenic acid (4-caffeoylquinic acid), 1-kestose [*O*-β-D-fructofuranosyl-(2→1)-β-D-fructofuranosyl-(2→1)-α-D-glucopyranoside], methyl-α-D-fructofuranoside, protocatechuic acid, thymidine, uridine 그리고 methyl-β-D-fructofuranoside을 분리하였다. 분리 정제된 생리활성성분 및 70% EtOH 추출물을 생리활성성분 분석팀 및 효능확인연구팀에 연구용 시료로 제공하였다. 또한 효능연구 확인을 위한 생리활성성분을 대량으로 제조하였다. 분리된 화합물의 화학적 구조결정을 위하여 NMR (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C), IR, UV, Mass-Spectrometry 등의 여러 가지 분광학적 분석을 통하여 구조를 동정하였다. 본 연구에서 개발된 황련의 alkaloid계 성분과 독활의 diterpene계 성분의 HPLC/UV 분석방법은 황련과 독활의 주성분을 분석 시 분석이 용이하도록 실험 방법을 작성하였고, 향후 대한약전 개정 시 황련과 독활의 지표성분 분석법으로 활용이 가능하다. 황련과 독활의 간편한 분석방법 중의 하나인 TLC의 분석방법도 설정으로 간편한 확인방법이 가능하다. 두가지 생약의 LC-MS/MS 분석 가능성도 확인하였다. HPLC로 분석한 황련과 독활의 주요성분의 패턴분석도 가능하였다. 황련과 독활 시중 판매시료의 산지별 성분 분석결과를 활용하여 기원별 패턴 분석을 할 수 있으며, 현재 황련 대용품인 호황련, 조황련은 berberine류 alkaloid계 성분이 없었으며 독활의 중국산 *Angelica* 속의 천독활은 diterpene계 성분이 확인되지 않아 황련과 독활은 기원식물에 따른 품질관리가 필요한 한약재로 확인되었다.

## ○ 참여연구원

성 명	주민등록번호(앞번호만 기재)	성 명	주민등록번호(앞번호만 기재)
최 재 수		정 현 아	
윤 나 영		정 다 미	
김 소 영		신 상 희	
배 현 주		조 지 영	
김 지 은		이 진 영	
황 진 영		김 소 영	
신 상 희		박 선 영	
현 숙 경		배 현 주	
최 현 영		전 수 경	
장 현 정		다오콩토	
민 병 선		서 호 원	
권 주 희		장 민 정	
이 정 훈		손 호 청	
이 준 석		이 미 경	
레티킴반		뉴엔티폰타오	

<b>Keywords</b> (5개 내외)	<b>한글</b>	생리활성성분, 황련, 독활, 표준품, 유효성분, HPLC-UV 함량분석, TLC 분석법, LC-MS/MS 분석법, 패턴인식법,
	<b>영문</b>	Bioactive component, <i>Coptis japonica</i> , <i>Aralia continentalis</i> , control reference standard, HPLC-UV analysis, TLC analysis, LC-MS/MS analysis, pattern recognition 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



## 1세부 연구과제 요약

과제번호	08182한약재254			
단위과제명	한약재 생리활성성분 분리 및 분석 연구			
제 1 세부과제명	황련과 독활의 생리활성성분 분리			
연구책임자	성 명	최 재 수	주민등록번호 (앞번호만 기재)	[REDACTED]
	소속 기관명	부경대학교 식품생명공학부		

### ○ 연구목표 (400~600자)

한약재의 유효성분 중심의 관리를 위하여 한약재(황련, 독활) 생리활성성분 분리(각 10 종 이상) 및 연구용 시료를 제공, 유효성분 정량용 표준품을 제조하고자 한다.

### ○ 연구내용 (1000~1200자)

기원이 확인된 2종 한약재(황련(KP), 독활(KHP))를 대상으로 각 생리활성성분 분리 및 동정 하고자 하였다. 즉, 황련과 독활의 국내 연구와 국외연구 활동에 대한 활성연구와 물질의 분리연구에 조사를 하고 황련과 독활에 함유된 여러 성분을 칼럼크로마토그래피를 이용하여 주성분 및 기타 성분들을 분리, 정제하여 분광학적 분석방법으로 화학구조를 결정한다. 외국 약전과 비교조사하여 대한약전, 한약(생약)규격집 및 식약청 고시의 기준 규격 제·개정을 위한 기초자료를 마련한다. 기원별(산지별) 한약재의 70% 에탄올엑스 각 5종 이상 제조하여 연구용 시료로 제공한다.

### ○ 연구성과(응용분야 및 활용범위포함) (400~600자)

황련 및 독활 500g의 70% EtOH 추출물을 조제하여 효능 및 분석팀에 각각 10 gram 제공하였다. 그리고 황련과 독활의 산지별 비교를 하고자 총 13종의 황련과 독활을 추출, 제조하여 분석팀 및 효능 확인연구팀에 연구용 시료로 제공하였다. 또한 화합물의 분리를 위해 황련 10 kg MeOH 추출액과 독활 12 kg MeOH 추출액을 회전 농축기로 농축하여 엑스를 H<sub>2</sub>O를 가하여 현탁시켰다. 다음과 같이 용매의 극성증가 순으로 분획을 실시하여 황련 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> fraction (230 g), *n*-BuOH fraction (1100 g) 및 H<sub>2</sub>O fraction (840 g)의 각 분획물과 독활 hexane fraction (360 g), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> fraction (22 g), EtOAc fraction (20 g), *n*-BuOH fraction (237 g) 및 H<sub>2</sub>O fraction (2600 g) 을 얻었다. 이들 분획물을 SiO<sub>2</sub>, Sephadex LH-20, RP-18, MCI gel 등을 이용한 column chromatography 및 HPLC를 이용하여 황련으로부터 coptisine, pinosresinol, isolariciresinol, epiberberine, jateorrhizine, berberine, palmatine, magnoflorine, groenlandicine, β-sitosterol, ferulic acid methyl ester, 3-(3',4'-dihydroxyphenyl)lactic acid methylester 그리고 독활로부터 *ent*-pimara-8(14),15-diene-19-oic acid (continentalic acid), 7β-hydroxy-*ent*-pimara-8(14),15-diene-19-oic acid, 7-oxo-*ent*-pimara-8(14),15-diene-19-oic acid, 16α-methoxy-17-hydroxy-*ent*-kauran-19-oic acid, 15α,16α-epoxy-17-hydroxy-*ent*-kauran-19-oic acid, 17-Hydroxy-*ent*-kaur-15-en-19-oic acid, 16α,17-dihydroxy-*ent*-kauran-19-oic acid, mixture (3:2) 형태의 stigmasta-5-en-3β-ol (β-sitosterol) 과 stigmasta-5,22-dien-3β-ol (stigmasterol), mixture (9:1) 형태의 daucosterol (β-sitosterol glucoside) 과 stigmasterol glucoside, 7-dehydroabietanone, 16α-hydroxy-17-isovaleryloxy-*ent*-kauran-19-oic acid, *ent*-kaur-16-en-19-oic acid (kaurenoic acid), *ent*-pimara-8(14),15-diene-19-ol (*ent*-pimarol), 8α-Hydroxy-*ent*-pimara-15-en-19-ol (*ent*-thermarol), 4β-hydroxy-19-nor(-)-pimara-8(14),15-diene, 4-epiruilopezol, lignoceric acid, (+)-spathulenol, dehydrofaltarindiol, D-fructose, chlorogenic acid (5-caffeoylquinic acid), 3,5-di-*O*-caffeoylquinic acid, neochlorogenic acid (3-caffeoylquinic acid), sucrose, caffeic acid, cryptochlorogenic acid (4-caffeoylquinic acid), 1-kestose [*O*-β-D-fructofuranosyl-(2→1)-β-D-fructofuranosyl-(2→1)-α-D-glucopyranoside], methyl-α-D-fructofuranoside, protocatechuic acid, thymidine, uridine 그리고 methyl-β-D-fructofuranoside을 분리하였다. 분리 정제된 생리활성성분 및 70% EtOH 추출물을 생리활성성분 분석팀 및 효능확인연구팀에 연구용 시료로 제공하였다. 또한 효능연구 확인을 위한 생리활성성분을 대량으로 제조하였다. 분리된 화합물의 화학적 구조결정을 위하여 NMR (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C), IR, UV, Mass-Spectrometry 등의 여러 가지 분광학적 분석을 통하여 구조를 동정하였다.

○ 참여연구원

성명	주민등록번호(앞번호만 기재)	성명	주민등록번호(앞번호만 기재)
최재수		정현아	
윤나영		정다미	
김소영		신상희	
배현주		조지영	
김지은		이진영	
황진영		김소영	
신상희		박선영	
현숙경		배현주	
최현영		전수경	
장현정			

Keywords (5개 내외)	한글	생리활성성분, 황련, 독활, 표준품
	영문	Bioactive component, <i>Coptis japonica</i> , <i>Aralia continentalis</i> , control reference standard

주1) 연구목표, 연구내용, 연구성과를 서술형으로 기재

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

## 2세부 연구과제 요약

과제번호	S-08-03-2-HET-254-0-B			
단위과제명	한약재 생리활성성분 분리 및 분석 연구 - 황련, 독활			
제2 세부과제명	황련, 독활의 생리활성성분의 분석법 개발			
연구책임자	성 명	민 병 선	주민등록번호 (앞번호만 기재)	[REDACTED]
	소속 기관명	대구가톨릭대학교 약학대학		

### ○ 연구목표 (400~600자)

황련에서 다량 분리되고 황련의 주요 생리활성 성분으로 알려진 berberine, palmatine, coptisine과 독활의 주요성분이고 다량 함유되어 있는 *epi*-continentalic acid, kaurenoic acid 및 continentalic acid의 물질을 동시에 정량할 수 있는 HPLC-UV 동시 정량법을 설정하고 HPLC 방법의 validation을 수행하여 함량 분석법을 확립한다. 황련과 독활의 간단한 화학적 확인 방법으로 TLC 분석의 방법도 확립한다. 또한 LC-MS/MS을 이용한 분석법 설정과 정량성을 확립한다. 시중에 유통되고 황련과 속이 다른 호황련, 조황련 및 독활의 국내생산품과 중국산 천독활을 포함하는 각각의 국내유통 수입한약재 등을 포함한 유통품의 각각 20종의 제품 모니터링을 통하여 적절한 함량기준을 제시하고자 한다. 함량분석을 통한 패턴인식 및 지문인식으로 기원별, 산지별 한약재 평가를 하고자 한다.

### ○ 연구내용 (1000~1200자)

분리된 물질의 구조 데이터를 통하여 동시정량이 가능한 HPLC에 적합한 컬럼과 이동상을 결정하여 분리된 물질들의 최적의 동시분석법을 개발하고 validation을 통하여 동시 정량법을 개발하였으며 시판되고 있는 한약재를 구입하여 지표성분함량을 정량하였다. TLC 분석법 및 LC-MS/MS 분석법도 검토하였고, HPLC의 성분함량을 기초로 data 처리로 기원별, 산지별 분석을 실시하였다.

#### 가. 황련과 독활의 생리활성물질의 동시분석법 개발

황련에 함유된 berberine, palmatine, coptisine, *epi*-berberine 및 독활의 생리활성물질 *epi*-continentalic acid, kaurenolic acid, continentalic acid의 정량조건을 HPLC-UV 법으로 설정하였다. HPLC-UV법으로 황련 및 독활의 column은 C-18을 이동상은 각각 10 mM hexansulfonic acid-acetonitrile과 0.1% TFA-acetonitrile; UV는 254 nm와 205 nm로 정량법을 설정하였다.

#### 나. 황련과 독활의 생리활성물질의 동시분석법 검증 (validation)

황련과 독활에 함유된 생리활성물질의 동시 정량법에 대한 HPLC/UV 방법의 validation을 다음 항목에 대해 실시함으로써 동시분석법에 대한 타당성을 입증하였다.

- 재현성 (Reproducibility)
- 정확도 및 정밀도 (Accuracy and Precision)
- 회수율(Recovery)
- 완건성 (Robustness)
- 안정성 (Stability)

#### 다. 황련과 독활의 시중 유통품의 생리활성성분 함량 측정

황련과 독활의 시중 유통품 및 식의약청 제공 황련과 독활의 유사 생약에 대한 생리활성성분의 함량을 측정하였다. *Coptis chinensis*는 황련의 주요성분 4가지가 모두 함유되어 있었으나 호황련 (*Picrorrhiza kurroo*)와 조황련 (*Jeffersonia dubia*)에는 황련의 4가지 성분이 검출되지 않았다. 또한 독활은 *Aralia cordata*는 diterpene계 성분이 검출되었으나 천독활 (*Angelica pubescens*)은 diterpene계 성분이 검출되지 않았다.

#### 라. 황련과 독활의 TLC 분석 및 LC-MS/MS 분석법 개발

황련의 alkaloid계 성분과 독활의 diterpene계 성분의 간편한 분석방법인 TLC 방법으로 silica gel plate와 용매는 각각 *n*-propanol : formic acid : H<sub>2</sub>O = 90 : 1 : 9 및 hexane : EtOAc (5% formic acid) = 5 : 1로 분석이 가능하였다. 황련과 독활 지표성분의 LC-MS/MS의 분석이 가능하였다.

마. HPLC로 분석한 황련과 독활의 활성성분을 중심으로 R-program을 이용한 패턴분석을 실시하였다. 각각의 생약의 기원별 성분 분류가 가능하였다.

○ 연구성과(응용분야 및 활용범위포함) (400~600자)

- 본 연구에서 개발된 황련의 alkaloid계 성분과 독활의 diterpene계 성분의 HPLC/UV 분석방법은 황련과 독활의 주성분을 분석 시 분석이 용이하도록 실험 방법을 작성하였고, 향후 대한약전 개정 시 황련과 독활의 지표성분 분석법으로 활용이 가능하다. 황련과 독활의 간편한 분석방법 중의 하나인 TLC의 분석방법도 설정으로 간편한 확인방법이 가능하다. 두가지 생약의 LC-MS/MS 분석 가능성도 확인하였다. HPLC로 분석한 황련과 독활의 주요성분의 패턴분석도 가능하였다.
- 황련과 독활 시중 판매시료의 산지별 성분 분석결과를 활용하여 기원별 패턴 분석을 할 수 있으며, 현재 황련 대응품인 호황련, 조황련은 berberine류 alkaloid계 성분이 없었으며 독활의 중국산 *Angelica* 속의 천독활은 diterpene계 성분이 확인되지 않아 황련과 독활은 기원식물에 따른 품질 관리가 필요한 한약재로 확인되었다.

○ 참여연구원

성명	주민등록번호(앞번호만 기재)	성명	주민등록번호(앞번호만 기재)
민병선		서효원	
권주희		장민정	
이정훈		손효청	
이준석		이미경	
레티김반		뉴엔티풍타오	
다오쿵토			

Keywords (5개 내외)	한글	유효성분, HPLC-UV 함량분석, TLC 분석법, LC-MS/MS 분석법, 패턴인식법,
	영문	Bioactive component, HPLC-UV analysis, TLC analysis, LC-MS/MS analysis, pattern recognition analysis

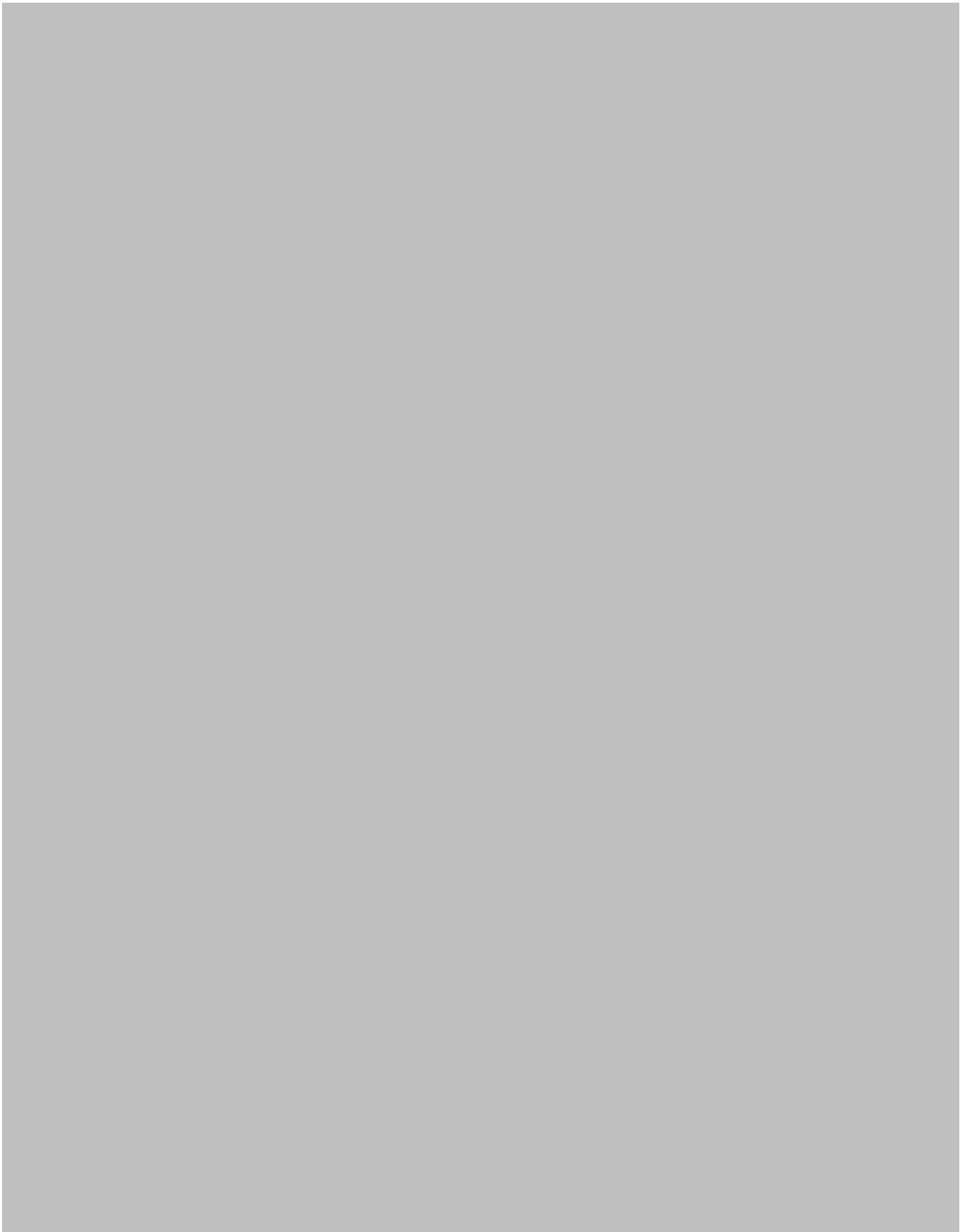
- 1) 연구목표, 연구내용, 연구성과를 서술형으로 기재
- 2) 국가연구개발사업 DB를 통한 공개를 희망하지 않는 경우 공개가능여부란에 “비공개”로 표시
- 3) 연구성과는 그간의 연구결과 및 기대성과를 서술
- 4) 세부과제가 없을시 작성하지 않음 (세부과제별로 작성)

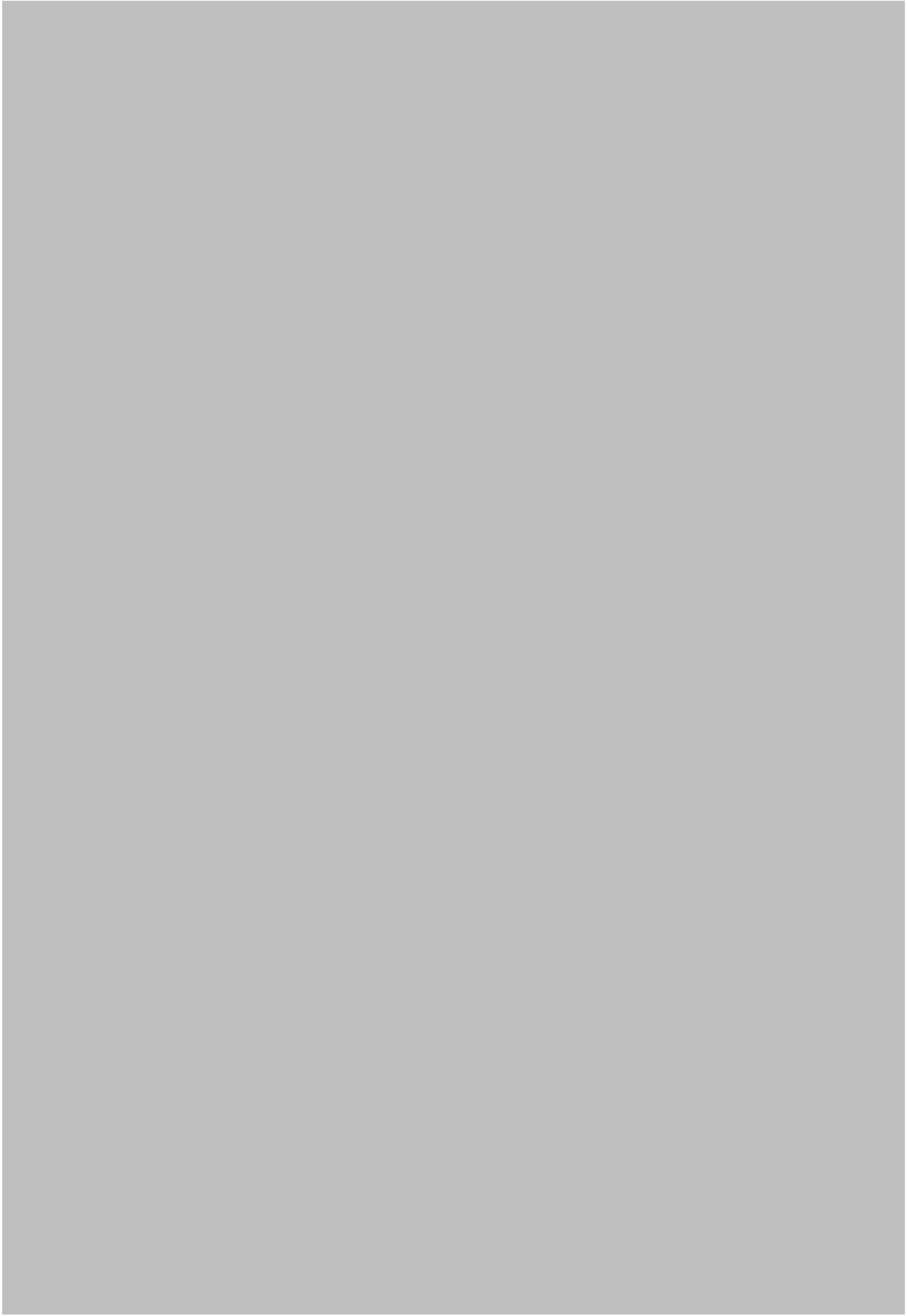
# 첨부서류







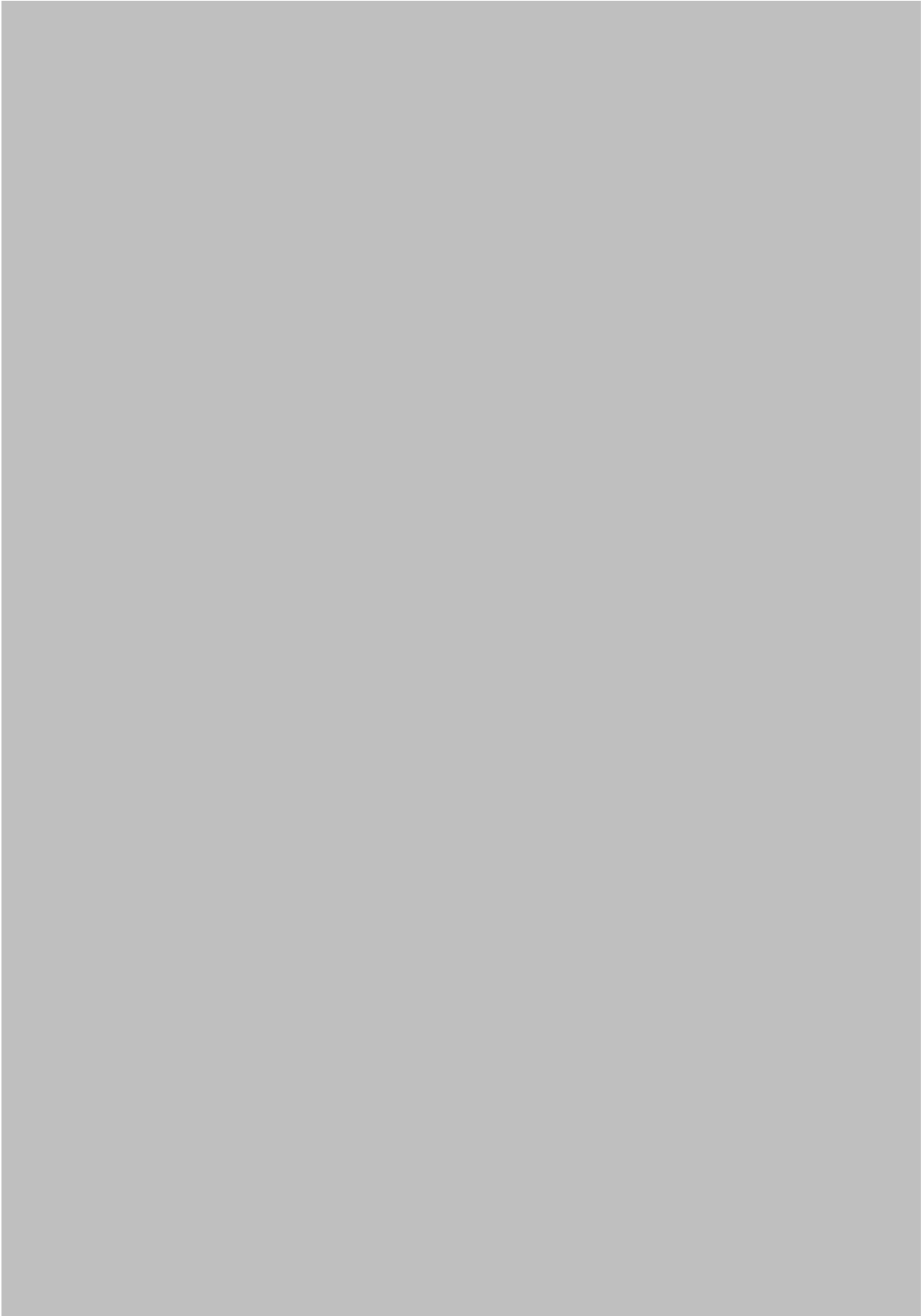








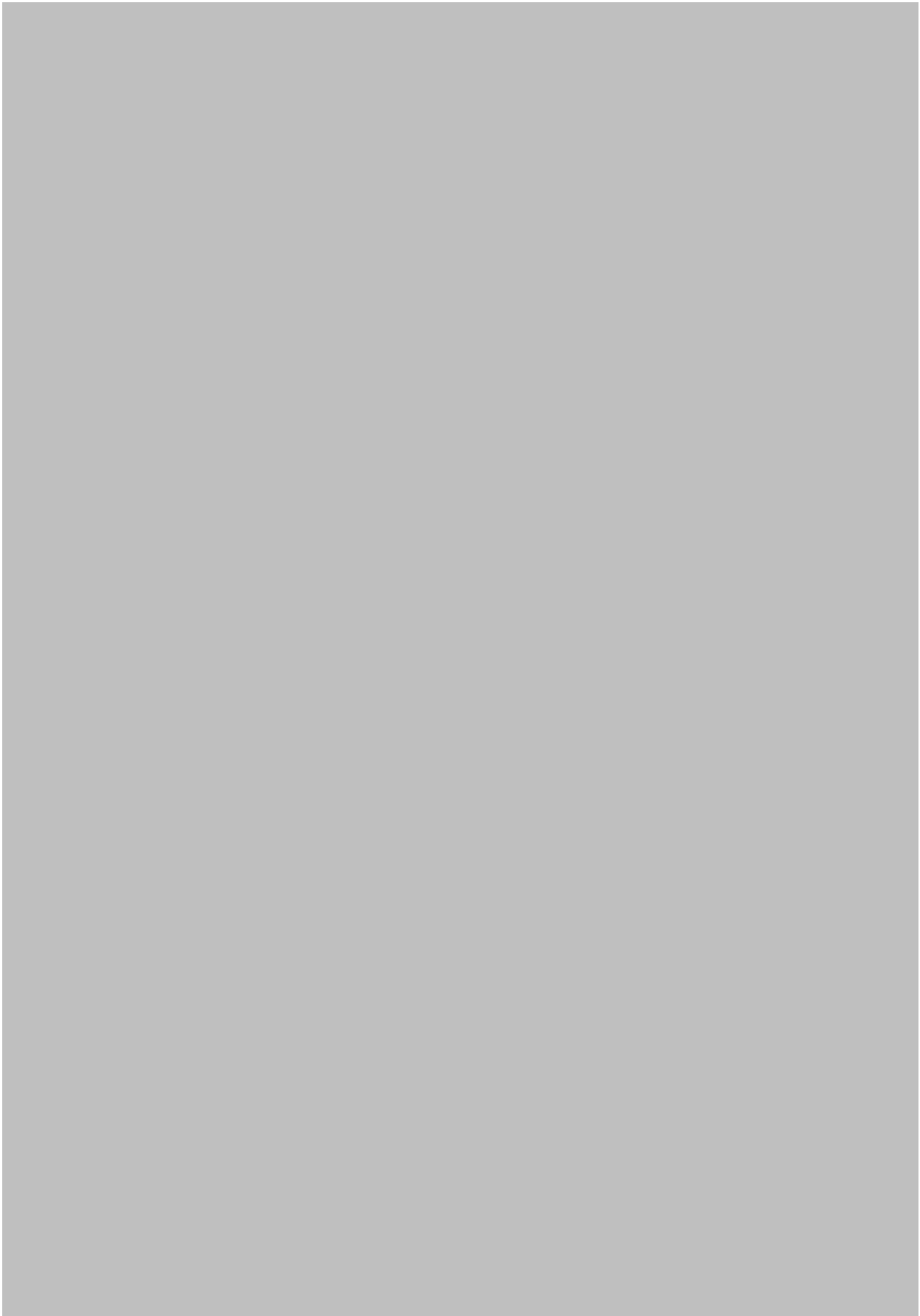










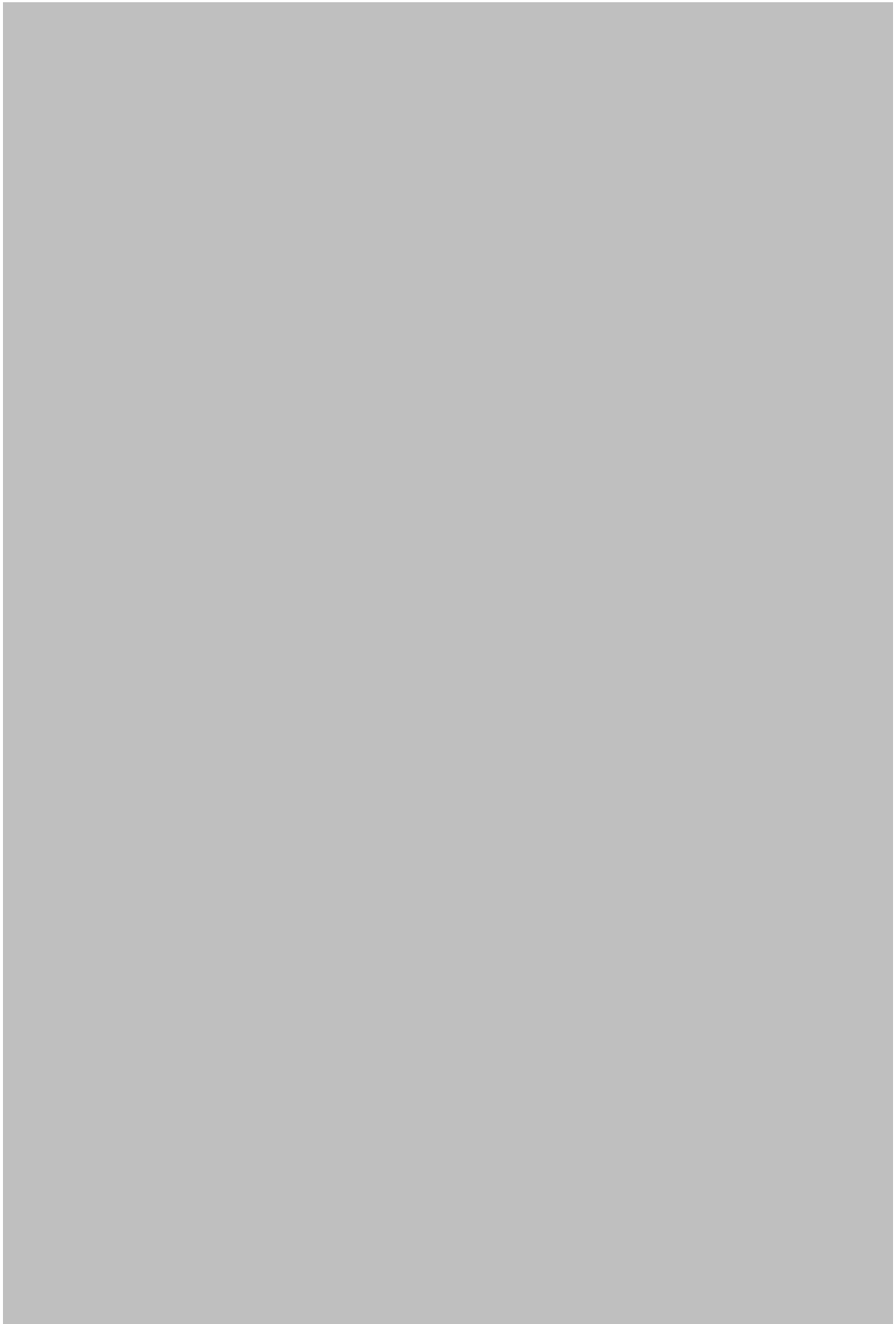








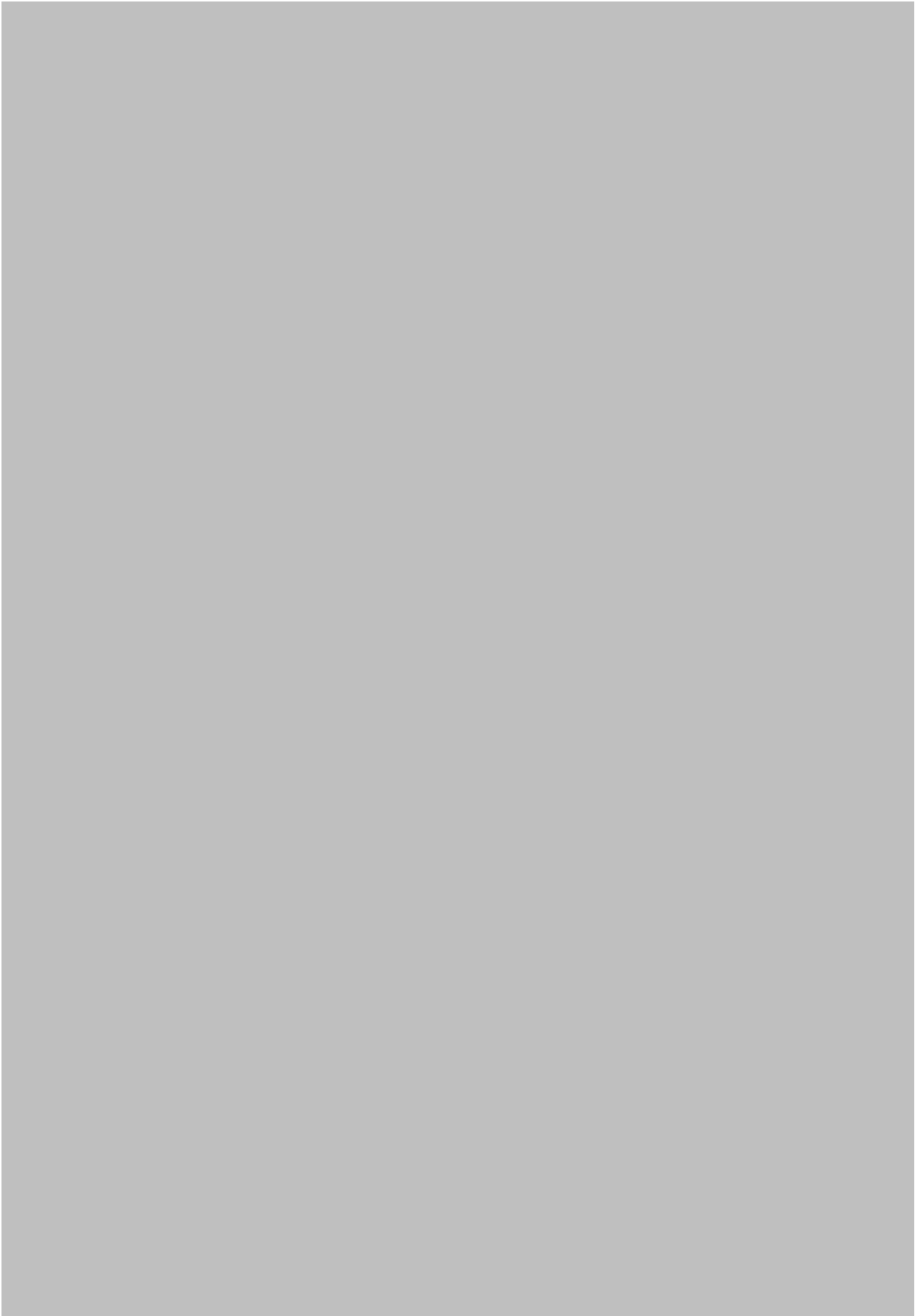




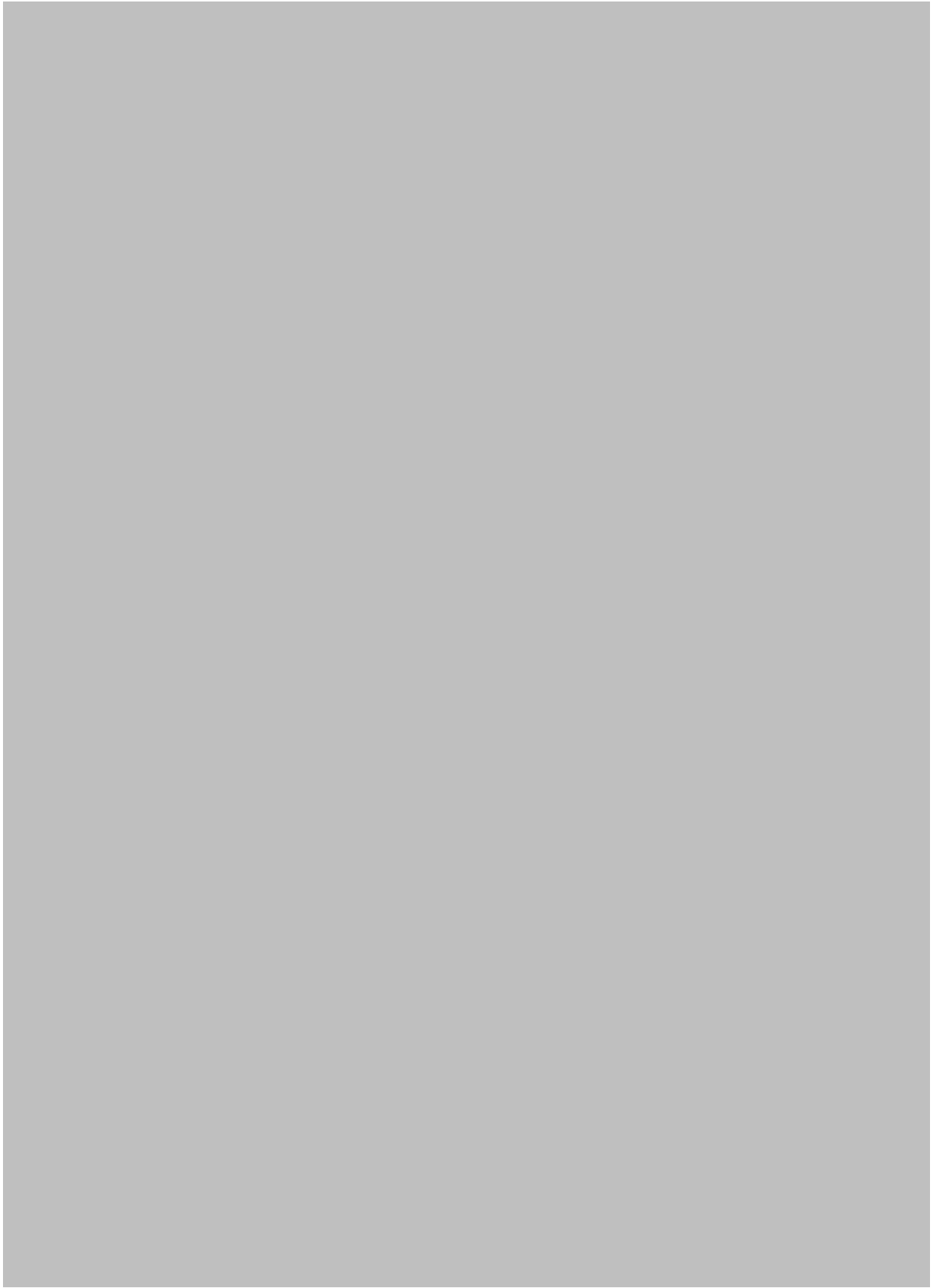


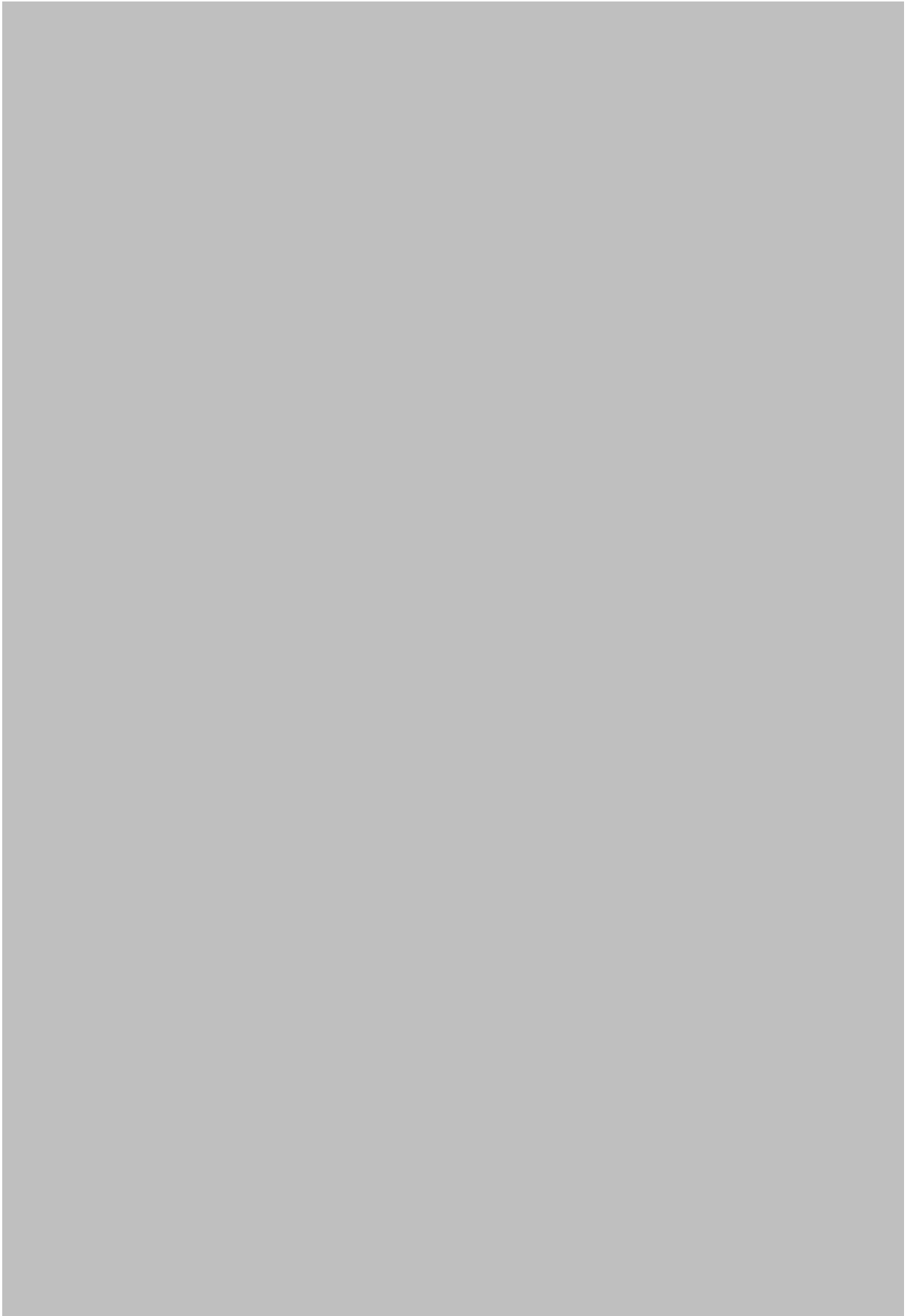


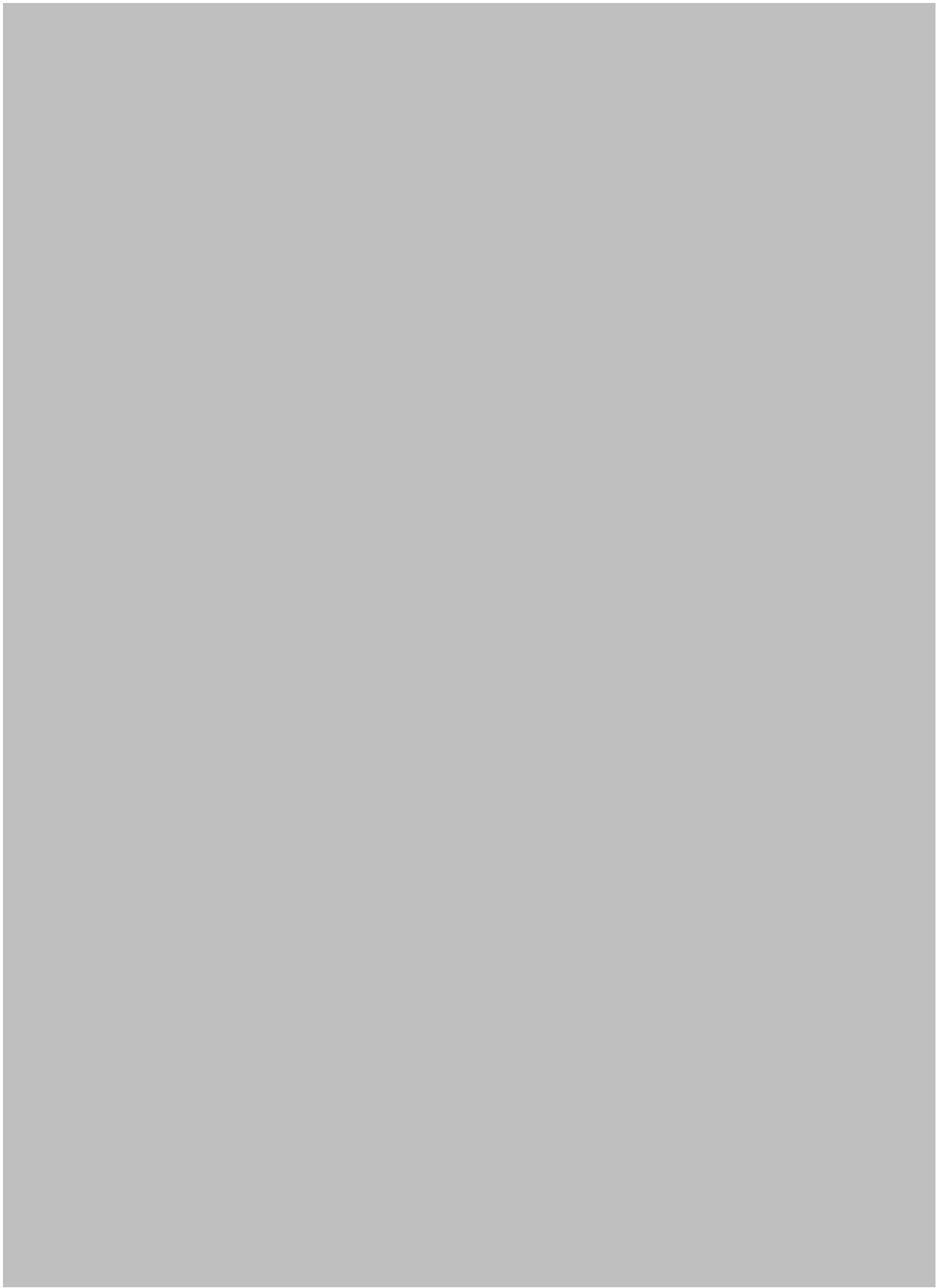














# Protective Effect of Magnoflorine Isolated from *Coptidis Rhizoma* on $\text{Cu}^{2+}$ -Induced Oxidation of Human Low Density Lipoprotein

Tran Manh Hung<sup>1</sup>, MinKyun Na<sup>1</sup>, Byung Sun Min<sup>2</sup>, Xinfeng Zhang<sup>3</sup>, IkSoo Lee<sup>1</sup>, Tran Minh Ngoc<sup>1</sup>, Phuong Thien Thuong<sup>1</sup>, Dai-Eun Sok<sup>1</sup>, KiHwan Bae<sup>1</sup>

## Abstract

The aim of this study was to investigate the antioxidant activity of magnoflorine, an alkaloid isolated from *Coptidis Rhizoma*, against the oxidation of native low density lipoprotein (LDL) and modified LDL. Magnoflorine was found to inhibit the copper-mediated ( $\text{Cu}^{2+}$ ) oxidation of LDL, as well as of glycated and glycoxidated LDL by increasing the lag time of conjugated diene formation and preventing the generation of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). In addition, the results from the fluorescence emission spectra of tryptophan (Trp) supported that the antioxidant activity of magnoflorine could be associated with the protective effect on the structural modification of apolipoprotein B (apoB) required for LDL oxidation. These results suggest that magnoflorine may be useful for preventing the oxidation of various LDL forms.

Oxidative modification of low density lipoprotein (LDL) in the arterial wall is now widely regarded as a key step for the development of atherosclerosis. LDL, especially in modified forms (oxidized or glycated = non-enzymatically glycosylated), are favouring atherosclerosis, due to enhanced accumulation in the artery wall and formation of "foam cells". One hypothesis is that an increase in the LDL modification by oxidation and/or glycation may induce endothelial cell injury and accelerate foam cell formation in the arterial intima [1], [2]. The increase of glycation and lipid peroxidation is the notable feature in diabetes mellitus. These changes suggest an oxidative stress state for which hyperglycemia, rather than processes that lead to diabetes, is primarily responsible [3]. Oxygen free radicals have been implicated in the pathogenesis of diabetes, and the production of oxygen free radicals in diabetes is through glucose auto-oxidation and non-enzymatic protein glycation [4]. The glycated LDL is more prone to oxidation than native LDL. LDL oxidation and/or glycation

seem to play such a prominent role in the pathophysiology of atherosclerosis [5].

*Coptidis Rhizoma*, the rhizome of *Coptis chinensis* Franch (Ranunculaceae), has been traditionally used to treat diabetes. It is also prescribed as one of the crude drugs for various vascular disorders and as an alternative therapy for hypercholesterolemia [6]. The alkaloids in *Coptidis Rhizoma* were considered to be its active constituents [7]. In the course of our study on the antioxidants useful for treating or preventing atherosclerosis, we have found that the water extract of *Coptidis Rhizoma* possesses significant anti-LDL oxidation activity. Phytochemical study has led to the isolation of magnoflorine (Fig. 1), a minor quaternary alkaloid with the isoquinoline skeleton. The antioxidant activity of magnoflorine was investigated with respect to inhibition of free radical peroxidation of dioleoyl phosphatidylcholine liposomes [8]. Recently, magnoflorine was demonstrated to play a role in the protection of the human high density lipoprotein (HDL) against lipid peroxidation [9]. However, the effect exerted by magnoflorine against lipid peroxidation of human LDL has not been studied. For these reasons, the aim of this study was to investigate the inhibitory effect of magnoflorine on the  $\text{Cu}^{2+}$ -induced lipid oxidation in the native and modified LDL.

Repeated column chromatography led to the isolation of a colorless crystal compound. The isolated compound was identified as magnoflorine by analyses of MS, NMR data, and comparison with data in the literature [10]. In this study, we tested the inhibitory activity of magnoflorine against various forms of LDL oxidation mediated by  $\text{Cu}^{2+}$ . The oxidation of LDL, glycated LDL, and glycoxidated LDL initiated by  $\text{Cu}^{2+}$  was measured by the formation of malondialdehyde (MDA) using the TBARS assay. As shown in Table 1, magnoflorine exhibited antioxidant activities against LDL oxidation with an  $\text{IC}_{50}$  value of  $3.7 \mu\text{M}$ , while the  $\text{IC}_{50}$  values were  $4.3 \mu\text{M}$  and  $6.5 \mu\text{M}$ , respectively, in the case of glycated LDL and glycoxidated LDL oxidation. In this experiment, BHT, caffeic acid, and  $\alpha$ -tocopherol were used as the positive controls. Under these conditions, BHT inhibited LDL oxidation and glycated LDL oxidation with  $\text{IC}_{50}$  values of  $3.0 \mu\text{M}$  and  $11.5 \mu\text{M}$ , respectively, while caffeic acid showed the activity with  $\text{IC}_{50}$  values of  $5.3 \mu\text{M}$  and  $5.7 \mu\text{M}$ , respectively. However,  $\alpha$ -tocopherol only manifests lower activity with  $\text{IC}_{50}$  values of  $23.4 \mu\text{M}$  (against LDL oxidation) and  $28.1 \mu\text{M}$  (against glycoxidated LDL oxidation).

In further study, the effect of magnoflorine on the change of lag time was investigated. The lag time (protection from oxidation) in the formation of conjugated dienes represents the initiating phase of oxidation, and the extent of the lag time indicates the

**Affiliation:** <sup>1</sup> College of Pharmacy, Chungnam National University, Daejeon, Korea · <sup>2</sup> College of Pharmacy, Catholic University of Daegu, Gyeongsan, Korea · <sup>3</sup> School of Forestry and Bioscience Technology, Zhejiang Forestry University, Lin'an, Zhejiang, P. R. China

Received March 31, 2007 · Revised June 29, 2007 · Accepted July 30, 2007

**Bibliography:** *Planta Med* 2007; 73: 1281–1284 © Georg Thieme Verlag KG Stuttgart · New York · DOI 10.1055/s-2007-981615 · Published online September 20, 2007 · ISSN 0032-0943

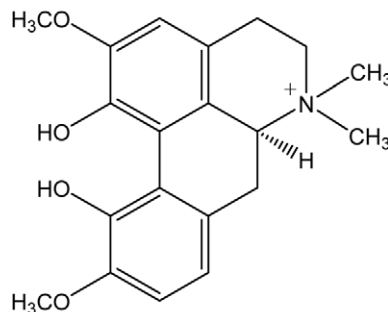


Fig. 1 Chemical structure of magnoflorine.



Table 1 Effect of magnoflorine on the oxidation of native and modified LDL

Extract/Compounds	TBARS, IC <sub>50</sub> (μM) <sup>a</sup>		
	Native LDL	Glycated LDL	Glycoxidated LDL
Water extract	68.3 ± 6.1 <sup>c</sup>	ND	ND
Magnoflorine	3.7 ± 0.2	4.3 ± 0.3	6.5 ± 0.4
BHT <sup>b</sup>	3.0 ± 0.4	11.5 ± 1.4	ND
Caffeic acid <sup>b</sup>	5.3 ± 0.1	5.7 ± 0.5	ND
α-tocopherol <sup>b</sup>	23.4 ± 2.7	ND	28.1 ± 2.5

<sup>a</sup> IC<sub>50</sub> values were determined by regression analysis and expressed as mean ± S.D. of three replicates.

<sup>b</sup> Positive controls.

<sup>c</sup> In μg/mL. ND = not determined.

oxidation resistant capacity of LDL forms. The spectrophotometric analyses of the Cu<sup>2+</sup>-induced LDL oxidation (A), Cu<sup>2+</sup>-induced glycated LDL oxidation (B), and Cu<sup>2+</sup>-induced glycoxidated LDL oxidation (C) based on the conjugated diene formation due to the unsaturated lipids are presented in Fig. 2. When the LDL was incubated with Cu<sup>2+</sup> alone, the lag time was 38 ± 2 min whereas, in the presence of magnoflorine (2.0, 4.0, 10.0 μM), the lag phase was retarded to 44 ± 3, 82 ± 3, and 185 ± 6 min, respectively. In the case of glycated LDL, the lag time of the control group was 37 ± 3 min, while that of the 4.0 μM magnoflorine treated group was markedly prolonged to 67 ± 5 min. The results regarding the anti-glycoxidated LDL oxidation indicated that magnoflorine (4.0 μM) could prolong the lag phase (64 ± 4 min) as compared to that of control (33 ± 3 min).

Further results observed in the fluorescence assay supported the protective action of magnoflorine against apoB oxidative modification promoted by Cu<sup>2+</sup>. As presented in Fig. 3, the fluorescence of Trp for the oxidized LDL was decreased (Plot 1), indicating that apoB was modified by Cu<sup>2+</sup>. Treatment with magnoflorine dose-dependently increased the intensity of fluorescence, suggesting that the Trp residue of LDL could be protected from the oxidative modification (Plots 2, 3, and 4).

Glycated LDL is produced when glucose forms a covalent bond with the lysine residues of the apoB, the main apolipoprotein of LDL [11], [12], [13]. Glycoxidation occurs when oxidative reactions affect the initial products of glycation, and results in irreversible structural alterations of proteins. Glycoxidation products are believed to be atherogenic, and to accumulate with advancing age [14]. Thus, it is necessary for LDL oxidation inhibitors derived from medicinal plants and/or synthetic compound to evaluate the inhibitory effect on these species on modified LDL. Interestingly, boldine, which has a similar chemical structure with magnoflorine, has been well established to be a free radical scavenger which can prevent LDL from oxidative modifications both *in vitro* and *in vivo* [15]. As demonstrated in this study, magnoflorine also showed potent antioxidant activity against the Cu<sup>2+</sup>-mediated oxidation in a few LDL forms, which was proved using the decrease in the formation of conjugated dienes and TBARS. The activity of magnoflorine was similar to or more potent than those of some known LDL antioxidants such as BHT, caffeic acid, and α-tocopherol. Moreover, the antioxidant effects of magnoflorine on both the glycated and glycoxidated LDL are

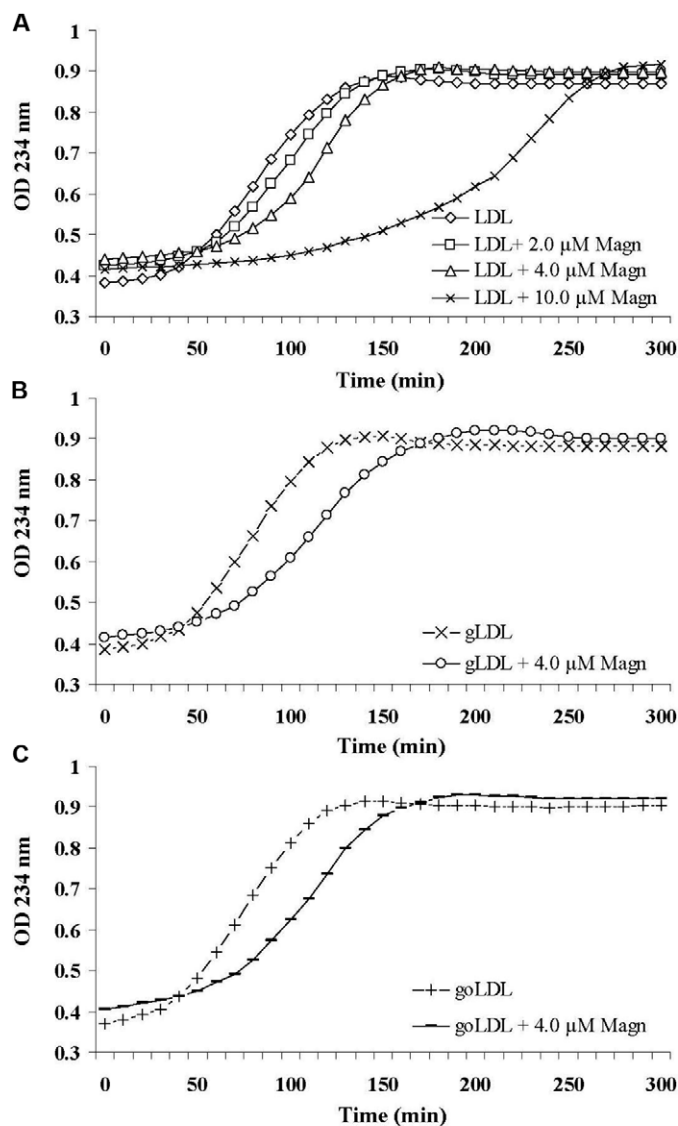


Fig. 2 Effect of magnoflorine (Magn) on LDL, glycated LDL (gLDL), and glycoxidated LDL (goLDL) oxidation. LDL (A), gLDL (B), and goLDL (C) (100 mg protein/mL) in PBS (pH 7.4) was incubated with 5 μM Cu<sup>2+</sup> at 37 °C in the absence (control) or presence of magnoflorine. Conjugated dienes formation was measured by determining the absorbance at 234 nm every 10 min for 5 hours at 37 °C. Results were expressed as mean ± S.D. of three replicates.

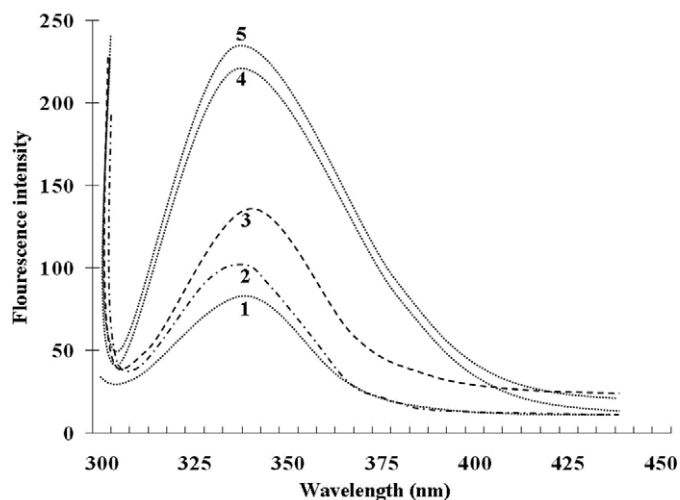


Fig. 3 Fluorescence changes by the inhibitory effect of magnoflorine on apoB modifications treated by  $\text{Cu}^{2+}$ . LDL (50  $\mu\text{g}$  protein/mL) was incubated with 5  $\mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$  at 37 °C for 1 h in the absence or presence of magnoflorine at various concentrations. Fluorescence emission spectra of apoB were measured with the excitation wavelength at 295 nm. Spectra of native apoB (5) and oxidized apoB in the absence (1) and in the presence of 1.0  $\mu\text{M}$  (2), 4.0  $\mu\text{M}$  (3) and 10.0  $\mu\text{M}$  (4) magnoflorine.

worthy of notice, because the LDL modified by glycation may be more susceptible to oxidation, and thus enhance its atherogenicity, as diabetes patients have a high risk for atherosclerosis. In addition, magnoflorine exhibited the protective action against apoB oxidation through interaction with the LDL molecule and such interactions cause changes in the microenvironment around the Trp residue [16]. Since magnoflorine was an effective antioxidant in the metal-dependent pro-oxidant system, metal ion chelating properties might underlie magnoflorin's apparent antioxidant effects towards LDL oxidation *in vitro*. The presence of phenolic hydroxy groups may be responsible for the antioxidant efficiency, via a chain-breaking mechanism by donation of the phenolic hydrogen. Magnoflorine also showed a lower value for O-H bond dissociation energy [8], which could explain the high antioxidant efficiency.

In the present study, we demonstrate the anti-LDL oxidation effect of *Coptidis Rhizoma* in various LDL forms. Magnoflorine may be useful for preventing the development and progression of LDL lipid peroxidation.

## Materials and Methods

The root of *Coptis chinensis* were purchased from a local market in Daejeon, Korea in June 2006, and were identified by Prof. KiHwan Bae. A voucher specimen (CNU 1286) was deposited in the herbarium of the College of Pharmacy, Chungnam National University. Magnoflorine was isolated following our previous study [9].

**Magnoflorine:** m.p. 210–212 °C; IR (KBr):  $\nu_{\text{max}}$  = 3400 (OH), 1640, 1645 (aromatic ring)  $\text{cm}^{-1}$ ; UV (MeOH):  $\lambda_{\text{max}}$  = 230, 280, 323 nm; FAB-MS:  $m/z$  = 343 [M + H]<sup>+</sup>,  $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{NO}_4$ . <sup>1</sup>H-NMR and <sup>13</sup>C-NMR spectral data were in accordance with those in a published paper [10].

**Antioxidant assay:** Blood was drawn from healthy normolipidemic volunteers and human LDL was prepared from plasma by sequential flotation ultracentrifugation and the LDL protein was determined by the bicinchoninic acid method using bovine serum albumin as a standard [17]. The TBARS assay of Buege and Aust was used with a slight modification [18]. The conjugated diene formation was measured by the change in UV absorbance at 234 nm which was continuously monitored at 10 min intervals for 5 h at 37 °C using a spectrophotometer (Shimadzu UV-1240; Tokyo, Japan). The lag time was measured as the intercept between the baseline and the tangent of the absorbance curve during the propagation phase [19]. The controls BHT, caffeic acid and  $\alpha$ -tocopherol were purchased from Sigma (Yongin-City, Korea). For the preparation and characterization of LDL modifications, dialysed LDL at a concentration of 0.6–0.7 mg LDL protein/mL was incubated with 0.5 M glucose in the presence or absence of antioxidants (1.0 mM EDTA, 20  $\mu\text{M}$  butylated hydroxytoluene; Sigma) at 37 °C for 4 weeks in the dark [20], and the protective effect of the compound against apoB-100 oxidative modifications was further examined using a Perkin-Elmer 550–55 Fluorimeter, with the excitation wavelength of 295 nm at 37 °C [16].

## Acknowledgments

This work was supported by a grant funded by the Korean Food and Drug Administration (2007).

## References

- Steiner C. Atherosclerosis, the major complication of diabetes. *Adv Exp Med Biol* 1985; 189: 277–97.
- Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JD, Witztum JL. Beyond cholesterol: modification that increases its atherogenicity. *N Engl J Med* 1989; 320: 915–24.
- Augustin AJ, Breipohl W, Boker T, Lutz J, Spitznas M. Increased lipid peroxide levels and myeloperoxidase activity in the vitreous of patients suffering from proliferative diabetic retinopathy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1993; 231: 647–50.
- Asayama K, Hayashibe H, Dobashi K, Niitsu T, Miyao A, Kato K. Antioxidant enzyme status and lipid peroxidation in various tissues of diabetic and starved rats. *Diabetes Res* 1989; 12: 85–91.
- Sobal G, Menzel EJ, Sinzinger H. Why is glycated LDL more sensitive to oxidation than native LDL? – A comparative study. *Prostaglandin Leukot Essent Fatty Acids* 2000; 63: 177–86.
- Yokozawa T, Ishida A, Cho EJ, Nakagawa T. The effects of *Coptidis Rhizoma* extract on a hypercholesterolemic animal model. *Phytomedicine* 2003; 10: 17–22.
- Chuang WC, Young DS, Liu LK, Sheu SJ. Liquid chromatographic-electrospray mass spectrometric analysis of *Coptidis Rhizoma*. *J Chromatogr A* 1996; 755: 19–26.
- Račková L, Májeková M, Kost'álová D, Štefek Milan. Antiradical and antioxidant activities of alkaloids isolated from *Mahonia aquifolium*. *Structural aspects*. *Bioorg Med Chem* 2004; 12: 4709–15.
- Hung TM, Lee JP, Min BS, Choi JS, Na MK, Zhang XF, Ngoc TM et al. Magnoflorine from *Coptidis Rhizoma* protects high density lipoprotein during oxidant stress. *Biol Pharm Bull* 2007; 30: 1157–60.
- Mori H, Fuchigami M, Inoue N, Nagai H, Koda A, Noshioka I. Principle of the bark of *Phellodendron amurense* to suppress the cellular immune response. *Planta Med* 1994; 60: 445–9.
- Schleicher E, Deufel T, Wieland OH. Non-enzymatic glycosylation of human serum lipoproteins. *FEBS Lett* 1981; 129: 1–4.
- Tames FJ, Mackness MI, Arrol S, Laing I, Durrington PN. Non-enzymatic glycation of apolipoprotein B in the sera of diabetic and non-diabetic subjects. *Atherosclerosis* 1992; 93: 237–44.

- <sup>13</sup> Misciagna G, Logroscino G, De Michele G, Guerra V, Cisternino AM, Caruso MG et al. Glycated apolipoprotein B and myocardial infarction. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2007; 17: 6–12.
- <sup>14</sup> Lions TJ. Glycation and oxidation: A role in the pathogenesis of atherosclerosis. *Am J Cardiol* 1993; 71: 26–31.
- <sup>15</sup> Santanam N, Penumetcha M, Speisky H, Parthasarathy S. A novel alkaloid antioxidant, Boldine and synthetic antioxidant, reduced form of RU486, inhibit the oxidation of LDL *in-vitro* and atherosclerosis *in vivo* in LDLR<sup>-/-</sup> mice. *Atherosclerosis* 2004; 173: 203–10.
- <sup>16</sup> Reyftmann JP, Santus R, Maziere JC, Morliere P, Salmon S, Candide C et al. Sensitivity of tryptophan and related compounds to oxidation induced by lipid autooxidation. Application to human serum low- and high-density lipoproteins. *Biochim Biophys Acta* 1990; 1042: 159–67.
- <sup>17</sup> Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1985; 150: 76–85.
- <sup>18</sup> Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Method Enzymol* 1978; 52: 903–11.
- <sup>19</sup> Puhl H, Waeg G, Esterbauer H. Methods to determine oxidation of low-density lipoproteins. *Method Enzymol* 1994; 233: 425–41.
- <sup>20</sup> Sobal G, Helmut S. Effect of simvastatin on the oxidation of native and modified lipoproteins. *Biochem Pharmacol* 2005; 70: 1185–91.

## Magnoflorine from *Coptidis Rhizoma* Protects High Density Lipoprotein during Oxidant Stress

Tran Manh HUNG,<sup>a</sup> Jong Pill LEE,<sup>d</sup> Byung Sun MIN,<sup>b</sup> Jae Sue CHOI,<sup>c</sup> MinKyun NA,<sup>a</sup> XinFeng ZHANG,<sup>a</sup> Tran Minh NGOC,<sup>a</sup> IkSoo LEE,<sup>a</sup> and KiHwan BAE<sup>\*,a</sup>

<sup>a</sup>College of Pharmacy, Chungnam National University; Daejeon 305–764, Korea; <sup>b</sup>College of Pharmacy, Catholic University of Daegu; Gyeongsan 712–702, Korea; <sup>c</sup>Faculty of Food Science and Biotechnology, Pukyong National University; Busan 608–737, Korea; and <sup>d</sup>Korea Food and Drug Administration; Seoul 122–704, Korea.

Received January 8, 2007; accepted March 6, 2007

The objective of the present study was to investigate the beneficial properties of magnoflorine, an alkaloid isolated from *Coptidis Rhizoma*, on protecting human high density lipoprotein (HDL) against lipid peroxidation. Magnoflorine exerts an inhibitory effect against Cu<sup>2+</sup>-induced lipid peroxidation of HDL, as showed by prolongation of lag time from 62 to 123 min at the concentration of 3.0 μM. It also inhibits the generation of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in the dose-dependent manners with IC<sub>50</sub> values of 2.3±0.2 μM and 6.2±0.5 μM since HDL oxidation mediated by either catalytic Cu<sup>2+</sup> or thermo-labile radical initiator (AAPH), respectively. Separately, Cu<sup>2+</sup> oxidized HDL lost the antioxidant action but the inclusion of magnoflorine/Cu<sup>2+</sup> oxidized HDL can protect LDL oxidation according to increasing magnoflorine concentration. The results suggest that magnoflorine may have a role to play in preventing the HDL oxidation.

**Key words** *Coptidis Rhizoma*; magnoflorine; cardiovascular disease; high density lipoprotein; antioxidant

Blood levels of high-density lipoprotein (HDL) are inversely associated with risk for coronary heart disease,<sup>1)</sup> the most common cause of death. Among the potential mechanisms by which HDL may exert its cardio-protective effect, much attention has recently focused upon its antioxidant function which protects low-density lipoprotein (LDL) from oxidative (*i.e.*, atherogenic) modification.<sup>2,3)</sup> Numerous prospective cohort studies have demonstrated the protective nature of an elevated level of HDL, and the high risk associated with low levels of this class of lipoprotein.<sup>4,5)</sup> The decrease in atherosclerosis associated with increased HDL levels in human apolipoprotein A-I (apoA-I) transgenic animals further illustrates the protective nature of HDL.<sup>6–8)</sup> HDL is susceptible to oxidation by a variety of pro-oxidants.<sup>9)</sup> During incubation with redox-active copper ions (Cu<sup>2+</sup>), HDL is found to undergo extensive lipid oxidation as indicated by a loss in polyunsaturated fatty acyl content and concurrent accumulation of lipid epoxides, lyso-phosphatidylcholine, and cholesterol oxidation products; thiobarbituric acid-reactive substances, a marker of lipid oxidation, similarly increase in HDL incubated with Cu<sup>2+</sup>.<sup>10,11)</sup> In general, oxidation of HDL is found to result in a loss of cardio-protective properties. For example, the antioxidant ability of HDL to protect LDL from atherogenic modification is lost upon Cu<sup>2+</sup>-mediated oxidation of HDL.<sup>12,13)</sup>

As a part of our screening program to find antioxidant compounds from natural sources, we have attempted to determine the human density lipoproteins oxidation inhibitory constituents of medicinal plants in Korea. *Coptidis Rhizoma* (root of *Coptis chinensis* FRANCH, Ranunculaceae) has been used to treat diabetes mellitus for more than 1000 years in the history of Chinese medicinal remedy. It has long been used for treating gastroenteritis, diarrhea, anti-tumor, and antimicrobial.<sup>14–17)</sup> *Coptidis Rhizoma* is currently used for several skin diseases including acne, neurodermatitis, skin ulcers,<sup>18)</sup> and dermatological indications.<sup>19)</sup> Moreover, *Coptidis Rhizoma* is prescribed as a crude drug in folk medicines,

such as Oren-gedoku-to and San'o-shashinto, for several vascular disorders. It was useful as an alternative therapy for hypercholesterolemia, effective in preventing hypercholesterolemic atherosclerosis and lowering the relative risk of coronary artery disease through decreases in lipid peroxidation and cholesterol levels.<sup>20)</sup> The alkaloids present in *Coptidis Rhizoma* (berberine, coptisine, jateorrhizine and palmatine...) were considered to be its active constituents.<sup>21,22)</sup> Among them, magnoflorine is a quaternary alkaloid with the isoquinoline skeleton. Magnoflorine was shown to suppress the induction phase of the cellular immune response,<sup>23)</sup> and assigned as noncytotoxic to various human cancer cell lines.<sup>24)</sup> The antioxidant activity of magnoflorine was investigated with respect to its structural feature and physico-chemical properties to inhibit free radical, peroxidation of dioleoyl phosphatidylcholine, and liposomes initiated by thermal degradation of the azoinitiator (AAPH).<sup>25)</sup> However, no studies have been specifically investigated the ability of this antioxidant to protect human density lipoprotein from oxidation. In this study, we examined the susceptibility of HDL to *in vitro* Cu<sup>2+</sup> and AAPH induced lipid peroxidation in the presence of magnoflorine. Also, the study of magnoflorine/Cu<sup>2+</sup> oxidized HDL in preventing LDL oxidation was used to investigate whether the inclusion protects LDL from oxidative modification.

### MATERIALS AND METHODS

**Plant Material** The root of *Coptis chinensis* FRANCH (*Coptidis Rhizoma*) was purchased from a local market in Daejeon, Korea in June 2006, and was identified by Prof. Ki-Hwan Bae. A voucher specimen (CNU 1286) was deposited in the herbarium of the College of Pharmacy, Chungnam University.

**Extraction and Isolation** Dried plant material (6.0 kg) was extracted with hot MeOH, refluxed for 3 h (31×3 times) to yield a methanolic extract (320 g). The extract was sus-

\* To whom correspondence should be addressed. e-mail: baekh@cnu.ac.kr

pended in H<sub>2</sub>O and then partitioned with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and EtOAc. The aqueous layer was subjected to Diaion column chromatography and eluted with a stepwise gradient of H<sub>2</sub>O and MeOH (H<sub>2</sub>O→40% MeOH, 40→60% MeOH, and 60→100% MeOH) to give three subfractions (F1–F3). The subfraction F2 (35 g) was continually separated by MCI gel CHP20P column chromatography using H<sub>2</sub>O and MeOH gradient (H<sub>2</sub>O→30% MeOH, 35→80% MeOH) to give F2.1 (20 g) and F2.2 (6 g). F2.2 was re-subjected to MCI gel CHP20 column chromatography using 2% AcOH–MeOH (1 : 1), magnoflorine (15.5 mg) was obtained by crystallization in MeOH from the collected subfraction F2.2.3.

**Magnoflorine:** Colorless crystal, mp 210–212 °C; IR  $\nu_{\max}$  (KBr) 3400 (OH), 1645, 1640 (aromatic ring) cm<sup>-1</sup>; UV,  $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$  230, 280, 323 nm; FAB-MS  $m/z$  343 [M+H]<sup>+</sup>, C<sub>20</sub>H<sub>24</sub>NO<sub>4</sub>. <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR spectral data were in accordance with published paper.<sup>23,24)</sup>

**HDL and LDL Preparation** Blood from healthy normolipemic donors was obtained by venipuncture and collected in EDTA-containing vacutainer tubes. LDL was prepared from plasma by sequential flotation ultracentrifugation as described previously.<sup>26)</sup> To isolate HDL, plasma was prepared by centrifugation at 3000 rpm for 10 min and thereafter used for the preparation of plasma lipoproteins. HDL was isolated from plasma by ultracentrifugation for 1:30 h with a vertical rotor.<sup>27)</sup> After dialysis at 4 °C for 24 h against 10 mM phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.4, HDL protein concentration ( $\mu\text{g}$  protein/ml) was determined as described by Lowry *et al.*<sup>28)</sup>

**Cu<sup>2+</sup> Mediated HDL Oxidation** The oxidation of HDL was assessed by the formation of conjugated dienes determined as the change in UV absorbance at 232 nm. Briefly, HDL (200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) in PBS (pH 7.4) was pre-incubated with either the absence (control) or presence of magnoflorine (various concentrations), and then Cu<sup>2+</sup> (5  $\mu\text{M}$ ) was added to initiate the oxidation at 37 °C. Absorbance at 232 nm was continuously monitored at 10 min intervals for 5 h at 37 °C using a spectrophotometer (Shimadzu UV-1240, Tokyo, Japan). The lag time was measured as the intercept between the baseline and the tangent of the absorbance curve during the propagation phase.<sup>29,30)</sup> The oxidation of HDL to malondialdehyde (MDA) was measured using the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) assay. Briefly, HDL (200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) in PBS (pH 7.4) was pre-incubated with magnoflorine, and then Cu<sup>2+</sup> was added to initiate the oxidation. The reaction mixture was incubated at 37 °C for 2 h and the reaction was terminated by adding 20% trichloroacetic acid (TCA) and 1% thiobarbituric acid (TBA). After boiling at 95 °C for 15 min, the mixture was centrifuged at 10000 rpm for 10 min. The absorbance of supernatant was measured at 532 nm.

**Peroxy Radicals Mediated HDL Oxidation** Oxidation of HDL by peroxy radicals was performed by incubation of the HDL (200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) at 37 °C in PBS (pH 7.4) with one of the thermo-labile radical initiator (AAPH) for 2 h. AAPH (10 mM) served as a source of hydrophilic peroxy radicals.<sup>31)</sup> At the end of the incubation, samples were also assessed by measuring accumulation of lipid aldehydes (TBARS) as described above.

**Effect of Magnoflorine/Cu<sup>2+</sup> Oxidized HDL in LDL Oxidation** HDL (1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) was pre-incubated with Cu<sup>2+</sup> (5  $\mu\text{M}$ ) for 1 h in the presence or absence of mag-

noflorine (0–10  $\mu\text{M}$ ) in PBS buffer (10 mM, pH 7.4) at 4 °C. Native HDL or oxidized HDL (0.1 mg/ml) was incubated with LDL (0.1 mg/ml) in the presence of Cu<sup>2+</sup> (0.5  $\mu\text{M}$ ) at 37 °C, and 3 h later, the lipid oxidation was assessed by the measurement of peroxide values as described previously.<sup>32)</sup> The inhibition of LDL oxidation by HDL under these conditions was calculated according to the formular:

$$\text{inhibition of LDL oxidation (\%)} \\ = [(A_{\text{HDL}} + A_{\text{LDL}}) - A_{\text{HDL+LDL}}] \times 100 / (A_{\text{HDL}} + A_{\text{LDL}})$$

Where ( $A_{\text{HDL}} + A_{\text{LDL}}$ ) is the sum of the absorbances observed for HDL and LDL incubated separately with Cu<sup>2+</sup> for 3 h, and  $A_{\text{HDL+LDL}}$  is the absorbance observed during co-incubation of LDL with HDL and Cu<sup>2+</sup> for 3 h.

**Statistical Analysis** The results are expressed as mean values  $\pm$  S.D. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA. A  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

## RESULTS AND DISCUSSION

Numerous studies have found that HDL is readily modified using a variety of oxidants *in vitro*. These include transition metal ions, aqueous peroxy and hydroxyl radicals, aldehydes, peroxidase-generated tyrosyl radical, cigarette smoke, lipoxygenase, hypochlorous acid, cultured endothelial cell, and macrophages.<sup>9,33)</sup> As part of an ongoing study to search for antioxidants from traditional medicine plants, we have focused on the water layer of *Coptidis Rhizoma* with the expectation that we could find out more anti-lipid peroxidation agents. Repeated column chromatography led to the isolation of a colorless crystal compound. This compound was identified as magnoflorine by analyses of MS, NMR data, and comparison with those in the literature (Fig. 1).<sup>23)</sup>

Since the formation of conjugated dienes represents the initiate phase of HDL oxidation, the extent of lag time is indicated as oxidation resistant capacity of HDL. As shown in Fig. 2, spectrophotometric analysis of Cu<sup>2+</sup>-induce HDL oxidation based on the conjugated dienes formation due to the unsaturated lipids is presented. When the HDL was incubated with Cu<sup>2+</sup> alone, the lag time was 62 min, whereas, in the presence of magnoflorine (3.0  $\mu\text{M}$ ), the lag phase was retarded to 123 min. In this experiment, the lag phases of vitamin C (3.0  $\mu\text{M}$ ) and vitamin E (3.0  $\mu\text{M}$ ) retarded to 97 and 145 min, respectively (Table 1).

The oxidation of HDL initiated by Cu<sup>2+</sup> and thermo-labile radical initiator AAPH was also measured by the formation of malondialdehyde (MDA) using the TBARS assay. As shown in Table 1, the compound tested remarkably reduced the formation of TBARS, comparable to the results of conjugated diene formation. Magnoflorine exhibited significant

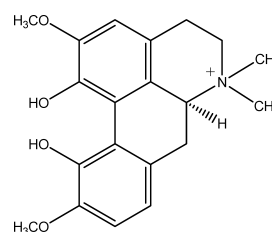


Fig. 1. Magnoflorine Structure

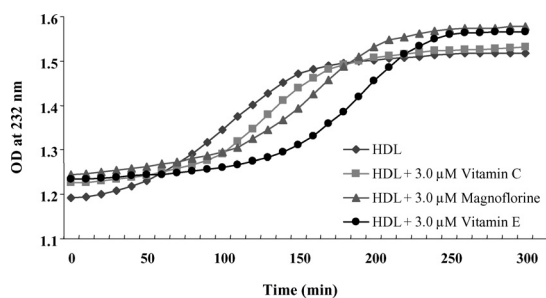


Fig. 2. Conjugated Diene Effect of Magnoflorine on the  $\text{Cu}^{2+}$ -Mediated HDL Oxidation

HDL (200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) in PBS (pH 7.4) was pre-incubated with vitamin C (3.0  $\mu\text{M}$ ), vitamin E (3.0  $\mu\text{M}$ ) or magnoflorine (3.0  $\mu\text{M}$ ), and then  $\text{Cu}^{2+}$  (5  $\mu\text{M}$ ) was added to initiate the oxidation at 37  $^{\circ}\text{C}$ . Conjugated diene was measured by determined the absorbance at 232 nm continuously at 10 min intervals for 5 h at 37  $^{\circ}\text{C}$ .

Table 1. Effect of Magnoflorine on the Oxidation of HDL by TBARS Method

Compound	Lag time (min) <sup>a)</sup>	TBARS, $\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ ) <sup>b)</sup>	
		$\text{Cu}^{2+}$ -mediated	AAPH-mediated
Magnoflorine	123	$2.3 \pm 0.2^{* \dagger}$	$6.2 \pm 0.5^{* \dagger}$
Vitamin C <sup>c)</sup>	97	$10.5 \pm 0.8$	$18.7 \pm 1.5$
Vitamin E <sup>c)</sup>	145	$1.8 \pm 0.2$	$4.4 \pm 0.5$

a) The lag time of blank was estimated to be 52 min, b) the values represent mean  $\pm$  S.D. of triplicate experiments, c) compound used as positive control; \*  $p < 0.05$  vs. vitamin C,  $\dagger p < 0.05$  vs. vitamin E.

inhibitory activity against  $\text{Cu}^{2+}$ - and AAPH mediated HDL oxidation in the dose dependent manners entirely with  $\text{IC}_{50}$  values of  $2.3 \pm 0.2$  and  $6.2 \pm 0.5$   $\mu\text{M}$ , respectively. Vitamin C showed inhibitory activity with  $\text{IC}_{50}$  values of  $10.5 \pm 0.8$   $\mu\text{M}$  and  $18.7 \pm 1.5$   $\mu\text{M}$ , meanwhile, vitamin E showed inhibitory activity with  $\text{IC}_{50}$  values of  $1.8 \pm 0.2$   $\mu\text{M}$  and  $4.4 \pm 0.5$   $\mu\text{M}$ , under  $\text{Cu}^{2+}$  and AAPH mediated oxidation.

The effective action of magnoflorine on the ability of HDL to protect LDL from  $\text{Cu}^{2+}$  (0.5  $\mu\text{M}$ )-mediated oxidation was evaluated by the measurement of the peroxide value. As showed in Fig. 3, the oxidized HDL (HDL-0), which was prepared from exposure of HDL to  $\text{Cu}^{2+}$  (5  $\mu\text{M}$ ) in the absence of magnoflorine, expressed a slight protection (28.5%), while native HDL was highly effective (68.8%) in protecting LDL from the oxidation. The inclusion of magnoflorine/ $\text{Cu}^{2+}$  oxidized HDL preparations (HDL-1.0, -2.0, -5.0, -10.0) decreased lipid oxidation of LDL progressively with increasing concentration of magnoflorine (1.0, 2.0, 5.0, 10.0  $\mu\text{M}$ ). It is suggested that the ability of magnoflorine/ $\text{Cu}^{2+}$  oxidized HDL in preventing LDL oxidation maybe related to the oxidation state of HDL after pre-incubation.

Oxidative modifications that would affect the capability of HDL to protect against atherosclerosis are of considerable importance and interest. The exact beneficial effects of HDL *in vivo* remain unknown. HDL may also be protective by inhibiting the oxidation of LDL, and by neutralizing the atherogenic effects of oxidized LDL.<sup>9)</sup> However, certain forms of oxidized HDL may actually enhance protection by stimulating the delivery of intracellular cholesterol to cell surface sites where it becomes available for removal by other (non-oxidized) HDL particles.<sup>10)</sup> Lipid oxidation in HDL is promoted by a variety of factors. In this study, we used  $\text{Cu}^{2+}$ ,

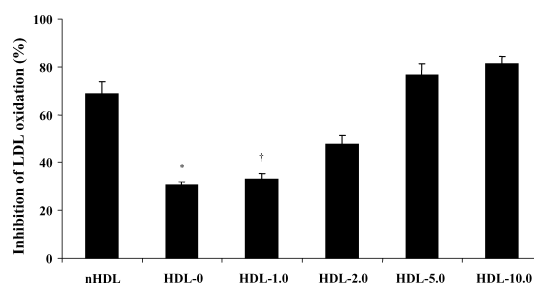


Fig. 3. Effect of Magnoflorine/ $\text{Cu}^{2+}$  Oxidized HDL in LDL Oxidation

After 3 h incubation, an aliquot was taken for the assay of lipid peroxidation, based on the measurement of the peroxide values. nHDL is native HDL. HDL-0, -1.0, -2.0, -5.0, and -10.0 indicate the HDL oxidized with  $\text{Cu}^{2+}$  in the presence of magnoflorine at 0, 1.0, 2.0, 5.0, and 10.0  $\mu\text{M}$ , respectively. \*  $p < 0.05$  vs. nHDL,  $\dagger p < 0.05$  vs. HDL-0.

a metal ion-independent oxidant, and AAPH, a hydrophilic peroxy radicals as the activation sources. That is consistent with those of numerous other investigators who reported that lipids in HDL are highly susceptible to oxidation during incubation with  $\text{Cu}^{2+}$  and AAPH.<sup>13,27,31)</sup> Although there have been a number of reports on the designing and development of synthetic lipid peroxidation inhibitors, that were necessary for those other studies, which have been reported the HDL oxidation inhibitors derived from medicinal plants.<sup>27,30)</sup> Specially, boldine, an antioxidant alkaloid isolated from *Peumus boldus*, which has similar chemical structure with magnoflorine, has been well established to have free radical scavenger, prevents the oxidation of LDL *in vitro* and *in vivo*.<sup>34)</sup>

Our results clearly demonstrate that magnoflorine significantly inhibits lipid oxidation in HDL exposed to a metal ion-independent form and peroxy radicals mediated of oxidant stress. Magnoflorine, even at low concentration (3.0  $\mu\text{M}$ ) could exert a protective effect against  $\text{Cu}^{2+}$  induced lipid peroxidation of HDL, as showed by decrease the lag time of conjugated diene process. Interestingly, magnoflorine is more effective than vitamin C but less than vitamin E by retarding lag phase (Fig. 2), and further evidence by TBARS method (Table 1). Since magnoflorine was a more effective antioxidant in the metal-dependent pro-oxidant system (2.3  $\mu\text{M}$ ) compared to the peroxy radical system (6.2  $\mu\text{M}$ ), metal ion chelating properties may underlie magnoflorin's apparent antioxidant effects towards HDL oxidation *in vitro*. In addition, HDL has been recognized to have antioxidant action to protect LDL from oxidative modification, this might be supported by present finding that the oxidized HDL, prepared from the exposure of HDL to  $\text{Cu}^{2+}$  in combination with magnoflorine, exerted an antioxidant action against LDL oxidation.

The antioxidant effect of magnoflorine is due to its chemical structure. Magnoflorine is an alkaloid bearing two free phenolic groups. The presence of aromatic-OH group may be responsible for their antioxidant efficiency, similarly to phenolic antioxidants,<sup>35)</sup> *via* chain-breaking mechanism by donation of phenolic hydrogen. Moreover, magnoflorine showed a lower value of O-H bond dissociation energy, and highest occupied molecular orbital surroundings of the reaction center, which have been identified as important requisites for both chelating and radical scavenging activity and explaining the higher antioxidant efficiency of the former compound.<sup>25)</sup>

The hypothesis that *Coptidis Rhizoma* would be useful as an alternative therapy for hypercholesterolemia, thus, mag-

nofflorine and some other constituents are able to play an important role on reducing oxidative stress, prevent the development and progression of atherosclerotic disease. In summary, our results demonstrate that magnoflorine could inhibit lipid oxidation in HDL but the cardioprotective ability of this lipoprotein fraction in combination with magnoflorine to prevent atherogenic modification of LDL should be more preserved.

**Acknowledgements** This work was supported by a grant funded from the Korean Food and Drug Administration (2007).

## REFERENCES

- 1) National Heart, Lung, and Blood Institute, Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III): Final Report, National Institutes of Health (2002).
- 2) Nofer J. R., Kehrel B., Fobker M., Levkau B., Assmann G., von Eckardstein A., *Atherosclerosis*, **161**, 1—16 (2002).
- 3) Assmann G., Nofer J. R., *Annu. Rev. Med.*, **54**, 321—341 (2003).
- 4) Stampfer M. J., Sacks M. D., Salvini S., Willett S. C., Hennekens C. H., *New Engl. J. Med.*, **325**, 373—381 (1991).
- 5) Rubins H. B., Robins S. J., Iwane M. K., Boden W. E., Elam M. B., Fye C. L., Gordon D. J., Schaefer E. J., Schectman G., Wittes J. T., *Am. J. Cardiol.*, **71**, 45—52 (1993).
- 6) Rubin E. M., Krauss R. M., Spangler E. A., Verstuyft J. G., Clift S. M., *Nature* (London), **353**, 265—267 (1991).
- 7) Paszty C., Maeda N., Verstuyft J., Rubin E. M., *J. Clin. Invest.*, **94**, 899—903 (1994).
- 8) Plump A. S., Scott C. J., Breslow J. L., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **91**, 9607—9611 (1994).
- 9) Francis G. A., *Biochim. Biophys. Acta*, **1483**, 217—235 (2000).
- 10) Nagano Y., Arai H., Kita T., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **88**, 6457—6461 (1991).
- 11) Parthasarathy S., Barnett J., Fong L. G., *Biochim. Biophys. Acta*, **1044**, 275—283 (1990).
- 12) Jaouad L., Milochevitch C., Khalil A., *Free Radic. Res.*, **37**, 77—83 (2003).
- 13) Hillstrom R. J., Yacopin-Ammons A. K., Lynch S. M., *J. Nutr.*, **133**, 3047—3051 (2003).
- 14) Iizuka N., Miyamoto K., Hazama S., Yoshino S., Yoshimura K., Okita K., Fukumoto T., Yamamoto S., Tangoku A., Oka M., *Cancer Lett.*, **158**, 35—41 (2000).
- 15) Lee D. U., Kang Y. J., Park M. K., Lee Y. S., Seo H. G., Kim T. S., Kim C. H., Chang K. C., *Life Sci.*, **73**, 1401—1412 (2003).
- 16) Hwang B. Y., Roberts S. K., Chadwick L. R., Wu C. D., Kinghorn A. D., *Planta Med.*, **69**, 623—627 (2003).
- 17) Yu H. H., Kim K. J., Cha J. D., Kim H. K., Lee Y. E., Choi N. Y., You Y. O., *J. Med. Food*, **8**, 454—461 (2005).
- 18) Higaki S., Nakamura M., Morohashi M., Hasegawa Y., Yamagishi T., *J. Dermatol.*, **23**, 871—875 (1996).
- 19) Nam C., Kim S., Sim Y., Chang I., *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.*, **16**, 84—90 (2003).
- 20) Yokozawa T., Ishida A., Cho E. J., Nakagawa T., *Phytomedicine*, **10**, 17—22 (2003).
- 21) Otsuka H., Tsukui M., Matsuoka T., Goto M., Fujimura H., Hiramatsu Y., Sawada T., *Yakugaku Zasshi*, **94**, 796—801 (1974).
- 22) Peng W. H., Haieh M. T., Wu C. R., *Jpn. J. Pharmacol.*, **74**, 261—266 (1997).
- 23) Mori H., Fuchigami M., Inoue N., Nagai H., Koda A., Nishioka I., *Planta Med.*, **60**, 445—449 (1994).
- 24) Min Y. D., Choi S. U., Lee K. R., *Arch. Pharm. Res.*, **29**, 627—632 (2006).
- 25) Račková L., Májeková M., Košťálová D., Štefek M., *Bioorg. Med. Chem.*, **12**, 4709—4715 (2004).
- 26) Hung T. M., Na M. K., Thuong P. T., Su. D., Sok D. E., Song K. S., Seong Y. H., Bae K., *J. Ethnopharmacol.*, **108**, 188—192 (2006).
- 27) Ferretti G., Bacchetti T., Menanno F., Curatola G., *Atherosclerosis*, **172**, 55—61 (2004).
- 28) Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall P. J., *J. Biol. Chem.*, **193**, 265—275 (1951).
- 29) Puhl H., Waeg G., Esterbauer H., *Methods Enzymol.*, **233**, 425—441 (1994).
- 30) Sobal G., Sinzinger H., *Biochem. Pharmacol.*, **70**, 1185—1191 (2005).
- 31) Calla M. S., Lynch S. M., *Arch. Biochem. Biophys.*, **452**, 129—137 (2006).
- 32) Raveh O., Pinchuk I., Schnitzer E., Fainaru M., Schaffer Z., Lichtenberg D., *Free Radic. Biol. Med.*, **29**, 131—146 (2000).
- 33) Steinberg D., *J. Biol. Chem.*, **272**, 20963—20966 (1997).
- 34) Santanam N., Penumetcha M., Speisky H., Parthasarathy S., *Atherosclerosis*, **173**, 203—210 (2004).
- 35) Bors W., Heller W., Michel C., Saran M., *Methods Enzymol.*, **186**, 343—355 (1990).

## Quantitative Determination of Protoberberines from the Roots of *Coptis chinensis*

Byung-Sun Min\* and Jae Sue Cho<sup>1</sup>

College of Pharmacy, Catholic University of Daegu, Gyeongbuk 712-702, Korea

<sup>1</sup>Faculty of Food Science and Biotechnology, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

**Abstract** – A simple reversed phase HPLC method was developed for extracting pharmacologically active compounds coptisine, palmatine, berberine, and epiberberine from the roots of *Coptis chinensis* using a binary gradient of acetonitrile : 10 mM hexanesulfonic acid-Na monohydrate with UV detection at 254 nm. The coptisine (**1**), palmatine (**2**), berberine (**3**), and epiberberine (**4**) contents of the roots of *C. chinensis* collected from sixteen district markets in Korea and China were 6.79 ~ 24.63 µg/g, 5.40 ~ 20.75 µg/g, 21.40 ~ 81.21 µg/g, and 3.45 ~ 12.04 µg/g, respectively.

**Keywords** – *Coptis chinensis*, HPLC, coptisine, palmatine, berberine, epiberberine

### Introduction

The rhizome of *Coptis chinensis* Franch. (Ranunculaceae) is a traditional Chinese medicine with anti-inflammatory, anti-bacterial, analgesic and stomachic activities (Park *et al.*, 2005), and has been used to treat anxiety, antibacterial, antihypertensive and CNS depressant (Cho *et al.*, 2000; Min *et al.*, 2006). In the previous studies, the rhizomes of this plant are composed mainly of alkaloids, phenolic compounds, lignans, coumarinolignans and sesquillignan (Yahara *et al.*, 1985; Cho *et al.*, 2000; Min *et al.*, 2006). The MeOH extract of this plant exhibited inhibitory activity of the morphine-induced conditioned place preference through the regulation of *c-fos* expression in the mouse brain (Lee *et al.*, 2003). Protoberberine alkaloids isolated from the rhizome of *C. japonica* inhibit the catecholamine biosynthesis in PC12 cells (Lee and Kim, 1996). The berberine have been reported to have antifungal activity tested against *Candida tropicalis* (resistant to nyastin, miconazole, and econazole) (Slobodnikova *et al.*, 2004), anti-inflammatory activity (Ivanovska and Philipov, 1996), anti-diabetic effect related to the property of stimulating insulin secretion and modulating lipids (Yang and Wang, 2003), and hepatoprotective activity (Tsai and Tsai, 2004; Wang *et al.*, 2004). It was previously reported that the 8-oxocoptisine showed significant P-gp multidrug resistance inhibitory activity (Min *et al.*, 2006) and coptisine inhibited MAO-A activity

in the mouse whole brain (Ro *et al.*, 2001). The biological effect of neolignan woorenosides have been demonstrated *in vitro* anti-inflammatory activity (Cho *et al.*, 2000). *C. chinensis* contains numerous protoberberine alkaloids such as berberine, magnoflorine, coptisine, palmatine, worenine and epiberberine (Min *et al.*, 2006). This study quantified the levels of coptisine, palmatine, berberine and epiberberine from the roots of *C. chinensis* collected from the district markets in Korea and China.

### Experimental

**General** – The chromatographic system for quantitative analysis consisted of a 306 pump (Gilson, USA), 811C dynamic mixer (Gilson, USA), UV/VIS-156 detector (Gilson, USA), 231 XL sample injector (Gilson, USA), and GILSON UniPoint data processor (Gilson, USA). Separation was performed using an Agilent Eclipse XD8-C18 (Agilent Technologies, USA; 5 µm, 4.6 × 150 mm). Methanol (Burdick & Jackson, USA) and acetonitrile (Burdick & Jackson, USA) used in this work were of HPLC grade and other reagents were of analytical grade. Milli-Q (Millipore, MA, USA) treated water (with resistivity more than 17.5 MΩ cm) was used throughout the experiments. Hexansulfonic acid-Na monohydrate was purchased from Sigma Chemicals (St. Louis, MO, USA).

**Plant material** – The roots of *C. chinensis* were purchased from oriental medicinal markets, such as, CDU-1 (Hwaseung-sa, Daegu, Korea, cultured in China), CDU-2 (Hyunjin-sa, Daegu, Korea, cultured in China), CDU-3 (Kyungsan-mart, Daegu, Korea, cultured in

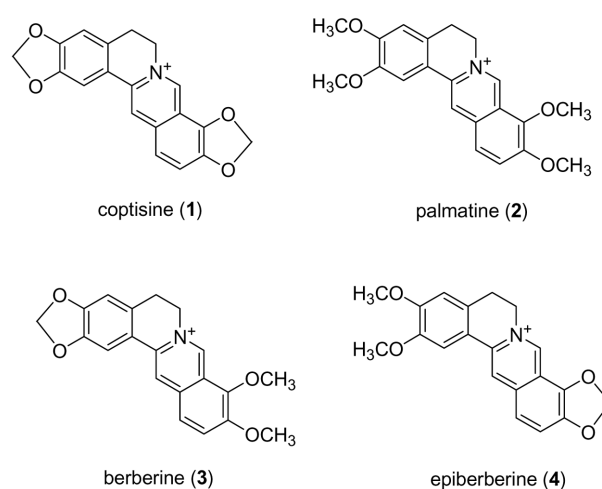


China), CDU-4 (Hobuk-mart, Hobuk-sung, China, cultured in China), CDU-5 (Kwangsu-mart, Kwangsu-sung, China, cultured in China), CDU-6 (Joongdo-hospital, Daejeon, Korea, cultured in China), CDU-7 (Baegje Co., Daejeon, Korea, cultured in China), CDU-8 (Kyungdong Co., Daejeon, Korea, cultured in China), CDU-9 (Kyungdong-mart, Seoul, Korea, cultured in China), CDU-10 (Byungin Co., Seoul, Korea, cultured in China), CDU-11 (Kyungshin Co., Yeongchun, Korea, cultured in China), CDU-12 (Yeongchun-mart1, Yeongchun, Korea, cultured in China), CDU-13 (Yeongchun-mart2, Yeongchun, Korea, cultured in China), CDU-14 (Sehwa-dang, Kwangju, Korea, cultured in China), CDU-15 (Kwangduk Co., Kwangju, Korea, cultured in China), and CDU-16 (Johwa Co., Kwangju, Korea, cultured in China). All of plant materials identified by Prof. KiHwan Bae, Chungnam National University, Korea and voucher specimens have been deposited at the Herbarium of College of Pharmacy, Catholic University of Daegu, Korea.

**Isolation of standard compounds** – The roots (10 kg) of *C. chinensis* were refluxed with MeOH for three hours (3 × 20 L). The total filtrate was concentrated to dryness in vacuum at 40 °C in order to render the MeOH extract (2.2 kg) and this extract was suspended in 10% MeOH and sequentially partitioned with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (230 g) and BuOH (1100 g), and H<sub>2</sub>O (840 g) in sequence. The BuOH-soluble fraction (1100 g) was chromatographed over Si gel, MCI-CHP20, and Sephadex LH20 columns using CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH under gradient conditions to yield coptisine (1), palmatine (2) and berberine (3). The aqueous layer (840 g) was chromatographed on MCI-CHP20 and Sephadex LH-20 gel to isolate epiberberine (4).

**Coptisine (1)** – yellow amorphous powder; UV  $\lambda_{\max}$  (MeOH): 226, 239, 264, 356; <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 9.71 (1H, s, H-8), 8.71 (1H, s, H-13), 7.87 (1H, d,  $J$  = 8.3 Hz, H-11), 7.83 (1H, d,  $J$  = 8.0 Hz, H-12), 7.63 (1H, s, H-1), 6.84 (1H, s, H-4), 6.45 (2H, s, OCH<sub>2</sub>O), 6.09 (2H, s, OCH<sub>2</sub>O), 4.89 (2H, m, H-6), 3.23 (2H, m, H-5); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 151.0 (C-10), 148.8 (C-3), 148.1 (C-2), 144.6 (C-8), 144.1 (C-9), 137.8 (C-13a), 133.2 (C-12a), 130.6 (C-4a), 121.9 (C-12), 121.6 (C-13b), 120.7 (C-11), 112.5 (C-8a), 108.2 (C-4), 105.3 (C-1), 105.0 (OCH<sub>2</sub>O), 102.5 (OCH<sub>2</sub>O), 56.0 (C-6), 27.0 (C-5).

**Palmatine (2)** – yellow amorphous powder; mp, 208 °C; UV  $\lambda_{\max}$  (EtOH): 228, 240, 268, 276, 343, 350, 433; <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 9.78 (1H, s, H-8), 8.88 (1H, s, H-13), 8.10 (1H, d,  $J$  = 8.0 Hz, H-11), 8.00 (1H, d,  $J$  = 8.0 Hz, H-12), 7.63 (1H, s, H-1), 7.03 (1H, s, H-4), 4.87 (2H, m, H-6), 4.19 (3H, s, 9-OCH<sub>3</sub>), 4.08 (3H,



**Fig. 1.** Structure of coptisine (1), palmatine (2), berberine (3) and epiberberine (4) isolated from *C. chinensis*.

s, 10-OCH<sub>3</sub>), 3.97 (3H, s, 2-OCH<sub>3</sub>), 3.92 (3H, s, 3-OCH<sub>3</sub>), 3.52 (2H, m, H-5); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 152.6 (C-3), 150.7 (C-10), 149.7 (C-2), 145.2 (C-8), 144.5 (C-9), 138.6 (C-13a), 134.0 (C-12a), 128.9 (C-4a), 126.8 (C-12), 123.3 (C-11), 122.1 (C-13b), 120.1 (C-13), 119.3 (C-8a), 111.0 (C-4), 108.7 (C-1), 61.3 (C-9, OCH<sub>3</sub>), 56.4 (C-10, OCH<sub>3</sub>), 56.1 (C-2, OCH<sub>3</sub>), 55.8 (C-3, OCH<sub>3</sub>), 55.4 (C-6), 26.6 (C-5); LC-ESI-MS/MS  $m/z$ : 352 [M]<sup>+</sup>.

**Berberine (3)** – yellow amorphous powder; mp, 158–160 °C; UV  $\lambda_{\max}$  (EtOH): 230, 266, 352, 432; <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 9.75 (1H, s, H-8), 8.69 (1H, s, H-13), 8.10 (1H, d,  $J$  = 8.3 Hz, H-11), 7.98 (1H, d,  $J$  = 8.4 Hz, H-12), 7.64 (1H, s, H-1), 6.94 (1H, s, H-4), 6.09 (2H, s, OCH<sub>2</sub>O), 4.91 (2H, t,  $J$  = 6.4 Hz, H-6), 4.18 (3H, s, 9-OCH<sub>3</sub>), 4.09 (3H, s, 10-OCH<sub>3</sub>), 3.24 (2H, t,  $J$  = 6.4 Hz, H-5); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 151.0 (C-10), 150.8 (C-3), 148.7 (C-2), 144.6 (C-9), 145.2 (C-8), 138.5 (C-13a), 134.0 (C-12a), 130.7 (C-4a), 126.8 (C-11), 123.3 (C-12), 122.1 (C-8a), 120.7 (C-13b), 120.3 (C-13), 108.2 (C-4), 105.3 (C-1), 102.5 (OCH<sub>2</sub>O), 61.3 (C-9, OCH<sub>3</sub>), 56.4 (C-10, OCH<sub>3</sub>), 56.0 (C-6), 27.0 (C-5).

**Epiberberine (4)** – yellow amorphous powder; mp, 260 °C; UV  $\lambda_{\max}$  (EtOH): 227, 245, 268, 361; <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 9.70 (1H, s, H-8), 8.81 (1H, s, H-13), 7.88 (1H, d,  $J$  = 8.0 Hz, H-11), 7.83 (1H, d,  $J$  = 8.0 Hz, H-12), 7.63 (1H, s, H-1), 7.03 (1H, s, H-4), 6.45 (2H, s, OCH<sub>2</sub>O), 4.88 (2H, m, H-6), 3.97 (3H, s, 2-OCH<sub>3</sub>), 3.92 (3H, s, 3-OCH<sub>3</sub>), 3.26 (2H, m, H-5); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 152.6 (C-3), 149.7 (C-2), 147.9 (C-10), 144.5 (C-9), 144.1 (C-8), 137.9 (C-13a), 133.3 (C-12a), 128.7 (C-4a), 121.8 (C-12), 121.1 (C-11), 121.0 (C-13), 119.3 (C-13b), 112.5 (C-8a), 111.0 (C-4), 108.5 (C-1),

104.9 (OCH<sub>2</sub>O), 56.2 (C-6), 55.8 (C-2, OCH<sub>3</sub>), 55.5 (C-3, OCH<sub>3</sub>), 26.5 (C-5).

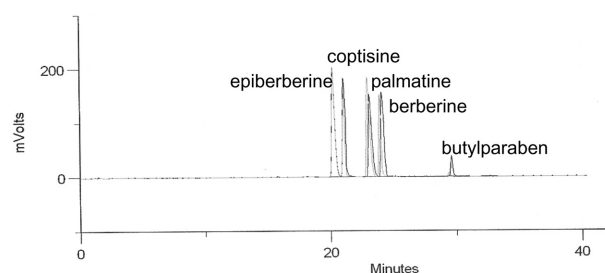
**Preparation of test sample** – Air-dried roots (500 mg) was finely powdered and refluxed with 40 mL 70% MeOH (+ 1% HCl) for 2 hours, and filtered using filter paper. The methanol extracts were evaporated to dryness in vacuum. The residue was dissolved in 90 mL 70% MeOH and 10 mL 0.002% butylparaben (70% methanol solution). The crude extract then filtered with a 0.45 µm pore size and a 10 µL sample subjected to HPLC analysis.

**HPLC analysis** – Method for protoberberine alkaloids analysis was modified from those previously described (Feng *et al.*, 2005) by using a reverse phase system (Hypersil C-18, 5 µm, 4.6 × 250 mm i.d.). Elution was initially with acetonitrile-10 mM hexanesulfonic acid-Na monohydrate (15 : 85), which was changed according to linear gradient over 40 min to acetonitrile-10 mM hexanesulfonic acid-Na monohydrate (80 : 20). The flow rate was 1 mL/min, and 10 µL aliquots of samples were injected for analysis and UV detection was carried out at 254 nm.

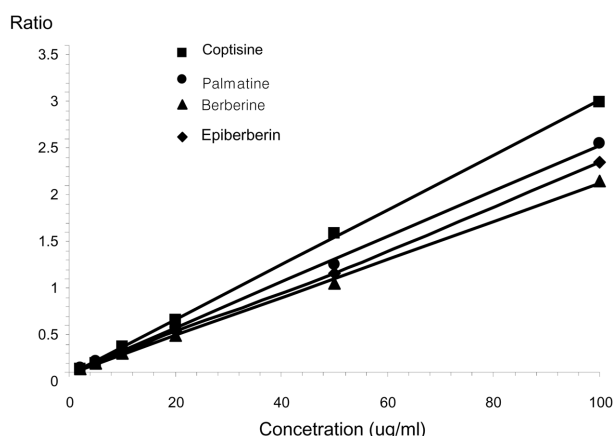
**Calibration** – Stock solutions (2 mg/mL) of coptisine (1), palmatine (2), berberine (3) and epiberberine (4) isolated from *C. chinensis* were prepared individually in methanol, and different concentrations (2, 5, 10, 25, 50, 100 µg/mL) of these were loaded onto an HPLC for the preparation of the calibration functions. The calibration function of coptisine, palmatine, berberine and epiberberine calculated with peak area (*y*), concentration (*x*, mg/mL), and mean values (*n* = 5) ± standard deviation.

## Results and Discussion

The optimal mobile phase composition for the analysis of coptisine (1), palmatine (2), berberine (3) and epiberberine (4) from the 70% MeOH (+ 1% HCl) extracts of the roots of *C. chinensis* was selected by performing several HPLC runs with various concentrations of acetonitrile in 10 mM hexanesulfonic acid-Na monohydrate as a mobile phase. A solution of the initial 15% acetonitrile in 10 mM hexanesulfonic acid-Na monohydrate, which was changed gradually over 40 min to 80% acetonitrile, was selected as the mobile phase. The HPLC peaks of the coptisine (1), palmatine (2), berberine (3) and epiberberine (4) contained in each roots of *C. chinensis* were verified using the standard reference material. The chromatographic system used produced symmetrical peaks with a baseline resolution for coptisine, palmatine, berberine and epiberberine using a simple gradient profile (Lee *et al.*, 2004). Butylparaben was used as an internal



**Fig. 2.** HPLC chromatogram of coptisine (1), palmatine (2), berberine (3) and epiberberine (4) isolated from *C. chinensis*.



**Fig. 3.** Calibration curve of coptisine, palmatine, berberine and epiberberine.

standard. The retention time of coptisine (1), palmatine (2), berberine (3), epiberberine (4) and butylparaben were 20.17, 21.04, 23.10, 24.08 and 29.62 min, respectively (Fig. 2). The correlation coefficients of each calibration curve of coptisine (1), palmatine (2), berberine (3) and epiberberine (4) were 0.9994, 0.9992, 0.9987 and 0.9994, respectively (Table 1, Fig. 3). Under the above HPLC condition the detection limit of compounds were 0.25 µg/mL (UV<sub>254</sub> nm).

The performance of the expressed method was tested by applying it to a simultaneous assay of coptisine (1), palmatine (2), berberine (3) and epiberberine (4) in the roots of *C. chinensis* obtained from the sixteen of oriental medicinal markets in Korea and China. The test samples were prepared as described previously and injected in duplicate (Li and Wang, 2004). The results are summarized in Table 2. It was found that the protoberberine alkaloid contents of the herbal samples were quite different. Berberine (3) is the major compound in the roots of *C. chinensis*. Of these roots of *C. chinensis*, the sample from Hobuk-mart (CDU-4) in China had the highest alkaloids contents (coptisine, 24.63 ± 4.11 µg/g; palmatine, 20.75 ± 4.38 µg/g; berberine, 81.16 ± 11.59 µg/g; epiberberine,

**Table 1.** Calibration graphs, linear ranges, LOD and LOQ of coptisine (1), palmatine (2), berberine (3) and epiberberine (4)

Compound	linear range ( $\mu\text{g/mL}$ )	Slope (a)	Intercept (b)	Correlation Coefficient ( $r^2$ )	LOD <sup>a</sup> ( $\mu\text{g/mL}$ )	LOQ <sup>b</sup> ( $\mu\text{g/mL}$ )
coptisine (1)	2 ~ 100	-0.0236	0.02938	0.9994	0.1	0.25
palmatine (2)	2 ~ 100	-0.001	0.02440	0.9992	0.1	0.25
berberine (3)	2 ~ 100	0.0151	0.02039	0.9987	0.1	0.25
epiberberine (4)	2 ~ 100	0.0015	0.02457	0.9994	0.1	0.25

<sup>a</sup>Limit of detection. <sup>b</sup>Limit of quality control

**Table 2.** Analytical results of coptisine (1), palmatine (2), berberine (3) and epiberberine (4) of *C. chinensis* purchased from markets in Korea and China

Samle	Content (mg/g)			
	coptisine (1)	palmatine (2)	berberine (3)	epiberberine (4)
CUD-1 <sup>a</sup>	9.66 ± 1.10	7.87 ± 1.00	33.28 ± 5.34	4.49 ± 0.39
CUD-2 <sup>b</sup>	17.43 ± 3.80	15.43 ± 0.06	57.25 ± 11.00	7.77 ± 1.74
CUD-3 <sup>c</sup>	9.48 ± 1.25	9.62 ± 0.83	30.76 ± 2.24	5.24 ± 0.54
CUD-4 <sup>d</sup>	24.63 ± 4.11	20.75 ± 4.38	81.16 ± 11.59	12.04 ± 2.55
CUD-5 <sup>e</sup>	6.79 ± 0.85	5.40 ± 0.27	21.40 ± 2.53	3.76 ± 0.21
CUD-6 <sup>f</sup>	12.54 ± 0.55	10.00 ± 0.42	45.62 ± 0.10	5.97 ± 0.58
CUD-7 <sup>g</sup>	13.32 ± 0.40	11.97 ± 0.52	48.16 ± 2.39	7.36 ± 1.09
CUD-8 <sup>h</sup>	12.38 ± 0.59	9.90 ± 0.13	43.43 ± 0.61	7.02 ± 0.48
CUD-9 <sup>i</sup>	9.53 ± 0.15	8.80 ± 0.82	33.87 ± 2.05	4.97 ± 0.31
CUD-10 <sup>j</sup>	10.42 ± 0.79	8.46 ± 0.99	35.68 ± 3.30	5.39 ± 0.53
CUD-11 <sup>k</sup>	8.50 ± 0.39	6.57 ± 0.06	27.61 ± 0.23	3.45 ± 0.02
CUD-12 <sup>l</sup>	11.03 ± 1.49	8.49 ± 1.47	38.65 ± 4.34	4.60 ± 0.93
CUD-13 <sup>m</sup>	13.65 ± 0.53	12.17 ± 0.80	41.34 ± 10.15	6.51 ± 0.50
CUD-14 <sup>n</sup>	23.47 ± 2.87	17.06 ± 0.60	77.21 ± 5.36	10.28 ± 0.97
CUD-15 <sup>o</sup>	22.77 ± 0.36	16.62 ± 2.09	81.21 ± 6.98	10.55 ± 0.18
CUD-16 <sup>p</sup>	17.61 ± 0.68	13.00 ± 0.46	53.36 ± 2.64	9.32 ± 0.29

<sup>a</sup>CDU-1 (Hwaseung-sa, Daegu, Korea, cultured in China), <sup>b</sup>CDU-2 (Hyunjin-sa, Daegu, Korea, cultured in China), <sup>c</sup>CDU-3 (Kyungsan-mart, Daegu, Korea, cultured in China), <sup>d</sup>CDU-4 (Hobuk-mart, Hobuk-sung, China, cultured in China), <sup>e</sup>CDU-5 (Kwangsu-mart, Kwangsu-sung, China, cultured in China), <sup>f</sup>CDU-6 (Joongdo-hospital, Daejeon, Korea, cultured in China), <sup>g</sup>CDU-7 (Baegje Co., Daejeon, Korea, cultured in China), <sup>h</sup>CDU-8 (Kyungdong Co., Daejeon, Korea, cultured in China), <sup>i</sup>CDU-9 (Kyungdong-mart, Seoul, Korea, cultured in China), <sup>j</sup>CDU-10 (Byungin Co., Seoul, Korea, cultured in China), <sup>k</sup>CDU-11 (Kyungshin Co., Yeongchun, Korea, cultured in China), <sup>l</sup>CDU-12 (Yeongchun-mart1, Yeongchun, Korea, cultured in China), <sup>m</sup>CDU-13 (Yeongchun-mart2, Yeongchun, Korea, cultured in China), <sup>n</sup>CDU-14 (Sehwa-dang, Kwangju, Korea, cultured in China), <sup>o</sup>CDU-15 (Kwangduk Co., Kwangju, Korea, cultured in China), <sup>p</sup>CDU-16 (Johwa Co., Kwangju, Korea, cultured in China)

12.04 ± 2.55  $\mu\text{g/g}$ ). These results suggest that this method might be used more conveniently for the monitoring the quality of protoberberine alkaloids from the roots of *C. chinensis*.

### Acknowledgement

This work was supported by a grant (07092Herbal Medicine Part323) from the National Center for Standardization of Herbal Medicine funded by the Food Drug and Administration, Republic of Korea (2007).

### References

Cho, J.Y., Baik, K.U., Yoo, E.S., Yoshikawa, K., and Park, M.H., In vitro anti-inflammatory effects of neolignan woorenosides from the rhizomes

- of *Coptis japonica*. *J. Nat. Prod.* **63**, 1205-1209 (2000).  
 Feng, S.L., Hu, F.D., and Zhao, J.X., Determination of seven compounds in Tang Maikang granule by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. Sci.* **43**, 522-525 (2005).  
 Lee, M.K. and Kim, H.S., Inhibitory effects of protoberberine alkaloids from the roots of *Coptis japonica* on catecholamine biosynthesis in PC12 cells. *Planta Med.* **62**, 31-34 (1996).  
 Lee, S.M., Park, J.K., and Lee, C.G., Quantitative determination of triterpenoids from the fruits of *Zizyphus jujuba*. *Natural Product Sciences* **10**, 93-95 (2004).  
 Lee, S.Y., Song, D.K., and Jang, C.G., Effects of *Coptis japonica* on morphine-induced conditioned place preference in mice. *Arch. Pharm. Bull.* **26**, 540-544 (2003).  
 Li, K. and Wang, H., Simultaneous determination of matrine, sophoridine and oxymatrine in *Sophora flavescens* Ait. by high performance liquid chromatography. *Biomed. Chromatogr.* **18**, 178-182 (2004).  
 Min, Y.D., Yang, C.Y., Lee, K.H., Kim, K.R., Choi, S.U., and Lee K.R., Protoberberine alkaloids and their reversal activity of P-gp expressed multidrug resistance (MDR) from the rhizome of *Coptis japonica* Makino. *Arch. Pharm. Res.* **29**, 757-761 (2006).

- Ivanovska, N. and Philipov, S., Study on the anti-inflammatory action of *Berberis vulgaris* root extract, alkaloid fractions and pure alkaloids. *Immunopharmacology* **18**, 553-561 (1996).
- Park, H.J., Kim, Y.J., Leem, K., Park, S.J., Seo, J.C., Kim, H.K., and Chung, J.H., *Coptis japonica* root extract induces apoptosis through caspase-3 activation in SNU-668 human gastric cancer cells. *Phytother. Res.* **19**, 189-192 (2005).
- Ro, J.S., Lee, S.S., Lee, K.S., and Lee, M.K., Inhibition of type a monoamine oxidase by coptisine in mouse brain. *Life Sci.* **70**, 639-645 (2001).
- Slobodnikova, L., Kostalova, D., Labudova, D., and Kettmann, V., Antimicrobial activity of *Mahonia aquifolium* crude extract and its major isoalted alkaloids. *Phytother. Res.* **18**, 674-676 (2004).
- Tsai, P.L. and Tsai, T.H., Hepatobiliary excretion of berberine. *Drug Metab. Dispos.* **32**, 504-412 (2004).
- Wang, L.K., Liu, Z., Guo, M., and Liu, S., Structural elucidation and identification of alkaloids in Rhizoma Coptidis by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **39**, 1356-1365 (2004).
- Yahara, S., Satoshiro, M., Nishioka, I., Nagasawa, T., and Oura, H., Isolation and characterization of phenolic compounds from Coptidis Rhizoma. *Chem. Pharm. Bull.* **33**, 527-531 (1985).
- Yang, H.T. and Wang, G.J., Transport and uptake characteristics of a new derivative of berberine (CPU-86017) by human intestinal epithelial cell line: Caco-2. *Acta Pharmacol. Sin.* **24**, 1185-1191 (2003).

(Accepted March 10, 2008)

## Inhibitory Activities of the Alkaloids from *Coptidis Rhizoma* against Aldose Reductase

Hyun Ah Jung, Na Young Yoon, Hyun Ju Bae, Byung-Sun Min<sup>1</sup>, and Jae Sue Choi

Division of Food Science and Biotechnology, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea and <sup>1</sup>College of Pharmacy, Catholic University of Daegu, Gyeongsbuk 712-702, Korea

(Received April 12, 2008/Revised July 15, 2008/Accepted November 6, 2008)

As part of our ongoing search of natural sources for therapeutic and preventive agents for diabetic complications, the rat lens aldose reductase (RLAR) inhibitory effect of *Coptidis Rhizoma* (the rhizome of *Coptis chinensis* Franch) was evaluated. Its extract and fractions exhibited broad and moderate RLAR inhibitory activities of 38.9–67.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . In an attempt to identify bioactive components, six quaternary protoberberine-type alkaloids (berberine, palmatine, jateorrhizine, epiberberine, coptisine, and groenlandicine) and one quaternary aporphine-type alkaloid (magnoflorine) were isolated from the most active *n*-BuOH fraction, and the chemical structures therein were elucidated on the basis of spectroscopic evidence and comparison with published data. The anti-diabetic complications capacities of seven *C. chinensis*-derived alkaloids were evaluated *via* RLAR and human recombinant AR (HRAR) inhibitory assays. Although berberine and palmatine were previously reported as prime contributors to AR inhibition, these two major components exhibited no AR inhibitory effects at a higher concentration of 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in the present study. Conversely, epiberberine, coptisine, and groenlandicine exhibited moderate inhibitory effects with  $\text{IC}_{50}$  values of 100.1, 118.4, 140.1  $\mu\text{M}$  for RLAR and 168.1, 187.3, 154.2  $\mu\text{M}$  for HRAR. The results clearly indicated that the presence of the dioxymethylene group in the D ring and the oxidized form of the dioxymethylene group in the A ring were partly responsible for the AR inhibitory activities of protoberberine-type alkaloids. Therefore, *Coptidis Rhizoma*, and the alkaloids contained therein, would clearly have beneficial uses in the development of therapeutic and preventive agents for diabetic complications and diabetes mellitus.

**Key words:** *Coptis chinensis*, *Coptidis Rhizoma*, Alkaloids, Aldose reductase, Diabetic complications

### INTRODUCTION

Aldose reductase (AR) is one of the important enzymes in the polyol pathway that catalyzes the reduction of glucose to sorbitol and thus plays a crucial part in the development of diabetic complications, including retinopathy, neuropathy, nephropathy, and cataracts (Kawanishi et al., 2003; de la Fuente et al., 2003). For these reasons, there are growing interests in AR inhibitors (ARIs) to alleviate the various symptoms of diabetic complications and treat its many related diseases. Although several synthetic ARIs have been proposed, including zopolrestat, epalrestat, and sorbinil, most of them place a limit on

their usage, and/or have been withdrawn from clinical trials due to relatively low efficacy, poor pharmacokinetics, and unsatisfactory safety (Kawanishi et al., 2003; Manzanaro et al., 2006). In an attempt to develop potent, safe, and new anti-diabetic complications agents from natural sources (de la Fuente et al., 2003), we began an effort to search for ARIs and evaluate their potentials.

*Coptis chinensis* Franch, of the Ranunculaceae family, is a perennial, stemless herb that grows throughout China. *Coptidis Rhizoma*, the rhizome of *C. chinensis*, has commonly been prescribed for treatment of diabetes mellitus in Chinese traditional herbal medicine for a long time due to its blood sugar-lowering properties. It also relaxes blood vessels, lowers fevers, stimulates circulation, and exerts antibacterial, antiviral, and antifungal activity (Huang, 1999). In addition, *Coptis chinensis* are reported to possess anti-inflammatory (Schinella et al., 2002), anti-proliferative (Tse et al., 2006), antioxidant (Schinella et al., 2002;

Yokozawa et al., 2005), and anti-hypertensive activities (Ko et al., 2000), as well as hypoglycemic and hypocholesterolemic effects (Yuan et al., 2006).

Coptidis Rhizoma is known to harbor a diversity of alkaloids, including berberine, palmatine, jateorrhizine, epiberberine, and coptisine, which are considered to be its active constituents (Sun et al., 2006). In particular, berberine is the most predominant component and shows various pharmacological and biological effects, including anti-hypertensive (Ko et al., 2000), anti-diabetic (Tang et al., 2006; Huang et al., 2006), anti-inflammatory (Kuo et al., 2004), hypolipidemic (Kong et al., 2004; Doggrell, 2005), and antioxidant effects (Hsieh et al., 2007). Berberine, palmatine, and jateorrhizine have been reported to exhibit hypoglycemic and hypocholesterolemic effects (Yuan et al., 2006). Yokozawa et al. (2005) reported that coptisine, palmatine, magnoflorine, and epiberberine might contribute to the protective effects of Coptidis Rhizoma on oxidative stress, including inhibition of cellular peroxynitrite generation. Jateorrhizine and magnoflorine were also reported to exhibit significant antioxidant and antiradical capacities (Racková et al., 2004; Hung et al., 2007).

Since Coptidis Rhizoma has been used for treatment of diabetes mellitus, and several alkaloids isolated from Coptidis Rhizoma showed preventive and inhibitory activity against several diabetic complications-related symptoms, including antioxidant, hypolipidemic, and hypocholesterolemic effects, the present study on the inhibitory effects of Coptidis Rhizoma on diabetic complications is worthy of promoting this field of research. In particular, our present results seem to be inconsistent with previous research on the AR inhibitory effects of Coptidis Rhizoma-derived alkaloids (Lee, 2002; Nakai et al., 1985), therefore, the objectives of the present work are to re-evaluate the AR inhibitory effects of several alkaloids and reaffirm the structure-activity relationship of Coptidis Rhizoma-derived alkaloids.

## MATERIALS AND METHODS

### General experimental procedures

The  $^1\text{H}$ - and  $^{13}\text{C}$ -NMR spectra were determined using a JEOL JNM ECP-400 spectrometer (JEOL, Japan) at 400 MHz for  $^1\text{H}$  and 100 MHz for  $^{13}\text{C}$ . The EI-MS data was collected on a GCMS QP-5050A spectrometer (Shimadzu, Japan). Column chromatography was conducted using silica (Si) gel 60 (70-230 mesh, Merck, Germany), and MCI CHP20P gel (75-150  $\mu\text{m}$ , Mitsubishi Chemical Co., Tokyo, Japan). TLC was conducted on precoated Merck Kieselgel 60 F<sub>254</sub> plates (20×20 cm, 0.25 mm).

### Chemicals

Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH),

quercetin, and DL-glyceraldehyde dimer were purchased from Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA). Human recombinant aldose reductase (HRAR, 0.4 unit) was purchased from Wako Chemicals (Osaka, Japan).

### Plant materials

The rhizome of *C. chinensis* was purchased from a local retailer and authenticated by Prof. J. H. Lee at Dongguk University, Gyeongbuk Province, Korea. A voucher specimen (No. 20060420) was deposited in the author's laboratory (Prof. J. S. Choi).

### Extraction, fractionation, and isolation

The powdered rhizome of *C. chinensis* (10 kg) were refluxed with methanol (MeOH) for 3 h (3×10 L). The total filtrate was then concentrated to dryness *in vacuo* at 40°C, in order to render the MeOH extract (2.2 kg). This extract was suspended in distilled water (H<sub>2</sub>O) and then successively partitioned with methylene chloride (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), *n*-butanol (BuOH), to yield CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (230 g), *n*-BuOH (1.1 kg) fractions, respectively, as well as H<sub>2</sub>O residue (840 g). A portion of *n*-BuOH fraction (316 g) was initially chromatographed over a Si gel column using a mixed solvent of EtOAc, MeOH, and H<sub>2</sub>O (EtOAc:MeOH:H<sub>2</sub>O 21:4:3 → 21:10:3 → EtOAc:MeOH:2% HCl 21:10:3, gradient conditions) to yield 14 subfractions (BF1~ BF18). BF02 (9.3 g) was repeatedly chromatographed over a Si gel column using a mixed solvent of EtOAc, MeOH, and H<sub>2</sub>O (EtOAc:MeOH:H<sub>2</sub>O 21:4:3) to yield palmatine (3 g). BF03 (21.1 g) was recrystallized with MeOH, yielding berberine (7 g). The filtrate of BF03 (15 g) was subjected to column chromatography over a Si gel column with a mixture solvent of CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and MeOH (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH 5:1 → 0:1, gradient conditions) to yield jateorrhizine (50 mg). BF12 (17.3 g) was chromatographed over a MCI gel column with aqueous MeOH (0% → 100%), followed by recrystallization with MeOH to obtain groenlandicine (60 mg), and coptisine (80 mg). A portion of BF13 (20 g) was chromatographed over a MCI gel column with aqueous MeOH (0% → 100%), followed by recrystallization with MeOH to obtain epiberberine (90 mg). Magnoflorine (20 mg) were isolated from BF14 (13 g) by MCI gel column chromatography with aqueous MeOH (0% → 100%). The chemical structures of isolated alkaloids were elucidated on the basis of spectroscopic evidences and by comparison with published data (Grycová et al., 2007; Lee and Kim, 1997). The NMR data of isolated alkaloids were as follows.

### Berberine

$^1\text{H}$ -NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) :  $\delta$  9.75 (1H, s, H-8), 8.69 (1H, s, H-13), 8.10 (1H, d,  $J$  = 8.3 Hz, H-11), 7.98 (1H, d,  $J$  = 8.4 Hz, H-12), 7.64 (1H, s, H-1), 6.94 (1H, s,

H-4), 6.09 (2H, s, OCH<sub>2</sub>O), 4.91 (2H, t,  $J = 6.4$ , H-6), 4.18 (3H, s, 9-OCH<sub>3</sub>), 4.09 (3H, s, 10-OCH<sub>3</sub>), 3.24 (2H, t,  $J = 6.4$  Hz, H-5); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD) :  $\delta$  151.0 (C-10), 150.8 (C-3), 148.7 (C-2), 144.6 (C-9), 145.2 (C-8), 138.5 (C-13a), 134.0 (C-12a), 130.7 (C-4a), 126.8(C-11), 123.3(C-12), 122.1 (C-8a), 120.7 (C-13b), 120.3 (C-13), 108.2 (C-4), 105.3 (C-1), 102.5 (OCH<sub>2</sub>O), 61.3 (C-9, OCH<sub>3</sub>), 56.4 (C-10, OCH<sub>3</sub>), 56.0 (C-6), 27.0 (C-5).

#### Magnoflorine

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  6.65 (1H, d,  $J = 6.5$  Hz, H-9), 6.46 (1H, d,  $J = 6.5$  Hz, H-8), 6.45 (1H, s, H-3), 3.78 (3H, s, 10-OCH<sub>3</sub>), 3.80 (1H, m, C-6), 3.80 (3H, s, 2-OCH<sub>3</sub>), 3.45 (1H, m, H-5), 3.23 (1H, m, H-5), 3.23 (3H, s, N<sup>+</sup>CH<sub>3</sub>), 3.10 (1H, m, H-4), 2.93 (1H, dd,  $J = 3.2$ , 12.3 Hz, H-7), 2.77 (3H, s, N<sup>+</sup>CH<sub>3</sub>), 2.58 (1H, m, H-4), 2.42 (1H, br t,  $J = 12.3$ , 13.6 Hz, H-7); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  151.9 (C-2), 150.5 (C-10), 149.4 (C-1), 148.4 (C-11), 124.8 (C-7a), 122.4 (C-11b), 122.3 (C-11a), 119.8 (C-6b), 115.9 (C-8), 114.7 (C-3a), 109.4 (C-9), 108.3 (C-3), 69.9 (C-6a), 61.12 (C-5), 55.1 (2-OCH<sub>3</sub>), 54.8 (10-OCH<sub>3</sub>), 52.7 (N<sup>+</sup>CH<sub>3</sub>), 42.8 (N<sup>+</sup>CH<sub>3</sub>), 30.5 (C-7), 23.5 (C-4).

#### Groenlandicine

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) :  $\delta$  9.62 (1H, s, H-8), 8.69 (1H, s, H-13), 7.86 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-11), 7.82 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-12), 7.60 (1H, s, H-1), 6.83 (1H, s, H-4), 6.43 (2H, s, OCH<sub>2</sub>O), 4.89 (2H, m, H-6), 3.99 (2-OCH<sub>3</sub>), 3.28 (H-5); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD) :  $\delta$  150.8 (C-3), 148.5 (C-2), 147.7 (C-10), 144.4 (C-9), 143.9 (C-8), 138.4 (C-13a), 133.5 (C-12a), 129.0 (C-4a), 121.7 (C-12), 121.0 (C-11), 120.6 (C-13), 118.1 (C-13b), 114.7 (C-4), 112.4 (C-8a), 108.6 (C-1), 104.8 (OCH<sub>2</sub>O), 56.2 (C-6), 55.7 (2-OCH<sub>3</sub>), 26.4 (C-5).

#### Jateorrhizine

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) :  $\delta$  9.71 (1H, s, H-8), 8.74 (1H, s, H-13), 8.08 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-11), 7.97 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-12), 7.63 (1H, s, H-1), 6.84 (1H, s, H-4), 4.48 (2H, m, H-6), 4.18 (3H, s, 9-OCH<sub>3</sub>), 4.09 (3H, s, 10-OCH<sub>3</sub>), 4.00 (3H, s, 2-OCH<sub>3</sub>), 3.18 (2H, m, H-5); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD) :  $\delta$  150.6 (C-9), 150.5 (C-2), 148.4 (C-3), 145.0(C-8), 144.5 (C-10), 139.1 (C-13a), 134.2 (C-12a), 129.1 (C-4a), 126.8 (C-12), 123.1(C-11), 122.0 (C-13b), 119.7 (C-13), 118.2 (C-8a), 114.7 (C-4), 108.8 (C-1), 61.3 (9-OCH<sub>3</sub>), 55.7 (10-OCH<sub>3</sub>), 56.4 (2-OCH<sub>3</sub>), 56.2 (C-6), 26.4 (C-5).

#### Coptisine

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) :  $\delta$  9.71 (1H, s, H-8), 8.71 (1H, s, H-13), 7.87 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-11), 7.83

(1H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-12), 7.63 (1H, s, H-1), 6.84 (1H, s, H-4), 6.45 (2H, s, OCH<sub>2</sub>O), 6.09 (2H, s, OCH<sub>2</sub>O), 4.89 (2H, m, H-6), 3.23 (2H, m, H-5); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD) :  $\delta$  151.0 (C-10), 148.8 (C-3), 148.1 (C-2), 144.6 (C-8), 144.1 (C-9), 137.8 (C-13a), 133.2 (C-12a), 130.6 (C-4a), 121.9 (C-12), 121.6 (C-13b), 120.7 (C-13), 120.7 (C-11), 112.5 (C-8a), 108.2 (C-4), 105.3 (C-1), 105.0 (OCH<sub>2</sub>O), 102.5 (OCH<sub>2</sub>O), 56.0 (C-6), 27.0 (C-5).

#### Palmatine

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) :  $\delta$  9.78 (1H, s, H-8), 8.88 (1H, s, H-13), 8.10 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-11), 8.00 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-12), 7.63 (1H, s, H-1), 7.03 (1H, s, H-4), 4.87 (2H, m, H-6), 4.19 (3H, s, 9-OCH<sub>3</sub>), 4.08 (3H, s, 10-OCH<sub>3</sub>), 3.97 (3H, s, 2-OCH<sub>3</sub>), 3.92 (3H, s, 3-OCH<sub>3</sub>), 3.52 (2H, m, H-5); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD) :  $\delta$  152.6 (C-3), 150.7 (C-10), 149.7 (C-2), 145.2(C-8), 144.5 (C-9), 138.6 (C-13a), 134.0 (C-12a), 128.9 (C-4a), 126.8 (C-12), 123.3(C-11), 122.1 (C-13b), 120.1 (C-13), 119.3 (C-8a), 111.0 (C-4), 108.7 (C-1), 61.3 (9-OCH<sub>3</sub>), 56.4 (10-OCH<sub>3</sub>), 56.1 (2-OCH<sub>3</sub>), 55.8 (3-OCH<sub>3</sub>), 55.4 (C-6), 26.6 (C-5); LC-ESI-MS/MS  $m/z$  352 [M]<sup>+</sup>, 337, 322, 308.

#### Epiberberine

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) :  $\delta$  9.70 (1H, s, H-8), 8.81 (1H, s, H-13), 7.88 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-11), 7.83 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-12), 7.63 (1H, s, H-1), 7.03 (1H, s, H-4), 6.45 (2H, s, OCH<sub>2</sub>O), 4.88 (2H, m, H-6), 3.97 (3H, s, 2-OCH<sub>3</sub>), 3.92 (3H, s, 3-OCH<sub>3</sub>), 3.26 (2H, m, H-5); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD) :  $\delta$  152.6 (C-3), 149.7 (C-2), 147.9 (C-10), 144.5 (C-9), 144.1 (C-8), 137.9 (C-13a), 133.3 (C-12a), 128.7 (C-4a), 121.8(C-12), 121.1(C-11), 121.0 (C-13), 119.3 (C-13b), 112.5 (C-8a), 111.0 (C-4), 108.5 (C-1), 104.9 (OCH<sub>2</sub>O), 56.2 (C-6), 55.8 (2-OCH<sub>3</sub>), 55.5 (3-OCH<sub>3</sub>), 26.5 (C-5).

#### Assay for RLAR inhibitory activity

In these experiments we followed The Guidelines for Care and Use of Laboratory Animals as approved by Pukyong National University. According to the modified method of Hayman and Kinoshita (1965), rat lens homogenate was prepared. Briefly, the lens were removed from the eyes of Sprague-Dawley rats (Samtako BioKorea, Inc.) weighing 250-280 g. The lens are homogenized in sodium phosphate buffer (pH 6.2), which was prepared from sodium phosphate dibasic (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 0.66 g) and sodium phosphate monobasic (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 1.27 g) in 100 mL of double distilled water. The supernatant was obtained by centrifugation of the homogenate at 10,000 rpm at 4°C for 20 min and was frozen until use. A crude AR, with a specific activity of 6.5 U/mg, was used in the evaluations for enzyme inhibition. The partially purified material was separated into 1.0 mL aliquots, and

stored at  $-40^{\circ}\text{C}$ . Each 1.0 mL cuvette contained equal units of enzyme, 100 mM sodium phosphate buffer (pH 6.2), and 1.6 mM NADPH, both with and without 50 mM of the substrate, DL-glyceraldehyde, and an inhibitor (f.c. 10~100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for the extract, and fractions, and 12.5~50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for the compounds, dissolved in 100% DMSO). The AR activity was determined by measuring the decrease in NADPH absorption at 340 nm over a 4 min period on a Ultrospec<sup>®</sup>2100pro UV/Visible spectrophotometer with SWIFT II Applications software (Amersham Biosciences, New Jersey, USA). Quercetin, a well known ARI was used as references. The inhibition percentage (%) was calculated as  $[1 - (\Delta\text{A sample}/\text{min} - \Delta\text{A blank}/\text{min}) / (\Delta\text{A control}/\text{min} - \Delta\text{A blank}/\text{min})] \times 100$ , where  $\Delta\text{A sample}/\text{min}$  represents the reduction of absorbance for 4 min with the test sample and substrate, respectively, and  $\Delta\text{A control}/\text{min}$  represents the same, but with 100% DMSO instead of a sample. The 50% inhibition concentrations of the RLAR inhibitory activity were calculated from the log-dose inhibition curve within test concentrations. The  $\text{IC}_{50}$  values are expressed as the mean  $\pm$  SEM.

#### Assay for HRAR inhibitory activity

The recombinant human AR inhibitory activities were examined according to the method of Nishimura et al (1991). The reaction mixture was prepared as follows: 100  $\mu\text{L}$  of 0.15 mM NADPH, 100  $\mu\text{L}$  of 10 mM DL-glyceraldehyde, as a substrate, 5  $\mu\text{L}$  of the recombinant human AR, and various concentrations of the samples (f.c. 25~75  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , dissolved in 100% DMSO) in a total volume of 1.0 mL of 100 mM sodium phosphate buffer (pH 6.2). The AR activity was determined by measuring the decrease in NADPH absorption at 340 nm over a 1 min period on a Ultrospec<sup>®</sup>2100pro UV/Visible spectrophotometer with SWIFT II Applications software (Amersham Biosciences). Quercetin, a well known ARI was used as references. The inhibition percentage (%) was calculated similar to the RLAR assay, except that  $\Delta\text{A sample}/\text{min}$  represents the reduction of absorbance for 1 min with the test samples and substrate. The 50% inhibition concentrations of the HLAR inhibitory activity were calculated from the log-dose inhibition curve within test concentrations. The  $\text{IC}_{50}$  values are expressed as the mean  $\pm$  SEM.

#### Statistics

All results are presented as mean  $\pm$  S.E.M. Statistical significance was analyzed via one-way ANOVA and Student's *t*-test (Systat In., Evaston, Ill., USA).

## RESULTS AND DISCUSSION

To evaluate the anti-diabetic complication effects of

Coptidis Rhizoma, the RLAR inhibitory activities of the MeOH extract and its  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , *n*-BuOH, and  $\text{H}_2\text{O}$  fractions were measured using the modified method of Hayman and Kinoshita (1965). As shown in Table I, the extract and its fractions exhibited moderate RLAR inhibitory activities with  $\text{IC}_{50}$  values of 49.1, 64.6, 38.9, and 67.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  respectively, as compared to a positive control, quercetin ( $\text{IC}_{50}$  0.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Lee (2002) previously demonstrated that the MeOH extract, and the  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , and *n*-BuOH fractions showed significant RLAR inhibitory effects, particularly the  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  fraction exhibiting RLAR inhibitory effects similar to quercitrin. In the present study, the *n*-BuOH fraction was the most active fraction, followed by the  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  and  $\text{H}_2\text{O}$  fractions, whereas Lee (2002) stated that the  $\text{H}_2\text{O}$  fraction showed only marginal activity. The TLC analyses of the MeOH extract and its fractions indicated that *n*-BuOH and  $\text{H}_2\text{O}$  fractions also harbored a variety of alkaloids. Thus these polar fractions are expected to exert as good RLAR activity as other fractions. Since the *n*-BuOH fraction exhibited the most RLAR inhibitory effect in the present work, further phytochemical examinations were carried out to obtain seven alkaloids, including six quaternary protoberberine-type alkaloids (berberine, palmatine, jateorrhizine, epiberberine, coptisine, and groenlandicine) and one quaternary aporphine-

**Table I.** RLAR inhibitory activities of the MeOH extract and its fractions from *C. chinensis*

Sample	Conc. ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) <sup>a</sup>	Inhibition <sup>b</sup> (%)		$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) <sup>c</sup> Mean $\pm$ SEM
Quercetin	5	83.33	85.71	0.39 $\pm$ 0.13
	1	67.86	67.86	
	0.2	39.29	35.71	
MeOH	100	81.31	78.69	49.14 $\pm$ 3.59
	50	52.68	42.86	
	10	29.46	29.46	
$\text{CH}_2\text{Cl}_2$	100	60.66	63.93	64.62 $\pm$ 1.91
	50	50.00	45.12	
	10	23.17	30.49	
<i>n</i> -BuOH	50	60.61	57.58	38.87 $\pm$ 1.60
	10	27.27	25.76	
$\text{H}_2\text{O}$	100	80.33	95.08	67.48 $\pm$ 5.07
	50	18.03	24.59	
	10	-1.64	1.64	

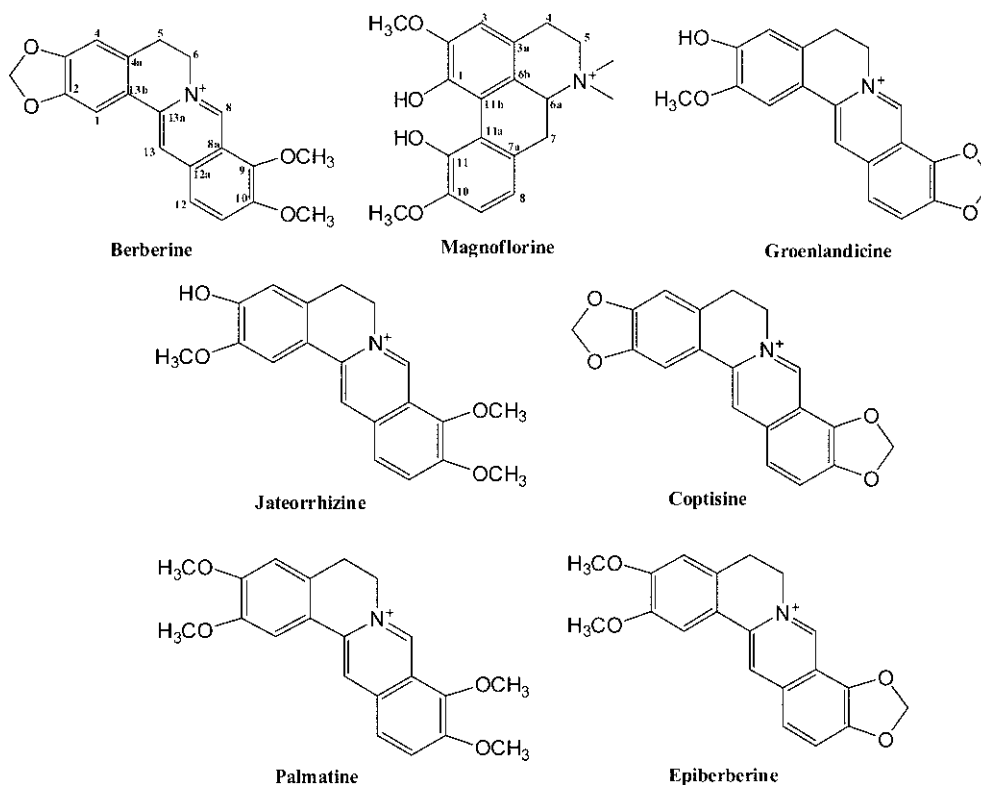
<sup>a</sup>Final concentrations of test samples were 10~100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for the extract, and fractions, and 1~10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for quercetin, which were dissolved in 100% DMSO. <sup>b</sup>The inhibition percentage (%) was calculated as  $[1 - (\Delta\text{A sample}/\text{min} - \Delta\text{A blank}/\text{min}) / (\Delta\text{A control}/\text{min} - \Delta\text{A blank}/\text{min})] \times 100$ , where  $\Delta\text{A sample}/\text{min}$  represents the reduction of absorbance for 4 min with the test sample and substrate, respectively, and  $\Delta\text{A control}/\text{min}$  represents that with 100% DMSO instead of a sample. The 50% inhibition concentration is expressed as the mean  $\pm$  SEM of triple experiments.



type alkaloid (magnoflorine) (Fig. 1).

The RLAR inhibitory activities of the seven alkaloids isolated from the most active *n*-BuOH fraction are shown

in Table II. Among the tested compounds, berberine and palmatine exhibited no RLAR inhibitory activities within the test concentration of 12.5–50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Magnoflorine and



**Fig. 1.** Structures of alkaloids from *C. chinensis*

**Table II.** RLAR inhibitory activities of seven alkaloids from *C. chinensis*

	Conc. $\mu\text{g}/\text{mL}^a$	Inhibition <sup>b</sup> %		IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) <sup>c</sup> Mean $\pm$ SEM	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ ) <sup>d</sup> Mean $\pm$ SEM
Quercetin	5	77.94	76.47	0.57 $\pm$ 0.20	1.88 $\pm$ 0.47
	1	66.18	63.24		
	0.2	33.82	41.18		
Berberine	50			> 50	
Palmatine	50			> 50	
Jateorrhizin	50	14.08	12.68	> 50	
	50	101.59	98.41		
	33.3	50.51	50.11		
Coptisine	50	12.50	12.50	37.87 $\pm$ 0.35	118.36 $\pm$ 0.78
	50	86.87	85.86		
	33.3	31.31	35.13		
	25	15.28	9.72		
Groenlandicine	12.5	4.84	3.23	45.12 $\pm$ 2.96	140.13 $\pm$ 6.50
	50	52.38	60.32		
	25	23.61	18.06		
Magnoflorine	12.5	10.96	10.96	> 50	
	50	29.85	18.33		

<sup>a</sup>Final concentrations of test samples were 10–50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for the compounds, which were dissolved in 100% DMSO. <sup>b</sup>The inhibition percentage (%) was the same as in Table I. <sup>c,d</sup>The 50% inhibition concentrations ( $\mu\text{g}/\text{mL}$  and  $\mu\text{M}$ , respectively) were calculated from the log dose inhibition curve and expressed as the mean  $\pm$  SEM of duplicate experiments.

jateorrhizine showed marginal RLAR inhibitory activities with 18% and 13% inhibition at a concentration of 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectively. Conversely, epiberberine, coptisine, and groenlandicine showed good inhibitory activities with  $\text{IC}_{50}$  values of 33.6, 37.9, and 45.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (100.1, 118.4, and 140.1  $\mu\text{M}$ ), respectively, in the RLAR assay. As shown in Table III, groenlandicine, epiberberine, and coptisine also exhibited the HRAR inhibitory effects with  $\text{IC}_{50}$  values of 51.2, 56.5, and 66.7  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (154.2, 168.1, and 187.3  $\mu\text{M}$ ), respectively. The results suggested that the presence of dioxymethylene group in the D ring and the oxidized form of the dioxymethylene group in the A ring were at least partly attributed to the RLAR and HRAR inhibitory activities of protoberberine-type alkaloids. Nakai et al. (1985) and Lee (2002) reported that both berberine and palmatine showed potent RLAR inhibitory effects, with palmatine exhibiting potency greater than berberine, due to the oxidized form of the dioxymethylene group in the A ring. Similar to these previous results, the oxidized form of the dioxymethylene group in the A ring might contribute to the RLAR and HRAR inhibitory effects of the alkaloids in present study, however, the presence of dioxymethylene group in the D ring seems to play a much more crucial role in the AR inhibitory activity: epiberberine, coptisine, groenlandicine vs. berberine, palmatine. The important structural characterization of ARI may be harbored within the polar portion as well as the hydrophobic ring system. The hydrophobic ring systems of the ARIs are tightly bound adjacent to the anion-bind site of AR, and the polar systems are bound in an anion-binding site adjacent to the nicotinamide ring of the coenzyme (El-Kabbani and Podjarny, 2007). Epiberberine and groenlandicine, possessing the dimethylene group in the D ring as the hydrophobic ring system, and methoxyl group

in the A ring as the polar systems of an alkaloid unit, may be deemed the reasonable ARIs in the RLAR and HRAR systems. The AR-polyol pathway is expected to be highly implicated in oxidative stress, such as reduction/oxidation of NADPH and glutathione. According to Yokozawa's study (2005) on *Cotidis Rhizoma* and its alkaloids, coptisine, palmatine, epiberberine, jateorrhizine, and magnoflorine inhibited peroxy-nitrite- and SIN-1-induced cellular damage, except for berberine. In part, epiberberine, and jateorrhizine could potentially exhibit the RLAR inhibitory effects through inhibition of reactive nitrogen species formation, however, the precise mechanism remains unclear since there are other biological aspects of berberine to consider, including strong radical scavenging, inhibition of lipid peroxidation, LDL oxidation, and nitric oxide generation, as well as chelation of metal ion (Shirwaikar et al., 2006; Hsieh et al. 2007). Moreover, the remarked difference between previous results (Lee, 2002; Nakai et al., 1985) and our present data might be due to the modification of enzyme preparation.

Until now, several kinds of minor compounds have been isolated from the *Coptis* species, including lignans (Cho et al., 2001), neolignans (Yoshikawa et al., 1995), coumarins (Mizuno et al., 1992), acids and phenolics (Yahara et al., 1985). Since coumarins and phenolics have been reported to possess AR inhibitory activity, these two kinds of compounds are likely to play more important roles in AR inhibition than the alkaloids, in spite of limited presence.

In conclusion, *Coptidis Rhizoma*, and the alkaloids contained within, would clearly have beneficial uses in the development of therapeutic and/or preventive agents for diabetic complications and diabetes mellitus.

**Table III.** HRAR inhibitory activities of alkaloids from *C. chinensis*

	Conc. $\mu\text{g}/\text{mL}^{\text{a}}$	Inhibition <sup>b</sup> %		$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) <sup>c</sup> Mean $\pm$ SEM	$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ ) <sup>d</sup> Mean $\pm$ SEM																																	
Quercetin	0.25	53.85	53.85	0.22 $\pm$ 0.00	0.73 $\pm$ 0.01																																	
	0.05	30.77	23.08			Coptisine	75	53.85	61.54	66.67 $\pm$ 3.57	187.27 $\pm$ 10.03	50	30.77	38.46	25	0.00	7.69	Epiberberine	75	69.23	76.92	56.48 $\pm$ 1.85	168.10 $\pm$ 5.51	50	46.15	46.15	25	0.00	7.69	Groenlandicine	75	76.92	69.23	51.19 $\pm$ 2.38	154.19 $\pm$ 7.17	50	53.85	53.85
Coptisine	75	53.85	61.54	66.67 $\pm$ 3.57	187.27 $\pm$ 10.03																																	
	50	30.77	38.46																																			
	25	0.00	7.69																																			
Epiberberine	75	69.23	76.92	56.48 $\pm$ 1.85	168.10 $\pm$ 5.51																																	
	50	46.15	46.15																																			
	25	0.00	7.69																																			
Groenlandicine	75	76.92	69.23	51.19 $\pm$ 2.38	154.19 $\pm$ 7.17																																	
	50	53.85	53.85																																			
	25	23.08	15.38																																			

<sup>a</sup>Final concentrations of test samples were 10–50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for the compounds, which were dissolved in 100% DMSO. <sup>b</sup>The inhibition percentage (%) was the same as in Table I. <sup>c,d</sup>The 50% inhibition concentrations ( $\mu\text{g}/\text{mL}$  and  $\mu\text{M}$ , respectively) were calculated from the log dose inhibition curve and expressed as the mean  $\pm$  SEM of duplicate experiments.

## ACKNOWLEDGMENTS

This study was financially supported by Pukyong National University under the 2007 Post-Doc. Program. This study was also supported by a grant from the Food Drug & Administration, South Korea (2007).

## REFERENCES

- Cho, J. Y., Kim, A. R., and Park, M. H., Lignans from the rhizomes of *Coptis japonica* differentially act as anti-inflammatory principles. *Planta Med.*, 67, 312-316 (2001).
- de la Fuente, J. A., Manzanaro, S., Martín, M. J., de Quesada, T. G., Reymundo, I., Luengo, S. M., and Gago, F., Synthesis, activity, and molecular modeling studies of novel human aldose reductase inhibitors based on a marine natural product. *J. Med. Chem.*, 46, 5208-5221 (2003).
- Doggrell, S. A., Berberine—a novel approach to cholesterol lowering. *Expert. Opin. Investig. Drugs.*, 14, 683-685 (2005).
- El-Kabbani, O., and Podjarny, A., Selectivity determinants of the aldose and aldehyde reductase inhibitor-binding sites. *Cell Mol. Life Sci.*, 64, 1970-1978 (2007).
- Grycová, L., Dostál, J., and Marek, R., Quaternary protoberberine alkaloids. *Phytochemistry*, 68, 150-175 (2007).
- Hayman, S. and Kinoshita, J. H., Isolation and properties of lens aldose reductase. *J. Biol. Chem.*, 240, 877-882 (1965).
- Hsieh, Y. S., Kuo, W. H., Lin, T. W., Chang, H. R., Lin, T. H., Chen, P. N., and Chu, S. C. Protective effects of berberine against low-density lipoprotein (LDL) oxidation and oxidized LDL-induced cytotoxicity on endothelial cells. *J. Agric. Food Chem.*, 55, 10437-10445 (2007).
- Huang, C., Zhang, Y., Gong, Z., Sheng, X., Li, Z., Zhang, W., and Qin, Y., Berberine inhibits 3T3-L1 adipocyte differentiation through the PPAR $\gamma$  pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 348, 571-578 (2006).
- Huang, K. C. *The pharmacology of Chinese herbs*, CRC press Inc., Boca Raton: FL., pp. 381-382 (1999).
- Hung, T. M., Lee, J. P., Min, B. S., Choi, J. S., Na, M., Zhang, X., Ngoc, T. M., Lee, I., and Bae, K., Magnoflorine from *Coptidis Rhizoma* protects high density lipoprotein during oxidant stress. *Biol. Pharm. Bull.*, 30, 1157-1160 (2007)
- Kawanishi, K., Ueda, H., and Moriyasu, M., Aldose reductase inhibitors from the nature. *Curr. Med. Chem.* 10, 1353-1374 (2003).
- Ko, W. H., Yao, X. Q., Lau, C. W., Law, W. I., Chen, Z. Y., Kwok, W., Ho, K., and Huang, Y. Vasorelaxant and antiproliferative effects of berberine. *Eur. J. Pharmacol.*, 399, 187-196 (2000).
- Kong, W., Wei, J., Abidi, P., Lin, M., Inaba, S., Li, C., Wang, Y., Wang, Z., Si, S., Pan, H., Wang, S., Wu, J., Wang, Y., Li, Z., Liu, J., and Jiang, J. D., Berberine is a novel cholesterol-lowering drug working through a unique mechanism distinct from statins. *Nat. Med.*, 10, 1344-1351 (2004).
- Kuo, C. L., Chi, C. W., and Liu, T. Y. The anti-inflammatory potential of berberine in vitro and in vivo. *Cancer Lett.*, 203, 127-137 (2004).
- Lee, H. S., Rat lens aldose reductase inhibitory activities of *Coptis japonica* root-derived isoquinoline alkaloids. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 7013-7016 (2002).
- Lee, H. Y. and Kim, C. W., Studies on the constituents of *Berberis amurensis* Ruprecht. *Kor. J. Pharmacogn.*, 28, 257-263 (1997).
- Manzanaro, S., Salva, J., and de la Fuente, J. A., Phenolic marine natural products as aldose reductase inhibitors. *J. Nat. Prod.*, 69, 1485-1487 (2006).
- Mizuno, M., Kijima, H., Iinuma, M., Tanaka, T., and Goto, K., Coumarin derivatives in *Coptis trifolia*. *Phytochemistry*, 31, 717-719 (1992).
- Nakai, N., Fujii, Y., Kobashi, K., and Nomura, K., Aldose reductase inhibitors: flavonoids, alkaloids, acetophenones, benzophenones, and spirohydantoin of chroman. *Arch. Biochem. Biophys.*, 239, 491-496 (1985).
- Nishimura, C., Yamaoka, T., Mizutani, M., Yamashita, K., Akera, T., and Tanimoto, T., Purification and characterization of the recombinant human aldose reductase expressed in baculovirus system. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1078, 171-178 (1991).
- Racková, L., Májeková, M., Kostálová, D., and Stefek, M. Antiradical and antioxidant activities of alkaloids isolated from *Mahonia aquifolium*. Structural aspects. *Bioorg. Med. Chem.*, 12, 4709-4715 (2004).
- Schinella, G. R., Tournier, H. A., Prieto, J. M., Mordujovich de Buschiazzo, P., and Rios, J. L. Antioxidant activity of anti-inflammatory plant extracts. *Life Sci.*, 70, 1023-1033 (2002).
- Shirwaikar, A., Shirwaikar, A., Rajendran, K., and Punitha, I. S. In vitro antioxidant studies on the benzyl tetra isoquinoline alkaloid berberine. *Biol. Pharm. Bull.*, 29, 1906-1910 (2006).
- Sun, J., Ma, J. S., Jin, J., Wang, H. S., Wen, Q. H., Zhang, H. G., and Zhou, Q. L., Qualitative and quantitative determination of the main components of huanglianjiadu decoction by HPLC-UV/MS. *Yao Xue Xue Bao.*, 41, 380-384 (2006).
- Tang, L. Q., Wei, W., Chen, L. M., and Liu, S., Effects of berberine on diabetes induced by alloxan and a high-fat/high-cholesterol diet in rats. *J. Ethnopharmacol.*, 108, 109-115 (2006).
- Tse, W. P., Che, C. T., Liu, K., and Lin, Z. X. Evaluation of the anti-proliferative properties of selected psoriasis-treating Chinese medicines on cultured HaCaT cells. *J. Ethnopharmacol.*, 108, 133-141 (2006).
- Yahara, S., Satoshiro, M., Nishioka, I., Nagasawa, T., and Oura, H., Isolation and characterization of phenolic compounds from *Coptidis Rhizoma*. *Chem. Pharm. Bull.*,

- 33, 527-531 (1985).
- Yokozawa, T., Satoh, A., Cho, E. J., Kashiwada, Y., and Ikeshiro, Y., Protective role of *Coptidis Rhizoma* alkaloids against peroxynitrite-induced damage to renal tubular epithelial cells. *J. Pharm. Pharmacol.*, 57, 367-374 (2005).
- Yoshikawa, K., Kinoshita, H., Kan, Y., and Arihara, R., Neolignans and phenylpropanoids from the rhizomes of *Coptis japonica* var. *dissecta*. *Chem. Pharm. Bull.*, 43, 578-581 (1995).
- Yuan, L., Tu, D., Ye, X., and Wu, J., Hypoglycemic and hypocholesterolemic effects of *Coptis chinensis* franch inflorescence. *Plant Foods Hum. Nutr.*, 61,139-144 (2006).

## 주 의

1. 이 보고서는 식품의약품안전청에서 시행한 용역연구개발과제의 최종보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 식품의약품안전청에서 시행한 용역연구개발과제의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.
4. 이 보고서 내용을 신문, 방송, 참고문헌, 세미나 등에 인용 시에는 해당 주관부서 또는 연구책임자와 사전에 상의하여 주시기 바랍니다.