

더덕을 주요성분으로 함유한
항알러지/항아토피 기능성 화장품 제제 개발에관한연구

(Development of combined cosmetic preparations
containing *Codonopsis lanceolata*)

강 원 대 학 교

농림수산식품자료실



0017669

농 립 수 산 식 품 부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “더덕을 주요성분으로 함유한 항알러지/항아토피 기능성 향장품
제제 개발에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2009 년 4 월 20 일

주관연구기관명 : 강원대학교

협동연구기관명 : 중앙대학교

참여기업 : 태기산더덕영농법인

주관연구책임자 : 조 재 열

세부연구책임자 : 홍 역 기

협동연구책임자 : 이 재 휘

연 구 원 : 김 병 훈

연 구 원 : 김 주 영

연 구 원 : 이 용 규

연 구 원 : 김 석 영

연 구 원 : 김 병 윤

연 구 원 : 홍 역 기

연 구 원 : 이 희 환

연 구 원 : 강 두 진

연 구 원 : 안 효 실

연 구 원 : 이 재 휘

연 구 원 : 허 진 서

요 약 문

I. 제 목

더덕을 주요성분으로 함유한 항알러지/항아토피 기능성 향장품 제제 개발에 관한 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발의 목적

본 연구의 목적은 항알러지/항아토피 기능성 소재인 더덕추출물 사포닌 분획을 피부에 적용하는 항알러지/항아토피 기능성 화장품제형을 개발하기 위한 효능평가 연구를 수행하고 기능성 향장품제형의 개발과 생산기술 확보를 목적으로 하고 있다.

- 제 1세부

본 연구는 더덕의 활성 분획 및 활성성분을 이용하여 In vitro 및 In vivo 효능평가를 실시하고, 효과적인 항알러지/항아토피 소재를 탐색하는 것을 목적으로 하고 있다. 이를 통해, 항알러지/항아토피 기능성 소재 탐색 시 근원적인 병인을 치유할 수 있는 면역학적 연구모형을 확립함으로써 더덕 이외에도 향후 국내 생약 및 약용식물을 이용한 다양한 소재개발 연구 시 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

- 제 2세부

국내에서는 더덕을 이용한 항알러지/항아토피 기능성 향장품 연구는 전무한 상황이다. 현재까지도 더덕의 분획화를 통해 항알러지/항아토피 효능을 이용한 향장품제제 개발 또는 연구가 매우 미흡한 실정이다. 더덕유래 활성물질의 분리정제를 통하여 활성분획의 고수율과 더불어 활성물질의 고순도 분리정제 기술을 개발할 필요가 있으며, 항알러지/항아토피 관련 고효능/고순도의 생리활성물질을 대량생산할 수 있는 추출 및 분리정제 공정 최적화 기술을 개발할 필요가 있다.

- 협동과제

본 협동연구의 목적은 항알러지/항아토피 기능성 소재를 피부에 적용하여 항알러지/항아토피 기능성 화장품제형을 개발하기 위한 기초연구를 수행하고 기능

성화장품제형의 개발과 생산기술을 확보함을 목적으로 하고 있다. 고효능 고기능성 항알러지/항아토피 생리활성물질 함유 기능성 화장품제품의 개발은 피부 국소로 그 작용이 제한되는 다른 활성물질에 대해서도 적용이 가능한 광범위한 기반기술로 판단된다.

2. 연구개발의 필요성

아토피 증상이나 알러지 질환은 산업의 발달, 식생활의 서구화 및 인스턴트화, 심각한 환경오염 발생, 새집증후군과 같은 신종 질병 등과 함께 동반되면서, 21세기에 접어들어 더욱 꾸준히 증가하고 있는 추세이다. 이와 같은 아토피성 및 알러지성 피부염의 발병 추세는 국내뿐 아니라 서구사회나, 심지어 개발이 진행되고 있는 여러 후진국에서 조차도 심각하게 발생되고 있으므로, 이들 질환 치료제는 범세계적인 시장수요를 창출할 것으로 예상되고 있다.

특히 주 환자군이 어린 아이들이라는 점 때문에 항알러지/항아토피 질환 치료제는 무엇보다 안전하고 효과가 뛰어나야 하며, 이를 위해서는 새로운 합성적 방법에 의한 치료제 개발보다는, 기존부터 이미 알려져 있는 안전한 생약이나 식용 식물로부터 치료자원을 소재화하는 것이 더 타당한 것으로 받아들여지고 있다.

또한 알러지나 아토피성 질환은 계절적 요인, 환경적 요인 및 식이적 요인 등이 복합적으로 다양하게 작용함으로써 발생되며, 대부분 회피할 수 없는 환경이나 삶의 패턴 때문에 악화되거나 치유되는 현상이 반복적으로 진행되기도 한다.

심각한 아토피성 피부염 환자들은 사회생활의 지장을 초래할 정도로 이들 질환은 큰 사회적인 과장을 불러일으키고 있으며, 실제 치유된 아토피 환자들의 경우는 삶의 질을 향상시켰다는 차원에서 환자 개인뿐 아니라 사회전반에 걸쳐 큰 영향을 끼치고 있다. 따라서, 증상을 완화시키는 대중적 요법 치료제 보다는 근원적인 원인을 제거해주는 강력한 치료제 개발이 시급한 실정이다.

질병 치료에 대한 필요성 외에도 지역경제 회복과 지방 자립도 향상에 기여할 지역특산물을 이용한 기능성 화장품 제제화 연구 필요성 부각되고 있다. 이러한 이유로 황성의 주요 특산물의 하나인 더덕을 이용한 기능성 화장품 제제화 연구는 성공적으로 수행 시 더덕 생산 농가의 소득향상에 기여하게 되며, 이는 황성지역의 경제 부흥과 지방 자립도 향상에 크게 이바지할 것으로 판단된다.

또한 기존에 식품으로서의 역할에서 화장품으로서의 소재전환에 따른 더덕의 제품 다양성을 부여함으로써 관련 산업의 성장 및 이에 따른 황성지역 주민의 고용효과가 상승될 것으로 기대됨에 따라, 본 연구의 성공적 수행은 지방 특산물의 고부가 가치화 및 기능성화 추진 성공모델이 될 것으로 예상된다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

- 제 1세부

1) T세포/수지상세포 기능 억제분획 연구

1-1) Th2 분화조절능 평가

- Th2 세포로부터 IL-4 분비능 억제효과
- Th1 세포로부터 IL-12 분비능 항진효과

1-2) Th1 분화 촉진 유도 수지상세포 기능 항진효과 평가

- 수지상세포의 Th2 분화 억제효과 평가
- 수지상세포의 Th1 분화 촉진 효과 평가

2) 비만세포/대식세포 기능 억제분획 효능평가 연구

2-1) 비만세포/대식세포 기능 억제효과 평가

- 알러지 유도 화학물질 분비억제효과 평가
- 알러지 유도 사이토카인 분비억제효과 평가

2-2) 더덕 효능성분의 항알러지/항아토피 효과 기전연구

- Th2반응 억제 기전연구
- 비만세포 기능 억제 기전연구

3) 동물실험 및 예비임상 실험 연구

3-1) 동물실험을 이용한 효능평가

- 접촉성피부염 모델을 이용한 효능 평가
- 히스타민 유리 유도 모델을 이용한 효능평가

3-2) 예비임상실험을 이용한 효능평가

- 피부 자극성 시험
- 인체 항알러지/항아토피 치료효능 예비 평가

- 제 2세부

1) 생리활성 추출 및 단일성분 분리

- 1-1) 추출물 제조 및 수율 검토
 - 용매(열수, 에탄올, 메탄올 등)별 추출물 제조
 - 용매별 추출 수율 검토
- 1-2) 단일물질 분리정제
 - 단일 활성물질 분리법 확립
 - 단일 활성물질의 물리화학적 특성연구

- 2) 생리활성물질 분리정제 기술개발
 - 2-1) 생리활성물질 분리정제
 - 생리활성물질 분리정제 조건 확립
 - 생리활성물질 함량분석
 - 2-2) 생리활성물질 특성분석
 - 생리활성물질 특성분석
 - 생리활성물질 분리정제 수율제고

- 3) 생리활성 단일물질 분리공정 최적화
 - 3-1) 분리정제공정 개발
 - 분리정제 수율 촉진 및 저해요인 검토
 - 분리정제 최적 조건 검토
 - 3-2) 생산성 극대화를 위한 공정 최적화
 - 분리정제 고수율 기술개발
 - 고수율 최적화 공정시스템 구축

- 협동과제

1) 더덕추출물의 예비제형 평가

1-1) 더덕추출물의 물성 평가

- 수용해성 평가
- 더덕추출물 함유 수용액의 경시안정성 평가

1-2) 더덕추출물 함유 지질나노입자 개발

- 지질나노입자의 제조법 확립
- 지질나노입자의 특성 분석

2) 더덕추출물 함유 반고형 제형의 설계와 방출특성 평가

2-1) 더덕추출물 함유 반고형 제형의 제조

- 크림제형(O/W 크림 및 W/O 크림)
- 친수성 반고형 제형
- 친유성 반고형 제형

2-2) 더덕추출물의 방출특성 평가

- 더덕추출물의 방출량 분석법 수립
- 방출시험 장치 고안
- 방출특성 평가

3) 더덕추출물 함유 기능성 화장품 제형의 조성 결정 및 제조공정 수립

3-1) 더덕추출물 함유 크림제의 제형 조성 및 제조방법 확립

- 더덕추출물 함유 크림제 조성
- 더덕추출물 함유 크림제 제조방법

3-2) 더덕추출물 함유 에센스제의 제형 조성 및 제조방법 확립

- 더덕추출물 함유 에센스제 조성
- 더덕추출물 함유 에센스제 제조방법

3-3) 더덕추출물 함유 팩제의 제형 조성 및 제조방법 확립

- 더덕추출물 함유 팩제 조성
- 더덕추출물 함유 팩제 제조방법

IV. 연구개발결과

- 제 1세부

1) Th2 및 Th1 분화조절능 평가

더덕의 각 분획별 추출물을 Balb/c mice에서 얻은 비장세포에 전처리 한 후, T세포의 mitogen인 concanavalin A 및 phytohemagglutinin (PHA)를 처리하여 T세포의 증식을 유도하였다. 그리고 그 상층액을 취하여 T세포가 분비한 IL-4와 IFN- γ 의 양을 ELISA 법을 이용하여 정량하였다. 그 결과 더덕의 열수추출물과 Hexane 분획에서 IL-4와 IFN- γ 의 양이 증가하였다. 따라서 더덕의 열수추출물과 Hexane 분획은 T세포의 Th2/Th1 분화조절능이 있을 것으로 생각된다. 또한 더덕의 지상부/지하부 추출물을 이용하여 T세포 분화 유도에 중요한 역할을 하는 대식세포에서 Th2/Th1반응에 관여하는 유전자인 COX-2와 IL-12의 발현 정도를 RT-PCR 방법을 통해 확인하였다. 그 결과 지상부의 경우 COX-2와 IL-12의 mRNA 발현이 모두 억제되었으며, 지하부는 IL-12의 mRNA 발현만을 억제하였다.

2) 비만세포/대식세포 기능 억제 효과 및 더덕 효능성분의 항알러지/항아토피 효과 기전연구

더덕의 각 분획별 추출물의 효능을 비만세포에 처리 후 분비되는 β -hexosaminidase의 양을 β -hexosaminidase 정량법을 이용하여 정량하였다. 그 결과 더덕의 각각의 분획들이 β -hexosaminidase의 방출을 유의적으로 억제하는 것을 확인하였다. 또한 더덕의 각 분획별 추출물을 대식세포에 처리 후 FITC-dextran 탐식 정도를 Flow cytometry를 이용하여 정량한 결과 더덕 부탄올 분획의 사포닌 성분이 대식세포의 탐식능을 강력히 억제하였다. 그리고 대식세포에서 분비되는 사이토카인 중 알러지/아토피 반응에 관여하는 TNF- α 와 PGE2의 생성능을 ELISA 법을 이용해 측정하였으며, 더덕의 부탄올 사포닌 성분에 의해 강력히 억제된 것을 확인하였다.

3) 동물실험 및 예비임상 실험 연구

이전의 연구를 바탕으로 피부염에 대한 동물 실험 및 예비임상 실험을 진행한 결과, PGE2에 의한 염증 반응 및 인체를 대상으로 한 임상 실험에서 더덕 유래의 사포닌 성분에 대한 효과를 확인할 수 있었다. 더덕 유래 사포닌 성분은 ICR mice에서의 경구 투여와 인체에 대한 피부 치료에서 효과를 보였으며, 이러한 것은 피부를 통한 치료뿐만 아니라 경구 투여를 통해서도 효과가 있음을 나타낸다. 본 연구팀은 이러한 결과들을 통해서 더덕 유래의 사포닌 분획이 PGE2 유래의 염증 반응 및 알러지/아토피 피부염에 대해 효과가 있음을

확인하였고, 인체에 대한 부작용이 없음 또한 확인하였다.

- 제 2세부

1) 생리활성물질 추출 및 단일성분 분리

각 용매별로 추출물을 제조하여 각각의 수율을 확인하고, 가장 수율이 좋은 열수 추출물을 이용하여 다당체를 분리하였다. 또한 HPLC를 사용한 다당체의 구성성분과 특성검토를 통해 더덕유래 다당체는 fructose와 glucose로 이루어짐을 확인하였다. 각 추출물별 NO억제능 실험을 통해 최적 활성분획이 butanol 추출물임을 확인하였다.

2) 생리활성물질 분리정제 기술개발

인삼 saponin 추출방법을 응용하여 생리활성물질인 crude saponin를 추출 및 분리하였으며, 함량분석 및 HPLC를 사용하여 구성성분이 ginsenoside-Re와 ginsenoside-Rg1와 유사한 구조임을 확인하였다. 또한 각 layer 별 NO억제능을 확인하고, 가장 효능이 좋은 cascade butanol saponin 활성분획의 구성성분과 활성물질 함량 분석을 하였으며, 활성물질의 특성을 검토 하였다. 그 결과 crude saponin의 구성성분과 다른 물질로 구성되어 있음을 확인하였다.

3) 생리활성물질 분리공정 최적화

가장 좋은 활성분획의 제조 및 추출수율 최적조건 확립을 위해 시간 및 volume에 변화를 주어 단계별 최적화 조건을 검토하여 최적 조건을 확인하였으며, 그 결과로 얻어진 추출물의 함량을 확인하였다. 그 결과 시간이 증가함에 따라 비례적으로 추출수율이 증가하였지만, 효율적인 면에서는 크게 차이가 나지 않았다. Volume 역시 양의 증가에 따라 추출수율도 증가하였지만, 그 정도는 크게 증가하지 않았다. 또한 생리활성물질 분리시 일부가 소실됨을 확인하였으며 이에 따라 추출 과정에서 소실되는 생리활성물질의 양을 줄이는 방안을 마련할 필요가 있었다.

- 협동과제

1) 더덕추출물의 예비제형 평가

본 연구에서는 기능성 화장품 제형 설계에 필요한 더덕추출물의 물리화학적 특성들을 평가하였다. 더덕추출물의 물에 대한 용해성, 용액상태에서의 안정성, 그리고 지질 나노입자로의 가공이 가능한지를 평가하였다. 더덕추출물은 수용성을 띠기 때문에 유제형 제형이나 수용성 기체에 함유되기에 적합한 것으로 판명되었다. 더덕추출물의 물성상 지용성 환경에 탑재되기에 어려움이

예측 되었으나 더덕추출물 함유 지질 나노입자도 성공적으로 제조가 되었다.

2) 더덕추출물 함유 반고형 제형의 설계와 방출특성 평가

더덕추출물 함유 O/W 크림, W/O 크림, 수용성 기제로만 이루어진 제형, 지용성 기제를 사용한 제형 등을 제조하여 이들 기제들로부터 더덕추출물의 방출 특성을 평가하였다. 더덕추출물의 방출특성을 평가하기 위해 방출실험 모델을 수립하였다. 방출실험 결과 수용성 환경이 외상(external phase)이 되는 O/W 크림 기제와 친수성 고분자 물질들로만 이루어진 친수성 기제가 가장 우수하였다. 이중에서도 특히 O/W 기제는 신속하고도 지속적으로 더덕추출물을 방출할 수 있었기에 더덕추출물을 가장 효율적으로 피부에 전달 할 수 있는 기제라고 생각되었다.

3) 더덕추출물 함유 기능성 화장품 제형의 제조공정 수립 및 시제품 제작

물을 외상으로 함유하는 O/W 크림제와 주로 물을 기제로 사용하는 에센스 제형, 그리고 피부보습과 아토피피부염 부위에 장시간 더덕추출물을 전달하기 위한 수단으로 팩제를 설계하였다. 이상 3종의 화장품 제형의 실험실적 처방을 확립하였고 대량생산에 적합한 제조공정을 적용하여 제조공정을 수립하였다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획(필요에 따라 제목을 달리할 수 있음)

1. 연구성과 활용 실적

논문 4건

특허 3건

인력양성 박사 1건 석사 4건

2. 연구성과 활용계획

- 제 1세부

- 1) 염증 반응에 관련된 효능 평가 시스템을 확립함으로써 보다 효율적으로 염증 억제 효능 평가를 조금 더 효과적으로 진행할 수 있으며, 현재의 결과들을 대조군으로 사용 가능함.
- 2) 알러지/아토피 반응에 관련된 효능 평가 시스템을 확립함으로써 보다 효율적으로 염증 억제 효능 평가를 진행할 수 있으며, 현재의 결과들을 대조군으로 사용 가능함. 또한 In vitro에서의 평가 뿐만 아니라 In vivo에 대한 평가가 가능하므로 실용 가능성을 높일 수 있음.

- 3) 더덕 유래의 사포닌 성분이 염증 반응 및 알러지/아토피 반응에 효과가 있음을 확인하였으며, 동물 실험 및 예비 임상을 통해 부작용이 없음을 밝혀내었고, 그 효과를 확인하였다. 따라서 이러한 결과를 통해 직접적으로 알러지/아토피 질환 치료제로 적용이 가능함.

- 제 2세부

- 1) 더덕유래 활성물질의 분리정제 방법에 사용된 효능을 갖는 단일물질 분리방법을 다른 생리활성 천연물에도 적용하여 활성물질 탐색과 분리정제에 이용.
- 2) 더덕유래 향장품 개발시 최적생산 및 분리정제 공정기술을 이용하여 적은비용으로 더덕에서의 활성물질을 고순도 고수율로 생산해 낼 수 있음.

- 협동과제

- 1) 본 연구를 통해 크림제, 에센스제, 그리고 팩제 등 3종의 더덕추출물 사포닌 분획 함유 향아토피/항알러지 화장품 제형이 개발되었으나 더덕추출물의 지속적인 피부적용의 한 방법으로 더덕추출물 함유 미용비누의 시제품을 제작하였다. 이를 통해 세안과정(미용비누)과 세안후(크림제/에센스제), 그리고 취침전(팩제) 등 다양한 생활 조건에서 향아토피/항알러지 효과가 유지되도록 하였으며 이들 4종의 화장품 제형을 하나의 통합된 아토피 케어 전문 화장품으로 개발을 추진할 수 있는 기반을 마련하였다.

SUMMARY

I. Title

Development of combined cosmetic preparations containing *Codonopsis lanceolata*

II. Objectives and Significance

Codonopsis lanceolata, is regarded as one of the well-known edible and biofunctional herb with a great deal of interest. Saponins are the major component of this plant that displays various biological activities such as antidiabetic, anticancer, anti-inflammatory and antihyperlipidemic effects. In this study, we compared the in vitro and in vivo anti-allergic and anti-atopic dermatitis potency of solvent fractions, prepared from the root of *Codonopsis lanceolata*. Furthermore, their molecular mechanisms on the pathophysiological activation of macrophages, monocytes and splenic lymphocytes have been investigated.

Secondly, using *Codonopsis lanceolata*, there has been only a few cosmetic applications for anti-allergy and anti-atopic dermatitis. It has been known that the cosmetic products utilizing the efficacy of anti-allergy and anti-atopic dermatitis have been little developed through fractionization to obtain the purified extracts. It has been required to develop the purification technology for the high recovery and purity of biological response modifier derived from *Codonopsis lanceolata*. In addition, it has been needed to develop the optimal process technology for extraction and purification in order to mass-produce the highly purified biological response modifier showing the activity of anti-allergy and anti-atopic dermatitis.

In the final part of this project, the primary aim of this research was to perform basic studies to design anti-allergic/atopic functional cosmetic dosage forms and develop cosmetic products and related manufacturing technologies. The development technology of highly efficient anti-allergic/atopic bioactive materials-containing functional cosmetic products can be applied to other bioactive materials that should be delivered topically to the skin.

III. Scope

Part 1

1. Evaluation of functional activation of T and antigen presenting cells
 - 1.1. Evaluation of Th2 differentiation
 - 1.2. Evaluation of functional activation of antigen presenting cells
2. Evaluation of functional activation of mast cells and macrophages
 - 2.1. Evaluation of functional activation of mast cells and macrophages
 - 2.2. Evaluation of anti-atopic mechanism
3. Evaluation of anti-atopic activities using animal model and pre-clinical study
 - 3.1. anti-atopic effect in animal model
 - 3.2. anti-atopic effect in human

Part 2

1. Extraction and purification of biological response modifier
 - 1.1. Extract preparation and recovery
 - 1.2. Purification technology
2. Development of purification technology
 - 2.1. Purification of biological response modifier
 - 2.2. Characterization of biological response modifier
3. Optimization of purification process
 - 3.1. Development of purification process
 - 3.2. Process optimization for maximal productivity

Part 3

1. Preformulatory evaluation of the extract of *Codonopsis lanceolata*
 - 1.1. Aqueous solubility of the extract
 - 1.2. Stability monitoring as a function of time
2. Development of semisolid cosmetic dosage forms and evaluation of release properties
 - 2.1. Preparation of semisolid cosmetic dosage forms
 - 2.2. Release properties of the extract of *Codonopsis lanceolata* from the dosage forms
3. Formulation determination and establishment of production procedures of cosmetic dosage forms
 - 3.1. Formulation and production of the cream containing the extract of *Codonopsis lanceolata*
 - 3.2. Formulation and production of the essence containing the extract of

Codonopsis lanceolata

3.3. Formulation and production of the pack containing the extract of *Codonopsis lanceolata*

IV. Results and Recommendation

Part 1

1. Evaluation of functional activation of T and antigen presenting cells

The molecular immunological effects of fractions from *Codonopsis lanceolata* on cell viability, the production of cytokines and cytotoxic molecules as well as their mechanism were evaluated using splenic T cells. Fractions did not block normal cell viability of splenic T lymphocytes. Hot water extract and hexane fraction strongly up-regulated IL-4 and IFN-gamma production. In addition, Fractions from *odonopsis lanceolata* negatively modulated the expression of IL-12 and COX-2, which are known to be critical factors in atopic dermatitis symptoms.

2. Evaluation of functional activation of mast cells and macrophages

The effect of fractions from *Codonopsis lanceolata* on the production of histamine, a critical pathophysiological factor in atopic symptom, was examined using hexosaminidase assay. Of fractions, saponin fraction showed significant inhibition of beta-hexosaminidase release. In addition, fractions strongly suppressed FITC-dextran uptake, assessed by flow cytometry. Saponin fraction from *Codonopsis lanceolata* strongly suppressed PGE2 and TNF-alpha production as assessed by ELISA. Finally, the fractions also modulated cell-cell adhesion seen in skin inflammatory conditions.

3. Evaluation of anti-atopic activities using animal model and pre-clinical study

The in vivo efficacies of saponin fraction from *Codonopsis lanceolata* were evaluated using animal and human volunteer. Saponin fraction nicely suppressed skin rash induced by allergen DNCB. Furthermore, this fraction also inhibited in vivo ear edema-induced by arachidonic acid, a strong inflammatory inducer. In agreement with previous results, this fraction also normalized atopic symptoms of atopic dermatitis patient without skin irritation phenomena. Interestingly, saponin fraction also showed anti-stress effect. Thus this fraction recovered higher serum levels of GOT and GPT, parameters seen under stress-induced

liver damage conditions. Therefore, our data suggest that saponin fraction from *Codonopsis lanceolata* can be developed as potent and valuable anti-atopic dermatitis biomaterial with anti-inflammatory and anti-stress properties.

Part 2

1. Extraction and purification of biological response modifier

The extraction yields were examined with various solvents. Polysaccharide was purified from hot-water extract showing the best extraction yield. By using HPLC, it was confirmed that polysaccharide consisted of glucose and fructose. The optimal active fraction was known to be the butanol extract by the experiment of the inhibition activity against NO production.

2. Development of purification technology

The crude saponin was extracted and purified with the modified extraction method of ginseng saponin. It was confirmed that the constituents were ginsenoside-Re and ginsenoside-Rg1 by HPLC. And the inhibition activity against NO production was studied with each fraction. The cascade butanol fraction of crude saponin showed the best inhibition activity. The compositions and contents of this fraction were examined, resulting in containing the crude saponin compositions and other compounds.

3. Optimization of purification process

In order to establish the optimal conditions for the active fraction and the extraction yield, extraction time and volume were varied. The content was examined from the established optimal conditions. The extraction yield was proportionally increased with increase in time. However, there was no significant difference in yield with respect to efficiency. The extraction yield was also increased a little with increase in volume with showing no great difference. There was a loss in purification process of biological response modifier. Thus, it was necessary to find the way to reduce the loss in purification process.

Part 3

1. Preformulatory evaluation of the extract of *Codonopsis lanceolata*

The extract of *Codonopsis lanceolata* was evaluated for aqueous solubility, time-stability profile together with chromatographic determination method. The possibility of being incorporated into the solid lipid nanoparticles was also

examined. The extract of *Codonopsis lanceolata* was highly hydrophilic and this indicated that water-bearing formulation is suitable for the extract. Although the extract is hydrophilic material, it can be incorporated into the lipid nanoparticles.

2. Development of semisolid cosmetic dosage forms and evaluation of release properties

The extract of *Codonopsis lanceolata* was added to four different cosmetic dosage forms such as O/W cream, W/O cream, hydrophilic base, and lipophilic base. Then the release property of the extract was evaluated to select suitable bases for use in the treatment of anti-allergic/atopic dermatitis. O/W cream formulation and hydrophilic base showed excellent release behavior of the extract of *Codonopsis lanceolata*.

3. Formulation determination and establishment of production procedures of cosmetic dosage forms

Formulation determination and production procedures of three types of cosmetic dosage forms were performed such as cream, essence and pack. All the formulation contained aqueous media, thus the extract of *Codonopsis lanceolata* could be stably incorporated in the cosmetic dosage forms.

CONTENTS

Summary	1
Chapter 1. Outline of the research project	19
1. Economical and industrial Significances of the research field and the necessity of the research	19
1) Necessity of the research	19
2) Outcome of the research	20
Chapter 2. The state of art in the country and abroad	22
1. International state	22
2. Domestic state	24
3. The research state of art in the country and abroad	24
Chapter 3. Contents and results of the research	27
1. Contents and results of the research of group 1	27
1) Evaluation of functional activation of T and antigen presenting cells	29
2) Evaluation of functional activation of mast cells and macrophages	44
3) Evaluation of anti-atopic activities using animal model and pre-clinical study	58
2. Contents and results of the research of group 2	76
1) Extraction and purification of biological response modifier	77
2) Development of purification technology	100
3) Optimization of purification process	118
3. Contents and results of the research of group 3	160
1) Preformulatory evaluation of the extract of <i>Codonopsis lanceolata</i>	161
2) Development of semisolid cosmetic dosage forms and evaluation of release properties	168

3) Formulation determination and establishment of production procedures of cosmetic dosage forms	177
Chapter 4. Objective achievement and contribution to relative field	184
Chapter 5. Application plan of results	188
Chapter 6. Science technology informations collected from abroad during research program	193
Chapter 7. References	196
Appendix. Published articles, patents, and other achievements	204

목 차

요 약 문	1
제 1장 연구개발과제의 개요	19
제 1절 연구개발대상 기술의 경제적·산업적 중요성 및 연구개발의 필요성 ..	19
1. 연구개발의 필요성	19
2. 연구개발결과의 활용방안 및 기대성과	20
가. 연구개발 결과의 활용방안	20
나. 기대성과	20
제 2장 연구개발대상 기술의 국내외 현황	22
제 1절. 세계적 수준	22
제 2절. 국내 수준	24
제 3절. 국내·외의 연구 현황	24
제 3장 연구개발 수행 내용 및 결과	27
제 1절. 제 1 세부과제 연구개발수행 내용 및 결과	27
1. 연구개발 수행내용	27
2. 연구수행 결과	29
(1) T세포/수지상세포 기능 억제분획 연구	29
(2) 비만세포/대식세포 기능 억제분획 효능평가 연구	44
(3) 동물실험 및 예비임상실험을 이용한 효능평가	58
제 2절. 제 2 세부과제 연구개발수행 내용 및 결과	76
1. 연구개발 수행내용	76
2. 연구수행 결과	77
(1) T세포/수지상세포 기능 억제 평가용 더덕 분획 제조 및 억제 단일성분 분리	77
(2) 비만세포/대식세포 기능 억제 물질 분리정제 기술개발	100
(3) 항알러지/항아토피 분획 및 단일물질 분리공정 최적화	118
제 3절. 협동과제 연구개발수행 내용 및 결과	160
1. 연구개발 수행내용	160
2. 연구수행 결과	161

(1) 더덕함유 기능성 신소재의 물성연구 및 분석법 확립 및 더덕함유 기능성 신소재 함유 향장품 제제설계 연구	161
(2) 더덕함유 기능성 향장품 제제 개발 연구	168
(3) 기능성 향장품의 생산기술 확립	177
제 4장 목표 달성도 및 관련 분야에서의 기여도	184
제 1절 1차년도 목표달성도	184
제 2절 2차년도 목표달성도	185
제 3절 4차년도 목표달성도	186
제 4절 관련 분야에서의 기여도	187
제 5장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	188
제 1절 연구성과	188
1. 논문게재 성과	188
2. 특허 성과	189
3. 국내외 학술발표 성과	190
4. 인력활용/양성 성과	191
제 2절 연구성과 활용계획	192
1. 제 1세부 연구성과 활용계획	192
2. 제 2세부 연구성과 활용계획	192
3. 제 3세부 연구성과 활용계획	192
제 6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	193
제 7장 참고문헌	196
부 록	205

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1절. 연구개발대상 기술의 경제적·산업적 중요성 및 연구개발의 필요성

1. 연구개발의 필요성

▶ 국내외적으로 아토피 및 알러지 질환 발생 증가

세계일보 2005년 12월 27일 기사

최근, 서울에 사는 6살 미만 아동 10명 가운데 4명 꼴로 아토피성 피부염을 앓았던 것으로 나타나 이들 질환의 심각성이 강력히 제기되고 있음. 즉, 6살 미만 아동 866명 중 41.7%가 아토피성 피부염을 앓은 적이 있는 것으로 파악됐고, 전체 응답자 가운데 22%는 최근 1년 동안 아토피 증상이 나타난 것으로 조사되었음. 또한 23.6%는 아토피성 피부염과 함께 천식을 앓은 적이 있다고 답하였고, 알레르기 비염과 알레르기 결막염을 같이 앓은 아동도 각각 32%와 24%로 조사되었음

- 아토피 증상이나 알러지 질환은 산업의 발달, 식생활의 서구화 및 인스턴트화, 심각한 환경오염 발생, 새집증후군과 같은 신종 질병 등과 함께 동반되면서, 21세기에 접어들어 더욱 꾸준히 증가하고 있는 추세임.

- 이와같은 아토피성 및 알러지성 피부염의 발병 추세는 국내뿐 아니라 서구사회나, 심지어 개발이 진행되고 있는 여러 후진국에서 조차도 심각하게 발생되고 있으므로, 이들 질환 치료제는 범세계적인 시장수요를 창출할 것으로 예상되고 있음.

▶ 주 환자층인 어린아이들을 대상으로 하는 안전하고 효과적인 치료제 개발요구

- 특별히 주 환자군이 어린 아이들이라는 점 때문에 항알러지/항아토피 질환 치료제는 무엇보다 안전하고 효과가 뛰어나야 하며, 이를 위해서는 새로운 합성적 방법에 의한 치료제 개발보다는, 기존부터 이미 알려져 있는 안전한 생약이나 식용 식물로부터 치료자원을 소재화하는 것이 더 타당한 것으로 받아들여지고 있음.

▶ 잦은 재발이 동반되는 질환이므로 근원인 치료제 개발이 요구

- 알러지나 아토피성 질환은 계절적 요인, 환경적 요인 및 식이적 요인 등이 복합적으로 다양하게 작용함으로써 발생되며, 대부분 회피할 수 없는 환경

이나 삶의 패턴 때문에 악화되거나 치유되는 현상이 반복적으로 진행되기도 함.

- 심각한 아토피성 피부염 환자들은 사회생활의 지장을 초래할 정도로 이들 질환은 큰 사회적 파장을 불러일으키고 있음.
- 실제 치유된 아토피 환자의 경우는 삶의 질을 향상시켰다는 차원에서 환자 개인뿐 아니라 사회전반에 걸쳐 큰 영향을 끼치고 있음.
- 따라서, 증상을 완화시키는 대중적 요법 치료제 보다는 근원적인 원인을 제거해주는 강력한 치료제 개발이 시급한 실정임.

▶ 지역경제 회복과 지방 자립도 향상에 기여할 지역특산물을 이용한 기능성 향장품 제제화연구 필요성 부각

- 지역주민의 경제적인 향상과 지방자치단체의 수입증대는 인구감소 추세와 지방자립화 시대에 접어들면서 생존을 위한 전략적 필요성으로 부각되고 있음.
- 황성의 주요 특산물의 하나인 더덕을 이용한 기능성 향장품 제제화 연구는 성공적으로 수행 시 더덕 생산 농가의 소득향상에 기여하게 되며, 이는 황성지역의 경제 부흥과 지방 자립도 향상에 크게 이바지할 것으로 판단됨.
- 또한 기존에 식품으로서의 역할에서 향장품으로의 소재전환에 따른 더덕의 제품 다양성을 부여함으로써 관련 산업의 성장 및 이에 따른 황성지역 주민의 고용효과가 상승될 것으로 기대됨.
- 본 연구의 성공적 수행은 지방 특산물의 고부가 가치화 및 기능성화 추진 성공모델이 될 것으로 예상됨.

2. 연구개발결과의 활용방안 및 기대성과

가. 연구개발결과의 활용방안

- 더덕의 생리활성물질에 대한 향장품 가공처리 기술 개발에 따른 더덕관련 향장품 가공제품의 기능성 증대에 활용
- 향장품 관련업체에 기술을 이전하여 고품질/고기능성 향장가공제품 생산에 활용
- 가공시 제품 제작을 통한 고부가가치의 가공제품 개발 가능성을 제시하여 부작용이 적고 효과가 항알러지/항아토피 효과가 증대된 고기능성 향장품 개발 의욕 및 관련산업 활성화 유도
- 개발된 최적 항알러지성/항아토피성 향장품 연구 및 제품 생산공정 기술을 다양한 기능성 향장 가공제품 생산성 향상에 활용
- 더덕의 신규 활성에 따른 특허등록 및 권리 확보에 활용
- 항알러지/항아토피 성분을 차후 신약으로 개발 활용

나. 기대성과

(1) 기술적 측면

- 항알러지/항아토피 기능성 소재 탐색시 근원적인 병인을 치유할 수 있는 방법적인 면역학 연구모델을 완성해냄으로써 향후 국내 생약 및 약용식물을 이용한 다양한 소재개발 연구시 활용될 수 있음
- 고효능 고기능성 항알러지/항아토피 생리활성물질 개발을 통한 기능성 향장제품의 다양화 및 산업화에 기여
- 최적 생산 및 분리정제 공정기술을 개발함으로써 더덕이 가지는 고부가가치 생리활성물질 생산성을 향상시켜 산업화를 이루는데 크게 기여

(2) 경제적·산업적 측면

- 더덕의 부가가치 향상으로 수요 창출 및 기능성 가공제품의 다양화를 통하여 더덕재배 관련 농가소득 증대에 크게 기여
- 더덕을 이용한 향장품 산업화는 횡성 지역경제를 더욱 부흥시키며, 지역내 추가적인 고용효과 창출에 기여
- 항알러지/항아토피 기능성을 강화시킨 고품질의 안전한 향장품 개발을 통해 고가의 외국산 알러지/아토피 관련 기능성 제품의 수입대체 효과를 이룸과 동시에 국내시장 뿐 아니라 국제시장에 수출할 수 있는 고급 기능성 향장품으로서의 경쟁력을 갖출 것으로 기대
- 생산 및 분리정제 공정 최적화 기술을 개발함으로써 가공시 소비되는 생산비용 절감에 따른 시장경쟁력 강화

제 2장. 연구 개발대상 기술의 국내·외 현황

제 1절. 세계적 수준

개념정립 단계	0	기업화 단계	0	기술 안정화 단계	
---------	---	--------	---	-----------	--

- 알러지 및 아토피 발생에 관한 면역병리학적인 현상들이 점차 이해되고 있으며, 특별히 이들 과정은 근원적으로 T cell의 분화과정에서 과도하게 생성된 helper type II T (Th2) cell에 의해 매개되는 것으로 알려짐에 따라, 상승된 이들 세포들의 기능을 억제하는 신 물질 개발이 활발히 진행되고 있음.

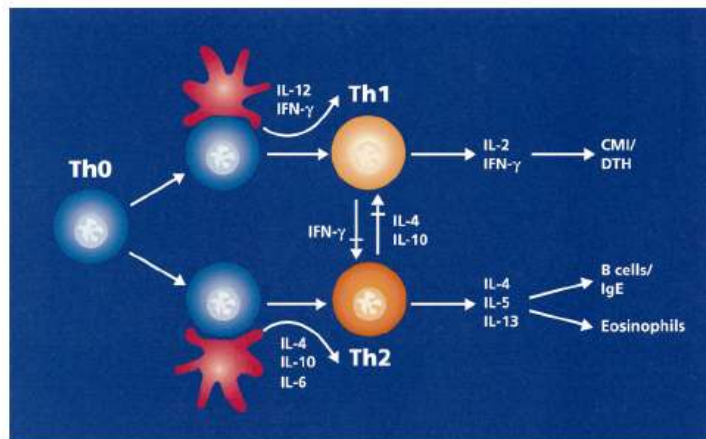


그림 1. T cell로부터 Th1/Th2로의 분화 및 연결된 면역 반응. Th2 반응의 경우 B cell로부터 알러지나 아토피의 원인이 되는 IgE 생성을 유도하고, eosinophil이나 mast cell로부터 알러지 유발 화학물질들을 분비하게 함.

- 즉, 초기 단계에서 분화된 Th2는 IL-4와 같은 사이토카인을 분비하여 B cell로부터 IgE생성을 촉진하게 되고 이는 다시 알러지 유발 물질 (allergen)과 결합 후 eosinophil이나 비만세포 등과 같은 후기 단계 관련 세포들을 자극하게 됨. 이렇게 자극된 세포들은 자신들이 가지는 알러지나 아토피 유발 물질 (히스타민 등)을 분비하여 심한 가려움증, 홍반, 부종 등을 발생하게 함 (그림 1).
- 따라서 근원적인 치료는 Th2 반응의 생성을 억제하는 것이며, 이를 위해서는 Th1 반응을 상대적으로 강화시키는 방법이 효과적이라는 것이 정설로 받아들여지고 있음.

- 노바티스에서 개발한 인간 IgE 인식 항체인 Omalizumab (a recombinant DNA-derived humanized IgG16-kappa monoclonal antibody)를 개발해서 현재 임상에서 사용하고 있음. 효과가 매우 고무적으로 알려져 있으나 단백질제에 따른 부작용이 예상됨.
- 아토피 및 알러지 유발을 억제하는 것으로 알려진 regulatory T cell (그림 2)에 대해 집중적으로 연구되고 있음. 즉 이들 regulatory T cell의 기능을 강화하는 측면에서의 약물개발이 진행될 것으로 예상됨.

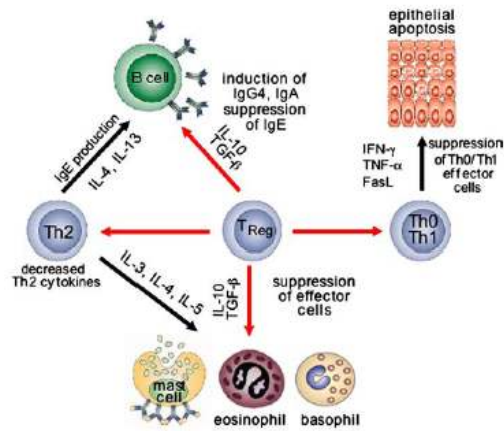


그림 2. T regulatory cell 이 알러지 억제 기능. 즉 이들 세포는 mast cell (비만 세포)나 eosinophil의 알러지 유도 활성을 억제하는 것으로 알려져 있음

- 가장 설득력 있는 아토피 발생 원인인 유전적인 돌연변이에 관한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 현재 표적 유전자 발굴 연구를 다양하게 시도하고 있음. 향후 이들 결과를 토대로 유전자치료 등과 같은 근원적 방법의 치료제 개발이 진행될 것으로 전망됨.
- 여러 가지 장점에도 불구하고 천연물 (Chinese herbals)을 이용한 아토피질환 치료제 개발은 현재 거의 진행되고 있지 않음. 이는 서구사회가 가지는 천연물의 과학성에 대한 불신에서 기인되는 것으로 판단됨. 또한 다수의 천연물들은 간독성을 유발할 수 있다고 믿고 있음.

제 2절. 국내 수준

- ▶ 대중적인 치료제 개발에 국한된 국내 항알러지/항아토피 질환 치료제 연구
 - 알러지/아토피 발생에 관한 국내 면역 병리학적 연구는 매우 미진한 단계임.
 - 항알러지/항아토피 질환치료제는 알러지 발생 후기단계에서 진행되는 주로 가려움이나 홍반 등의 생성을 완화시키고 제거하는 대증요법제가 개발되고 있음.

- ▶ 더덕을 이용한 항알러지/항아토피 기능성 향장품 연구는 전무
 - 치료제 개발은 막대한 비용과 시간을 요하므로, 보다 개발이 쉽고 빠른 향장품 연구가 전략적으로 유용한 제품개발 방법으로 인식되고 있음.
 - 현재까지도 국내에선 더덕을 이용하여 항알러지 항아토피 기능을 가지는 향장품 체제연구는 진행되어 있지 않음.
 - 특별히, 이들의 분획화를 통해 항알러지/항아토피 효과를 검색한 논문이나 문헌은 이제까지 보고된 적이 없음.
 - 다만, 더덕의 제품 다양성은 여러 종류의 식품류 제조, 엑기스 제조 등과 같은 기본적인 소재화 연구에만 제한되어져 있음.

제 3절. 국내·외의 연구현황

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
경희대학교	인삼사포닌을 이용한 항알러지 질환 치료제 개발연구 진행	현재 제품개발 사례는 없음
경희대학교	<i>Carpopeltis affinis</i> 를 이용한 항알러지 질환 치료제 개발연구 진행	현재 제품개발 사례는 없음
두산그룹	여러 생약성분 복합제를 이용한 항아토피질환 치료제 개발연구 진행	현재 제품개발 사례는 없음
안동대학교	더덕의 향각미 증진 및 가공품에 관한 연구	현재 다양한 가공제품이 개발되어 판매되고 있음
안동대학교	더덕의 저장, 최소가공 및 유통기술 개발	
한경대학교	더덕의 유전자원개발과 고부가가치 품종육성	

1. 더덕 및 더덕 구성성분에 관한 선행 연구현황

- 더덕 (*Codonopsis lanceolata*)은 초롱꽃과에 속하는 다년생 초본으로 중국, 한국 및 일본 등지에서 자생하는 식용 및 약용 식물임, 산삼과 버금가는 뛰어난 약효를 지녔다고 해서 사삼으로 불리어 지며, 인삼과 유사한 약리 효능을 가지고 있는 것으로 알려져 있음.



그림 3. 더덕의 뿌리, 잎 및 꽃

- 봄에는 어린 잎을, 가을에는 뿌리를 식용으로 이용하며, 한방에서는 치열, 거담(痰) 및 폐열 제거 등에 사용함. 더덕 뿌리에는 특유의 씹싸름한 향을 내는 사포닌이 많이 들어 있어, 기침을 멎게 하고, 가래를 삭이는 효과가 있음. 또한 기관지염, 편도선염, 인후염 등과 같은 호흡기 염증질환에 좋은 식품으로 인정받고 있음. 위, 폐, 비장, 신장 등 내장기관을 튼튼히 하고 피로를 없애는 강장효과뿐 아니라 여성의 월경불순, 피부 미용에 탁월한 효과가 있으며 모유 분비를 촉진시키는 효과가 있음. 혈압을 낮춰주는 효능이 있기 때문에 고혈압 환자에게 좋고, 식욕부진, 변비에도 효과가 있음.

더덕의 항알러지/항아토피 효과 관련 선행 연구결과

1. 주요구성성분은 인삼에서 발견되는 사포닌류와 인우린이며, 이외에도 alpha-spinasterol, stigmasterol, albigenic acid, essential oil 및 apigenin 등과 같은 성분들이 보고되었음.
2. 더덕의 주성분인 사포닌류는 현재 알러지 효과가 보고되어 몇몇 국내 그룹에서는 항알러지용 치료제로 개발 중에 있으며, 본 연구자의 경우도 사포닌류로 부터 FITC에 의해 유도된 접촉성 피부염 억제효과 (종양괴사인자 매개성 피부질환 치료제 조성물, 특허등록 번호 10-0245670-0000 (1999.12.01)) 및 아토피 유발 사이토카인인 TNF- α 생성 억제 효과를 확보하여 natural product science 분야에서 국제적으로 저명한 과학잡지인 Planta Medica에 각각 두 편 (Cho et al., 2001, 2002)을 보고 한 바 있음.
3. 또한 최근에는 이들 사포닌류가 대식세포의 기능을 억제하여 여러 염증매개 물질 (NO) 및 면역세포 활성화 시 요구되는 adhesion molecule 합성을 저하하는 선행연구 결과를 얻은 바 있음 (과학재단, 2004년 보고서, 고려 인삼학회 2005년 보고서).
4. 본 연구자는 사포닌류가 알러지/아토피 질환의 주요 면역병리 원인 세포인 T cell의 분열 및 증식을 억제하는 한다는 것을 확인한 바 있음 (과학재단 2004년 보고서, 고려 인삼학회 2005년 보고서).
5. 주요 성분 중에 하나인 apigenin의 경우에도 강력한 항산화물질로 보고되고 있으며, 여러 가지 피부 염증과정이나 제 1형 알러지 유발을 억제하는 것으로 확인되어 있음.
6. 더덕 뿌리로부터 열수추출에 의해 얻은 분획은 T 임파구의 분열 촉진, helper T cell의 분화 유도, 대식세포의 탐식과정 촉진 등과 같은 작용과 대식세포 유래 아토피 촉진 염증물질인 NO 생성을 억제하였음.
7. 특별히, 사포닌 성분은 계면활성제로 유화작용, 가용화작용, 세정작용, 및 기포작용 등과 다양한 작용 외에, 피부의 제일 바깥쪽에 있는 각질층을 깨끗하게 하므로 표면의 조직이 거친 피부에 좋은 향장학적 특성을 가지고 있음.
8. 더덕은 향장품 제조 시 큰 장점이라 할 수 있는 고유 향을 가지고 있으며, 1997년에는 농림기술 관리센터지원에 의한 “더덕의 향긋미 증진 및 가공품에 관한 연구”가 완료되어 향 증진을 위한 재배 및 가공 기술이 널리 보급되고 있음.
9. 더덕으로부터 에탄올로 추출된 성분들은 인삼으로부터 에탄올로 추출된 성분들 보다 더 강력한 항산화작용을 나타내는 것으로 확인되었음.



따라서 더덕을 이용한 항알러지/항아토피 기능성 향장품 제제 시 사용되는 분획은 주로 사포닌류나 플라보노이드류를 함유한 층으로 예상되며, 알러지나 아토피 생성에 대한 억제효과도 매우 클 것으로 기대되고 있음

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1절. 제 1 세부과제 연구개발수행 내용 및 결과

1. 연구개발 수행내용

구분	연구개발목표	연구 범위	연구 수행방법	내용
1차 년도	Th2 분화조절 능 평가	Th2 세포 분화조절능 평가	IL-4 분비능 측정	더덕의 각 분획별 추출물을 T세포에 처리 후 분비되는 IL-4의 양을 ELISA법을 이용하여 정량
		T세포 분화 유도세포의 Th2 분화 억제 평가	COX-Ⅱ 유전자 발현 억제 측정	T세포 분화 유도세포인 macrophage에 더덕 추출물을 처리하여 COX-Ⅱ의 유전자 발현량을 RT-PCR법을 이용하여 측정
	Th1 분화 촉진 유도세포 기능 항진효과 평가	Th1 세포 분화조절능 평가	IFN- γ 분비능 측정	더덕의 각 분획별 추출물을 T세포에 처리 후 분비되는 IFN- γ 의 양을 ELISA법을 이용하여 정량
		T세포 분화 유도세포의 Th1 분화 촉진 평가	IL-12 유전자 발현 유도 측정	T세포 분화 유도세포인 macrophage에 더덕 추출물을 처리하여 IL-12의 유전자 발현량을 RT-PCR법을 이용하여 측정
2차 년도	비만세포/대식 세포 기능 억제 효과 평가	비만세포 기능 억제 효과 평가	β -hexosaminidase 분비억제효과 평가	더덕의 각 분획별 추출물을 비만세포에 처리 후 분비되는 β -hexosaminidase의 양을 β -hexosaminidase 정량법을 이용하여 정량
		대식세포 기능 억제 효과 평가	대식세포 탐식능 측정	더덕의 각 분획별 추출물을 대식세포에 처리 후 FITC-dextran 탐식 정도를 Flow cytometry를 이용하여 정량
	더덕 효능성분의 항알러지/ 항아토피 효과 기전연구	알러지 유도 사이토카인 분비억제효과 평가	Prostaglandin E ₂ 분비억제효과 평가	T세포 분화 유도세포인 macrophage에 더덕 추출물을 처리한 후 분비되는 Prostaglandin E ₂ 의 양을 ELISA법을 이용하여 측정
		Th2반응 억제 기전 연구	IL-12 유전자 발현 유도 측정	T세포 분화 유도세포인 macrophage에 더덕 추출물을 처리하여 IL-12의 유전자 발현량을 RT-PCR법을 이용하여 측정

3차 년도	동물실험을 이용한 효능평가	접촉성피부염 모델 및 히스타민 유리 유도 모델을 이용한 효능 평가	DNCB에 의한 접 촉성 피부염 마우 스의 치료 효과 확인	DNCB를 이용하여 피부염을 유도한 후, 더덕 유래의 사포 닌 분획이 1% 함유된 크림 기제를 4일간 ICR mice의 등 에 도포하여 그 효과를 확인 하였다. 그 결과, 1% saponin 크림을 바른 몇몇 mouse의 경 우 피부염 증상이 회복되는 것을 관찰하였다.
	예비임상실험 을 이용한 효능평가	피부 자극성 시험	인체 장/단기 피 부 부작용 유무 확인	1% 사포닌 분획 크림을 단기 처 리의 경우 1회, 장기 처리의 경우 1일 1회 7일동안 처리하였음. 그 결과 피부에 대한 부작용 및 인 체에 대한 독성은 발생하지 않았 음.
		인체 항알러지/ 항아토피 치료효능 예비 평가	아토피 환자를 대 상으로한 아토피 치료 효과 확인	만성 아토피 질환을 앓고 있는 12세 여아를 대상으로 한달간 1% 사포닌 분획 크림을 발병부 위에 국소적으로 바른 결과 아토 피에 의한 적색의 피부염 흔적이 사라짐.

2. 연구수행 결과

(1) T세포/수지상세포 기능 억제분획 연구

1) Th2 분화조절능 평가

마우스 T lymphocyte, EL-4 및 Jurkat T 세포들은 5% CO₂, 37°C incubator에서 배양하였다. 배지는 10% FBS가 포함된 RPMI 1640을 사용하였다. 세포성 면역활성 효과를 검증하기 위한 선행실험으로서, 더덕 추출물이 나타내는 세포생존에 미치는 효과를 MTT(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay법을 이용하여 분석하였다. (Cho et al., Eur. J. Pharmacol. 398; 399-407, 2000) 96-well plate에 1×10^6 의 세포를 plating하고 37°C에서 각 면역실험 조건에 상응하는 배양시간 동안 CO₂ incubator에서 배양한다. 이후 10 µl MTT 용액 (stock concentration : 5 mg/ml)을 첨가하고 3시간 동안 추가반응을 유도하였다. 반응 종료 및 formazan crystal 용해를 위해 각 well에 100 µl MTT stopping solution (10% Sodium dodecyl sulfate in 0.01M HCL)을 추가적으로 첨가하였다. 세포 생존율은 MTT가 formazan으로 환원된 양을 570 nm에서 흡광도를 측정하여 얻어진 OD 값을 통해 산출하였다.

① T세포 주에서 세포 생존율(cell viability) 실험 결과

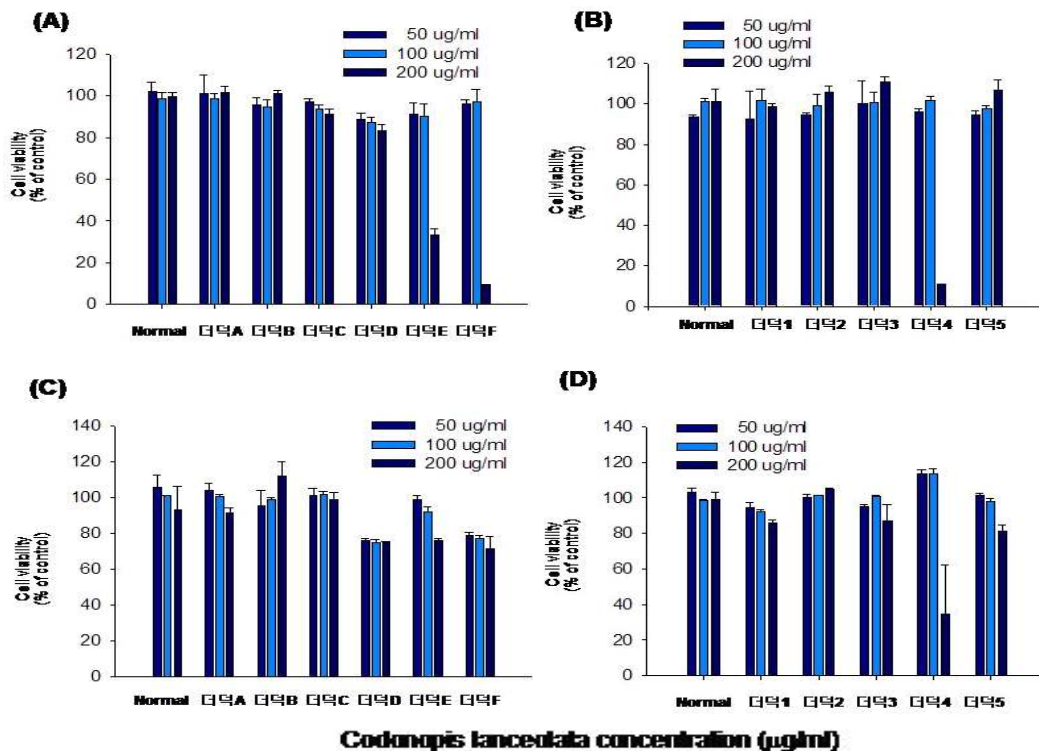


Fig. 1-1. Effect of fractions from *C. Lanceolata* on the viability of EL4(A,B) & Jurkat T cells(C, D).

더덕의 T세포 분화 조절능 평가를 위한 사전 실험으로 여러 T세포 주에서 각 더덕의 증류수 분획(A), Methanol 분획(B), Ethanol 분획(C), 불용성 Methanol 분획(D), 불용성 Ethanol 분획(E), 불용성 Acetone 분획(F) 및 세부 분획으로 Hexane(1), Ethylacetate(2), Chloroform(3), Buthanol(4), 증류수 (5) 분획들이 가지는 세포 생존율을 평가하여 Fig. 1-1에 제시하였다.

② Balb/c mouse 유래의 T세포의 세포 증식을 실험

T세포 증식 assay는 T세포 mitogen인 concanavalin A 및 phytohemagglutinin 을 이용하여 실시하였다. Balb/c mouse로부터 무균조작으로 비장을 적출하고 주사기를 이용하여 차가운 RPMI 1640 배지로 비장세포를 분리하였다. 분리된 비장세포를 원심분리로 모은 후 0.83% ammonium chloride-20 mM Tris buffer (pH 7.4)를 이용하여 적혈구를 용해시켰다. 다시 Hanks' balanced salts solution 및 RPMI 1640 배지로 3회 세척 후 10% FBS 함유 RPMI 1640 배지를 이용하여 세포를 5×10^6 cells/ml 농도로 96 well plates에 접종한다. 여러 농도의 시료와 concanavalin A (1 μ g/ml) 및 phytohemagglutinin (10 μ g/ml)을 동시에 처리하고 48시간 동안 배양한다. T 임파구 분열은 배양 44시간 경에 10 μ l의 MTT 용액을 넣고 4시간 추가 배양 후 10% sodium dodecyl sulfate 용액으로 발색을 유도하고 microplate ELISA reader를 이용하여 570 nm에서 측정하였다.

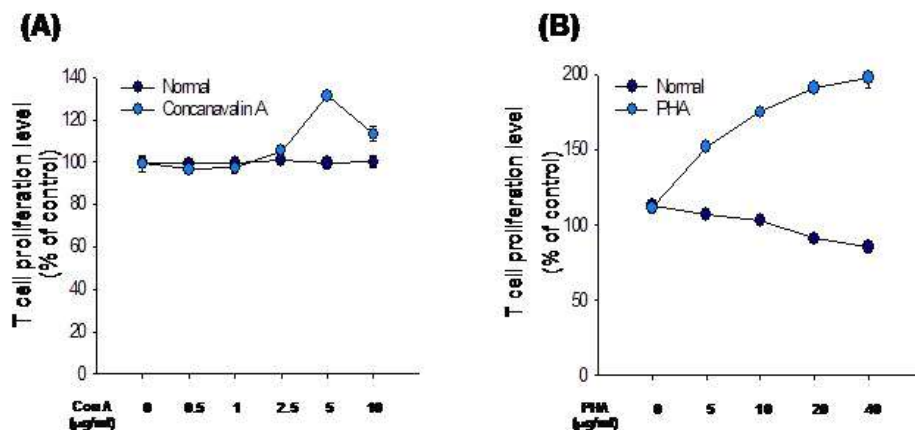


Fig. 1-2. Effect of T cell mitogens on T cell proliferation.

T세포 분화 조절능 평가를 위한 사전 실험으로 Balb/c mouse의 비장에서 T세포를 분리하여 T세포 mitogen인 concanavalin A(Con A) 및 phytohemagglutinin(PHA) 을 농도 별로 처리하여 48시간동안 배양 후 항을 MTT assay로 측정하여 각 T세포의 증식정도를 측정하였다.

③ Balb./c mouse 유래의 T세포에서의 IL-4 및 IFN- γ 의 분비능 측정 실험

Balb/c mouse로부터 무균조작으로 비장을 적출하고 주사기를 이용하여 차가운 RPMI 1640 배지로 비장세포를 분리하였다. 분리된 비장세포를 원심분리로 모은 후 0.83% ammonium chloride-20 mM Tris buffer (pH 7.4)를 이용하여 적혈구를 용해시켰다. 다시 Hanks' balanced salts solution 및 RPMI 1640 배지로 3회 세척 후 10% FBS 함유 RPMI 1640 배지를 이용하여 세포를 5×10^6 cells/ml 농도로 96 well plates에 접종한다. 여러 농도의 시료와 phytohemagglutinin(PHA) (10 μ g/ml)을 동시에 처리하고 48시간 동안 배양하였다. 이후 IL-4 및 IFN- γ 분비능을 조사하여 Th1/Th2 세포로부터의 분비능 조절 효과 평가하여 Fig. 1-3에 제시하였다.

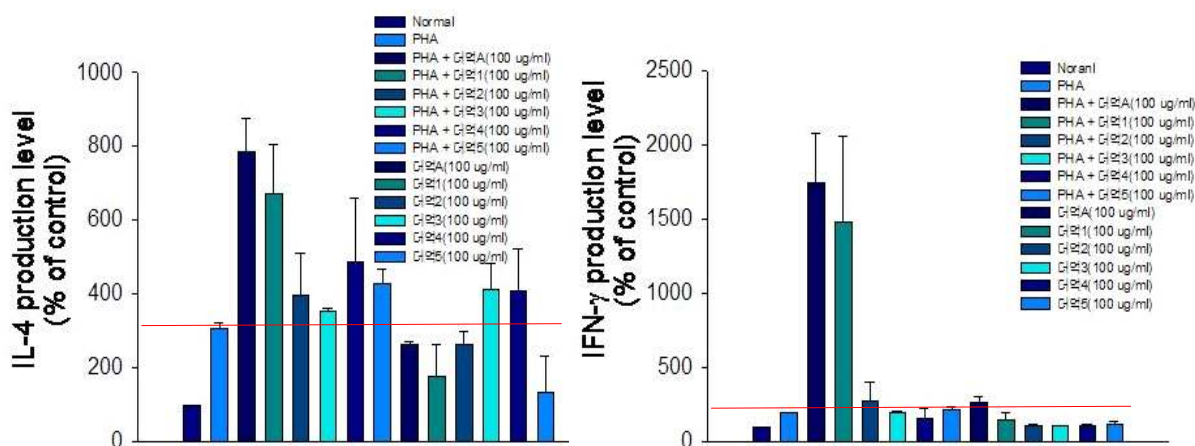


Fig. 1-3. Effect of fractions from *C. Lanceolata* on the production of IL-4 & IFN- γ in PHA-treated T cells.

결과에서처럼 PHA로 자극시킨 T세포에서의 IL-4 분비량은 자극시키지 않은 실험군에서의 분비량보다 300%이상 증가하였으며 PHA와 더덕 분획을 혼용 처리한 실험군 중 더덕A와 혼용 처리한 실험군에서는 800%, 더덕A의 세부분획인 더덕1과 혼용처리한 실험군에서는 600%이상의 증강효과를 나타내었다. IFN- γ 의 경우 PHA와 더덕A, 더덕1의 혼용 처리군에서 1700%, 1400%의 분비량 증가를 나타내었다. Th1세포로의 분화유도는 항알러지/항아토피 작용에 중요한 조건이며, Th1세포로의 분화에는 IFN- γ 의 역할이 주요하므로 더덕A와 더덕1 분획의 경우 알러지/아토피 억제기능을 강력히 유도할 것으로 사료되는 결과이다.

2) Th1 분화 촉진 유도 수지상세포 기능 향진효과 평가

① 더덕의 지상부 및 지하부 추출물의 세포 생존율 실험 결과

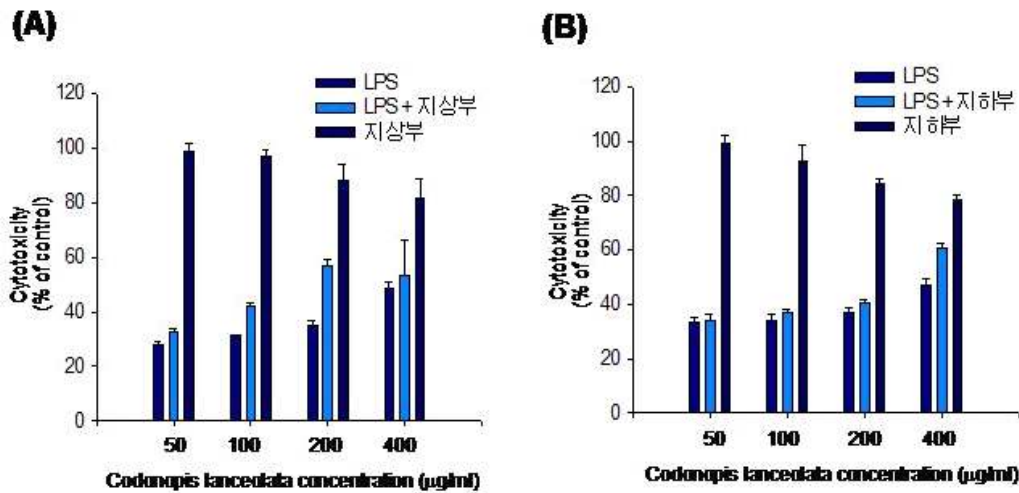


Fig. 1-4. Effect of fractions from *C. Lanceolata* on the viability of RAW 264.7 cells.

더덕이 나타내는 T세포/수지상 세포의 기능 억제분획 연구를 위해 식물추출물 은행에서 더덕의 지상부(Fig. 1-4A)와 지하부(Fig. 1-4B) methanol 추출물을 분양받아 사전실험을 진행하였다. 우선적으로 이들 추출물들이 세포독성을 나타내는지에 관한 선행연구가 필요하므로, T세포에 항원을 제시하며, 활성을 유도하는 것으로 알려진 대식세포인, RAW264.7 cell에서 각각의 희석 농도로 24시간 동안 처리한 후, 세포에 미치는 cell viability에 관한 영향을 MTT assay로 측정하여 Fig. 1-4에 제시하였다. 결과에서처럼 지상부와 지하부 모두 400µg/ml의 농도에서 20% 미만의 세포 생존율 저해작용을 보였다.

② 각 분획별 더덕 추출물의 세포생존을 실험 결과

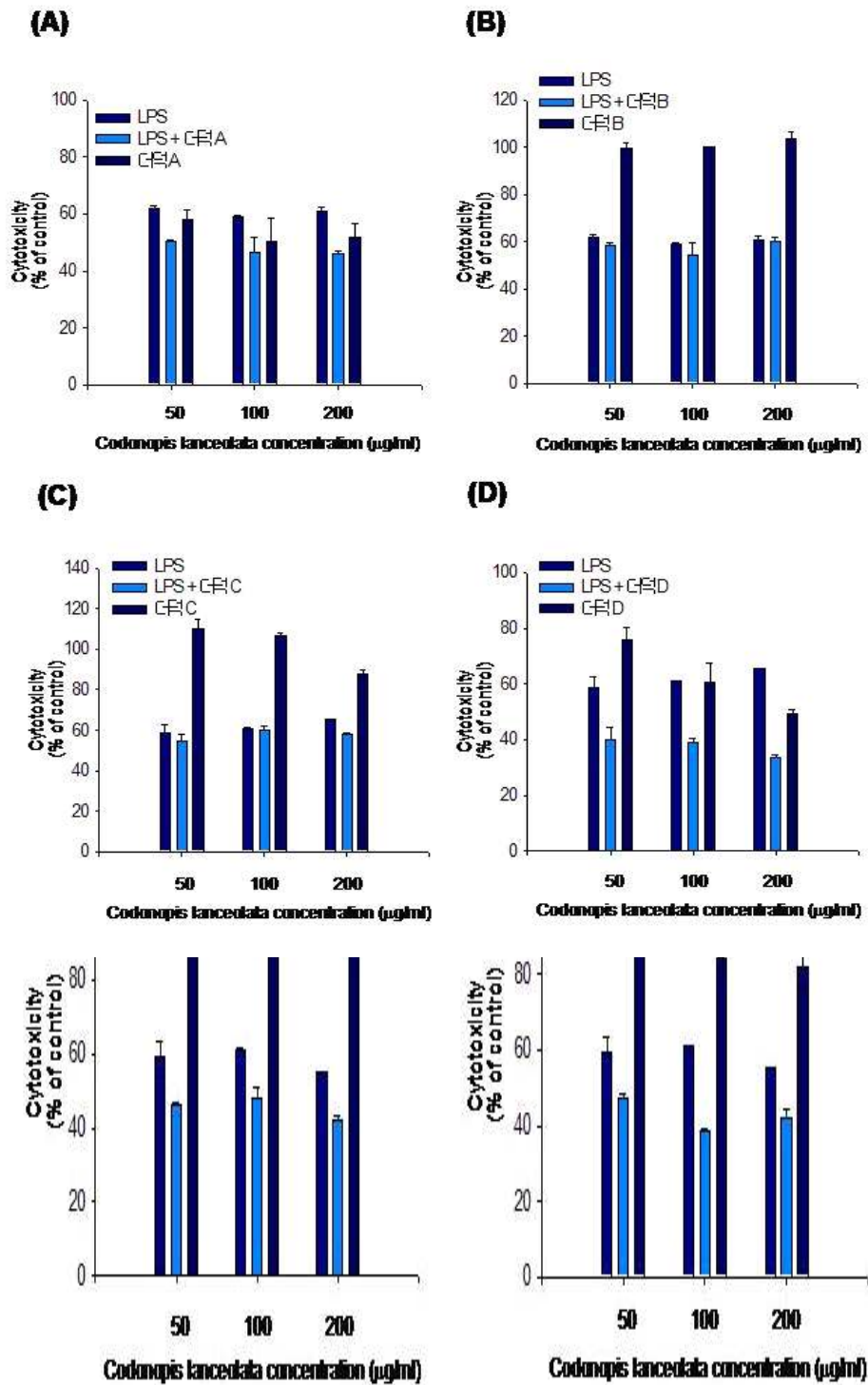


Fig. 1-5. Effect of subfractions from *C. Lanceolata* on the viability of RAW 264.7 cells.

T세포에 항원을 제시하며, 활성을 유도하는 것으로 알려진 대식세포주 (RAW 264.7)에서 더덕의 증류수 분획(A), Methanol 분획(B), Ethanol 분획 (C), 불용성 Methanol 분획(D), 불용성 Ethanol 분획(E), 불용성 Acetone 분획(F)의 효과를 알아보기 위한 사전실험으로 세포생존을 실험을 각각 50 μ g/ml, 100 μ g/ml, 200 μ g/ml의 농도에서 MTT assay로 측정하여 Fig. 1-5에 제시하였다. 결과에서처럼 더덕 분획 B, C, E, F 에서는 모든 처리농도에서 20% 미만의 세포 생존을 저해작용을 보였다. 반면 더덕 분획 A의 경우 40% 이상의 세포 생존을 저해 작용을 나타냈으며, 더덕 분획 D의 경우 농도 의존적으로 세포의 생존을 저해 작용을 나타내었다.

③ 증류수 추출물(A)의 각 세부 분획별 세포생존을 실험 결과

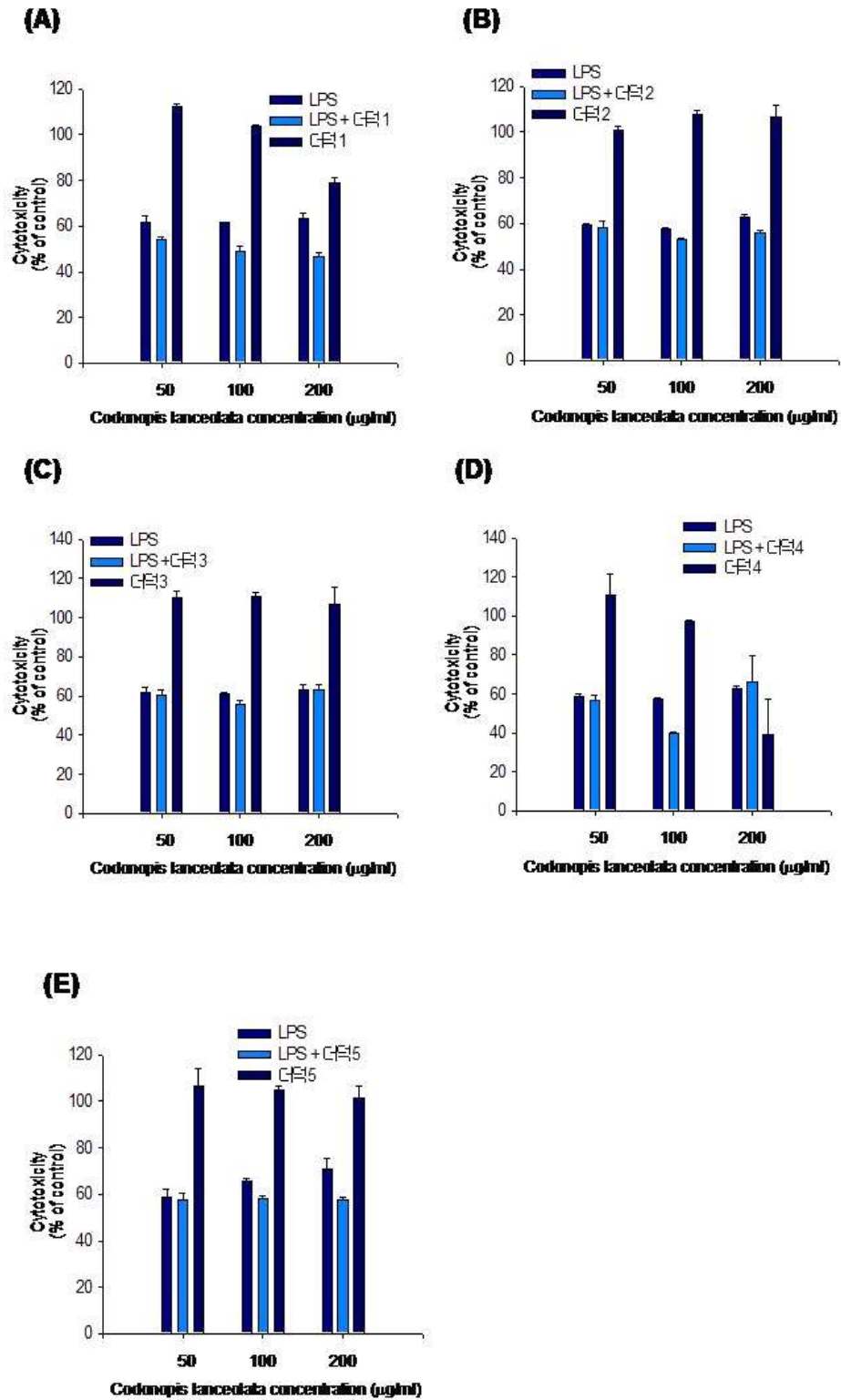


Fig. 1-6. Effect of water fractions on the viability of RAW 264.7 cells.

T세포의 분화를 촉진하는 더덕의 단일성분 동정을 위한 세부 분획 추출을 실시 하여 더덕의 증류수 분획(A)을 Hexane(1) (Fig. 1-6A.), Ethylacetate(2) (Fig. 1-6B.), Chloroform(3) (Fig. 1-6C.), Buthanol(4) (Fig. 1-6D.), 증류수(5) (Fig. 1-6E.)의 세부 분획으로 분리 하였다, 각각의 세부 분획이 가지는 T세포 분화 조절능 평가의 선행 실험으로 각 세부 분획별 세포생존을 실험을 50 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$, 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 MTT assay로 측정하여 Fig. 1-6.에 제시하였다. 결과에서처럼 더덕 세부 분획 중 Buthanol(4) (Fig. 1-6D.) 분획에서 농도 의존적으로 유의적인 세포 생존을 저해 작용을 나타내었다. 반면 Hexane(1) (Fig. 1-6A.), Ethylacetate(2) (Fig. 1-6B.), Chloroform(3) (Fig. 1-6C.), 증류수(5) (Fig. 1-6E.) 세부 분획에서는 특별한 세포 생존을 저해작용을 보이지 않는 결과를 얻을 수 있었다.

④ 대식세포 유래 세포독성물질 Nitric oxide (NO) 생성능 측정

Murine 대식 세포주인 RAW264.7, Balb/c mouse 유래의 dendritic cell 및 macrophage 세포를 penicillin (100 IU/ml) 및 streptomycin (100 $\mu\text{g/ml}$)과 10%의 FBS를 함유하는 RPMI 1640 배지를 이용해서 1×10^6 cell/ml의 농도로 조절한 후, 96 well plate에 접종하고, 5% CO₂ 및 37°C에서 18시간 동안 전 배양하였다 (Cho et al., Eur. J. Pharmacol. 398: 399-407, 2000). 이후 배지를 제거하고 4배 농도로 조제된 시험물질 50 μl 와 50 μl 의 LPS (최종농도 2.5 $\mu\text{g/ml}$) 함유 배지를 동시에 처리하여 배양하였다. 24시간 후 상층액을 100 μl 씩 또 다른 96 well plate에 옮기고 NO 정량은 Griess 용액 (0.5%

naphthylethylenediamine dihydrochloride, 5% sulfanilamide, 25% H₃PO₄)을 이용하여 실시하였다. 표준물질로 sodium nitrite (0 에서 100 μM) 를 사용하여 검량선을 작성하였다.

⑤ 더덕의 지상부 및 지하부 추출물의 NO생성능 조절 효과

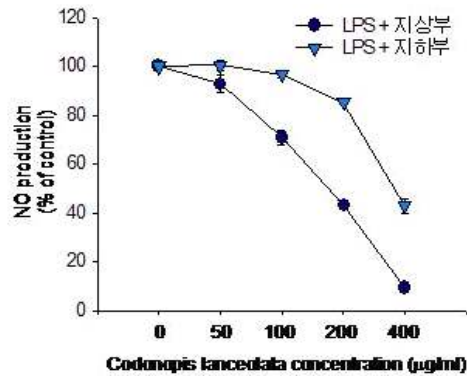


Fig. 1-7. Effect of fractions on NO production in LPS-activated RAW 264.7 cells.

대식세포에서 분비되는 대표적인 세포독성물질인 NO 생성에 관한 더덕 지상부, 지하부 추출물의 조절효과를 조사하였다. 각 추출물의 NO 생성 조절 정도는 LPS 단독 처리군에서 분비되는 NO 양을 100%로 환산하여 비교하였다. Fig. 1-7.에서처럼, 더덕 지상부, 지하부 추출물을 50 μg/ml, 100 μg/ml, 200 μg/ml, 400 μg/ml의 농도로 처리한 결과 농도 의존적으로 NO 생성을 억제하였으며 지하부의 경우 400 μg/ml에서 90%에 가까운 NO 생성 억제능을 보였다.

⑥ 각 분획별 더덕 추출물의 NO생성능 조절 효과

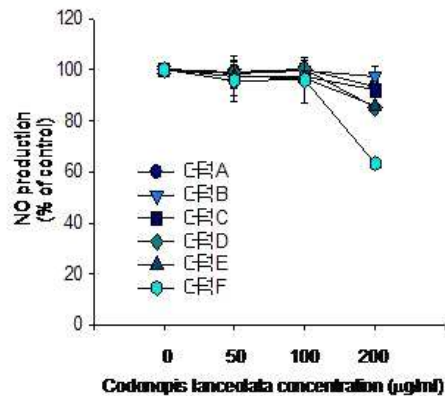


Fig. 1-8. Effect of subfractions on NO production in LPS-activated RAW 264.7 cells.

더덕의 증류수 분획(A), Methanol 분획(B), Ethanol 분획(C), 불용성 Methanol 분획(D), 불용성 Ethanol 분획(E), 불용성 Acetone 분획(F)의 NO 생성능 조절 효과를 알아보기 위한 실험으로 각각 50 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$, 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 측정하여 Fig. 1-8.에 제시하였다. 결과에서처럼 각 분획 200 $\mu\text{g/ml}$ 처리한 경우 대식 세포 유래의 세포 독성 물질인 NO의 생성능을 분획 A 7%, B 3%, C 8%, D 84%, E 85%, F 37%를 각각 억제하는 것으로 나타났다.

⑦ 증류수 추출물(A)의 각 세부 분획별 NO생성능 조절 효과

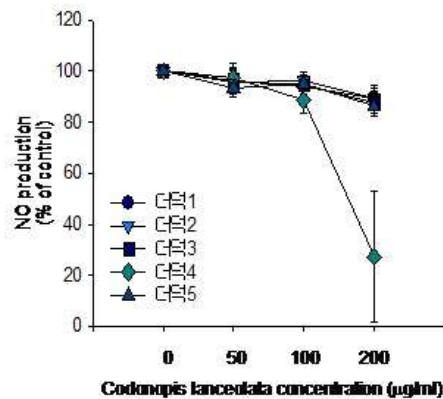


Fig. 1-9. Effect of water fractions on NO production in LPS-activated RAW 264.7 cells

대식세포에서 분비되는 대표적인 세포독성물질인 NO 생성에 관한 조절효과를 Hexane(1), Ethylacetate(2), Chloroform(3), Buthanol(4), 증류수(5)의 세부 분획으로 나누어 추출을 시행하였으며, 각각의 세부 분획별 NO생성능 조절 효과를 알아보기 위한 실험으로 각각 50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml의 농도에서 측정하여 Fig. 1-9.에 제시하였다. 결과에서처럼 Buthanol(4) 분획을 200 µg/ml처리한 경우 NO의 생성능을 75% 억제한 것으로 나타났으며 이를 제외한 각 세부 분획별 NO 생성능 억제 효과는 크게 나타나지 않았다.

⑧ Balb/c mouse 유래의 dendritic cell에서의 세포생존을 실험 결과

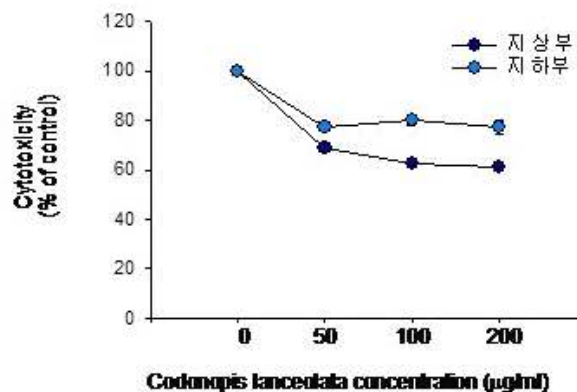


Fig. 1-10. Effect of fractions on the viability of primary dendritic cells.

Dendritic cell에 의한 T세포 분화유도를 평가하기 위한 사전실험으로 Balb/c mouse의 골수유래 혈액세포를 얻어 GM-CSF/IL-4를 처리한 후 dendritic cell로 분화 유도시킨다. 이후 더덕 추출물이 세포생존에 미치는

영향을 MTT assay로 측정하여 Fig. 1-10.에 제시하였다. 지상부의 경우 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서는 40%의 세포 생존을 저해 효과를 나타내었다. 지하부의 경우 농도에 관계없이 20% 정도의 세포 생존을 저해 효과를 나타내었다.

⑨ Balb/c mouse 유래의 macrophage에서의 세포생존을 실험 결과

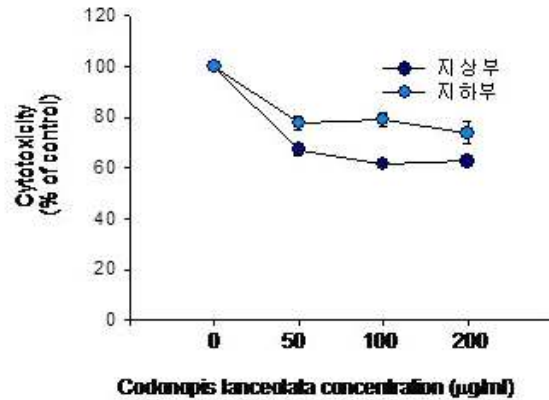


Fig. 1-11. Effect of fractions on the viability of primary macrophages.

Balb/c mouse의 골수유래 혈액세포를 얻어 GM-CSF를 처리한 후, Dendritic cell과 함께 T세포에 항원을 제시하는 세포 중 하나인, macrophage로 분화 유도시킨다. 이후 macrophage에 의한 T cell분화 유도 정도를 평가하기 위한 사전실험으로 더덕 추출물이 세포에 미치는 cell viability에 관한 영향을 MTT assay로 측정하여 Fig. 1-11.에 제시하였다. 지상부의 경우 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 37%의 세포 생존을 저해 효과를 나타내었다. 반면 지하부의 경우 농도에 관계없이 23% 정도의 세포 생존을 저해 효과를 나타내었다.

⑩ Balb/c mouse 유래의 dendritic cell에서의 NO생성능 조절 효과

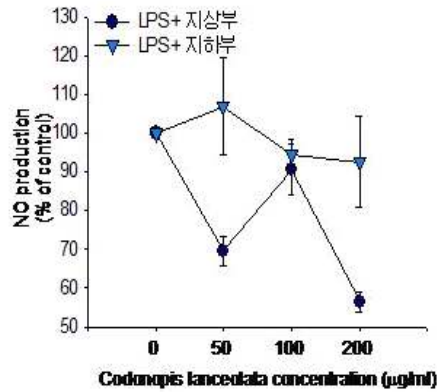


Fig. 1-12. Effect of fractions on NO production in LPS-activated DCs.

Balb/c mouse 유래의 dendritic cell을 위와 동일한 방법으로 얻어 세포 독성물질인 NO 생성에 관한 더덕 지상부, 지하부 추출물의 조절효과를 조사하여 Fig. 1-12.에 제시하였다. NO 생성 조절정도는 LPS 단독처리군에서 분비되는 NO 양을 100%로 환산하여 비교하였다.

⑪ Balb/c mouse 유래의 macrophage에서의 NO생성능 조절 효과

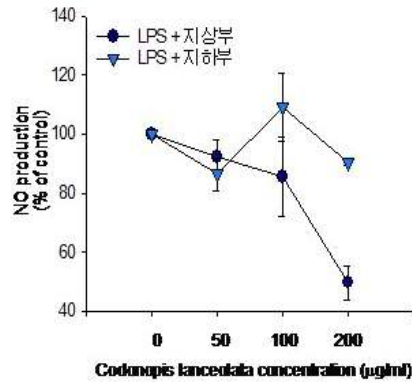


Fig. 1-13. Effect of fractions on NO production in LPS-activated primary macrophages.

Balb/c mouse 유래의 macrophage를 위와 동일한 방법으로 얻어 세포 독성물질인 NO 생성에 관한 더덕 지상부, 지하부 추출물의 조절효과를 조사하여 Fig. 1-13.에 제시하였다. NO 생성 조절정도는 LPS 단독처리군에서 분비되는 NO 양을 100%로 환산하여 비교하였다.

⑫ T세포 분화 유도세포에서의 Th2 분화 억제 효과

사이토카인의 발현 정도를 전사수준에서 조사하기 위해 각 시료를 일정시간동안 처리하여 배양한 세포로부터 Trizol reagent를 처리하여 total RNA를 추출하고 First strand cDNA synthesis kit (Fermentas)에 의해 cDNA를 제조한 다음, 동량의 cDNA를 PCR로 증폭시켰다 (Hong et al., 2003). 이때 사용한 표적단백질의 sense 및 antisense primer 염기서열은 기존문헌을 참조하여 제조하였다. PCR amplification은 i-Master PCR kit (iNtRON)을 사용하여 각 실험군 cDNA와 표적단백질들의 sense 및 antisense primers, 대조군 GAPDH primers 및 dNTP 250uM, Tris-HCL(pH8.3) 10mM, KCl 50mM, NgCl₂ 1.5mM를 포함한 i-mater solution 20ul에서 시행하며, PCR은 95°C에서 45초 간 denaturing, 55°C에서 45초 간 annealing 그리고 72°C에서 1분간 extension 하는 조건으로 시행하였고, 총 25 cycles을 실시하였다.

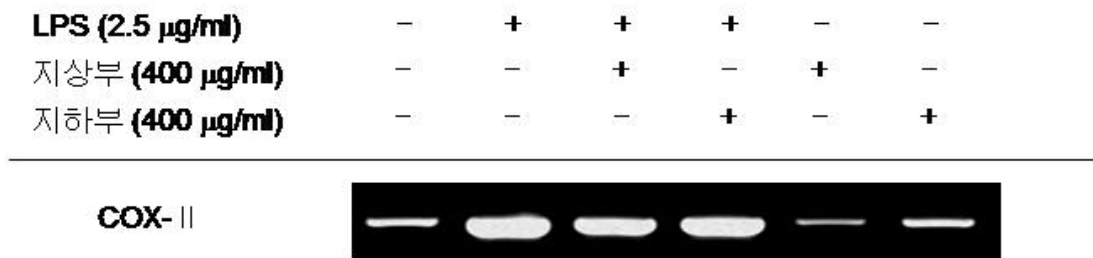


Fig. 1-14. Effect of fractions on the expression of COX-II in LPS-activated APC

T세포 분화를 유도하는 세포의 활성을 유도할 수 있는 LPS를 처리함으로써, Th2 반응을 유도할 수 있는 cytokine인 COX-II의 생성량을 인위적으로 증가시킨 환경에서 더덕 지상부와 지하부를 위와같은 농도로 처리하였을 경우, LPS와 지상부의 혼용 처리군에서 COX-II의 mRNA 생산을 감소시킨 것을 확인할 수 있었다. 이를 보아 더덕 지상부 추출물이 Th2반응을 억제시킬 수 있는 것으로 관찰되었다(Fig. 1-14).

⑬ T세포 분화 유도세포에서의 Th1 분화 촉진 효과

앞서 서술된 실험방법과 동일한 방법으로 진행되었으며, PCR은 95°C에서 45초 간 denaturing, 58°C에서 45초 간 annealing 그리고 72°C에서 1분간 extension 하는 조건으로 시행하였고, 총 35 cycles을 실시하였다.

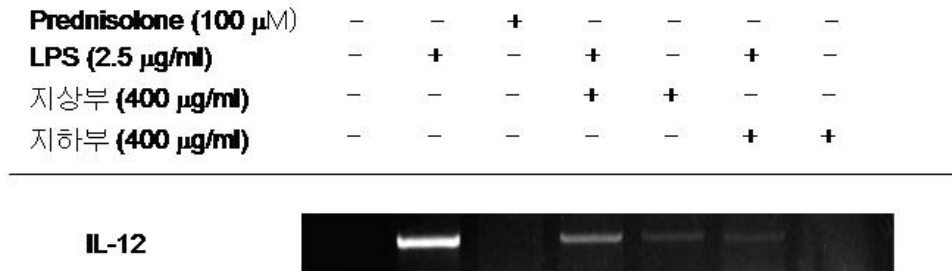


Fig. 1-15. Effect of fractions on IL-12 expression in LPS-activated APC

T세포 분화를 유도하는 세포의 활성을 유도할 수 있는 LPS를 처리함으로써, Th1 반응을 유도할 수 있는 cytokine인 IL-12의 생성량을 인위적으로 증가시킨 환경에서 더덕 지상부와 지하부를 위와같은 농도로 처리하였을 경우, IL-12를 mRNA 레벨에서 감소시킨 것을 확인 할 수 있었다. 이를 보아 더덕 지상부 및 지하부 추출물이 T cell 분화유도 세포에서 Th1반응의 촉진효과는 없는 것으로 관찰되었다(Fig 1-15).

(2) 비만세포/대식세포 기능 억제분획 효능평가 연구

1) 비만세포/대식세포 기능 억제효과 평가

마우스 대식세포주인 RAW264.7 및 rat 비만세포주인 RBL-2H3 세포들은 5% CO₂, 37°C incubator에서 배양하였다. RAW264.7 세포의 배지는 10% FBS가 포함된 RPMI 1640을 사용하였으며, RBL-2H3 세포의 배지는 10% FBS가 포함된 DMEM을 사용하였다.

① 대식세포주에서 세포 생존률(cell viability) 실험 결과

세포성 면역활성 효과를 검증하기 위한 선행실험으로서, 더덕 추출물이 나타내는 세포생존에 미치는 효과를 MTT(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay법을 이용하여 분석하였다. (Cho et al., Eur. J. Pharmacol. 398; 399-407, 2000) 96-well plate에 1×10^6 의 세포를 plating하고 37°C에서 각 면역실험 조건에 상응하는 배양시간 동안 CO₂ incubator에서 배양한다. 이후 10 µl MTT 용액 (stock concentration : 5 mg/ml)을 첨가하고 3시간 동안 추가반응을 유도하였다. 반응 종료 및 formazan crystal 용해를 위해 각 well에 100 µl MTT stopping solution (10% Sodium dodecyl sulfate in 0.01M HCL)을 추가적으로 첨가하였다. 세포 생존율은 MTT가 formazan으로 환원된 양을 570 nm에서 흡광도를 측정하여 얻어진 OD 값을 통해 산출하였다.

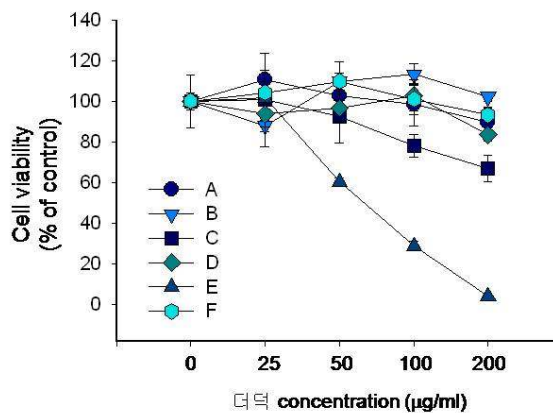
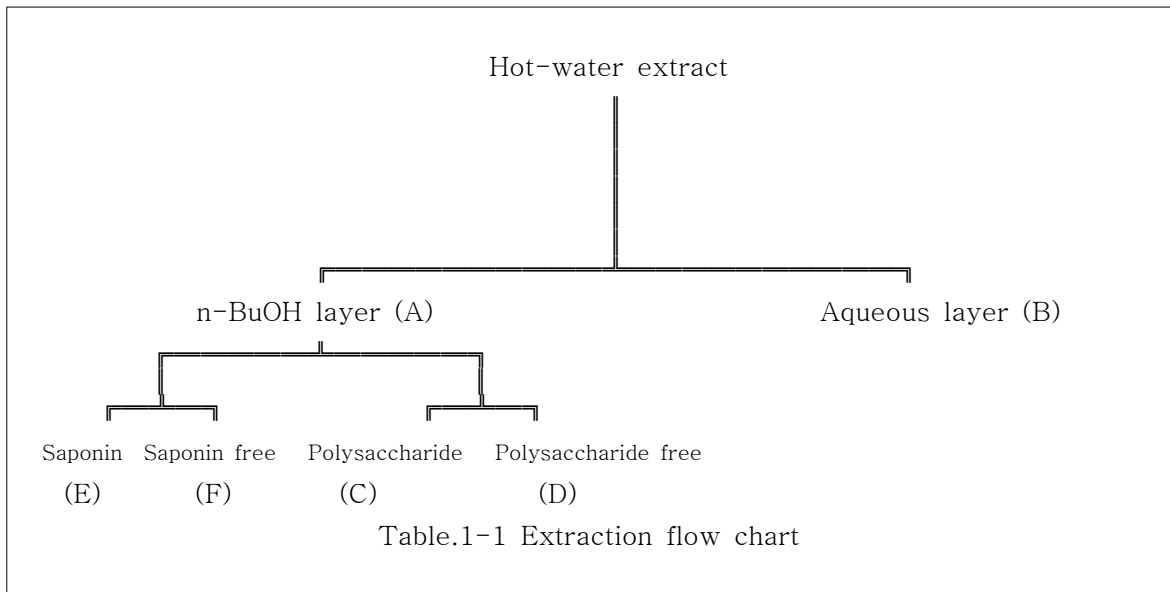


Fig. 1-16. Effect of fractions from *Codonopsis lanceolata* on the viability of RAW264.7

더덕의 대식세포 기능을 조절하는 능력을 평가를 위한 사전 실험으로 대식 세포주에서 1차년도에 효과가 있었다고 판단되어지는 더덕의 BuOH 분획을 이용하여 하위 분획물을 추출하였다. 각 더덕의 Cascade BuOH(A), Cascade distilled water(B), Cascade BuOH polysaccharide(C), Cascade BuOH polysaccharide free(D), Cascade BuOH saponine(E), Cascade BuOH saponine free(F) 분획들이 가지는 세포 생존율을 평가하여 Fig. 1-16.에 제시하였다. 또한 각 분획들을 이해하기 쉽도록 table.1에 나타내었다.



② 대식세포 유래 세포독성물질 Nitric oxide (NO) 생성능 측정

마우스 대식세포주인 RAW264.7를 penicillin (100 IU/ml) 및 streptomycin (100 µg/ml)과 10%의 FBS를 함유하는 RPMI 1640 배지를 이용해서 1×10^6 cell/ml의 농도로 조절한 후, 96 well plate에 접종하고, 5% CO₂ 및 37°C에서 18시간 동안 전배양하였다 (Cho et al., Eur. J. Pharmacol. 398: 399-407, 2000). 이후 배지를 제거하고 4배 농도로 조제된 시험물질 50 µl와 50 µl의 LPS (최종농도 1 µg/ml) 함유 배지를 동시에 처리하여 배양하였다. 24시간 후 상층액을 100µl씩 또 다른 96 well plate에 옮기고 NO 정량은 Griess 용액 (0.5% naphthylethylenediamine dihydrochloride, 5% sulfanilamide, 25% H₃PO₄)을 이용하여 실시하였다. 표준물질로 sodium nitrite (0 에서 100 µM) 를 사용하여 검량선을 작성하였다.

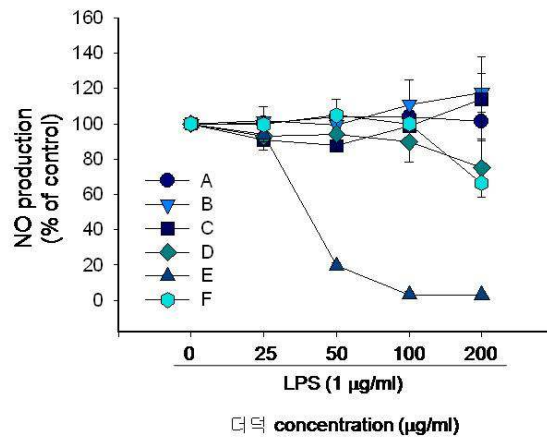


Fig.1-17. Effect of fractions on NO production from LPS-treated RAW264.7 cells

더덕의 A부터 F까지 각 분획의 NO 생성능 조절 효과를 알아보기 위한 실험으로 각각 0 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml의 농도에서 측정하여 Fig. 1-17.에 제시하였다. 결과에서처럼 Cascade BuOH saponin 분획인 E에서 더덕 처리 농도에 의존적으로 대식 세포 유래의 세포 독성 물질인 NO의 생성능을 억제하는 것으로 나타났으며, 50 µg/ml 이상의 농도에서는 약 80% 이상 억제하는 것으로 확인되었다.

따라서 위와 같은 결과를 바탕으로 더덕의 Cascade BuOH saponine (E) 분획을 RAW264.7 세포에 농도별로 처리하여 더덕 분획의 농도에 의한 대식세포의 NO 생성능 및 세포 생존률을 확인하였다. 그 결과 50 µg/ml 이상의 농도에서 80% 이상 NO 분비능이 억제 되는 것을 확인하였으나, 50 µg/ml에서 40%정도의 세포 독성을 갖고 있다는 것을 Fig. 1-18.에 제시하였다. 그러나 세포 생존률에 비해 NO 생성능의 억제 정도가 강력한 것으로 보아, 대식세포주에서 NO 생성능 억제는 세포 독성에 의한 효과뿐만 아니라 더덕 분획에 의한 효과도 작용하고 있는 것으로 생각된다.

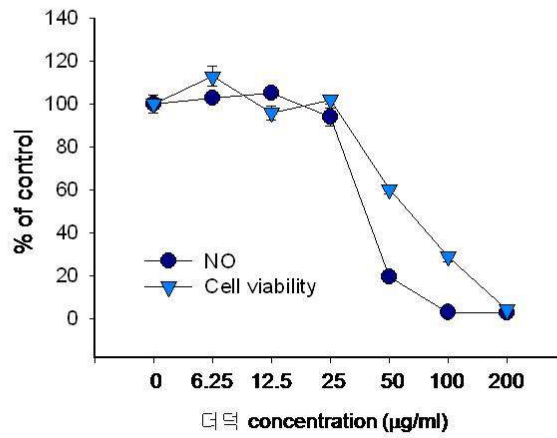


Fig. 1-18. Effect of fraction E on the viability of RAW264.7 cells and their NO production

③ 대식세포에 의한 탐식능 (Phagocytosis) 측정

Mouse 대식세포주인 RAW264.7을 penicillin (100 IU/ml) 및 streptomycin (100 µg/ml)과 10%의 FBS를 함유하는 RPMI 1640 배지를 이용해서 1×10^6 cell/ml의 농도로 조절한 후, 12 well plate에 접종하고, 5% CO₂ 및 37°C에서 18시간 동안 전배양하였다 (Cho et al., Eur. J. Pharmacol. 398: 399-407, 2000). 이후 배지를 제거하고 새 배지 800 µl로 교체해준 후 5배 농도로 조제된 시험물질 200 µl를 처리하여 배양하였다. 6시간 후 상층액을 제거하고 빛을 차단한 상태에서 5% FBS를 포함한 PBS에 FITC-dextran을 1mg/ml로 조제하여 1ml 처리하고 배양하였다. 이 이후의 실험은 모두 빛을 차단한 상태에서 진행한다. 30분 후 FITC-dextran을 제거하고 PBS로 4-5회 세척한 뒤 세포를 모아 3.7% formaldehyde로 고정시킨 후 Flow cytometry를 통해 형광정도를 측정하였다.

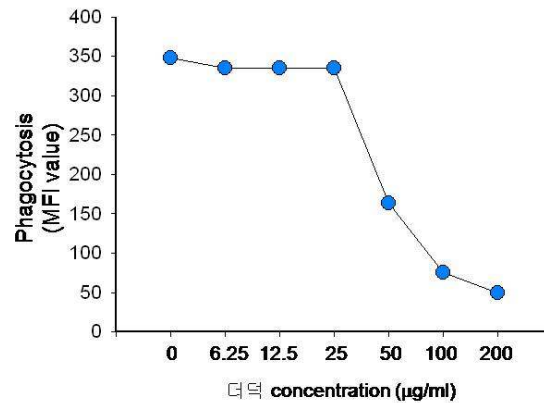


Fig.1-19 Effect of fraction E on the phagocytic uptake of RAW264.7 cells

대식세포의 탐식능을 측정한 결과, 더덕 E 분획의 50 µg/ml의 농도에서 58% 정도 탐식능을 억제하였다. 또한 100 µg/ml에서 80%, 200 µg/ml에서 85% 정도 탐식능을 억제하는 것을 Fig.1-4를 통해 제시하였다. 위의 결과로 보아 더덕 E 분획은 50 µg/ml 이상의 농도에서 대식세포의 기능을 억제하는 효과를 가진다(Fig. 1-19)..

④ 대식세포에 의한 활성산소종 (ROS) 발생능 측정

Mouse 대식세포주인 RAW264.7을 penicillin (100 IU/ml) 및 streptomycin (100 µg/ml)과 10%의 FBS를 함유하는 RPMI 1640 배지를 이용해서 1×10^6 cell/ml의 농도로 조절한 후, 12 well plate에 접종하고, 5% CO₂ 및 37°C에서 18시간 동안 전배양하였다 (Cho et al., Eur. J. Pharmacol. 398: 399-407, 2000). 이후 배지를 제거하고 새 배지 400 µl로 교체해준 후부터 빛을 차단한 상태로 실험을 진행하였으며, 5배 농도로 조제된 ROS 검출 dye인 Dihydrorhodamine123을 최종 농도 10 µM로 200 µl를 처리하여 배양하였다. 10분 후 시험물질을 200 µl처리 후 배양하고 30분 후 ROS 유도 물질인 SNP를 0.25 mM로 처리 한 후 배양한다. 20분 후 상층액을 제거하고 PBS로 4-5회 세척해준 후 세포를 모아 Flow cytometry를 통해 형광정도를 측정하였다.

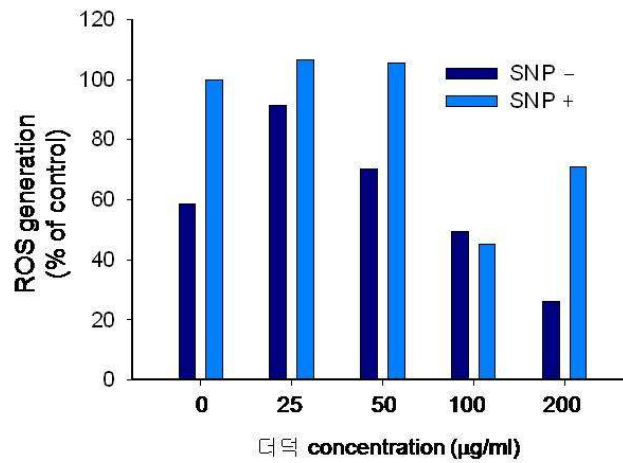


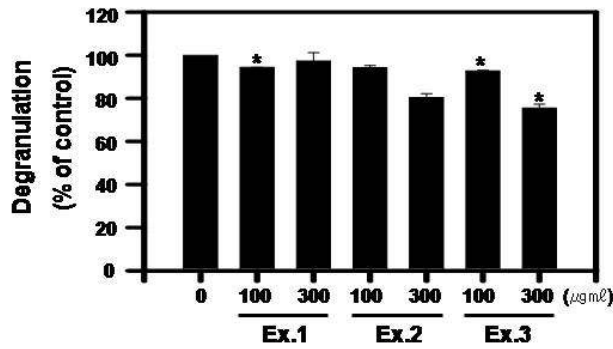
Fig.1-20 Effect of fraction E on the ROS generation of SNP-treated RAW264.7

더덕 E 분획을 농도별로 처리하였을 때 SNP에 의한 ROS 발생능이 100 μg/ml의 농도에서 50% 정도 감소하였으나, 농도 의존적인 효과는 없음을 Fig. 1-20.를 통해 제시하고 있다.

⑤ 비만세포에서 β-hexosaminidase 방출량 측정

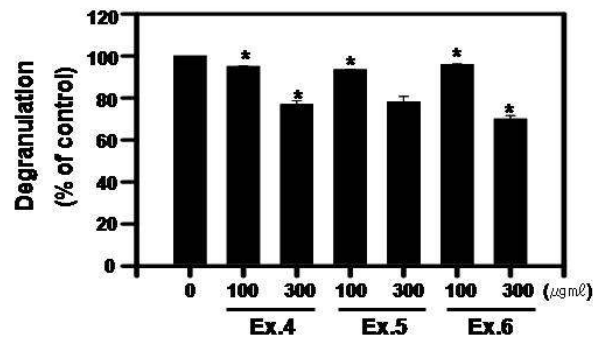
β-hexosaminidase는 비만세포의 과립을 구성하는 물질로 알려져 있으며, 탈과립에 의한 히스타민 분비는 β-hexosaminidase의 방출량에 비례한다. 따라서 β-hexosaminidase의 방출량을 측정함으로써 rat의 비만세포주인 RBL-2H3 세포에서 탈과립과 히스타민 분비 정도를 확인하였다. RBL-2H3 세포를 10% FBS를 포함한 DMEM에 현탁 시킨 후 24 well plate에 각 well당 2×10^5 개의 세포를 분주한 다음, 각 well당 0.5 μg/ml DNP-IgE로 감작시킨 후 5% CO₂ incubator에서 하룻밤 배양한다. 이후 각 well의 세포들을 Siraganian buffer (119 mM NaCl, 5 mM KCl, 5.6 mM glucose, 0.4 mM MgCl₂, 25 mM HEPES, 40 mM NaOH, 1 mM CaCl₂, 0.1% BSA, pH 7.2)로 2번 세척한 다음 37°C에서 10분간 Siraganian buffer로 전 반응시키고, 시험물질을 첨가한 후 10분간 다시 반응시켰다. 이후 세포를 37°C에서 30분간 antigen (DNP-BSA, 10 μg/ml)을 처리하여 탈 과립상태로 만든 후 반응을 ice에서 10분간 incubation 시켜 반응을 종결시키고 상층액 20 μl를 취해 96 well plate에 옮긴 후 1mM p-nitrophenyl-N-acetyl-β-D-glucosaminide를 넣고 1시간 동안 배양시킨 다음 stop solution (0.1 M Na₂CO₃/NaHCO₃)을 넣은 다음 ELISA로 흡광도 405 nm에서 측정하여 정량하였다.

(A)



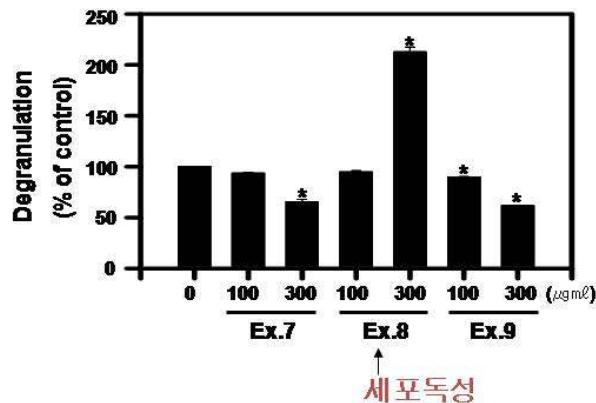
Each value represents the mean \pm SE. * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 vs. vehicle control as determined by Student's t -test. n >5.

(B)



Each value represents the mean \pm SE. * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 vs. vehicle control as determined by Student's t -test. n >5.

(C)



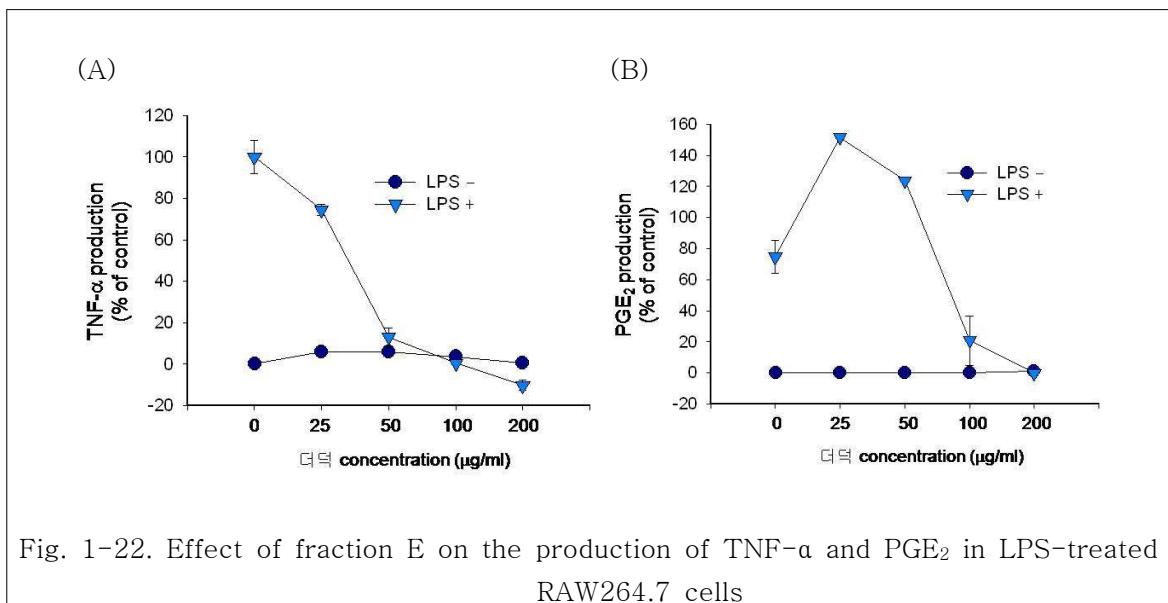
Each value represents the mean \pm SE. * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 vs. vehicle control as determined by Student's t -test. n >5.

Fig. 1-21. Effect of fractions from *Codonopsis lanceolata* on the release of β -hexosaminidase from DNP-IgE treated BL-2H3

이 실험은 9개의 더덕 분획으로 100 $\mu\text{g/ml}$ 과 300 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 진행하였다. 더덕의 분획들은 Hot water extract (Ex.1), 더덕 polysaccharide (Ex.2), 더덕 polysaccharide free (Ex.3), Cascade BuOH (Ex.4), Cascade distilled water (Ex.5), Cascade BuOH polysaccharide (Ex.6), Cascade BuOH polysaccharide free (Ex.7), Cascade BuOH saponine (Ex.8), Cascade BuOH saponine free (Ex.9)로 구성되어 있다. Fig. 1-21.에서 제시한 데이터에 의하면, Ex.8을 제외한 다른 분획들은 대체로 300 $\mu\text{g/ml}$ 에서 20% 정도 β -hexosaminidase의 방출을 억제하며, Ex.8은 세포 독성에 의해서 100 $\mu\text{g/ml}$ 이상에서 세포가 분해되는 현상을 보였다. 따라서, 더덕 분획은 비만세포에서 분비하는 알러지 유도 물질인 히스타민 분비를 억제하는 효과가 높지 않은 것을 확인하였다.

⑥ 대식세포에서 알러지 유도 사이토카인 및 염증유발물질 분비억제효과 평가

알러지에 의해 유도되는 염증 반응에 관여하는 대표적인 사이토카인인 $\text{TNF-}\alpha$ 와 PGE_2 의 생성능이 더덕 E 분획에 의해 억제되는지를 확인하기 위하여 ELISA법을 통해 사이토카인 분비량을 측정하였다.



그 결과 $\text{TNF-}\alpha$ 의 분비량은 50 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도에서 80% 이상 억제하였으며, PGE_2 의 경우 100 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도에서 80% 이상 억제한 것을 Fig. 1-22.을 통해 제시하였다. 따라서 더덕 E 분획은 알러지 반응에 의해 유도된 전염증성 사이토카인들을 억제하는 효과를 가진다고 볼 수 있다.

⑦ 전사수준에서 대식세포의 알러지 유도 사이토카인 및 화학물질 분비억제효과 평가

사이토카인 및 화학물질의 발현 정도를 전사수준에서 조사하기 위해 각 시료를 일정시간동안 처리하여 배양한 세포로부터 Trizol reagent를 처리하여 total RNA를 추출하고 First strand cDNA synthesis kit (Fermentas)에 의해 cDNA를 제조한 다음, 동량의 cDNA를 PCR로 증폭시켰다 (Hong et al., 2003). 이때 사용한 표적단백질의 sense 및 antisense primer 염기서열은 기존문헌을 참조하여 제조하였다. PCR amplification은 i-Master PCR kit (iNtRON)을 사용하여 각 실험군 cDNA와 표적단백질들의 sense 및 antisense primers, 대조군 GAPDH primers 및 dNTP 250uM, Tris-HCL(pH8.3) 10mM, KCl 50mM, NgCl₂ 1.5mM를 포함한 HiPi solution 20ul에서 시행하며, PCR은 94°C에서 45초 간 denaturing, 30초 간 annealing 그리고 72°C에서 1분간 extension 하는 조건으로 시행하였고, 각각의 primer에 대한 annealing temperature와 cycle 수는 COX-2와 GAPDH는 55°에서 25 cycles, TNF-α는 55°에서 20 cycles, iNOS 60°, 30 cycles을 실시하였다.

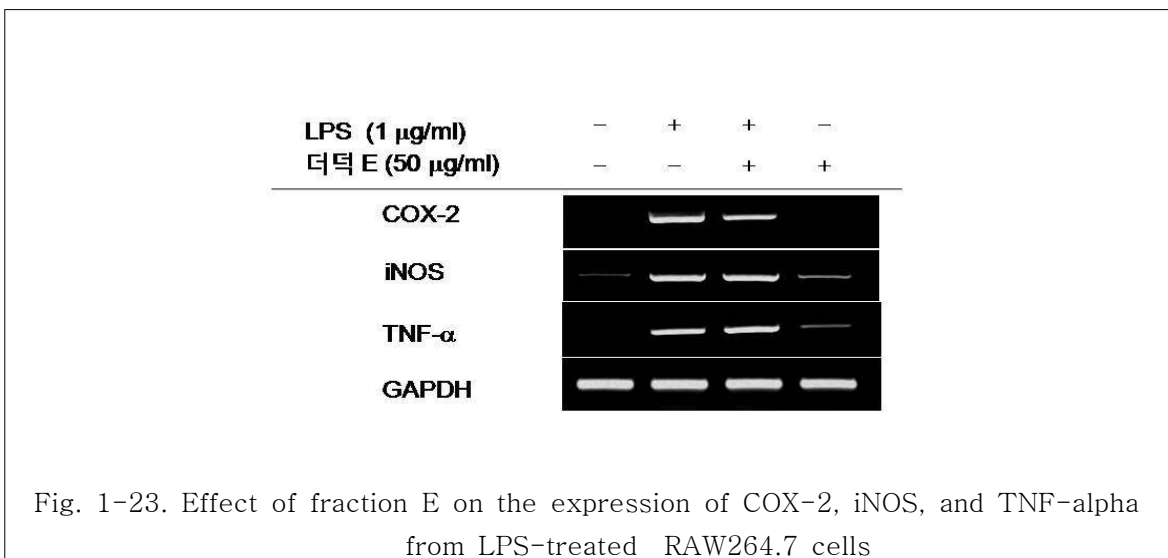


Fig. 1-23.을 통해 사이토카인의 전사 수준에서의 발현량을 관찰한 결과, COX-2는 더덕 E 분획에 의해서 억제되는 것을 확인하였다. 그러나 TNF-α와 NO 생성에 영향을 주는 효소인 iNOS는 억제되지 않는 것으로 보아 더덕 E 분획은 TNF-α와 iNOS의 전사수준에는 영향을 주지 않는다.

2) 더덕 효능성분의 항알러지/항아토피 효과 기전연구

마우스 대식세포주인 RAW264.7 및 Balb/c mouse의 spleen에서 채취한 splenocytes를 이용하여 실험을 진행하였으며 이러한 세포들은 5% CO₂, 37°C incubator에서 배양하였다. 배지는 10% FBS가 포함된 RPMI 1640을 사용하였다.

① Th2 반응 억제 기전연구

앞서 서술된 실험방법과 동일한 방법으로 진행되었으며, PCR은 95°C에서 45초 간 denaturing, 58°C에서 45초 간 annealing 그리고 72°C에서 1분간 extension 하는 조건으로 시행하였고, 총 35 cycles을 실시하였다.

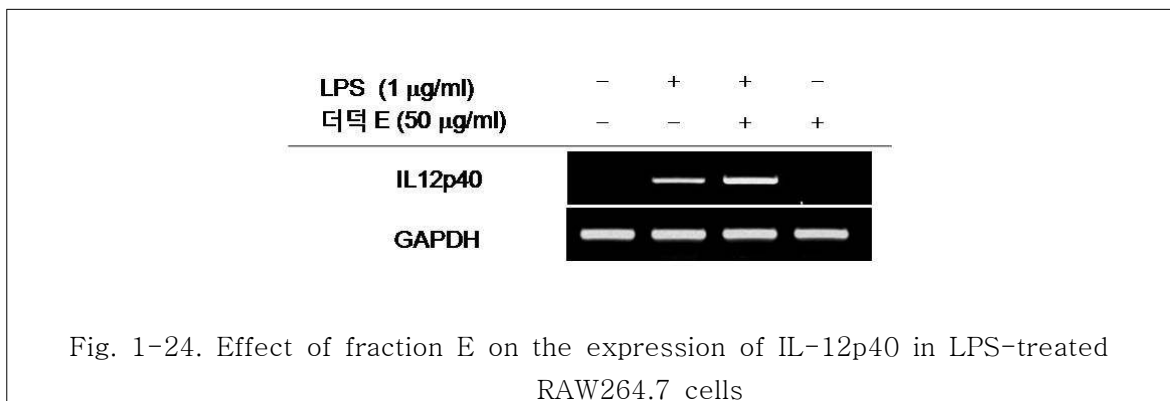


Fig.1-24.에서 보이는 것 과 같이, T 세포의 활성을 유도하는 능력을 가진 대식세포주에서 더덕 E 분획은 Th1으로 분화를 유도하는 사이토카인인 IL12p40의 발현을 증가켰다. 따라서 더덕 E 분획은 대식세포에서 T cell의 Th1분화를 촉진함으로써 Th2로의 분화를 억제하여 결과적으로 Th2 반응을 억제한다고 볼 수 있다.

② 신호전달과정 검토

mouse 대식세포주인 RAW264.7에서 더덕 E 분획 50 µg/ml을 시간 별로 처리함으로써 LPS에 의해 활성화되는 신호전달 단백질의 인산화정도를 확인하였다.

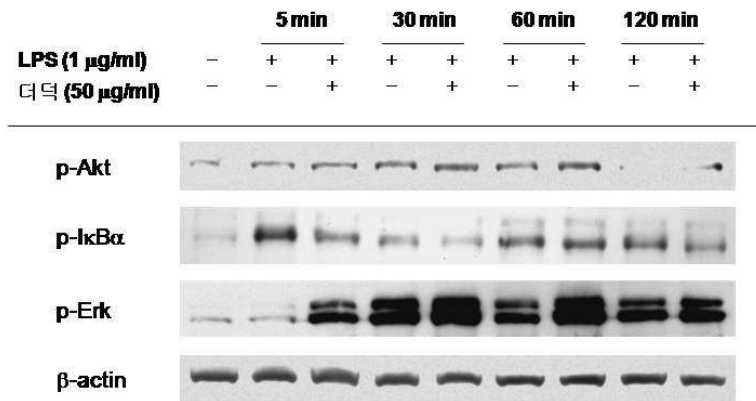


Fig. 1-25. Effect of fraction E on the phosphorylation of Akt, IκBα and ERK in LPS-treated RAW264.7 cells

Fig. 1-25.에 의하면 Akt의 인산화 형태에는 영향을 주지 않았으며, IκBα의 인산화 형태를 모든 시간에서 억제하는 것을 확인할 수 있다. 그리고 MAPkinase 중 하나인 Erk의 인산화 형태는 모든 시간에서 증가된 것을 볼 수 있다.

③ 비만세포 기능 억제 기전 연구 및 Th1 기능조절 기전연구

Fig. 1-21.에서 보여지듯, 더덕 성분들은 비만세포로부터 유리되는 히스타민 생성과정을 강력히 억제하지 않았으므로, 비만세포의 기능 억제 기전연구는 진행하지 않았다. 그러나 근원적 원인인 Th2 과정억제를 Th1과정 촉진을 통해 증진시킬 것으로 예측됨에 따라, T cell 관련 추가실험을 조사포닌 분획을 이용하여 추가적으로 하기와 같이 진행하였다.

Balb/c mouse로부터 무균조작으로 spleen을 적출하고 주사기를 이용하여 차가운 RPMI 1640 배지로 splenocyte를 분리하였다. 분리된 splenocyte를 원심분리로 모은 후 0.83% ammonium chloride-20 mM Tris buffer (pH 7.4)를 이용하여 적혈구를 용해시켰다. 다시 Hanks' balanced salts solution 및 RPMI 1640 배지로 3회 세척 후 10% FBS 함유 RPMI 1640 배지를 이용하여 세포를 1×10^7 cells/ml 농도로 96 well plates에 접종한다. 여러 농도의 시료와 LPS, Concanavaline A(ConA), phytohemagglutinin(PHA)를 10 µg/ml의 농도로 동시에 처리하고 48시간 동안 배양하였다. 그 후 상층액을 채취하여 INF-γ의 분비량을 ELISA법으로 확인하였으며, MTT assay를 통해 T 세포 분화능을 확인하였다.

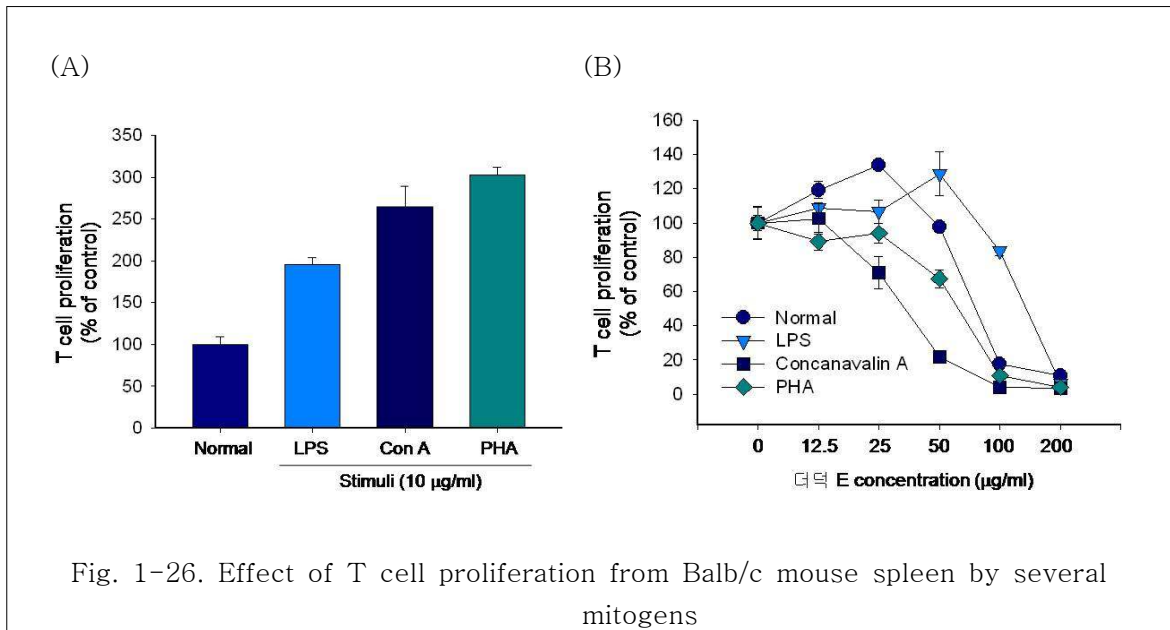


Fig. 1-26. Effect of T cell proliferation from Balb/c mouse spleen by several mitogens

Stimuli를 처리하지 않은 군과 각각의 Stimuli를 처리한 군을 비교하였을 때, T 세포로의 분화능이 증가된 것을 Fig. 1-26의 (A)를 통해 확인 할 수 있다. 또한 더덕 E 분획은 Stimuli에 의해 증가된 T 세포 분화능을 억제하였으며, 특히 Concanavalin A에 의해 증가된 T 세포 분화능을 농도 의존적으로 강력하게 억제한 것을 Fig. 1-26의 (B)를 통해 제시하였다.

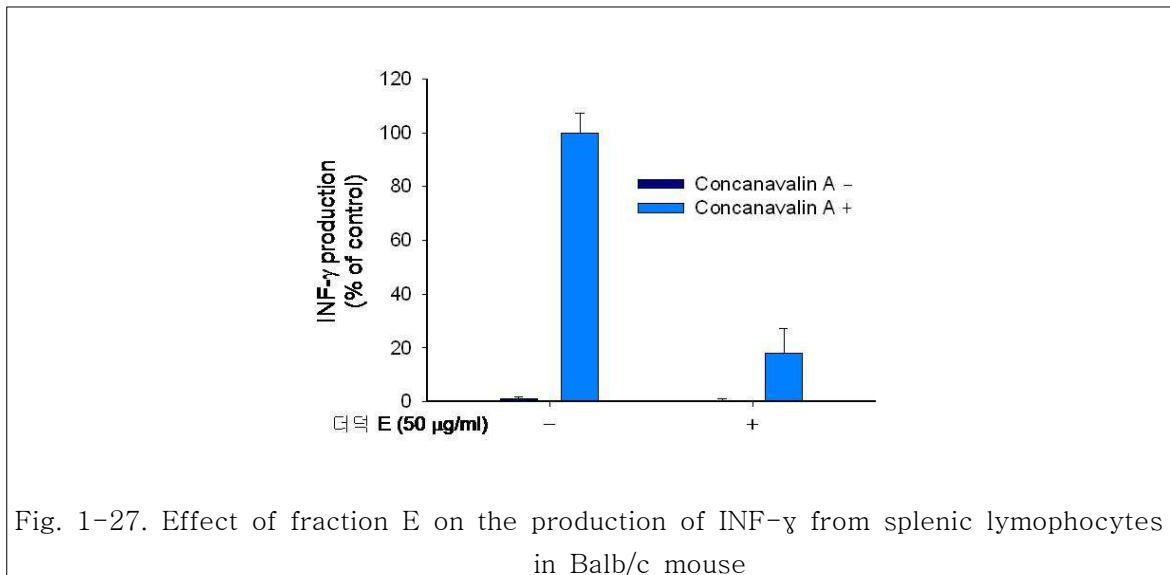


Fig. 1-27. Effect of fraction E on the production of INF- γ from splenic lymphocytes in Balb/c mouse

더덕 E 분획이 T 세포의 분화능을 가장 강력히 억제했던 Concanavalin A에서 INF- γ 의 분비량을 측정된 결과를 Fig. 1-27.를 통해 제시하였다. 그 결과, Concanavalin A에 의해서 증가되었던 INF- γ 의 분비량이 더덕 E 분획에

의해 80% 억제된 것을 확인할 수 있었다. 이것을 통해 더덕 E 분획은 T 세포의 분화능을 억제함으로써 IFN- γ 의 분비를 감소시킨다고 생각할 수 있으며, 이러한 현상들은 더덕 E 분획이 T 세포의 분화능을 억제하고 그로 인한 각종 사이토카인의 분비를 감소시킴으로써 T 세포에 의해 활성화 되는 비만 세포의 기능을 억제한다고 생각할 수 있다.

④ 대식세포 기능 억제 기전 연구

Human monocyte 세포주인 U937을 이용하여 세포와 세포외 기질의 주요구성 물질인 fibronectin과의 점착능을 확인하였으며, 또한 세포와 세포 사이의 응집능을 확인하였다. 이러한 세포와 세포 혹은 세포와 세포외 기질의 상호작용은 세포의 분화와 증식, 그리고 기능의 활성화에 중요한 역할을 한다. 따라서 대식세포의 전구세포인 monocyte를 이용하여 실험을 진행하였다. Human monocyte 세포주인 U937 세포는 5% CO₂, 37°C incubator에서 배양하였으며, 배지는 10% FBS가 포함된 RPMI 1640을 사용하였다. cell-fibronectin 점착능은 96 well plate에 37°C에서 2시간동안 fibronectin을 코팅한 후 1×10⁶ cells/ml 농도로 세포를 접종하고 시험물질을 처리한다. 4시간 후 PBS로 세척한 후 crystal violet으로 세포를 염색한 후 흡광도를 측정하여 정량하였다.

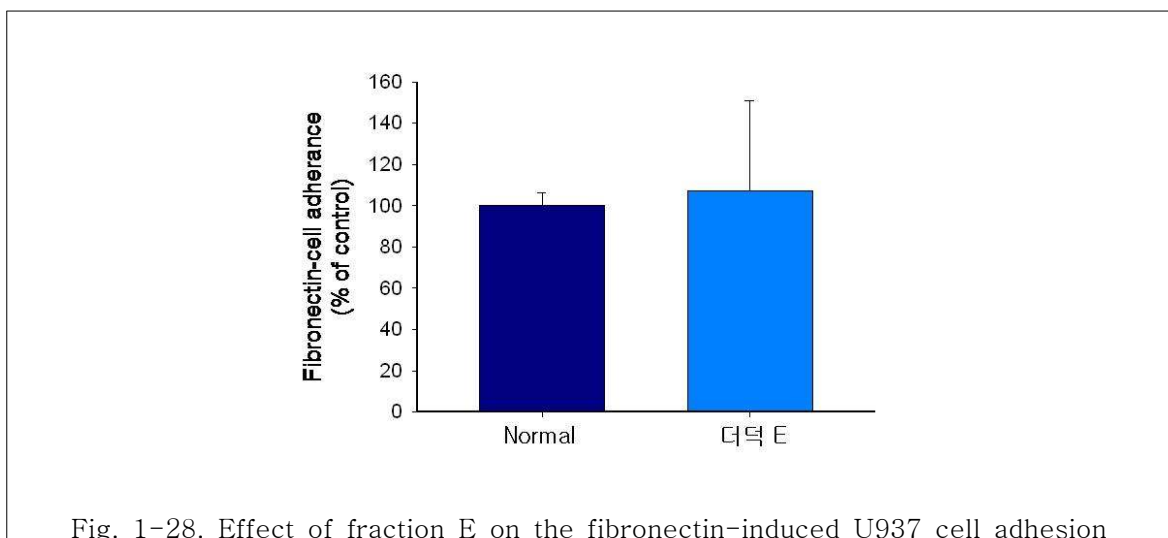
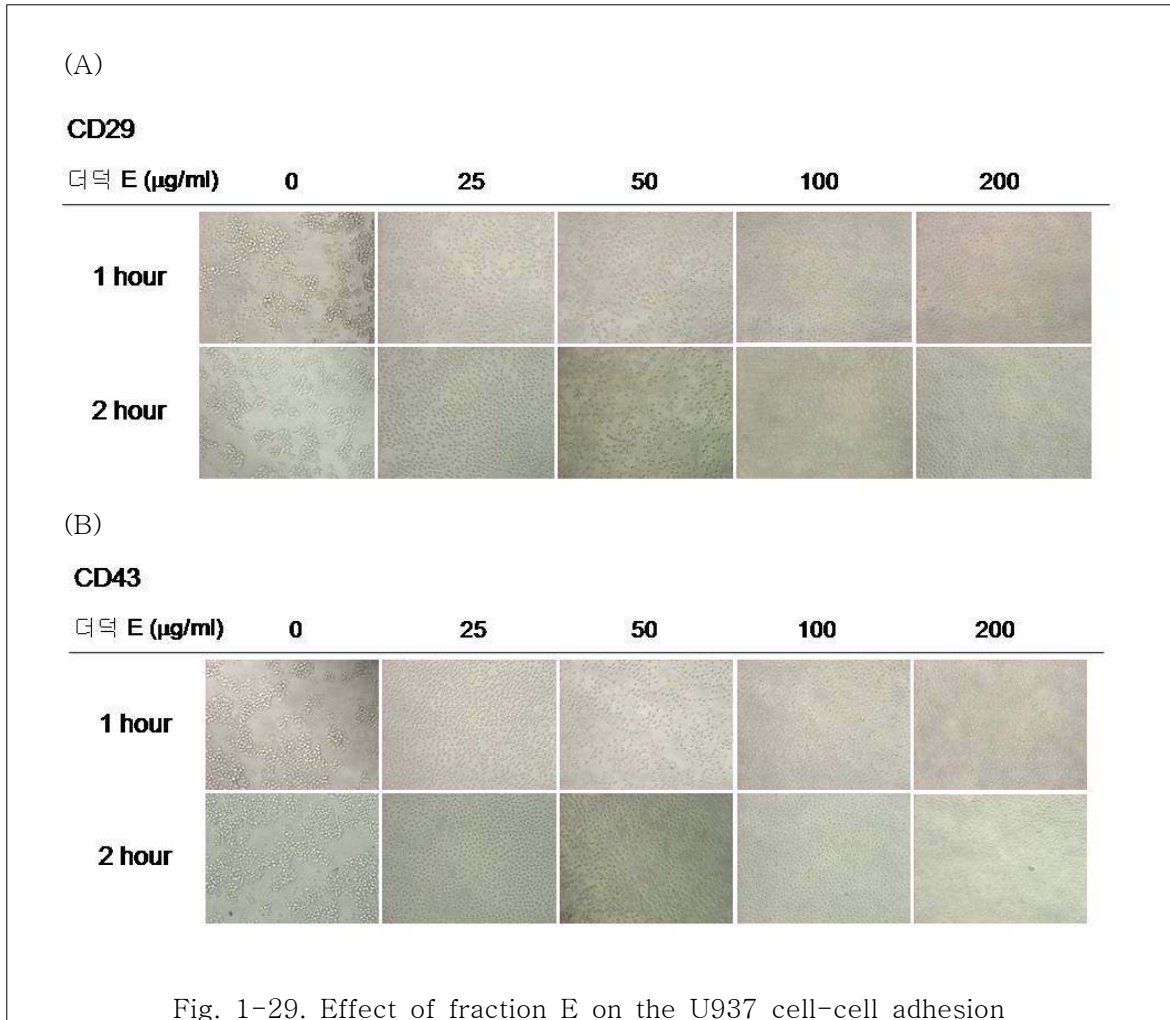


Fig. 1-28. Effect of fraction E on the fibronectin-induced U937 cell adhesion

그 결과 더덕 E 분획은 세포와 fibronectin의 점착능에 영향을 주지 않았음을 Fig. 1-28.을 통해 확인할 수 있었다.

cell-cell 응집능은 96 well plate에 1×10^6 cells/ml 농도로 세포를 접종한 후 시험물질을 처리한다. 그 후 CD43과 CD29 antibody를 처리하고 현미경으로 세포를 관찰하였다.



그 결과 CD29와 CD43에 의해서 응집되었던 세포가 더덕 E 분획에 의해 세포간 응집이 억제되는 것을 Fig. 1-29.를 통해 제시하였다. 따라서 더덕 E 분획은 대식세포의 전구세포인 monocyte의 세포간 상호작용을 억제함으로써 세포 활성화 및 그 기능을 억제한다.

(3) 동물실험 및 예비임상실험을 이용한 효능평가

1) 당해 연도 연구 목표

이 전 연구의 결과를 바탕으로 알러지/아토피에 효과가 있다고 생각되는 세부분획 중 BuOH 분획의 사포닌 성분을 이용하여 동물 실험 및 예비 임상실험을 통해 그 효능을 평가하였다.

2) 실험 방법 및 결과

① 실험 방법

a. 실험 동물

대한 바이오 링크에서 입수한 6주령의 수컷, 실험실에서 3일간 순화시킨 후 일반상태를 관찰하여 외관상 건강한 동물만을 선별하여 실험에 사용하였다. 체중범위는 280g~310g으로 제한하고 사육 환경은 다음과 같다. 명암은 12시간으로 자동 조절 시켰으며 온도는 $20\pm 2^{\circ}\text{C}$, 습도 $50\pm 10\%$ 로 유지하였고 대한 바이오 링크사의 DBL혼합 사료를 급식하였으며 물은 정수기를 사용 자유롭게 섭취토록 하였다.

b. 귀 부종 억제 효능 평가

ICR mouse에 7일 동안 더덕 추출물 사포닌 분획을 10 mg/kg와 50 mg/kg의 두 개 농도로 1일 2회 경구투여 하였고, 대조군으로 Indomethacine 1 mg/kg를 같은 방법으로 투여하였다. 7일째 1회 투여 1 시간 후 arachidonic acid를 ICR mouse의 귀에 발라 부종을 유발하였으며, 1 시간 후 귀 두께를 ear thickness guage로 측정하였고, 대조군과 비교하여 저해능을 구하였다.

c. 알러지 억제 효능 평가

ICR mice를 털을 제모기로 우선 제모한 후 비트 크림을 사용하여 털을 완전히 제거 후 control을 제외한 다른 2개군에 대해 1% DNCB로 200ul씩 피부에 1일 1회 도포하여 피부 염증을 3일간 유도 시켰다. 3일 후부터 control을 제외한 군에 대해서 연고기제와 더덕 추출물 사포닌 분획이 1% 함유된 크림 기제를 1일 1회 4일 동안 도포하였다.

d. 예비 임상 실험 - 부작용 유무 평가 (단기)

20세 이상의 건강한 성인 남녀 10인을 대상으로 팔의 안쪽 부분에 더덕 추출물 사포닌 분획이 1% 함유된 크림 기제를 1회 도포하여 부작용 유무를 평가하였다.

e. 예비 임상 실험 - 부작용 유무 평가 (장기)

20세 이상의 건강한 성인 남녀 10인을 대상으로 팔의 안쪽 부분에 더덕 추출물 사포닌 분획이 1% 함유된 크림 기제를 1일 1회 7일동안 도포하여 부작용 유무를 평가하였다.

f. 아토피 피부염 치료 효능 평가

생후부터 현재까지 아토피 피부염을 앓고 있는 12세 서울 거주 여자 (협동 연구책임자 친자)를 대상으로 평가를 진행하였으며, 더덕 추출물 사포닌 분획이 1% 함유된 크림 기제를 한달간 도포하여 그 효능을 평가하였다.

② 실험 결과

a. In vivo에서 Arachidonic acid에 의해 유도된 귀 부종 억제 효과

더덕 유래 사포닌 성분의 염증반응 조절 효과를 평가하기 위해 2개의 다른 농도로 ICR mice에 일주일간 경구투여 하였다. 그리고 대표적인 염증 매개 물질인 PGE2 생성에 관여하는 Arachidonic acid를 mice의 귀에 처리하여 부종을 유도하였으며 귀의 두께를 측정하는 것으로 그 효능을 평가하였다.

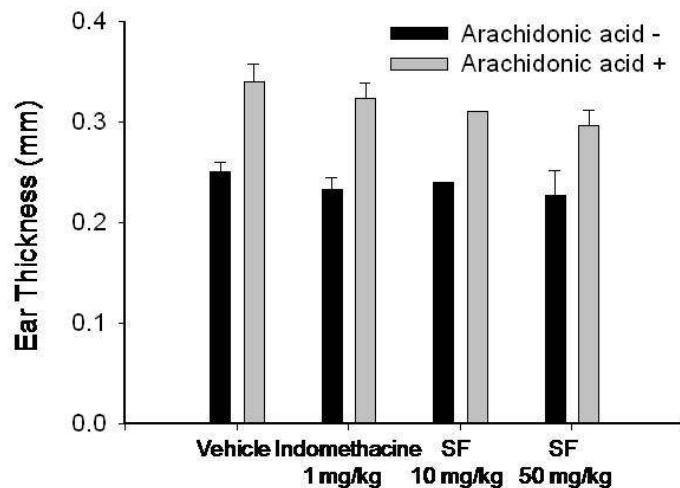


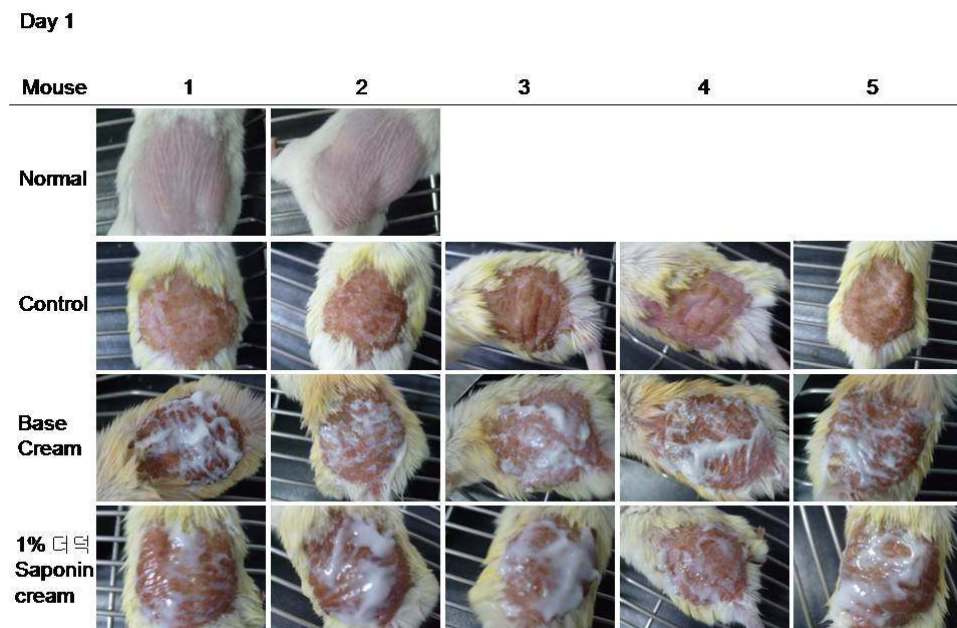
Fig. 1-30. Inhibitory effect of *Codonopsis lanceolata* derived saponin fraction on arachidonic acid-induced ear edema.

그 결과, 대조군으로 사용한 Indomethacine에 비교하여 더덕 유래의 사포닌 분획을 투여한 군에서의 귀 부종 정도가 적은 것을 Fig. 1-30.을 통해 확인하였다. 따라서, 더덕 유래의 사포닌 분획은 Arachidonic acid에 의해 유도된

PGE2 관련 염증 반응을 In vitro에서 뿐만 아니라 In vivo에서도 억제한다는 것을 확인할 수 있었다.

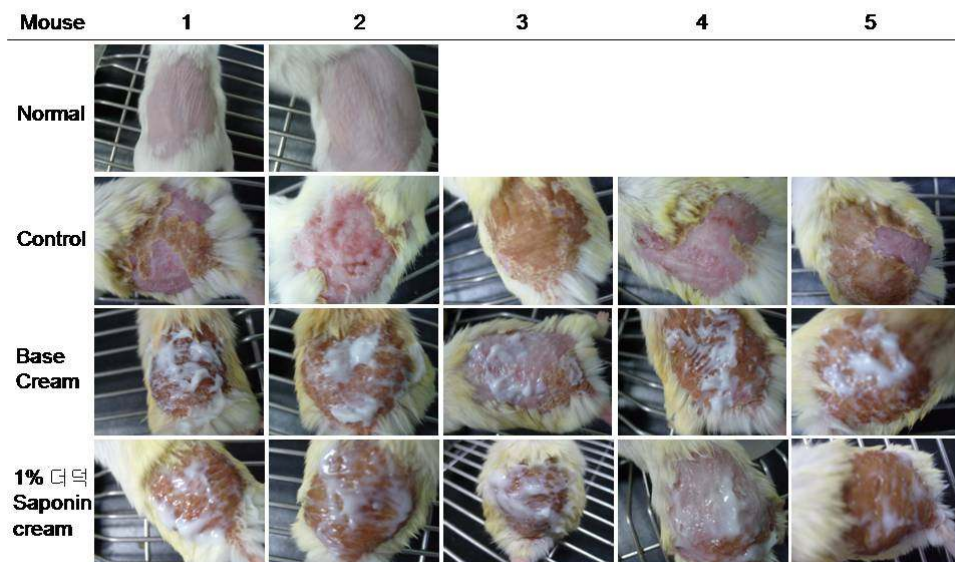
b. In vivo에서 DNCB에 의해 유도된 알러지성 접촉성 피부염 완화 효과
 제 4형 과민반응으로 알려진 접촉성 피부염 완화 효과에 대한 실험을 진행하였으며, 이러한 반응은 비만세포의 탈과립이 증가됨에 따라 발생하는 것으로 알려져 있다. 이전 연구에서 평가하였던 비만세포의 β -hexosaminidase의 분비능 결과를 바탕으로 접촉성 피부염 유도제로 알려진 디니트로클로로 벤젠 (DNCB)을 이용하여 피부염을 유도하였다. 그 후, 더덕 유래의 사포닌 분획이 1% 함유된 크림 기제를 4일간 ICR mice의 등에 도포하여 그 효과를 확인하였다.

(A)



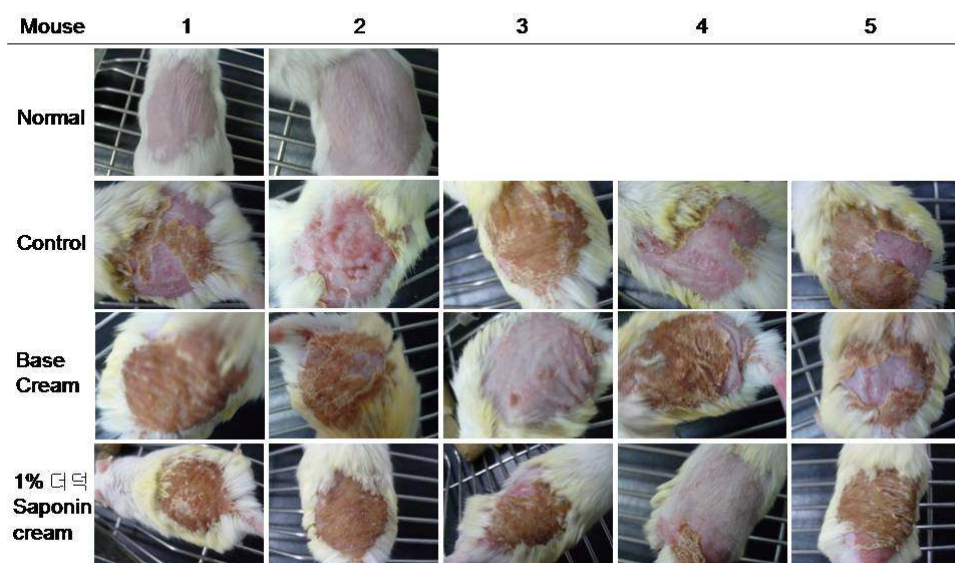
(B)

Day 2



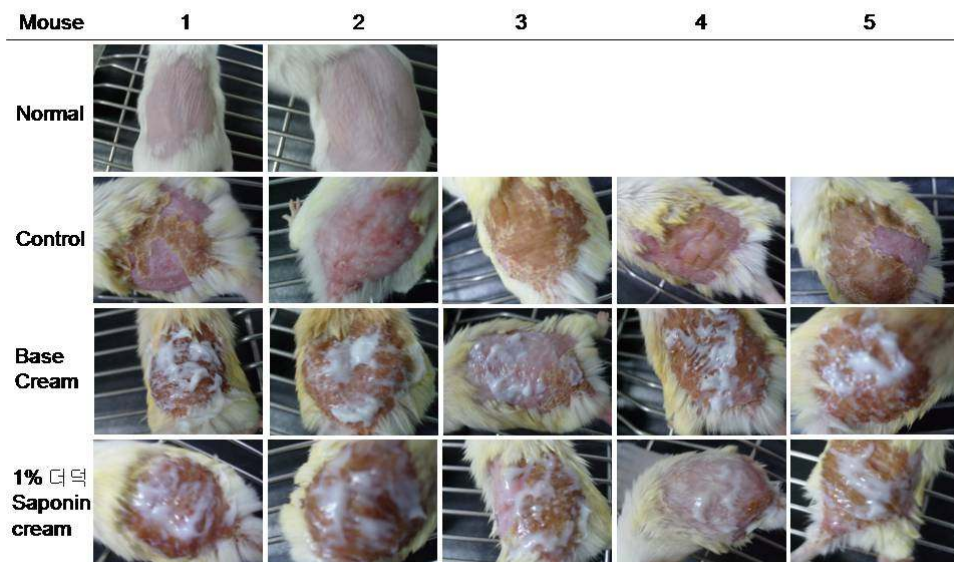
(C)

After 2 days



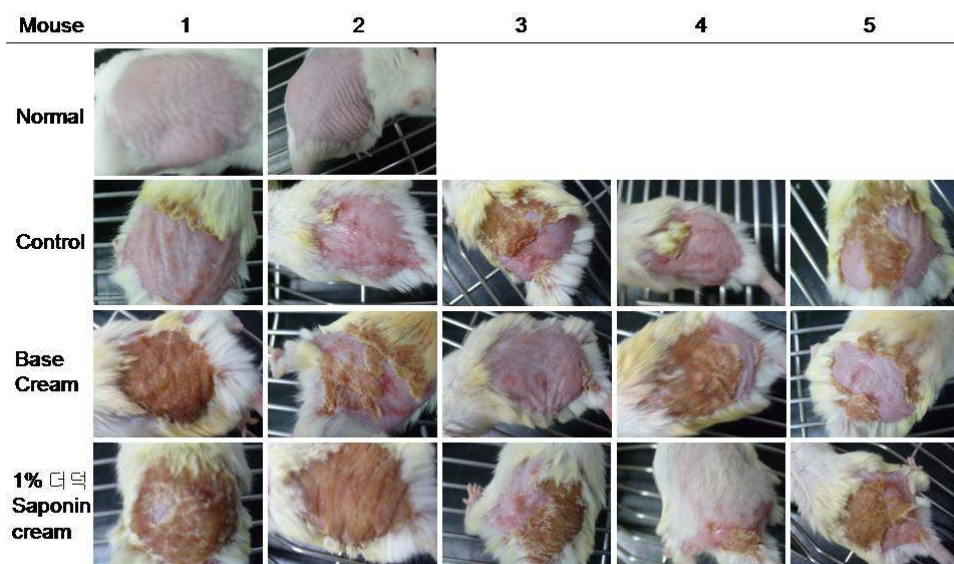
(D)

Day 3



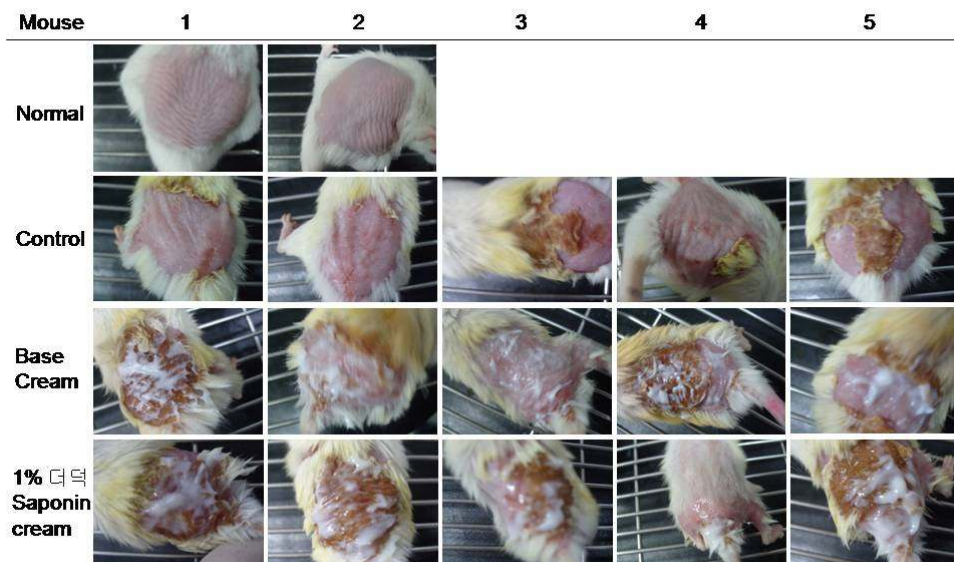
(E)

After 3 days



(F)

Day 4



(G)

After 4 days

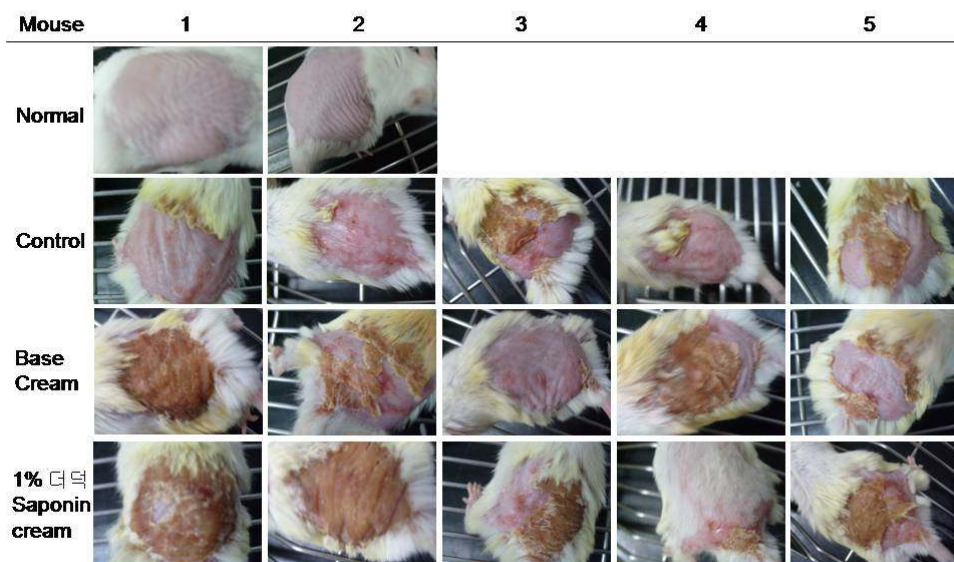


Fig. 1-31 Therapeutic effect of cream containing 1% *Codonopsis lanceolata* derived saponine fraction on DNBC-induced contact dermatitis. (A) day 1, (B) day 2, (C) after 2 days, (D) day 3, (E) after 3 days, (F) day 4, (G) after 4 days.

Fig 1-31.에서 볼 때, control 군 및 크림 기제만 처리한 base cream 군과 비교하여 1% saponin 크림을 바른 몇몇 mouse의 경우 피부염 증상이 회복되는 것을 관찰하였다. 또한 control 군 및 base cream 군은 회복 후 상처가 많이 남아 있는 반면, 1% saponin 크림을 바른 군은 상처 치유 효과가 더 좋은 것을 확인하였다. 이로써 아토피 피부염 증상 자체에 대한 치료 효과 뿐 아니라 피부염 증상이 있는 후 유발되는 상처에 대한 치유 효과도 있는 것으로 관찰되었다. 또한 1% saponin을 함유하는 크림을 바른 군에서는 상처 회복 후 발모 속도에 있어서 control 군 및 크림 기제만 처리한 base cream 군과 비교하여 촉진되는 결과를 보였다. 이로써 더덕 추출물의 saponin 성분은 항아토피 효과 및 상처치유 효과 외에도 육모 또는 양모의 효과를 가지는 것으로 생각되며, 이는 더덕의 saponin 성분이 피부에 흡수되어 인위적으로 유발된 일련의 염증반응들을 억제함으로써 나타난 현상으로 사료된다.

c. 예비 임상 실험 (I) : 1% saponin 분획크림에 대한 단기적 부작용 유무 평가



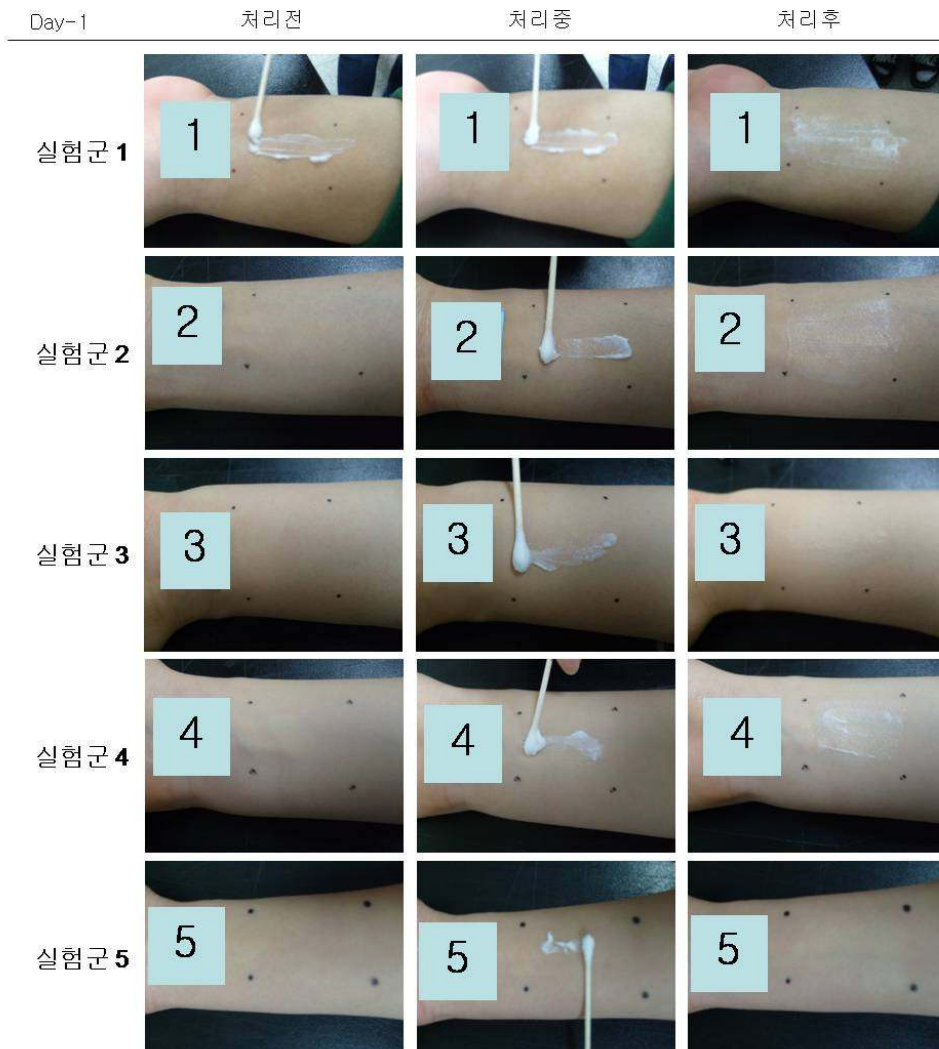
Fig. 1-32 사포닌 함유 크림의 단기적 처리에 의한 인체 부작용 유무 평가

1% saponin 분획 크림의 실용화를 위한 임상 실험을 진행하기 위하여 우선적으로 크림에 대한 피부 부작용 유무를 평가하였다. 건강한 20세 이상의 성인 남녀 (무작위 선출) 10명을 대상으로 단기적 도포에 의한 부작용 유무를 평가하였으며, 1회 처리 후 피부 변화를 관찰하였다. 그 결과 Fig. 1-32.에서 보는 것과 같이 10명 모두에게서 피부 부작용은 발생하지 않는 것을 확인하였다. 따라서, 1% 더덕 유래 saponin 분획 크림은 인체에 대한 단기적인 독성이나 부작용은 없는 것으로 사료된다.

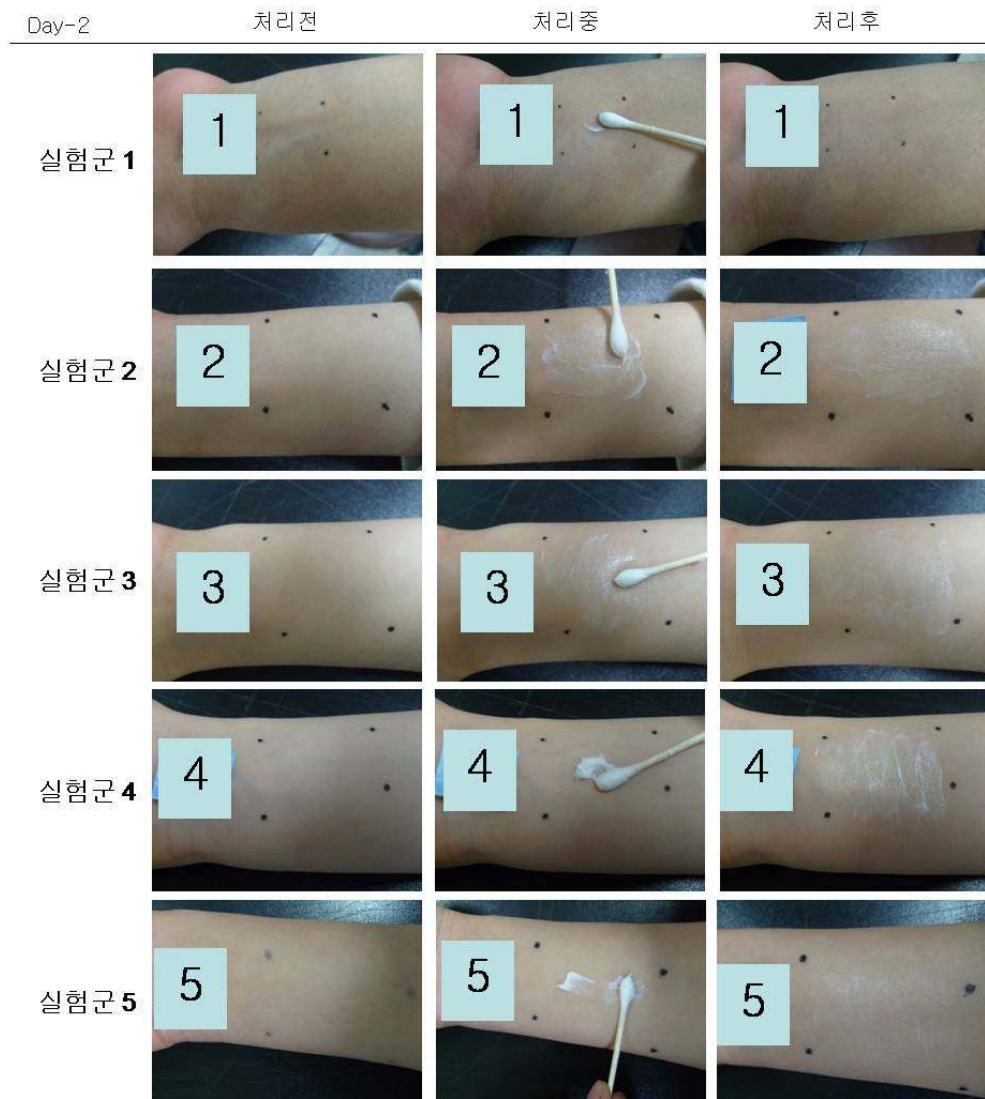
d. 예비 임상 실험 (Ⅱ) : 1% saponin 분획 크림에 대한 장기적 부작용 유무 평가

예비 임상 실험 (Ⅰ)을 바탕으로, 1% saponin 분획 크림을 이용하여 장기적 도포에 의한 부작용 유무를 평가하였다. 건강한 20세 이상의 성인 남녀 (무작위 선출) 5명을 대상으로 일주일간 같은 부위에 1일 1회 처리하였으며, 일주일간 피부 변화를 관찰하였다.

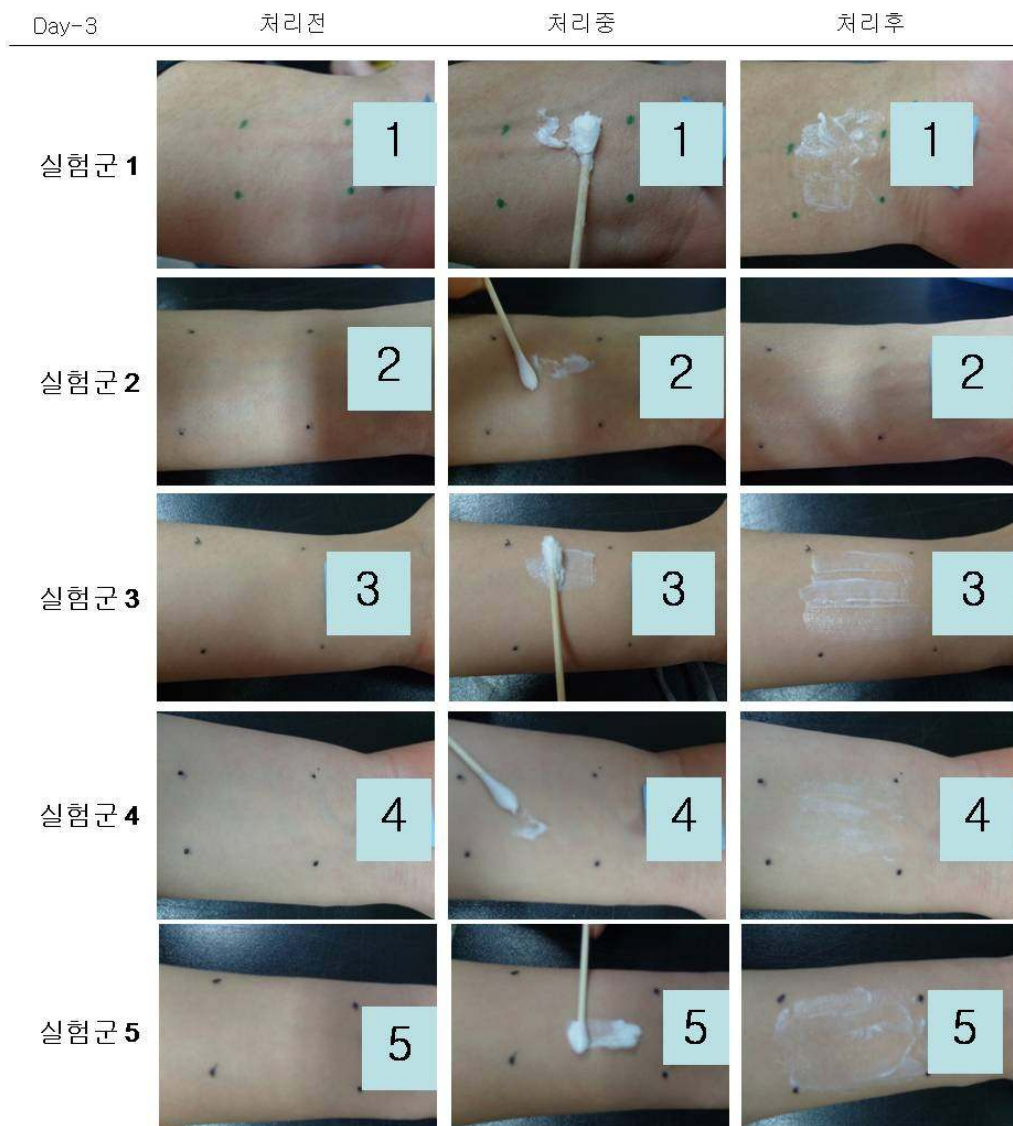
(A)



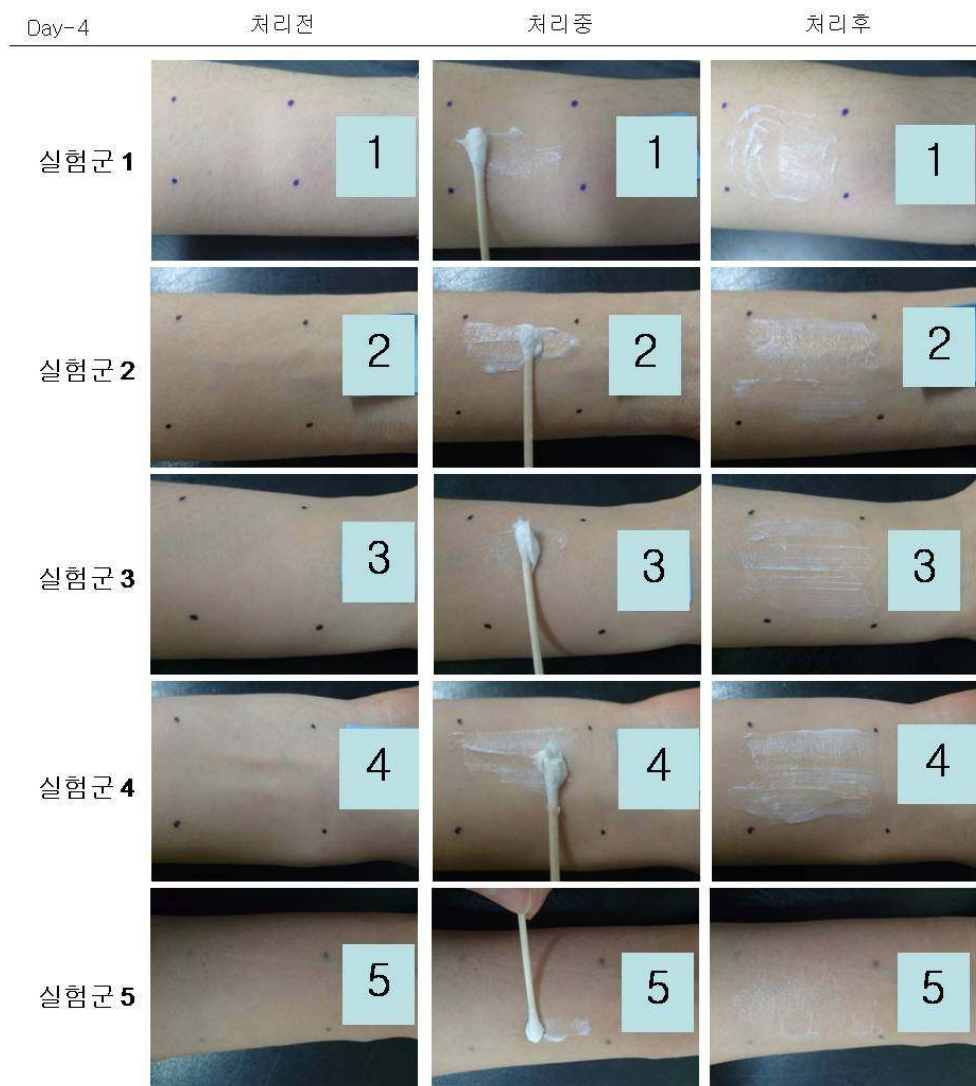
(B)



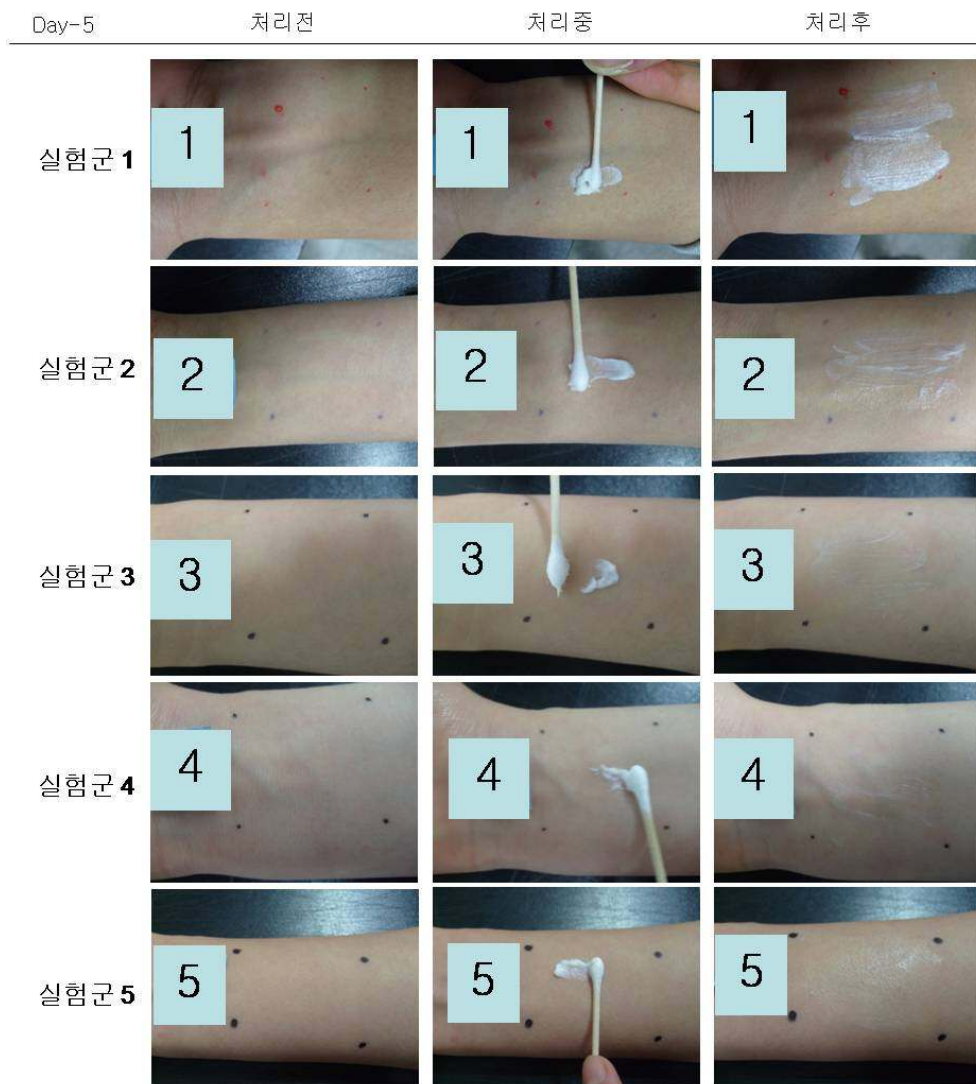
(C)



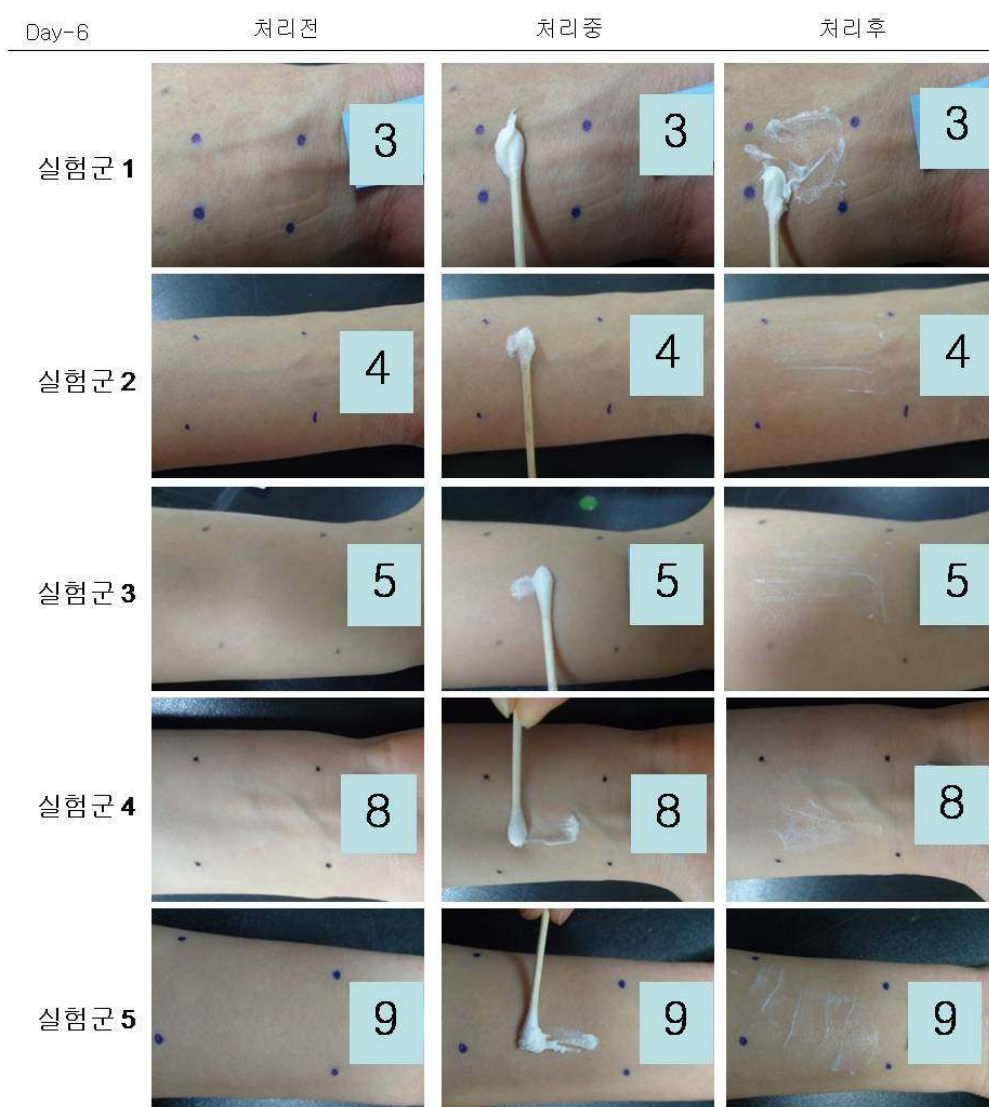
(D)



(E)



(F)



(G)

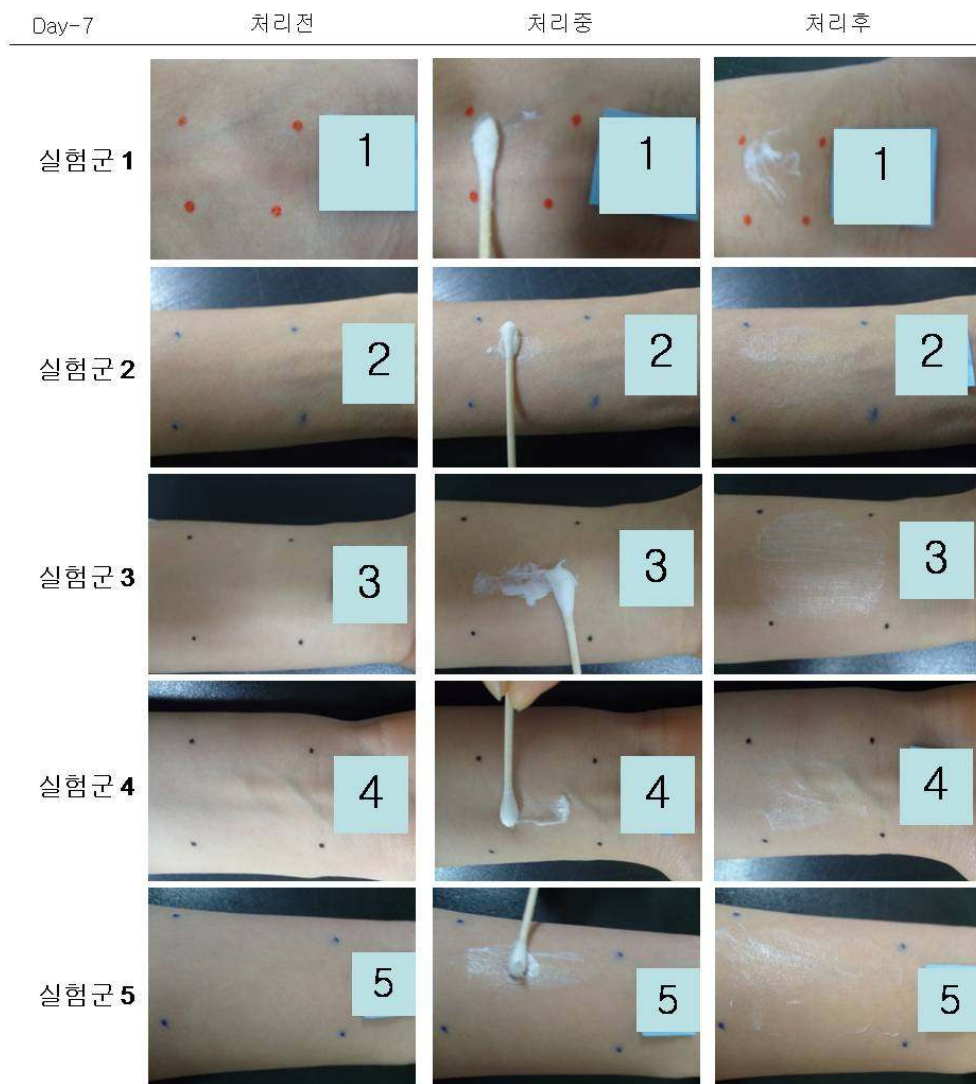


Fig. 1-33. 사포닌 함유 크림의 장기적 처리에 의한 인체 부작용 유무 평가. (A) day 1, (B) day 2, (C) day 3, (D) day 4, (E) day 5, (F) day 6, (G) day 7.

Fig. 1-33.에서의 결과를 통해, 일주일간 1% saponin 크림의 처리 후에도 5명 모두에게서 피부 부작용이 나타나지 않는 것을 확인하였다. 따라서, 단기적 처리 및 장기적 처리 두 경우 모두 1% saponin 크림이 인체 독성이 없는 것을 확인하였으며, 부작용 또한 없는 것으로 확인 되었다. 예비 임상 실험 (I)과 (II)를 통해 1% saponin 크림이 장기적인 알러지 및 아토피 질환 치료에 이용 가능함을 예측할 수 있다.

e. 예비 임상 실험 (III) : 아토피 질환 환자를 대상으로 한 1% saponin 분획 크림의 아토피 질환 치료 효능 평가

예비 임상 실험 (I)과 (II)의 결과를 바탕으로, 1% saponin 분획 크림을 이용하여 아토피 질환을 앓고 있는 환자를 대상으로 치료 효능을 평가하였다. 생후부터 현재까지 장기적으로 아토피 질환을 앓고 있는 12세 여아 (협동과 제책임자 친자)를 대상으로 한달 동안 아토피 발병 부위에 1일 1회 처리하였으며, 한달 후 아토피 질환에 의해 발생한 피부 질환의 변화를 관찰하였다.



사용전



사용후

Fig. 1-34. 사포닌 함유 크림의 처리에 의한 아토피 질환 치료 효과.

Fig. 1-34.의 결과와 같이, 한달간 1% saponin 크림을 국소적으로 도포한 결과 여아의 팔뚝 안쪽에 있던 적색의 피부염 흔적이 사라진 것을 확인할 수 있다. 또한 어린 아이에 대해서도 1% saponin 크림의 부작용은 나타나지 않았음을 보여준다. 이러한 결과를 통해 1% saponin 크림이 아토피 피부염을 치료하는 효능이 있음을 알 수 있으며, 알러지 및 아토피 피부염 치료에 적용할 수 있는 가능성을 보여준다.

3) 결론 및 의의

이전의 연구를 바탕으로 피부염에 대한 동물 실험 및 예비임상 실험을 진행한 결과, PGE2에 의한 염증 반응 및 인체를 대상으로 한 임상 실험에서 더덕 유래의 사포닌 성분에 대한 효과를 확인할 수 있었다. 더덕 유래 사포닌 성분은 ICR mice에서의 경구 투여와 인체에 대한 피부 처리에서 효과를 보였으며, 이러한 것은 피부를 통한 처리뿐만 아니라 경구 투여를 통해서도 효과가 있음을 나타낸다. 본 연구팀은 이러한 결과들을 통해서 더덕 유래의 사포닌 분획이 PGE2 유래의 염증 반응 및 알러지/아토피 피부염에 대해 효과가 있음을 확인하였고, 인체에 대한 부작용이 없음 또한 확인하였다. 따라서, 더덕 유래의 사포닌 성분은 장기적인 알러지 및 아토피 피부염에 적용할 수 있음을 시사한다.

제 2절. 제 2세부과제 연구개발수행 내용 및 결과

1. 연구개발 수행내용

구분	연구개발목표	연구 범위	연구 수행방법	내용
1차 년도	T세포/수지상세포 기능 억제 평가용 더덕 분획 제조 및 억제 단일 성분 분리	추출물 제조 및 수율	용매별 추출물 제조	용매 종류별로 각각의 추출물을 분말화하여 제조 및 수율검토
		열수 추출 최적화	각 조건별 최적화	온도, 시간, volume에 따라 수율검토 및 최적조건 확립
		활성분획 선별	용매별 추출물 분획제조	분획별 NO활성 검토후 선별
		다당체 분석	다당체 추출	조다당체 제조 및 수율 검토, HPLC 이용 성분 분석
		조사포닌 분석	조사포닌 추출	조사포닌 제조 및 수율 검토, HPLC 이용 성분 분석
2차 년도	비만세포/대식세포 기능 억제 물질 분리 정제 기술개발	추출물 제조 및 수율	용매별 추출물 제조	용매 종류별로 각각의 추출물을 분말화하여 제조 및 수율검토
		열수 추출 최적화	각 조건별 최적화	온도, 시간, volume에 따라 수율검토 및 최적조건 확립
		활성분획 선별	용매별 추출물 분획제조	분획별 NO활성 검토후 선별
		다당체 분석	다당체 추출	조다당체 제조 및 수율 검토, HPLC 이용 성분 분석
		조사포닌 분석	조사포닌 추출	조사포닌 제조 및 수율 검토, HPLC 이용 성분 분석
3차 년도	항알러지/항아토피 분획 및 단일물질 분리공정 최적화	분리정제 수율 촉진 및 저해요인 검토	단계별 최적화 조건을 검토	가장 좋은 활성분획의 제조 및 추출수율 최적조건 확립을 위해 시간 및 volume에 변화를 주어 단계별 최적화 조건을 검토
		분리정제 최적 조건 검토	최적 조건을 확인	분리정제 최적 조건 확인
		분리정제 고수율 기술 개발	추출물의 함량을 확인	추출물의 함량을 확인하였다. 그 결과 시간이 증가함에 따라 비례적으로 추출수율이 증가 Volume의 증가에 따라 추출수율도 증가
		고수율 최적화 공정시스템 구축	고수율 최적화 공정시스템 구축	고수율 최적화 공정시스템 구축

2. 연구개발 수행결과

(1) T세포/수지상세포 기능 억제 평가용 더덕 분획 제조 및 억제 단일성분 분리

1) 추출물 제조 및 수율검토

① 용매별 추출물 제조 및 수율 검토

a. 추출과정

용매별 추출은 기본적으로 열수 추출을 하였으며 그 외에 천연물 추출에 많이 사용되고 있는 용매로 Acetone, Ethanol, Methanol을 선택하여 사용하였다. 먼저 *Codonopsis Lanceolata*을 황성에서 직접 구매하여 물세척으로 표면에 붙어있는 흙과 이물질들을 제거하였으며 세척 후 상온에서 하루정도 건조하였다. 그 후 작은 크기로 절단하여 동결 건조하여 분쇄과정을 거친 후 분말 형태로 만들었다. 만들어진 분말을 20g씩 사용하고 solvent의 용량은 500ml씩 동일시하여 실험을 진행했으며 총 12시간 추출하였다. 열수 추출은 90℃에서 추출하였고 그 외의 추출은 모두 실온에서 진행하였으며 2번에 걸쳐 300ml, 200ml씩 나누어 용매를 첨가하여 추출하였다. 이렇게 얻어진 추출물은 filtration을 거쳐 추출액만을 얻어서 사용했으며 각각의 추출액은 수율을 얻기 위해 evaporation을 거쳐 용매를 제거 후 동결건조를 하여 분말화하였다. 분말화된 추출물들은 무게를 측정하여 각각의 추출수율을 구했으며 수율은 모두 백분율을 이용하여 구하였다.

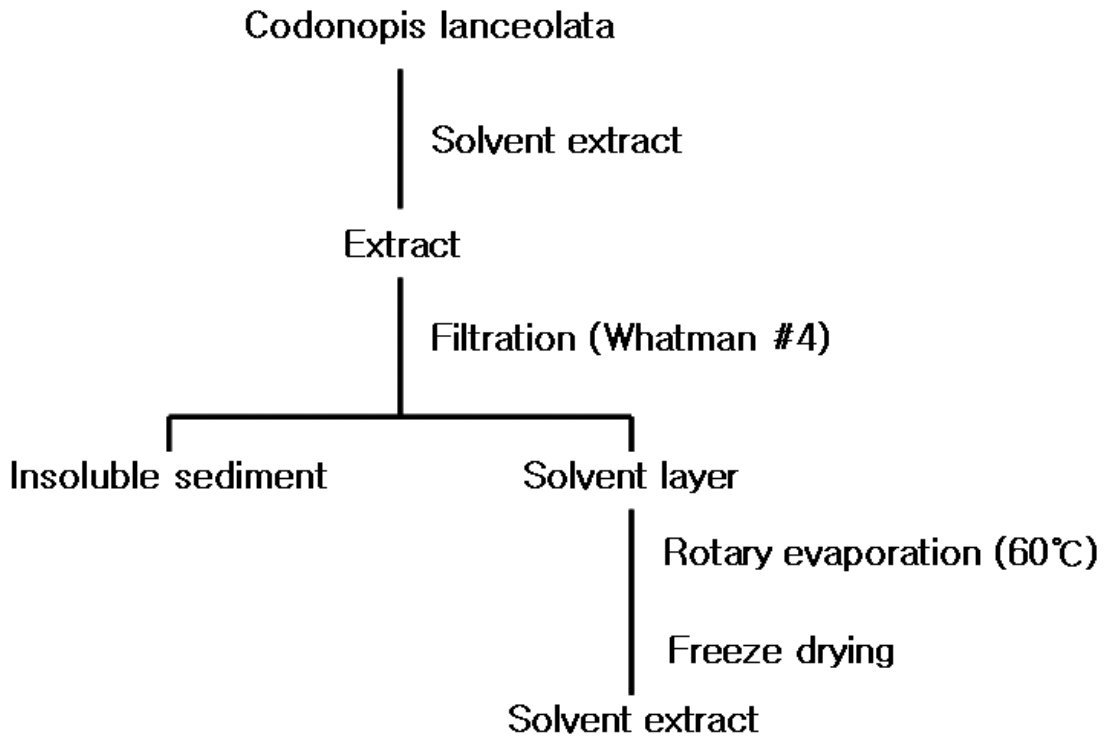


Fig. 2-1. Extraction procedure of *Codonopsis Lanceolata*

b. 추출수율

용매는 천연물 추출에 관련된 논문들을 보고 4가지로 선정하였으며 추출 조건은 열수 추출만 제외하고 모두 같은 조건에서 행하였다. Distilled water는 90℃에서 12h 동안 추출한 후 filtration하여 동결건조를 거쳐 분말화했으며 나머지 3가지의 용매는 실온에서 12h 추출하였으며 6h씩 300ml, 200ml 로 나누어서 2번에 걸쳐 추출을 끝내었다. 추출이 끝난 시료들은 모두 분말화하여 그 수율을 비교하였다. 추출물의 양을 보면 열수 추출에서 8.32g, ethanol추출은 2.41g, methanol추출에서는 2.90g이 나왔으며 acetone의 경우 0.18g만이 추출되었다. 수율을 보면 열수 추출에서는 41.60%로 가장 많은 수율이 나왔으며 ethanol과 methanol의 경우는 각각 12.05%, 14.50%로 비슷한 양이 추출되었으나 acetone의 경우 0.90%라는 극히 소량만이 추출되었다. 열수 추출과 다른 용매의 추출물의 수율은 차이가 거의 30%에 가까울 정도로 차이가 났다.

Table 2-1. Extraction yield of *Codonopsis Lanceolata* by various solvents

solvent	solvent volume	sample	Extracted amount	Extraction yield
Acetone	500ml	20g	0.18g	0.90%
Ethanol	500ml	20g	2.41g	12.05%
Methanol	500ml	20g	2.90g	14.50%
Distilled water	500ml	20g	8.32g	41.60%

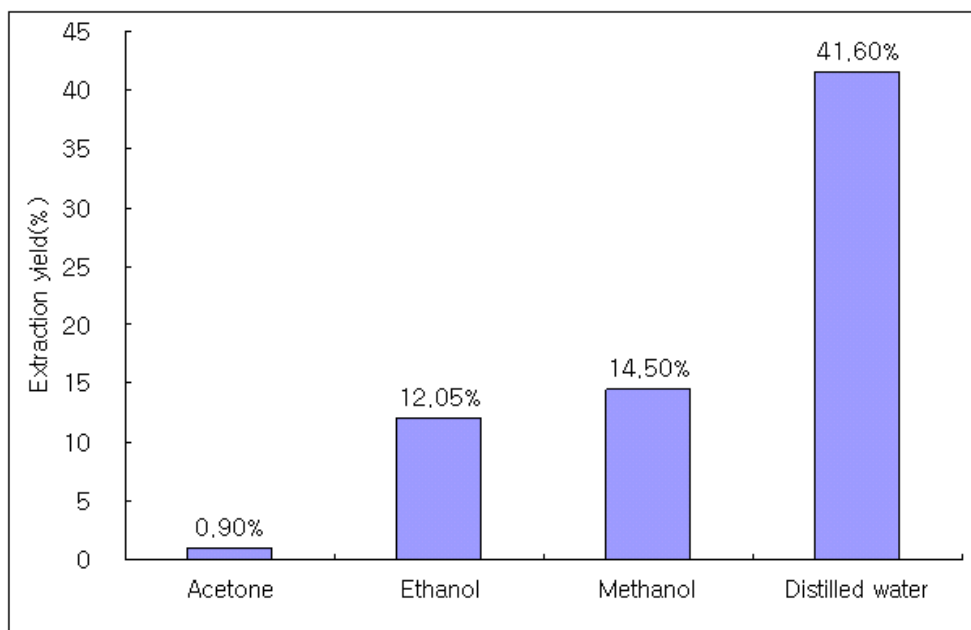


Fig. 2-2. Extraction yield of *Codonopsis Lanceolata* by various solvents

② 불수용성 추출물 제조

a. 추출과정

Codonopsis Lanceolata 분말을 용매별 추출에서 가장 수율이 좋았던 열수로 처리한 후 filtration을 통해 수용성 부분과 insoluble sediment로 나누었다. 이 때 분말 20g을 증류수 500ml에 추출하였다. 불수용성 성분을 분리하기 위해 insoluble sediment에 다른 용매를 각각 처리하여 불수용성 부분을 얻었으며 불수용성 성분을 추출하기 위해 용매로는 Acetone, Ethanol, Methanol을 사용했으며 실험은 각각의 용매별로 해야 했으므로 3가지를 같이 진행하였다. 용매는 6시간 씩 300ml, 200ml로 처리하여 총 12시간 추출하였으며 총 사용한 용매는 500ml을 사용하였다. 이렇게 각각의 용매를 거쳐 나온 추출물은 filtration을 거쳐 추출액을 얻었으며 얻어진 추출액은 evaporation을 거쳐 용매를 제거했으며

용매를 제거한 추출액은 freeze drying하여 분말화하여 추출을 마쳤다. 분말화 시킨 추출물은 무게를 측정하여 각각의 수율을 구했으며 수율은 백분율을 이용하여 구하였다.

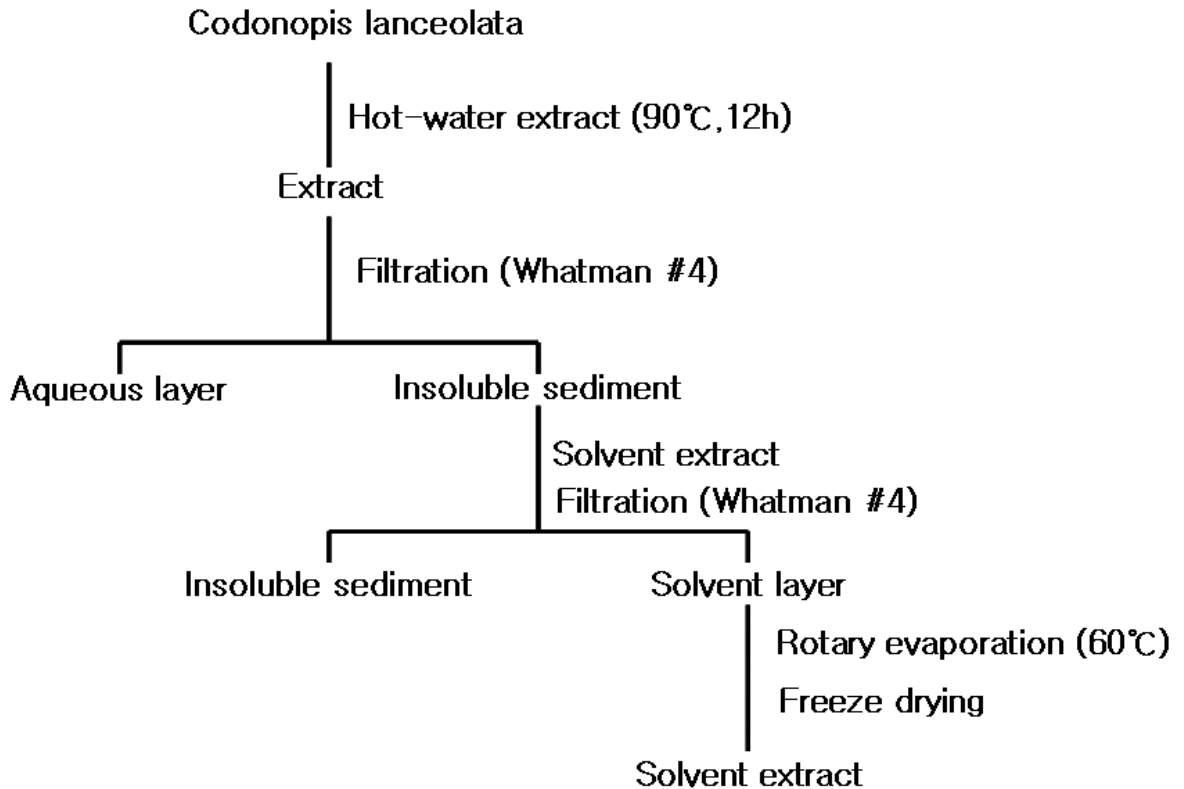


Fig. 2-3. Extraction procedure of water-insoluble sediment from *Codonopsis lanceolata*

b. 추출수율

수용성과 불수용성을 분리하기 위해 일차적으로 hot-water로 추출하고 filtration 후 남은 sediment를 나머지 용매로 추출하였다. Sediment에는 물에 녹지 않은 것들이 들어있는데 용매로 그것들을 추출하여 불수용성 성분을 추출했다. 일차 hot-water 추출은 90°C에서 12h 동안 하였고 나머지 3가지 용매는 앞서의 용매별 추출에서와 같이 실온에서 6h씩 300ml, 200ml씩 하여 총 12h 추출한 후 rotary evaporator를 거쳐 freeze drying하여 추출 수율을 비교하였다. Methanol에서는 0.97g, ethanol에서의 추출물의 무게는 0.91g 나왔으며 또 acetone에서는 0.53g

으로 가장 추출수율이 낮게 나왔으나 앞의 실험에서보다 ethanol이나 methanol과의 차이가 많이 나지는 않았다. 수율을 보았을 때 methanol, ethanol, acetone이 각각 4.85%, 4.55%, 2.65%였으며 methanol이 다른 용매들에 비해 더 많은 수율이 나오는 것을 알 수 있었다.

Table 2-2. Extraction yield of *Codonopsis Lanceolata* water-insoluble sediment by various solvents

solvent	solvent volume	sample	Extracted amount	Extraction yield
Acetone	500ml	20g	0.53g	2.65%
Ethanol	500ml	20g	0.91g	4.55%
Methanol	500ml	20g	0.97g	4.85%

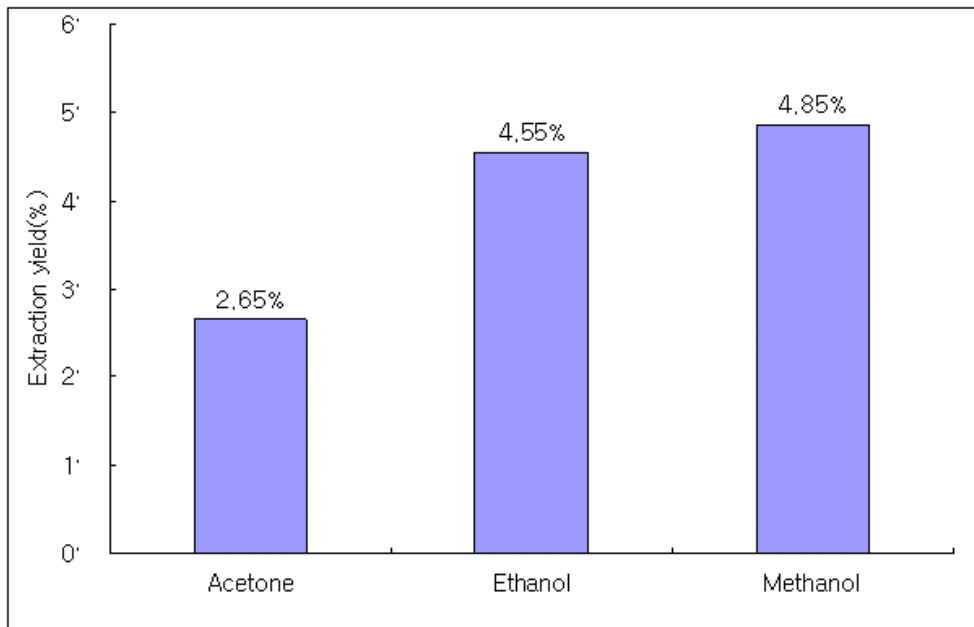


Fig. 2-4. Extraction yield of *Codonopsis Lanceolata* water-insoluble sediment by various solvents

③ 최적 추출조건

a. 추출과정

㉠ Temperature

기본으로 *Codonopsis Lanceolata* 분말 20g을 distilled water volume 을 500mL에 넣어서 추출하였으며 먼저 온도만을 조절하여 수율이 좋은 추출 최적의 온도를 찾았다. 온도는 실온, 50℃, 70℃, 90℃ 로 4가

지 조건을 정하고 추출시간은 12시간으로 하였으며 추출이 끝나면 filtration을 거쳐 각각 동결건조를 실시하였다. 동결건조가 완료되면 그 무게를 측정하여 수율을 보았으며 수율이 좋은 온도로 다음의 실험을 진행하였다.

㉠ Time

앞선 실험에서 수율이 가장 좋은 온도를 선정할 수 있었다. 온도와 volume을 같게 하고 추출시간만을 다르게 하여 각 시간별로 추출 수율을 보았으며 수율이 일정 이상의 시간을 지나서 늘어나는 모습을 보이지 않는다면 추출시간을 그 이상 늘리지 않는 것이 좋다. 시간은 1h, 3h, 6h, 9h, 12h 으로 놓고 각 시간별로의 추출했으며 추출물을 filtration을 거쳐 동결건조하여 무게를 측정하였고 추출 수율을 구했으며 수율이 가장 좋은 시간을 최적의 시간으로 보고 다음 실험을 진행하였다.

㉡ Volume

최적의 온도와 시간이 정해졌으므로 *Codonopsis Lanceolata* 분말 20g 과 다양한 volume으로 distilled water를 반응시켜 그 수율을 보았다. Distilled water는 300mL, 500mL, 1L로 반응 시켰다. 각각의 추출물은 filtration과 동결건조를 거쳐 분말화하였고 그 무게를 측정하여 추출 수율을 구하였다. 이때 수율이 가장 좋은 것이 열수 추출의 최적 조건이 되는 것이다.

㉢ 121℃

일반적으로 멸균을 위해 사용하는 autoclave를 이용하여 추출을 시도하였다. 우선 같은 기계를 이용하였으며 121℃일 때 30min, 1h, 2h으로 변화를 주었으며 각각의 추출물들은 filtration을 거쳐 동결건조하여 분말화 후 무게측정과 수율을 계산하였다.

b. 추출수율

먼저 온도만 변화를 주어서 추출되는 양과 수율을 알아보았다. 그런 결과 실온에서는 다른 온도들에 비해 추출되는 양이 적었으며 온도가 올라갈수록 더 많은 양이 추출되는 양과 비율이 높아지는 것을 알 수 있었다. 그 결과 90℃에서 가장 많은 양이 나왔으며 그 이유로 최적조건으로 온도로 정하였다. 최적 온도로서 90℃가 정해졌기 때문에 온도는 90℃로 일정하게 하고 추출하는 시간만을 다르게 하였다. 그 결과 추출되는 양에서 그 양이 크게 차이는 나지 않았으나 추출되는 시간에 비례하여 추출되는 시간이 많을수록 양이 늘어나는 것을 볼 수 있었다. 12시간을 추출했을 때 가장 많은 양이 추출되었으므로 최적 시간으로 정하였다. 앞에서의 실험을 통해서 최적 온도와 시간이 정해졌으며 용매의 volume만을 다르게 하여 추출하였다. 그 결과 300ml과 500ml에서 추출되는 양은 비슷하게 나왔으나 1L에서는 추출되는 양이 적은 것을 볼 수 있었다. 많은 차이는 보이지 않았지만 volume이 500ml에서 가장 많이 나왔기에 최적조건으로 정하였다. Autoclave에서는 시간만을 조정해 봤는데 1시간을 추출했을 때 가장 많은 양이 추출되었다.

Table 2-3. Extraction yield of *Codonopsis Lanceolata* at various temperature(℃)

Temperature (℃)	Time(hr)	solvent volume (ml)	sample	Extraction sample	Extraction yield(%)
Room temperature	12	500ml	20g	8.26g	41.30%
50	12	500ml	20g	11.08g	55.40%
70	12	500ml	20g	11.14g	55.70%
90	12	500ml	20g	11.60g	58.00%

Table 2-4. Extraction yield of *Codonopsis Lanceolata* for various times(hr)

Temperature (℃)	Time(hr)	solvent volume (ml)	sample	Extraction sample	Extraction yield(%)
90	1	500	20g	10.90g	54.50
90	3	500	20g	10.84g	54.20
90	6	500	20g	11.33g	56.65
90	9	500	20g	11.41g	57.05
90	12	500	20g	11.56g	57.80

Table 2-5. Extraction yield of *Codonopsis Lanceolata* with various volume(ml)

Temperature (°C)	Time(hr)	solvent volume (ml)	sample	Extraction sample	Extraction yield(%)
90	12	300ml	20g	10.95g	54.75%
90	12	500ml	20g	11.56g	57.80%
90	12	1l	20g	4.70g	23.50%

Table 2-6. Extraction yield of *Codonopsis Lanceolata* for various time at autoclave time

Temperature (°C)	Time(hr)	solvent volume (ml)	sample	Extraction sample	Extraction yield(%)
121	0.5	500	20g	10.08g	50.40%
121	1	500	20g	12.43g	62.15%
121	2	500	20g	11.04g	55.00%

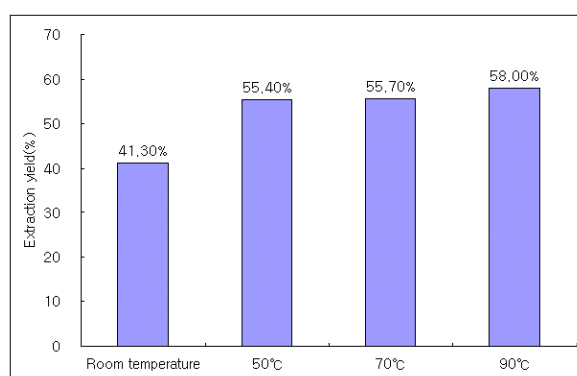


Fig. 2-5 Extraction yield of *Codonopsis Lanceolata* at various temperature(°C) for 12 hours

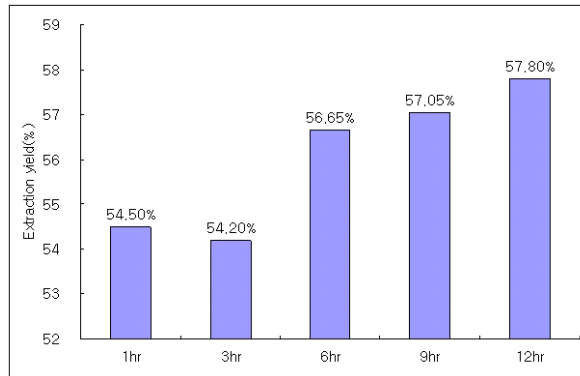


Fig. 2-6. Extraction yield of *Codonopsis Lanceolata* at various time(hr) at 90°C

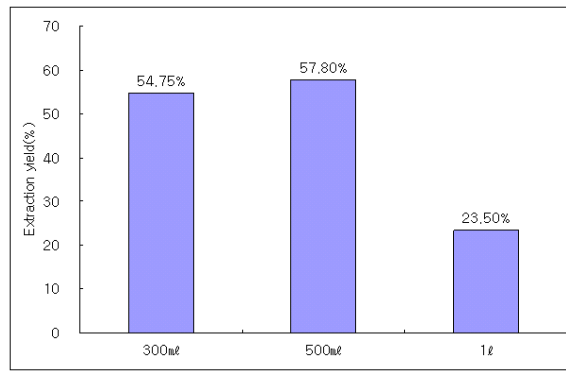


Fig. 2-7. Extraction yield of *Codonopsis Lanceolata* at various volume(ml) for 12hours at 90°C

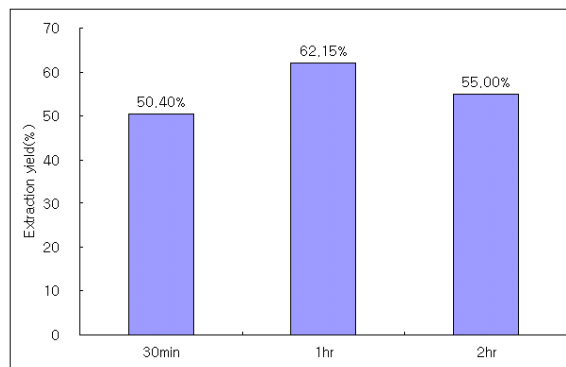


Fig. 2-8. Extraction yield of *Codonopsis Lanceolata* for various time at autoclave time

④ Cascade 추출물 제조

a. 추출과정

Codonopsis Lanceolata 분말 20g을 증류수 500ml로 열수 추출한 후 filtration을 거쳐 얻어진 추출액을 가지고 cascade step을 진행하였다. 사용된 용매는 천연물에서 많이 쓰이는 것들을 선정하여 사용했으며 선정된 용매로는 Hexane, Chloroform, Ethyl acetate, Butanol을 사용하였다. 사용한 용매들은 aqueous layer 액량과 동량의 용매를 사용하였으며 먼저 hexane으로 추출을 하였으며 aqueous layer층에 chloroform을 가하여 aqueous layer과 분리하고 분리된 aqueous layer에 다시 ethyl acetate를 가하였고 또 aqueous layer과 분리하였다. 그리고 분리된 aqueous layer층은 n-butanol을 사용하여 다시 aqueous layer으로 나누었다. 각각의 cascade step에서 얻은 추출액은 앞의 실험과 동일하게 evaporation과 freeze drying을 통하여 분말화하여 추출물을 제조하였다. 추출물의 무게를 측정하여 수율을 측정하였으며 수율은 백분율을 사용해서 비교하였다.

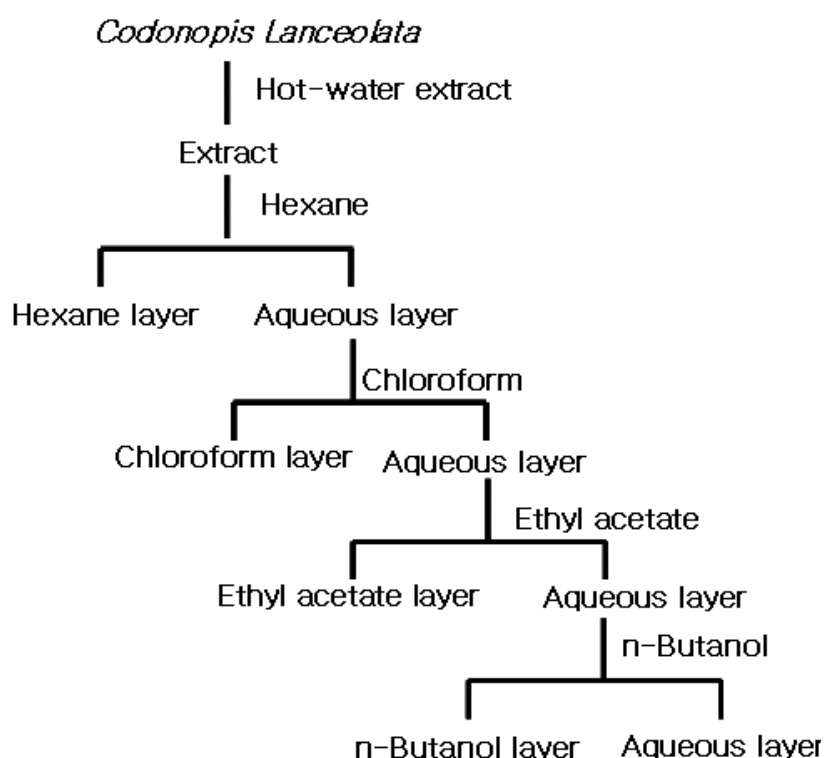


Fig. 2-9. Cascade extraction procedure with various solvents of hot-water extract from *Codonopsis Lanceolata*

b. 추출수율

Cascade step의 용매는 다른 논문들에 의해 선정했으며 Hot-water extract를 가지고 진행하였다. Hot-water extract와 동량의 solvent volume으로 추출하였으며 그 수율은 마지막 단계까지 진행한 후 각각의 추출액을 가지고 freeze drying까지 진행하여 분말상태에서 수율을 측정하였다. 측정결과 Hexane층에서는 0.05g, Chloroform층에서는 0.21g, Ethyl acetate층에서는 0.06g, butanol층에서는 0.25g, distilled water층에서는 9.10g으로 압도적으로 많이 추출되었고 그 다음으로 butanol과 chloroform이 많은 수율을 나타내었다. 수율을 보게되면 Hexane층에서는 0.25%, Chloroform층에서는 1.05%, Ethyl acetate층에서는 0.15%, butanol층에서는 1.25%, distilled water층에서는 45.50%가 나왔다. Hexane과 ethyl acetate는 추출되는 양이 너무 미량이라 더 많은 수율을 얻을 수 있는 방법을 알아봐야 할 것 같다.

Table 2-7. Cascade extraction yield with various solvents of *Codonopsis Lanceolata* extract by hot-water

solvent	solvent volume	sample	Extracted amount	Extraction yield
Hexane	500ml	20g	0.05g	0.25%
Chloroform	500ml	20g	0.21g	1.05%
Ethyl acetate	500ml	20g	0.03g	0.15%
Butanol	500ml	20g	0.25g	1.25%
Distilled water	500ml	20g	9.10g	45.50%

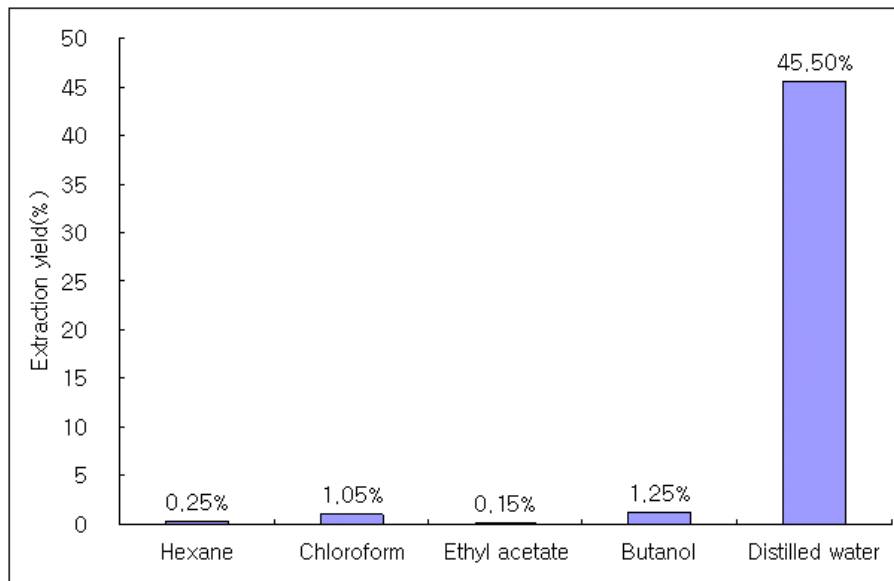


Fig. 2-10. Cascade extraction yield of *Codonopsis Lanceolata* extract by hot-water

⑤ 활성분획 선별

용매별로 추출한 각각의 추출물을 가지고 가장 활성이 좋은 분획을 선택해야하는데 그 지표로 NO억제능을 보았다. 일반적으로 NO(산화질소)는 혈관의 안쪽을 감싸고 있는 상피세포라는 막에서 미세 액체로 생성 분비되며 신경전달물질로 작용하여 혈관을 유연하고 건강하게 하여 혈관을 확장, 혈압을 조절하고 혈류의 흐름을 촉진함으로써 고혈압을 낮추고, 혈액을 정화하고, 상피세포를 보호하고, 혈전 생성과 죽상반의 축적으로 인한 동맥경화의 진행을 지연시키며, 심장발작(심근경색)과 뇌졸중을 예방 또는 치료한다고 알려져 있으며 또한, 산화질소 순환계 뿐만 아니라 면역계, 신경계 등에도 신호 물질로 작용하여 폐, 간, 신, 위, 뇌, 등 모든 세포의 기능을 향상시킨다. 또 포도당연소 부산물인 프리라디칼을 중화시키며, 피부와 뼈의 노화를 방지하며, 운동 시 나오는 젖산 축적의 양을 줄이며, 암세포 증식억제, 당뇨 합병증예방, 알츠하이머병, 발기 부전, 관절염, 불면증 등에 기여한다.

하지만 anti-inflammation이나 anti-allergy, atopy의 경우에는 NO가 높은 것이 좋은 것이 아니다. Inflammation이나 allergy가 생기게 되면 대식세포에서 histamine이나 cytokine 등 염증매개 물질들이 나오게 되는데 이로 인해 Inflammation이나 allergy가 더 악화가 되고 그로인해

NO의 생성이 많아지게 된다. 그렇게 많아진 NO는 대식세포를 자극하기 때문에 대식세포에서는 histamine이나 cytokine 등 염증매개 물질들을 배출하기 때문에 악순환이 반복되게 된다. 그렇기에 면역학적인 면에서 보면 NO의 생성이 많은 것이 좋지만 atopy나 allergy에서는 적당한양의 NO만을 필요로 한다. 그렇기에 활성 분획의 지표로 NO억제능을 보았다.

NO억제능 실험은 제 1세부에 실험을 의뢰해서 수행하였으며 그 결과 cascade step에서의 마지막 단계인 butanol분획이 다른 분획들에 비해 가장 많은 NO억제능을 보였다. NO억제능 실험은 각 분획에 LPS처리한 후 LPS에 의해 생성된 NO를 얼마나 억제했는지를 보았는데 LPS만 넣은 것을 100%로 보았을 때 butanol분획은 27%가량으로 낮추는 효과를 보였다. 그로인해서 butanol분획을 활성분획으로 선정하였다.

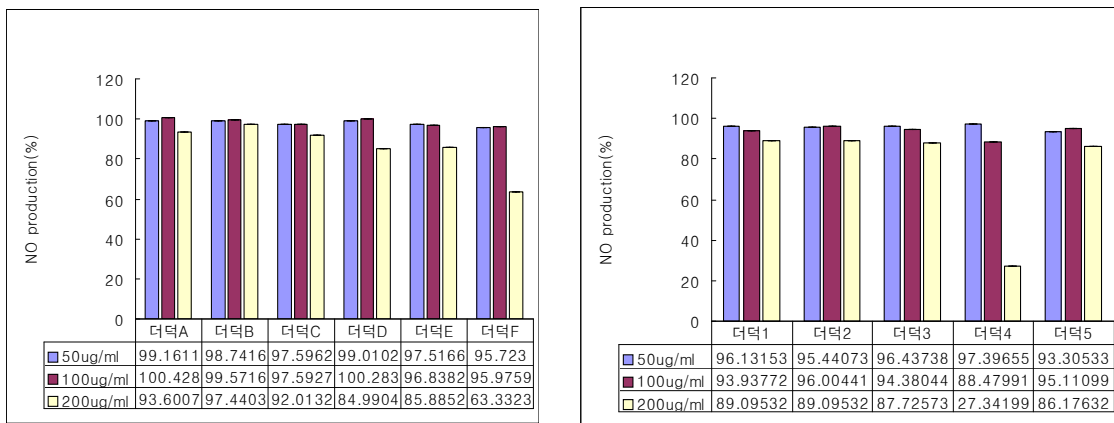


Fig. 2-11. The effect of various extracts from *Codonopsis Lanceolata* in murine macrophage cell (제 1세부 연구 결과중에서)

2) 단일물질 분리정제

① 다당체 추출 및 분석

a. 분리과정

㉠ 추출액 제조

추출액은 *Codonopsis Lanceolata* 분말 20g을 distilled water 500ml로 열수 추출(90°C, 12h)하여 filtration(Whatman #4)을 거친 후 생긴 추출액을 사용하였다.

㉡ 다당체 분리

추출액 2등분하여 추출액 3배 volume의 ethanol을 가하여 4°C에서 하

루정도 두었다. 그런 후 하나는 filtration을 통해 다당체를 얻은 후 열풍 건조를 시켜서 무게를 측정하였고 남은 하나는 원심분리(6,000rpm, 30min)를 통해 침전된 것들만을 distilled water에 녹여서 모았다. 이렇게 모아진 추출액은 evaporation을 통해 ethanol을 제거해주었으며 약간의 distilled water에 녹여 투석을 통해 정제하였다. 투석은 총 3일간 했으며 투석이 끝나면 동결건조 시키고 이때 동결건조 한 것은 무게 측정에 사용되며 그 일부는 분석을 위해 HPLC용 시료를 만드는데 사용되었다.

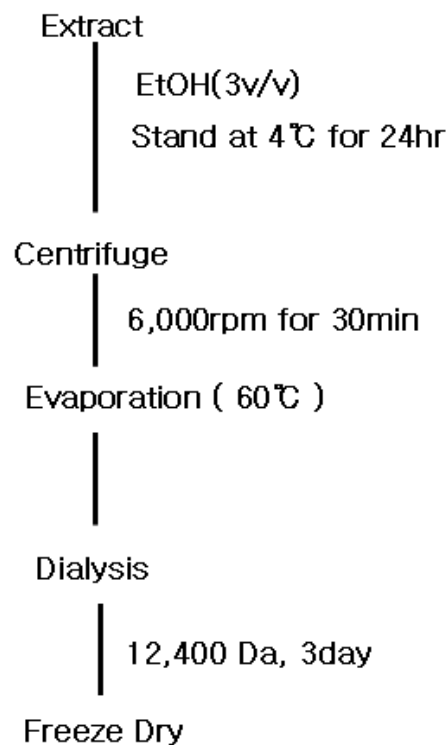


Fig. 2-12. Extraction procedure of polysaccharides

㉔ 다당체 수율

Codonopsis Lanceolata 분말 20g을 distilled water 500ml로 열수 추출 (90°C, 12h)하여 filtration(Whatman #4)을 거친 후 생긴 추출액을 사용하였다. 얻어진 추출액은 반으로 나누어서 두 개 모두 3배 volume

ethanol에 추출액을 부어주고 4°C에서 하루 동안 두었다. 다음 날 하나는 filtration하여 filter paper(Whatman #4)에 걸린 다당체들은 열풍건조해서 그 무게를 측정하였으며 나머지 하나는 6,000rpm에서 30분간 원심 분리하여 다당체들을 분리하였으며 분리한 다당체들은 ethanol을 제거하기 위해 evaporation(60°C)하였으며 3일간 투석한 후 동결건조하였다. 하나의 추출액으로 열풍건조와 동결건조로 나누어서 추출물을 얻었기에 얻어진 추출물은 2배를 곱하여 그 수율을 구했다. 그 결과 열풍건조를 거쳐 얻어진 추출물의 무게는 2.00g이고 10.01%의 수율이 나왔다. 투석을 거친 후에 측정한 무게는 불순물이 제거되어서인지 그 양이 열풍건조를 거친 추출물보다는 적었다. 투석을 거쳐 얻어진 다당체의 무게는 1.62g으로 8.13%의 수율을 얻었다.

Table 2-8. Extraction yield of polysaccharides from *Codonopsis Lanceolata*

	polysaccharides	Extraction yield
추출수율 (EtOH침전)	2.00g	10.01%
추출수율 (투석)	1.62g	8.13%

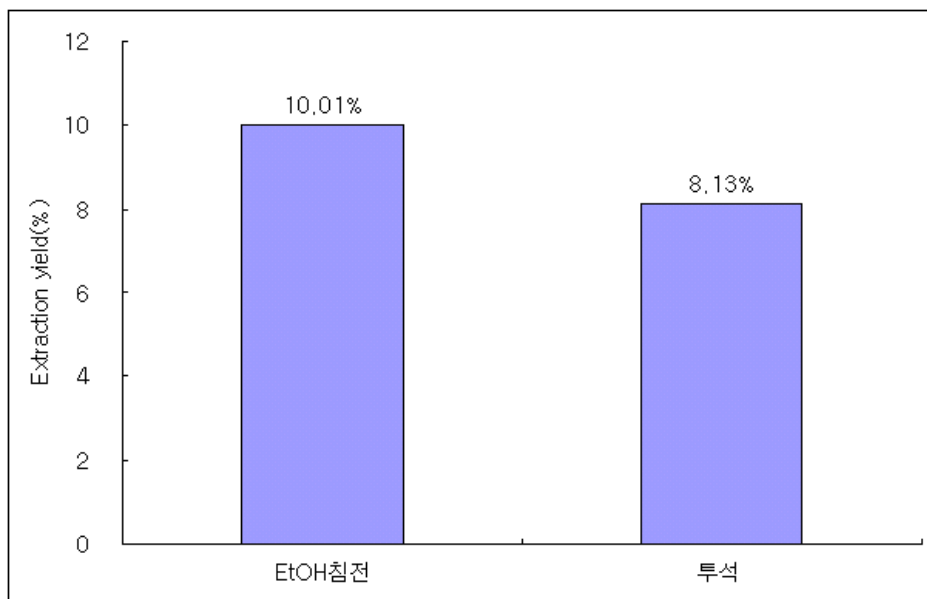


Fig. 2-13. Extraction yield of polysaccharides from *Codonopsis Lanceolata*

b. 특성분석

㉠ 다당체 구성당 분석

구성당의 조성비를 알아보기 위해 동결건조를 마친 시료 2mg을 정확히 칭량하여 1.5mL microtube에 담은 후 b.p.가 비교적 낮아 산의 제거가 용이한 2M trifluoroacetic acid 1mL을 넣어 진탕하여 녹인 후, 100°C에서 4시간동안 산가수분해하여 완전히 monomer size로 절단한 후 vaccum distillation 장치를 이용하여 용매를 완전히 제거하였다. 용매가 제거된 시료에 1mL의 DI water(deionized water)를 넣어 완전히 녹인 후 0.2µm PTFE membrane에 filtering하여 희석하여 HPLC용 시료로 사용하였다. Standard는 D-glucose, D-galactose, D-mannose, L-flucose, D-fructose를 사용하였다.

구성당 분석측정에 HPLC를 사용하였으며 Column은 Agilent Zorbax Cabohydrate를 사용하였고 flow rate는 1.4mL/min , oven temperature는 60°C, injection volume은 20µl, mobile phase는 acetonotrile과 DI water를 85 : 15의 비율로 사용했으며 detector로는 ELSD를 사용해서 분석하였다. ELSD는 기존의 UV나 RI에 비해 감도도 더 좋고 시간도 많이 단축할 수 있기 때문에 최근에 많이 사용되어지는 기기이다.

Table 2-9. Operation conditions of HPLC

Instrument	Young Lin MP30
Columns	Agilent Zorbax Cabohydrate
Flow rate	1.4 mL/min
Oven temperature	60°C
Injection volume	20 µl
Mobile phase(%)	Acetonotrile : DI water = 85 : 15
Detector	ELSD ZAM 3000

㉡ 다당체 특성검토

Fig. 10.에서 처음은 추출액에 3배 volume의 ethanol을 부어서

polysaccharid를 침전시킨 그림이고 두 번째 사진은 다당체를 filtration 했을 때 filter paper(Whatman #4)에 의해 걸러진 polysaccharid를 찍어 둔 사진이다.

추출액을 3배 volume ethanol에 부었을 때 사진에서 보듯이 가라앉는 것이 거의 없으면서 전체적으로 깨끗하게 엉겨있는 것을 볼 수 있었다. 또한 엉겨있는 것들도 몽글몽글하면서 약간의 노란빛을 가지고 있는 흰색을 띄고 있었다. 또 밑에 엉기지 않은 액 중에는 위로 떠오르지 못하고 중간에 뭉쳐있는 것을 볼 수 있었다.

Filtration을 통해 걸러낼 때 잘 걸러지지 않는 것을 볼 수 있었으며 하루를 4°C에 두어서 그런지 색이 좀 더 노란색을 띄고 있었으며 약간 미끌한 느낌을 지니고 있으며 서로 엉겨있는 형상을 유지한다.

HPLC로 분석한 결과 standard에서는 fucose는 12.2783분, fructose는 17.7050분, mannose는 20.7800분, glucose는 22.9500분, galactose는 26.6717분에 peak를 나타냈다. 그리고 더덕에서 추출한 다당체에서는 fructose와 glucose만으로 구성되어있는 것을 확인할 수 있었으며 그 외에 다른 물질들의 peak는 잡히지 않았다. 그로 인해 더덕유래 다당체에는 fructose와 glucose로 구성되어 있는 것을 알 수 있었다.

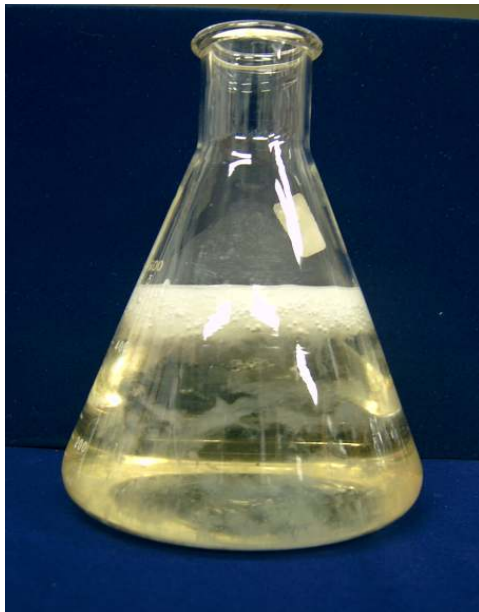


Fig. 2-14. Photograph of polysaccharide precipitated by ethanol

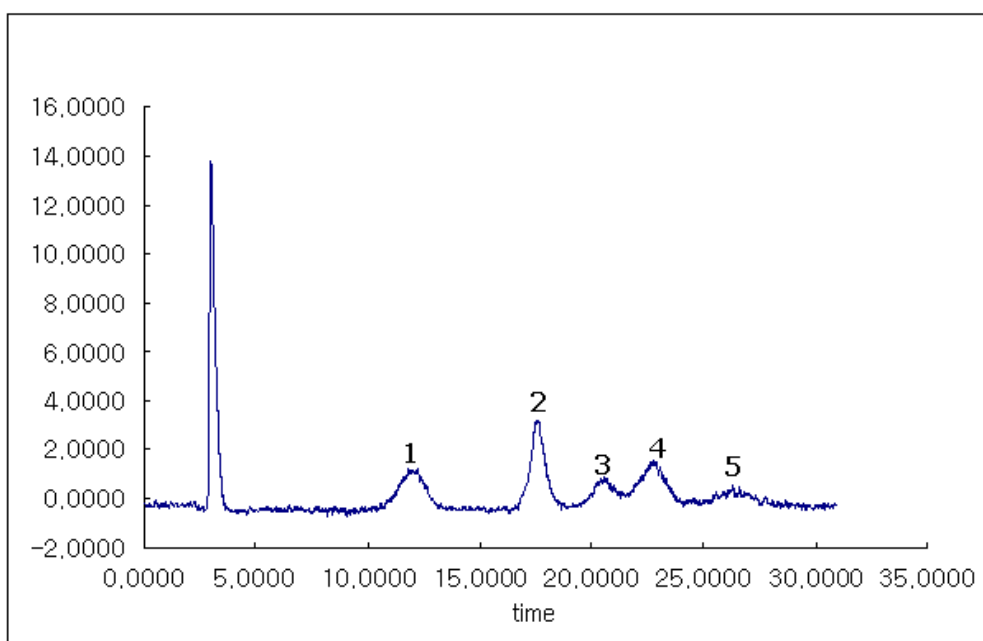


Fig. 2-15. HPLC chromatogram of standard saccharides

- | | |
|--------------|-------------|
| 1. Fucose | 2. Fructose |
| 3. Mannose | 4. Glucose |
| 5. Galactose | |

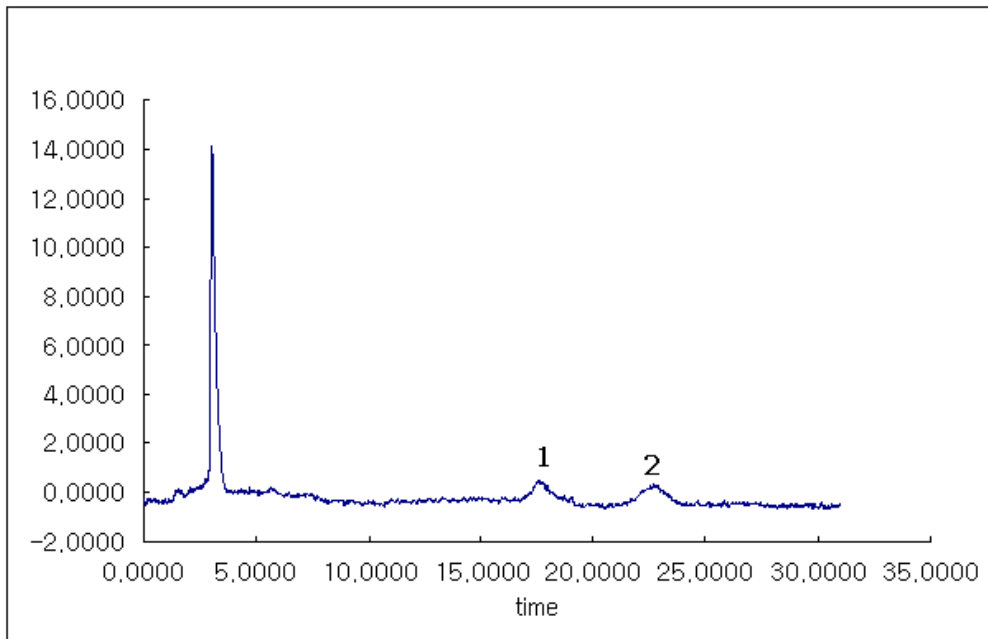


Fig. 2-16. HPLC chromatogram of extract from *Codonopsis Lanceolata*
 1. Fructose 2. Glucose

② Crude saponin 제조

a. 분리과정

㉠ Saponin 제조과정

Crude saponin 제조는 인삼 saponin 성분을 추출하는 방법을 응용하였다. 먼저 80% methanol 100mL에 *Codonopsis Lanceolata* 분말 4g을 넣어 1시간 정도 추출(4회 반복)한 후 filtration하여 80% methanol로 2회 정도 반복하고 filtration한다. 그 후 여액은 evaporation하여 농축시키고 distilled water를 넣어 농축물과 섞어준다. 그 후 ether를 넣어 분액깔대기에서 층분리를 하고 물층에 수포화 부탄올을 첨가하여 3회 정도 추출한 다음 수포화 부탄올층만을 모아 distilled water로 washing하였다. 수포화 부탄올층을 모아 evaporation하여 crude saponin을 얻는다. 수포화 부탄올은 n-butanol과 distilled water를 7:3의 비율로 혼합한 뒤 상층의 수포화 부탄올층을 분리하였다. 그렇게 분리한 수포화부탄올을 사용하였다.

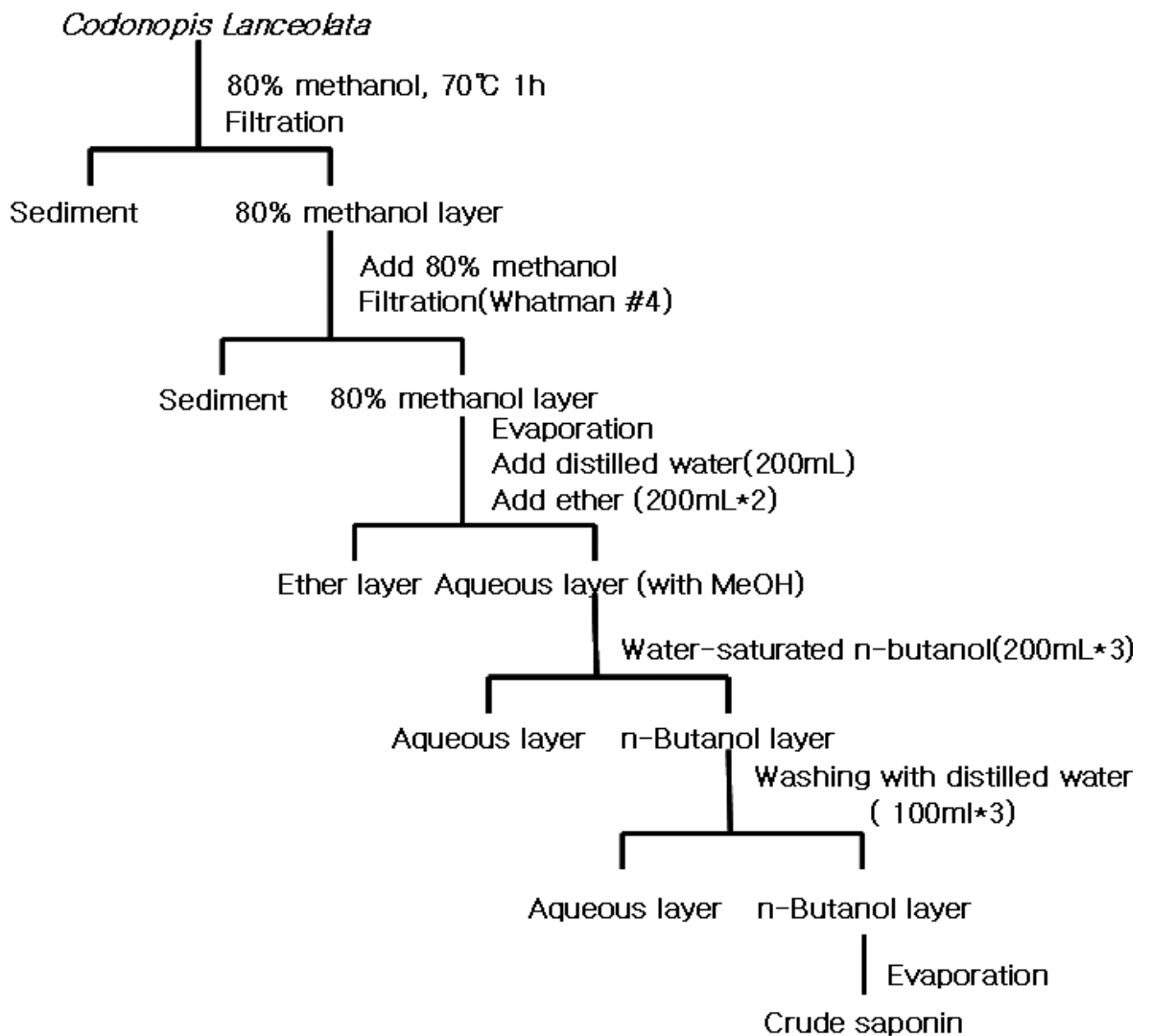


Fig. 2-17 Crude saponin extraction

㉔ Crude saponin 수율

Crude saponin을 추출해내는 방법은 *Codonopsis Lanceolata*와 가장 가까운 인삼에 대한 자료들을 근거로 찾아보았다. 인삼은 예전부터 *Codonopsis Lanceolata* 보다 약용으로 많이 사용되기 때문에 연구가 많이 행해졌으며 아직도 많은 연구자들이 연구하는 중이다. 실험에서 사용한 saponin 추출법은 saponin추출 시 가장 많이 사용하는 방법 중 하나이고 대표적인 방법이다. 하지만 이 경우에는 saponin 분획과정에서 층분리를 해야 하는 과정이 많아 그 시간이 많이 걸리고 분액깔대기를 사용하지만 완벽하고 정확한 층분리가 어렵다는 점이 있다. 그래서 최

근에는 saponin의 더 정확하고 빠르게 추출하기 위해 새로운 방법들이 연구가 되어지고 있는 추세이다.

총 사용한 *Codonopsis Lanceolata*는 총 16g을 사용했으며 80% methanol은 총 400mL을 사용해서 추출하였다. Ether는 200mL씩 2회에 걸쳐서 사용하였으며 ether를 사용하는 이유는 불순물을 제거하기 위해 사용하였으며 각각의 층분리는 분액깔대기를 이용하여 실험하였다. 그리고 수포화 n-butanol은 실험 전에 준비해두었는데 n-butanol 700mL과 distilled water 300mL을 섞어서 만들었으며 상층의 수포화 n-butanol층만을 사용하였다. 수포화 n-butanol은 200mL씩 3회 반복해서 물층에 부어 추출하였으며 수포화 n-butanol층은 모아서 distilled water로 100mL씩 3회 정도 세척한다. 이때 매회 세척 시 층이 더 이상 변화가 없을 때까지 지켜봐야한다.

Crude saponin 추출에서 마지막으로 남은 n-butanol층을 evaporation하여 완전히 농축시켰는데 이때 용매가 남아있을 수 있기 때문에 vaccum dry oven을 사용하여 용매를 완전히 제거하고 항량이 될 때까지 건조시킨 후 그 무게를 측정하였다. 전체 추출된 crude saponin은 0.3862g이고 전체 사용한 *Codonopsis Lanceolata* 분말에서 crude saponin의 함량을 계산해 본 결과 2.41%를 차지하였다. 인삼의 경우 인삼근에서 일반적으로 saponin의 함량이 3~4% 정도로 보고되어 있으나 인삼의 비해서는 saponin의 함량이 적은 것처럼 보이지만 인삼은 워낙 saponin함량이 높은 천연물 중의 하나이므로 이정도의 함량도 적지 않은 수치라고 생각된다. *Codonopsis Lanceolata*의 정확한 saponin 함량을 알기 위해서는 앞으로 추출한 crude saponin의 정제와 어떤 성분이 함유되어 있는지 성분분석을 해봐야 할 듯하다.

b. 특성분석

㉠ Crude saponin 분석

Crude saponin의 구성성분을 알아보기 위해 추출을 마친 crude saponin을 5mg을 정확히 칭량하여 5ml의 HPLC용 methanol을 넣어 완전히 녹인 후 0.2 μ m PTFE membrane에 filtering하여 HPLC용 시료로 사용하였다. Standard로는 일반적으로 인삼에서 많이 사용하고 saponin연구에서 많이 사용되고 있는 ginsenoside-Re와

ginsenoside-Rb1, ginsenoside-Rc를 사용했으며 이 표준물질은 Sigma 사 제품으로 사용하였으며 각 물질 5mg을 1ml에 녹여서 희석하여 사용하였으며 3가지 물질을 1:1:1로 섞어서 standard로 사용하였으며 각각 나온 peak를 확인함으로써 분석되는 순서를 알 수 있었다.

Saponin 분석측정을 위해 HPLC를 사용하였으며 Column은 C18을 사용하였으며 flow rate는 1.0mL/min, oven temperature는 40°C로 유지하였다. Injection volume은 20µl, mobile phase는 acetonitrile과 DI water, Isopropanol을 94.9 : 5.0 : 0.1의 비율로 사용했으며 detector로는 ELSD를 사용해서 분석하였다. ELSD에 유입된 nebulizing gas는 질소 가스로 2.0 L/min의 유속으로 흘려주었다.

Table 2-10. Operation conditions of HPLC

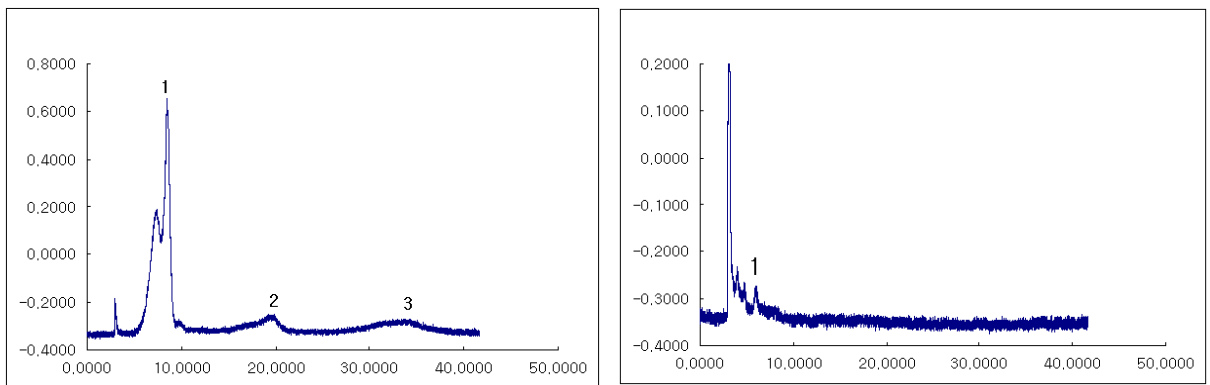
Instrument	Young Lin MP30
Columns	C18
Flow rate	1.0 mL/min
Nebulizing gas	N₂, 2L/min
Oven temperature	40°C
Injection volume	20 µl
Mobile phase(%)	Acetonitrile : DI water : Isopropanol = 94.9 : 5.0 : 0.1
Detector	ELSD ZAM 3000

㉔ 특성분석

Standard로는 ginsenoside-Re, ginsenoside-Rc, ginsenoside-Rb1을 섞어서 사용하였으며 각각 따로 peak를 확인하여 물질을 확인하였다. 각각의 peak를 확인한 결과 ginsenoside-Re의 경우 7.4450분, 8.4800분에 peak가 나왔으며 ginsenoside-Rc는 19.5083분에, ginsenoside-Rb1은 34.3300분에 peak가 나타났다. 반면 추출한 crude saponin으로

HPLC를 찍어본 결과에서는 ginsenoside-Re만이 함유되어 있었으며 나머지 ginsenoside-Rc와 ginsenoside-Rb1의 peak는 보이지 않았다. Ginsenoside-Re peak앞에 2개의 peak가 보이는데 다른 논문들에 의해 검토해 본 결과 그 중 하나는 ginsenoside-Rg1으로 예상하고 있으며 다른 하나의 peak는 아직 어떠한 물질인지 예상할 수 없었다.

다른 종류의 ginsenoside(Rd, Rb2, Rf 등)들은 어떤 detector를 사용하는지에 관계없이 다들 Re보다 뒤쪽으로 peak가 나오기 때문에 같은 물질이라고는 예상할 수 없으며 ginsenoside중에 ginsenoside Re보다 앞쪽에서 peak가 형성되는 것은 Rg1뿐이고 그렇지 않은 경우는 Re와 Rg1이 같이 나오는 것뿐이다. 그렇기에 직접 추출한 crude saponin에는 ginsenoside-Re와 ginsenoside-Rg1으로 구성되어 있을 것이라 예상된다.



(a) Standard ginsenosides

(b) Crude saponin

Fig. 2-18. Composition of standard ginsenoside and crude saponin by HPLC chromatogram

1. ginsenoside-Re 2. ginsenoside-Rc 3. ginsenoside-Rb1

(2) 비만세포/대식세포 기능 억제 물질 분리정제 기술개발

1) 추출물 제조 및 수율검토

① 추출물 제조 및 수율 검토

a. 열수추출 및 수율

먼저 *Codonopsis lanceolata*을 횡성에서 직접 구매하여 물세척으로 표면에 붙어있는 흙과 이물질들을 제거하였으며 세척 후 상온에서 하루정도 건조하였다. 그 후 동결건조하여 분쇄과정을 거친 후 분말 형태로 만들었다. 만들어진 분말을 20g씩 사용하였으며 나머지의 조건은 1차년도에 시행했었던 최적 조건으로 추출하였다. Distilled water의 용량은 500ml씩 넣어서 실험을 진행했으며 총 12시간, 90°C에서 추출하였다. 이렇게 얻어진 추출물은 filtration을 거쳐 추출액만을 얻어서 사용했으며 추출액은 수율을 얻기 위해 동결건조를 하여 분말화하였다. 분말화된 추출물들은 무게를 측정하여 각 추출수율을 구했으며 수율은 모두 백분율을 이용하여 구하였다.

추출물의 양을 보면 열수 추출에서 8.32g이 추출되었으며 수율을 100%로 나타냈을 때 열수 추출에서는 41.60%로 나타났다.

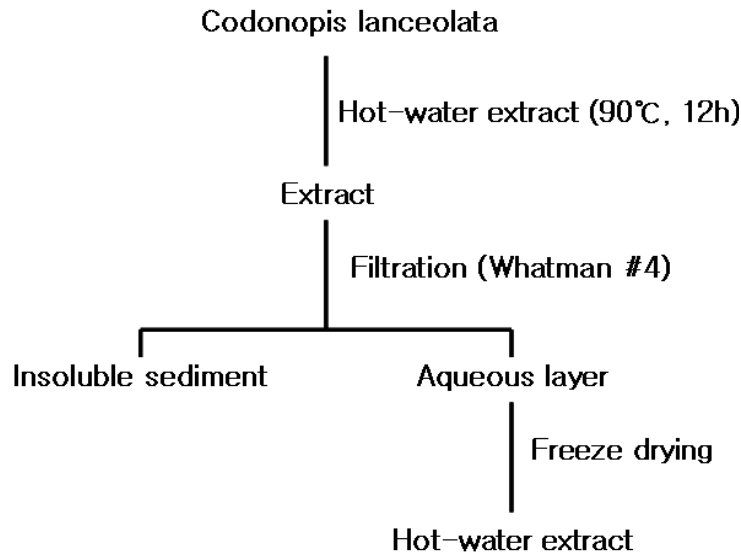


Fig. 2-19 Extraction procedure of *Codonopsis lanceolata*

Table.2-11 Extraction yield of *Codonopsis Lanceolata* by hot-water extract

solvent	solvent volume	sample	Extracted amount	Extraction yield
Distilled water	500ml	20g	8.32g	41.60%

b. Crude saponin 추출 및 수율

Crude saponin 제조는 인삼 saponin 성분을 추출하는 방법을 응용하였다. 먼저 80% methanol 100mL에 *Codonopsis Lanceolata* 분말 4g을 넣어 1시간 정도 추출(4회 반복)한 후 filtration하여 80% methanol로 2회 정도 반복하고 filtration한다. 그 후 여액은 evaporation하여 농축시키고 distilled water를 넣어 농축물과 섞어준다. 그 후 ether를 넣어 분액깔대기에서 층분리를 하고 물층에 수포화 부탄올을 첨가하여 3회 정도 추출한 다음 수포화 부탄올층만을 모아 distilled water로 washing하였다. 수포화 부탄올층을 모아 evaporation하여 crude saponin을 얻는다. 수포화 부탄올은 n-butanol과 distilled water를 7:3의 비율로 혼합한 뒤 상층의 수포화 부탄올층을 분리하였다. 그렇게 분리한 수포화부탄올을 사용하였다.

총 사용한 *Codonopsis Lanceolata*는 총 16g을 사용했으며 80% methanol은 총 400mL을 사용해서 추출하였다. Ether는 200mL씩 2회에 걸쳐서 사용하였으며 ether를 사용하는 이유는 불순물을 제거하기 위해 사용하였으며 각각의 층분리는 분액깔대기를 이용하여 실험하였다. 그리고 수포화 n-butanol은 실험 전에 준비해두었는데 n-butanol 700mL과 distilled water 300mL을 섞어서 만들었으며 상층의 수포화 n-butanol층만을 사용하였다. 수포화 n-butanol은 200mL씩 3회 반복해서 물층에 부어 추출하였으며 수포화 n-butanol층은 모아서 distilled water로 100mL씩 3회 정도 세척한다. 이때 매회 세척 시 층이 더 이상 변화가 없을 때까지 지켜보아야한다.

Crude saponin 추출에서 마지막으로 남은 n-butanol층을 evaporation하여 완전히 농축시켰는데 이때 용매가 남아있을 수 있기 때문에 vaccum dry oven을 사용하여 용매를 완전히 제거하고 항량이 될 때까지 건조시킨 후 그 무게를 측정하였다. 전체 추출된 crude saponin은 0.3862g이고 전체 사용한 *Codonopsis Lanceolata* 분말에서 crude saponin의 함량을 계산해 본 결과 2.41%를 차지하였다.

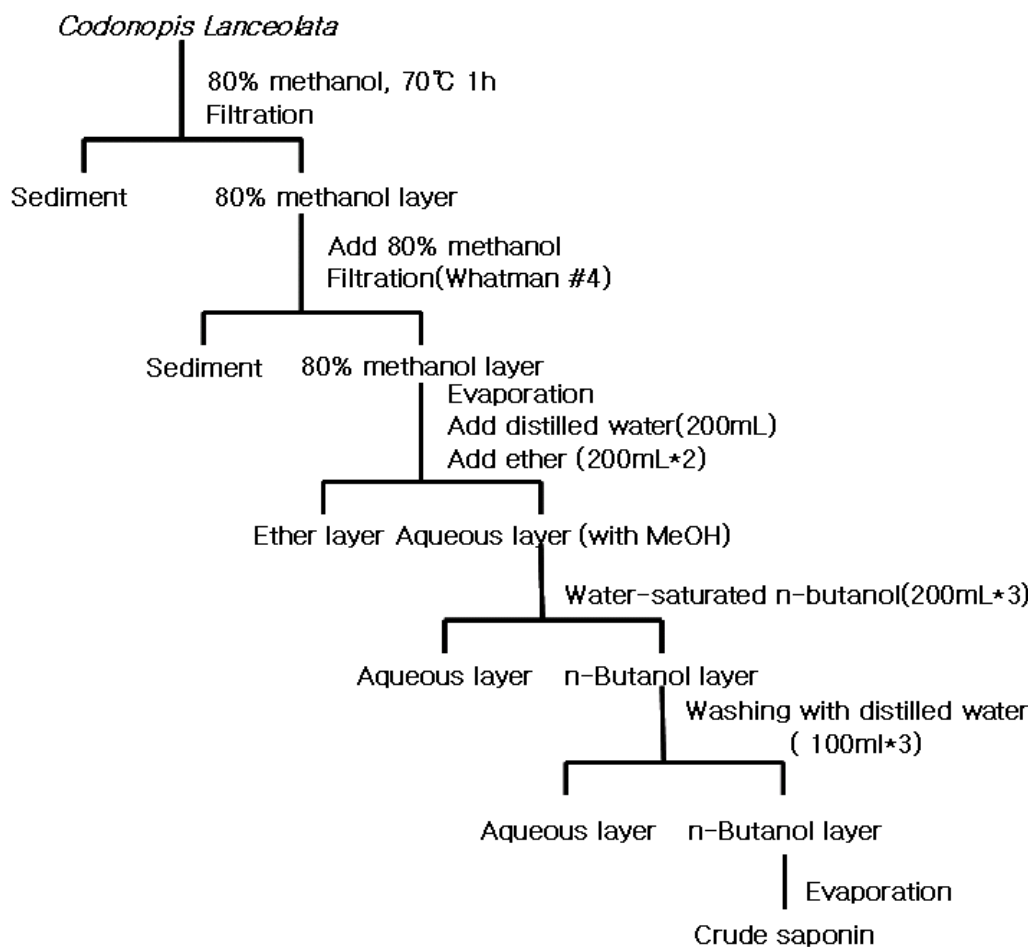


Fig. 2-20 Crude saponin extraction

Table.2-12 Extraction yield of crude saponin from *Codonopsis Lanceolata*

	sample	Extracted amount	Extraction yield
Crude saponin	16g	0.3862g	2.41%

c. 다당체 추출 및 수율

추출액은 *Codonopsis Lanceolata* 분말 20g을 distilled water 500ml로 열수 추출(90°C, 12h)하여 filtration(Whatman #4)을 거친 후 생긴 추출액을 사용하였다. 추출액 2등분하여 추출액 3배 volume의 ethanol을 가하여 4°C에서 하루정도 두었다. 그런 후 하나는 filtration을 통해 다당체를 얻은 후 열풍건조를 시켜서 무게를 측정하였고 남은 하나는 원심분리

(6,000rpm, 30min)를 통해 침전된 것들만을 distilled water에 녹여서 모았다. 이렇게 모아진 추출액은 evaporation을 통해 ethanol을 제거해주었으며 약간의 distilled water에 녹여 투석을 통해 정제하였다. 투석은 총 3일간 했으며 투석이 끝나면 동결건조 시키고 이때 동결건조 한 것은 무게 측정에 사용되었다.

하나의 추출액으로 열풍건조와 동결건조로 나누어서 추출물을 얻었기에 얻어진 추출물은 2배를 곱하여 그 수율을 구했다. 그 결과 열풍건조를 거쳐 얻어진 추출물의 무게는 2.00g이고 10.01%의 수율이 나왔다. 투석을 거친 후에 측정한 무게는 불순물이 제거되어서인지 그 양이 열풍건조를 거친 추출물보다는 적었다. 투석을 거쳐 얻어진 다당체의 무게는 1.62g으로 8.13%의 수율을 얻었다.

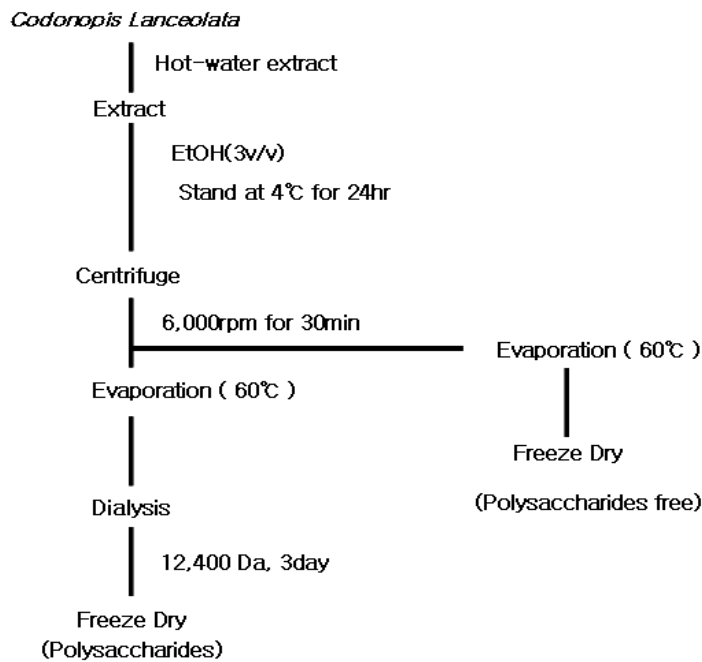


Fig. 2-21 Extraction procedure of polysaccharides

Table.2-13 Extraction yield of polysaccharides from *Codonopsis lanceolata*

	sample	Extracted amount	Extraction yield
Polysaccharides	20g	1.62g	8.13%

② Cascade Butanol layer 추출물 제조

a. Cascade 제조 및 수율

Codonopsis Lanceolata 분말 20g을 증류수 500ml로 열수 추출한 후 filtration을 거쳐 얻어진 추출액을 가지고 cascade step을 진행하였다. 사용된 용매는 천연물에서 많이 쓰이는 것들을 선정하여 사용했으며 선정된 용매로는 Hexane, Chloroform, Ethyl acetate, Butanol을 사용하였다. 사용한 용매들은 aqueous layer 액량과 동량의 용매를 사용하였으며 먼저 hexane으로 추출을 하였으며 aqueous layer층에 chloroform을 가하여 aqueous layer과 분리하고 분리된 aqueous layer에 다시 ethyl acetate를 가하였고 또 aqueous layer과 분리하였다. 그리고 분리된 aqueous layer층은 n-butanol을 사용하여 다시 aqueous layer으로 나누었다. 각각의 cascade step에서 얻은 추출액은 앞의 실험과 동일하게 evaporation과 freeze drying을 통하여 분말화하여 추출물을 제조하였다. 추출물의 무게를 측정하여 수율을 측정하였으며 수율은 백분율을 사용해서 비교하였다.

측정결과 Hexane층에서는 0.05g, Chloroform층에서는 0.21g, Ethyl acetate층에서는 0.06g, butanol층에서는 0.25g, distilled water층에서는 9.10g으로 압도적으로 많이 추출되었고 그 다음으로 butanol과 chloroform이 많은 수율을 나타내었다. 수율을 보면 Hexane층에서는 0.25%, Chloroform층에서는 1.05%, Ethyl acetate층에서는 0.15%, butanol층에서는 1.25%, distilled water층에서는 45.50%가 나왔다.

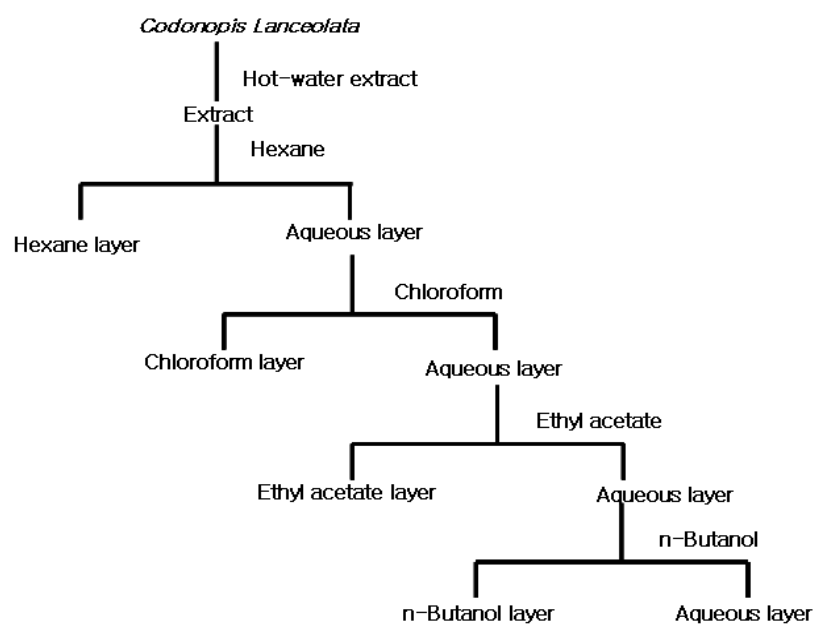


Fig. 2–22 Cascade extraction procedure with various solvents of hot–water extract from *Codonopsis Lanceolata*

Table.2–14 Cascade extraction yield with various solvents of *Codonopsis Lanceolata* extract by hot–water

solvent	solvent volume	sample	Extracted amount	Extraction yield
Hexane	500ml	20g	0.05g	0.25%
Chloroform	500ml	20g	0.21g	1.05%
Ethyl acetate	500ml	20g	0.03g	0.15%
Butanol	500ml	20g	0.25g	1.25%
Distilled water	500ml	20g	9.10g	45.50%

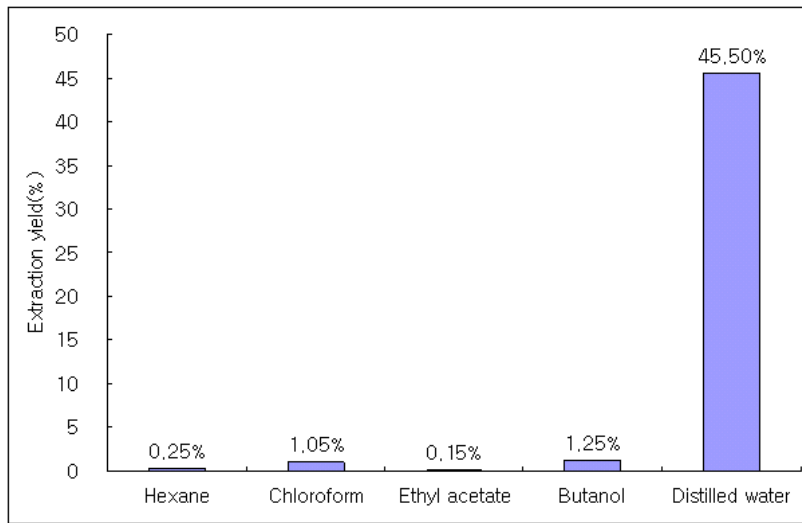


Fig. 2-23 Cascade extraction yield of *Codonopsis Lanceolata* extract by hot-water

b. Cascade Butanol층 saponin 제조 및 수율

Cascade step에서 만들어진 butanol층을 분말화하여 saponin을 제조하였는데 그 과정은 위에서 crude saponin을 만드는 과정과 동일시하였으나 cascade butanol층이 워낙 소량이 추출되었기에 몇 번의 과정을 거쳐 cascade butanol층의 양을 20g을 모아서 saponin을 추출하였다. 총 사용한 분말은 20g을 사용했으며 80% methanol은 총 500mL을 사용해서 추출하였다. Ether는 250mL씩 2회에 걸쳐서 사용하였으며 ether를 사용하는 이유는 불순물을 제거하기 위해 사용하였으며 각각의 층분리는 분액깔대기를 이용하여 실험하였다. 그리고 수포화 n-butanol은 실험 전에 준비해었는데 n-butanol 700mL과 distilled water 300mL을 섞어서 만들었으며 상층의 수포화 n-butanol층만을 사용하였다. 수포화 n-butanol은 200mL씩 3회 반복해서 물층에 부어 추출하였으며 수포화 n-butanol층은 모아서 distilled water로 100mL씩 3회 정도 세척한다. 이때 매회 세척 시 층이 더 이상 변화가 없을

때까지 충분한 시간을 두고 지켜봐야한다.

이렇게 만들어진 saponin은 evaporation을 통해 용매를 날리고 동결 건조하여 분말화하여 수율을 측정했다. 그리고 추출과정에서 나오는 ether layer와 물층을 모아서 eavaporation으로 용매를 날리고 동결 건조하여 saponin free fraction으로 나타냈다. cascade butanol층 saponin의 경우는 열수 추출물로부터 cascade step을 거쳐 butanol층을 가지고 만든것이라 기존의 crude saponin과는 다르게 동결건조를 할 수 있었다. Cascade Butanol 층을 20g으로 시작했을 때 saponin의 경우 11.24%, saponin free의 경우에는 77.5%로 나타났다. 총 88.74%가 나왔는데 나머지는 추출과정에서 손실된 것으로 보여진다. 그리고 Cascade Butanol 제조 시 20g으로 시작했을 경우부터 시작한다면 cascade Butanol saponin은 0.14%의 추출 수율을 가지게 되며 saponin free의 경우에는 0.97%로 나타났다. Cascade Butanol층이 소량 추출되기 때문에 상대적으로 추출되는 saponin의 양이 적어지는 것을 알 수 있다.

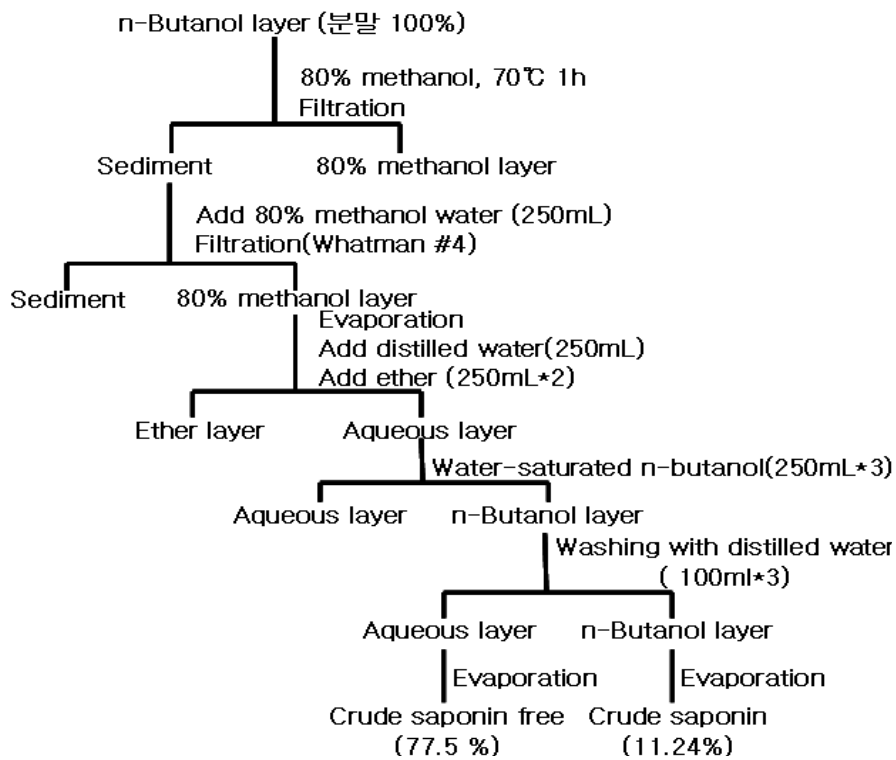


Fig. 2-24 Saponin extraction procedure of by cascade butanol layer extract

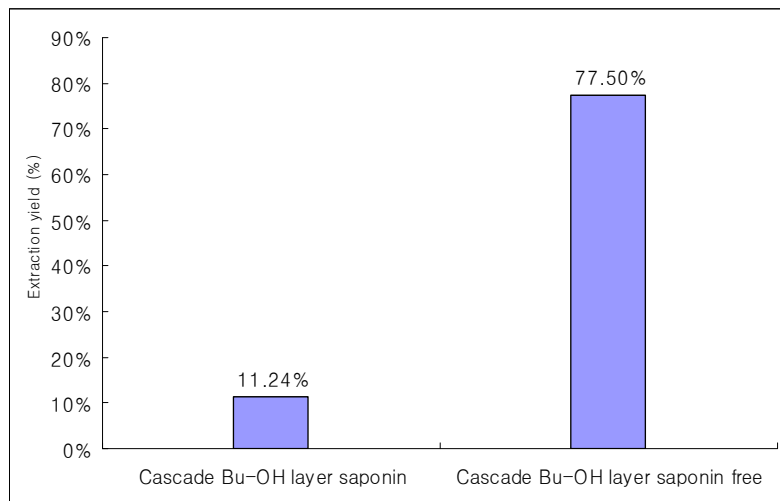


Fig. 2-25 Saponin extraction yield of cascade butanol layer extract

c. Cascade Butanol층 다당체 제조 및 수율

Cascade step에서 만들어진 Butanol층을 evaporation을 통해 용매를 날려주고 다시 distilled water에 녹여 3배 volume의 ethanol을 가하여 4°C에서 하루정도 두었다. 그런 후 filtration을 통해 다당체를 얻고 원심분리(9,000rpm, 30min)를 통해 침전된 것들만을 distilled water에 녹여서 모았다. 이렇게 모아진 추출액은 evaporation을 통해 ethanol을 제거해주었으며 약간의 distilled water에 녹여 투석을 통해 정제하였다. 투석은 총 3일간 했으며 투석이 끝나면 동결건조 시키고 이때 동결건조 한 것은 무게 측정에 사용되었다. 그리고 원심분리 후 남은 액은 polysaccharides free fraction으로 evaporation 과정을 거쳐 ethanol을 제거하여 동결건조하였다. Ethanol 침전 시 그 양이 적어 침전되는 것이 확연하게 눈에 보이지는 않았으나 원심분리를 했을 때 볼 수 있었으며 침전물의 양이 앞에서 제조한 다당체보다 색이 더 투명한 것을 볼 수 있었다.

Cascade butanol층을 100%로 보았을 때 투석과 동결건조까지 끝낸 polysaccharides는 17%, polysaccharides free는 80% 의 수율을 나타냈다. Cascade butanol층 saponin 보다는 손실이 적었다. Cascade butanol층 제조 시 20g으로 시작했을 경우 cascade butanol층 polysaccharides는 0.21%, polysaccharides free는 1%로 나타났다.

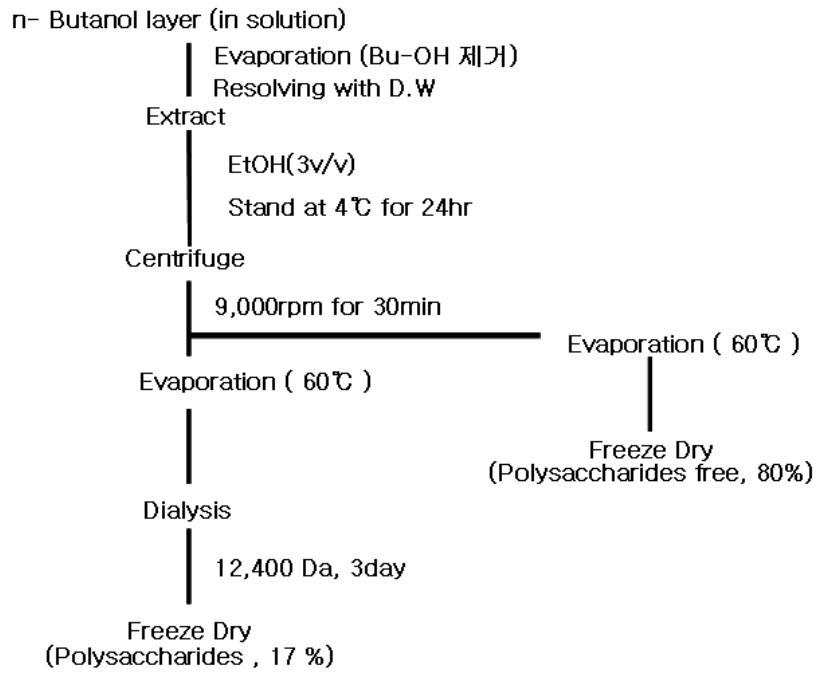


Fig. 2-26 Polysaccharides extraction procedure of cascade butanol layer extract

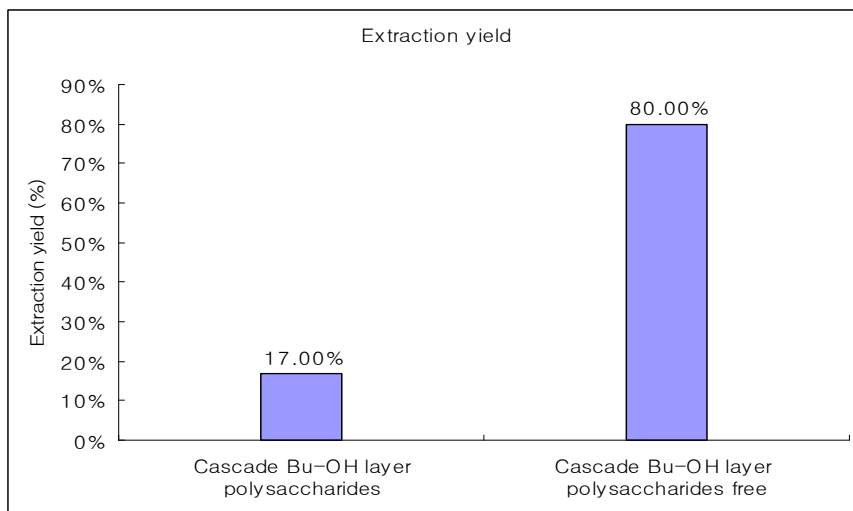


Fig. 2-27 Polysaccharides extraction yield of cascade butanol layer extract

③ 활성분획 선별

용매별로 추출한 각각의 추출물을 가지고 가장 활성이 좋은 분획을 선택해야하는데 그 지표로 NO억제능을 보았다. 일반적으로 NO(산화질소)는 혈관의 안쪽을 감싸고 있는 상피세포라는 막에서 미세 액체로 생성 분비되며 신경전달물질로 작용하여 혈관을 유연하고 건강하게 하여 혈관을 확장, 혈압을 조절하고 혈류의 흐름을 촉진함으로써 고혈압을 낮추고, 혈액을 정화하고, 상피세포를 보호하고, 혈전 생성과 죽상반의 축적으로 인한 동맥경화의 진행을 지연시키며, 심장발작(심근경색)과 뇌졸중을 예방 또는 치료한다고 알려져 있으며 또한, 산화질소 순환계 뿐만 아니라 면역계, 신경계 등에도 신호 물질로 작용하여 폐, 간, 신, 위, 뇌, 등 모든 세포의 기능을 향상시킨다. 또 포도당연소 부산물인 프리라디칼을 중화시키며, 피부와 뼈의 노화를 방지하며, 운동 시 나오는 젖산 축적의 양을 줄이며, 암세포 증식억제, 당뇨 합병증예방, 알츠하이머병, 발기 부전, 관절염, 불면증 등에 기여한다.

하지만 anti-inflammation이나 anti-allergy, atopy의 경우에는 NO가 높은 것이 좋은 것이 아니다. Inflammation이나 allergy가 생기게 되면 대식세포에서 histamine이나 cytokine 등 염증매개 물질들이 나오게 되는데 이로 인해 Inflammation이나 allergy가 더 악화가 되고 그로인해 NO의 생성이 많아지게 된다. 그렇게 많아진 NO는 대식세포를 자극하기 때문에 대식세포에서는 histamine이나 cytokine 등 염증매개 물질들을 배출하기 때문에 악순환이 반복되게 된다. 그렇기에 면역학적인 면에서 보면 NO의 생성이 많은 것이 좋지만 atopy나 allergy에서는 적당한양의 NO만을 필요로 한다. 그렇기에 활성 분획의 지표로 NO억제능을 보았다.

NO 억제능 평가는 A) Polysaccharide, B) Polysaccharide free, C) Cascade butanol layer extract, D) Cascade distilled water layer extract, E) Cascade Bu-OH layer polysaccharide, F) Cascade Bu-OH layer polysaccharide free, G) Cascade Bu-OH layer saponin H) Cascade Bu-OH layer saponin free fraction을 가지고 실험하였다. 또한 농도별로 cell viability도 함께 평가하였다.

그 결과로 NO 억제능에서는 cascade butanol layer saponin fraction이 50ug/ml부터 200ug/ml의 농도에서 높은 억제능을 보였으며 cascade butanol layer polysaccharide free fraction 200ug/ml와 cascade Bu-OH

layer saponin free fraction 200ug/ml의 농도에서도 NO 억제능을 보였다. Cell viability 측정 결과 cascade butanol layer saponin fraction이 다른 fraction에 비해 낮은 수치를 나타냈으나 cell viability와 NO 억제능을 살펴본 결과 cascade butanol layer saponin fraction을 활성 부획으로 선택하였다.

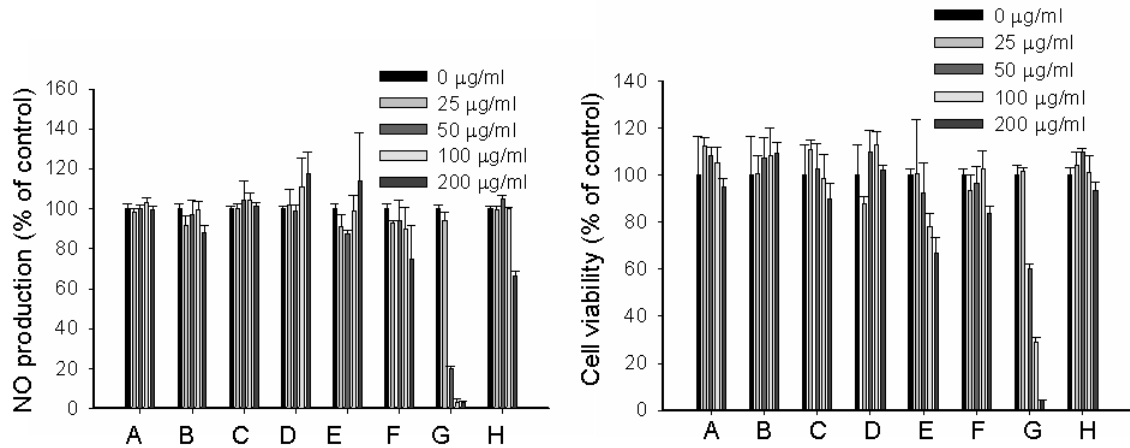


Fig. 2-27 The effect of various extracts from *Codonopsis lanceolata* in murine macrophage cell (제 1세부 연구 결과중에서)

- A. Polysaccharides
- B. Polysaccharides free
- C. Cascade butanol layer extract
- D. Cascade distilled water layer extract
- E. Cascade butanol layer polysaccharides
- F. Cascade butanol layer polysaccharides free
- G. Cascade butanol layer saponin
- H. Cascade butanol layer saponin free

2) 단일물질 분리정제

① Cascade Butanol층 saponin 제조

a. 분리과정

Saponin 제조는 인삼 saponin 성분을 추출하는 방법을 응용하였다. 먼저 *Codonopsis Lanceolata* 분말 20g으로 열수추출을 시작하여 Hexane, Chloroform, Ethyl acetate, Butanol층의 cascade step을 거쳤다. 그 후 cascade butanol층을 evaporation을 통해 용매를 날리고 동결건조 후 분말하여 20g을 만들었다. 이렇게 만들어진 cascade butanol층은 80%methanol에 넣어 1시간 정도 추출한 후 filtration한다. 그 후 여액은 evaporation하여 농축시키고 distilled water를 넣어 농축물과 섞어준다. 그 후 ether를 넣어 분액깔대기에서 층분리를 하고 물층에 수포화 부탄올을 첨가하여 3회 정도 추출한 다음 수포화 부탄올층만을 모아 distilled water로 washing하였다. 수포화 부탄올층을 모아 evaporation하여 crude saponin을 얻는다. 수포화 부탄올은 n-btanol과 distilled water를 7:3의 비율로 혼합한 뒤 상층의 수포화 부탄올층을 분리하였다. 그렇게 분리한 수포화부탄올을 사용하였다.

Cascade Butanol 층을 20g으로 시작했을 때 saponin의 경우 11.24%, saponin free의 경우에는 77.5%로 나타났다. 총 88.74%가 나왔는데 나머지는 추출과정에서 손실된 것으로 보여진다. 그리고 Cascade Butanol 제조 시 20g으로 시작했을 경우부터 시작한다면 cascade Butanol saponin은 0.14%의 추출 수율을 가지게 되며 saponin free의 경우에는 0.97%로 나타났다.

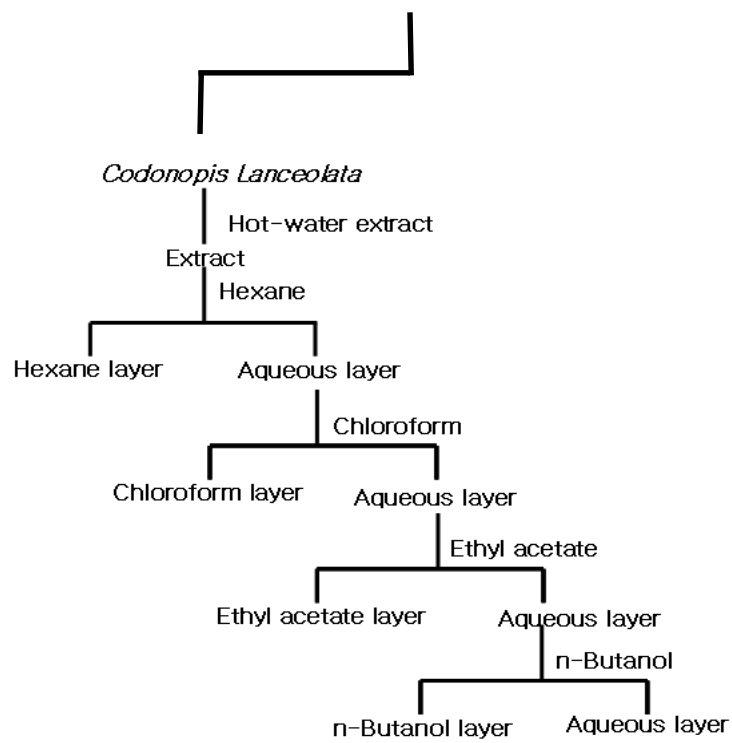


Fig. 2-28. Saponin extraction of cascade butanol extract

b. 특성분석

㉠ Cascade butanol층 saponin 분석

Cascade butanol층 saponin의 구성성분을 알아보기 위해 추출을 마친 cascade butanol층 saponin을 5mg을 정확히 칭량하여 10ml의 HPLC용 methanol을 넣어 완전히 녹인 후 0.2 μ m PTFE membrane에 filtering하여 HPLC용 시료로 사용하였다. Standard로는 일반적으로 인삼에서 많이 사용하고 saponin연구에서 많이 사용되고 있는 ginsenoside-Re와 ginsenoside-Rb1, ginsenoside-Rc를 사용했으며 이 표준물질은 Sigma사 제품으로 사용하였으며 각 물질 5mg을 1ml에 녹여서 희석하여 사용하였으며 3가지 물질을 1:1:1로 섞어서 standard로 사용하였으며 각각 나온 peak를 확인함으로써 분석되는 순서를 알 수 있었다.

Saponin 분석측정을 위해 HPLC를 사용하였으며 Column은 C18을 사용하였으며 flow rate는 0.6mL/min, injection volume은 20 μ l, mobile phase는 acetonitrile과 DI water를 3 : 7의 비율로 사용했으며 detector로는 UV를 사용해서 분석하였다. UV는 203nm에서 측정하였다.

Table 2-15. Operation conditions of HPLC

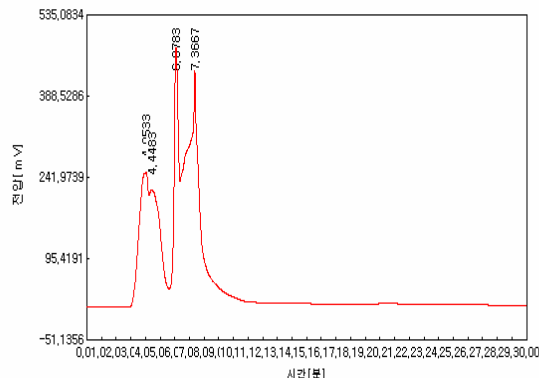
Instrument	Young Lin MP30
Columns	C18
Flow rate	0.6 mL/min
Injection volume	20 μ l
Mobile phase(%)	Acetonitrile : DI water = 3 : 7
Detector	UV (203nm)

㉡ 특성분석

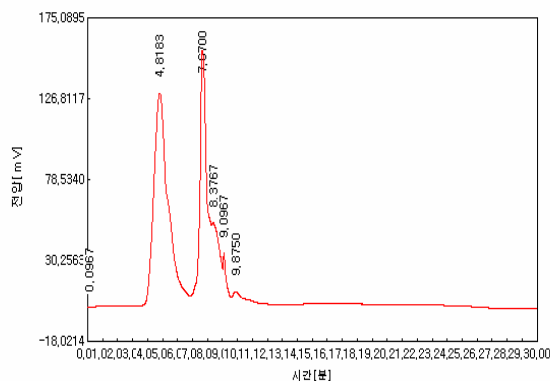
Cascade butanol층 saponin과 saponin free의 peak를 보고 어떤 peak가 saponin peak인지를 확인하였다. 5분이 지나서 용매 peak가 나오고 그 뒤로 saponin의 경우엔 peak가 눈에 보일 정도로 나타났다. 그러나 saponin free의 경우엔 그 peak가 약하거나 없는것처럼 나타났다. 약하게 나타나는 것은 추출과정에서 완벽하게 saponin이 제거 되지 않았기

때문이라 생각한다. 그래서 그 peak를 saponin peak라 할 수 있다.

Standard로는 ginsenoside-Re, ginsenoside-Rc, ginsenoside-Rb1을 섞어서 사용하였으며 각각 따로 peak를 확인하여 물질을 확인하였다. 각각의 peak를 확인한 결과 ginsenoside-Re의 경우 8.1922분, ginsenoside-Rc는 26.8050분, ginsenoside-Rb1은 23.2883분에 peak가 나타났다. Cascade butanol층 saponin과 standard를 섞어서 찍어 본 결과 ginsenoside-Re와 같은 시간대에 peak가 드는 것을 확인할 수 있었다. 이런 결과로써 추출한 cascade butanol층 saponin에는 ginsenoside-Re로 구성되어 있을 것이라 예상한다. 그리고 나타난 peak의 면적으로 계산해 보았을 경우 총 면적의 47.38%를 차지한다. 이것으로 cascade butanol층의 saponin에 들어있는 활성물질의 양을 구하면 cascade butanol 층 saponin에는 들어있는 ginsenoside-Re의 양은 473.8mg/g이라 추정할 수 있다.

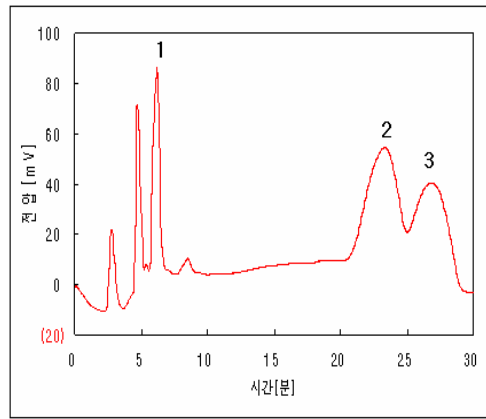


(a) Cascade butanol layer saponin

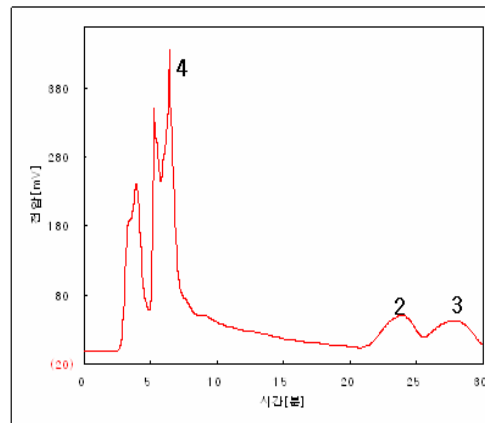


(b) Cascade butanol layer saponin free

Fig.2-29 Composition of cascade butanol layer saponin and cascade butanol layer saponin free



(a) Standard ginsenosides



(b) Standard + Cascade butanol layer saponin

Fig. 2-30 Composition of standard ginsenosides and cascade butanol layer saponin

- Peak : 1. ginsenoside-Re 2. ginsenoside-Rb1
 3. ginsenoside-Rc
 4. ginsenoside-Re + cascade butanol layer saponin

(3)항알리지/항아토피 분획 및 단일물질 분리공정 최적화

1) 추출물 제조 및 수율검토

① 용매별 추출물 제조 및 수율 검토

a. 추출과정

용매별 추출은 기본적으로 열수 추출을 하였으며 그 외에 천연물 추출에 많이 사용되고 있는 용매로 Acetone, Ethanol, Methanol을 선택하여 사용하였다. 먼저 *Codonopsis Lanceolata*을 황성에서 직접 구매하여 물세척으로 표면에 붙어있는 흙과 이물질들을 제거하였으며 세척 후 상온에서 하루정도 건조하였다. 그 후 작은 크기로 절단하여 동결건조하여 분쇄과정을 거친 후 분말 형태로 만들었다. 만들어진 분말을 20g씩 사용하고 solvent의 용량은 500ml씩 동일시하여 실험을 진행했으며 총 12시간 추출하였다. 열수 추출은 90℃에서 추출하였고 그 외의 추출은 모두 실온에서 진행하였으며 2번에 걸쳐 300ml, 200ml씩 나누어 용매를 첨가하여 추출하였다. 이렇게 얻어진 추출물은 filtration을 거쳐 추출액만을 얻어서 사용했으며 각각의 추출액은 수율을 얻기 위해 evaporation을 거쳐 용매를 제거 후 동결건조를 하여 분말화하였다. 분말화된 추출물들은 무게를 측정하여 각각의 추출수율을 구했으며 수율은 모두 백분율을 이용하여 구하였다.

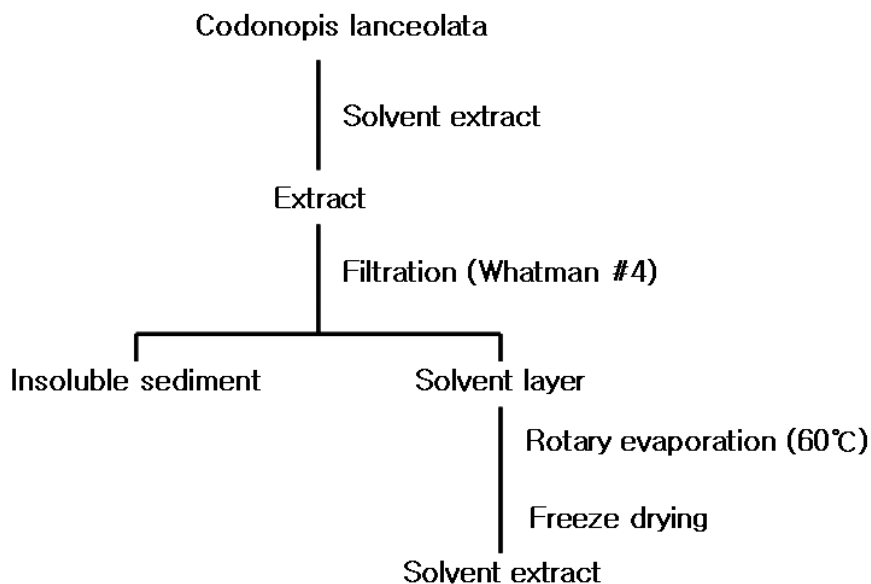


Fig. 2-31. Extraction procedure of *Codonopsis Lanceolata*

b. 추출수율

용매는 천연물 추출에 관련된 논문들을 보고 4가지로 선정하였으며 추출 조건은 열수 추출만 제외하고 모두 같은 조건에서 행하였다. Distilled water는 90℃에서 12h 동안 추출한 후 filtration하여 동결건조를 거쳐 분말화했으며 나머지 3가지의 용매는 실온에서 12h 추출하였으며 6h씩 300ml, 200ml 로 나누어서 2번에 걸쳐 추출을 끝내었다. 추출이 끝난 시료들은 모두 분말화하여 그 수율을 비교하였다. 추출물의 양을 보면 열수 추출에서 8.32g, ethanol추출은 2.41g, methanol추출에서는 2.90g이 나왔으며 acetone의 경우 0.18g만이 추출되었다. 수율을 보면 열수 추출에서는 41.60%로 가장 많은 수율이 나왔으며 ethanol과 methanol의 경우는 각각 12.05%, 14.50%로 비슷한 양이 추출되었으나 acetone의 경우 0.90%라는 극히 소량만이 추출되었다. 열수 추출과 다른 용매의 추출물의 수율은 차이가 거의 30%에 가까울 정도로 차이가 났다.

Table 2-16. Extraction yield of *Codonopsis Lanceolata* by various solvents

solvent	solvent volume	sample	Extracted amount	Extraction yield
Acetone	500ml	20g	0.18g	0.90%
Ethanol	500ml	20g	2.41g	12.05%
Methanol	500ml	20g	2.90g	14.50%
Distilled water	500ml	20g	8.32g	41.60%

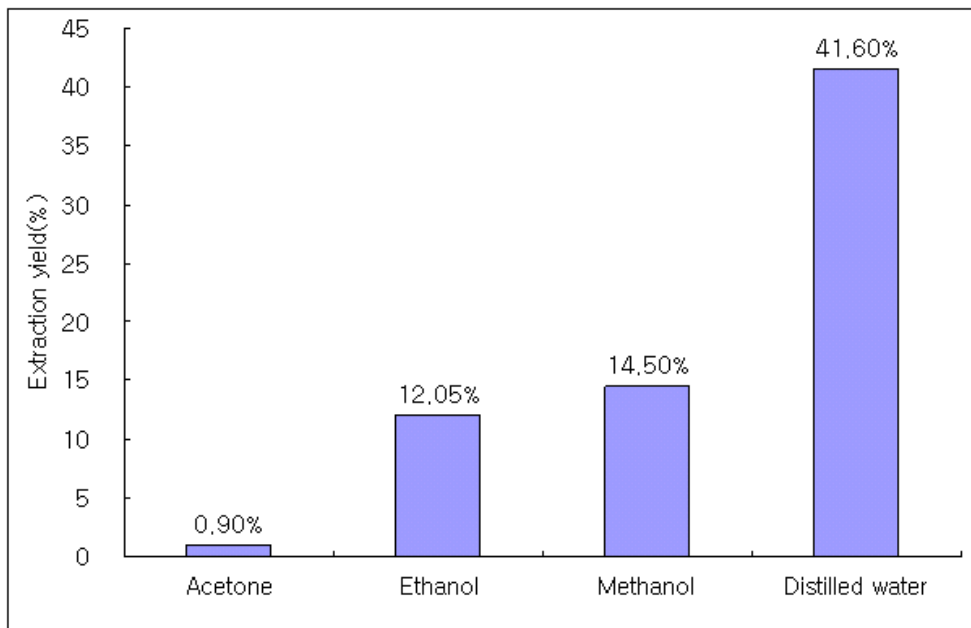


Fig. 2-32. Extraction yield of *Codonopsis Lanceolata* by various solvents

② 불수용성 추출물 제조

a. 추출과정

Codonopsis Lanceolata 분말을 용매별 추출에서 가장 수율이 좋았던 열수로 처리한 후 filtration을 통해 수용성 부분과 insoluble sediment로 나누었다. 이 때 분말 20g을 증류수 500ml에 추출하였다. 불수용성 성분을 분리하기 위해 insoluble sediment에 다른 용매를 각각 처리하여 불수용성 부분을 얻었으며 불수용성 성분을 추출하기 위해 용매로는 Acetone, Ethanol, Methanol을 사용했으며 실험은 각각의 용매별로 해야 했으므로 3가지를 같이 진행하였다. 용매는 6시간 씩 300ml, 200ml로 처리하여 총 12시간 추출하였으며 총 사용한 용매는 500ml을 사용하였다. 이렇게 각각의 용매를 거쳐 나온 추출물은 filtration을 거쳐 추출액만을 얻었으며 얻어진 추출액은 evaporation을 거쳐 용매를 제거했으며 용매를 제거한 추출액은 freeze drying하여 분말화하여 추출을 마쳤다. 분말화 시킨 추출물은 무게를 측정하여 각각의 수율을 구했으며 수율은 백분율을 이용하여 구하였다.

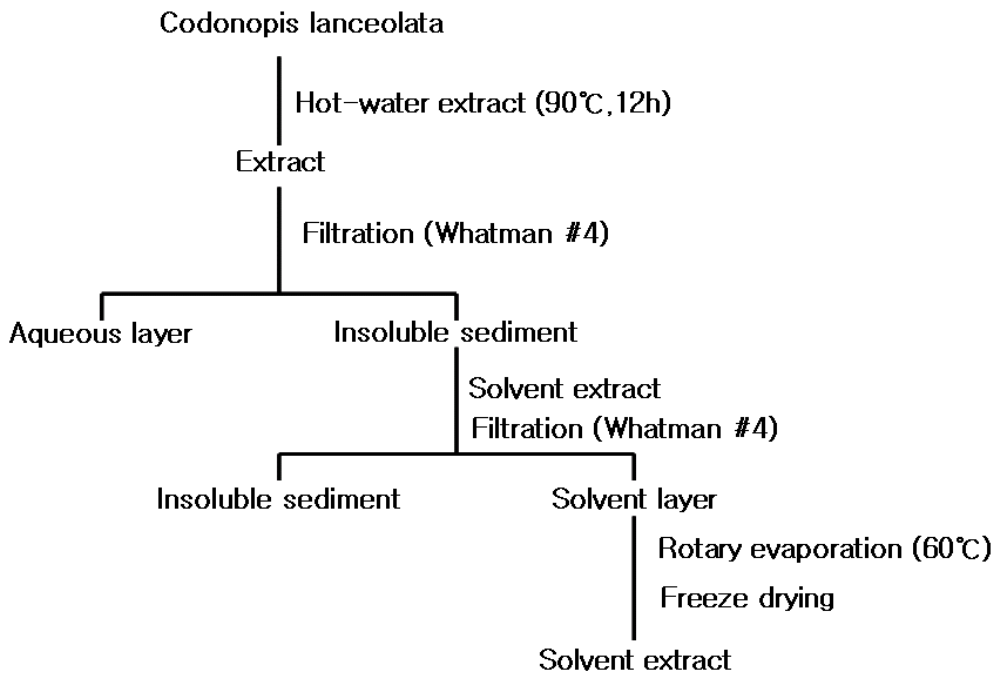


Fig. 2-33. Extraction procedure of water-insoluble sediment from *Codonopsis Lanceolata*

b. 추출수율

수용성과 불수용성을 분리하기 위해 일차적으로 hot-water로 추출하고 filtration 후 남은 sediment를 나머지 용매로 추출하였다. Sediment에는 물에 녹지 않은 것들이 들어있는데 용매로 그것들을 추출하여 불수용성 성분을 추출했다. 일차 hot-water 추출은 90°C에서 12h 동안 하였고 나머지 3가지 용매는 앞서의 용매별 추출에서와 같이 실온에서 6h씩 300ml, 200ml씩 하여 총 12h 추출한 후 rotary evaporator를 거쳐 freeze drying하여 추출 수율을 비교하였다. Methanol에서는 0.97g, ethanol에서의 추출물의 무게는 0.91g 나왔으며 또 acetone에서는 0.53g으로 가장 추출수율이 낮게 나왔으나 앞의 실험에서보다 ethanol이나 methanol과의 차이가 많이 나지는 않았다. 수율을 보았을 때 methanol, ethanol, acetone이 각각 4.85%, 4.55%, 2.65%였으며 methanol이 다른 용매들에 비해 더 많은 수율이 나오는 것을 알 수 있었다.

Table 2-17. Extraction yield of *Codonopsis Lanceolata* water-insoluble sediment by various solvents

solvent	solvent volume	sample	Extracted amount	Extraction yield
Acetone	500ml	20g	0.53g	2.65%
Ethanol	500ml	20g	0.91g	4.55%
Methanol	500ml	20g	0.97g	4.85%

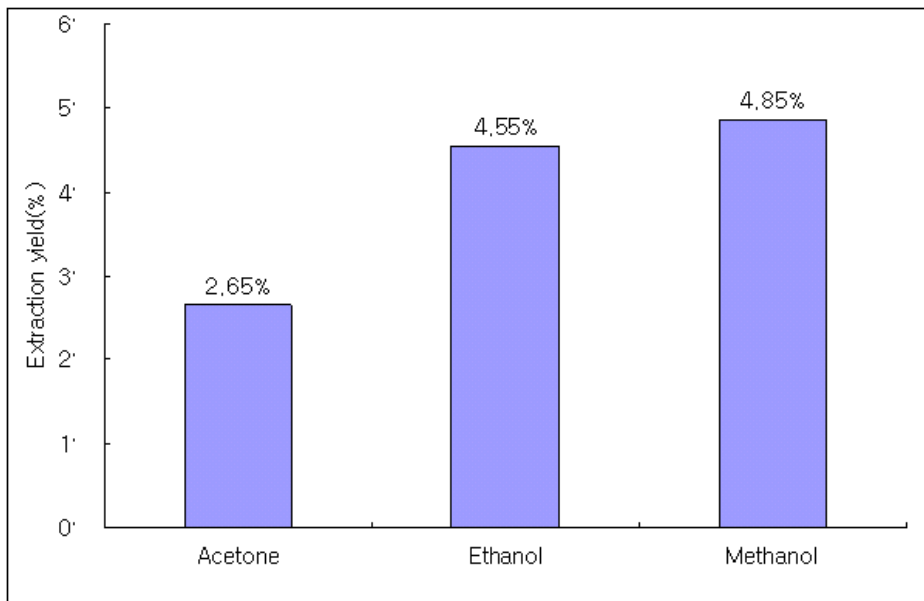


Fig. 2-34. Extraction yield of *Codonopsis Lanceolata* water-insoluble sediment by various solvents

③ 열수 추출 최적조건

a. 추출과정

㉠ Temperature

기본으로 *Codonopsis Lanceolata* 분말 20g을 distilled water volume을 500mL에 넣어서 추출하였으며 먼저 온도만을 조절하여 수율이 좋은 추출 최적의 온도를 찾았다. 온도는 실온, 50℃, 70℃, 90℃ 로 4가지 조건을 정하고 추출시간은 12시간으로 하였으며 추출이 끝나면 filtration을 거쳐 각각 동결건조를 실시하였다. 동결건조가 완료되면 그 무게를 측정하여 수율을 보았으며 수율이 좋은 온도로 다음의 실험을 진행하였다.

㉡ Time

앞선 실험에서 수율이 가장 좋은 온도를 선정할 수 있었다. 온도와 volume을 같게 하고 추출시간만을 다르게 하여 각 시간별로 추출 수율을 보았으며 수율이 일정 이상의 시간을 지나서 늘어나는 모습을 보이지 않는다면 추출시간을 그 이상 늘리지 않는 것이 좋다. 시간은 1h, 3h, 6h, 9h, 12h 으로 놓고 각 시간별로의 추출했으며 추출물을 filtration을 거쳐 동결건조하여 무게를 측정하였고 추출 수율을 구했으며 수율이 가장 좋은 시간을 최적의 시간으로 보고 다음 실험을 진행하

였다.

㉔ Volume

최적의 온도와 시간이 정해졌으므로 *Codonopsis Lanceolata* 분말 20g 과 다양한 volume으로 distilled water를 반응시켜 그 수율을 보았다. Distilled water는 300mL, 500mL, 1 L로 반응 시켰다. 각각의 추출물은 filtration과 동결건조를 거쳐 분말화하였고 그 무게를 측정하여 추출 수율을 구하였다. 이때 수율이 가장 좋은 것이 열수 추출의 최적 조건이 되는 것이다.

㉕ 121℃

일반적으로 멸균을 위해 사용하는 autoclave를 이용하여 추출을 시도 하였다. 우선 같은 기계를 이용하였으며 121℃일 때 30min, 1h, 2h으로 변화를 주었으며 각각의 추출물들은 filtration을 거쳐 동결건조하여 분말화 후 무게측정과 수율을 계산하였다.

b. 추출수율

먼저 온도만 변화를 주어서 추출되는 양과 수율을 알아보았다. 그런 결과 실온에서는 다른 온도들에 비해 추출되는 양이 적었으며 온도가 올라갈수록 더 많은 양이 추출되는 양과 비율이 높아지는 것을 알 수 있었다. 그 결과 90℃에서 가장 많은 양이 나왔으며 그 이유로 최적조건인 온도로 정하였다. 최적 온도로서 90℃가 정해졌기 때문에 온도는 90℃로 일정하게 하고 추출하는 시간만을 다르게 하였다. 그 결과 추출되는 양에서 그 양이 크게 차이는 나지 않았으나 추출되는 시간에 비례하여 추출되는 시간이 많을수록 양이 늘어나는 것을 볼 수 있었다. 12시간을 추출했을 때 가장 많은 양이 추출되었으므로 최적 시간으로 정하였다. 앞에서의 실험을 통해서 최적 온도와 시간이 정해졌으며 용매의 volume만을 다르게 하여 추출하였다. 그 결과 300ml과 500ml에서 추출되는 양은 비슷하게 나왔으나 1 L에서는 추출되는 양이 적은 것을 볼 수 있었다. 많은 차이는 보이지 않았지만 volume이 500ml에서 가장 많이 나왔기에 최적조건으로 정하였다. Autoclave에서는 시간만을 조정해봤는데 1시간을 추출했을 때 가장 많은 양이 추출되었다.

Table 2–18. Extraction yield of *Codonopsis Lanceolata* at various temperature(°C)

Temperature (°C)	Time(hr)	solvent volume (ml)	sample	Extraction sample	Extraction yield(%)
Room temperature	12	500ml	20g	8.26g	41.30%
50	12	500ml	20g	11.08g	55.40%
70	12	500ml	20g	11.14g	55.70%
90	12	500ml	20g	11.60g	58.00%

Table 2–19. Extraction yield of *Codonopsis Lanceolata* for various times(hr)

Temperature (°C)	Time(hr)	solvent volume (ml)	sample	Extraction sample	Extraction yield(%)
90	1	500	20g	10.90g	54.50
90	3	500	20g	10.84g	54.20
90	6	500	20g	11.33g	56.65
90	9	500	20g	11.41g	57.05
90	12	500	20g	11.56g	57.80

Table 2–20. Extraction yield of *Codonopsis Lanceolata* with various volume(ml)

Temperature (°C)	Time(hr)	solvent volume (ml)	sample	Extraction sample	Extraction yield(%)
90	12	300ml	20g	10.95g	54.75%
90	12	500ml	20g	11.56g	57.80%
90	12	1l	20g	4.70g	23.50%

Table 2–21. Extraction yield of *Codonopsis Lanceolata*
for various time at autoclave time

Temperature (°C)	Time(hr)	solvent volume (ml)	sample	Extraction sample	Extraction yield(%)
121	0.5	500	20g	10.08g	50.40%
121	1	500	20g	12.43g	62.15%
121	2	500	20g	11.04g	55.00%

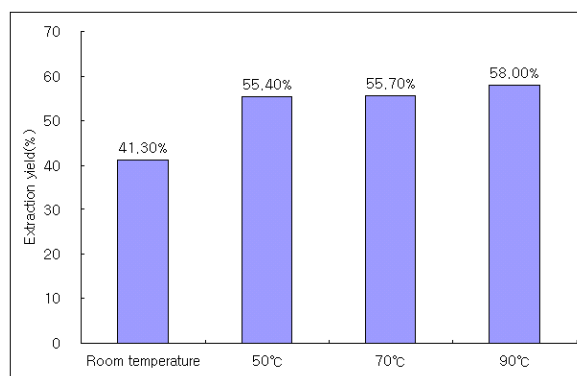


Fig. 2–35. Extraction yield of *Codonopsis Lanceolata* at various temperature(°C) for 12 hours

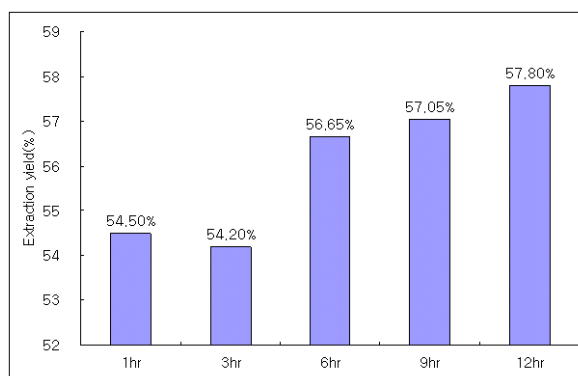


Fig. 2–36. Extraction yield of *Codonopsis Lanceolata* for various time(hr) at 90°C

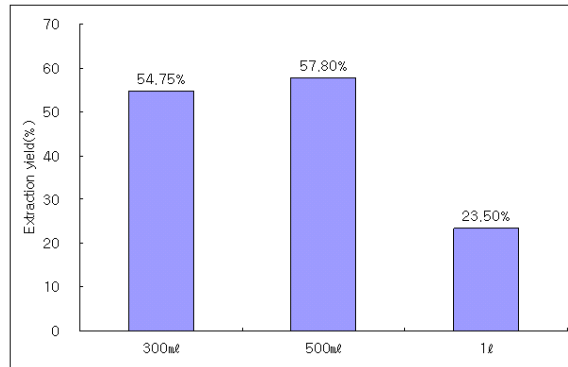


Fig. 2-37. Extraction yield of *Codonopsis Lanceolata* with various volume(ml) for 12hours at 90°C

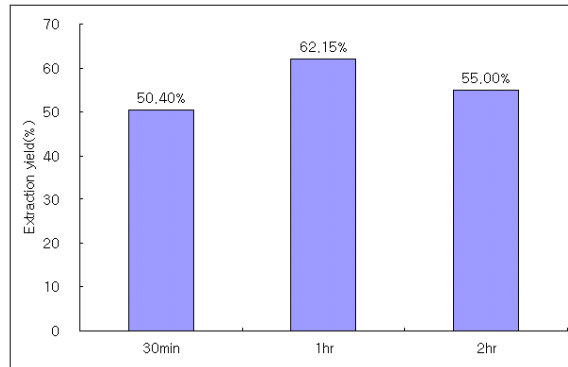


Fig. 2-38. Extraction yield of *Codonopsis Lanceolata* for various time at autoclave time

④ Cascade 추출물 제조

a. 추출과정

Codonopsis Lanceolata 분말 20g을 증류수 500ml로 열수 추출한 후 filtration을 거쳐 얻어진 추출액을 가지고 cascade step을 진행하였다. 사용된 용매는 천연물에서 많이 쓰이는 것들을 선정하여 사용했으며 선정된 용매로는 Hexane, Chloroform, Ethyl acetate, Butanol을 사용하였다. 사용한 용매들은 aqueous layer 액량과 동량의 용매를 사용하였으

며 먼저 hexane으로 추출을 하였으며 aqueous layer층에 chloroform을 가하여 aqueous layer과 분리하고 분리된 aqueous layer에 다시 ethyl acetate를 가하였고 또 aqueous layer과 분리하였다. 그리고 분리된 aqueous layer층은 n-butanol을 사용하여 다시 aqueous layer으로 나누었다. 각각의 cascade step에서 얻은 추출액은 앞의 실험과 동일하게 evaporation과 freeze drying을 통하여 분말화하여 추출물을 제조하였다. 추출물의 무게를 측정하여 수율을 측정하였으며 수율은 백분율을 사용해서 비교하였다.

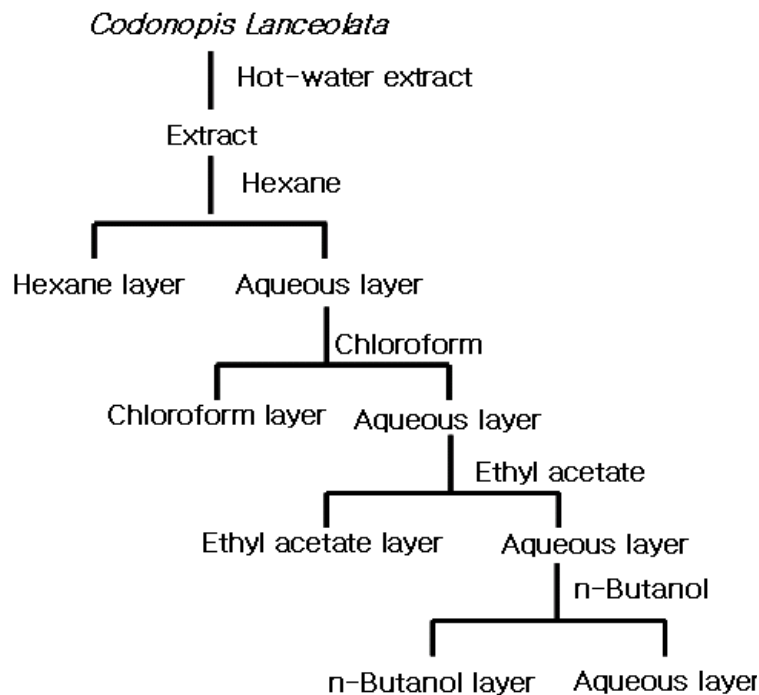


Fig. 2-39. Cascade extraction procedure with various solvents of hot-water extract from *Codonopsis Lanceolata*

b. 추출수율

Cascade step의 용매는 다른 논문들에 의해 선정했으며 Hot-water extract를 가지고 진행하였다. Hot-water extract와 동량의 solvent volume으로 추출하였으며 그 수율은 마지막 단계까지 진행한 후 각각의 추출액을 가지고 freeze drying까지 진행하여 분말상태에서 수율을 측정하였다. 측정결과 Hexane층에서는 0.05g, Chloroform층에서는 0.21g,

Ethyl acetate층에서는 0.06g, butanol층에서는 0.25g, distilled water층에서는 9.10g으로 압도적으로 많이 추출되었고 그 다음으로 butanol과 chloroform이 많은 수율을 나타내었다. 수율을 보게되면 Hexane층에서는 0.25%, Chloroform층에서는 1.05%, Ethyl acetate층에서는 0.15%, butanol층에서는 1.25%, distilled water층에서는 45.50%가 나왔다. Hexane과 ethyl acetate는 추출되는 양이 너무 미량이라 더 많은 수율을 얻을 수 있는 방법을 알아봐야 할 것 같다.

Table 2-22. Cascade extraction yield with various solvents of *Codonopsis Lanceolata* extract by hot-water

solvent	solvent volume	sample	Extracted amount	Extraction yield
Hexane	500ml	20g	0.05g	0.25%
Chloroform	500ml	20g	0.21g	1.05%
Ethyl acetate	500ml	20g	0.03g	0.15%
Butanol	500ml	20g	0.25g	1.25%
Distilled water	500ml	20g	9.10g	45.50%

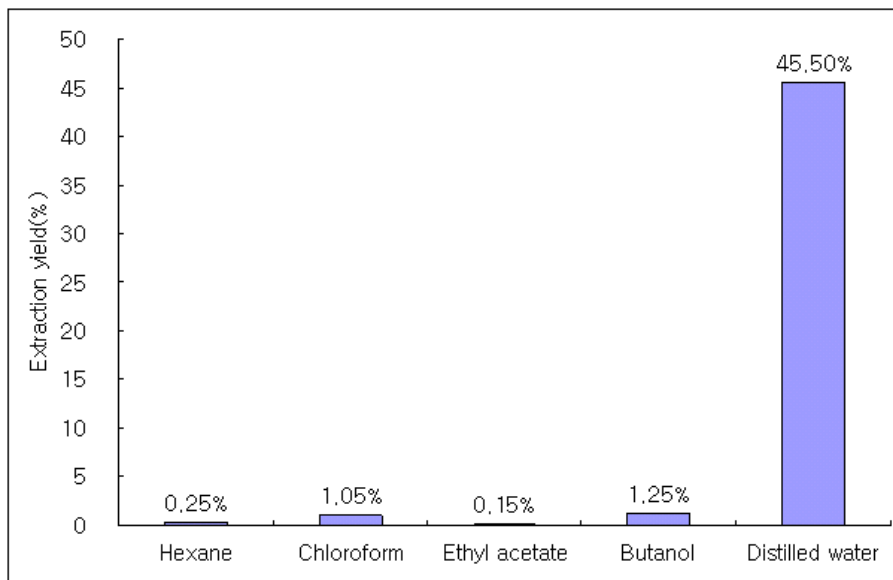


Fig. 2-40.. Cascade extraction yield of *Codonopsis Lanceolata* extract by hot-water

⑤ 활성분획 선별

용매별로 추출한 각각의 추출물을 가지고 가장 활성이 좋은 분획을 선택해야하는데 그 지표로 NO억제능을 보았다. 일반적으로 NO(산화질소)는 혈관의 안쪽을 감싸고 있는 상피세포라는 막에서 미세 액체로 생성 분비되며 신경전달물질로 작용하여 혈관을 유연하고 건강하게 하여 혈관을 확장, 혈압을 조절하고 혈류의 흐름을 촉진함으로써 고혈압을 낮추고, 혈액을 정화하고, 상피세포를 보호하고, 혈전 생성과 죽상반의 축적으로 인한 동맥경화의 진행을 지연시키며, 심장발작(심근경색)과 뇌졸중을 예방 또는 치료한다고 알려져 있으며 또한, 산화질소 순환계 뿐만 아니라 면역계, 신경계 등에도 신호 물질로 작용하여 폐, 간, 신, 위, 뇌, 등 모든 세포의 기능을 향상시킨다. 또 포도당연소 부산물인 프리라디칼을 중화시키며, 피부와 뼈의 노화를 방지하며, 운동 시 나오는 젖산 축적의 양을 줄이며, 암세포 증식억제, 당뇨 합병증예방, 알츠하이머병, 발기 부전, 관절염, 불면증 등에 기여한다.

하지만 anti-inflammation이나 anti-allergy, atopy의 경우에는 NO가 높은 것이 좋은 것이 아니다. Inflammation이나 allergy가 생기게 되면 대식세포에서 histamine이나 cytokine 등 염증매개 물질들이 나오게 되는데 이로 인해 Inflammation이나 allergy가 더 악화가 되고 그로인해 NO의 생성이 많아지게 된다. 그렇게 많아진 NO는 대식세포를 자극하기 때문에 대식세포에서는 histamine이나 cytokine 등 염증매개 물질들을 배출하기 때문에 악순환이 반복되게 된다. 그렇기에 면역학적인 면에서 보면 NO의 생성이 많은 것이 좋지만 atopy나 allergy에서는 적당한양의 NO만을 필요로 한다. 그렇기에 활성 분획의 지표로 NO억제능을 보았다.

NO억제능 실험은 제 1세부에 실험을 의뢰해서 수행하였으며 그 결과 cascade step에서의 마지막 단계인 butanol분획이 다른 분획들에 비해 가장 많은 NO억제능을 보였다. NO억제능 실험은 각 분획에 LPS처리한 후 LPS에 의해 생성된 NO를 얼마나 억제했는지를 보았는데 LPS만 넣은 것을 100%로 보았을 때 butanol분획은 27%가량으로 낮추는 효과를 보였다. 그로인해서 butanol분획을 활성분획으로 선정하였다.

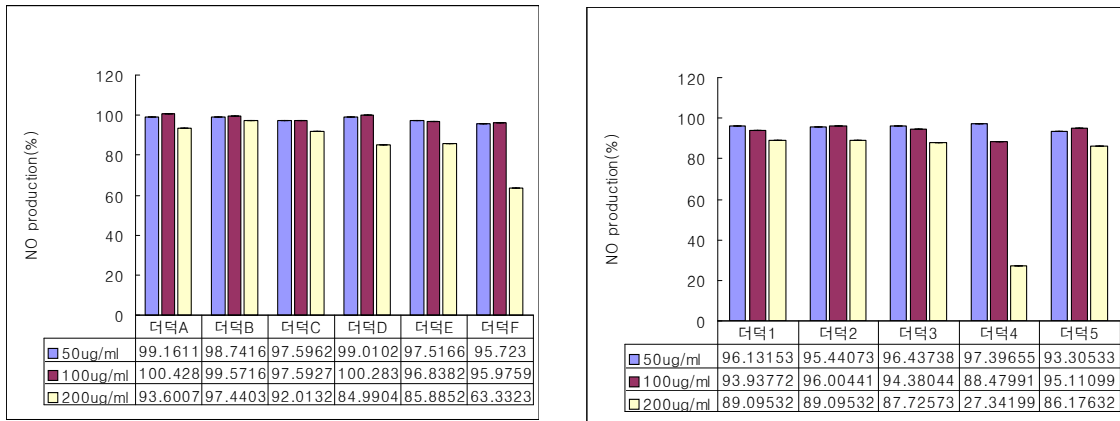


Fig. 2-41. The effect of various extracts from *Codonopsis Lanceolata* in murine macrophage cell (제 1세부 연구 결과중에서)

2) 단일물질 분리정제

① 다당체 추출 및 분석

a. 분리과정

㉠ 추출액 제조

추출액은 *Codonopsis Lanceolata* 분말 20g을 distilled water 500ml로 열수 추출(90°C, 12h)하여 filtration(Whatman #4)을 거친 후 생긴 추출액을 사용하였다.

㉡ 다당체 분리

추출액 2등분하여 추출액 3배 volume의 ethanol을 가하여 4°C에서 하루정도 두었다. 그런 후 하나는 filtration을 통해 다당체를 얻은 후 열풍 건조를 시켜서 무게를 측정하였고 남은 하나는 원심분리(6,000rpm, 30min)를 통해 침전된 것들만을 distilled water에 녹여서 모았다. 이렇게 모아진 추출액은 evaporation을 통해 ethanol을 제거해주었으며 약간

의 distilled water에 녹여 투석을 통해 정제하였다. 투석은 총 3일간 했으며 투석이 끝나면 동결건조 시키고 이때 동결건조 한 것은 무게 측정에 사용되며 그 일부는 분석을 위해 HPLC용 시료를 만드는데 사용되었다.

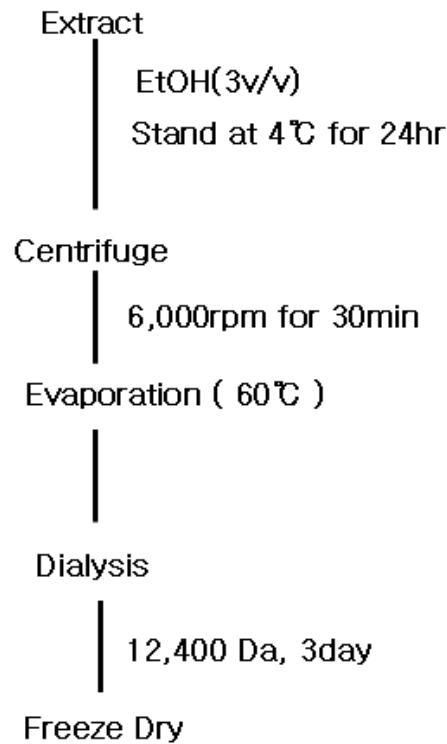


Fig.2-41. Extraction procedure of polysaccharides

㉔ 다당체 수율

Codonopsis Lanceolata 분말 20g을 distilled water 500ml로 열수 추출 (90°C, 12h)하여 filtration(Whatman #4)을 거친 후 생긴 추출액을 사용하였다. 얻어진 추출액은 반으로 나누어서 두 개 모두 3배 volume ethanol에 추출액을 부어주고 4°C에서 하루 동안 두었다. 다음 날 하나는 filtration하여 filter paper(Whatman #4)에 걸린 다당체들은 열풍건조 해서 그 무게를 측정하였으며 나머지 하나는 6,000rpm에서 30분간 원심 분리하여 다당체들을 분리하였으며 분리한 다당체들은 ethanol을 제거

하기위해 evaporation(60°C)하였으며 3일간 투석한 후 동결건조하였다. 하나의 추출액으로 열풍건조와 동결건조로 나누어서 추출물을 얻었기에 얻어진 추출물은 2배를 곱하여 그 수율을 구했다. 그 결과 열풍건조를 거쳐 얻어진 추출물의 무게는 2.00g이고 10.01%의 수율이 나왔다. 투석을 거친 후에 측정된 무게는 불순물이 제거되어서인지 그 양이 열풍건조를 거쳐 추출물보다는 적었다. 투석을 거쳐 얻어진 다당체의 무게는 1.62g으로 8.13%의 수율을 얻었다.

Table 2-23. Extraction yield of polysaccharides from *Codonopsis Lanceolata*

	polysaccharides	Extraction yield
추출수율 (Et-OH침전)	2.00g	10.01%
추출수율 (투석)	1.62g	8.13%

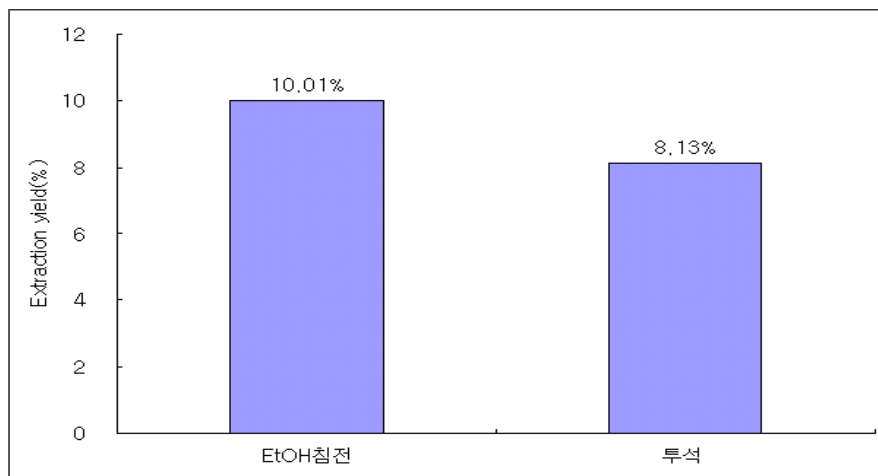


Fig.2-42. Extraction yield of polysaccharides from *Codonopsis Lanceolata*

b. 특성분석

㉠ 다당체 구성당 분석

구성당의 조성비를 알아보기 위해 동결건조를 마친 시료 2mg을 정확히 칭량하여 1.5mL microtube에 담은 후 b.p.가 비교적 낮아 산의 제거가 용이한 2M trifluoroacetic acid 1mL을 넣어 진탕하여 녹인 후,

100℃에서 4시간동안 산가수분해하여 완전히 monomer size로 절단한 후 vaccum distillation 장치를 이용하여 용매를 완전히 제거하였다. 용매가 제거된 시료에 1mL의 DI water(deionized water)를 넣어 완전히 녹인 후 0.2 μ m PTFE membrane에 filtering하여 희석하여 HPLC용 시료로 사용하였다. Standard는 D-glucose, D-galactose, D-mannose, L-flucose, D-fructose를 사용하였다.

구성당 분석측정에 HPLC를 사용하였으며 Column은 Agilent Zorbax Cabohydrate를 사용하였고 flow rate는 1.4mL/min , oven temperature 는 60℃, injection volume은 20 μ l, mobile phase는 acetonitrile과 DI water를 85 : 15의 비율로 사용했으며 detector로는 ELSD를 사용해서 분석하였다. ELSD는 기존의 UV나 RI에 비해 감도도 더 좋고 시간도 많이 단축할 수 있기 때문에 최근에 많이 사용되어지는 기기이다.

Table 2-24. Operation conditions of HPLC

Instrument	Young Lin MP30
Columns	Agilent Zorbax Cabohydrate
Flow rate	1.4 mL/min
Oven temperature	60℃
Injection volume	20 μ l
Mobile phase(%)	Acetonitrile : DI water = 85 : 15
Detector	ELSD ZAM 3000

㉞ 다당체 특성검토

Fig. 10.에서 처음은 추출액에 3배 volume의 ethanol을 부어서 polysaccharid를 침전시킨 그림이고 두 번째 사진은 다당체를 filtration 했을 때 filter paper(Whatman #4)에 의해 걸러진 polysaccharid를 찍어 둔 사진이다.

추출액을 3배 volume ethanol에 부었을 때 사진에서 보듯이 가라앉는 것이 거의 없으면서 전체적으로 깨끗하게 엉겨있는 것을 볼 수 있었다.

또한 엉겨있는 것들도 몽글몽글하면서 약간의 노란빛을 가지고 있는 흰색을 띄고 있었다. 또 밑에 엉기지 않은 액 중에는 위로 떠오르지 못하고 중간에 뭉쳐있는 것을 볼 수 있었다.

Filtration을 통해 걸러낼 때 잘 걸러지지 않는 것을 볼 수 있었으며 하루를 4℃에 두어서 그런지 색이 좀 더 노란색을 띄고 있었으며 약간 미끌한 느낌을 지니고 있으며 서로 엉겨있는 형상을 유지한다.

HPLC로 분석한 결과 standard에서는 fucose는 12.2783분, fructose는 17.7050분, mannose는 20.7800분, glucose는 22.9500분, galactose는 26.6717분에 peak를 나타냈다. 그리고 더덕에서 추출한 다당체에서는 fructose와 glucose만으로 구성되어있는 것을 확인할 수 있었으며 그 외에 다른 물질들의 peak는 잡히지 않았다. 그로 인해 더덕유래 다당체에는 fructose와 glucose로 구성되어 있는 것을 알 수 있었다.



Fig. 2-43. Photograph of polysaccharide precipitated by ethanol

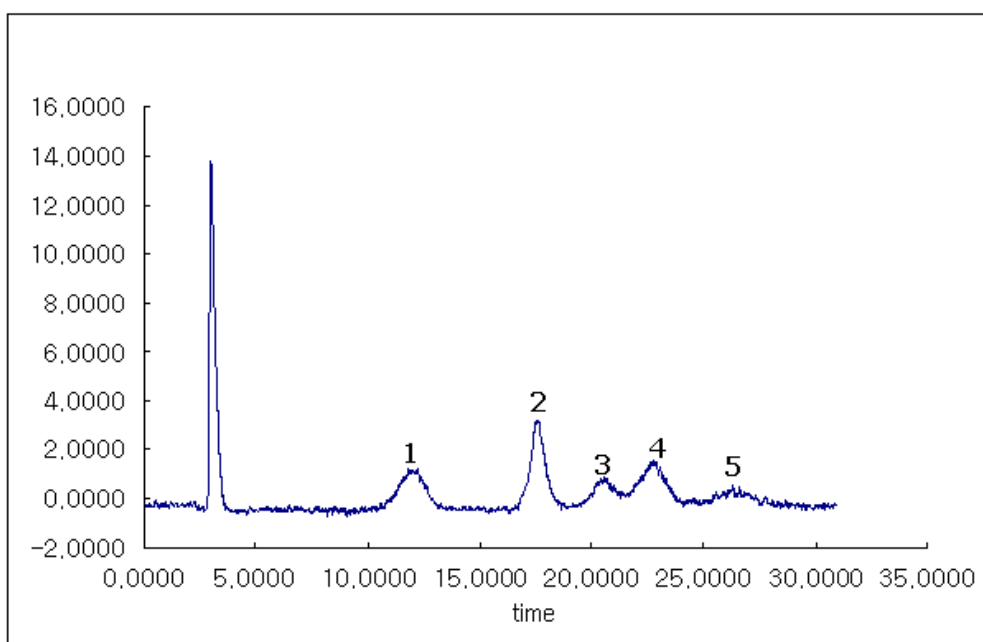


Fig. 2-44. HPLC chromatogram of standard saccharides

- | | |
|--------------|-------------|
| 1. Fucose | 2. Fructose |
| 3. Mannose | 4. Glucose |
| 5. Galactose | |

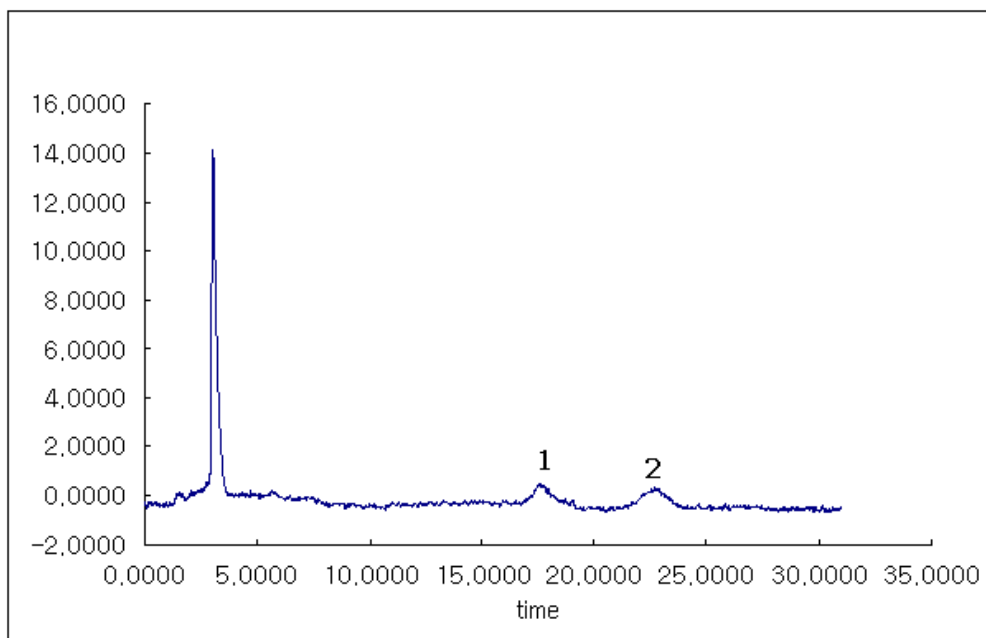


Fig. 2-45. HPLC chromatogram of extract from *Codonopsis Lanceolata*

- | | |
|-------------|------------|
| 1. Fructose | 2. Glucose |
|-------------|------------|

② Crude saponin 제조

a. 분리과정

㉠ Saponin 제조과정

Crude saponin 제조는 인삼 saponin 성분을 추출하는 방법을 응용하였다. 먼저 80% methanol 100mL에 *Codonopsis Lanceolata* 분말 4g을 넣어 1시간 정도 추출(4회 반복)한 후 filtration하여 80% methanol로 2회 정도 반복하고 filtration한다. 그 후 여액은 evaporation하여 농축시키고 distilled water를 넣어 농축물과 섞어준다. 그 후 ether를 넣어 분액깔대기에서 층분리를 하고 물층에 수포화 부탄올을 첨가하여 3회 정도 추출한 다음 수포화 부탄올층만을 모아 distilled water로 washing하였다. 수포화 부탄올층을 모아 evaporation하여 crude saponin을 얻는다. 수포화 부탄올은 n-butanol과 distilled water를 7:3의 비율로 혼합한 뒤 상층의 수포화 부탄올층을 분리하였다. 그렇게 분리한 수포화부탄올을 사용하였다.

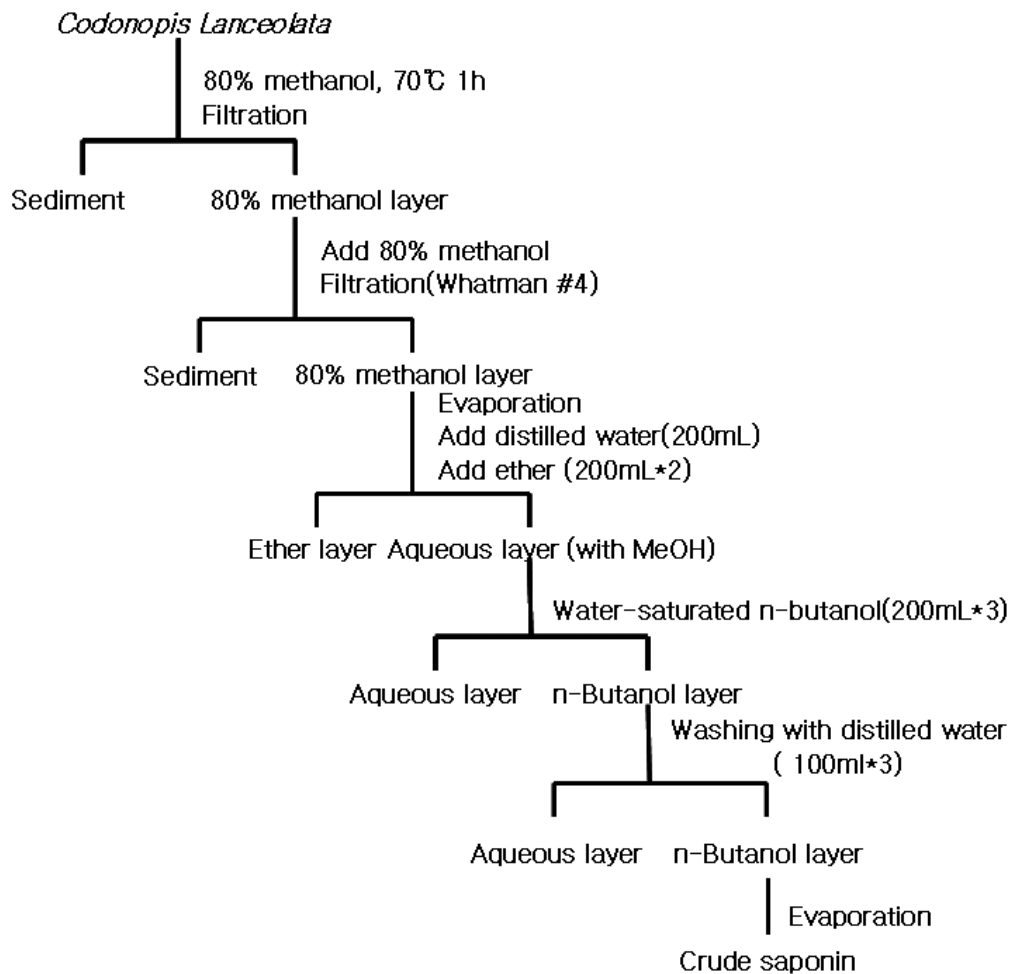


Fig. 2-46. Crude saponin extraction

㉔ Crude saponin 수율

Crude saponin을 추출해내는 방법은 *Codonopsis Lanceolata*와 가장 가까운 인삼에 대한 자료들을 근거로 찾아보았다. 인삼은 예전부터 *Codonopsis Lanceolata* 보다 약용으로 많이 사용되기 때문에 연구가 많이 행해졌으며 아직도 많은 연구자들이 연구하는 중이다. 실험에서 사용한 saponin 추출법은 saponin추출 시 가장 많이 사용하는 방법 중 하나이고 대표적인 방법이다. 하지만 이 경우에는 saponin 분획과정에서 층분리를 해야 하는 과정이 많아 그 시간이 많이 걸리고 분액깔대기를 사용하지만 완벽하고 정확한 층분리가 어렵다는 점이 있다. 그래서 최근에는 saponin의 더 정확하고 빠르게 추출하기 위해 새로운 방법들이 연구가 되어지고 있는 추세이다.

총 사용한 *Codonopsis Lanceolata*는 총 16g을 사용했으며 80% methanol은 총 400mL을 사용해서 추출하였다. Ether는 200mL씩 2회에 걸쳐서 사용하였으며 ether를 사용하는 이유는 불순물을 제거하기 위해 사용하였으며 각각의 층분리는 분액깔대기를 이용하여 실험하였다. 그리고 수포화 n-butanol은 실험 전에 준비해두었는데 n-butanol 700mL과 distilled water 300mL을 섞어서 만들었으며 상층의 수포화 n-butanol층만을 사용하였다. 수포화 n-butanol은 200mL씩 3회 반복해서 물층에 부어 추출하였으며 수포화 n-butanol층은 모아서 distilled water로 100mL씩 3회 정도 세척한다. 이때 매회 세척 시 층이 더 이상 변화가 없을 때까지 지켜봐야한다.

Crude saponin 추출에서 마지막으로 남은 n-butanol층을 evaporation 하여 완전히 농축시켰는데 이때 용매가 남아있을 수 있기 때문에 vaccum dry oven을 사용하여 용매를 완전히 제거하고 항량이 될 때까지 건조시킨 후 그 무게를 측정하였다. 전체 추출된 crude saponin은 0.3862g이고 전체 사용한 *Codonopsis Lanceolata* 분말에서 crude saponin의 함량을 계산해 본 결과 2.41%를 차지하였다. 인삼의 경우 인삼근에서 일반적으로 saponin의 함량이 3~4% 정도로 보고되어 있으나 인삼의 비해서는 saponin의 함량이 적은 것처럼 보이지만 인삼은 워낙 saponin함량이 높은 천연물 중의 하나이므로 이 정도의 함량도 적지 않은 수치라고 생각된다. *Codonopsis Lanceolata*의 정확한 saponin 함량을 알기 위해서는 앞으로 추출한 crude saponin의 정제와 어떤 성분이 함유되어 있는지 성분분석을 해봐야 할 듯하다.

b. 특성분석

㉠ Crude saponin 분석

Crude saponin의 구성성분을 알아보기 위해 추출을 마친 crude saponin을 5mg을 정확히 칭량하여 5ml의 HPLC용 methanol을 넣어 완전히 녹인 후 0.2 μ m PTFE membrane에 filtering하여 HPLC용 시료로 사용하였다. Standard로는 일반적으로 인삼에서 많이 사용하고 saponin연구에서 많이 사용되고 있는 ginsenoside-Re와 ginsenoside-Rb1, ginsenoside-Rc를 사용했으며 이 표준물질은 Sigma사 제품으로 사용하였으며 각 물질 5mg을 1ml에 녹여서 희석하여 사용하였으며 3가지 물질을 1:1:1로 섞어서 standard로 사용하였으며 각각

나온 peak를 확인함으로써 분석되는 순서를 알 수 있었다.

Saponin 분석측정을 위해 HPLC를 사용하였으며 Column은 C18을 사용하였으며 flow rate는 1.0mL/min, oven temperature는 40℃로 유지하였다. Injection volume은 20 μ l, mobile phase는 acetonitrile과 DI water, Isopropanol을 94.9 : 5.0 : 0.1의 비율로 사용했으며 detector로는 ELSD를 사용해서 분석하였다. ELSD에 유입된 nebulizing gas는 질소 가스로 2.0 L/min의 유속으로 흘려주었다.

Table 2-26. Operation conditions of HPLC

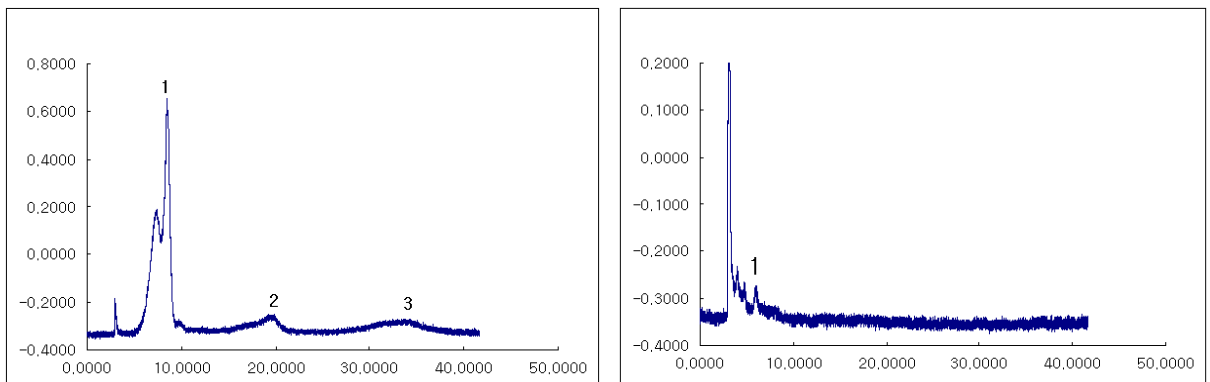
Instrument	Young Lin MP30
Columns	C18
Flow rate	1.0 mL/min
Nebulizing gas	N ₂ , 2L/min
Oven temperature	40℃
Injection volume	20 μ l
Mobile phase(%)	Acetonitrile : DI water : Isopropanol = 94.9 : 5.0 : 0.1
Detector	ELSD ZAM 3000

㉔ 특성분석

Standard로는 ginsenoside-Re, ginsenoside-Rc, ginsenoside-Rb1을 섞어서 사용하였으며 각각 따로 peak를 확인하여 물질을 확인하였다. 각각의 peak를 확인한 결과 ginsenoside-Re의 경우 7.4450분, 8.4800분에 peak가 나왔으며 ginsenoside-Rc는 19.5083분에, ginsenoside-Rb1

은 34.3300분에 peak가 나타났다. 반면 추출한 crude saponin으로 HPLC를 찍어본 결과에서는 ginsenoside-Re만이 함유되어 있었으며 나머지 ginsenoside-Rc와 ginsenoside-Rb1의 peak는 보이지 않았다. Ginsenoside-Re peak앞에 2개의 peak가 보이는데 다른 논문들에 의해 검토해 본 결과 그 중 하나는 ginsenoside-Rg1으로 예상하고 있으며 다른 하나의 peak는 아직 어떠한 물질인지 예상할 수 없었다.

다른 종류의 ginsenoside(Rd, Rb2, Rf 등)들은 어떤 detector를 사용하는지에 관계없이 다들 Re보다 뒤쪽으로 peak가 나오기 때문에 같은 물질이라고는 예상할 수 없으며 ginsenoside중에 ginsenoside Re보다 앞쪽에서 peak가 형성되는 것은 Rg1뿐이고 그렇지 않은 경우는 Re와 Rg1이 같이 나오는 것뿐이다. 그렇기에 직접 추출한 crude saponin에는 ginsenoside-Re와 ginsenoside-Rg1으로 구성되어 있을 것이라 예상된다.



(a) Standard ginsenosides

(b) Crude saponin

Fig. 2-47. Composition of standard ginsenoside and crude saponin by HPLC chromatogram

1. ginsenoside-Re

2. ginsenoside-Rc

3. ginsenoside-Rb1

3) Cascade Butanol layer 추출 최적 조건

a. 추출과정

Codonopsis Lanceolata 분말 20g을 증류수 500ml로 열수 추출한 후 filtration을 거쳐 얻어진 추출액을 가지고 cascade step을 진행하였다. 사용된 용매는 천연물에서 많이 쓰이는 것들을 선정하여 사용했으며 선정된 용매로는 Hexane, Chloroform, Ethyl acetate, Butanol을 사용하였다. 사용한 용매들은 aqueous layer 액량과 동량의 용매를 사용하였으며 먼저 hexane으로 추출을 하였으며 aqueous layer층에 chloroform을 가하여 aqueous layer과 분리하고 분리된 aqueous layer에 다시 ethyl acetate를 가하였고 또 aqueous layer과 분리하였다. 그리고 분리된 aqueous layer층은 n-butanol을 사용하여 다시 aqueous layer으로 나누었다. 각각의 cascade step에서 얻은 추출액은 앞의 실험과 동일하게 evaporation과 freeze drying을 통하여 분말화하여 추출물을 제조하였다. 추출물의 무게를 측정하여 수율을 측정하였으며 수율은 백분율을 사용해서 비교하였다.

b. 추출 최적조건

㉠ Mixing time

앞선 실험에서 얻어진 열수 최적 조건을 이용하여 열수추출을 후 얻어진 추출물을 filtration을 거쳤다. Cascade step에서 열수추출물 500mL을 기준으로 용매와 추출물 1:1의 기준으로 mixing time만을 다르게 하여 각 time별로 추출 수율을 보았으며 수율이 일정 이상의 시간을 지나서 늘어나는 모습을 보이지 않는다면 추출시간을 그 이상 늘리지 않는 것이 좋다. 시간은 3min, 5min, 7min, 10min으로 놓고 각 mixing time별로의 추출했으며 추출물을 filtration을 거쳐 동결건조하여 무게를 측정하였고 추출 수율을 구했으며 수율이 가장 좋은 시간을 최적의 mixing time으로 보고 다음 실험을 진행하였다.

㉡ Mixing volume

최적의 mixing time이 정해졌으므로 열수추출물 500mL과 다양한

volume의 Hexane, Chloroform, Ethyl acetate, Butanol을 반응시켜 그 수율을 보았다. Hexane, Chloroform, Ethyl acetate, Butanol은 250mL, 500mL, 750mL, 1 L로 반응 시켰다. 각각의 추출물은 filtration과 동결 건조를 거쳐 분말화하였고 그 무게를 측정하여 추출 수율을 구하였다. 이때 수율이 가장 좋은 것이 cascade step의 최적 조건이 되는 것이다.

b. 추출 수율

먼저 상온에서 mixing time만 변화를 주어서 추출되는 양과 수율을 알아보았다. Mixing time은 3min, 5min, 7min, 10min으로 정하여 실험을 진행하였다. 그 결과 추출되는 양에서 그 양이 크게 차이는 나지 않았으나 mixing time에 비례하여 mixing time이 길수록 양이 늘어나는 것을 볼 수 있었다. 10min을 추출했을 때 가장 많은 양이 추출되었으므로 최적 mixing time으로 정하였다. 앞의 실험을 통해서 최적 mixing time이 정해졌으며 각 용매의 volume만을 다르게 하여 추출하였다. 이때에는 열수추출 500mL에 용매별 250mL, 500mL, 750mL, 1 L로 10min 반응 시켰다. 그 결과 열수 추출 500mL에 각 용매별 1 L에서 추출되는 양이 가장 많은 것을 확인할 수 있었다. 이로서 cascade step의 최적 조건은 mixing time이 10min, 열수추출 500mL에 용매 mixing volume 1 L인 것을 확인할 수 있었다.

Table 2-27. Extraction yield of *Codonopsis Lanceolata* at various times (min).

Mix time Solvents	Yield (%)			
	3 min	5 min	7 min	10 min
Hexane	38.00 %	38.00 %	38.50 %	39.00 %
Chloroform	29.00 %	24.50 %	34.75 %	36.50 %
Ethyl acetate	37.75 %	37.75 %	40.75 %	44.75 %
Butanol	45.50 %	45.75 %	46.25 %	47.50 %

Table 2-28. Extraction yield of *Codonopsis Lanceolata* with various volumes (ml).

Volume Solvents	Yield (%)			
	500:250	500:500	500:750	500:1000
Hexane	33.00 %	29.50 %	34.00 %	36.50 %
Chloroform	31.00 %	31.00 %	31.00 %	35.00 %
Ethyl acetate	29.50 %	30.50 %	30.50 %	42.50 %
Butanol	43.50 %	45.00 %	45.00 %	48.50 %

4) Cascade Butanol layer 추출물 분획 제조

① 추출물 제조 및 수율

a. Cascade Butanol층 saponin 제조 및 수율

Cascade step에서 만들어진 butanol층을 분말화하여 saponin을 제조하였는데 그 과정은 위에서 crude saponin을 만드는 과정과 동일시하였으나 cascade butanol층이 워낙 소량이 추출되었기에 몇 번의 과정을 거쳐 cascade butanol층의 양을 20g을 모아서 saponin을 추출하였다. 총 사용한 분말은 20g을 사용했으며 80% methanol은 총 500mL을 사용해서 추출하였다. Ether는 250mL씩 2회에 걸쳐서 사용하였으며 ether를 사용하는 이유는 불순물을 제거하기 위해 사용하였으며 각각의 층분리는 분액깔대기를 이용하여 실험하였다. 그리고 수포화 n-butanol은 실험 전에 준비해었는데 n-butanol 700mL과 distilled water 300mL을 섞어서 만들었으며 상층의 수포화 n-butanol층만을 사용하였다. 수포화 n-butanol은 200mL씩 3회 반복해서 물층에 부어 추출하였으며 수포화 n-butanol층은 모아서 distilled water로 100mL씩 3회 정도 세척한다. 이때 매회 세척 시 층이 더 이상 변화가 없을 때까지 충분한 시간을 두고 지켜봐야한다.

이렇게 만들어진 saponin은 evaporation을 통해 용매를 날리고 동결 건조하여 분말화하여 수율을 측정했다. 그리고 추출과정에서 나오는 ether layer와 물층을 모아서 evaporation으로 용매를 날리고 동결 건조하여 saponin free fraction으로 나타냈다. cascade butanol층

saponin의 경우는 열수 추출물로부터 cascade step을 거쳐 butanol층을 가지고 만든것이라 기존의 crude saponin과는 다르게 동결건조를 할 수 있었다. Cascade Butanol 층을 20g으로 시작했을 때 saponin의 경우 11.24%, saponin free의 경우에는 77.5%로 나타났다. 총 88.74%가 나왔는데 나머지는 추출과정에서 손실된 것으로 보여진다. 그리고 Cascade Butanol 제조 시 20g으로 시작했을 경우부터 시작한다면 cascade Butanol saponin은 0.14%의 추출 수율을 가지게 되며 saponin free의 경우에는 0.97%로 나타났다. Cascade Butanol층이 소량 추출되기 때문에 상대적으로 추출되는 saponin의 양이 적어지는 것을 알 수 있다.

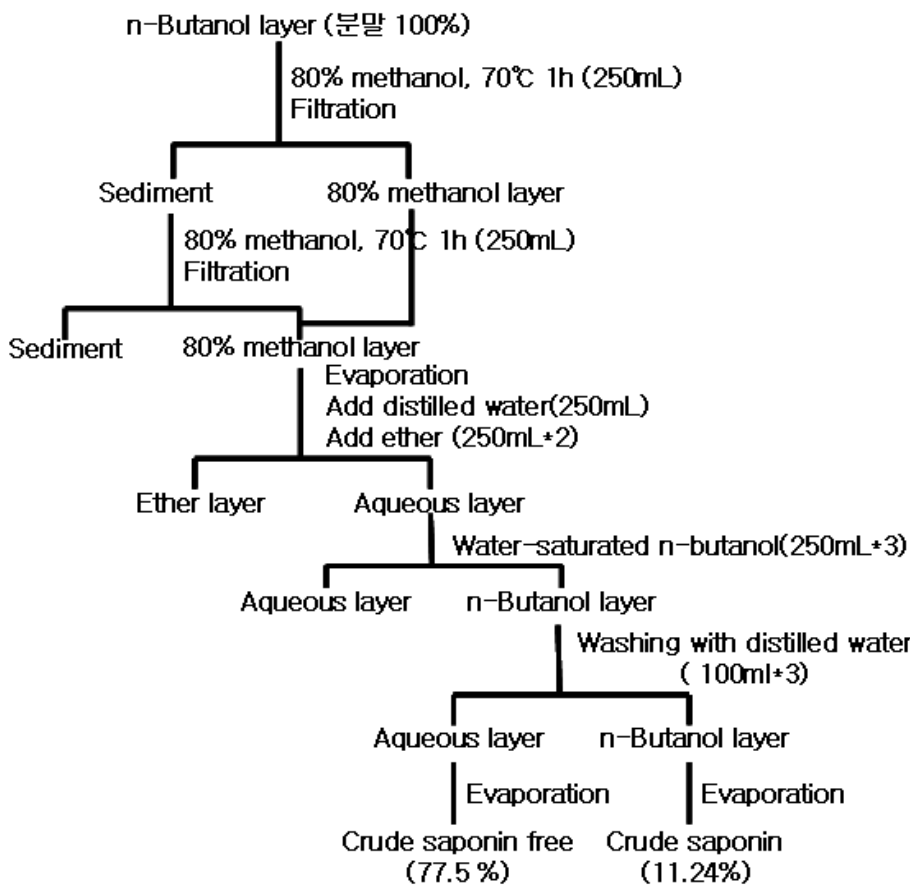


Fig. 2-48. Saponin extraction procedure of by cascade butanol layer extract

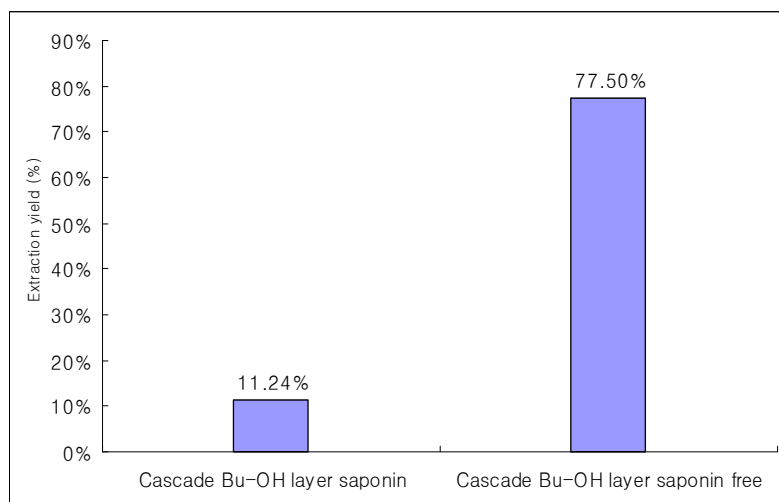


Fig. 2-49. Saponin extraction yield of cascade butanol layer extract

b. Cascade Butanol층 다당체 제조 및 수율

Cascade step에서 만들어진 Butanol층을 evaporation을 통해 용매를 날려주고 다시 distilled water에 녹여 3배 volume의 ethanol을 가하여 4°C에서 하루정도 두었다. 그런 후 filtration을 통해 다당체를 얻고 원심분리(9,000rpm, 30min)를 통해 침전된 것들만을 distilled water에 녹여서 모았다. 이렇게 모아진 추출액은 evaporation을 통해 ethanol을 제거해주었으며 약간의 distilled water에 녹여 투석을 통해 정제하였다. 투석은 총 3일간 했으며 투석이 끝나면 동결건조 시키고 이때 동결건조한 것은 무게 측정에 사용되었다. 그리고 원심분리 후 남은 액은 polysaccharides free fraction으로 evaporation 과정을 거쳐 ethanol을 제거하여 동결건조하였다. Ethanol 침전 시 그 양이 적어 침전되는 것이 확연하게 눈에 보이지는 않았으나 원심분리를 했을 때 볼 수 있었으며 침전물의 양이 앞에서 제조한 다당체보다 색이 더 투명한 것을 볼 수 있었다.

Cascade butanol층을 100%로 보았을 때 투석과 동결건조까지 끝낸 polysaccharides는 17%, polysaccharides free는 80%의 수율을 나타냈다. Cascade butanol층 saponin 보다는 손실이 적었다. Cascade butanol층 제조 시 20g으로 시작했을 경우 cascade butanol층 polysaccharides는 0.21%, polysaccharides free는 1%로 나타났다.

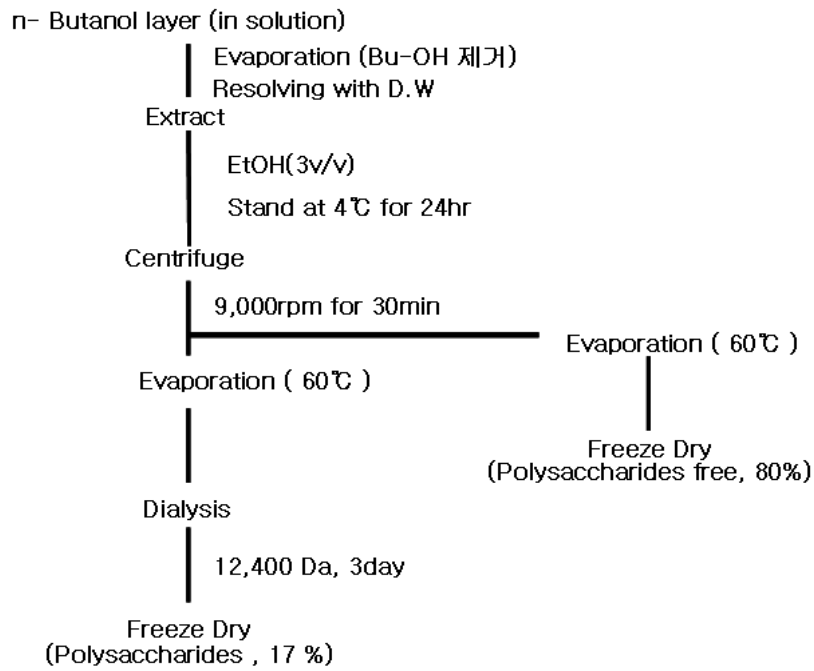


Fig. 2-50. Polysaccharides extraction procedure of cascade butanol layer extract

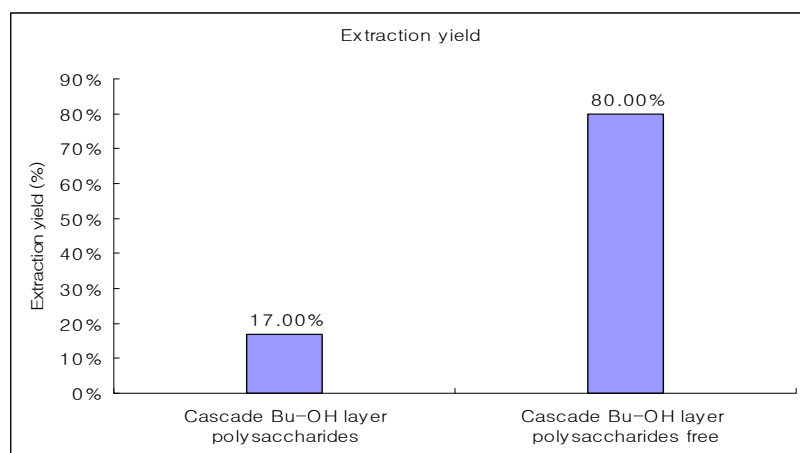


Fig. 2-51. Polysaccharides extraction yield of cascade butanol layer extract

② 활성분획 선별

용매별로 추출한 각각의 추출물을 가지고 가장 활성이 좋은 분획을 선택해야하는데 그 지표로 NO억제능을 보았다. 일반적으로 NO(산화질소)는 혈관의 안쪽을 감싸고 있는 상피세포라는 막에서 미세 액체로 생성 분비되며 신경전달물질로 작용하여 혈관을 유연하고 건강하게 하여 혈관을 확장, 혈압을 조절하고 혈류의 흐름을 촉진함으로써 고혈압을 낮추고, 혈액을 정화하고, 상피세포를 보호하고, 혈전 생성과 죽상반의 축적으로 인한 동맥경화의 진행을 지연시키며, 심장발작(심근경색)과 뇌졸중을 예방 또는 치료한다고 알려져 있으며 또한, 산화질소 순환계 뿐 만 아니라 면역계, 신경계 등에도 신호 물질로 작용하여 폐, 간, 신, 위, 뇌, 등 모든 세포의 기능을 향상시킨다. 또 포도당연소 부산물인 프리라디칼을 중화시키며, 피부와 뼈의 노화를 방지하며, 운동 시 나오는 젖산 축적의 양을 줄이며, 암세포 증식억제, 당뇨 합병증예방, 알츠하이머병, 발기 부전, 관절염, 불면증 등에 기여한다.

하지만 anti-inflammation이나 anti-allergy, atopy의 경우에는 NO가 높은 것이 좋은 것이 아니다. Inflammation이나 allergy가 생기게 되면 대식세포에서 histamine이나 cytokine 등 염증매개 물질들이 나오게 되는데 이로 인해 Inflammation이나 allergy가 더 악화가 되고 그로인해 NO의 생성이 많아지게 된다. 그렇게 많아진 NO는 대식세포를 자극하기 때문에 대식세포에서는 histamine이나 cytokine 등 염증매개 물질들을 배출하기 때문에 악순환이 반복되게 된다. 그렇기에 면역학적인 면에서 보면 NO의 생성이 많은 것이 좋지만 atopy나 allergy에서는 적당한양의 NO만을 필요로 한다. 그렇기에 활성 분획의 지표로 NO억제능을 보았다.

NO 억제능 평가는 A) Polysaccharide, B) Polysaccharide free, C) Cascade butanol layer extract, D) Cascade distilled water layer extract, E) Cascade Bu-OH layer polysaccharide, F) Cascade Bu-OH layer polysaccharide free, G) Cascade Bu-OH layer saponin H) Cascade Bu-OH layer saponin free fraction을 가지고 실험하였다. 또한 농도별로 cell viability도 함께 평가하였다.

그 결과로 NO 억제능에서는 cascade butanol layer saponin fraction이 50ug/ml부터 200ug/ml의 농도에서 높은 억제능을 보였으며 cascade butanol layer polysaccharide free fraction 200ug/ml와 cascade Bu-OH layer saponin free fraction 200ug/ml의 농도에서도 NO 억제능을 보였다.

Cell viability 측정 결과 cascade butanol layer saponin fraction이 다른 fraction에 비해 낮은 수치를 나타냈으나 cell viability와 NO 억제능을 살펴본 결과 cascade butanol layer saponin fraction을 활성 부획으로 선택하였다.

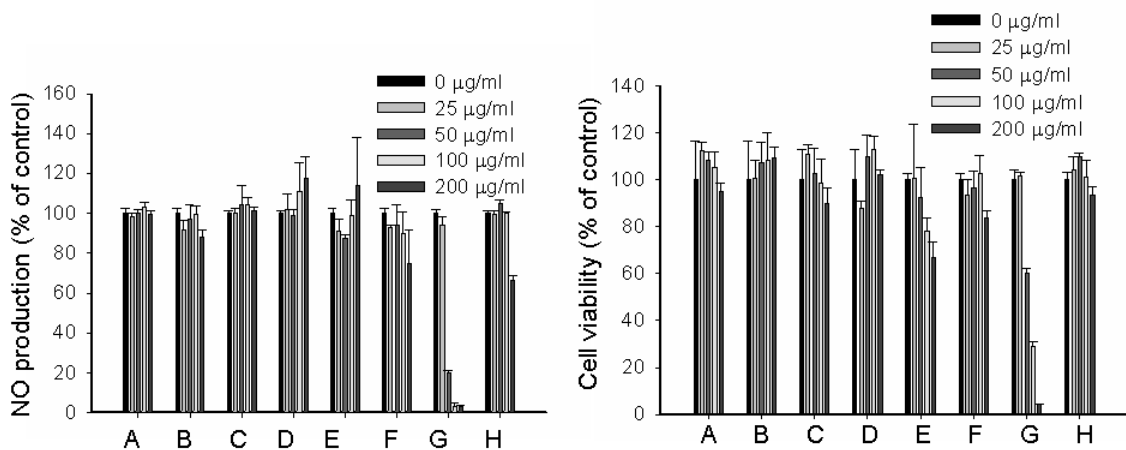


Fig.2-52. The effect of various extracts from *Codonopsis Lanceolata* in murine macrophage cell (제 1세부 연구 결과중에서)

- A. Polysaccharides
- B. Polysaccharides free
- C. Cascade butanol layer extract
- D. Cascade distilled water layer extract
- E. Cascade butanol layer polysaccharides
- F. Cascade butanol layer polysaccharides free
- G. Cascade butanol layer saponin
- H. Cascade butanol layer saponin free

5) 단일물질 분리정제

① Cascade Butanol층 saponin 제조

a. 분리과정

Saponin 제조는 인삼 saponin 성분을 추출하는 방법을 응용하였다. 먼저 *Codonopsis Lanceolata* 분말 20g으로 열수추출을 시작하여 Hexane, Chloroform, Ethyl acetate, Butanol층의 cascade step을 거쳤다. 그 후 cascade butanol층을 evaporation을 통해 용매를 날리고 동결건조 후 분말하여 20g을 만들었다. 이렇게 만들어진 cascade butanol층은 80%methanol에 넣어 1시간 정도 추출한 후 filtration한다. 그 후 여액은 evaporation하여 농축시키고 distilled water를 넣어 농축물과 섞어준다. 그 후 ether를 넣어 분액깔대기에서 층분리를 하고 물층에 수포화 부탄올을 첨가하여 3회 정도 추출한 다음 수포화 부탄올층만을 모아 distilled water로 washing하였다. 수포화 부탄올층을 모아 evaporation하여 crude saponin을 얻는다. 수포화 부탄올은 n-butanol과 distilled water를 7:3의 비율로 혼합한 뒤 상층의 수포화 부탄올층을 분리하였다. 그렇게 분리한 수포화부탄올을 사용하였다.

Cascade Butanol 층을 20g으로 시작했을 때 saponin의 경우 11.24%, saponin free의 경우에는 77.5%로 나타났다. 총 88.74%가 나왔는데 나머지는 추출과정에서 손실된 것으로 보여진다. 그리고 Cascade Butanol 제조 시 20g으로 시작했을 경우부터 시작한다면 cascade Butanol saponin은 0.14%의 추출 수율을 가지게 되며 saponin free의 경우에는 0.97%로 나타났다.

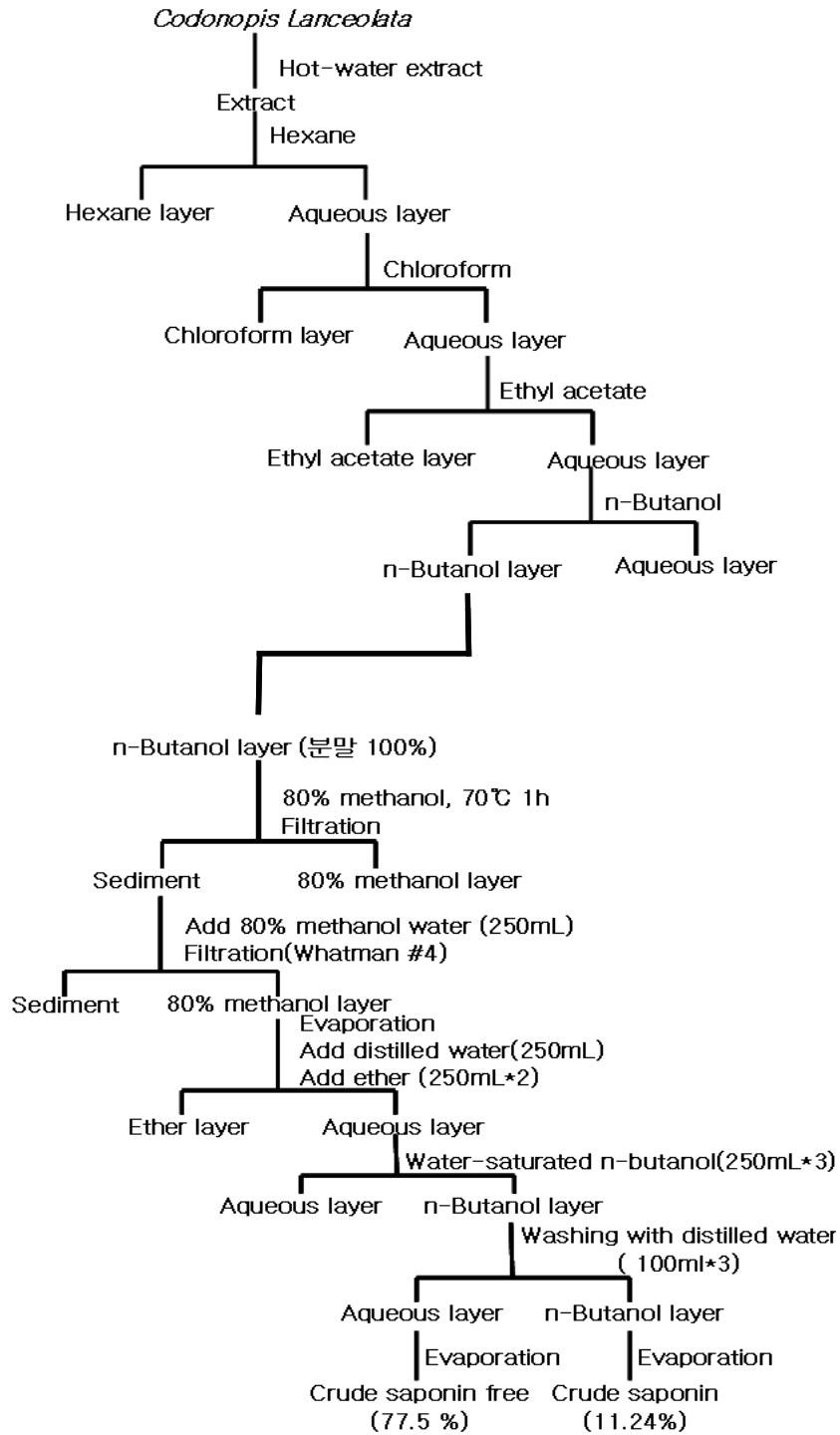


Fig. 2-53. Saponin extraction of cascade butanol extract

b. 특성분석

㉠ Cascade butanol층 saponin 분석

Cascade butanol층 saponin의 구성성분을 알아보기 위해 추출을 마친 cascade butanol층 saponin을 5mg을 정확히 칭량하여 10ml의 HPLC용 methanol을 넣어 완전히 녹인 후 0.2 μ m PTFE membrane에 filtering하여 HPLC용 시료로 사용하였다. Standard로는 일반적으로 인삼에서 많이 사용하고 saponin연구에서 많이 사용되고 있는 ginsenoside-Re와 ginsenoside-Rb1, ginsenoside-Rc를 사용했으며 이 표준물질은 Sigma사 제품으로 사용하였으며 각 물질 5mg을 1ml에 녹여서 희석하여 사용하였으며 3가지 물질을 1:1:1로 섞어서 standard로 사용하였으며 각각 나온 peak를 확인함으로써 분석되는 순서를 알 수 있었다.

Saponin 분석측정을 위해 HPLC를 사용하였으며 Column은 C18을 사용하였으며 flow rate는 0.6mL/min, injection volume은 20 μ l, mobile phase는 acetonitrile과 DI water를 3 : 7의 비율로 사용했으며 detector로는 UV를 사용해서 분석하였다. UV는 203nm에서 측정하였다.

Table 2-29. Operation conditions of HPLC

Instrument	Young Lin MP30
Columns	C18
Flow rate	0.6 mL/min
Injection volume	20 μ l
Mobile phase(%)	Acetonitrile : DI water = 3 : 7
Detector	UV (203nm)

㉔ 특성분석

Cascade butanol층 saponin과 saponin free의 peak를 보고 어떤 peak가 saponin peak인지를 확인하였다. 5분이 지나서 용매 peak가 나오고 그 뒤로 saponin의 경우엔 peak가 눈에 보일 정도로 나타났다. 그러나 saponin free의 경우엔 그 peak가 약하거나 없는것처럼 나타났다. 약하게 나타나는 것은 추출과정에서 완벽하게 saponin이 제거 되지 않았기 때문이라 생각한다. 그래서 그 peak를 saponin peak라 할 수 있다.

Standard로는 ginsenoside-Re, ginsenoside-Rc, ginsenoside-Rb1을 섞어서 사용하였으며 각각 따로 peak를 확인하여 물질을 확인하였다. 각각의 peak를 확인한 결과 ginsenoside-Re의 경우 8.1922분, ginsenoside-Rc는 26.8050분, ginsenoside-Rb1은 23.2883분에 peak가 나타났다. Cascade butanol층 saponin과 standard를 섞어서 찍어 본 결과 ginsenoside-Re와 같은 시간대에 peak가 드는 것을 확인할 수 있었다. 이런 결과로써 추출한 cascade butanol층 saponin에는 ginsenoside-Re로 구성되어 있을 것이라 예상한다. 그리고 나타난 peak의 면적으로 계산해 보았을 경우 총 면적의 47.38%를 차지한다. 이것으로 cascade butanol층의 saponin에 들어있는 활성물질의 양을 구하면 cascade butanol 층 saponin에는 들어있는 ginsenoside-Re의 양은 473.8mg/g이라 추정할 수 있다.

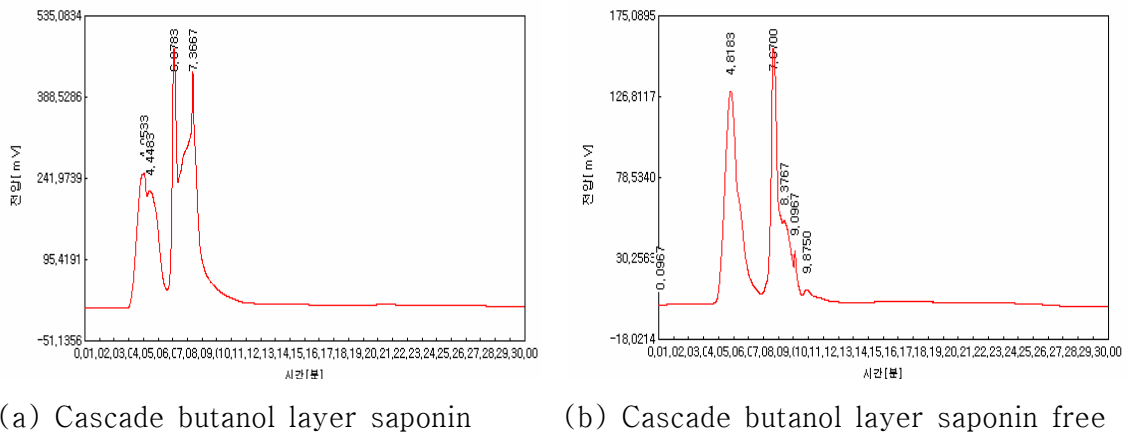
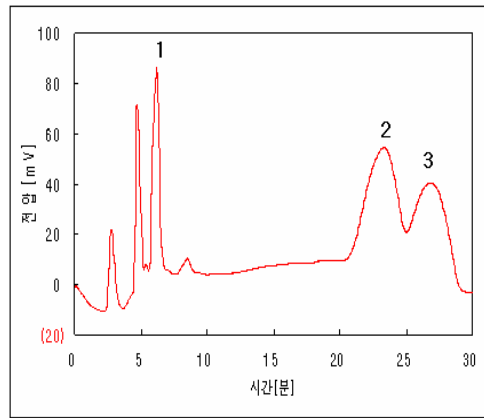
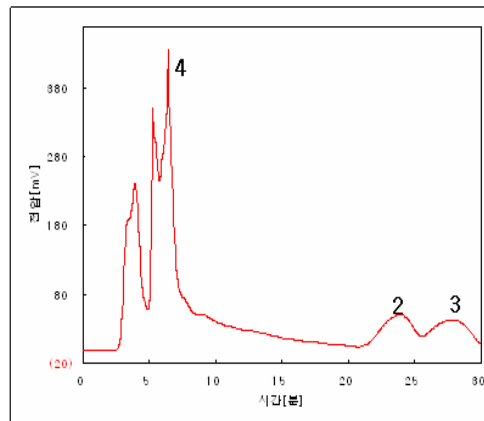


Fig. 2-54. Composition of cascade butanol layer saponin and cascade butanol layer saponin free



(a) Standard ginsenosides



(b) Standard + Cascade butanol layer saponin

Fig. 2-55. Composition of standard ginsenosides and cascade butanol layer saponin

- Peak : 1. ginsenoside-Re 2. ginsenoside-Rb1
 3. ginsenoside-Rc
 4. ginsenoside-Re + cascade butanol layer saponin

6) 최종 추출물 특성 분석

Cascade butanol층 saponin의 구성성분을 알아보기 위해 추출을 마친 cascade butanol층 saponin을 5mg을 정확히 칭량하여 10ml의 HPLC용 methanol을 넣어 완전히 녹인 후 0.2 μ m PTFE membrane에 filtering하여 HPLC용 시료로 사용하였다. Standard로는 일반적으로 인삼에서 많이 사용하고 saponin연구에서 많이 사용되고 있는 ginsenoside-Re와 ginsenoside-Rg1을 사용했으며 이 표준물질은 Sigma사 제품으로 사용하였으며 각 물질 5mg을 1ml에 녹여서 희석하여 사용하여 standard로 사용하였으며 각각 나온 peak를 확인함으로써 cascade butanol층 saponin의 성분이 무엇인지를 알 수 있었다.

Saponin 분석측정을 위해 HPLC를 사용하였으며 Column은 C18을 사용하였으며 flow rate는 0.6mL/min, injection volume은 5.0 μ l, mobile phase는 acetonitrile과 DI water를 gradient로 사용했으며 detector로는 UV를 사용해서 분석하였다. UV는 203nm에서 측정하였다. 또한 마지막 washing time까지하여 total run time은 1h으로하였다.

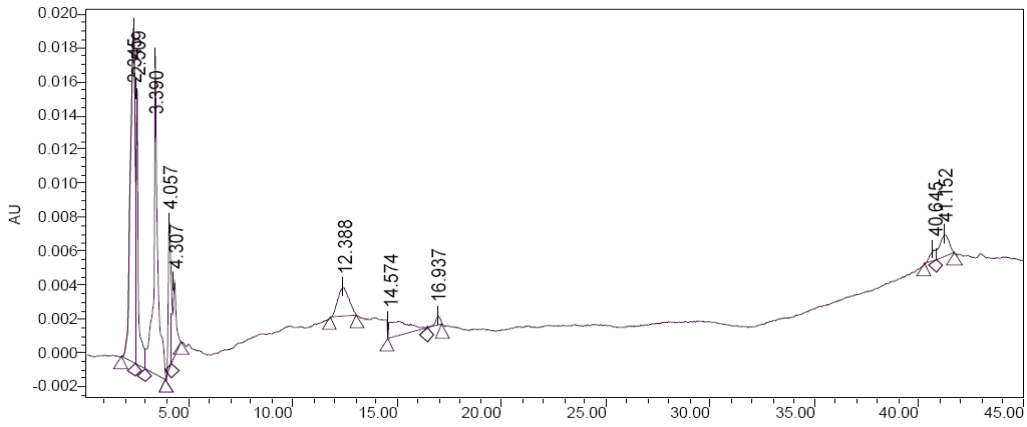
Table 2-30. Operation conditions of HPLC

Instrument	Young Lin MP30
Columns	C18
Flow rate	0.6 mL/min
Injection volume	5.0 μ l
Mobile phase(%)	0 min : Acetonitrile 20% water 80% 20 min : Acetonitrile 25% water 75% 25 min : Acetonitrile 25% water 75% 35 min : Acetonitrile 25% water 75% 40 min : Acetonitrile 25% water 75% 45 min : Acetonitrile 25% water 75%
Detector	UV (203nm)

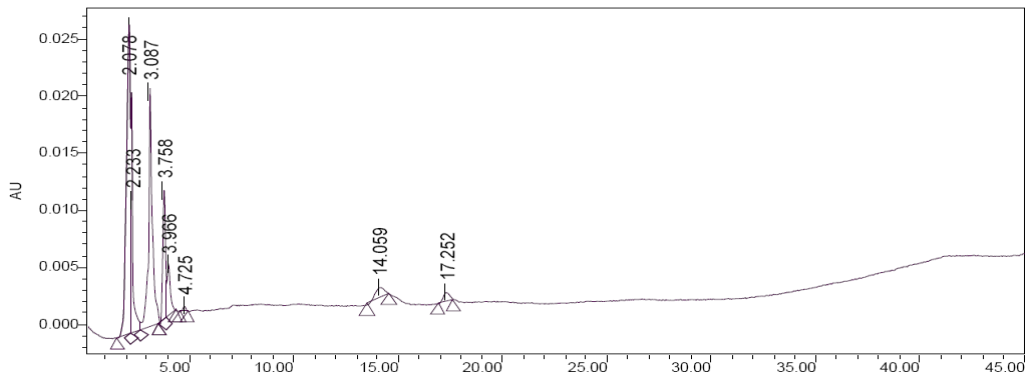
① 단계별 추출물들의 함량 변화

앞선 실험들을 통해 단계별 최적 조건을 확립했다. 그러한 결과로 얻어진 열수 추출물과 cascade butanol추출물, cascade butanol층 saponin의 추출물의 함량이 어떻게 달라지는지와 정제의 정도를 알아보기 위해 HPLC로 확인하였다. 분석조건은 위의 조건과 동일하며 열수추출물과 cascade butanol층 추출물은 0.5 mg/ml로 cascade butanol layer saponin의 농도는 1 mg/ml로 실험하였다. 그 결과 열수추출물과 cascade butanol층에서는 작게 나타난 16분대의 peak가 cascade butanol layer saponin에서는 확연히 peak의 면적이 넓어지는 것을 확인했으며 열수추출물에서의 peak보다 cascade butanol층의 peak가 1.5배 정도 넓어진 것을 확인할 수 있었다. 또한 열수추출물에서 나타난 12분대의 peak는 cascade butanol층부터 완전히 제거된 것을 확인할 수 있었으며 열수추출물이나 cascade butanol층보다 농도가 2배 높은 것을 감안하고 peak의 면적을 확인하게 되면 10배 정도 함량이 높아진 것을 확인할 수 있었다.

A) Hot-water extract



B) Cascade butanol extract



C) Cascade butanol layer saponin

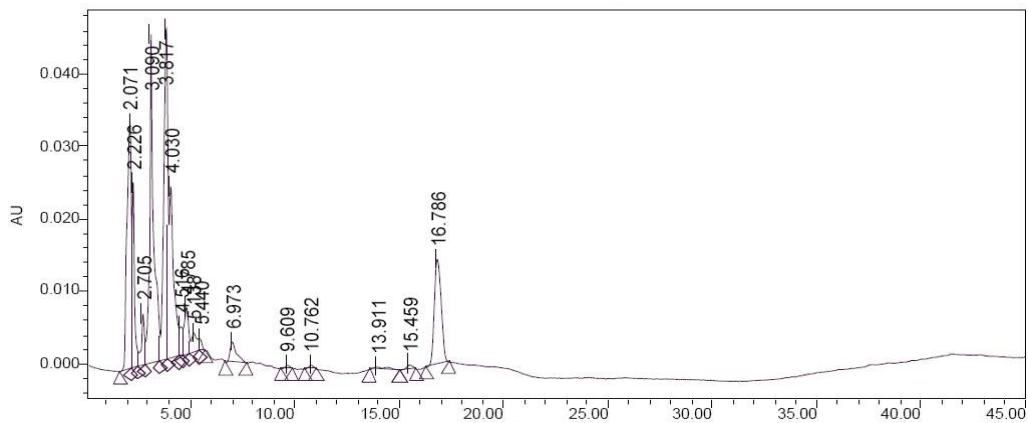


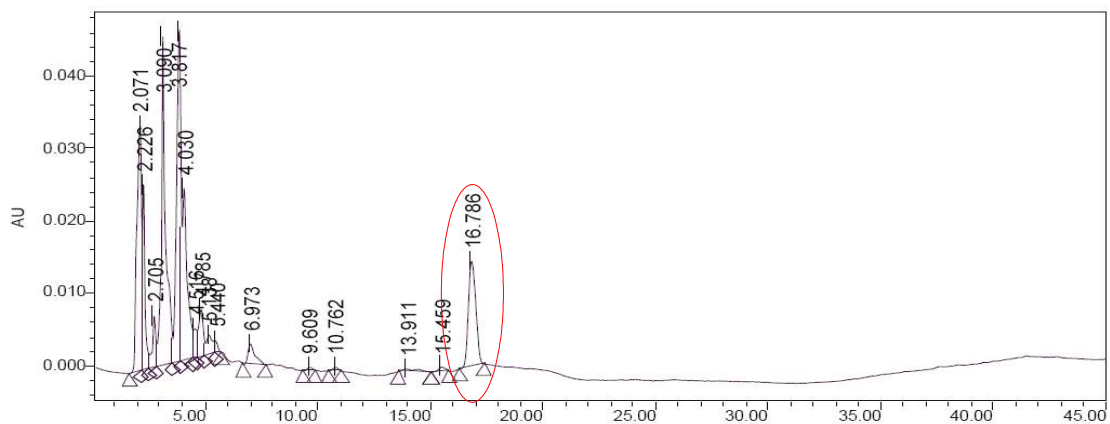
Fig.2-56. Composition of hot-water extract , Cascade butanol extract and Cascade butanol layer saponin

② Cascade butanol층 saponin 특성분석

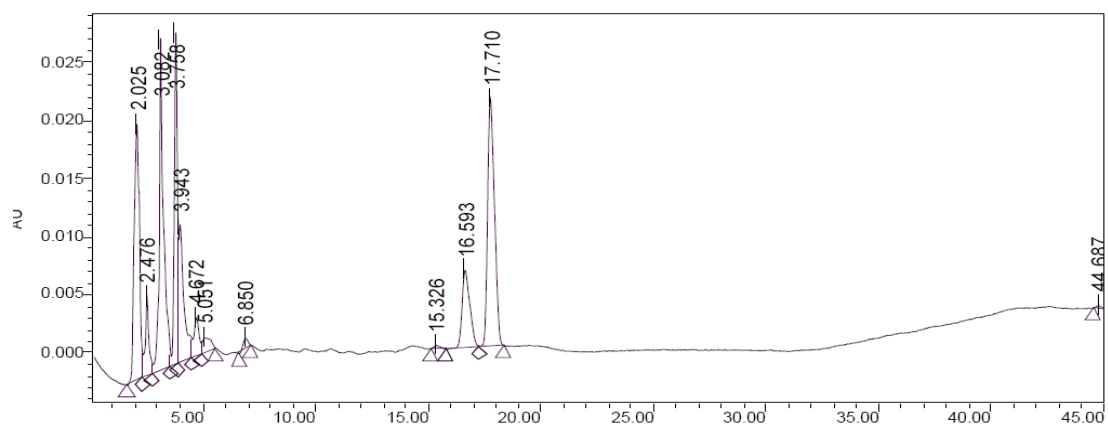
2차년도 과제에서 Cascade butanol층 saponin과 saponin free의 peak를 보고 saponin peak인지를 확인하였다. 그리고 Standard로는 ginsenoside-Re, ginsenoside-Rc, ginsenoside-Rb1 사용하여 cascade butanol layer saponin의 성분이 ginsenoside-Re라고 추정하였다. 그리하여 더 자세한 peak를 알아보기 위하여 standard로 ginsenoside-Rg1와 ginsenoside-Re를 사용하고 mobile phase 또한 gradient로 peak를 확인하였다.

Standard로는 ginsenoside-Rg1, ginsenoside-Re을 섞어서 사용하였으며 각각 따로 peak를 확인하여 물질을 확인하였다. Cascade butanol layer saponin의 농도는 1 mg/ml로 실험하였고 나머지는 0.5 mg/ml로 실험을 진행했다. Cascade butanol layer saponin과 각각의 standard peak를 확인한 결과 ginsenoside-Rg1은 17.394분, ginsenoside-Re는 17.710분에 peak가 나타났으며 standard 두 가지와 cascade butanol layer saponin을 섞어서 찍었을 때에는 cascade butanol layer saponin은 16.718분, ginsenoside-Rg1은 17.539분, ginsenoside-Re는 18.156분에 peak가 나타났다. Cascade butanol층 saponin과 두 가지 standard를 섞어 실험한 결과 ginsenoside-Rg1와 ginsenoside-Re와 1초 정도의 간격을 두고 peak가 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 이런 결과로써 추출한 cascade butanol층 saponin에는 ginsenoside-Rg1, ginsenoside-Re이 아닌 다른 물질로 구성되어 있을 것이라 예상한다.

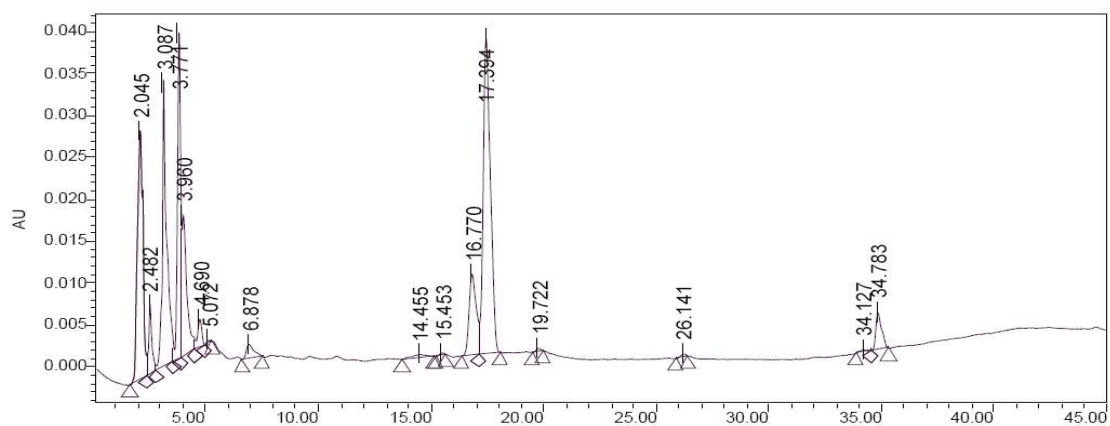
A) Cascade butanol layer saponin



B) ginsenoside-Re + Cascade butanol layer saponin



C) ginsenoside-Rg1 + Cascade butanol layer saponin



D) ginsenoside-Rg1 + ginsenoside-Re + Cascade butanol layer saponin

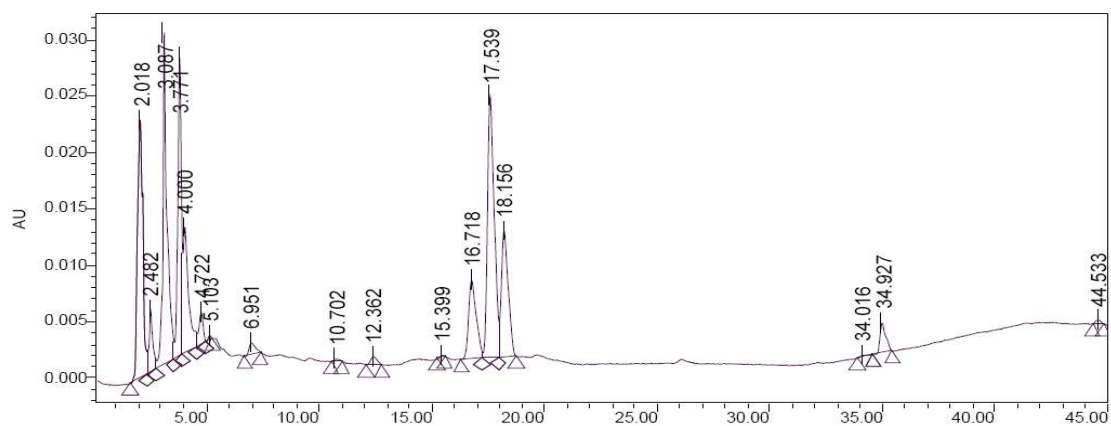


Fig. 2-57. Composition of standard ginsenosides and cascade butanol layer saponin

- A) Cascade butanol layer saponin
- B) ginsenoside-Re + Cascade butanol layer saponin
- C) ginsenoside-Rg1 + Cascade butanol layer saponin
- D) ginsenoside-Rg1 + ginsenoside-Re + Cascade butanol layer saponin

제 3절. 협동과제 연구개발수행 내용 및 결과

1. 연구개발 수행내용

구분	연구개발목표	연구 범위	연구 수행방법	내용
1차 년도	더덕함유 기능성 신소재의 물성연구 및 분석법 확립	더덕함유 기 능성 신소재 의 물성연구 및 분석법 확립	피부면역 조절에 관여하는 것 으로 평가되고 있는 더덕 추출 물을 함유하는 고기능성 향장 품을 개발하기 위해 더덕추출 물의 피부면역 조절기능과 향 장품 자체의 피부환경 보호기 능 및 보습기능을 모두 갖춘 기능성 향장품을 제조하고자 함.	더덕 추출물의 HPLC 정량 분석법 확립 더덕 추출물의 용해도 평가 연구
	더덕함유 기능성 신소재 함유 향장품 제제설계 연구	더덕함유 기 능성 신소재 함유 향장 품 제제설계 연 구	더덕함유 기능성 신소재의 물 성연구 더덕함유 기능성 신소재의 정 량분석법 확립 신소재의 나노수송체 개발 신소재 나노입자 함유 향장품 설계 및 평가에 관련된 연구를 수행함.	더덕 추출물의 고형지질나노 입자 제조법 개발 더덕 추출물이 탑재된 고형 지질나노입자의 크림제 조성 연구
2차 년도	더덕함유 기 능성 향장품 제제 개발 연 구	더덕추출물 의 물성에 적합한 향 장제형 설 계	더덕추출물의 물성에 적합한 반고형 향장기제를 선정하기 위해 기제로부터 더덕 추출 물의 방출율을 평가할 수 있 는 평가법을 개발하였음	더덕추출물의 각종 기제 로부터의 방출율을 평가 한 결과 o/w형 크림기제 와 수용성 기제로부터 더 덕추출물의 방출이 가장 컸음
3차 년도	더덕추출물 함 유 기능성 화 장품 제형의 조성 결정 및 제조공정 수립	더덕추출물 함유 크림제/ 에센스제/팩 제/의 제형 조성 및 제 조방법 확립	더덕추출물 함유 기능성 화장 품 제형의 제조공정 수립 및 시작품 제작	물을 외상으로 함유하는 O/W 크림제와 주로 물을 기제로 사용하는 에센스 제 형, 그리고 피부보습과 아토피 피부염 부위에 장시간 더 덕추출물을 전달하기 위한 수단으로 팩제를 설계. 이상 3종의 화장품 제형의 실험실적 처방을 확립. 대량생산에 적합한 제조공정 을 적용하여 제조공정을 수 립.

2. 연구개발 수행결과

(1) 항알러지/항아토피 기능성 향장품 제제 개발 연구

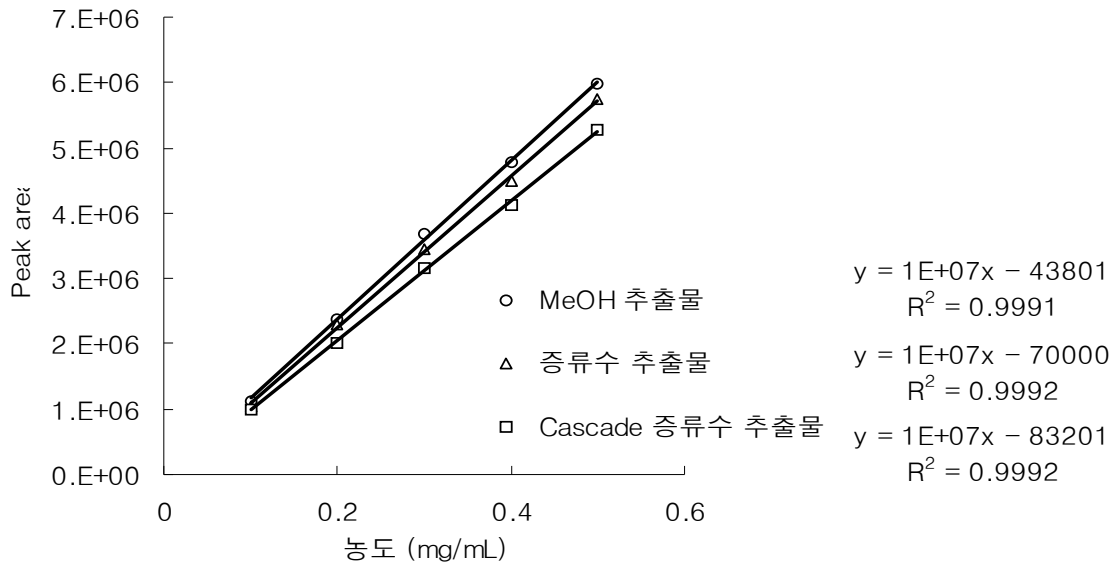
본 연구에서는 아토피 피부염 환자에서 나타나는 주요한 특징인 피부장벽기능의 저하문제와 이로 인한 수분 보습능력의 저하 문제를 개선하기 위해 피부면역 조절에 관여하는 것으로 평가되고 있는 더덕 추출물을 함유하는 고기능성 향장품을 개발하고자 한다. 본 연구를 통해 개발하고자하는 아토피 치료용 고기능성 향장품은 더덕추출물의 피부면역 조절기능과 향장품 자체의 피부환경 보호기능 및 보습기능을 모두 갖춘 고기능성 화장품 제제로 화장품 제형화를 위해 일차적으로 더덕 추출물의 정량분석법과 물리화학적 특성을 조사하였고 더덕추출물 함유 향장품에서 더덕추출물의 나노수송체로서 고품지질나노입자를 제조하고 평가하였다.

1) 더덕추출물의 HPLC 정량분석법

더덕에 대한 메탄올(이하 MeOH로 약함) 추출물, 증류수 추출물, Cascade 증류수층 추출물 각각 5mg을 water 10ml에 넣고 150rpm으로 10분간 shaker에서 교반하고, 0.45 μ m membrane filter로 filtering을 한 후 water로 적절히 희석한 후 용액 중 더덕 추출물들에 대한 농도를 액체크로마토그래피법(HPLC)로 분석하였다. HPLC는Hitachi 시스템(pump L-2130, UV detector L-2400)을 분석컬럼은 Shiseido(C18, 4.6 mm x 150 mm, 5 μ m)의 역상 컬럼을 사용하였고, 이동상은 acetonitrile : water =5:5 (v/v)의 혼합물을 사용하였으며, 검출파장은 210 nm, 컬럼 온도는 30 $^{\circ}$ C, 주입용량은 40 μ l, 유속은 1ml/min로 하였다.

더덕의 MeOH 추출물, 증류수 추출물, Cascade 증류수층 추출물에 대한 상기 HPLC 조건에서의 크로마토그램을 Fig. 3-1에 나타내었다. 더덕의 세 가지 추출물 모두 수용성을 띠고 있었으며 약 1.2분에 각 추출물의 주 피크를 관찰할 수 있었다. 또한 HPLC 크로마토그램 상의 주피크의 정량성을 확인하기 위해 검량선을 작성한 결과를 Fig. 3-2에 나타내었고 그 결과 시료의 농도와 피크면적 간에 양호한 직선의 관계를 얻을 수 있었다.

Fig. 3-2 더덕의 MeOH 추출물, 증류수 추출물 및 Cascade 증류수층 추출물의 HPLC 검량선



2) 더덕 추출물의 용해도 평가

더덕 추출물의 용해성을 평가하기 위해 더덕의 MeOH 추출물, 증류수 추출물 및 Cascade 증류수층 추출물 일정량을 2 mL의 신선한 증류수가 가해진 시험관에 가한 후 실온에서 shaker로 용해시켰다. 더덕 추출물이 다 용해되면 추가적으로 일정량의 추출물을 물에 가하여 최대로 녹을 수 있는 더덕 추출물의 양을 구하였다. 그 결과 세 종류의 추출물 모두 물에 대한 용해도가 1g/mL 이상으로 나타났고 이러한 용해도는 나노수송체 제조나 향장품 제조시 가해지는 물에 용해시켜 사용하기에 충분한 용해도인 것으로 판단되었다.

3) 더덕 추출물의 경시안정성 평가

더덕 추출물 3종을 0.5 mg/mL의 농도로 용해시킨 후 실온, 40°C 및 60°C에 보관 하면서 주피크의 함량 변화를 4주간 측정하였다. 그 결과 <Table 3-1>에서 보는 바와 같이 실온에서는 유의성 있는 함량 저하가 관찰되지 않았고 40°C에 보관한 경우 1-2%의 함량저하가 그리고 60°C에 보관한 경우 2-3%의 함량 저하가 관찰되었다. 따라서 일상의 보관 조건에서 더덕 추출물들은 매우 안정함을 알 수 있었다.

<Table 3-1> 더덕 추출물의 안정성 추이

시료	보관온도	1주	2주	3주	4주
MeOH 추출물	실온	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0
	40°C	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	99.2 ± 1.6	98.7 ± 4.1
	60°C	100.0 ± 0.0	99.4 ± 2.3	98.3 ± 3.7	97.5 ± 3.9
증류수 추출물	실온	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	99.0 ± 0.5
	40°C	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	98.3 ± 5.3	98.6 ± 2.8
	60°C	100.0 ± 0.0	98.8 ± 5.2	97.4 ± 2.6	97.1 ± 5.8
Cascade 증류수 추출물	실온	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0
	40°C	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	99.7 ± 3.6	98.1 ± 6.3
	60°C	100.0 ± 0.0	99.2 ± 4.6	97.5 ± 6.2	97.8 ± 4.7

4) 더덕 추출물의 고형지질나노입자 개발

고형지질나노입자(solid lipid nanoparticles, SLN)는 기존의 콜로이드성 물질 운반체들이 지닌 단점을 배제하고 장점만을 취한 새로운 약제운반체이다. SLN 나노 size로 가공되기 때문에 화장품의 형태로 피부 적용 시 모공 등의 피부부속기관을 통해 침투가 용이할 뿐만 아니라 피부를 통한 확산에도 매우 유리한 수송체로 생각된다. 따라서 본 연구에서는 수용성인 더덕 추출물을 지질매트릭에 탑재하여 나노입자로 가공하는 기술을 개발하고자 한다.

① 시험 방법

더덕 추출물 함유 SLN 제조. 더덕 추출물 함유 SLN 제조를 위해 고형지질로는 Precirol ATO 5 (glyceryl palmitostearate)를 사용하였다. 유화제로는 L- α -lecithin (L- α -phosphatidylcholine)과 폴록사머 188을 사용하였다. Precirol 100 mg과 lecithin 5 mg을 60 °C의 수욕상에서 가온, 용융하고, 동일 온도에서 가온된 폴록사머 188 (5 %)과 더덕의 MeOH 추출물 10 mg을 함유하는 수상을 유상에 가하여 w/o의 조에멀션 상태를 만들고 약 30초간 초음파 유화를 시켰다. 이것을 최외상인 폴록사머 188 2

% 수용액 2 mL에 가하고 다시 1분간 초음파 유회한 후 형성된 w/o/w 에멀션을 상온으로 냉각하여 고휘지질나노입자의 현탁액을 제조하였다. 이 밖에 o/w 에멀션 방법으로도 시료를 제조하였고 디클로로메탄을 사용하여 유상을 제조하고 이것으로 w/o/w 에멀션, 그리고 이 w/o/w 에멀션으로부터 고휘지질나노입자를 제조하여 위의 시료들과 비교를 하였다.

봉입률과 봉입효율. 제조한 더덕 추출물 함유 고휘지질나노입자의 현탁액을 Centrikon T-1170 초원심분리기 (Kontron, Milano, Italy)를 이용하여 100,000 g에서 4 °C를 유지한 상태에서 1시간 동안 초원심분리를 하였다. 상정액을 제거한 후 침전물에 증류수를 부어서 가온하여 녹인 후 - 20 °C 에서 30분간 보관한다. 이 냉각된 용액을 3,500 rpm으로 10분간 원심분리하여 지질성분을 제거한 다음 상정액 중의 더덕 추출물의 농도를 HPLC로 정량하였다. 얻어진 결과를 아래의 식에 대입하여 약물의 봉입률과 봉입효율을 산출하였다.

$$\text{Loading amount} = \frac{\text{Mass of extract}}{\text{Total mass of lipid and extract}} \times 100$$

$$\text{Loading efficiency} = \frac{\text{Mass of extract remained in SLN}}{\text{Total mass of extract initially added}} \times 100$$

입자도 및 입자분포 측정. 제조된 각 시료들의 평균 입자도 및 제타전위 값은 photon correlation spectroscopy에 의해서 측정하였고 여기에 사용된 기기는 Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, 영국)를 사용하였다. 측정시 한 시료마다 5회 반복하여 측정하였다.

② 시험결과

글리신이 봉입된 SLN의 입자 크기 및 제타포텐셜. W/o/w 에멀션 가온용융유회법으로 제조한 SLN의 평균 입자경은 433.34 nm, 0.38의 polydispersity index, 그리고 -23.83 mV의 제타전위값을 갖는 콜로이드성 입자이었다. 또한 o/w 에멀션 가온용융유회법에 따라 제조한 SLN의 평균 입자경은 525.62 nm, 0.36의 polydispersity index 및 -27.68의 제타전위값을

나타내었다. 디클로로메탄을 사용하여 제조된 SLN의 평균 입자경의 경우, 평균입자도, polydispersity index, 및 제타전위값은 각각 325.29 nm, 0.40, -32.64 mV 였다. 제조된 SLN의 평균 입자도 및 분포로 판단할 때 피부에 적용 시 더덕 추출물의 피부 침투를 증대시킬 수 있을 것으로 판단되었다.

<Table 3-2> 더덕의 MeOH 추출물을 함유하는 고형지질나노입자의 입자도와 입자분포 및 제타전위 값. 고형지질나노입자는 가온용융 w/o/w 법에 따라 제조하였다 (Mean \pm SD, n=5).

Preparation methods	Particle size (nm)	Polydispersity index	Zetapotential (mV)
W/o/w emulsion, hot melted	433.34 \pm 36.25	0.38	- 23.83 \pm 6.34
O/w emulsion, hot melted	525.62 \pm 42.31	0.36	- 27.68 \pm 4.76
W/o/w emulsion, solvent melted	325.29 \pm 72.82	0.40	- 32.64 \pm 7.51

봉입률 및 봉입효율. 친수성인 더덕의 MeOH 추출물을 함유하는 고형지질나노입자의 봉입정도를 측정한 결과는 <Table 3-3>과 같다. 더덕의 MeOH 추출물은 수용성으로 수상을 중심에 배열한 w/o/w 유제를 사용했을 때가 수상을 외상으로 사용한 o/w유제에 비해 높은 봉입율을 보여 주었다. 또한 w/o/w 유제를 가온용융하여 제조한 경우보다 유기용매를 사용해 제조한 경우 보다 높은 봉입율을 나타 냈으나 유기용매의 잔류 독성을 감안할 때 w/o/w 유제를 가온용융하여 고형지질나노입자를 제조하는 경우가 수용성인 더덕 추출물을 함유할 경우 보다 유리함을 알 수 있었다.

<Table 3-3> 고히지질나노입자 내로의 더덕 추출물의 봉입량 과 봉입효율 (Mean ± SD, n=5).

Preparation methods	Drug loading amount (%)	Drug loading efficiency (%)
W/o/w emulsion, hot melted	0.96 ± 0.17	9.34 ± 2.16
O/w emulsion, hot melted	0.12 ± 0.03	1.76 ± 0.15
W/o/w emulsion, solvent melted	2.25 ± 0.24	13.12 ± 1.28

5) 더덕 추출물이 탑재된 고히지질나노입자의 크림제 조성 연구 (진행 중)

아토피 치료용 고히능성 향장품은 더덕추출물의 피부면역 조절기능과 향장품 자체의 피부환경 보호기능 및 보습기능을 모두 갖춘 고히능성 화장품 제제를 필요로 한다. 따라서 더덕 추출물의 피부 침투를 돕기 위해 고히지질나노입자 수송체를 설계하였고 이를 피부에 원활하게 전달하면서도 피부환경의 보호기능과 보습기능을 갖추기 위해서는 크림제와 같은 반고형 화장품 제형을 개발하여야 한다. 현재는 더덕 추출물이 탑재된 고히지질나노입자를 함유하는 크림제의 처방 설계가 진행 중이며 본 과제의 1년차 연구 종료시점 이전에 처방설계와 평가가 완료될 예정이다.

(2) 더덕함유 기능성 향장품 제제 개발 연구

1) 연구의 배경

피부에 쉽게 바를 수 있는 적당한 조도의 균질적인 반고형 외용제, 연고제는 기제와 주약으로 이루어지며, 기제는 그 물성에 따라 소수성 기제와 친수성 기제로 나뉜다. 소수성 기제는 유지성 기제라고도 하며 광물성인 것과 동·식물성인 것이 있다. 광물성의 소수성기제에는 바셀린· 파라핀· 플라스틱베이스가 사용된다. 플라스틱베이스는 분자량 2만의 폴리에틸렌을 5%의 비올로 유동 파라핀에 섞어서 가열하여 겔화한 것이다. 동·식물성 기제에는 식물유·목랍·밀랍 등의 납 류와 쇠기름· 돼지기름 등이 원료로서 사용된다. 가장 유명한 것이 단연고인데 식물유와 밀랍을 혼합하거나 가열하여 만든다. 친수성 기제에는 유제성 기제와 수용성 기제가 있다. 유제성 기제에는 수중유형 (oil-in-water) 즉 바니싱 크림형과 유중수형 (water-in-oil) 즉 콜드 크림형의 2가지 종류가 있다. 수중유형의 예가 친수연고이고, 유중수형의 예가 흡수연고이다. 또한 유중수형에는 전혀 물을 함유하지 않은 기제에 수성물질을 가하면 유제성이 되는 것과 처음부터 물을 함유하고 있는 것의 2가지로 나눌 수 있다. 물을 전혀 함유하지 않은 친수성기제에는 친수바셀린· 정제 라놀린 등이 있고, 물을 함유한 것에는 흡수연고 외에 가수라놀린· 친수플라스틱베이스 등이 있다. 수용성기제는 물에 쉽게 녹는 것으로 마크로콜 연고가 그 예이다. 마크로콜은 폴리에틸렌글리콜이라 하며, 분자량이 작은 것 (200~700)은 액체이고 큰 것 (1000 이상)은 고체이다. 마크로콜 연고는 고체인 마크로콜 4000과 액체인 마크로콜 400을 똑같은 양으로 혼합하고, 45℃에서 가열하여 녹인 후 저어서 냉각해 만든 것이다. 그 밖에 무지방성 연고기제가 있다. 무기성으로는 벤토나이트· 비감, 유기성으로는 트라가칸트· 알긴산나트륨· 메틸셀룰로오스· 카르복시메틸셀룰로오스 등이 있는데, 물 또는 다른 액체로 팽윤시켜 연고 모양의 조도를 갖게 겔화한 것이다. 그러나 이것들은 곰팡이나 세균에 오염되기 쉬우며 연고제의 선택은 경피 흡수를 이용하느냐, 국소작용을 이용하느냐에 따라서도 달라진다. 또한 피부에 대한 연고기제의 작용으로 기제에 의해 피부를 보호해줄 뿐만 아니라 피부의 점찰 작용을 한다. 외부의 온도 변화에 따라 피부를 냉각시키며, 약물을 운반하는 가장 매개가 되며 이를 통하여 경피흡수를 도와 흡착 작용을 한다.

지금껏 더덕추출물에 관한 다양한 연구가 진행되어왔으나, 식품 분야에서 많은 연구를 진행하였을 뿐 피부 관련 분야의 연구는 미미한 편이다. 더덕추출물의 멜라닌 생성 억제 효과에 관한 연구를 찾아 볼 수 있으며, 이밖에도 더덕추출물이 아토피 피부염의 치료에 있어서도 가능성을 제공할 수 있음이

밝혀 지고 있다. 아토피 피부염의 치료에 있어 약물의 국소 적용은 그 효능이 입증되었으며, 직접 치료부위의 적용은 경구 투여에 비해 높은 전달율 및 높은 농도로 약물을 전달할 수 있다는 장점을 가지고 있다. 더덕의 추출물을 함유하는 화장품 제형을 개발함에 있어 화장품 제제로부터 더덕추출물의 방출은 더덕의 피부에 대한 효능을 좌우하는 가장 중요한 인자가 된다. 화장품 제형, 특히 피부에 가장 적용이 용이한 반고형 제형으로부터 더덕추출물의 방출은 반고형제형의 조성, 더덕추출물의 용해도, 유제의 입자 크기, 물의 함량 등 많은 요인에 의해 영향을 받을 것으로 판단된다. 특히 제형 및 그에 따른 추출물의 용해도는 화장품 제제에서 추출물의 방출에 가장 큰 요인이 될 것으로 생각된다. 따라서 본 연구는 이를 바탕으로 더덕추출물을 이용하여 아토피 화장품으로써의 여러 제형을 설계하고 이에 따른 방출 특성을 평가하여 더덕추출물을 가장 용이하게 방출시킬 수 있는 반고형화장품 조성을 얻게 되었다. 이러한 더덕추출물의 방출특성 평가를 통해 더덕추출물 함유 화장품 개발에 있어서 가장 적합한 제형을 선정할 수 있었다.

2) 실험방법

① 더덕 추출물의 용해도 평가

더덕추출물의 용해도를 평가하여 아래의 실시예에서 얻어진 방출실험결과와 비교평가하여 최적의 방출효율을 갖는 외용제를 설계하고자 하였다. In vitro 방출시험에서 적절한 시험액을 선정하기 위해서 용매는 정제수, 에탄올, 아세트니트릴, 메탄올로 하여 용해도를 측정하였다. 시험액에 과량의 더덕추출물을 넣어 진탕교반하고 12시간 후에 시험액을 여과하여 더덕 추출물의 용해도를 자외가시부흡광광도계로 평가하였다.

② 더덕 추출물의 정량을 위한 자외가시부흡광광도계를 이용한 검량선의 작성
가장 용해도가 높은 용매를 선정하여 더덕추출물에 용해시켜 농도별(100ppm, 200ppm, 400ppm)로 희석시킨 뒤, 검출 파장을 240nm로 하여 각 농도를 바탕으로 UV 분석을 통해 검량선을 작성하였다. 이는 각각 5번씩 측정하고 그 평균값을 기준으로 하였다. 검량선은 X축을 약물의 농도 (Conc.), Y축을 흡광도의 값으로 계산하여 작성하였다.

③ 더덕추출물 함유 반고형 향장제의 제조

다양한 용해성을 갖는 크림 제제로부터 더덕추출물의 방출 특성을 평가하기 위하여 4가지의 크림을 제조하였다. (O/W 크림, W/O 크림, 친수성 크림, 친유성 크림) 모두 더덕추출물의 함량은 3% (w/w)로 고정하였으며, O/W 크

림, W/O 크림, 친수성 크림, 친유성 크림의 제조방법은 다음과 같다.

O/W 크림. O/W 크림은 Table. 1의 처방에 따라 제조하였다. 폴리글리세릴-3-메틸글루코스디스테아레이트, 스테아린산, 세탄올 및 유동 파라핀을 처방에 따라 넣고, 65℃에서 가온하여 유상을 제조하고 글리세린, 정제수, 더덕추출물을 넣고 65℃에서 가온하여 완전히 용해시켜 수상을 제조하였다. 같은 온도에서 유상을 수상에 가하고 homogenizer를 사용하여 수분간 유화시킨 후, 냉각하여 O/W 크림을 제조하였다.

Table.3-4 Formulation of O/W cream

Ingredients	Formulation(%)
Polyglyceryl-3-methylglucose distearate	3
Stearic acid	5
Cethyl alcohol	2
Mineral oil	7
Glycerin	10
Water	73

W/O 크림. W/O 크림은 Table 2의 처방에 따라, 더덕추출물을 65℃에서 용해시킨 수상을 세스퀴올레인산소르비탄, 트윈 80, 유동 파라핀, 백색 바셀린 및 세탄올을 처방에 따라 65℃에서 완전히 용해시킨 유상에 넣고, homogenizer를 사용하여 수분간 유화시켜 W/O 크림을 제조하였다.

Table.3-5 Formulation of W/O cream

Ingredients	Formulation(%)
Sorbitan sesquioleate	4
Tween 80	6
Paraffin liquid	8
Vaseline	12
Cethyl alcohol	20
Water	50

친수성 크림. 친수성 크림은 Table 3의 처방에 따라 제조하였다. 폴리에틸렌 글리콜 400, 폴리에틸렌글리콜 4000을 70℃에서 가온하여 완전히 용해시킨 후, 더덕추출물이 용해된 수상을 같은 온도에서 폴리에틸렌 혼합물에 가한 다음 충분히 교반하였다. 30℃로 냉각시키면서 응고될 때까지 교반을 계속하여 친수성 크림을 제조하였다.

Table.3-6 Formulation of Hydrophilic Cream

Ingredients	Formulation(%)
Polyethylene glycol 400	60
Polyethylene glycol 4000	30
Water	10

친유성 크림. 친유성 크림은 Table 4의 처방에 따라 제조하였다. 백색바셀린을 70℃에서 가온하여 완전히 용해시키고, 더덕추출물이 분산된 유동파라핀을 70℃에서 용해시킨 후, 백색 바셀린에 가하여 충분히 교반하였다. 30℃로 냉각시키면서 응고될 때까지 교반을 계속하여 친유성 크림을 제조하였다.

Table.3-7 Formulation of Lipophilic Cream

Ingredients	Formulation(%)
Vaseline	90
Paraffin liquid	10

④ 더덕추출물 함유 반고형 향장제로부터 더덕추출물의 in vitro 방출 실험

외용제제의 약물방출 및 경피 흡수를 평가할 때는 mouse 및 rat 등의 적당한 동물의 피부를 이용하거나 실제 피부와 유사한 성질을 가진 여러 합성 고분자막들을 확산막으로 대개 이용하고 있으며, 특히 합성 고분자막으로써 반투막을 이용한 in vitro 확산 실험이 약물의 방출 실험에 자주 사용되었다. 따라서 본 실험에서는 이상에서 제조한 더덕추출물을 함유하는 크림제제(O/W 크림, W/O 크림, 친수성 크림, 친유성 크림)로부터 더덕추출물의 방출율을 본 실험실에서 개발한 Immersion 방법을 통해 평가하였다. 더덕추출물

이 지속적으로 방출이 되는지와 방출율을 평가하기 위하여 시료의 채취 시간을 4시간까지로 하였다. 인산염 완충액 제조를 용이하게 하기 위해 phosphate buffer tablet을 사용하여 100 ml정제수에 1정을 넣어 20 Mm의 인산염 완충액을 제조하였다. 원통형의 폴리프로필렌 튜브 (3.2cm직경, 11.5cm길이)를 사용하여 shaking incubator에서 더덕추출물의 방출을 측정하였다. 각 처방의 크림을 투석막에 넣고 양끝을 weighted closures로 밀봉하여 pH 7.4등장 인산염 완충액 50 ml로 채운 원통형의 폴리프로필렌 튜브에 넣고, 지속적으로 방출되는지를 평가하기 위해 0.5, 1, 2, 3, 4시간마다 1ml의 방출 매질을 채취하여 0.45 μ m크기의 시린지 필터로 여과하고 이를 4°C에 보관, 자외가시부흡광광도계를 이용하여 분석하였다. Shaking incubator를 이용하여 50rpm으로 교반하면서 온도를 $37\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 로 유지시킨 뒤 정해진 시간마다 sample을 채취하였고, 매회 채취 시 동량의 매질을 보충해 주었다. 검출파장은 최대 피크파장인 240 nm에서 분석하였다. 같은 실험을 세 번 반복 실험하여 결과를 구하였다. 아래의 그림은 본 실험에 사용한 실험장치의 모식도이다.

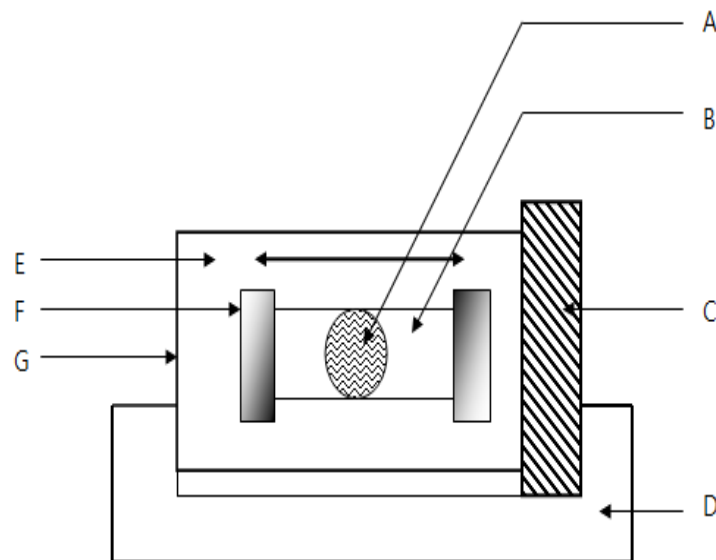


Fig..3-3 Experimental set up of the immersion method used for Codonopsis extract release

- A: cream formulation,
- B: dialysis membrane, C: sieve, D: shaking incubator,
- E: phosphate buffer solution, F: weighted closure,
- G: polypropylene cylindrical tube.

3) 결과 및 고찰

- ① 더덕 추출물의 정량을 위한 자외가시부흡광도계를 이용한 검량선의 작성 실험의 정확성을 기준으로 평가하기 위하여 각각 네가지 제형의 방출실험을 시작하기에 앞서 100, 200, 및 400 µg/ml 각 농도에 따른 검량선을 측정하였다. 검량선 측정 결과 R^2 값은 0.9993으로 나왔고 양호한 직선모양을 나타내었다. 이 검량선은 추후 방출 실험에서 나온 전체 함량 (%) 계산에 사용하였다.

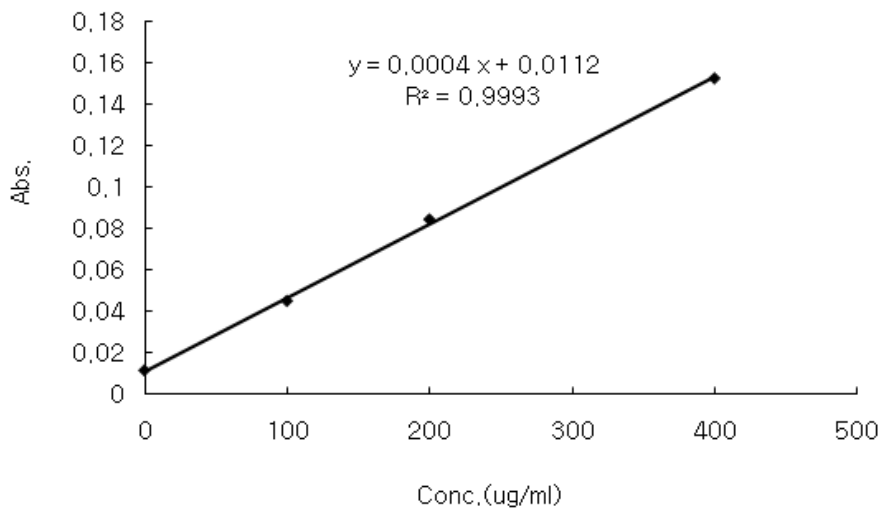


Fig..3-4 Calibration curve of standard solutions of *Codonopsis lanceolata* extract

- ② 더덕 추출물의 용해도 평가

본 연구에서 더덕추출물과 기제 성분간의 혼합 적합성을 평가하기 위하여 정제수, 에탄올, 아세토니트릴 그리고 메탄올에 더덕추출물을 용해시켜 보았다. 그 결과 더덕 추출물은 정제수에서 가장 용이하게 용해되는 것을 알 수 있었다. 나머지 용매에서는 부유물이 보였으며, 이를 토대로 더덕추출물이 수상층에서 추출한 과정을 보아 수용성 물질임이 확인되었다. 정제수에서의 용해도는 다량의 더덕추출물을 용해 시켰으며 정제수 1 ml에 약 0.5 - 1 g 이상의 더덕추출물을 용해시킬 수 있었다. 따라서 물을 함유하는 기제의 경우에는 더덕추출물을 물에 용해시키고, 유성기제와 같이 물을 함유하지 않은 기제에는 유성성분에 더덕추출물을 분산시켜 시료를 제조하였다.

- ③ 더덕추출물 함유 반고형 향장제로부터 더덕추출물의 in vitro 방출 실험

각 처방에 따라 제조된 3% 더덕추출물 함유 크림제를 투석막에 넣고 양끝을 weighted closures로 밀봉하여 폴리프로필렌 튜브 속에 넣고 인산염 완충액에 완전히 잠기게 한 후, 투석막을 통한 더덕추출물의 방출량을 측정하였다. Immersion법은 크림제가 완전히 방출 매질에 잠겨 있기 때문에 방출에 이용되는 매질의 이용률이 크며, 수용성인 더덕추출물이 방출 매질이 이용도에 따라 각 크림제로부터 방출량을 평가할 수 있었다. Franz diffusion cell을 이용해 제한적으로 방출매질을 이용할 수 있는 조건에서도 더덕추출물을 함유하는 반고형 향장제제의 방출율도 평가를 해 보았으나 제한된 방출매질의 이용률로 인하여 시험대상인 각 반고형 향장제제의 방출률 간에 있어서의 우열을 판단할 수 없었다. 따라서 본 연구자들은 이를 극복하기 위해 위에서 설명한 실험방법을 개발하여 시험제제의 방출율을 평가하였다.

더덕추출물을 함유한 각 4가지 제형의 크림의 방출량 측정 결과, 친수성 크림, O/W 크림, W/O 크림, 친유성 크림의 순서로 방출실험 시작 4시간 후 약 74%, 44%, 24%, 18%의 방출량을 나타내었다. O/W cream의 방출 양상을 비율로 그래프화하여 평가한 결과, 30분에서는 15%, 60분에서는 26%, 120분에서는 41%, 180분에서는 45%의 방출량을 보였으며, 240분에서는 비슷한 수치인 44%를 보였다. W/O cream의 방출량은 30분에서는 6%, 60분에서는 11%, 120분에서는 18%, 180분에서는 22%를 보였으며 240분에서는 비슷한 수치인 24%를 보였다. 약 20%정도의 방출량을 나타내므로 O/W cream에 비하여 절반가량의 방출량을 나타내었다. 친수성 크림의 방출 양상을 살펴본 결과, 30분에서는 7%, 60분에서는 18%, 120분에서는 30%, 180분에서는 41%의 방출량을 보였으며, 240분에서는 74%의 방출량을 보였다. 1시간경과 후, 방출량이 증가하면서 3시간 경과 후 급속도로 방출량이 증가함을 알 수 있었으며, 대체적으로 시간이 지날수록 증가되는 다소 빠른 방출을 나타냈고, 4시간 이후로 지속적인 방출이 일어날 것으로 예상하였다. 친유성 크림의 방출은 30분에서는 1%, 60분에서는 9%, 120분에서는 11%, 180분에서는 14%, 240분에서는 18%의 방출량을 나타내었다.

더덕추출물은 추출 과정에서 살펴보니, 용해도 평가 결과에서 보여진 것과 같이 물에 잘 녹는 수용성 물질이기 때문에 더덕추출물이 함유된 연고기제 중에서 더덕추출물의 수용성을 포함할 수 있는 영역을 가진 크림기제가 방출에 유리한 것을 실험을 통해 확인하였다. O/W cream과 친수성 크림의 추출물 방출 양상을 비교해 볼 때, 친수성 크림은 지속적인 증가를 보이는 반면, O/W cream은 약 2시간 정도까지는 증가 양상을 보이나 2시간 이후의 방출량은 시간이 지날수록 유사한 결과를 보였다. 친수성 크림의 급격한 증가 양상을 보이는 것은 방출 실험 시작 후 친수성 크림이 액화된 것이 원인이라

생각된다. 또한 immersion법의 경우 방출 매질과의 접촉면적 및 방출 매질의 양이 각 제형들의 용매 이용률을 증가시켜 더덕추출물의 방출량을 많이 나타낸 것이라 생각된다. 친유성 크림의 경우, 약물의 기체에 대한 용해도가 낮아 더덕추출물이 녹지 않은 상태로 분산되어 기체 내에 존재하고 그 결과 기체와 용질 사이에 낮은 농도 구배가 형성되어 추출물의 방출이 낮은 것으로 사료된다.

그리고 W/O cream 또한 O/W cream과 유사한 점차 증가 양상을 보이거나 소량의 증가 추세를 보이고 가장 방출량이 높은 친수성 크림에 비하여 절반 정도의 방출량을 나타내었다. O/W cream과 W/O cream의 경우, 모두 더덕추출물이 수상에 용해되어 있지만 매우 큰 방출 양상의 차이를 보이는 원인은 O/W cream은 더덕추출물이 수상에 존재하여 수상 조성물들이 물에 잘 녹아 확산층으로서의 기능을 하고 물의 침투가 용이하지만, W/O cream의 경우 수상에 더덕추출물이 용해되어 있지만 기체로부터 방출을 하기 위하여 유상을 통과하는 과정이 필요하게 된다. 따라서 제형의 차이에 따라 유상이 확산층으로 작용하여 방출을 억제하는 기능을 하였다. 유상의 경우 물에 용해되지 않아 물의 침투가 용이하지 않게 되며 낮은 방출량을 보이는 것이며, 이에 따라 두 제형사이에 방출 양상의 차이를 보이는 것으로 생각된다.

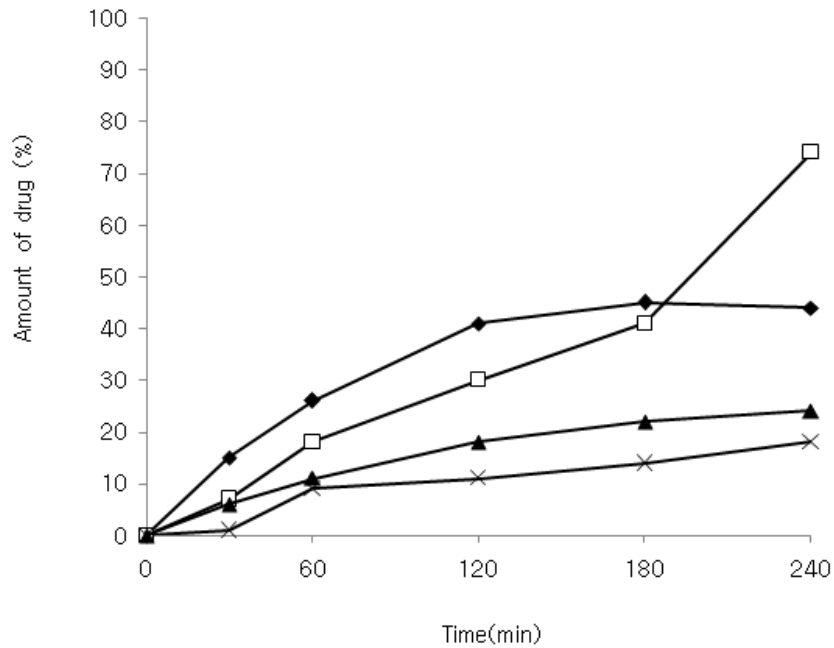


Fig.3-5 Release profile of Codonopsis extract from various semisolid cosmetic preparations totally immersed in phosphate buffer solution.

◆: O/W cream, ▲: W/O cream, □: Hydrophilic cream, X: Lipophilic cream.

4) 결론

이상의 결과를 종합해 볼 때 더덕추출물의 피부 전달에 있어 가장 중요한 전제가 되는 기체로부터의 방출율을 평가한 결과 수용성 환경이 외상 (external phase)이 되는 O/W 크림 기체와 친수성 고분자 물질들로만 이루어진 친수성 기체가 가장 우수하였다. 이중에서도 특히 O/W 기체는 신속하고도 지속적으로 더덕추출물을 방출할 수 있었기에 더덕추출물을 가장 효율적으로 피부에 전달 할 수 있는 기체라고 생각된다.

5) 연구진행 상황 및 향후계획.

향장제형 중에서 가장 편리하게 기능성 성분을 피부로 전달할 수 있는 반고형 기체 이외에도 현재 팩제의 제형설계에 관한 연구가 진행 중에 있고 제제 조성 연구가 완료되면 팩제에 대해 특허출원을 진행할 예정이다. 이를 통해 결과적으로 (1) O/W 크림기체를 기반으로하는 일반 화장품 제형과, (2) 고농도로 더덕추출물을 함유시킬 수 있는 수용성 기체를 기반으로하는 에센스 화장품 제형, (3) 그리고 피부에 수분을 공급해 주고 더덕추출물의 유효성분을 오랫동안 전달할 수 있는 팩제의 조성을 확보하여 이들 3종의 화장품 제형의 산업화 기반을 3차년도에 마련할 예정이다.

(3) 기능성 향장품의 생산기술 확립

1) 당해 연도 연구의 배경

본 연구에서 1, 2차년도 연구를 통해 개발된 더덕추출물 함유 O/W 크림제 및 외용 에센스제 및 팩제의 제형화 연구를 수행하고 그 제조공정을 수립하고자 하였다. 더덕추출물의 용해성, 안정성 등이 각 화장품 제형에 큰 영향을 미치므로 이전 연구결과에서 더덕추출물의 물성을 제조공정 수립 시 참고하였다.

본 과제에서 수득한 더덕추출물은 수용성이고 물에서는 물 1 ml에 1g 이상의 더덕추출물이 용해될 만큼 수용성이 크다. 따라서, 더덕 추출물 함유 제형 개발 시 물을 함유하는 제형은 더덕추출물의 제형화에 필수요소라고 판단되었다. 당해 년도에는 물을 외상으로 함유하는 O/W 크림제와 주로 물을 기제로 사용하는 에센스 제형, 그리고 피부보습과 아토피피부염 부위에 장시간 더덕추출물을 전달하기 위한 수단으로 팩제를 설계하였다. 이상 3종의 화장품 제형의 실험실적 처방을 확립하였고 대량생산에 적합한 제조공정을 적용하여 제조공정을 수립하였다. 본 과제가 마무리되는 3년차 연구가 종료되는 시점에서 Scale-up을 통한 시험생산을 완료하고 시제품을 생산할 예정이다.

2) 실험방법

① 크림제의 제조방법 및 처방조성 확립

유제형 크림의 일반적인 제조방법은 유화과정과 용해 과정을 포함하고 있다. 일반적으로 wax 등 물과 혼화가 곤란한 성분은 약 70 ~ 75℃의 증기욕에서 용해한다. 반면 열에 안정한 수용성 성분은 일정량의 정제수로 수용액으로 하여 유성성분의 같은 온도로 가열한다. 다음에 수용액을, 용해하고 있는 유성혼합물에 서서히 교반하면서(보통, 기계적으로) 가한다. Wax의 결정화를 방지하기 위해 온도는 그대로 5 ~ 10분 방치한 후 서서히 혼합물이 굳기까지 교반하면서 냉각한다. 이 과정을 주요 공정 단계별로 나타내면 다음과 같다.

a. 용해

수용성 기제 일정량에 더덕 추출물을 가해 용해시키고 이를 수상으로 사용하였다. 본 연구에 사용한 더덕 추출물은 수용성 이므로 상당한 양의 더덕추출물을 크림제에 함유시킬 수 있었으나 최종 더덕추출물의 농도는 1%로 조정하였다.

b. 용융

용점이 다른 기재원료를 용융시킬 때 고융점 물질로부터 순차적으로 저융점 물질을 녹이든가 또는 거꾸로 행하지만 전성분을 동시에 녹이는 편이 용융완료시간이 짧게 걸린다. 일반적으로 용융 후 냉각할 때 교반을 약하게 하고 온도를 서서히 내린다. 교반이 심하면 기재 중에 공기가 혼입되고 경시적으로 산패의 원인이 된다. 또 불균일하게 공기가 혼입되면 기재의 비중치가 변동되고 충전량 변동의 원인이 된다.

c. 유화

계면활성제를 외상에 가한 후 유상을 수상에 가하여 크림제를 형성하기 위한 유화공정을 수행하였다. 유화가 진행된 후 유제를 실온으로 냉각하여 크림제의 형성을 완료하였고 미리 정한 분량만큼 용기에 분할하여 포장하였다.

② 에센스제의 제조방법 및 처방조성 확립

에센스의 형태는 기존 화장품 제형을 검토해 볼 때 다양하다고 볼 수 있지만 제형학적으로는 화장수 또는 유액이 가장 일반적인 형태라고 생각된다. 또한, 에센스의 특성상 사용후의 촉촉함과 산뜻함 등을 요구하는 경우가 많기 때문에 수용성 고분자 (예를 들면, 폴리에틸렌글리콜 300, 400, 1500, 4000, 글리세린, 솔비톨, 말티톨, 히아루론산, 콘드로이틴산, 콜라겐, 엘라스틴, 피롤리돈카르본산 등)를 함유하는 경우가 많다.

③ 팩제의 제조방법 및 처방조성 확립

팩(pack)제는 화장품 제형의 하나로 얼굴뿐만 아니라 목, 어깨, 팔, 다리 등의 피부 일정 부위나 전신의 도포를 위해 사용할 수 있다. 팩제는 필-오프형, 닦아내는 제형, 고화 후 박리하는 제형, 및 도포형 제형 등이 있다. 본 연구에서는 부직포에 수용성인 더덕추출물 사포닌분획 함유 겔을 도포한 부직포겔 도포타입의 팩제를 설계하였다. 이러한 제형은 부직포를 덮고 있는 겔의 성질의 따라 사용성이 좌우되는데, 더덕추출물 사포닌분획은 수용성이 크기 때문에 수용성 고분자의 수화된 겔에 용이하게 흡수시킬 수 있어 본 연구에서는 수용성 겔 기반 부직포겔 팩제를 최종 제형으로 선정하였다.

3) 실험결과 및 고찰

① 크림제의 제조방법 및 처방조성 확립

수회의 실험실적 처방 연구를 통해 수립한 크림제의 조성을 아래의 <Table 3-8>에 나타내었다.

<Table 3-8> 더덕추출물 함유 O/W 크림의 조성

Ingredients	Formulation(%)
Polyglyceryl-3-methylglucose distearate	3
Stearic acid	5
Cethyl alcohol	2
Mineral oil	7
Glycerin	10
Water	73
향료	적량

또한 상기의 제조처방을 생산하기 위한 제조공정도 아래의 Fig. 3-6에 나타내었다. 폴리글리세릴-3-메칠글루코스디스테아레이트, 스테아린산 (기제 1)을 처방량에 따라 가한 후 67°C에서 가온하여 기제 1의 유상을 제조하였다. 또한 세탄올 및 유동 파라핀 (기제 2)을 처방에 따라 넣고 믹서로 세탄올을 용해하고 67°C로 가온하였다. 이 두 종류의 기제를 혼합한 후 따로 글리세린과 정제수에 용해한 더덕추출물을 넣고 70°C에서 가온하여 완전히 용해시켜 수상을 제조하였다. 같은 온도에서 유상을 수상에 가하고 호모믹서를 사용하여 1시간 동안 유화시킨다. 유화가 완료되면 감압장치를 연결하여 제조공정 중에 유입된 공기를 제거한 후 약 37°C로 냉각하여 최종적으로 더덕추출물 사포닌 분획 함유 크림을 제조하였다.

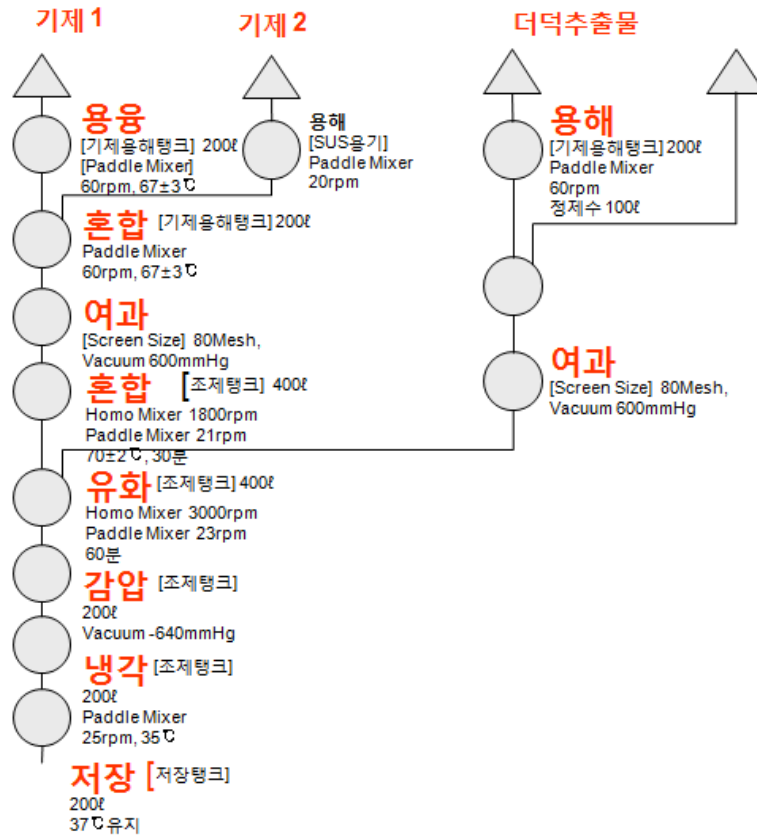


Fig. 3-6 더덕추출물 사포닌분획 함유 크림제형의 제조과정 흐름도

② 에센스제의 제조방법 및 처방조성 확립

본 연구실에서 정립한 더덕추출물 사포닌분획 함유 에센스제의 기본 처방을 <Table 3-9>에 나타내었고 그 제조과정을 Fig. 3-7으로 표시하였다.

<Table 3-9> 더덕추출물 함유(1%) 에센스 제형의 조성

Ingredients	Formulation(%)
Sorbitol	8
Polyethylene glycol 1500	7
Xanthan gum	0.5
Ethanol	7
Olive oil	0.5
Water	77
향료	적량

정제수에 더덕추출물 사포닌분획을 용해 시키 후 별도의 용기에, Sorbitol, Polyethylene glycol 1500, Xanthan gum, Ethanol 및 Olive oil을 혼합, 용해 하여 기제를 제조한다. 이러한 기제에 더덕추출물 사포닌분획 용액을 혼합한다. 최종 혼합액을 여과한 후 실온에서 포장 전까지 보관한다.

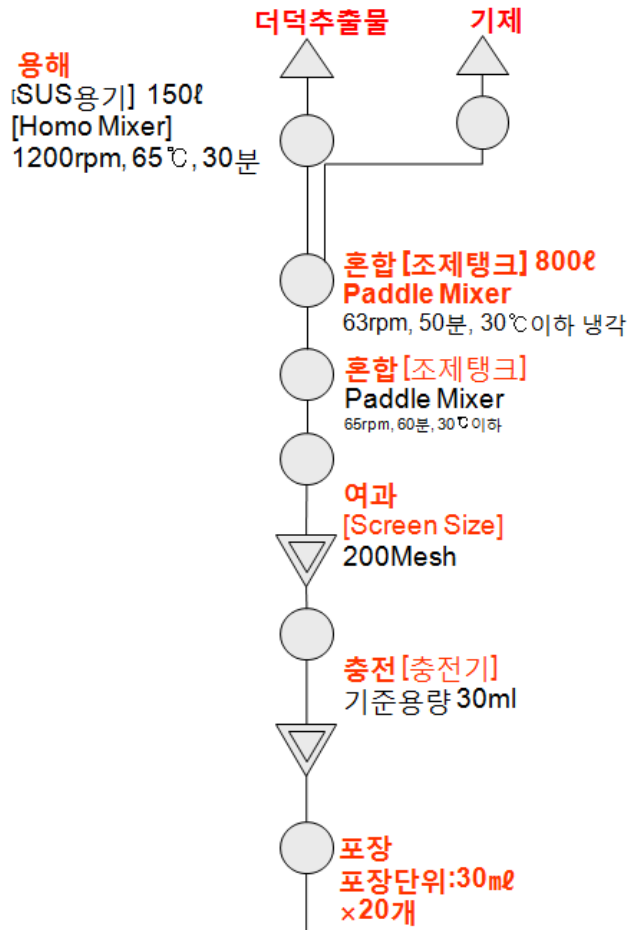


Fig. 3-7 더덕추출물 사포닌분획 함유 에센스 제형의 제조공정 흐름도

③ 팩제의 제보방법 및 처방조성 확립

본 연구실에서 정립한 더덕추출물 사포닌분획 함유 팩제의 기본 처방을 <Table 3-10>에 나타내었고 그 제조과정을 Fig. 3-8으로 표시하였다.

<Table 3-10> 더덕추출물 함유 팩 제형의 조성

Ingredients	Formulation(%)
Polyethylene glycol 1500	5
Sorbitol	5
Carboxyvinylpolymer	6
Potassium hydroxide	1
Xanthan gum	5
Water	78
향료	적량

정제수에 Polyethylene glycol 1500, Sorbitol, Carboxyvinylpolymer, Xanthan gum, 더덕추출물 사포닌분획을 용해 시킨 후 Potassium hydroxide를 가하여 더덕추출물함유 사포닌 분획의 겔을 제조한다. 제조된 겔에 향료 적량을 가한 후 더덕추출물 사포닌 분획 겔을 부직포에 적량씩 도포하여 팩제를 제조한 후 포장한다.

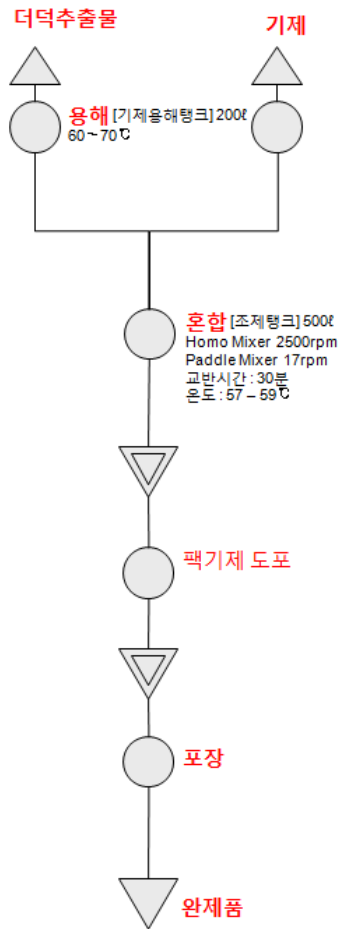


Fig. 3-8 더덕추출물 사포닌분획 함유 팩 제형 제조공정 흐름도

제 4 장 목표 달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1절. 1차년도 목표달성도

평가의 착안점	자 체 평 가
Th2 분화조절능 평가 및 T세포분화유도 세포의 기능조절 평가 (제 1세부)	<ul style="list-style-type: none"> - T세포의 분화조절 평가 달성 - 분화유도 세포의 기능조절 평가 달성
T세포/수지상세포 기능 억제평가용 분획조제 및 T세포/수지상세포 기능 억제성분 분석여부 (제 2 세부)	<ul style="list-style-type: none"> - 억제 분획조제와 활성 분획선별 달성 - 억제분획 성분 분석 달성
기능성 신소재의 실험실적 예비제제의 처방 설계 완료 (제 3 세부)	- 기능성 신소재의 나노수송체 처방을 완료하였고 이를 크림제 제형으로 개발하기 위해 조성연구가 진행 중이며 3월 말까지 크림제의 처방 설계가 완료될 예정입니다.

제 2절. 2차년도 목표달성도

평가의 착안점	자 체 평 가
더덕 분획에 의한 알리지 유도 화학물질 및 사이토카인 분비억제효과 평가 유무 (제 1세부)	<ul style="list-style-type: none"> - 세포로부터 분비되는 화학물질 및 사이토카인은 알리지 반응을 유도하는 핵심적 역할을 하므로 중요한 평가 요인임. - 따라서 비만세포에서 및 대식세포에 의해 분비되는 화학물질과 사이토카인의 분비능을 측정하였음. - 그 결과 더덕 분획에 의해서 대식세포에 의해 생성되는 화학물질과 사이토카인 분비능이 효과적으로 억제되었음. 그러나 비만세포에 의해 분비되는 화학물질인 히스타민의 분비능 조절에서는 큰 효과를 나타내지 못함.
비만세포/대식세포 기능 억제평가용 분획조제 및 억제성분 분석여부 (제 2세부)	<p>더덕의 주요 성분인 항알리지/항아토피/항염 성분인 사포닌 성분들에 대한 분석법 및 분획방법을 확립하였고, 이들 분획을 조사포닌 분획 형태로 추출완료 하였음</p>
더덕함유 기능성 향장품 제형 1종 확보 (제 3세부)	<ul style="list-style-type: none"> - 향장기제로부터 더덕추출물의 방출은 더덕추출물이 피부로 전달되기 위한 가장 우선적이고도 중요한 전제조건이 됨 - 따라서 반고형인 더덕추출물 함유 향장기제로부터 더덕추출물의 방출을 평가하였고 그 결과 반고형의 향장기제 2종을 확보하였음 - 현재 이상의 결과를 특허출원 중에 있으며, 크림제 이외에도 팩제에도 이 결과를 적용하여 팩제를 설계 중에 있음

제 3절. 3차년도 목표달성도

평가의 착안점	자 체 평 가
동물실험 및 예비임상 실험 연구 (제 1세부)	<p>더덕 유래의 사포닌 성분을 이용하여 동물 실험 및 예비 임상 실험을 한 결과, 동물 실험에서 PGE2에 의한 염증반응을 억제하는 결과를 얻을 수 있었다. 또한 알러지성 접촉성 피부염의 회복효과를 얻을 수 있었다. 예비 임상 실험의 경우 인체에 단기적 그리고 장기적으로 처리했을 때 부작용이 없음을 확인하였으며, 아토피 질환 환자에게 처리했을 때 그 증상이 치료됨을 확인하였다.</p>
항알러지/항아토피 활성물질 분리정제 공정 최적화 유무 (제 2세부)	<p>더덕유래 항알러지/항아토피 활성물질의 분리정제 방법에 사용된 효능을 갖는 단일물질 분리방법을 다른 생리활성 천연물에도 적용하여 활성물질 탐색과 분리정제에 이용.</p> <p>더덕유래 항알러지/항아토피 활성물질의 분리 정제시 최적생산 및 분리정제 공정기술을 이용하여 적은비용으로 더덕에서의 활성물질을 고순도 고수율로 생산해 낼수 있음.</p>
더덕유래 기능성 향장품의 생산기술 확립 (제 3세부)	<p>본 협동연구과제를 통해 더덕추출물 사포닌 분획 함유 기능성 향장품 제형 3종, 즉, 크림제, 에센스제 및 팩제의 최종 제조처방 및 제조공정을 확립할 수 있었으며 스के일업 제조연구를 통해 시작품 3종을 제조하였다.</p>

제 4절. 관련분야에의 기여도

1. 실험적 측면

: 본 연구 결과에서 얻어진 실험결과는 관련 연구시 대조군으로 사용될 수 있음.

: 본 실험을 통해 확보된 연구결과는 그 동안 증명되지 않았던 더덕이 갖는 효능들에 대한 과학적 증거로 사료됨.

: 따라서 이를 이용한 더덕의 효능자료 작성이 가능

: 본 연구를 통해 확립한 기술들을 타 유사분야 연구에 적용 가능

: 사포닌 함유 향장제품 개발 기술은 향후 추출물 함유 향장제품 개발연구시 적용 가능

2. 경제적 측면

: 더덕 사포닌 함유 추출물을 이용한 향아토피 향장제품 개발은 향후 관련 아토피 관련 산업의 발전을 유도할 것으로 판단됨

: 더덕 사포닌 성분의 대량 생산 기술 확립을 통해 이들의 원료 생산시 적용 가능

: 더덕 사포닌 함유 향장제품 개발은 향후 더덕 농가의 수입증대에 기여할 것을 판단됨

3. 사회적 측면

: 효과적인 향아토피 제품 개발은 향후 아토피로 인해 고통을 앓고 있는 환자들의 삶의 질 향상에 기여할 것으로 판단됨

: 환자들이 갖는 고통 부분에 대한 사회전체적인 부담이 경감될 것으로 판단됨

: 전통의학적으로 사용되어 오던 더덕의 효능평가 기술 확립은 향후 관련 대체의학 산업의 발전에도 크게 기여할 것으로 판단됨.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1절. 연구성과

1. 논문게재 성과

게재 연도	논문명	저자			학술지명	Vol. (No.)	국내외 구분	SCI 구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2007 · 05.3 0	Immunomodulatory effects of <i>Codonopsis lanceolata</i> extracts on macrophage functions.	이용규	조재열	김주영, 이지연, 변세은, 홍억기, 이재휘, 이만휘, 박화진	Journal of Ethnopharmacology	112 (1), 180-188	국외	SCI
2009 · 04.0 1	Regulatory effects of <i>Codonopsis lanceolata</i> on gene expression of GM-CSF in macrophage-like cells.	변세은	조재열	변세은, 이용규, 조재열	Journal of Ethnopharmacology	123(1) 185-189 (2009)	국외	SCI
2009 · 04.3 1	Inhibitory effect of saponin fraction from <i>Codonopsis lanceolata</i> on immune cell-mediated inflammatory response.	변세은	조재열	변세은, 최완수, 홍억기, 이재휘, 이만휘, 조재열	Archives of Pharmacal Research	2009년 4월 31일 출판 예정	국내	SCIE

2. 특허 성과

출원된 특허의 경우					등록된 특허의 경우				
출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호	등록연도	특허명	등록인	등록국	등록번호
2008.02.22	국소 적용을 위한 더덕 추출물 조성	중앙대학교 (이재휘, 조재열, 홍역기, 정소영)	대한민국	10-2008-15827					
2008.12.26	조혈모세포 증식을 갖는 더덕의 부탄올 분획을 함유하는 건강식품 조성물	강원대학교 산학협력단(조재열, 변세은, 이용규, 홍역기)	대한민국	10-2008-0134155					
2009.04.24	더덕 추출물 또는 더덕 사포닌 분획을 포함하는 발모 또는 양모 촉진용 조성물	강원대학교 산학협력단(조재열, 김민호, 홍역기, 이재휘, 이용규, 변세은, 홍역기)	대한민국	명세서 작성 완료 출원 예정					
2009.04.24	더덕 추출물 또는 더덕 사포닌 분획을 포함하는 아토피 피부질환용 조성물	강원대학교 산학협력단(조재열, 김민호, 홍역기, 이재휘, 이용규, 변세은, 홍역기)	대한민국	명세서 작성 완료 출원 예정					

3. 국내외 학술대회 발표 성과

개최일	발표논문제목	저자	학술대회명	장소	발표형식
2006.9.7-8	Study on extraction of <i>Codonopsis lanceolata</i> by various solvents.	안효실, 홍억기	한국생물공학회	서울 코엑스	포스터
2007.4.26-28	Cascade extraction produce and identification of saponin compounds and polysaccharides from <i>Codonopsis lanceolata</i> .	안효실, 홍억기	한국생물공학회	송도테크노파크, 갯벌타워	포스터
2007. 10.18-19	Anti-allergic activity of <i>Codonopsis lanceolata</i> on mast cell.	안효실, 윤종석, 홍억기	한국생물공학회	대구 인터볼고호텔	포스터
2008. 4. 18-19	Anti-allergic activity of <i>Codonopsis lanceolata</i> on macrophage.	안효실, 홍억기	한국생물공학회	전북대학교	포스터
2008.10.6-7	Anti-allergic activity id <i>Codonopsis lanceolata</i> extract.	안효실, 홍억기	한국생물공학회	제주 ICC	포스터
2006. 4.27-28	Immunomodulatory effect of total methanol extract from <i>Codonopsis lanceolata</i> .	이용규, 변세은, 김병훈, 김주영, 이지연, 조재열	2006 spring joint conference of the Korean society of crop science (KSCS) and the Korean society of medicinal crop science (KSMCS).	천안 상록리조트	포스터
2006. 5. 25-26	Immunomodulatory effect of total methanol extract from <i>Codonopsis lanceolata</i> .	이용규, 변세은, 조재열	63rd Korean Society for Biochemistry and Molecular Biology Annual Meeting in 2006.	서울 코엑스	포스터

2008. 10. 7 - 10	Regulatory Effects of <i>Codonopsis Lanceolata</i> on Gene Expression of GM-CSF in Macrophage-like cells.	변세은, 조재열	The 9th International Congress on Cell Biology and The 20th Annual Conference of Korea Society for Molecular and Cellular Biology.	서울 코엑스	포스터
2008. 10. 23 -24	Ethnopharmacological Roles of <i>Codonopsis lanceolata</i> on GM-CSF Expression in Macrophage-like Cells.	변세은, 이용규, 조재열	2008 Proceedings of the fall international convention.	서울 교육문화회관	포스터

4. 인력활용/양성 성과

지원 총인원	지원 대상 (학위별, 취득자)				성별		지역별		
	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	대전	기타지역
10	1	4							

제 2절. 연구성과 활용계획

1. 제 1세부 연구성과 활용계획

- 1) 염증 반응에 관련된 효능 평가 시스템을 확립함으로써 보다 효율적으로 염증 억제 효능 평가를 조금 더 효과적으로 진행할 수 있으며, 현재의 결과들을 대조군으로 사용 가능함.
- 2) 알러지/아토피 반응에 관련된 효능 평가 시스템을 확립함으로써 보다 효율적으로 염증 억제 효능 평가를 진행할 수 있으며, 현재의 결과들을 대조군으로 사용 가능함. 또한 In vitro에서의 평가 뿐만 아니라 In vivo에 대한 평가가 가능하므로 실용 가능성을 높을 수 있음.
- 3) 더덕 유래의 사포닌 성분이 염증 반응 및 알러지/아토피 반응에 효과가 있음을 확인하였으며, 동물 실험 및 예비 임상을 통해 부작용이 없음을 밝혀내었고, 그 효과를 확인하였다. 따라서 이러한 결과를 통해 직접적으로 알러지/아토피 질환 치료제로 적용이 가능함.

2. 제 2세부 연구성과 활용계획

- 1) 더덕유래 활성물질의 분리정제 방법에 사용된 효능을 갖는 단일물질 분리방법을 다른 생리활성 천연물에도 적용하여 활성물질 탐색과 분리정제에 이용.
- 2) 더덕유래 향장품 개발시 최적생산 및 분리정제 공정기술을 이용하여 적은비용으로 더덕에서의 활성물질을 고순도 고수율로 생산해 낼수 있음.

3. 제 3세부 연구성과 활용계획

본 연구를 통해 크림제, 에센스제, 그리고 팩제 등 3종의 더덕추출물 사포닌 분획 함유 향아토피/항알러지 화장품 제형이 개발되었으나 더덕추출물의 지속적인 피부적용의 한 방법으로 더덕추출물 함유 미용비누의 시제품을 제작하였다. 이를 통해 세안과정(미용비누)과 세안후(크림제/에센스제), 그리고 취침전 (팩제) 등 다양한 생활 조건에서 향아토피/항알러지 효과가 유지되도록 하였으며 이들 4종의 화장품 제형을 하나의 통합된 아토피 케어 전문 화장품으로 개발을 추진할 수 있는 기반을 마련하였다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

- Preparative isolation of six major saponins from *Platycodi Radix* by high-speed counter-current chromatography. Ha YW, Kim YS. *Phytochem Anal.* 2009 May;20(3):207-13.
- Preparative separation of the saponin lancemaside a from *Codonopsis lanceolata* by centrifugal partition chromatography. Shirota O, Nagamatsu K, Sekita S, Komoto N, Kuroyanagi M, Ichikawa M, Ohta S, Ushijima M. *Phytochem Anal.* 2008 Sep;19(5):403-10.
- Application of preparative high-speed counter-current chromatography/preparative high-performance liquid chromatography mode in rapid separation of saponins. Yao S, Luo J, Huang X, Kong L. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2008 Mar 15;864(1-2):69-77. Epub 2008 Feb 8.
- Drug retention and stability of solid lipid nanoparticles containing azidothymidine palmitate after autoclaving, storage and lyophilization. Heiati H, Tawashi R, Phillips NC. *J Microencapsul.* 1998 Mar-Apr;15(2):173-84.
- Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery--drug release and release mechanism. zur Mühlen A, Schwarz C, Mehnert W. *Eur J Pharm Biopharm.* 1998 Mar;45(2):149-55.
- Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery. II. Drug incorporation and physicochemical characterization. Schwarz C, Mehnert W. *J Microencapsul.* 1999 Mar-Apr;16(2):205-13.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
- Fu WW, Shimizu N, Dou DQ, Takeda T, Fu R, Pei YH and Chen YJ. 2006a. Five new triterpenoid saponins from the roots of *Platycodon grandiflorum*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 54: 557.560.
- Fu WW, Shimizu N, Takeda T, Dou DQ, Chen B, Pei YH and Chen YJ. 2006b. New A-ring lactone triterpenoid saponins from the roots of *Platycodon grandiflorum*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 54: 1285.1287.
- Gu M, Ouyang F and Su Z. 2004. Comparison of high-speed countercurrent chromatography and high-performance liquid chromatography on fingerprinting of Chinese traditional medicine. *J Chromatogr A* 1022: 139.144.
- Ha YW, Na YC, Seo JJ, Kim SN, Linhardt RJ and Kim YS. 2006. Qualitative

and quantitative determination of ten major saponins in *Platycodi Radix* by high performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection and mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1135: 27.35.

· Ha YW, Lim SS, Ha IJ, Na YC, Seo JJ, Shin H, Son SH and Kim YS. 2007. Preparative isolation of four ginsenosides from Korean red ginseng (steam-treated *Panax ginseng* C.A. Meyer), by high-speed countercurrent chromatography coupled with evaporative light scattering detection. *J Chromatogr A* 1151: 37.44.

· Han LK, Zheng YN, Xu BJ, Okuda H and Kimura Y. 2002. Saponins from *Platycodi Radix* ameliorate high fat diet-induced obesity in mice. *J Nutr* 132: 2241.2245.

· Ishii H, Tori K, Tozyo T and Yoshimura Y. 1984. Saponins from roots of *Platycodon grandiflorum*. part 2. Isolation and structure of new triterpene glycosides. *J Chem Soc Perkin Trans I* 661.668.

· Hansen LG, Host A, Halcken S, et al. Cord blood IgE. III. Prediction of IgE high-response and allergy. A follow-up at the age of 18 months. *Allergy* 1992: 47: 404.10.

· Kjellman NI, Croner S. Cord blood IgE determination for allergy prediction—a follow-up to seven years of age in 1651 children. *Ann Allergy* 1984: 53: 167.71

· McKnight AJ, Zimmer GJ, Fogelman I, Wolf SF, Abbas AK. Effects of IL-12 on helper T-cell dependent immune responses in vivo. *J Immunol* 1994: 152: 2172.

· Bengtsson A. The role of CD30 in atopic disease. *Allergy* 2001: 56: 593.603.

· Detection of genetic alterations in Korean ovarian carcinomas by degenerate oligonucleotide primed polymerase chain reaction-comparative genomic hybridization.

Kim GJ, Kim JO, Hong EK, Kim H, Chun YH, Park SH. *Cancer Genet Cytogenet*. 2003 Nov;147(1):23-7.

· Nikaido T, Koike K, Mitsunaga K and Saeki T. 1999. Two new triterpenoid saponins from *Platycodon grandiflorum*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 47: 903.904.

· Shi S, Jiang D, Zhao M and Tu P. 2007. Preparative isolation and purification of triterpene saponins from *Clematis mandshurica* by high-speed counter-current chromatography coupled with evaporative light scattering detection. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci* 852: 679.683.

- Slacanin I, Marston A and Hostettmann K. 1989. Modifications to a highspeed counter-current chromatograph for improved separation capability. *J Chromatogr* 482: 234,239
- Tang Q, Yang C, Ye W, Liu J and Zhao S. 2008. Preparative isolation and purification of chemical components from *Aconitum coreanum* by high-speed counter-current chromatography coupled with evaporative light scattering detection. *Phytochem Anal* 19: 155,159.

제 7 장 참고문헌

- 종양괴사인자 매개성 피부질환 치료제 조성물, 특허등록 번호 10-0245670-0000 (1999.12.01)
- In vitro inhibitory effect of protopanaxadiol ginsenosides on tumor necrosis factor (TNF)-alpha production and its modulation by known TNF-alpha antagonists. Cho JY, Yoo ES, Baik KU, Park MH, Han BH. *Planta Med.* 2001 Apr;67(3):213-8.
- Ginsenosides from *Panax ginseng* differentially regulate lymphocyte proliferation. Cho JY, Kim AR, Yoo ES, Baik KU, Park MH. *Planta Med.* 2002 Jun;68(6):497-500.
- In vitro anti-inflammatory effects of cynaropicrin, a sesquiterpene lactone, from *Saussurea lappa*. Cho JY, Baik KU, Jung JH, Park MH. *Eur J Pharmacol.* 2000 Jun 23;398(3):399-407.
- Regulatory effects of *Codonopsis lanceolata* on macrophage-mediated immune responses. Lee YG, Kim JY, Lee JY, Byeon SE, Hong EK, Lee J, Rhee MH, Park HJ, Cho JY. *J Ethnopharmacol.* 2007 May 30;112(1):180-8. Epub 2007 Mar 6.
- Beta-D-xylopyranosyl-(1-->3)-beta-D-glucuronopyranosyl echinocystic acid isolated from the roots of *Codonopsis lanceolata* induces caspase-dependent apoptosis in human acute promyelocytic leukemia HL-60 cells. Lee KW, Jung HJ, Park HJ, Kim DG, Lee JY, Lee KT. *Biol Pharm Bull.* 2005 May;28(5):854-9.
- Preparative isolation of six major saponins from *Platycodi Radix* by high-speed counter-current chromatography. Ha YW, Kim YS. *Phytochem Anal.* 2009 May;20(3):207-13.
- Preparative separation of the saponin lancemaside a from *Codonopsis lanceolata* by centrifugal partition chromatography. Shirota O, Nagamatsu K, Sekita S, Komoto N, Kuroyanagi M, Ichikawa M, Ohta S, Ushijima M. *Phytochem Anal.* 2008 Sep;19(5):403-10.
- Simultaneous determination of panax notoginsenoside R1, ginsenoside Rg1, Rd, Re and Rb1 in rat plasma by HPLC/ESI/MS: platform for the pharmacokinetic evaluation of total panax notoginsenoside, a typical kind of multiple constituent traditional Chinese medicine. Li X, Sun J, Wang G, Hao H, Liang Y, Zheng Y, Yan B, Sheng L. *Biomed Chromatogr.* 2007 Jul;21(7):735-46.
- Application of preparative high-speed counter-current

chromatography/preparative high-performance liquid chromatography mode in rapid separation of saponins. Yao S, Luo J, Huang X, Kong L. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2008 Mar 15;864(1-2):69-77. Epub 2008 Feb 8.

· Drug retention and stability of solid lipid nanoparticles containing azidothymidine palmitate after autoclaving, storage and lyophilization. Heiati H, Tawashi R, Phillips NC. *J Microencapsul.* 1998 Mar-Apr;15(2):173-84.

· Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery--drug release and release mechanism. zur Mühlen A, Schwarz C, Mehnert W. *Eur J Pharm Biopharm.* 1998 Mar;45(2):149-55.

· Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery. II. Drug incorporation and physicochemical characterization. Schwarz C, Mehnert W. *J Microencapsul.* 1999 Mar-Apr;16(2):205-13.

· Ali, S., Mann, D.A., 2004. Signal transduction via the NF-kappaB pathway: a targeted treatment modality for infection, inflammation and repair. *Cell Biochemistry and Function* 22, 67-79.

· Arnaout, M.A., Mahalingam, B., Xiong, J.P., 2005. Integrin structure, allostery, and bidirectional signaling. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 21, 381-410.

· Beal, M.F., Palomo, T., Kostrzewa, R.M., Archer, T., 2000. Neuroprotective and neurorestorative strategies for neuronal injury. *Neurotoxin Research* 2, 71-84.

· Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.

· Bremner, P., Heinrich, M., 2002. Natural products as targeted modulators of the nuclear factor-kappaB pathway. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 54, 453-472.

· Bresnihan, B., 1999. Pathogenesis of joint damage in rheumatoid arthritis. *Journal of Rheumatology* 26, 717-719.

· Brown, G.D., 2006. Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. *Nature Review Immunology* 6, 33-43.

· Chaudhuri, A., 2006. Selective adhesion-molecule therapy and inflammatory bowel disease. *New England Journal of Medicine* 354, 644-645.

· Cho, J.Y., Baik, K.U., Jung, J.H., Park, M.H., 2000. In vitro anti-inflammatory effects of cynaropicrin, a sesquiterpene lactone, from

- Saussurea lappa. *European Journal of Pharmacology* 398, 399–407.
- Cho, J.Y., Fox, D.A., Horejsi, V., Sagawa, K., Skubitz, K.M., Katz, D.R., Chain, B., 2001. The functional interactions between CD98, beta1-integrins, and CD147 in the induction of U937 homotypic aggregation. *Blood* 98, 374–382.
 - Cho, J.Y., Kim, A.R., Jung, J.H., Chun, T., Rhee, M.H., Yoo, E.S., 2004. Cytotoxic and pro-apoptotic activities of cynaropicrin, a sesquiterpene lactone, on the viability of leukocyte cancer cell lines. *European Journal of Pharmacology* 492, 85–94.
 - Cho, J.Y., Skubitz, K.M., Katz, D.R., Chain, B.M., 2003. CD98-dependent homotypic aggregation is associated with translocation of protein kinase Cdelta and activation of mitogen-activated protein kinases. *Experimental Cell Research* 286, 1–11.
 - Chung, H.Y., Kim, H.J., Kim, K.W., Choi, J.S., Yu, B.P., 2002. Molecular inflammation hypothesis of aging based on the anti-aging mechanism of calorie restriction. *Microscopy Research and Technique* 59, 264–272.
 - Diaz-Rodriguez, E., Montero, J.C., Esparis-Ogando, A., Yuste, L., Pandiella, A., 2002. Extracellular signal-regulated kinase phosphorylates tumor necrosis factor alpha-converting enzyme at threonine 735: a potential role in regulated shedding. *Molecular Biology of the Cell* 13, 2031–2044
 - Ahn KS, Noh EJ, Zhao HL, Jung SH, Kang SS and Kim YS. 2005. Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase II by Platycodon grandiflorum saponins via suppression of nuclear factor- κ B activation in RAW 264.7 cells. *Life Sci* 76: 2315.2328.
 - Choi SS, Han EJ, Lee TH, Han KJ, Lee HK and Suh HW. 2004. Antinociceptive profiles of platycodin D in the mouse. *Am J Chin Med* 32: 257.268.
 - Chu X, Sun A and Liu R. 2005. Preparative isolation and purification of five compounds from the Chinese medicinal herb *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc by high-speed counter-current chromatography. *J Chromatogr A* 1097: 33.39.
 - Conway WD and Ito Y. 1984. Development of countercurrent chromatography. *Anal Chem* 56: 534.554.
 - Fu WW, Shimizu N, Dou DQ, Takeda T, Fu R, Pei YH and Chen YJ. 2006a. Five new triterpenoid saponins from the roots of *Platycodon grandiflorum*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 54: 557.560.

- Fu WW, Shimizu N, Takeda T, Dou DQ, Chen B, Pei YH and Chen YJ. 2006b. New A-ring lactone triterpenoid saponins from the roots of *Platycodon grandiflorum*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 54: 1285.1287.
- Gu M, Ouyang F and Su Z. 2004. Comparison of high-speed countercurrent chromatography and high-performance liquid chromatography on fingerprinting of Chinese traditional medicine. *J Chromatogr A* 1022: 139.144.
- Ha YW, Na YC, Seo JJ, Kim SN, Linhardt RJ and Kim YS. 2006. Qualitative and quantitative determination of ten major saponins in *Platycodi Radix* by high performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection and mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1135: 27.35.
- Ha YW, Lim SS, Ha IJ, Na YC, Seo JJ, Shin H, Son SH and Kim YS. 2007. Preparative isolation of four ginsenosides from Korean red ginseng (steam-treated *Panax ginseng* C.A. Meyer), by high-speed countercurrent chromatography coupled with evaporative light scattering detection. *J Chromatogr A* 1151: 37.44.
- Han LK, Zheng YN, Xu BJ, Okuda H and Kimura Y. 2002. Saponins from *Platycodi Radix* ameliorate high fat diet-induced obesity in mice. *J Nutr* 132: 2241.2245.
- Ishii H, Tori K, Tozyo T and Yoshimura Y. 1984. Saponins from roots of *Platycodon grandiflorum*. part 2. Isolation and structure of new triterpene glycosides. *J Chem Soc Perkin Trans I* 661.668.
- Kim JY, Kim DH, Kim HG, Song GY, Chung YC, Roh SH and Jeong HG. 2006. Inhibition of tumor necrosis factor- α -induced expression of adhesion molecules in human endothelial cells by the saponins derived from roots of *Platycodon grandiflorum*. *Toxicol Appl Pharmacol* 210: 150.156.
- Kim YS, Kim JS, Choi SU, Lee HS, Roh SH, Jeong YC, Kim YK and Ryu SY. 2005. Isolation of a new saponin and cytotoxic effect of saponins from the root of *Platycodon grandiflorum* on human tumor cell lines. *Planta Med* 71: 566.568.
- Lee KJ, Choi CY, Chung YC, Kim YS, Ryu SY, Roh SH and Jeong HG. 2004. Protective effect of saponins derived from roots of *Platycodon grandiflorum* on tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative hepatotoxicity. *Toxicol Lett* 147: 271.282.
- Nikaido T, Koike K, Mitsunaga K and Saeki T. 1999. Two new triterpenoid saponins from *Platycodon grandiflorum*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 47: 903.904.

- Shi S, Jiang D, Zhao M and Tu P. 2007. Preparative isolation and purification of triterpene saponins from *Clematis mandshurica* by high-speed counter-current chromatography coupled with evaporative light scattering detection. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci* 852: 679.683.
- Shin CY, Lee WJ, Lee EB, Choi EY and Ko KH. 2002. Platycodin D and D3 increase airway mucin release in vivo and in vitro in rats and hamsters. *Planta Med* 68: 221.225.
- Slacanin I, Marston A and Hostettmann K. 1989. Modifications to a highspeed counter-current chromatograph for improved separation capability. *J Chromatogr* 482: 234.239
- Tang Q, Yang C, Ye W, Liu J and Zhao S. 2008. Preparative isolation and purification of chemical components from *Aconitum coreanum* by high-speed counter-current chromatography coupled with evaporative light scattering detection. *Phytochem Anal* 19: 155.159.
- Wang C, Schuller Levis GB, Lee EB, Levis WR, Lee DW, Kim BS, Park SY and Park E. 2004. Platycodin D and D3 isolated from the root of *Platycodon grandiflorum* modulate the production of nitric oxide and secretion of TNF- α in activated RAW 264.7 cells. *Int Immunopharmacol* 4: 1039.1049.
- Wei Y and Ito Y. 2006. Preparative isolation of imperatorin, oxypeucedanin and isoimperatorin from traditional Chinese herb 'bai zhi' *Angelica dahurica* (Fisch. ex Hoffm) Benth. et Hook using multidimensional high-speed counter-current chromatography. *J Chromatogr A* 1115: 112.117.
- Yanagida A, Shoji A, Shibusawa Y, Shindo H, Tagashira M, Ikeda M and Ito Y. 2006. Analytical separation of tea catechins and food-related polyphenols by high-speed counter-current chromatography. *J Chromatogr A* 1112: 195.201.
- Yao S, Liu R, Huang X and Kong L. 2007. Preparative isolation and purification of chemical constituents from the root of *Adenophora tetraphylla* by high-speed counter-current chromatography with evaporative light scattering detection. *J Chromatogr A* 1139: 254. 262.
- Zhao HL, Sim JS, Shim SH, Ha YW, Kang SS and Kim YS. 2005. Antiobese and hypolipidemic effects of platycodin saponins in diet-induced obese rats: evidences for lipase inhibition and calorie intake restriction. *Int J Obes (Lond)* 29: 983.990
- Death receptor 5 and Bcl-2 protein expression as predictors of tumor response to gemcitabine and cisplatin in patients with advanced non-small-cell lung cancer. Han JY, Hong EK, Choi BG, Park JN, Kim KW,

- Kang JH, Jin JY, Park SY, Hong YS, Lee KS. *Med Oncol*. 2003;20(4):355-62.
- A phase II study of weekly docetaxel plus capecitabine for patients with advanced nonsmall cell lung carcinoma. Han JY, Lee DH, Kim HY, Hong EK, Yoon SM, Chun JH, Lee HG, Lee SY, Shin EH, Lee JS. *Cancer*. 2003 Nov 1;98(9):1918-24.
 - Detection of genetic alterations in Korean ovarian carcinomas by degenerate oligonucleotide primed polymerase chain reaction-comparative genomic hybridization.
- Kim GJ, Kim JO, Hong EK, Kim H, Chun YH, Park SH. *Cancer Genet Cytogenet*. 2003 Nov;147(1):23-7.
- MacEwan DJ. TNF ligands and receptors: a matter of life and death. *Br J Pharmacol* 2002; 135: 885.
 - Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coman RL. Two types of murine helper T cell clone. 1. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986; 136: 2348.57.
 - Ellis TM, Simms PE, Slivnick DJ, Jack HM, Fischer RI. CD30 is a signal-transducing molecule that defines a subset of human activated CD45RO+ T cells. *J Immunol* 1993; 151: 2380.9.
 - Alzona M, Jack HM, Fischer RI, Ellis TM. CD30 defines a subset of activated human T cells that produce IFN- γ and IL-5 and exhibit enhanced B-cell helper activity. *J Immunol* 1993; 153: 2861.7.
 - Bengtsson A, Holm L, Back O, Fransson J, Scheynius A. Elevated serum levels of soluble CD30 in patients with atopic dermatitis (AD). *Clin Exp Immunol* 1997; 109: 533.7.
 - Ekstrom ES, Bengtsson A, Svensson A, et al. Presence of CD30+ and CD30L+ cells in human placenta and soluble CD30 levels in cord blood are independent of maternal atopy. *Placenta* 2001; 22: 372.9.
 - Chipeta J, Komada Y, Zhang XL, Azuma E, Yamamoto H, Sakurai M. Neonatal (cord blood) T cells can competently raise type1 and 2 immune responses upon polyclonal activation. *Cell Immunol* 2000; 205: 110.9.
 - Michie C, Harvey D. Can expression of CD45RO, a T-cell surface molecule, be used to detect congenital infection? *Lancet* 1994; 343: 1259.60.
 - Liao SY, Liao TN, Chiang BL, et al. Decreased production of IFN γ and increased production of IL-6 by cord blood mononuclear cells of newborns with a high risk allergy. *Clin Exp Allergy* 1996; 26: 397.405.
 - Dummer D, Brocker EB, Bastian BC. Elevated serum levels of soluble CD30 are associated with atopic dermatitis, but not with respiratory

- disorders and allergic contact dermatitis. *Br J Dermatol* 1997; 137: 185.7.
- Yamamoto J, Adachi Y, Onoue Y, Kanegane H, Miyawaki T. CD30 expression on circulating memory CD4+ T cells as a Th2- dominated situation in patients with atopic dermatitis. *Allergy* 2000; 55: 1011.8.
 - Oymar K, Laerdal A, Bjercknes R. Soluble CD30 and CD23 in cord blood are not related to atopy in early childhood. *Pediatr Allergy Immunol* 2000; 11: 220.4.
 - Durkop H, Latza U, Hummel M, Eitelbach F, Seed B, Stein H. Molecular cloning and expression of a new member of the nerve growth factor receptor family that is characteristic for Hodgkin's disease. *Cell* 1992; 68: 421
 - Bengtsson A. The role of CD30 in atopic disease. *Allergy* 2001; 56: 593.603.
 - Tang M, Kemp A, Varigos G. IL-4 and interferongamma production in children with atopic disease. *Clin Exp Immunol* 1993; 92: 133.6.
 - English BK, Burchett SK, English JD, Ammann JA, Wara DW, Wilson CB. Production of lymphotoxin and tumor necrosis factor by human neonatal mononuclear cells. *Pediatr Res* 1988; 24: 717.22.
 - Campbell DE, Hill DJ, Kemp AS. Enhanced IL-4 but normal interferon-gamma production in children with isolated IgE mediated food hypersensitivity. *Pediatr Allergy Immunol* 1998; 9: 68.72.
 - Del Prete G, de Carli M, Almerigogna F, et al. Preferential expression of CD30 by human CD4+ T cell producing Th2-type cytokines. *FASEB J* 1995; 9: 81.6.
 - Bengtsson A, Scheynius A, Avila-Carino A. Crosslinking of CD30 on activated human Th clones enhances their cytokine production and down regulates the CD30 expression.. *Scan J Immunol* 2000; 52: 595.601.
 - McKnight AJ, Zimmer GJ, Fogelman I, Wolf SF, Abbas AK. Effects of IL-12 on helper T-cell dependent immune responses in vivo. *J immunol* 1994; 152: 2172.
 - Gavett SH, O'Hearn DJ, Li X, Huang SK, Finkelman FD, Wills-Karp M. Interleukin 12 inhibits antigen- induced airway hyperresponsiveness, inflammation, and Th2 cytokine expression in mice. *J Exp Med* 1995; 153: 1707.
 - Heshmat NM, El-Haddi ES. Soluble CD30 serum levels in atopic dermatitis and bronchial asthma and its relationship with disease severity in pediatric age. *Pediatr Allergy Immunol* 2006; 17: 297.303.

- Bjorksten B, Borres MP, Einarsson R. Interleukin-4, soluble CD23 and interferon-gamma levels in serum during the first 18 months of life. *Int Arch Allergy Immunol* 1995; 107: 34.6.
- Hansen LG, Host A, Halcken S, et al. Cord blood IgE. III. Prediction of IgE high-response and allergy. A follow-up at the age of 18 months. *Allergy* 1992; 47: 404.10.
- Kjellman NI, Croner S. Cord blood IgE determination for allergy prediction-a follow-up to seven years of age in 1651 children. *Ann Allergy* 1984; 53: 167.71

부 록

Appendix

투고 논문, 특허, 그 외 성과

Published articles, patents, and other achievements