보안 과제( ), 일반 과제(○) / 공개( ), 비공개(○)

고부가가치식품기술개발사업 제4차 연도 최종보고서

발간등록번호
11-1543000-002376-01

더덕을 이용한 호흡기 및 순환기계 질환 개선 효능 건강기능식품 개발 최종보고서

2018. 9. 20.

주관연구기관 / (주)웰파이토

협동연구기관 / 충북대학교

우송정보대학

농 림 축 산 식 품 부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 "더덕을 이용한 호흡기 및 순환기계 질환 개선 효능 건강기능식품 개발" (개발기간 : 2014. 08. ~ 2018. 07.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2018. 09. 20.

주관연구기관명 : ㈜웰파이토 (대표자) 부희옥 (인)
협동연구기관명 : 충북대학교 산학협력단 (대표자) 최상훈 (인)
우송정보대학 산학협력단 (대표자) 이용희 (인)
국제공동연구기관명 : 일본 이화학연구소

참여기관명 : ㈜웰파이토 (대표자) 부희옥 (인)

주관연구책임자 : 부희옥
1협동연구책임자 : 이문순
2협동연구책임자 : 김학현
국제공동연구책임자 : 堂前直
참여기관책임자 : 부희옥

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	114036-04	해 당 단 계 연 구 기 간	2017.08.01 ~ 2018.07.31	단 계 구 분	4차년도/4차년도
연 구 사 업 명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	고부가가치식품기술개발사업			
연 구 과 제 명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	1세부: 더덕의 식품 소재화 및 항천식과 혈압강하 효능 건강기능식품 개발 국제공동: 더덕유래 혈압강하 효능물질의 특성 연구 1협동: 더덕으로부터 항천식, 혈압강하 작용 생리활성물질 단리 및 약리적 효능 검증 2협동: 국내 자생 더덕의 우량품종 선발, 육성 및 생물공학적 기법을 이용한 대량생산 시스템 확립			
연 구 책 임 자	부희옥	해당단계 참여연구원 수	총: 19명 내부: 8명 외부: 11명	해당단계 연구개발비	정부: 250,000천원 민간: 84,000천원 계: 334,000천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 42명 내부: 13명 외부: 29명	총 연구개발비	정부: 1,000,000천원 민간: 336,000천원 계: 1,336,000천원
연구기관명 및 소 속 부 서 명	1세부(주관기관): (주)웰파이토 1협동: 충북대학교 산학협력단 2협동: 우송정보대학 산학협력단			참여기업명 : (주)웰파이토	
국제공동연구	상대국명: 일본			상대국 연구기관명: 이화학연구소	
위 탁 연 구	연구기관명:			연구책임자:	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 갈음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	일반/「국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정」제24조의4에 해당하지 않음

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호											

국가과학기술종합정보시스템에 등록한 연구시설·장비 현황

구입기관	연구시설· 장비명	규격 (모델명)	수량	구입연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	NTIS 등록번호

요약	보고서 면수
1. 더덕의 우량품종 선발, 육성 및 대량생산시스템을 확립하고 이 결과를 바탕으로 비SCI 6편, 지식재산권(특허) 출원 1건을 완료함. 2. 더덕 소재에 대한 효능분석 결과를 바탕으로 SCI 논문 4편, 비SCI 3편, 지식재산권(특허) 출원 7건, 등록 2건을 완료함. 3. 잡지, 일간지, 인터넷을 통하여 더덕의 대량생산법 및 과민성면역 개선 효능에 대하여 홍보함으로써 더덕의 우수성을 알렸으며, 향후 더덕 소재의 건강기능식품개발을 기대해 볼 수 있음. 4. “더덕추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 항염증용 조성물 또는 천식예방과 치료용 조성물”이라는 명칭으로 기술실시계약을 체결함. 5. 더덕 추출물을 원료로 과민성면역(비염알레르기)에 대한 임상실험을 수행하였으며, 얻어진 결과를 바탕으로 식약처에 개별인정형 기능성원료 승인을 신청하고, 추후 기능성원료로서 인정되면 과민성면역 개선 관련 고부가가치 건강기능식품이 출시됨으로서 산업화가 이루어질 것임. 6. 더덕추출물 소재의 항천식, 항알레르기 효능에 대한 연구 결과를 토대로 참여기업인 ‘(주)웰파이토’에서는 “목맑음더덕수(액상 제형)“ “목맑음더덕청(과립제형)“을 브랜드화하여 시제품을 제작하였으며, 이를 바탕으로 본 제품을 곧 출시할 예정임.	

<요약문>

연구의 목적 및 내용	- 더덕 소재의 생리기능성 및 작용기전 구명 - 더덕으로부터 천식, 고혈압 예방과 치료 효능의 작용물질 분리 및 효능 검증 - 더덕을 이용한 항천식, 혈압강하 효능의 건강기능식품 개발을 위한 제조공정의 최적화 및 최적 가공적성, 표준화 확립 - 더덕 유래 항천식, 혈압강하 기능성 소재 개별인정형 원료의 승인을 위한 조건 확보 - 개발된 제품에 대한 식품학적 효능 검증 및 안전성 평가 - 더덕의 생리활성물질 분리 정제 및 구조 동정, 표준화를 위한 지표성분 설정 - 더덕 소재로부터 항천식, 혈압강하 활성 갖는 생리활성물질 스크리닝 - 생리활성물질의 유효성 평가 및 대량분리 정제 - 항천식, 혈압강하 효능 시제품 제조 및 안정성 평가 - 국내에 분포하는 더덕을 수집하여 우량품종을 선발, 기내 대량번식 시스템 (기외순화 포함)확립 및 재료의 균일화
연구개발성과	- 더덕 이용한 과민성면역 개선 효능의 건강기능식품 브랜드 개발 - 차별화된 고기능성 건강식품 개발에 의한 고부가가치 향상 및 고용창출 효과 - 도출된 기술에 대한 특허출원 및 개발된 원천기술을 활용하여 특화자원으로서의 차별화된 건강기능 식품산업 육성 - 우리나라에 자생하는 더덕의 품종개량에 의한 유용성분의 함량이 증가된 품종의 대량생산을 통해 원료 확보를 용이하게 하여 고부가가치 제품으로 산업화함으로서 기능성식품의 글로벌 산업화를 꾀함 - 산학연이 참여하는 사업으로서 학연에서 개발되는 기술과 제품은 기업으로 이전되어 산업화될 것이며, 산학연 연구클러스터 선도모델로 상호 협력하여 추진할 것임 - 기업/연구기관에서는 소재의 가공기술과 활성성분 분리 정제기술, 제제화 연구를 통하여 건강기능식품으로 산업화할 것임 - 동물실험, 임상시험을 통해 입증된 과민성면역 개선 효능에 대한 더덕의 새로운 가치 창출은 향후 관련 분야 제품개발에 획기적인 전기를 마련할 것임. - 일본의 핵심적 연구기관인 이화학연구소와의 공동연구개발을 통해 더덕추출물로부터 ACE 저해활성 지표의 혈압강하 효능물질을 동정함으로서 향후 일본에서의 특허 획득 및 새로운 수출시장을 개척하는데 상호 협력연구가 가능할 것임
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	▣ **활용방안** ○ 더덕소재 최적 추출공정기술 확보로 관련 산업계와의 기술제휴 등을 통해 산업화에 활용할 계획임

	○ 식품으로서의 소비패턴이 대부분 1차 가공에 한정되었던 더덕 소재를 고부가가치화함으로서 건강기능식품 제조에 적극 활용할 수 있을 것임 ○ 더덕 소재의 과민성면역 개선 효능분석 결과를 근거로 차별화된 고기능성 식품 생산에 활용 ○ 더덕소재로부터 혈압강하 효능물질을 동정함으로서 기존의 합성화학약제를 대체하는 천연물 유래 항고혈압 약제 개발에의 활용 가능성 ○ 지역사회 특산품 개발에 있어서 활용될 지자체 정책 자료로 제공 ○ 국내 자생 및 재배 약용식물의 고부가가치화를 통해 농가 경제 활성화 ○ 더덕사포닌 가수분해산물의 고기능성 천연소재로서의 활용가능성 제시 ○ 기능성이 강화된 더덕의 대량생산기술 확립으로 고기능성 식품 제조를 위한 천연소재의 안정적 공급 ○ 품종육성법 및 생물공학적 기술의 다양한 응용기법의 각 산업체 및 연구단체에서의 활용 ○ 우수한 품종개발 및 보급을 위한 데이터베이스로 이용 **▣ 기대성과** **1. 기술적 측면** ○ 더덕 이용한 천연 소재화 연구의 과학적 근거가 될 것으로 기대함 ○ 더덕 이용 새로운 기능성식품 소재 개발로 건강기능성 식품 시장의 확대 및 예방의학적 식품개발의 계기 마련 ○ 최근 세계적으로 식물자원을 이용한 고부가가치 식·의약품의 개발이 활발하게 시도되고 있으며 정부도 천연물신약 연구개발 촉진법을 통하여 이를 지원하고 있음. 천연유래 의약품 후보 물질을 이용한 고부가가치 신의약 제품 개발의 표준화 분석 시험법 개발 가능성 ○ 과민성 면역질환 조절 및 관련 대사물질의 약리효능 평가 등의 방법을 통하여 기존까지 알려지지 않았던 새로운 효과를 밝혀 천연물 신약 및 의약 선도물질로서의 개발 가능성을 제시함 ○ 생물공학적 기법을 이용한 더덕 소재의 기내대량증식 기술을 확립함으로서 유용 천연소재의 안정적 확보가 용이해짐 ○ 자생식물의 품종육성, 번식, 생태적 특성 등의 연구를 위한 데이터베이스의 확보가 필요하며, 본 연구는 이 같은 자생식물의 유용성을 지속시킬 수 있는 기초적 자료로 활용 가능

<table>
<tr><td></td><td colspan="5">○ 유효성분 고함유 품종의 필요부위만의 생산에 의한 고부가가치의 제품생산 가능
2. 경제·산업적 측면
○ 각 세부과제간의 상호 체계적인 공동연구의 성과가 학제간 및 산학연간의 연구에 모범이 될 수 있음
○ 더덕 및 생약초 재배 농가의 고부가가치 소득 창출 및 산업화에 따른 신소득 작물로 부각
○ 농업분야의 줄어드는 가치를 회복할 수 있는 계기
○ 유용 자원식물의 수요증대를 통한 관련농가의 소득증대・의욕고취에 기여
○ 기능성 건강식품 산업 육성에 기여
○ 더덕 천연 소재 개발 및 건강식품 개발로 인한 경제적 산업적 파생 및 활성화가 기대됨
○ 더덕 자원의 대중적인 소재 및 제품화에 연계함과 동시에 과학화를 진행함에 있어 관련 분야에 중요한 사례로 남을 것임
○ 우리 고유식물의 우수한 유전인자를 이용한 품종개량은 농업분야의 새로운 활로로서, 세계와의 경쟁에서 높은 부가가치를 제고 할 수 있음
○ 주요 약용·산채류의 이용은 증가추세이나 이를 만족할 공급의 부족으로, 중국 등의 외국 농산물의 수입 의존도가 높은 편임. 따라서 본 연구는 이를 대체할 수 있는 공급 및 우량품종의 생산으로 외국 수출이 가능함에 따라 새로운 농가수입원 창출 가능</td></tr>
<tr><td>국문핵심어
(5개 이내)</td><td>더덕</td><td>천식</td><td>고혈압</td><td>ACE(엔지오텐신 전환효소)</td><td>건강기능식품</td></tr>
</table>

<본문목차>

〈 목 차 〉

1. 연구개발과제의 개요 ····· 1

2. 연구수행 내용 및 결과 ····· 7

3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도 ····· 323

4. 연구결과의 활용 계획 ····· 327

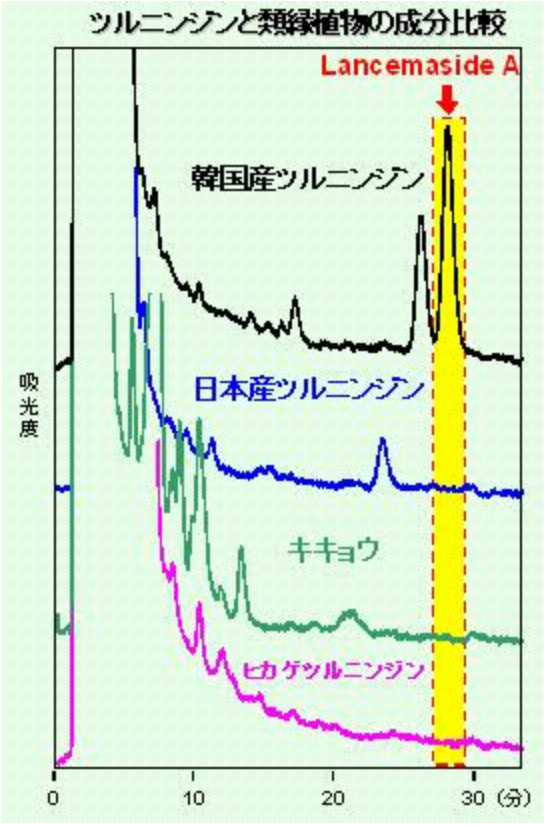
붙임. 참고 문헌 ····· 328

1. 연구개발과제의 개요

1-1. 연구개발 목적

더덕은 초롱꽃과(Campanulaceae)에 속하는 다년생 덩굴식물로 주로 한국, 만주, 일본, 대만 등의 산과 들에 자생하는 잠재적 부가가치가 높은 유용작물이며, 뿌리는 비대하고 방추형으로 그 생김새가 인삼과 비슷하여 한방명으로는 '사삼(沙蔘)'이라고도 하며, 예로부터 산삼에 버금가는 뛰어난 약효가 있다고 한다. 더덕은 야생더덕(산더덕)과 재배더덕이 있는데, 주로 고산지대에 자생하는 야생더덕이 재배더덕보다 향이 진하고 영양성분이 강하며, 재배더덕은 단백질과 지방함량이 높아 담백한 맛을 더 내는 것으로 알려져 있다. 더덕 뿌리에는 사포닌 성분이 들어 있는 것이 특색이다. 이 사포닌은 인삼이나 도라지에 들어있는 주요 성분이기도 하지만, 도라지보다 훨씬 많이 들어 있다. 쓴 맛을 내는 사포닌은 지방분해력이 크고 소화 흡수를 촉진시키며, 세포내 효소 활성화로 신진대사를 촉진하고 에너지를 증가시켜 원기회복, 피로, 무력감, 식욕부진 등을 개선해준다고 한다. 종기가 심할 때나 독충에 쏘였을 때 더덕가루를 바르면 효과가 좋은 것도 바로 이 사포닌의 효과 때문이다. 뿌리의 냄새는 특이하며 처음에는 단맛이 나지만 나중에는 쓴맛이 돈다. 약리실험에서 더덕은 가래를 삭이는 작용, 기침을 멈추는 작용, 혈압을 낮추는 작용, 보혈강장 작용, 혈중 콜레스테롤을 낮추는 작용, 건위작용, 피로회복 촉진작용뿐 아니라 자양강장 작용 등이 밝혀졌다. 또 폐열로 마른기침을 할 때, 허로(虛勞)로 인한 기침을 할 때, 수액이 부족하여 목안이 마를 때, 오랜 기침 등에 더덕을 사용한다. 기관지확장증, 폐결핵, 급성 및 만성 기관지염 등에도 좋다. 폐와 비장, 신장을 튼튼하게 해주므로 정력증강에도 매우 효과가 좋은 것으로 알려져 있다.

▣ 현재 시중에 유통되고 있는 더덕 관련 제품



<Lancemaside A 함량비교: 일본湧永製藥자료>

▣ 국내・외 더덕관련 식품개발 현황 및 문제점

○ 더덕과 관련한 국내의 연구현황을 보면, 면역세포 활성 및 항비만에 대한 연구들이 일부 있을 뿐 천식이나 고혈압과 관련한 과학적 입증 연구는 거의 없으며, 더욱이 이와 관련한 건강식품개발 또한 전무한 실정임

○ 현재 국내의 더덕관련 제품 개발은 거의 1차 상품 및 단순 가공 수준에 머물고 있으며, 다양한 증상별 효능을 발휘할 수 있는 생리활성물질의 표준화된 성분함량이 함유된 기능성 건강식품은 아직 개발되고 있지 않음

○ 더덕의 사포닌 성분 중 lancemaside A 성분을 포함한 생리활성물질에 대한 성분분석 연구는 일부 수행되었지만, 이들 성분을 적용한 건강식품개발에 대한 구체적 연구는 이루어져 있지 않음

○ 특히, 현재 국내 수많은 환자들이 고생하고 있는 것으로 알려진 고혈압과 천식에 대해서 간편한 건강기능식품 형태로 섭취할 수 있는 예방 및 치료 효능의 제품은 거의 없음

○ 건강을 지향하려는 소비자들의 요구가 매년 증가 추세에 있어 장기적인 경기 침체에도 불구하고 건강기능식품 시장은 매년 증가세를 보이고 있음

▣ 더덕 이용 건강기능식품 개발의 전망

○ 최근 산업경제의 발전으로 환경오염, 식생활의 변화로 호흡기질환이 급증하고 있는데, 대표적인 호흡기질환인 천식, 급 만성기관지염, 알레르기성 비염 등에 관련한 건강기능식품 등이 일부 출시되고 있지만 그 효능 구명이 불분명한 측면이 있으므로 이들 질환에 효능이 입증된 건강식품의 개발이 요구됨

○ 건강기능식품 시장 환경의 변화에 따라 2030세대의 건강기능식품 구입률이 매년 증가하면서 2030세대가 건강기능식품 시장의 주요고객으로 부상하고 있으며, 건강기능식품이 노년층을 위한 식품이라는 인식에서 벗어나 연령에 상관없이 섭취할 수 있는 식품이라는 인식도 높아졌다고 판단됨

○ 현재 천연 기능성 소재 개발은 기존의 기능성 소재로 주류를 이루던 항산화, 피로회복, 혈행개선, 콜레스테롤 개선 등의 기능성을 넘어 남성의 전립선의 건강 유지에 도움을 줄 수 있다고 인정받은 소팔메토, 노화로 인해 감소될 수 있는 황반색소 밀도를 유지시켜 줘 눈 건강에 도움을 줄 수 있다는 루테인 등 건강기능식품 원료 기능이 세분화되고 전문화되고 있음

○ 제품군별 국내 건강식품 판매액을 보면, 홍삼제품이 독보적인 1위를 차지하며, 그 외 알로에 제품, 각종 영양보충용 제품이 그 뒤를 잇고 있음. 특히 이들 상위 3개 제품군의 국내 총 판매액은 전체의 60% 이상을 점유하고 있어 제품군의 다양화가 요구됨

○ 수출실적 또한 인삼과 홍삼 제품이 대부분을 차지하고 있어서 수출 품목 다변화를 위해서도 인삼에 버금가는 기능성을 지니고 있는 더덕의 약리활성을 적용한 제품 개발은 국내는 물론 해외시장 개척에도 크게 기여할 것으로 기대됨

○ 고려인삼이 세계적 지명도의 건강식품으로 인정되고 있는 것과 같이 국내의 더덕 소재 또한 일본과 중국 등의 더덕과 비교하여 뛰어난 약리성분을 함유하고 있어서 건강기능식품으로 개발할 경우 국제적으로도 우수한 효능의 기능성식품으로 인정받을 수 있을 것으로 판단됨

1-2. 연구개발의 필요성

○ 경제성장과 더불어 건강지향적 식품에 대한 선호도가 증가하고 다양한 형태의 기능성 건강식품들이 출시되는 추세에 부응하여 고기능성 작물인 더덕의 가치성을 높이는데 기여하고, 더덕의 우수한 약리기능성을 이용한 고부가가치 제품 개발이 가능하다고 판단됨

○ 예방의학과 건강에 대한 관심이 커지면서 합성의약품의 부작용에 관한 염려가 증가되어 다양한 생리활성 성분을 함유한 유용식물로부터의 천연물 기능성 소재에 대한 발굴 및 다양한 건강기능성 식품에 대한 요구 증가 추세

○ 더덕 소재 고유의 특성을 극대화함으로서 차별화된 제품을 개발하기 위해서는 더덕의 특성을 보다 명확하게 검증하고 식품에의 적용에 있어 타 기능성 소재와의 배합 적합성 및 제조공정의 최적화 등을 통해 제품을 표준화함으로서 목적하는 효능이 발현되어 국민건강 개선에 실제적으로 도움이 되는 상품으로의 개발 필요성이 시급하다고 봄

○ 최근 각종 대기 환경오염 등의 외부환경 변화의 영향으로 천식환자가 늘어나는 추세에 있으며, 고혈압 환자 또한 급증하고 있는 실정으로 이에 대응한 예방 혹은 치료 효능의 대체 식품 개발이 시급함

○ 일반적으로 초롱꽃과 식물은 기관지질환에 특효가 있는 것으로 연구 보고되고 있는데, 더덕 또한 천식 개선에 효능이 있을 것으로 예상되는 바, 더덕에서의 항천식 관련 작용물질 구명은 관련제품 개발에 필수적임

○ 더덕은 혈압을 강하시키는 작용도 있는 것으로 알려져 있지만, 이에 대한 효능물질 구명

등 관련 연구는 전무한 실정이므로 그 원인물질의 메커니즘을 규명하고 이를 이용한 관련 제품 개발 필요성

○ 천연물질을 이용한 기능성식품 개발은 다양하게 이루어지고 있지만, 아직까지 더덕 소재를 이용한 고부가가치 기능성 소재화 및 상품화는 되어있지 않음

○ 더덕의 기능성을 융합한 항천식과 혈압강하 효능의 식품을 개발함으로서 천식과 고혈압으로 어려움을 당하고 있는 환자들의 고통을 없애고, 장기적 의료비 부담에서 오는 경제적 어려움을 경감시켜줄 필요가 있다고 봄

○ 일본의 경우, 혈류촉진과 세포재생에 필요한 더덕의 중요성을 인지하고 재배체계에 많은 힘을 쏟고 있으며, (주)藥都富山에서는 「和漢の泉」라는 상표명으로 화장수 및 기타 제품 등을 개발 판매 중이며 주요 식품회사에서도 제품개발을 시행중 임. 그러나 혈류촉진과 세포재생과 같은 특징적인 활성을 가진 성분인 사포닌(Lancemaside A)은 일본산 더덕에는 거의 함유되어 있지 않고 한국산 더덕에만 특징적인 유용성분으로 있어 일본으로부터 많은 관심을 받음. 따라서 우리나라의 주요 지역에 분포하고 있는 더덕의 특징을 구명함과 동시에 유용성분의 함량이 높은 품종의 선발, 이들의 육성과 함께 대량번식에 의한 대일 수출 작목으로 사업화가 필요.

○ 고품질의 품종 생산을 위해 우리나라의 주요지역에 분포하는 더덕의 성상, 생리, 생태적인 정보 및 유용성분의 함량 등을 바탕으로 품종 육성이 이루어져야 하며, 이들의 대량생산에 의한 공급체계가 필요

○ 국민 소득수준의 향상에 따라 동물성 단백질의 과다한 섭취에 의해 발생하는 성인병 등의 예방과 건강유지를 위해 건강식품에 대한 인식과 관심이 고조됨에 따라 전래의 산채이용이 현저한 증가추세에 있음. 그러나 국내의 생산단가가 높아 중국 등의 외국산에 의존하는 실정임. 이를 위하여 유망 산채류의 우량품종화 및 대량생산에 의한 국내공급 및 수출 작목으로의 육성이 필요

1-3. 연구개발 범위

○ 더덕 소재 최적 추출공정 확립
- 원재료의 추출용매, 온도, 시간 등에 의한 추출 공정 최적화
- 추출용매별, 분획별 최적 추출 수율
- 상온추출, 열수추출, 환류냉각 추출, 효소분해 추출공정에 따른 추출물 제조 효율 조사

○ 더덕의 지역별, 추출조건별 추출물의 생리기능성 검증 및 미지 물질 분석
- 지역별, 분획별, 추출용매별 추출물에 대한 면역증강, 항산화 및 항산화효소 활성, 항암활성, 항비만 효능 분석
- HR-GC/TOF 적용한 더덕의 미지 물질 분석

○ 추출물의 품질관리 조건 설정
- 추출물에 대해 일반세균, 대장균군 시험을 통해 품질관리 조건 설정

○ 더덕의 식품 소재화 가공공정 및 생산공정 표준화
- 제조 공정 및 대량생산 공정의 표준화
- 원료에 대한 품질관리 조건의 설정 및 분석

○ 각 제형별(분말, 과립, 액상 등) 건강기능식품 대량생산공정 확립

- 건강기능식품 개발을 위해 최적의 원료별 비율 설정
- 주원료, 부원료의 배합비율 기준설정을 통한 안정적 건강기능식품 개발 및 생산 공정 표준화 및 대량생산 공정 확립

○ 더덕의 개별인정형 기능성 소재로서의 승인조건 확보를 위한 지표성분 및 제조공정 표준화, 인체적용시험
- 지표성분 설정 : 물질분리, 정제 및 기능/지표 성분 설정
- 지표성분 함량 기준의 제조공정 표준화 : 추출, 농축, 건조, 분말화 조건 표준화
- 임상시험용 스틱포 제형의 제품 제조 및 인체적용시험
- 추출물 및 시제품의 안정성 평가실험 (장기·가속시험)
- 건강기능식품 품질관리를 위한 기능성 성분(지표성분), 미생물 관련(세균수, 대장균군 등) 분석

○ 더덕 이용한 면역조절, 혈압강하 효능의 기능성식품 대량생산 및 산업화 방안 구축
- 개별 인정형 기능성 원료 승인 조건 확보
- 산업화 및 마케팅 전략 구축
- 더덕의 건강식품 품목제조 신고

○ 더덕유래 혈압강하 효능물질의 특성 구명
- 한국산 더덕 추출물로부터 ACE(안지오텐신전환효소) 저해활성을 지표로 혈압강하 효능물질을 탐색하고 분리, 정제
- 효능물질의 ACE 활성 확인

○ 더덕 유래 혈압강하 작용물질의 단리정제(이화학연구소)
- 더덕 추출물과 더덕 추출물을 고체산 촉매를 이용하여 분해·유도체화한 성분을 ACE 저해활성을 지표로 혈압강하작용 성분을 단리·정제함

○ 더덕 유래 생리활성물질의 구조해석과 특성의 해명
- 더덕 유래의 정제된 유효성분(일본이화학연구소 분담의 고혈압관련 성분)을 고도의 기기분석을 활용하여 정밀한 극미량 성분의 구조도 결정함

○ 더덕 소재로부터 항천식, 혈압강하 활성 갖는 생리활성물질 스크리닝

○ 더덕의 생리활성물질 및 사포닌 분해산물 분리
- 더덕의 추출용매별 추출물 조제
- 추출물로부터 분획 단리
- 가수분해효소에 의한 더덕사포닌의 가수분해
- 추출물의 지표성분 설정 및 분석법 확립

○ 더덕으로부터 생리활성물질 화합물의 분리, 정제, 구조 동정
- 더덕에서 lancemaside A 및 가수분해산물에 대한 화학구조 결정

○ 더덕 및 더덕사포닌 가수분해산물의 항천식, 혈압강하 효능 생리활성물질의 약리효능 분석
- 기관지 질환세균 및 5-lipoxygenase (5-LO) 억제효과
- 급성 마우스 천식 모델의 항염증 효능

○ 더덕사포닌 가수분해산물의 분리, 정제, 구조 동정

○ 생리활성 물질의 유효성 평가 및 대량분리 정제
- Sephadex LH-20 및 MPLC에 의한 대량 분리정제
- 더덕사포닌 가수분해산물의 분리 및 생리활성
- Angiotensin converting enzymes(ACE) 저해활성측정

- 혈류개선 동물모델 실험: 고혈압 관련 동물실험은 혈류개선 Factor로 실험 수행

○ 가수분해산물의 효능분석 통해 선별된 생리활성물질 유효성 평가 및 대량분리 정제

○ 가수분해산물의 천식, 고혈압 예방 등의 시제품에 대한 기능성 검증

- MPLC에 의한 생리활성물질의 대량 분리정제
- 가수분해산물의 면역조절 효능 및 ACE 저해활성 분석

○ 우리나라의 주요지역에 분포하는 더덕의 우량품종 선발 및 성분분석

- PCR을 이용한 유전적 변이 탐색
- 형태 및 해부학적 관찰 : 지상부 및 지하부의 특성, Flow Cytometry를 통한 DNA 함량 확인
- 주요지역에 분포하는 더덕의 일반 및 무기성분 분석비교

○ 제품생산을 위한 균일한 재료의 원활한 공급체계 확립

- 선발된 우량품종의 농가실증 시험을 통한 농가의 재배생산체계 확보
- 선발된 우량품종의 기내대량생산시스템 및 기외순화체계 확립

○ 선발된 우량품종의 기능성물질(2차대사산물) 함량 증가를 위한 품종개량

- 종자 및 기내 배양체의 4배체 유도물질의 침지처리
- 형태 및 해부학적 관찰에 의한 4배체 식물의 확인

○ 생물공학적 기법을 이용한 배수체 식물(부정근 및 캘루스)의 대량번식법 개발

- 적정배지선발, 생장조절제의 단용 및 혼용, 적정환경조건, LED 광원 조사

○ 바이오리엑터를 이용한 배양근 생산시스템 확립

- 적정 배지, 생물반응기내 공기주입량에 따른 생장 및 배지 소모량
- LED 광원에 부정근 및 캘루스의 생장조사
- 더덕 우량품종의 부정근 배양기간별 기능성 물질 함량의 변화

2. 연구수행 내용 및 결과

2-1. 연구내용 및 결과

[더덕의 식품 소재화 및 항천식과 혈압강하 효능 건강기능식품 개발]

1. 더덕 소재 최적 추출 공정 확립

가. 공시재료

본 실험에 공시한 재료는 6개 지역(제주도, 전남 화순, 전북 무주, 충북 제천, 강원 횡성, 경북 울진)에서 재배한 3년근 더덕을 농가로부터 구입하여 사용하였다.

<제주 더덕>

<화순 더덕>

<무주 더덕>

<제천 더덕>

<횡성 더덕>

<울진 더덕>

Photo 1. 실험에 공시한 각 지역별 재배더덕

나. 최적 추출조건 확립 위한 추출공정 설정

최적 추출조건을 구명하기 위하여 열수추출, 상온추출, 환류냉각추출, 효소분해 추출 등의 추출 조건 및 용매 조성 (30%, 50%, 70%, 100% Ethyl alcohol 과 물)에 따른 추출 효율 및 각 추출물의 생리기능성 평가를 실시하여 추출물의 효능이 우수하고 추출 효율성을 높일 수 있는 추출공정 개발을 수행한다. 또한 더덕의 표준 추출공정을 설정한 공정으로부터 각 추출물의 Hexane, MC, EA, BuOH, DW 분획을 행하고, 추출공정 설정을 위해 각 추출방법에 따른 추출물의 수율과 항산화 활성 등을 분석한다.

(1) 열수추출

동결 건조한 더덕 시료 50g에 10배의 증류수를 가하여 20분씩 100℃에서 3회 추출 및 3시간씩 70℃에서 3회 반복 추출한 다음, 실온에서 냉각·여과한 후 추출액을 회전 감압농축기로 농축하였다. 농축한 추출물을 동결건조한 후 무게를 측정하는 방법으로 수율을 조사하였다. 그 결과, 모든 지역 더덕에서 100℃ 추출이 70℃ 추출보다 높은 회수율을 보였으며, 항산화능 또한 100℃ 추출에서 높은 효능을 나타냈다.

Table 1. Yield of extract sample according to hot water extraction

Extraction temperature	Yield (g)					
	Culture region					
	Hwasun	Uljin	Hoengseong	Jeju	Jecheon	Muju
100℃	31.25±0.51	30.62±0.71	31.81±0.63	32.39±0.41	30.87±0.62	32.08±0.37
70℃	26.50±0.48	27.17±0.25	26.85±0.82	27.92±0.38	25.79±0.27	24.86±0.45

*Data represent the mean values±SE of three independent experiments.

Table 2. DPPH radical scavenging activities according to hot water extraction

Culture region	Extraction temperature	DPPH radical scavenging activity, % of control				
		Concentration (mg/mL)				
		1	2.5	5	10	20
Hwasun	100℃	8.56±0.28	11.03±0.67	16.38±0.58	21.35±0.77	48.55±0.49
	70℃	9.15±1.08	12.37±0.58	15.92±0.51	22.27±1.09	45.65±0.57
Uljin	100℃	9.52±0.67	12.18±0.39	15.22±0.83	19.28±1.21	45.28±1.15
	70℃	8.26±0.37	12.67±0.45	16.35±0.92	17.56±0.78	42.51±0.76
Hoengseong	100℃	8.92±0.25	10.28±0.21	15.05±0.68	20.16±0.65	40.38±1.31
	70℃	9.29±0.85	13.08±0.78	16.72±0.62	21.23±1.37	41.61±1.03
Jeju	100℃	10.29±0.89	13.52±0.37	20.88±0.56	23.62±0.94	47.95±0.86
	70℃	8.67±0.63	13.71±0.57	19.25±0.83	24.07±0.75	46.19±0.79
Jecheon	100℃	9.38±0.52	10.92±0.73	14.69±0.48	18.86±0.59	46.29±0.83
	70℃	10.32±0.62	11.62±0.48	13.97±0.69	17.57±0.72	45.27±0.61
Muju	100℃	8.65±0.85	10.87±0.62	15.48±1.18	20.86±0.71	45.62±0.86
	70℃	9.07±0.39	11.15±0.27	15.86±0.82	18.92±0.73	44.85±1.25

*Data represent the mean values±SE of three independent experiments.

Table 3. ABTS radical scavenging activities according to hot water extraction

Culture region	Extraction temperature	ABTS radical scavenging activity, % of control					
		Concentration (mg/mL)					
		0.5	1	2.5	5	10	20
Hwasun	100℃	6.58±0.67	9.07±0.92	17.62±0.86	27.35±0.78	39.53±1.21	68.72±1.36
	70℃	6.23±0.76	8.75±0.59	17.92±0.48	25.83±0.96	39.08±0.82	65.28±1.83
Uljin	100℃	7.53±0.73	9.81±0.65	19.62±0.79	26.28±0.85	41.25±0.57	69.65±0.83
	70℃	8.06±0.69	10.12±0.85	18.85±0.64	28.51±0.93	37.85±1.45	68.31±1.31
Hoengseong	100℃	7.82±0.41	10.31±0.77	18.63±0.84	26.77±1.25	38.52±0.87	70.25±0.81
	70℃	8.16±0.66	11.08±0.58	18.33±0.93	27.09±0.57	39.57±0.92	67.82±0.87
Jeju	100℃	8.81±0.63	11.92±0.83	20.35±0.86	27.67±0.68	41.39±1.91	72.16±1.87
	70℃	8.63±0.81	10.75±0.58	20.86±1.25	29.28±0.84	38.25±1.45	72.08±1.37
Jecheon	100℃	7.62±0.73	11.06±0.82	17.82±0.57	26.77±1.08	40.21±1.36	68.37±1.68
	70℃	8.32±0.85	10.83±0.68	16.59±0.61	28.31±0.95	39.25±1.28	69.13±1.23
Muju	100℃	8.29±0.72	11.27±0.55	18.92±0.78	26.85±1.25	39.57±1.36	67.83±0.98
	70℃	8.12±0.69	9.78±0.85	16.38±0.63	29.18±0.52	37.62±1.75	68.36±1.36

*Data represent the mean values±SE of three independent experiments.

(2) 상온추출

상온추출은 동결 건조한 더덕 분말 50g을 EtOH 30%, 50%, 70%, 100% 비율로 3회 반복 3회 반복 추출한 다음, 추출액을 감압농축기로 완전히 농축한 후에 무게를 측정하는 방법으로 에탄올 비율별 회수율을 조사하였다.

(3) 환류냉각추출

환류냉각추출은 수직 환류냉각기가 부착된 flask에 동결건조 더덕 시료 50g에 10배의 증류수를 가한 후 100℃에서 12시간 동안 3회 반복 추출하였으며, EtOH 추출도 수직 환류냉각기가 부착된 flask에 5배의 70% 주정 알코올을 가한 다음 70℃에서 3시간 동안 3회 반복 추출하였다. 추출액을 실온에서 냉각·여과한 후 회전 감압농축기로 농축한 추출물을 동결건조한 다음 무게를 측정하는 방법으로 수율을 조사하였다. 그 결과, 물 추출 환류냉각추출이 EtOH 환류냉각추출보다 높은 회수율을 보였으며, 항산화능은 모든 지역의 재배더덕에서 EtOH 추출에서 높은 효능을 나타냈다.

Table 4. Yield of extract sample according to reflux extraction

Reflux extraction	Yield (g)					
	Culture region					
	Hwasun	Uljin	Hoengseong	Jeju	Jecheon	Muju
D.W.	31.25±0.51	30.62±0.71	31.81±0.63	32.39±0.41	30.87±0.62	32.08±0.37
70% EtOH	26.50±0.48	27.17±0.25	26.85±0.82	27.92±0.38	25.79±0.27	24.86±0.45

*Data represent the mean values±SE of three independent experiments.

Table 5. DPPH radical scavenging activities according to reflux extraction

Culture region	Reflux extraction	DPPH radical scavenging activity, % of control				
		Concentration (mg/mL)				
		1	2.5	5	10	20
Hwasun	D.W.	9.62±0.36	15.21±0.87	19.63±0.65	25.38±0.92	53.26±0.88
	70% EtOH	10.58±0.53	17.21±0.46	19.86±0.93	27.15±1.16	56.28±0.97
Uljin	D.W.	8.21±0.51	13.68±0.78	18.57±0.92	23.62±1.03	47.39±0.82
	70% EtOH	10.37±0.85	16.53±0.71	20.29±0.86	26.32±0.63	53.98±0.73
Hoengseong	D.W.	10.21±0.47	14.83±0.66	20.08±0.25	23.89±0.39	51.67±1.56
	70% EtOH	9.83±0.78	16.52±0.93	21.05±0.72	25.61±1.31	54.29±1.75
Jeju	D.W.	9.11±0.33	12.52±0.65	16.48±0.68	27.92±1.58	53.96±0.87
	70% EtOH	10.75±0.65	19.17±0.86	22.18±0.71	27.06±0.76	55.86±1.47
Jecheon	D.W.	8.52±0.28	12.92±0.92	18.53±0.58	24.16±0.69	49.69±0.86
	70% EtOH	10.18±0.73	13.28±0.29	17.83±0.63	23.73±1.31	52.32±1.27
Muju	D.W.	9.26±0.83	17.35±0.65	18.92±0.62	23.75±0.93	48.62±0.88
	70% EtOH	9.03±0.38	16.84±0.32	21.06±0.58	25.66±0.86	49.78±0.93

*Data represent the mean values±SE of three independent experiments.

Table 6. ABTS radical scavenging activities according to reflux extraction

Culture region	Reflux extraction	ABTS radical scavenging activity, % of control					
		Concentration (mg/mL)					
		0.5	1	2.5	5	10	20
Hwasun	D.W.	7.89±0.53	9.63±0.78	18.21±0.53	28.09±0.68	41.36±1.17	69.85±0.97
	70% EtOH	10.07±0.81	12.28±0.63	23.08±0.63	31.27±0.87	42.31±0.91	72.99±0.88
Uljin	D.W.	8.25±0.75	9.69±0.69	19.68±0.82	26.76±0.69	42.21±0.59	69.38±0.79
	70% EtOH	9.27±0.52	12.18±0.81	24.17±0.51	28.62±0.78	42.86±1.18	73.21±1.12
Hoengseong	D.W.	8.63±0.36	11.92±0.72	20.36±0.93	27.81±0.81	43.52±0.89	67.82±1.23
	70% EtOH	10.12±0.28	12.98±0.55	24.57±0.78	29.38±0.59	44.19±0.78	70.27±0.93
Jeju	D.W.	9.21±0.83	11.39±0.87	22.67±0.59	29.38±0.98	41.27±0.75	70.18±1.31
	70% EtOH	8.93±0.48	12.81±0.71	25.18±0.63	30.21±0.89	44.36±0.86	73.84±1.08
Jecheon	D.W.	7.82±0.59	12.05±0.85	21.17±0.52	26.93±1.02	40.81±1.67	68.92±1.25
	70% EtOH	9.06±0.76	12.88±0.65	23.62±0.68	27.85±0.91	45.06±1.18	68.73±0.75
Muju	D.W.	9.15±0.72	10.87±0.59	19.63±0.71	27.87±0.82	39.56±0.93	67.22±0.82
	70% EtOH	10.25±0.53	11.68±0.81	20.92±0.85	29.65±0.52	43.08±1.22	69.76±0.79

*Data represent the mean values±SE of three independent experiments.

(4) 효소분해 추출

생더덕 1kg에 가온 정제수를 30% (v/w) 첨가 후 효소 cellulase : pectinase : amyloglucosidase를 3:2:1, 3:2:2, 3:1:2의 비율 (w:w:w)로 혼합하여 이러한 비율별 혼합효소를 각각 생더덕량의 2% (w/w)를 첨가하여 45℃, 10시간 동안 추출하였다. 각 효소추출액을 실온에서 냉각·여과한 후 회전 감압농축기로 농축하여 30 brix 농축물 수득량을 기준으로 수율을 조사하였다. 그 결과, 3:2:2 효소 비율에서 상대적으로 다소 높은 수득율을 나타냈지만, 최적의 비율을 보다 면밀히 조사하기 위해서는 효소 혼합비율을 보다 다양하게 처리하여 보완 실험을 할 필요가 있다고 사료된다. 항산화능 또한 3:2:2 비율에서 대체적으로 높은 효능을 나타냈다.

Table 7. Effect of mixing ratio of macerating enzyme on yield of extracted by macerating enzymatic extraction

Mixing ratio (W/W/W)	Yield (g/30brix)					
	Culture region					
	Hwasun	Uljin	Hoengseong	Jeju	Jecheon	Muju
Control	280.75±8.57	302.58±7.51	305.58±10.21	315.62±6.28	306.25±6.21	311.27±7.53
3:2:1	316.32±8.57	328.25±7.51	326.38±10.21	335.63±6.28	323.52±6.21	335.27±7.53
3:2:2	319.83±8.57	331.26±7.51	329.67±10.21	337.26±6.28	327.86±6.21	336.75±7.53
3:1:2	317.76±8.57	330.29±7.51	329.83±10.21	335.29±6.28	326.55±6.21	335.87±7.53

*Data represent the mean values±SE of three independent experiments.
The control was value by hot-water(100℃) extraction method.

Table 8. DPPH radical scavenging activities according to mixing ratio by macerating enzymatic extraction

Culture region	Mixing ratio (W/W/W)	DPPH radical scavenging activity, % of control				
		Concentration (mg/mL)				
		1	2.5	5	10	20
Hwasun	Control	8.25±0.35	10.38±0.27	18.52±0.62	23.01±0.58	39.53±0.86
	3:2:1	9.38±0.92	12.25±1.02	19.78±0.76	25.36±0.92	42.27±0.81
	3:2:2	9.25±0.77	13.18±0.92	22.26±0.83	26.93±1.13	43.55±0.99
	3:1:2	10.08±1.03	13.22±0.75	20.38±0.79	25.65±0.81	43.26±0.87
Uljin	Control	9.32±0.63	10.53±0.52	19.77±0.93	22.51±0.85	40.29±0.81
	3:2:1	10.23±0.29	12.38±0.87	21.08±0.56	24.58±0.27	43.31±0.92
	3:2:2	9.86±0.39	13.72±0.79	23.62±0.53	27.06±0.67	45.28±0.87
	3:1:2	10.03±0.86	14.16±0.92	23.08±0.75	24.29±0.93	44.32±0.59
Hoengseong	Control	9.29±0.67	11.85±0.85	19.27±0.63	21.69±0.91	39.87±0.75
	3:2:1	10.93±0.55	13.21±0.46	20.18±1.25	24.63±0.78	43.57±0.92
	3:2:2	9.85±0.53	15.29±0.77	24.06±0.86	25.86±0.63	44.29±0.76
	3:1:2	10.12±0.33	13.83±0.92	21.68±0.63	25.05±0.52	43.93±0.82

Jeju	Control	10.23±0.76	13.51±0.55	18.65±0.73	25.02±0.92	40.35±0.85
	3:2:1	10.03±0.86	15.69±0.78	23.27±0.67	25.13±1.18	42.95±1.34
	3:2:2	9.78±0.53	16.05±0.81	25.29±0.75	26.87±0.62	46.16±0.58
	3:1:2	10.15±0.29	14.87±0.52	23.86±0.48	25.32±0.73	45.36±0.69
Jecheon	Control	8.26±0.81	10.68±0.76	17.28±0.59	22.06±0.52	40.24±0.75
	3:2:1	9.52±0.63	14.29±0.78	22.09±0.95	25.27±0.65	41.38±0.72
	3:2:2	9.78±0.82	13.85±0.49	21.52±0.78	25.62±0.56	43.27±0.76
	3:1:2	10.18±0.35	12.399±0.62	22.86±0.69	23.27±0.85	43.07±0.82
Muju	Control	9.25±0.26	10.79±0.91	16.85±0.68	22.28±0.71	39.82±0.65
	3:2:1	8.79±0.76	12.18±0.92	20.83±0.78	23.69±1.19	40.79±0.87
	3:2:2	9.87±0.52	13.63±0.41	22.18±0.73	23.93±0.65	42.51±0.58
	3:1:2	9.26±0.65	14.53±0.36	21.66±0.31	22.78±0.86	42.16±0.73

*Data represent the mean values±SE of three independent experiments.

Table 9. ABTS radical scavenging activities according to mixing ratio by macerating enzymatic extraction

Culture region	Mixing ratio (W/W/W)	ABTS radical scavenging activity, % of control					
		Concentration (mg/mL)					
		0.5	1	2.5	5	10	20
Hwasun	Control	6.82±0.53	8.73±0.33	15.66±0.97	23.59±0.75	35.82±0.65	61.58±1.23
	3:2:1	6.33±0.65	8.56±0.96	18.61±0.82	22.72±0.68	36.39±1.26	65.25±0.82
	3:2:2	7.23±0.73	9.83±0.62	17.95±0.86	26.89±0.75	38.56±0.58	66.28±1.53
	3:1:2	7.54±0.87	9.37±0.52	18.18±0.66	25.35±0.93	38.05±1.51	65.78±1.32
Uljin	Control	6.21±0.58	9.35±0.83	17.29±0.38	26.86±0.83	37.29±0.68	63.57±0.75
	3:2:1	7.16±0.83	10.25±0.75	19.53±0.59	25.78±0.68	38.55±1.29	66.29±0.85
	3:2:2	7.15±0.79	9.83±0.91	19.86±0.69	26.58±0.81	39.83±1.58	70.17±1.69
	3:1:2	7.85±0.66	10.09±0.39	18.69±0.53	27.52±0.72	38.65±0.85	70.28±0.68
Hoengseong	Control	7.56±0.52	9.27±0.49	17.85±0.83	25.68±0.71	36.73±0.39	65.28±1.42
	3:2:1	8.23±0.61	10.09±0.89	18.92±0.77	26.58±0.58	38.78±1.53	68.59±1.39
	3:2:2	7.51±0.75	11.18±0.68	19.85±0.89	29.53±0.49	40.62±0.85	71.64±1.15
	3:1:2	8.78±0.69	10.85±0.81	19.18±0.86	26.79±0.78	39.13±1.71	69.72±1.53
Jeju	Control	7.25±0.93	10.29±0.52	16.58±0.85	28.35±0.78	36.53±0.56	65.02±1.09
	3:2:1	7.38±0.73	10.57±0.65	19.68±0.81	29.52±0.58	39.48±0.85	68.12±1.18
	3:2:2	8.36±0.85	9.53±0.52	21.68±0.66	28.58±0.79	42.52±1.29	70.82±0.78
	3:1:2	8.52±0.59	10.18±0.88	18.62±0.82	29.49±0.65	38.58±0.58	70.75±1.42
Jecheon	Control	6.88±0.69	9.52±0.73	17.92±0.75	27.58±0.83	39.15±1.68	66.27±1.55
	3:2:1	8.05±0.82	10.18±0.98	18.73±0.56	27.88±0.85	40.53±0.78	70.58±1.31
	3:2:2	8.69±0.61	10.13±0.59	17.83±0.51	30.25±0.85	38.83±0.67	68.19±1.45
	3:1:2	7.25±0.56	9.83±0.98	18.28±0.89	28.63±0.68	40.48±1.56	66.93±1.12
Muju	Control	7.37±0.72	10.15±0.59	17.18±0.79	25.35±0.68	39.53±0.58	63.82±0.83
	3:2:1	8.16±0.59	9.87±0.63	19.38±0.58	28.52±0.83	41.25±1.35	69.15±1.52
	3:2:2	7.83±0.82	9.58±0.78	17.55±0.71	28.63±0.59	39.68±0.89	68.65±1.12
	3:1:2	9.13±0.73	10.25±0.91	18.69±0.82	27.52±0.75	37.62±1.51	69.39±1.45

*Data represent the mean values±SE of three independent experiments.

다. 추출 용매별, 분획별 추출물 조제

(1) 추출 및 용매분획

지역별 재배 더덕을 선별하여 세척한 다음 동결건조 후, 70% 주정알코올로 3회 반복 상온 추출한 다음, 감압 농축하여 추출물을 얻었다. 또한 농축한 추출물을 동결건조한 다음 다시 증류수에 현탁시켜 *n*-hexane, Methylene chloride, Ethyl acetate, Butyl alcohol, D.W. 등의 용매를 사용하여 순차적으로 연속 추출하여 분획하였다.

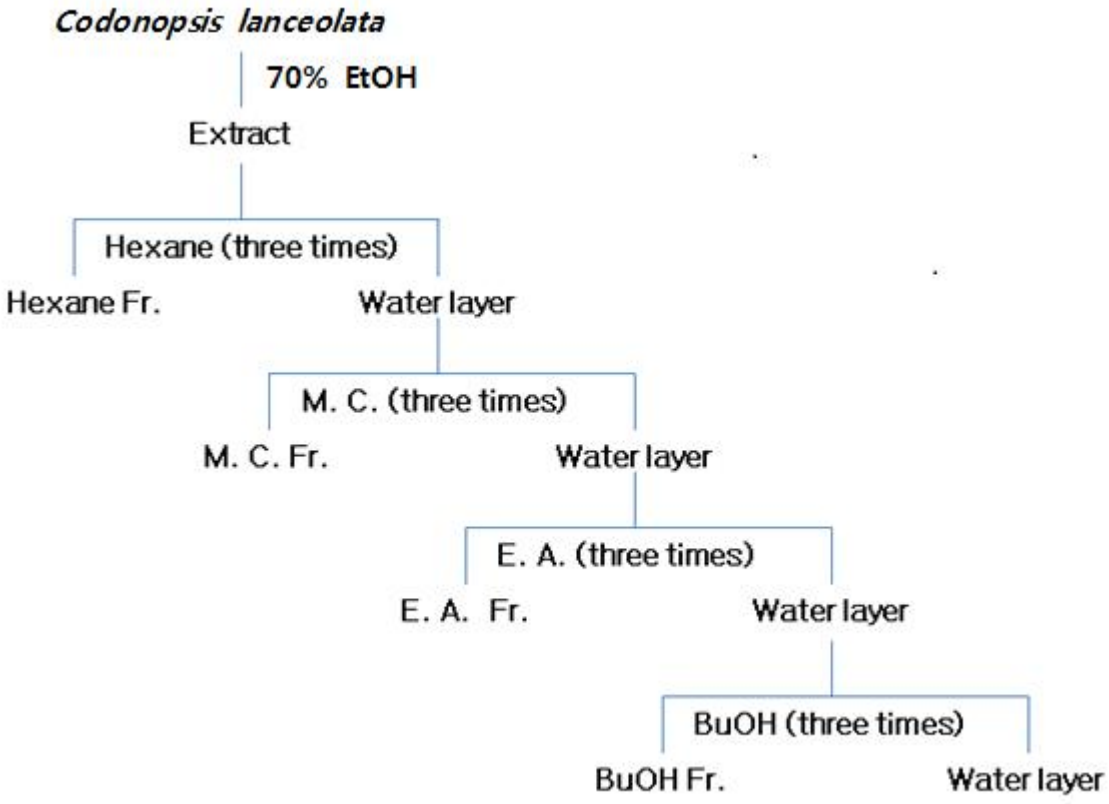


Fig. 1. Extraction and solvent partition in roots of *Codonopsis lanceolata*

(2) 용매분획별 수율

동결 건조한 더덕을 70% 주정알코올로 3회 반복 상온 추출한 다음, 감압 농축한 추출물을 동결 건조하여 분말화하였다. 동결건조 분말 50g을 *n*-hexane, Methylene chloride, Ethyl acetate, Butyl alcohol, D.W.(distilled water) 등의 용매별로 3회 반복하여 분획을 행한 다음, 추출액을 감압농축기로 완전히 농축한 후에 무게를 측정하는 방법으로 각 분획물의 회수율을 조사하였다. 지역에 관계없이 모든 시료에서 물 추출에서 가장 높은 회수율을 보였고, Ethyl acetate 층에서는 극히 미미한 수준의 수율을 나타냈다.

Table 10. Yield of extract sample according to solvent fractions

solvent	Yield (g)					
	Culture region					
	Hwasun	Uljin	Hoengseong	Jeju	Jecheon	Muju
n-Hexane	0.66±0.03	0.43±0.07	0.69±0.11	1.36±0.08	0.68±0.07	0.42±0.07
MethyleneChloride	0.24±0.12	0.51±0.05	0.21±0.09	0.41±0.10	0.50±0.05	0.28±0.14
Ethyl Acetate	0.10±0.04	0.14±0.03	0.11±0.02	0.16±0.12	0.17±0.07	0.11±0.09
n-BuOH	2.61±0.10	2.91±0.07	1.83±0.07	3.43±0.09	3.89±0.12	2.78±0.02
D.W	46.39±0.45	46.01±0.24	47.16±0.87	44.64±0.29	44.76±0.88	46.41±0.65

*Data represent the mean values±SE of three independent experiments.

(3) 추출용매별 수율

동결 건조한 더덕 분말 10g을 EtOH, MeOH, Ether, Acetone, erD.W.(distilled water) 등의 용매별로 3회 반복 추출한 다음, 추출액을 감압농축기로 완전히 농축한 후에 무게를 측정하는 방법으로 각 용매별 회수율을 조사하였다. 그 결과, 6개 지역 재배 더덕 모두에서 물 추출이 가장 높은 회수율을 보였고, Ether와 Acetone 층에서는 수율이 상대적으로 낮았다.

Table 11. Yield of extract sample according to extract solvents

solvent	Yield (g)					
	Culture region					
	Hwasun	Uljin	Hoengseong	Jeju	Jecheon	Muju
EtOH	1.25±0.01	0.80±0.03	0.68±0.01	0.38±0.03	0.72±0.01	0.73±0.01
MeOH	3.29±0.02	2.09±0.02	3.06±0.02	1.23±0.04	1.91±0.03	2.31±0.01
Ether	0.11±0.01	0.10±0.01	0.13±0.01	0.12±0.01	0.11±0.02	0.12±0.02
Acetone	0.12±0.01	0.11±0.02	0.10±0.01	0.12±0.02	0.11±0.01	0.13±0.01
Water	5.06±0.04	2.26±0.02	4.66±0.04	3.59±0.07	4.96±0.09	3.91±0.03

*Data represent the mean values±SE of three independent experiments.

(4) 알코올 비율별 수율

동결 건조한 더덕 분말 50g을 EtOH 30%, 50%, 70%, 100% 비율로 3회 반복 3회 반복 추출한 다음, 추출액을 감압농축기로 완전히 농축한 후에 무게를 측정하는 방법으로 에탄올 비율별 회수율을 조사하였다. 그 결과, 6개 지역 재배 더덕 모두에서 EtOH 50% 추출물에서 EtOH 30%와 70% 추출물에서보다 상대적으로 높은 회수율을 보였으며, EtOH 100% 추출물에서는 낮은 수율을 보였다.

Table 12. Yield of extract sample according to the percentage EtOH solvent

solvent	Yield (g)					
	Culture region					
	Hwasun	Uljin	Hoengseong	Jeju	Jecheon	Muju
EtoH 30%	16.12±0.44	13.08±0.65	16.55±0.44	7.17±0.05	11.04±0.41	17.64±0.60
EtoH 50%	19.50±0.55	14.46±0.47	18.22±0.54	10.53±0.18	13.65±0.85	16.62±0.55
EtoH 70%	16.31±0.09	12.67±0.09	16.64±0.36	7.13±0.17	12.34±0.36	14.24±0.74
EtoH 100%	6.36±0.48	5.11±0.14	4.73±0.25	2.70±0.74	14.24±0.33	4.89±0.07

*Data represent the mean values±SE of three independent experiments.

2. 지역별 재배더덕의 추출조건에 따른 생리기능성 검증

각 추출조건에 따른 더덕의 다양한 생리기능성의 차이를 검증함으로서 최적 추출물 조제의 기준을 설정하고자 한다.

가. 항산화 활성 검정

(1) DPPH radical 소거능

각 추출물을 Choi 등(2003)의 방법에 의한 수소전자공여능에 의해 항산화 활성을 측정하였다. 여러 농도의 시료를 메탄올 (or DMSO) 용매로 용해하여, 900 μL의 DPPH 용액 (100 μM)과 각 시료 100 μL를 혼합하여 교반한다. 이 혼합 시료를 암소에서 30분간 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 수소전자공여능은 각 실험을 3회 반복하여 평균을 낸 다음 대조구에 대한 흡광도의 감소 정도를 다음 식에 의하여 계산하였다.

$An= (A_0-A)/A_0 \times 100$

An : DPPH radical 소거능에 대한 항산화 활성(%)

A_0 : 시료가 첨가되지 않은 DPPH 용액의 흡광도

A : 반응용액 중의 DPPH와 시료의 반응한 흡광도

Table 13. DPPH radical scavenging activities according to culture region in *Codonopsis lanceolata*

Culture region	DPPH radical scavenging activity, % of control				
	Concentration (mg/mL)				
	0.5	1	2.5	5	10
Hwasun	7.67±0.30	8.50±0.70	10.07±0.29	11.37±0.46	13.45±0.49
Uljin	8.70±0.24	9.84±0.24	10.98±0.76	13.50±0.35	16.54±1.07
Hoengseong	8.89±0.15	10.18±0.26	10.41±0.35	12.47±0.40	15.27±0.24
Jeju	9.53±0.25	10.68±0.23	11.48±0.43	13.84±0.35	14.98±0.41
Jecheon	9.34±0.38	10.64±0.91	12.59±0.35	13.69±0.43	17.25±0.30
Muju	10.03±0.80	11.25±0.77	12.70±0.46	13.58±0.61	18.16±0.26

*Data represent the mean values±SE of three independent experiments.

Table 14. DPPH radical scavenging activities according to extract solvents in *Codonopsis lanceolata*

Culture region	Solvent	DPPH radical scavenging activity, % of control				
		Concentration (mg/mL)				
		1	2.5	5	10	20
Hwasun	EtOH	9.21±0.13	11.65±1.53	19.57±1.40	22.00±1.20	41.51±0.24
	MeOH	11.17±1.12	14.14±0.62	19.30±0.59	22.17±1.38	52.45±0.40
	D.W	7.82±0.76	12.17±0.72	18.28±0.67	22.50±0.80	54.15±0.34
	Acetone	7.13±0.84	9.87±0.81	13.43±0.78	18.40±0.74	43.62±0.31
	Ether	9.70±0.76	13.16±1.24	15.81±1.20	20.04±1.14	46.47±1.19
Uljin	EtOH	8.55±1.36	10.34±1.65	18.39±1.50	21.13±0.69	41.60±1.30
	MeOH	9.95±0.78	12.96±0.75	18.19±0.71	23.74±0.12	51.62±0.81
	D.W	5.56±0.54	10.02±0.52	16.28±0.48	24.12±1.07	51.07±0.41
	Acetone	9.01±0.99	11.69±0.96	15.17±0.92	20.04±0.87	43.53±0.82
	Ether	9.05±0.76	12.82±0.72	15.47±0.70	19.72±0.67	43.91±0.81
Hoengseong	EtOH	9.51±0.13	11.65±0.69	19.57±0.12	20.32±0.40	39.49±0.82
	MeOH	10.69±0.98	13.68±0.95	18.87±0.89	22.86±1.49	55.87±0.56
	D.W	6.70±0.44	11.11±0.41	17.29±0.39	24.10±0.46	53.97±0.47
	Acetone	9.60±0.31	11.44±1.13	14.94±1.09	19.82±1.02	46.53±1.18
	Ether	9.89±0.80	14.64±1.18	17.24±1.14	21.40±1.08	47.23±0.98
Jeju	EtOH	9.36±0.71	11.50±0.69	19.44±0.63	22.65±1.45	39.49±0.60
	MeOH	10.19±0.84	13.19±0.81	18.41±0.76	22.62±0.32	51.90±0.65
	D.W	9.88±0.41	14.96±1.09	20.88±1.02	23.82±0.22	54.53±0.61
	Acetone	8.86±0.87	11.36±1.02	14.86±0.98	19.75±0.93	45.16±0.60
	Ether	8.10±0.47	11.90±0.45	14.59±0.44	18.88±0.41	45.53±0.60
Jecheon	EtOH	6.99±1.10	9.19±1.07	17.33±0.98	21.38±0.70	42.61±0.60
	MeOH	9.81±0.80	12.83±0.78	18.07±0.73	22.86±1.54	52.08±0.72
	D.W	8.49±0.89	13.97±2.09	19.95±1.94	25.63±0.23	52.85±1.38
	Acetone	6.16±0.26	8.60±0.25	12.21±0.24	17.25±0.23	49.87±0.79
	Ether	7.88±0.54	10.69±0.52	14.38±0.50	18.68±0.48	50.21±0.78
Muju	EtOH	7.11±0.67	9.31±0.65	17.44±0.60	22.72±1.04	41.41±0.18
	MeOH	12.74±0.33	15.66±0.32	20.73±0.30	24.93±0.43	51.80±1.07
	D.W	10.42±0.40	15.65±0.45	21.51±0.41	22.22±0.50	51.73±0.95
	Acetone	8.15±1.11	10.59±1.35	14.12±1.29	19.05±1.22	49.61±0.68
	Ether	7.23±0.24	11.07±0.23	13.78±0.22	18.11±0.21	49.96±0.68

*Data represent the mean values±SE of three independent experiments.

Table 15. DPPH radical scavenging activities according to the percentage of EtOH solvent in *Codonopsis lanceolata*

Cuture region	Solvent	DPPH radical scavenging activity, % of control				
		Concentration (mg/mL)				
		1	2.5	5	10	20
Hwasun	EtOH30%	3.65±0.34	7.88±0.91	11.08±1.14	23.39±1.02	34.47±1.40
	EtOH50%	3.24±0.44	8.03±0.38	10.65±0.57	21.31±0.28	26.70±0.48
	EtOH70%	4.71±0.45	9.32±0.21	12.14±0.38	20.30±0.83	31.40±0.33
	EtOH100%	9.32±0.95	11.09±0.24	16.17±0.56	25.31±0.77	41.13±1.83
Uljin	EtOH30%	3.64±0.38	8.69±0.94	9.93±0.66	21.24±1.38	31.36±1.99
	EtOH50%	2.33±0.11	8.65±0.24	11.56±0.41	22.90±0.42	26.50±0.77
	EtOH70%	4.30±0.15	9.12±0.73	12.39±0.47	23.29±0.53	35.10±1.68
	EtOH100%	7.26±0.36	10.67±0.36	13.42±0.42	25.31±1.09	44.31±0.31
Hoengseong	EtOH30%	4.14±0.75	9.96±0.59	12.11±0.80	23.26±2.04	36.12±2.87
	EtOH50%	4.77±0.03	6.54±0.43	11.68±0.20	20.68±0.16	27.25±0.27
	EtOH70%	3.44±0.45	8.66±0.21	12.23±0.34	20.52±1.33	31.99±1.26
	EtOH100%	7.42±0.91	12.10±0.73	12.80±0.91	25.04±0.21	43.61±0.40
Jeju	EtOH30%	6.07±0.44	7.17±0.94	11.33±0.82	23.48±1.35	37.48±0.46
	EtOH50%	2.89±0.17	9.97±0.09	9.25±0.57	20.86±0.97	31.11±1.54
	EtOH70%	4.92±0.06	10.32±0.13	13.58±0.87	22.80±1.30	35.70±0.88
	EtOH100%	8.28±0.33	13.31±0.43	16.35±0.35	25.97±1.54	40.71±0.42
Jecheon	EtOH30%	6.39±0.26	9.31±0.91	12.31±0.83	21.59±1.19	36.71±0.77
	EtOH50%	2.90±0.10	8.66±0.22	9.12±0.35	21.53±1.25	27.47±0.12
	EtOH70%	4.60±0.22	9.15±0.36	13.20±0.50	20.25±0.56	30.73±0.52
	EtOH100%	8.30±0.94	13.24±0.67	14.11±0.37	28.03±1.12	43.48±0.76
Muju	EtOH30%	3.95±0.86	9.91±0.62	12.53±0.83	23.64±0.99	36.53±1.17
	EtOH50%	5.08±0.73	7.56±0.32	9.96±0.25	21.15±1.92	26.22±1.02
	EtOH70%	3.28±0.55	8.75±0.75	12.27±0.35	21.03±1.17	30.99±0.81
	EtOH100%	9.27±0.67	12.44±0.76	13.95±0.90	25.88±1.59	42.69±1.53

*Data represent the mean values±SE of three independent experiments.

1, 2.5, 5, 10, 20 mg/mL 등 5 가지 농도에서의 추출용매별, EtOH 추출농도별 DPPH 소거 활성을 분석한 결과를 보면, 지역별 재배더덕 간에는 큰 차이를 보이지 않지만 물 추출과 메탄올 추출에서 상대적으로 높게 나타났으며, 또한 EtOH 농도가 높을수록 비교적 높은 효능을 보였다. 전체적으로 DPPH 소거활성의 증가는 농도에 비례하는 농도의존적 경향을 나타냈다.

2) ABTS 양이온(ABTS·+) 소거능

7.4 mM ABTS(2,2'-azinbis-(3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid) 용액과 2.6 mM과황산칼륨(potassium persulphate)을 혼합, 암소에서 약 15시간 반응시킨 후 414 nm에서 흡광도가 1.5가 되도록 희석하였다. 희석한 용액 3 ㎖에 각 농도별로 조제한 시료 150 ㎕를 첨가, vortex mixer로 10초간 진탕하고 실온에 90분간 방치한 후 414 nm에서 흡광도를 측정하였다. 한편, ascorbic acid를 시료와 같은 농도로 조제하여 동일한 방법으로 흡광도를 측정함으로써 비교하였다. 양이온 소거능은 AEAC(relative ascorbic acid equivalent antioxidant capacity)로 나타내었으며, 이는 ascorbic acid의 소거능을 1.000으로 하였을 때 동일농도 시료의 ABTS 양이온 소거능을 나타내는 것으로 다음과 같은 식에 의해 계산하였다.

$$RAEAC = \frac{Caa}{\triangle Aaa} \times \frac{\triangle As}{Cs}$$

⊿Aaa : ascorbic acid 넣었을 때 흡광도 변화, Caa : ascorbic acid의 농도

⊿As : 시료 넣었을 때 흡광도 변화, Cs : 시료 농도

Table 16. ABTS radical scavenging activities according to extract solvents in *Codonopsis lanceolata*

Culture region	Solvent	ABTS radical scavenging activity, % of control					
		Concentration (mg/mL)					
		0.5	1	2.5	5	10	20
Hwasun	EtOH	8.17±0.69	11.13±0.67	18.71±0.61	22.21±0.67	34.70±1.02	65.11±0.71
	MeOH	7.48±1.79	10.58±1.73	12.87±0.94	23.16±1.00	35.06±1.63	70.15±1.78
	D.W	5.28±0.62	8.15±0.60	19.01±0.53	26.87±0.48	38.25±1.11	68.66±0.94
	Acetone	6.35±0.84	10.20±0.81	19.51±0.72	26.58±0.66	35.84±1.41	71.72±1.44
	Ether	7.79±0.42	10.27±0.41	18.07±1.05	27.53±0.93	37.89±1.71	72.26±0.22
Uljin	EtOH	6.71±0.94	9.71±0.91	12.35±0.89	21.58±0.80	33.17±0.68	65.54±0.71
	MeOH	7.68±0.60	10.78±0.58	15.55±0.55	25.83±0.49	37.34±1.24	70.30±0.59
	D.W	6.65±0.51	9.48±0.49	20.18±0.44	27.93±0.39	40.01±0.33	69.01±1.12
	Acetone	6.57±0.84	10.40±1.27	15.21±0.59	22.66±0.53	31.93±0.96	70.00±0.42
	Ether	4.62±0.84	7.18±0.81	13.48±0.78	23.46±0.69	34.72±1.77	71.01±2.05
Hoengseong	EtOH	6.64±0.96	9.65±0.93	17.35±0.85	26.05±0.76	38.48±2.04	71.64±0.90
	MeOH	9.38±0.58	12.42±0.56	17.16±1.09	26.43±1.15	39.20±1.41	71.14±1.02
	D.W	8.28±0.63	11.06±0.61	21.57±0.54	29.19±0.49	43.19±0.62	71.75±1.24
	Acetone	6.35±0.71	10.20±0.69	16.87±0.72	24.17±0.66	33.74±0.58	73.00±2.07
	Ether	5.93±1.34	8.46±1.31	15.28±1.21	25.05±1.07	36.97±1.34	71.16±1.52
Jeju	EtOH	7.77±0.40	10.74±0.39	18.76±0.93	27.32±0.83	38.65±1.39	72.09±0.75
	MeOH	8.50±0.85	11.56±0.82	18.84±0.97	28.73±0.85	40.65±0.71	71.88±0.34
	D.W	5.67±0.91	8.53±0.89	19.34±0.78	27.18±0.71	40.22±1.35	71.21±1.55
	Acetone	8.99±0.99	12.73±0.95	21.78±0.85	28.65±0.78	37.65±0.68	72.52±0.30
	Ether	7.72±0.55	10.20±0.53	16.89±0.49	26.48±0.44	38.62±0.36	71.66±0.62

Jecheon	EtOH	6.38±0.63	9.39±0.61	17.94±1.10	24.16±1.13	37.35±0.94	72.82±1.77
	MeOH	7.68±1.07	10.78±1.03	15.55±0.98	25.29±1.34	39.02±1.89	72.09±1.34
	D.W	8.47±0.60	11.25±0.58	21.74±0.51	29.34±0.46	41.18±0.38	69.09±0.61
	Acetone	6.57±0.84	10.40±0.81	19.69±0.72	26.75±0.86	34.52±1.13	71.23±1.14
	Ether	6.48±0.52	8.99±0.51	12.17±0.76	22.31±0.68	34.22±1.58	69.09±0.74
Muju	EtOH	7.51±0.81	10.48±0.78	18.71±0.93	28.53±0.37	39.22±1.57	71.96±1.52
	MeOH	9.11±0.60	12.16±0.58	17.10±0.97	26.82±1.11	40.88±1.72	72.20±0.62
	D.W	5.35±0.79	8.22±0.77	19.06±0.68	26.93±0.61	40.13±1.63	70.37±1.94
	Acetone	6.35±1.18	10.20±1.13	19.51±1.01	26.58±0.92	34.38±1.42	71.08±0.63
	Ether	7.66±0.57	10.13±0.55	15.59±0.67	25.33±0.60	38.26±1.75	70.99±0.82

*Data represent the mean values±SE of three independent experiments.

Table 17. ABTS radical scavenging activities according to the concentration of ethanol solvent from 6 regions cultured *Codonopsis lanceolata*

Culture region	Solvent	ABTS radical scavenging activity, % of control[z]					
		Concentration (㎎/㎖)					
		0.5	1	2.5	5	10	20
Hwasun	EtOH30%	4.95±0.58[by]	13.94±0.21[ay]	19.87±1.28[ay]	42.27±0.07[ay]	62.05±0.78[ay]	82.91±0.19[ay]
	EtOH50%	5.35±0.59[ab]	6.13±0.25[b]	10.47±0.13[b]	29.05±0.34[c]	38.08±1.08[d]	73.04±0.54[c]
	EtOH70%	7.21±0.18[a]	13.21±0.71[a]	20.23±0.34[a]	35.45±1.27[b]	55.96±1.04[b]	77.33±1.15[b]
	EtOH100%	4.32±0.97[b]	13.17±1.45[a]	18.89±0.96[a]	33.50±0.52[b]	46.87±0.41[c]	79.35±0.30[b]
Uljin	EtOH30%	7.21±0.46[a]	10.02±0.26[b]	16.11±1.57[bc]	37.56±1.24[a]	55.26±0.87[b]	77.20±1.30[b]
	EtOH50%	3.40±0.64[b]	7.78±0.27[c]	13.58±0.38[c]	27.53±1.08[b]	40.12±1.12[d]	76.83±0.18[b]
	EtOH70%	5.98±0.40[a]	15.15±0.27[a]	23.83±0.58[a]	42.42±0.89[a]	58.94±0.65[a]	83.61±0.50[a]
	EtOH100%	5.52±0.69[a]	10.59±0.64[b]	17.83±0.69[b]	30.84±2.92[b]	46.79±0.28[c]	79.31±0.58[b]
Hoengseong	EtOH30%	5.61±0.70[ab]	12.06±0.23[a]	19.70±1.20[a]	38.73±0.18[a]	58.21±1.23[a]	79.52±0.84[ab]
	EtOH50%	4.78±0.74[b]	5.86±0.22[b]	14.70±0.71[b]	29.02±1.20[b]	38.51±0.94[c]	73.63±0.20[c]
	EtOH70%	7.86±0.70[a]	12.72±0.85[a]	21.40±0.92[a]	37.30±0.93[a]	52.02±0.78[b]	78.23±1.48[b]
	EtOH100%	6.20±0.66[ab]	13.68±0.80[a]	22.69±1.17[a]	38.11±0.44[a]	54.72±1.11[ab]	81.77±0.33[a]
Jeju	EtOH30%	5.91±0.43[b]	11.96±0.38[b]	19.75±0.30[b]	38.00±2.41[b]	57.51±1.08[b]	81.62±1.17[b]
	EtOH50%	6.86±0.68[b]	8.28±0.42[c]	17.21±0.61[b]	30.01±1.80[c]	44.46±0.78[c]	80.50±0.37[b]
	EtOH70%	8.83±0.46[a]	13.53±0.41[ab]	25.74±1.47[a]	35.38±0.23[b]	59.46±1.05[b]	84.11±0.13[a]
	EtOH100%	7.00±0.29[b]	14.05±0.88[a]	25.91±0.55[a]	44.46±0.05[a]	63.15±0.26[a]	85.62±0.02[a]
Jecheon	EtOH30%	5.04±0.80[b]	11.93±0.40[b]	16.44±0.27[c]	34.59±0.82[bc]	59.03±1.60[b]	77.88±1.70[b]
	EtOH50%	4.83±0.79[b]	5.63±0.53[c]	12.47±0.89[d]	31.23±2.13[c]	48.86±0.75[c]	77.15±0.51[b]
	EtOH70%	7.83±0.38[a]	11.77±0.71[b]	22.42±0.82[b]	38.28±1.95[b]	55.64±1.37[b]	80.37±1.07[b]
	EtOH100%	4.89±0.78[b]	15.52±0.50[a]	25.12±0.56[a]	44.77±0.51[a]	65.31±1.82[a]	85.08±0.20[a]

Muju	EtOH30%	7.26±0.90[a]	11.98±0.63[a]	15.08±1.04[b]	32.33±0.58[b]	52.62±0.44[b]	77.62±0.66[b]
	EtOH50%	5.25±0.33[b]	7.22±0.31[c]	11.45±0.97[c]	31.67±1.78[b]	38.73±0.81[c]	73.60±0.20[c]
	EtOH70%	5.03±0.37[b]	10.14±0.39[b]	23.16±0.98[a]	33.53±1.36[ab]	53.58±1.12[b]	77.36±0.80[b]
	EtOH100%	7.57±0.41[a]	12.01±0.30[a]	21.22±0.90[a]	37.80±1.33[a]	59.89±0.95[a]	83.04±0.51[a]

[z]Data represent the mean values±SE of three independent experiments. [y]Meanswiththesameletterincolumn are not significantly different at $p<0.05$ level by Duncan's multiple range test.

ABTS 양이온 소거활성을 추출용매별, EtOH 추출농도별 검증한 결과를 보면, 추출물의 농도가 증가할수록 비례적으로 증가되는 경향을 보였지만, EtOH, MeOH, DW, Aceton, Ether 등 추출용매 간에는 큰 차이를 보이지 않았으며, 대체적으로 고농도의 EtOH에서 상대적으로 높은 소거활성을 나타냈다.

(2) 아질산염 소거능

시료 추출물의 아질산염 소거작용의 측정은 1mM $NaNO_2$ 20㎕에 시료의 추출액 40㎕와 0.1N HCl(pH 1.2) 또는 0.2M citrate buffer (pH 4.2, 6.0)를 140㎕ 사용하여 부피를 200㎕로 맞추었다. 이 반응액을 37℃ 항온수조에서 1시간 반응시킨 후 2% acetic acid 1000㎕, Griess 시약 (30% acetic acid로 조제한 1% sulfanilic acid와 1% naphthylamine을 1:1 비율로 혼합한 것, 사용직전에 조제) 80㎕를 가하여 잘 혼합시켜 빛을 차단한 상온에서 15분간 반응시킨 후 520nm에서 흡광도를 측정하여 아래와 같이 아질산염 소거능을 구하였다.

N(%) = [1-(A-C)/B]×100

N : nitrite scavenging ability

A : absorbance of 1mM $NaNO_2$ added sample after standing for 1hour

B : absorbance of 1$NaNO_2$

C : absorbance of control

Table 18. Nitrite scavenging activities according to the concentration of ethanol solvent from 6 regions cultured *Codonopsis lanceolata*

Culture region	Solvent	Nitrite scavenging activity (%)[z]		
		pH 1.2	pH 4.2	pH 6.0
Hwasun	EtOH30%	76.94[ay]	27.60[ay]	1.44[ay]
	EtOH50%	65.27[b]	10.51[b]	N.D[b]
	EtOH70%	63.40[b]	3.53[c]	N.D[b]
	EtOH100%	33.80[c]	N.D[d]	N.D[b]
Uljin	EtOH30%	74.14[a]	21.20[a]	2.47[a]
	EtOH50%	60.78[b]	14.52[b]	N.D[b]
	EtOH70%	57.80[b]	8.12[c]	N.D[b]
	EtOH100%	34.30[c]	N.D[d]	N.D[b]
	EtOH30%	76.66[a]	26.25[a]	N.D

Hoengseong	EtOH50%	65.27[b]	12.42[b]	N.D
	EtOH70%	61.16[b]	8.98[b]	N.D
	EtOH100%	32.03[c]	N.D[c]	N.D
Jeju	EtOH30%	77.40[a]	21.49[a]	1.34[a]
	EtOH50%	65.27[b]	12.89[b]	N.D[b]
	EtOH70%	59.29[b]	7.83[c]	N.D[b]
	EtOH100%	32.87[c]	N.D[d]	N.D[b]
Jecheon	EtOH30%	73.86[a]	22.54[a]	1.54[a]
	EtOH50%	66.11[b]	11.37[b]	N.D[b]
	EtOH70%	61.06[b]	7.35[bc]	N.D[b]
	EtOH100%	35.95[c]	N.D[c]	N.D[b]
Muju	EtOH30%	77.87[a]	25.98[a]	N.D
	EtOH50%	66.67[b]	13.28[b]	N.D
	EtOH70%	63.49[b]	6.02[c]	N.D
	EtOH100%	33.89[c]	N.D[d]	N.D

[z]Data represent the mean values±SE of three independent experiments. [y]Meanswiththesameletterincolumn are not significantly different at $p<0.05$ level by Duncan's multiple range test.

pH 1.2, 4.2, 6.0에서의 각 시료 추출물을 반응하여 EtOH 추출농도에 따른 아질산염에 대한 소거능을 조사한 결과, 반응 용액의 pH 1.2일 경우 시료 추출물 대부분이 아질산염을 60% 이상 분해시킬 수 있었지만, 100% EtOH 추출농도에서는 40% 이하의 분해능을 나타냈다. 또한 pH 4.2에서도 대부분 30% 이하의 아질산염 소거활성을 나타냈지만, pH 6.0에서는 거의 대부분 활성이 없었다. 따라서 pH 변화에 따른 더덕의 EtOH 추출농도별 추출물의 아질산염 소거활성은 pH 1.2에서 가장 높았으며 pH가 증가함에 따라 활성도 점차 감소되거나 상실되었다.

나. 항산화효소 활성 검정

(1) 효소액 조제

시료 0.5g에 Extract Buffer [100 mM K-PO_4 buffer(pH7.5), 100 mM EDTA, 1% PVP, 100 mM PMSF] 2 ml로 균질화하여 15.000g 로 20분간 원심분리한 다음 상층액을 항산화활성 측정에 사용하였다. Ascorbate peroxidase (APX)의 경우 extraction buffer에 위의 조성액에 10mM를 첨가하여 사용하였다. 단백질 정량은 BSA를 표준물질로 사용하여 Bradford (1976)방법에 따라 측정하였다.

(2) SOD (SuperOxide Dismutase)

SOD효소 활성 검정은 분석용 Kit (Sigma사,19160)를 사용하여 측정하였다. 즉, SOD의 효소활성이 NBT(Nitroblue tetrazolium)의 환원을 저해하는 능력을 검정하는 photochemical NBT method를 사용하였다. 반응액은 50 mM carbonic buffer (pH 10.2), 0.1 mM EDTA, 0.1 mM

Xanthine, 0.025 mM NBT로 하였으며, NBT환원 저해율을 흡광도 450nm에서 측정하였다. 각 시료에 대하여 3회 반복으로 하였으며, SOD효소 활성은 다음의 계산식에 의해 환산하였다.

$$\text{SOD활성 (NBT환원 저해율, \%)} = \{[(A_{blank1}-A_{blank3})-(A_{sample}-A_{blank2})] / (A_{blank1}-A_{blank3})\times 100$$

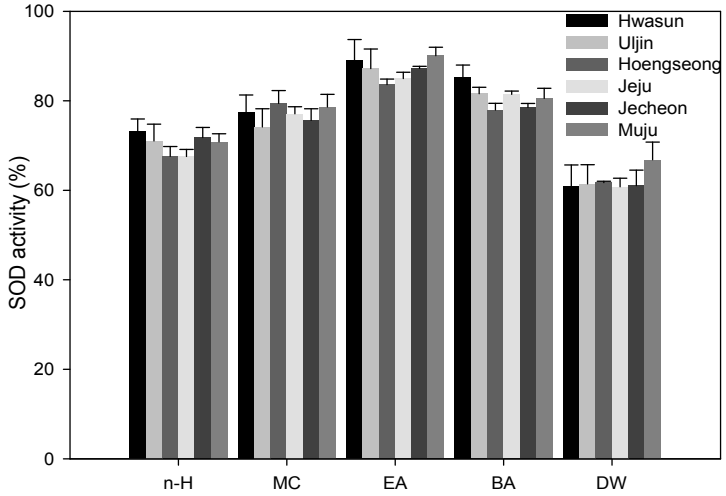


Fig. 2. SOD activities according to solvent fractions in *Codonopsis lanceolata*. The bars represent the standard error. n-H: *n*-hexane, MC: Methylene chloride, EA: Ethyl acetate, BA: Butyl alcohol, DW: distilled water

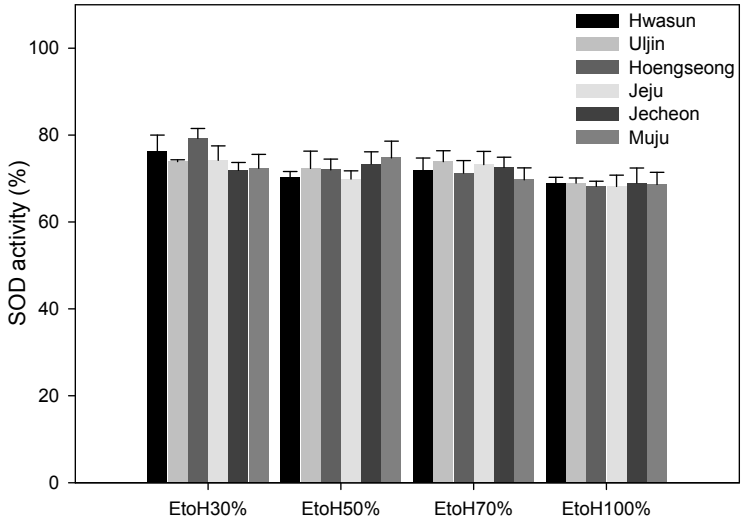


Fig. 3. SOD activities according to the percentage of EtOH solvent in *Codonopsis lanceolata*. The bars represent the standard error.

(3) CAT (Catalase)

CAT활성은 Aebi 등(1984)의 방법에 의해 측정하였으며, 반응액은 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0)와 10 mM H2O2로 하였다. CAT 활성은 반응액에 추출액을 가한 다음 240 mM에 2분간의 흡광도 변화를 측정하였다.

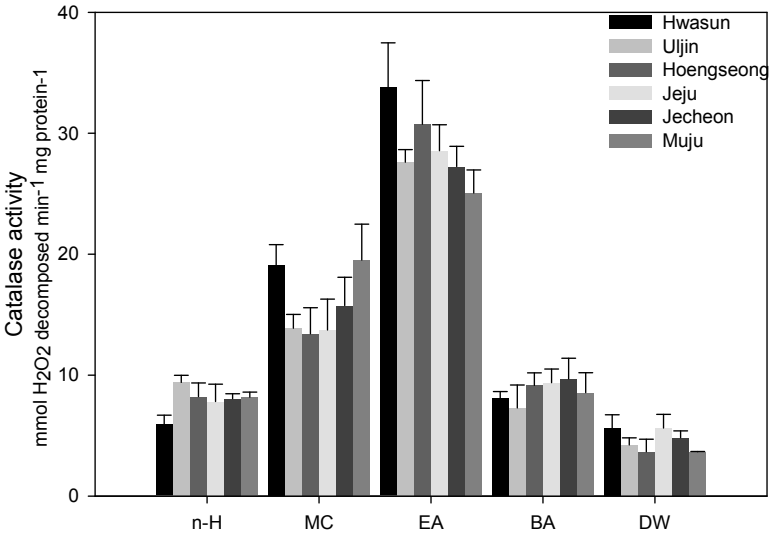


Fig. 4. CAT activities according to solvent fractions in *Codonopsis lanceolata*. The bars represent the standard error. n-H: *n*-hexane, MC: Methylene chloride, EA: Ethyl acetate, BA: Butyl alcohol, DW: distilled water

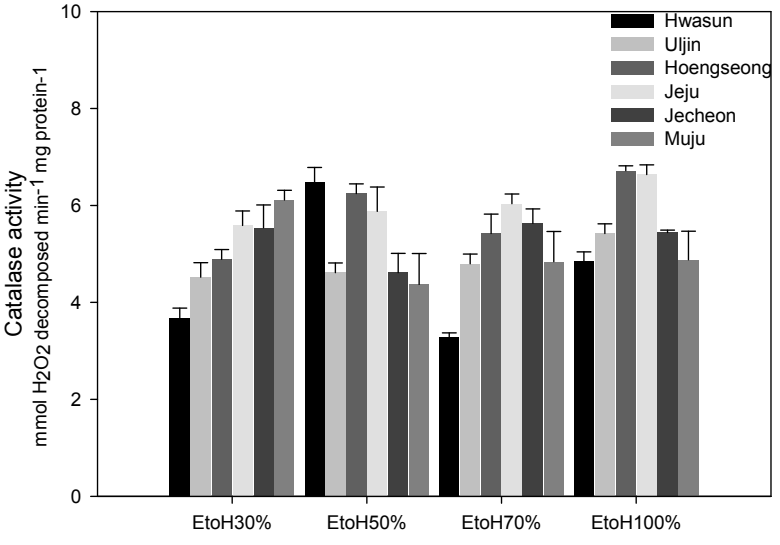


Fig. 5. CAT activities according to the percentage of EtOH solvent in *Codonopsis lanceolata*. The bars represent the standard error.

(4) APX (Ascorbate Peroxidase)

APX 활성은 Nacano and Asada(1981)방법에 따라 ascorbate의 산화 정도를 290nm에서 2분간의 흡광도 변화를 측정하였다. APX의 반응액은 0.5mM ascorbate와 0.2mM H2O2가 첨가된 100mM potassium phosphate buffer (pH 7.5)로 하였다.

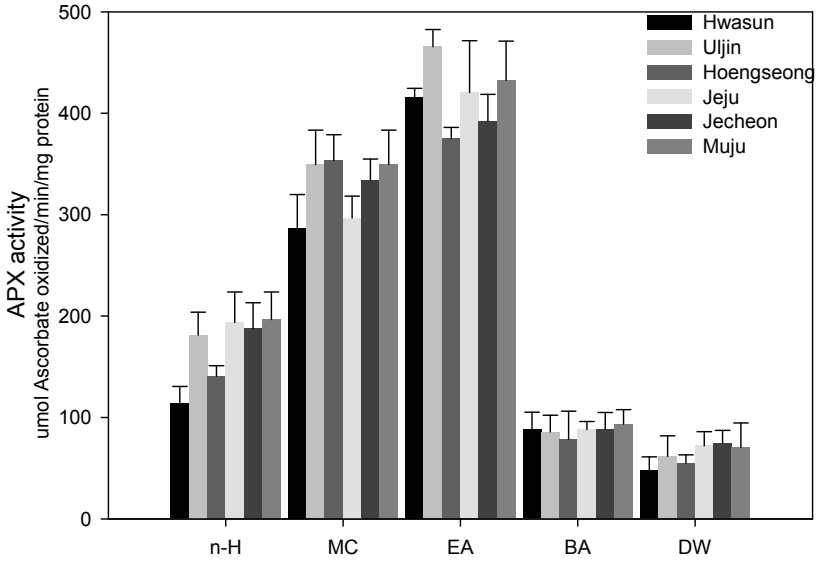


Fig. 6. APX activities according to solvent fractions in *Codonopsis lanceolata*. The bars represent the standard error. n-H: *n*-hexane, MC: Methylene chloride, EA: Ethyl acetate, BA: Butyl alcohol, DW: distilled water

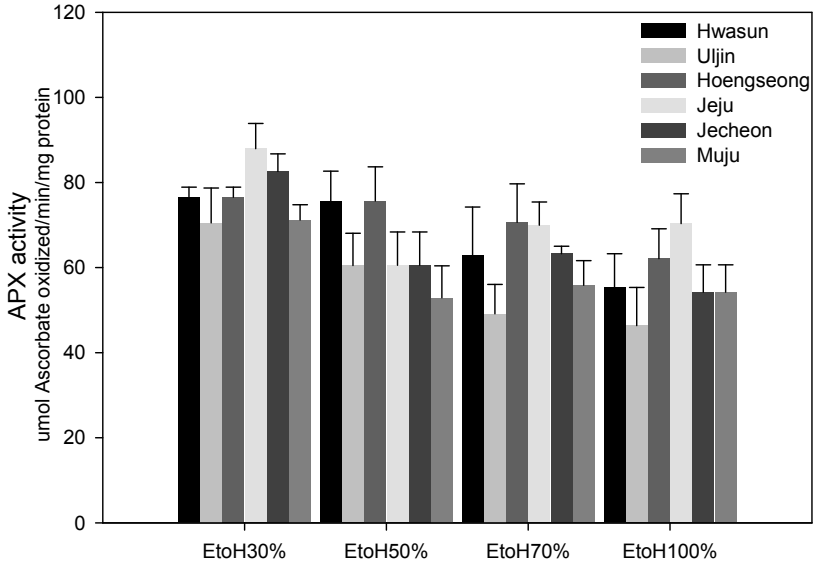


Fig. 7. APX activities according to the percentage of EtOH solvent in *Codonopsis lanceolata*. The bars represent the standard error.

(5) POD (Peroxidase)

POD 활성은 Egley 등 (1983)의 방법에 의해 측정하였으며, 반응액은 최종농도가 40mM K-PO_4 buffer (pH6.9), 1.5mM guaiacol, 6.5mM H_2O_2가 되도록 만든다. POD 활성은 반응액에 sample을 혼합하여 spectrophotometer를 이용해서 470nm에서 2분간 흡광도 변화를 측정하였다.

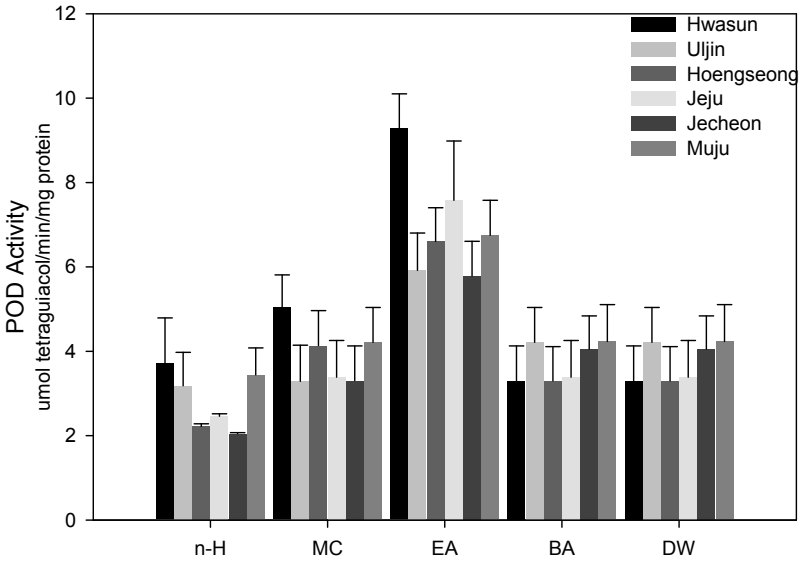


Fig. 8. POD activities according to solvent fractions in *Codonopsis lanceolata*. The bars represent the standard error. n-H: *n*-hexane, MC: Methylene chloride, EA: Ethyl acetate, BA: Butyl alcohol, DW: distilled water

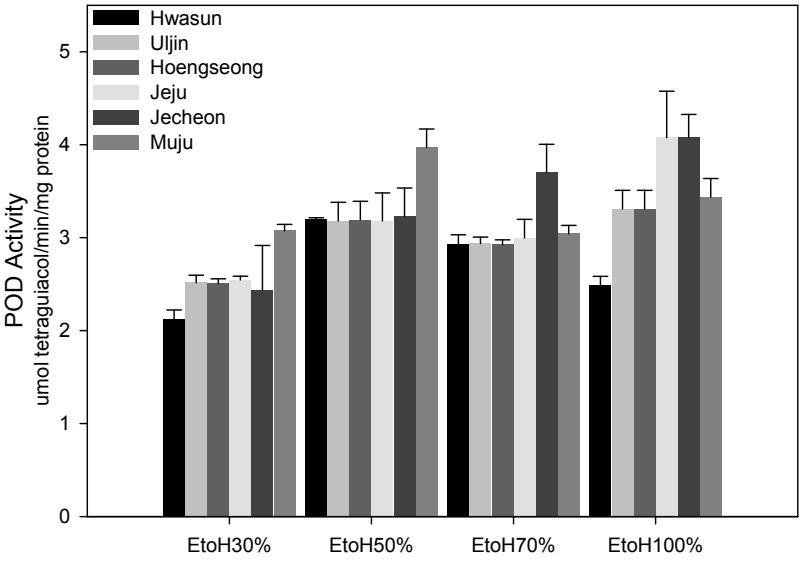


Fig. 9. POD activities according to the percentage of EtOH solvent in *Codonopsis lanceolata*. The bars represent the standard error.

각 더덕 시료의 분획별, EtOH 추출농도별 추출물의 항산화효소 활성을 보면, SOD 활성의 경우 EA>BA>MC>n-H>DW 순으로 활성이 높게 나타났으며, EtOH 추출농도와 지역별 재배더덕 간에는 큰 차이를 보이지 않았다. CAT 활성의 경우는 EA 분획물에서 가장 높은 활성을 보였고, 또한 EtOH 50%와 100% 추출농도와 제주 재배더덕에서 상대적으로 활성이 높은 결과를 나타냈다. APX 활성의 경우는 EA>MC>n-H>BA>DW 순으로 활성이 높게 나타났지만, 특히 BA와 DW 분획물에서 상대적으로 낮은 활성을 보였다. EtOH 추출농도에 따른 APX 활성

은 30% 추출농도에서 비교적 높은 결과를 보였으며 재배지역에 있어서는 제주 재배더덕이 다소 높은 활성을 나타냈다. POD 활성의 경우을 보면, EA 분획물에서 상대적으로 높은 활성을 나타냈고 그 외의 분획물에서는 큰 차이를 보이지 않았으며, 또한 EtOH 50%와 100% 추출농도에서 다소 높은 활성을 보였다.

다. 인체암세포주에 대한 더덕의 항암 활성 분석

6개 지역 재배 더덕의 인체암세포주에 대한 항암 효과를 측정하기 위해 MTT (3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5- diphenyltetrazoliumbromide) assay를 실시하여 측정하였다. 자궁암세포인 HeLa, 유방암세포인 MCF-7, 폐암세포인 Calu-6, 인간유래 신장 정상세포인 HEK293 세포주를 96well plate에 분주하고 37℃, 5%, CO_2 incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 배양한 세포에 시료 농도가 50, 100, 200, 400, 800 ㎍/ml가 되도록 10㎕ 처리한 후, 각각 24시간 배양하였고, 0.2㎎/㎖의 MTT 용액 10㎕를 각 well에 넣고 incubator에서 4시간 동안 배양하였다. 배양 종료 후 상등액을 제거하고 각 well에 100㎕의 DMSO를 첨가하여 상온에서 10분 동안 반응시킨 후 microplate reader로 540nm에서 흡광도를 측정하였고, 세포독성은 시료의 흡광도를 대조군의 흡광도에 대한 백분율로 나타내었다.

Table 19. Cytotoxicity of extracts from *Codonopsis lanceolata* cultured at different region on three cancer cell lines and Human embryonic kidney 293(HEK293) cell

Cell line	Culture region	Cell viability (% of control)				
		Concentration (ug/mL)				
		50	100	200	400	800
HeLa	Hwasun	92.25±4.63	79.64±7.95	80.53±9.70	78.31±8.64	73.09±3.03
	Uljin	93.99±3.32	94.63±4.37	93.07±4.14	87.46±3.39	88.12±1.17
	Hoengseong	95.28±1.56	97.80±3.63	97.12±1.50	92.47±1.23	84.84±0.39
	Jeju	92.08±7.41	87.90±1.59	85.51±0.79	83.56±2.61	83.16±4.69
	Jecheon	99.23±5.85	97.12±9.27	99.27±7.91	86.35±4.47	75.28±3.12
	Muju	94.39±1.56	91.91±2.16	87.39±6.88	84.07±1.53	81.91±2.20
Calu-6	Hwasun	87.44±6.99	84.11±3.72	83.35±4.10	84.91±3.10	83.32±2.21
	Uljin	89.75±5.30	88.88±7.30	86.15±8.89	82.33±3.66	68.97±2.11
	Hoengseong	92.67±1.65	92.85±5.05	89.90±4.08	91.18±0.25	88.09±5.40
	Jeju	84.57±2.73	81.99±1.14	78.00±1.25	78.14±2.21	79.71±2.77
	Jecheon	71.19±5.46	74.33±4.74	74.40±5.26	67.80±3.75	64.28±2.96
	Muju	87.82±2.44	82.16±5.47	79.73±1.77	73.91±5.00	67.43±1.26
MCF-7	Hwasun	90.51±5.50	89.53±4.58	91.59±3.97	93.88±6.22	92.86±3.95
	Uljin	94.70±1.68	95.21±1.99	95.70±3.13	93.61±3.74	90.86±1.73
	Hoengseong	92.10±0.54	95.24±0.43	93.38±1.42	93.61±1.61	93.59±5.59
	Jeju	91.02±3.41	90.05±4.27	91.40±5.19	90.05±0.76	90.40±4.21
	Jecheon	89.38±2.74	86.65±1.76	86.47±1.56	86.56±8.38	87.22±4.40
	Muju	81.47±8.50	83.27±3.63	83.56±3.20	81.12±2.62	76.25±5.66

HEK293	Hwasun	106.12±2.04	103.74±4.72	99.33±2.48	91.17±2.45	89.35±0.23
	Uljin	100.92±0.42	97.96±1.77	92.70±0.51	88.37±2.84	88.39±4.40
	Hoengseong	102.28±1.67	98.53±4.40	92.22±3.45	85.94±0.49	84.81±3.77
	Jeju	102.92±7.27	103.85±4.92	102.24±2.36	96.79±1.26	87.64±0.37
	Jecheon	103.94±0.75	101.78±1.07	96.48±2.95	90.39±0.43	87.86±3.32
	Muju	99.78±1.82	94.10±3.72	84.85±2.91	86.96±6.80	86.78±3.33

*Data represent the mean values±SE of three independent experiments.

Table 20. Cytotoxicity of extracts according to the percentage of EtOH solvent on human cancer cell line (Calu-6)

Cell line	Culture region	Solvent	Cell viability (% of control)					
			Concentration (ug/mL)					
			50	100	200	400	800	1000
Calu-6	Hwasun	EtoH 30%	97.07±2.67	94.02±5.77	91.89±4.79	81.31±4.78	73.33±9.70	71.44±4.60
		EtoH 50%	89.32±1.84	85.80±1.33	85.24±2.07	83.97±0.67	78.89±1.09	69.23±6.16
		EtoH 70%	82.57±5.10	82.53±1.82	82.91±3.57	79.69±0.49	71.66±7.51	64.30±4.63
		EtoH100%	85.67±6.53	77.38±4.38	73.36±6.07	66.42±2.32	64.23±2.80	63.48±3.32
	Uljin	EtoH 30%	90.89±5.30	89.09±5.29	85.19±6.84	82.45±7.17	78.45±2.40	70.69±7.54
		EtoH 50%	88.13±0.89	85.31±0.55	88.26±0.52	82.10±4.80	59.92±3.33	41.72±5.67
		EtoH 70%	85.27±8.29	83.54±2.67	80.62±1.04	72.81±4.26	56.37±2.63	38.85±4.65
		EtoH100%	82.91±7.73	82.34±3.48	75.24±9.78	72.98±6.96	67.81±7.77	57.23±1.91
	Hoengseong	EtoH 30%	85.79±5.75	83.06±4.78	81.66±5.60	80.81±6.10	79.41±7.77	59.64±4.75
		EtoH 50%	86.34±1.06	82.24±2.76	80.62±1.89	77.98±2.37	70.48±3.11	59.49±1.44
		EtoH 70%	83.21±7.02	80.78±1.88	79.10±2.69	74.08±4.38	65.13±4.41	47.82±7.25
		EtoH100%	69.31±8.73	59.10±6.94	61.10±6.48	55.39±9.30	53.72±6.18	50.51±6.19
	Jeju	EtoH 30%	90.27±5.01	81.49±7.54	80.29±1.98	77.81±6.24	62.46±4.77	61.66±3.19
		EtoH 50%	98.45±1.60	89.67±4.62	92.87±3.54	88.96±1.66	51.00±5.88	35.66±5.20
		EtoH 70%	88.96±1.87	83.89±4.00	86.08±3.62	86.53±1.98	52.66±1.51	38.46±6.28
		EtoH100%	94.25±9.73	90.34±7.64	85.05±9.03	79.94±4.03	70.74±2.48	68.83±7.40
	Jecheon	EtoH 30%	92.13±2.16	81.91±2.02	87.77±9.61	84.48±7.35	76.51±10.08	76.16±6.80
		EtoH 50%	92.69±9.78	84.86±2.41	78.93±8.08	77.03±6.88	73.88±3.76	47.45±4.37
		EtoH 70%	80.71±3.49	82.82±6.68	69.31±6.26	66.70±6.34	38.07±8.34	37.63±6.45

		EtoH100%	93.29±3.31	90.41±6.91	83.67±5.50	82.11±7.09	74.19±8.85	58.97±5.42
	Muju	EtoH 30%	87.53±5.61	77.83±2.32	75.20±6.64	72.84±9.26	59.93±4.32	54.58±3.88
		EtoH 50%	87.73±7.75	85.72±1.63	80.55±5.42	78.88±7.57	77.60±7.91	47.26±5.76
		EtoH 70%	86.50±5.56	83.01±0.79	77.66±4.75	72.90±6.11	35.58±3.59	35.35±5.29
		EtoH100%	88.07±8.46	83.71±8.14	81.97±8.53	79.18±9.12	70.76±4.23	68.97±1.87

*Data represent the mean values±SE of three independent experiments.

Table 21. Cytotoxicity of extracts according to the percentage of EtOH solvent on human cancer cell line (MCF-7)

Cell line	Culture region	Solvent	Cell viability (% of control)					
			Concentration (ug/mL)					
			50	100	200	400	800	1000
MCF-7	Hwasun	EtoH 30%	89.90±7.95	91.86±9.70	89.98±5.14	90.54±8.28	85.64±4.74	79.50±4.91
		EtoH 50%	93.56±8.03	88.93±2.04	83.99±5.06	80.99±2.93	80.76±3.43	75.70±10.67
		EtoH 70%	80.68±3.83	75.39±2.81	71.09±2.81	69.64±3.57	66.04±0.07	65.02±2.78
		EtoH100%	89.41±8.45	86.76±9.58	81.36±5.35	77.35±6.05	73.22±6.14	72.72±5.04
	Uljin	EtoH 30%	87.66±10.52	86.95±1.54	81.34±3.51	80.88±4.96	75.20±4.10	74.65±4.32
		EtoH 50%	94.71±3.71	94.22±5.59	86.81±8.44	82.25±9.84	74.80±8.58	52.86±3.06
		EtoH 70%	88.76±2.64	84.99±7.06	78.18±0.98	75.09±8.26	75.77±8.33	58.03±6.63
		EtoH100%	83.36±6.24	67.78±6.48	66.39±8.11	60.00±4.87	60.16±5.08	58.26±2.84
	Hoengseong	EtoH 30%	88.95±4.44	87.33±9.29	85.03±8.83	85.03±1.63	77.12±3.80	69.72±4.04
		EtoH 50%	84.46±1.17	78.44±0.70	78.49±2.81	78.25±7.08	70.34±3.99	60.56±6.13
		EtoH 70%	86.87±2.66	78.60±2.63	77.12±2.38	73.44±0.66	65.06±3.18	64.48±2.99
		EtoH100%	77.27±3.47	70.89±5.90	71.36±9.57	70.92±5.53	63.79±9.27	62.42±2.03
	Jeju	EtoH 30%	87.33±6.61	81.39±6.43	77.49±4.83	74.48±5.39	65.37±1.78	54.63±5.80
		EtoH 50%	87.21±2.71	83.06±1.68	79.68±1.89	76.03±2.94	56.48±1.02	46.63±5.01
		EtoH 70%	85.43±1.19	79.50±3.10	77.09±0.64	72.55±1.85	56.44±2.08	49.91±2.51
		EtoH100%	79.13±5.49	75.40±9.94	64.51±2.90	60.22±2.03	51.35±3.32	54.91±6.57
	Jecheon	EtoH 30%	90.89±6.80	83.78±7.04	83.88±8.24	75.89±6.13	57.69±6.89	52.84±1.49
		EtoH 50%	93.46±7.61	80.20±5.02	78.87±2.95	74.03±2.84	51.17±5.54	43.09±8.44
		EtoH 70%	67.01±2.35	65.06±9.55	52.89±2.32	50.34±4.32	31.66±6.05	28.88±5.35

	EtoH100%	84.16±7.63	78.47±8.28	71.05±8.09	70.60±3.27	68.42±7.18	66.56±5.23
Muju	EtoH 30%	90.83±12.38	77.28±1.01	69.66±6.36	66.81±5.96	66.09±8.77	62.17±11.03
	EtoH 50%	83.38±1.47	85.06±5.39	77.76±8.51	74.17±1.59	75.45±6.44	67.08±1.79
	EtoH 70%	74.62±3.06	69.04±1.82	65.84±3.43	66.40±1.38	45.83±3.23	38.67±1.11
	EtoH100%	84.34±5.53	74.52±1.14	72.02±6.14	65.08±5.98	61.12±5.18	60.55±9.94

*Data represent the mean values±SE of three independent experiments.

MTT방법에 의한 각 더덕시료 추출물의 인체암세포주에 대한 세포독성도를 확인한 결과, 800 ug/mL 농도에서도 지역별 재배더덕 간에 인체암세포주에 대해서 다소 낮은 독성도를 보였는데 이는 차후에 추가실험을 수행하여 재현성을 검증할 필요가 있다고 사료된다. 또한 EtOH 추출농도별로 보면 Calu-6와 MCF-7 세포주 모두에서 제주지역 재배더덕에서 좋은 효과가 있는 것으로 나타났으며, 전반적으로 70% EtOH 추출물에서 비교적 높은 독성도를 보였음을 알 수 있었다.

라. 제주지역 재배 더덕의 주정추출 용매비율에 따른 생리기능성 검증

본 연구에 있어 기능성 소재개발을 위해 수행된 모든 실험의 시료는 제주지역 재배 더덕을 사용하였으며, 최적의 용매비율을 선정하고자 주정알코올의 농도를 30%, 50%, 70%, 100%로 하여 각 추출조건에 따른 다양한 생리기능성의 차이를 검증함으로서 최적 추출물 조제의 기준을 설정하고자 한다.

(1) 총 폴리페놀 함량 측정

더덕 추출물에 대한 총 폴리페놀 함량은 spectrophotometer를 이용, 725nm에서 흡광도를 측정하여 분석하였다. 더덕추출물을 일정 농도로 녹이고 0.25㎖씩 Test tube에 취한 후, 여기에 10배 희석한 Folin & Ciocalteu’s phenol reagent 0.5㎖을 혼합하여, 상온에서 5분간 방치하였다. 그 후, 7.5% Sodium carbonate(Na_2Co_3) 0.5㎖을 혼합하여 30˚C에서 90분간 방치한 후, spectrophotometer를 이용, 725nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 폴리페놀 함량을 구하기 위하여 표준물질 Chlorogenic acid을 이용하여 검량선을 작성하고 더덕의 총 폴리페놀 함량을 구하여 정량하였다.

(2) 총 플라보노이드 함량 측정

총 플라보노이드 함량 측정은 더덕 추출물을 1mg/mL의 농도로 80% methanol을 이용하여 용해 한 다음 Diethylene glycol 10mL, 1N-NaOH 0.1mL을 가한 후, 37˚C incubator에 1시간 반응시키고, 420nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로는 Naringin을 사용하였다.

Table 22. Total polyphenol and flavonoid contents according to the concentration of ethanol solvent in *Codonopsis lanceolata*

EtOH Conc.	Total polyphenol (mg/g extract)	Total flavonoid (mg/g extract)
30%	131.28±1.25[c]	8.45±0.63[d]
50%	136.27±1.52[b]	10.18±0.26[c]
70%	143.65±2.16[a]	10.59±0.32[b]
100%	141.52±2.35[a]	11.82±0.78[a]

[z]Data represent the mean values±SE of three independent experiments. Means with the same letter in column are not significantly different by Duncan's multiple range test at $p<0.05$ level.

(3) 항산화 활성 검정

분석방법은 상기 기술한 방법과 동일하다.

Table 23. DPPH radical scavenging activities according to the concentration of ethanol solvent in *Codonopsis lanceolata*

EtOH Conc.	DPPH radical scavenging activity, % of control				
	Concentration (mg/mL)				
	1	2.5	5	10	20
30%	6.52±0.25[c]	7.32±0.33[d]	11.19±0.63[c]	23.26±1.16[b]	37.35±1.55[b]
50%	7.81±0.28[b]	11.83±0.52[b]	12.16±0.45[bc]	23.73±1.08[b]	39.08±1.32[ab]
70%	8.56±0.15[a]	10.27±0.26[c]	13.45±0.68[b]	25.52±1.23[ab]	40.62±1.38[ab]
100%	8.35±0.23[a]	13.48±0.51[a]	16.21±0.57[a]	27.81±1.29[a]	43.58±1.51[a]

[z]Data represent the mean values±SE of three independent experiments. Means with the same letter in column are not significantly different by Duncan's multiple range test at $p<0.05$ level.

(4) 인체암세포주에 대한 항암활성 및 항비만 효능 분석

분석방법은 하기 기술한 방법과 동일하다.

Table 24. Cytotoxicity of *Codonopsis lanceolata* extracts according to the concentration of ethanol solvent on three human cancer cell lines

Cell line	EtOH Conc.	Cell viability (% of control)					
		Concentration (ug/mL)					
		50	100	200	400	800	1000
HeLa	30%	91.25±0.58[b]	85.62±0.67[b]	73.18±0.28[a]	62.17±1.95[a]	52.32±1.09[a]	41.62±2.67[a]
	50%	95.28±1.25[a]	85.53±1.05[b]	70.15±1.18[ab]	57.22±0.08[ab]	47.19±2.18[ab]	36.28±1.53[ab]
	70%	91.62±0.62[b]	87.29±0.75[ab]	68.95±0.62[b]	55.18±1.76[b]	45.68±1.25[b]	34.92±1.51
	100%	94.16±1.51[ab]	88.65±0.52[a]	71.38±1.53[ab]	59.35±2.92[ab]	49.59±1.86[ab]	42.05±0.95[a]
Calu-6	30%	93.06±1.62[a]	87.27±1.56[a]	78.56±1.28[a]	65.28±2.25[a]	56.35±2.52[a]	44.62±1.46[a]
	50%	90.38±2.53[a]	83.75±0.92[ab]	74.45±0.63[b]	59.26±0.58[b]	48.08±1.18[b]	38.25±0.62[b]
	70%	89.52±1.86[a]	82.27±0.55[b]	75.62±1.08[ab]	58.83±1.16[b]	50.27±0.62[b]	39.72±1.87[b]
	100%	90.65±0.38[a]	87.08±1.62[a]	72.35±1.16[b]	64.69±0.85[a]	61.23±1.65[a]	47.56±1.28[a]
MCF-7	30%	86.92±1.51[a]	84.32±1.92[a]	67.25±1.26[a]	54.68±2.18[ab]	46.36±1.31[a]	37.82±0.26[a]
	50%	88.25±1.08[a]	81.28±0.63[ab]	65.63±1.68[ab]	51.36±1.06[bc]	39.18±0.53[b]	31.82±3.08[ab]
	70%	86.85±1.62[a]	76.23±1.26[c]	60.59±1.02[ab]	49.57±1.52[c]	40.76±1.67[b]	30.45±1.86[b]

100%	85.28±1.68[a]	78.15±0.58[bc]	62.38±1.86[ab]	56.37±0.56[a]	48.15±1.85[a]	36.25±0.35[ab]

[z]Data represent the mean values±SE of three independent experiments. Means with the same letter in column are not significantly different by Duncan's multiple range test at $p<0.05$ level.

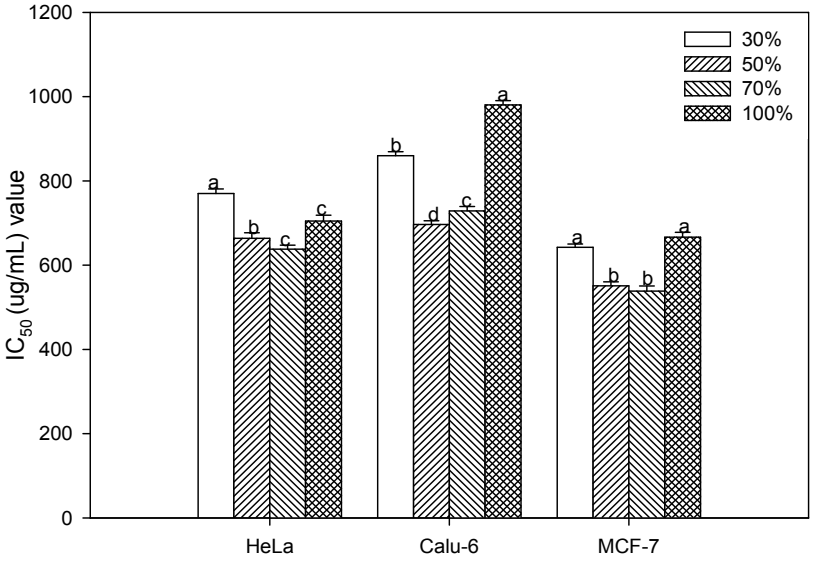


Fig. 10. Cytotoxic activity (IC_{50}values) of Codonopsis lanceolata extracts according to the concentration of ethanol solvent on three human cancer cell lines. IC_{50} is defined as the extract concentration a twhich there was a 50% decrease in cell number. Each bar represent mean±SE of three experiments in duplicate. Means followed by the same letter are not significantly different at $p<0.05$.

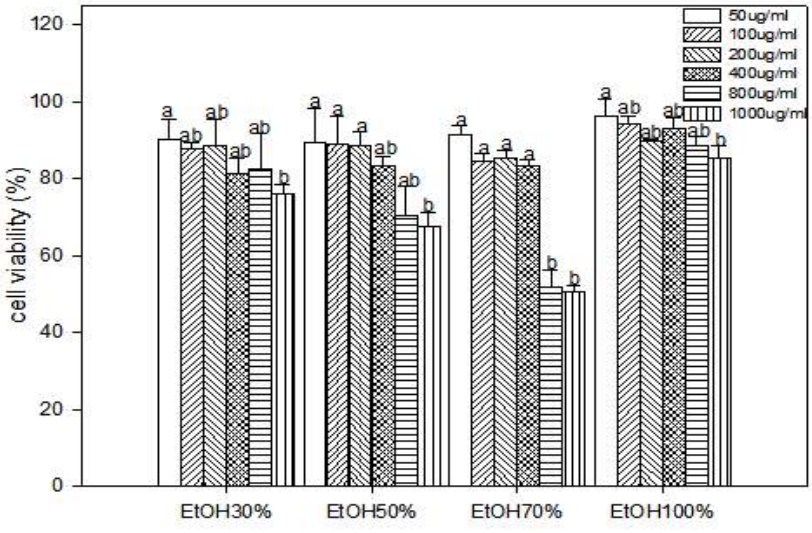


Fig. 11. Cell viability according to the concentration of ethanol solvent from *Codonopsis lanceolata* in 3T3-L1 preadipocyte cell growth in vitro. Each bar represent mean±SE of three experiments in duplicate. Means followed by the same letter are not significantly different at $p<0.05$.

주정추출 농도별 더덕추출물의 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량은 70%, 100% 추출물에서 많은 양을 나타냈다. DPPH 라디칼 소거활성은 농도의존적으로 증가하였으며, 100% 추출물에서 가장 높았다. 인체암세포주에 대한 세포독성 효과는 50% 및 70% 추출물에서 더 높았으며, 특히 MCF-7 세포에서의 세포독성 효과는 다른 세포보다 상대적으로 더 높았다. IC50 값은 MCF-7 세포에서 가장 낮게 나타났으며, 3T3-L1 세포에 대해 세포독성 효과는 30%, 100% 추출물에서 상대적으로 다소 높게 나타났다.

마. 지역별 재배 더덕의 3T3-L1 cell 이용한 항비만 효과 검정

3T3-L1 세포는 한국세포주은행에서 분양(KCLB NO. 10092.1)받아 배양해 사용하였다. 세포는 10% FBS이 포함된 DMEM을 사용하여 75T-flask에서 5% CO_2, 37℃ incubator에서 배양하였다. 3~4일 후 세포가 confluent하게 되면 0.05% Trypsin/0.53mM EDTA를 처리하여 세포를 분리하고 원심분리기(2000rpm, 2min)에서 세포를 모은 후 세포밀도를 1×10^4 cell/ml로 희석하여 12well plate에 1mL 씩 planting하여 배양하였다. 2일에 한번씩 10% FBS가 포함된 새로운 DMEM 배양액으로 바꿔주고 3~4일 후 세포가 confluent하게 되면 이틀 후에 DMEM 배양액에 5mg/mL insulin, 0.25mM dexamethasone, 0.5mM IBMX가 첨가된 배지를 처리하여 분화를 유도하였다. 2일 후에는 5mg/mL insulin만 포함된 배양액으로 교환하고 2일에 한 번씩 새 배양액으로 갈아주면서 분화를 유도하였다(Mac Dougald OA, Hwang C.S., Fan H., Lane M.D. 1995). 6일째에는 insulin이 함유되어 있지 않은 배양액을 세포를 배양한 후 7일째에 시료를 처리하고 24시간 후에 Oil red O 염색을 실시하였다.

(1)세포독성 측정

세포 생존율의 측정을 위한 MTT(methylthiazolyldiphenyltetrazolium bromide) assay는 Sladowski 등의 방법을 따라 행하였다. 배양시킨 3T3-L1 세포를 96well plate에 1×105 cell/well로 분주하여 16~18시간 배양한 후 농도별로 희석한 시료 추출물을 24시간 처리하였다. 5mg/ml로 용해한 MTT용액을 10uL/990ul medium으로 첨가한 후 5% CO2, 37℃에서 3시간 배양하였다. 배양이 끝난 다음 배양액을 제거한 뒤 DMSO 200uL/well로 넣고 20분간 교반하여 ELISA reader로 595nm에서 흡광도를 측정하였다.

(2) Oil red O 염색

세포 배양액을 버리고 세포를 고정시키기 위해 10% formaldehyde를 50uL 씩 각 well에 넣고 4℃에서 1시간 동안 배양하였다. 그 후에 formaldehyde를 버리고 PBS로 세 번 세척한 후 Oil red O 염색액(Oil red O 0.25g을 isopropyl alcohol 50mL에 녹인 용액을 증류수와 3:2의 비율로 혼합한 후 0.45um filter로 여과한 용액)을 500uL씩 넣고 다시 상온에서 1시간 동안 염색한 후 PBS로 3회 세척하였다. 염색된 세포는 현미경으로 관찰하였으며, 관찰 후 well당 500uL의 isoprophyl alcohol로 지방세포 내 염색된 염색약을 추출하여 spectrophotometer로 520nm에서 흡광도를 측정하였다.

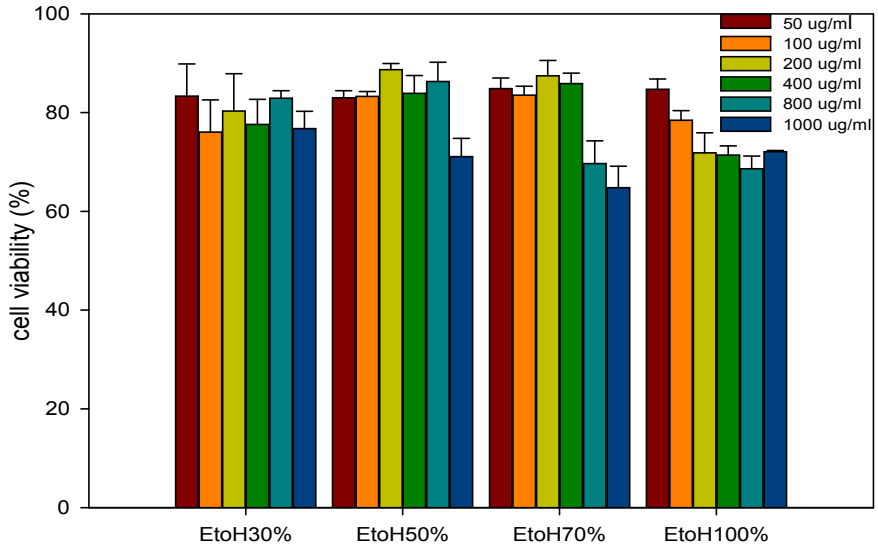


Fig. 12. Cell viability according to the percentage of EtOH solvent from Hwasun cultured *Codonopsis lanceolata* in 3T3-L1 preadipocyte cell growth in vitro. The bars represent the standard error.

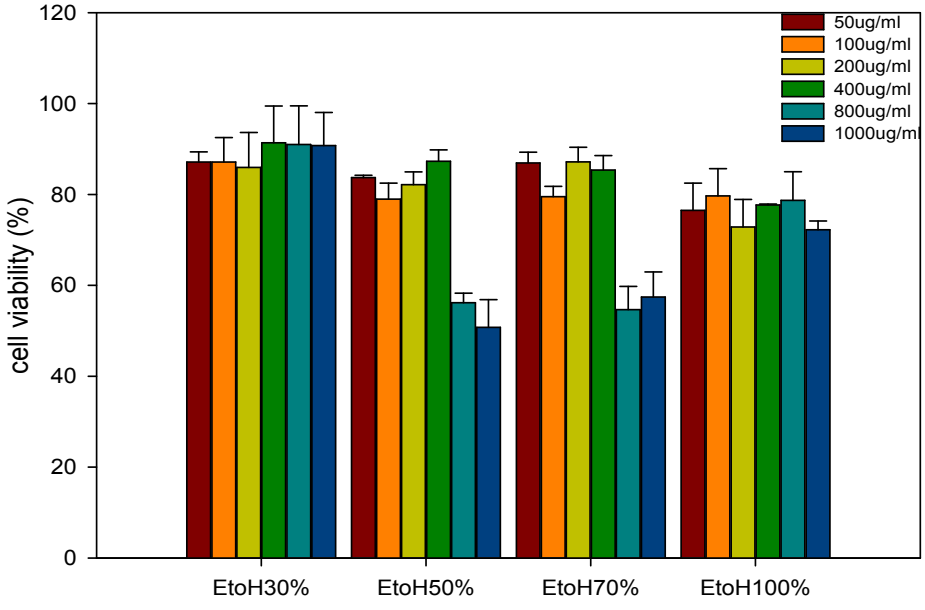


Fig. 13. Cell viability according to the percentage of EtOH solvent from Ulsin cultured *Codonopsis lanceolata* in 3T3-L1 preadipocyte cell growth in vitro. The bars represent the standard error.

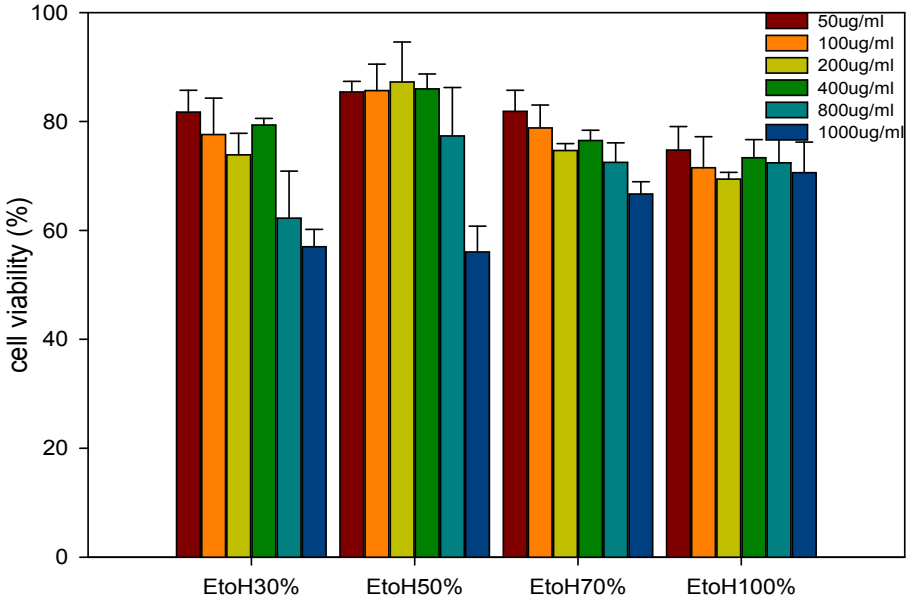


Fig. 14. Cell viability according to the percentage of EtOH solvent from Hoengseong cultured *Codonopsis lanceolata* in 3T3-L1 preadipocyte cell growth in vitro. The bars represent the standard error.

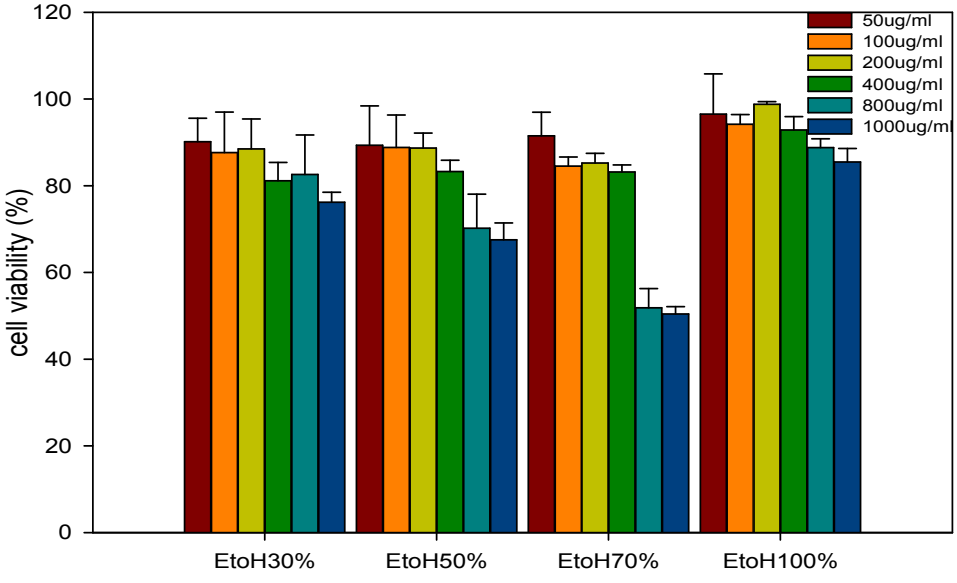


Fig. 15. Cell viability according to the percentage of EtOH solvent from Jeju cultured *Codonopsis lanceolata* in 3T3-L1 preadipocyte cell growth in vitro. The bars represent the standard error.

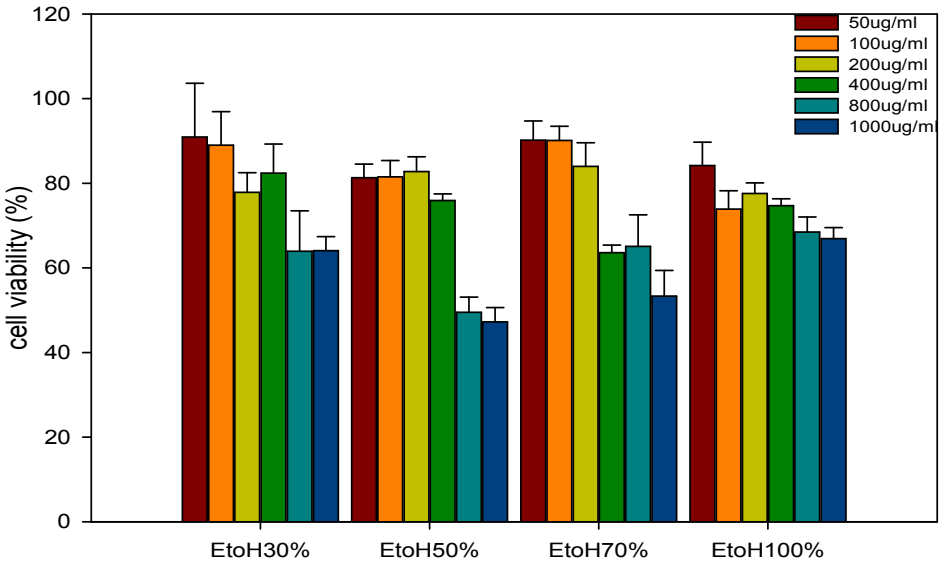


Fig. 16. Cell viability according to the percentage of EtOH solvent from Jecheon cultured *Codonopsis lanceolata* in 3T3-L1 preadipocyte cell growth in vitro. The bars represent the standard error.

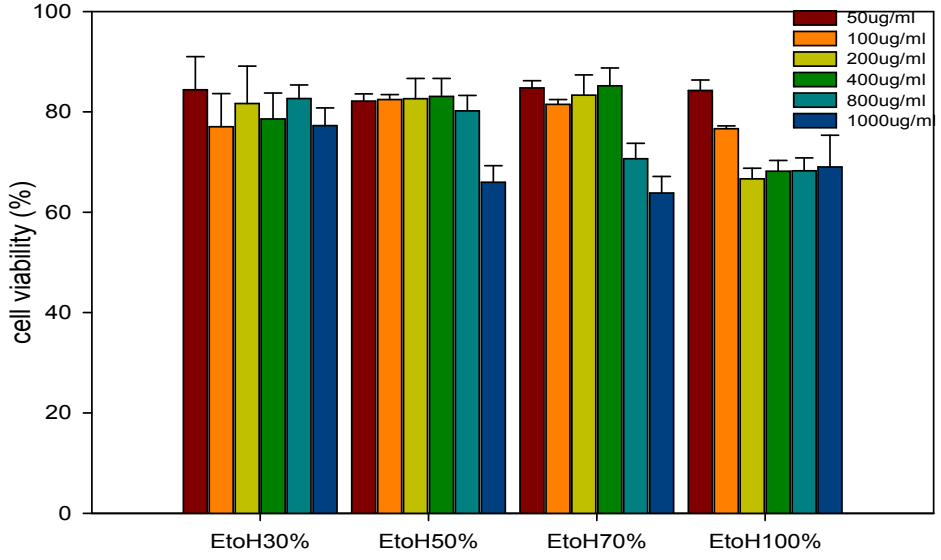


Fig. 17. Cell viability according to the percentage of EtOH solvent from Muju cultured *Codonopsis lanceolata* in 3T3-L1 preadipocyte cell growth in vitro. The bars represent the standard error.

3T3-L1 세포의 세포독성에 미치는 영향을 조사한 결과, 각 시료의 처리농도에 따라 세포 생존율 정도가 농도 의존적으로 감소하였으며, 전체적으로 제주 재배더덕과 EtOH 70% 추출농도에서 상대적으로 다소 높은 효능을 보였다.

바. 지역별 재배더덕의 면역세포 생육증진 효과 검증

추출용매 EtOH의 농도에 따른 면역기능 증강효과는 인간 면역세포인 T cell과 B cell (RPMI 8226, KCLB No.10155)을 이용하여 검증하였다. 세포의 생육은 10% FBS를 함유하는 RPMI 1640 배지에서 5% CO_2, 37℃에서 배양하였으며, 면역기능 증강효과는 24 well plate에 세포를 2.5×10^4 cells 농도로 조절한 후, 0.2 μm의 filter로 여과되어진 시료 (0.5 μg/μL)들은 24시간 경과한 각각의 well에 첨가한 후 8일간 다시 배양하였다. 8일 동안 배양하면서 각 well의 세포를 혈구계수기로 세포 수를 측정하였다. 그리고 시료 추출물들을 처리하지 않은 대조구와 비교하여 세포의 생육과 세포 수에 따라 면역활성을 측정하였다.

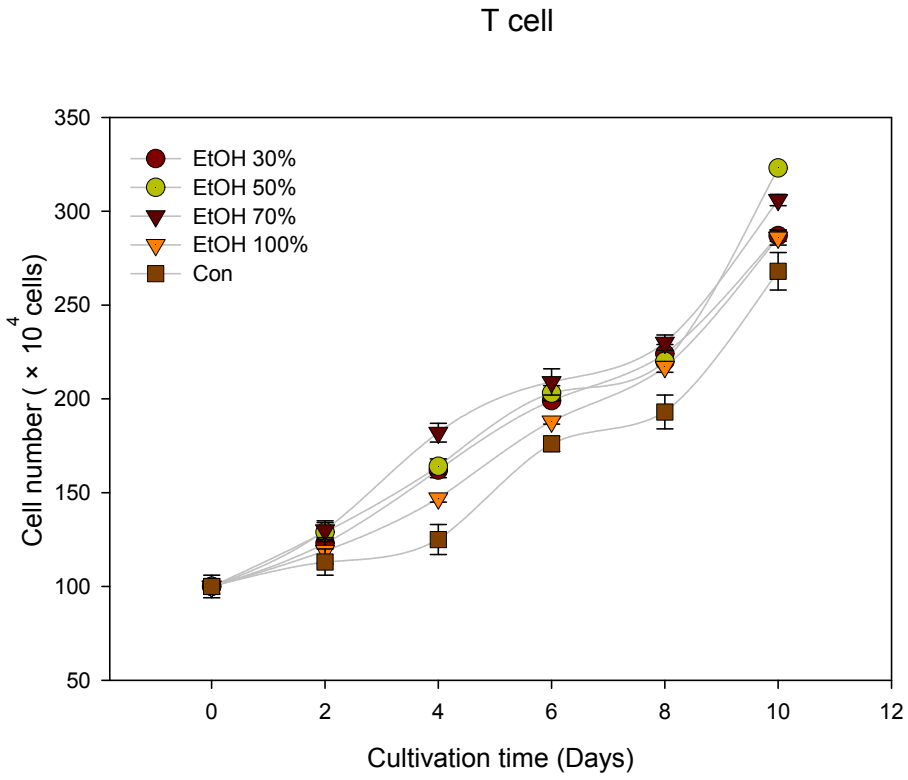


Fig. 18. The cell growth of human T cell line according to the percentage of EtOH solvent from Hwasun cultured *Codonopsis lanceolata*. The bars represent the standard error.

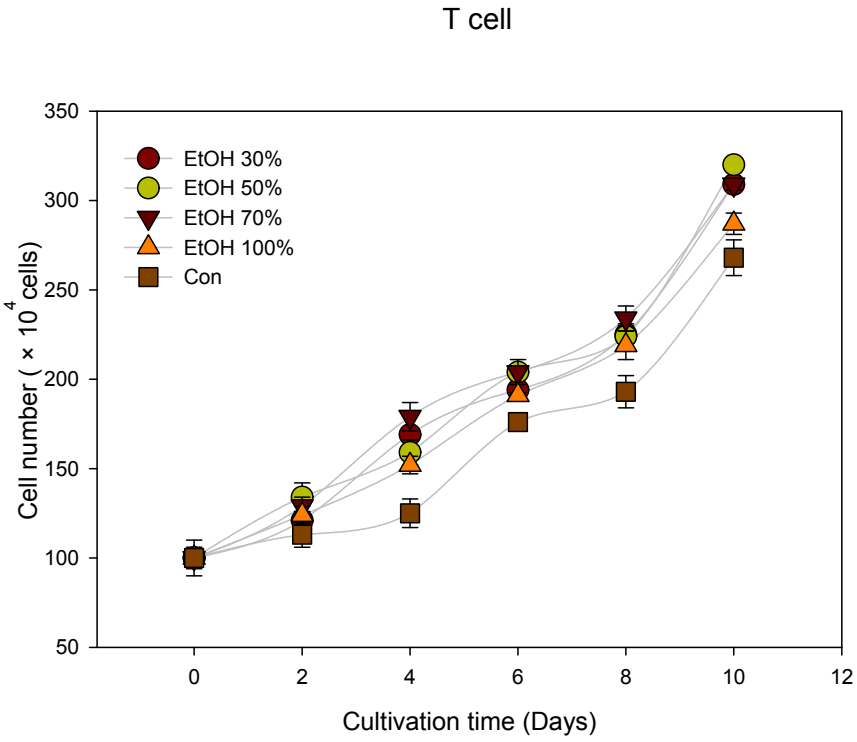


Fig. 19. The cell growth of human T cell line according to the percentage of EtOH solvent from Uljin cultured *Codonopsis lanceolata*. The bars represent the standard error.

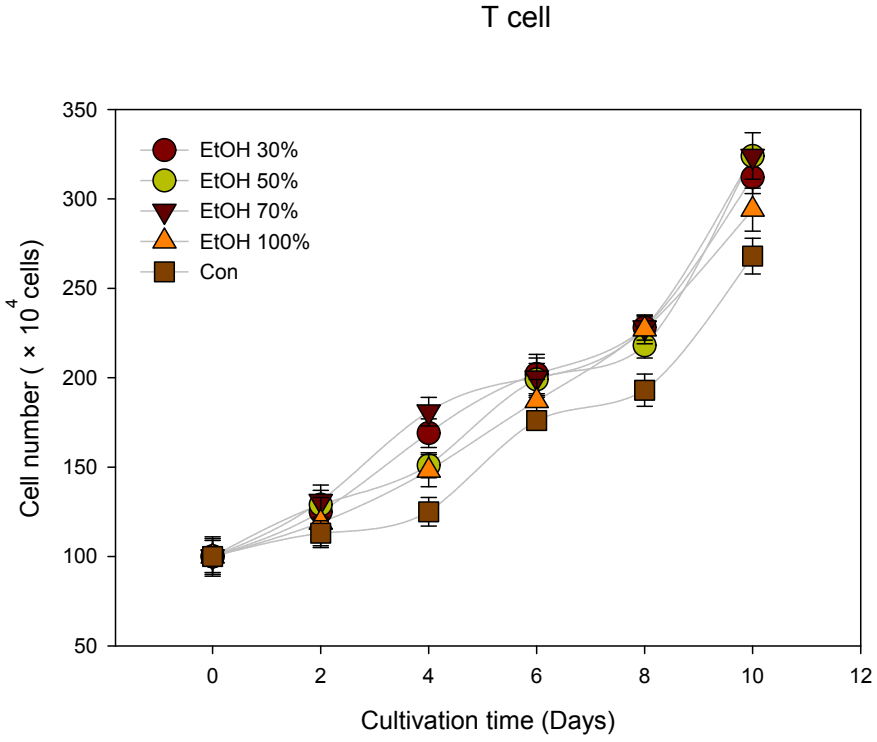


Fig. 20. The cell growth of human T cell line according to the percentage of EtOH solvent from Hoengseong cultured *Codonopsis lanceolata*. The bars represent the standard error.

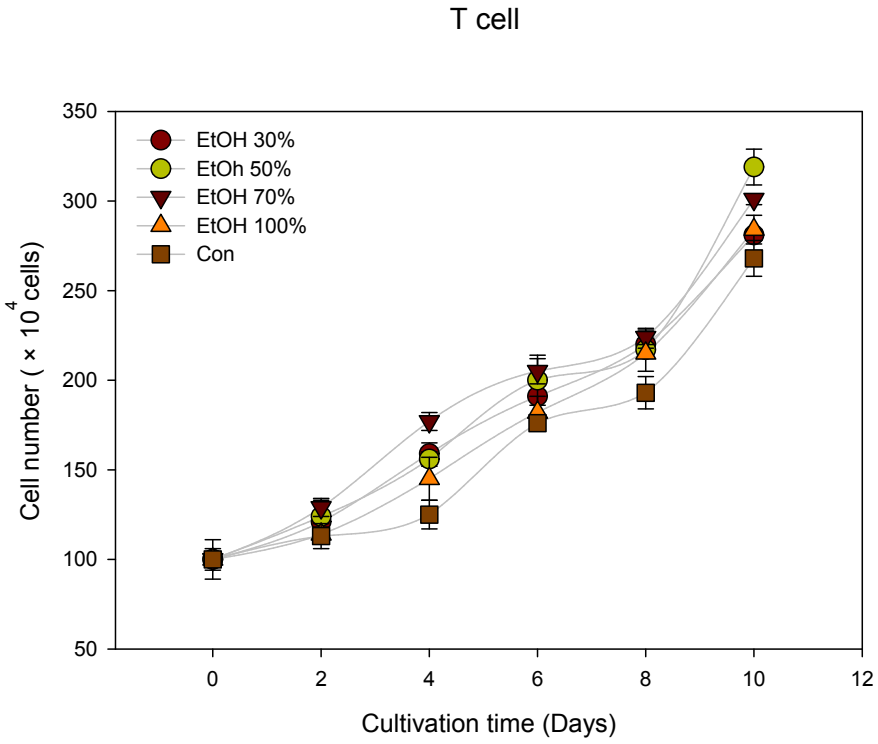


Fig. 21. The cell growth of human T cell line according to the percentage of EtOH solvent from Jeju cultured *Codonopsis lanceolata*. The bars represent the standard error.

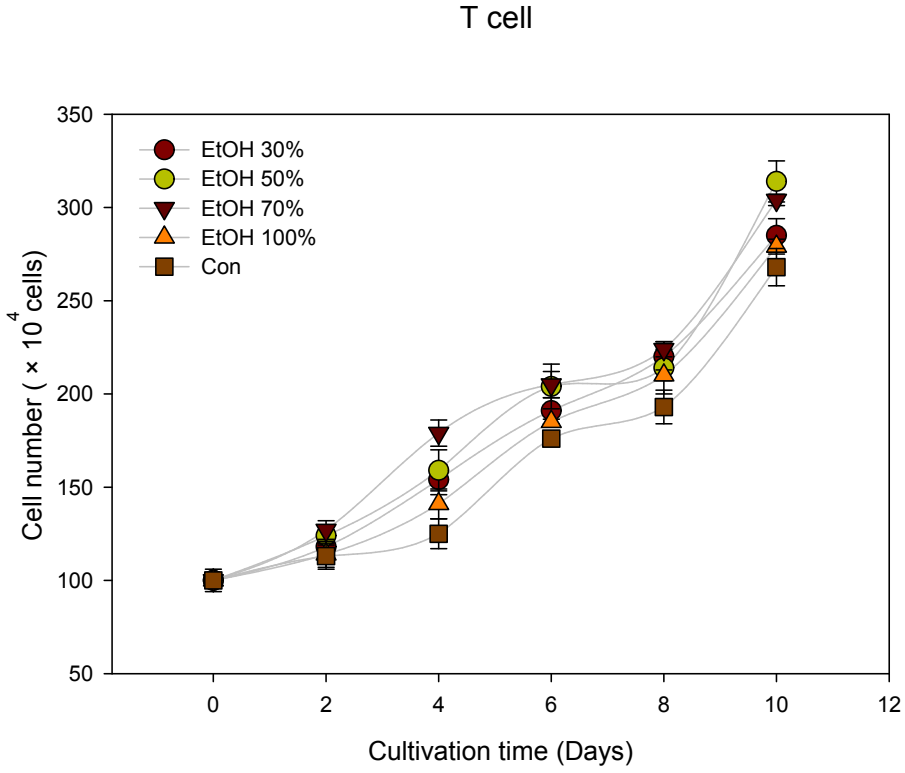


Fig. 22. The cell growth of human T cell line according to the percentage of EtOH solvent from Jecheon cultured *Codonopsis lanceolata*. The bars represent the standard error.

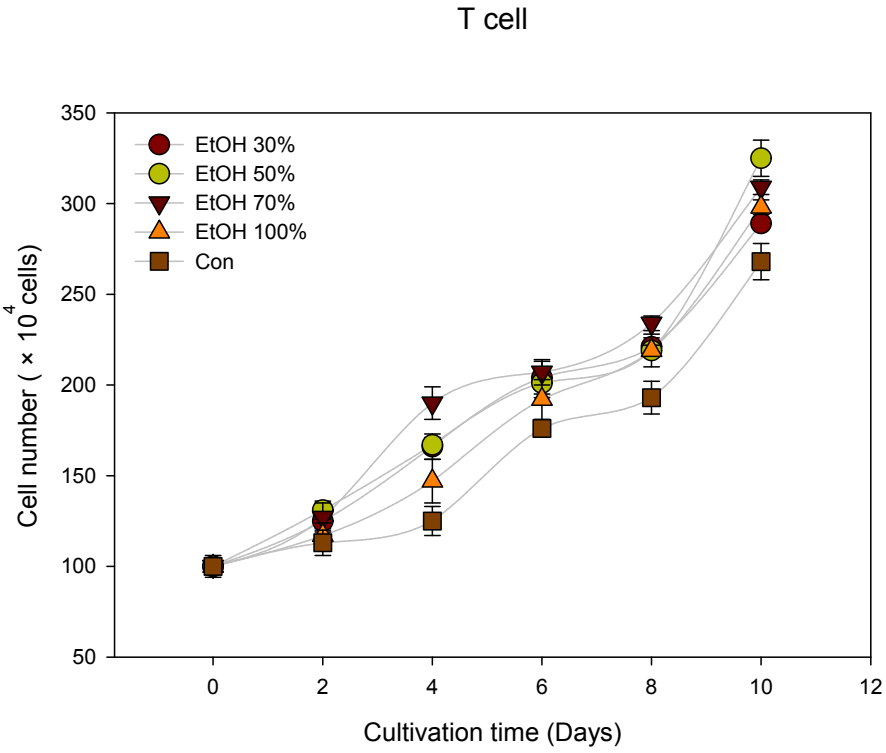


Fig. 23. The cell growth of human T cell line according to the percentage of EtOH solvent from Muju cultured *Codonopsis lanceolata*. The bars represent the standard error.

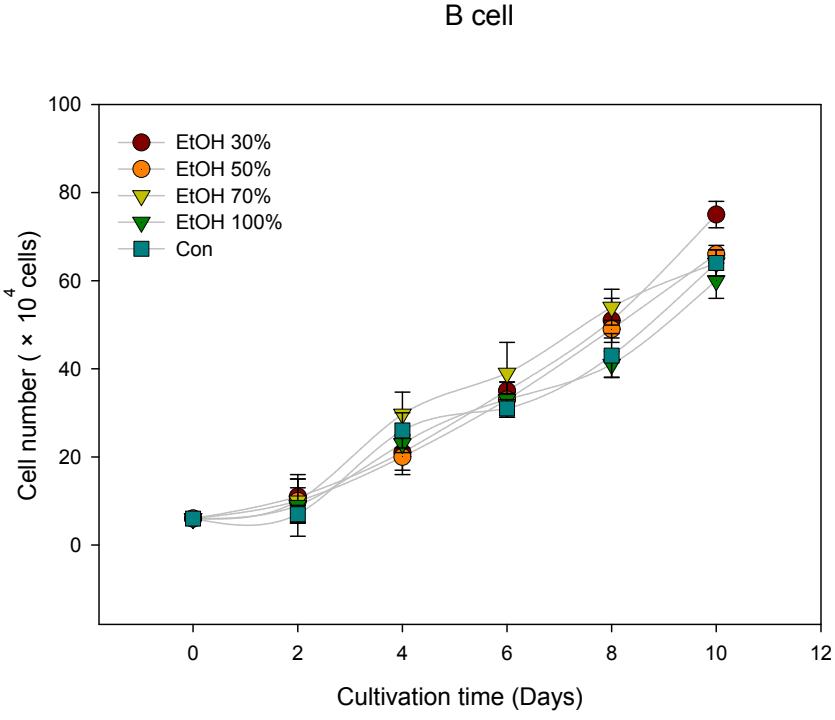


Fig. 24. The cell growth of human B cell line according to the percentage of EtOH solvent from Hwasun cultured *Codonopsis lanceolata*. The bars represent the standard error.

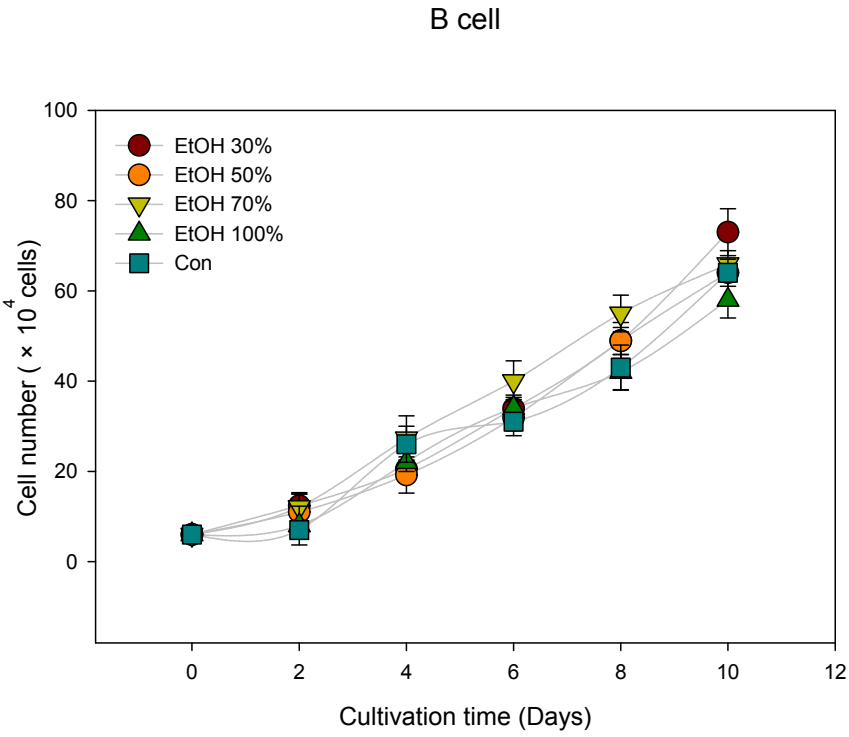


Fig. 25. The cell growth of human B cell line according to the percentage of EtOH solvent from Uljin cultured *Codonopsis lanceolata*. The bars represent the standard error.

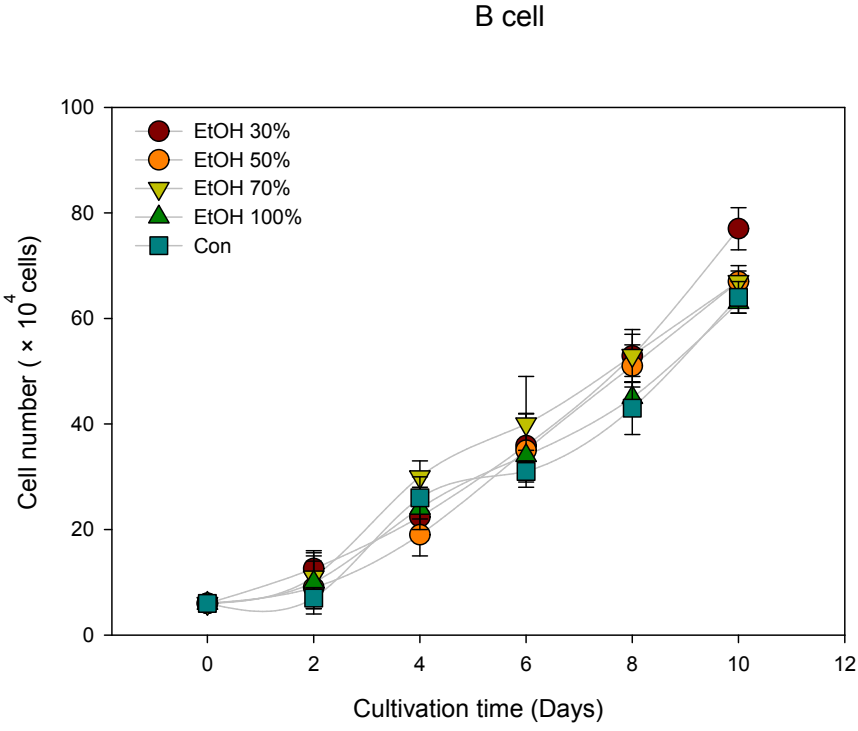


Fig. 26. The cell growth of human B cell line according to the percentage of EtOH solvent from Hoengseong cultured *Codonopsis lanceolata*. The bars represent the standard error.

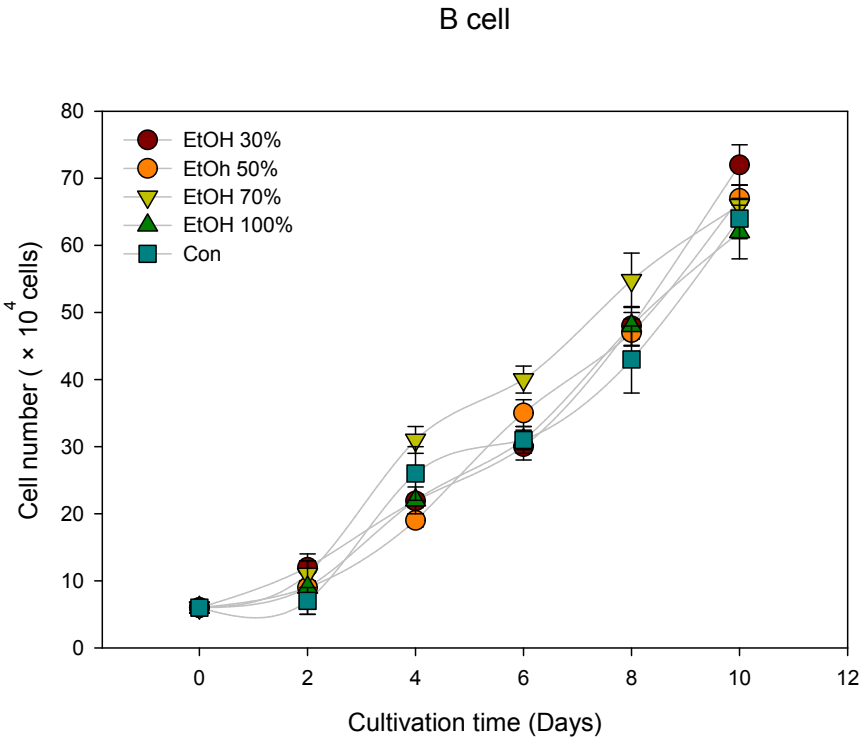


Fig. 27. The cell growth of human B cell line according to the percentage of EtOH solvent from Jeju cultured *Codonopsis lanceolata*. The bars represent the standard error.

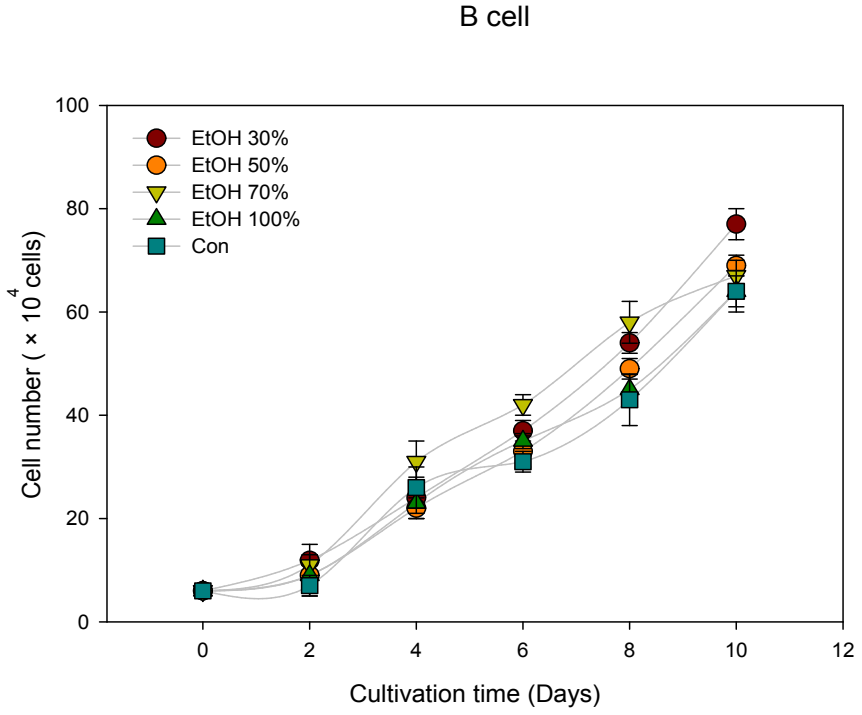


Fig. 28. The cell growth of human B cell line according to the percentage of EtOH solvent from Jecheon cultured *Codonopsis lanceolata*. The bars represent the standard error.

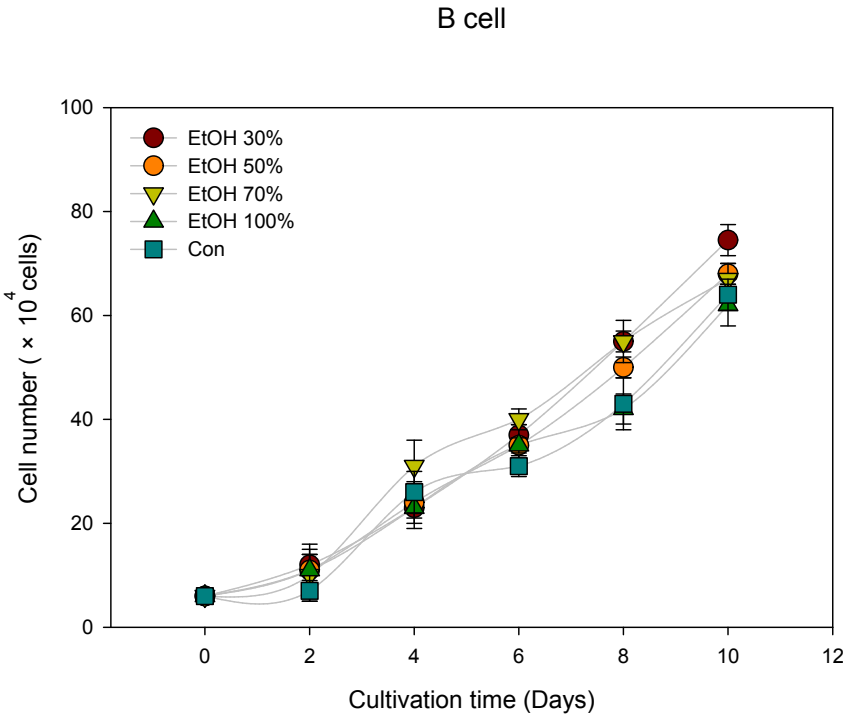


Fig. 29. The cell growth of human B cell line according to the percentage of EtOH solvent from Muju cultured *Codonopsis lanceolata*. The bars represent the standard error.

EtOH 추출농도에 따른 각 지역 재배더덕에 대한 인간 면역세포인 T cell과 B cell의 생육촉진 실험결과를 보면, T cell, B cell 모두에서 농도의존적으로 생육촉진을 나타냈으며, 재배지역 간에 큰 차이를 보이지는 않았다.

3. 더덕 분획추출물의 미세성분 분석

더덕 분획추출물 소재에 대하여 기존에 알려진 주요 성분 이외 알려져 있지 않은 미세성분 분석을 위하여 고분리능 기체크로마토그라피/이온비행질량분석기(HR GC/TOF)를 적용하여 미지의 물질을 분석하고자 하였다. 제주지역 재배 더덕을 시료로 5종의 추출용매별로 시료의 성분검출 효율을 비교한 결과를 보면, 에틸아세테이트, 부탄올, 메틸렌클로라이드, 헥산, 물 순으로 추출효율이 높은 것으로 나타났으며, 특히 에틸아세테이트 용매에서의 성분검출 효율이 상대적으로 가장 우수함을 확인할 수 있었다.

가. 각 분획추출물의 유도체화

각 분획추출물인 헥산, 에틸아세테이트, 부탄올, 메틸렌클로라이드, 물의 분획추출물을 유도체화를 실시하였다. 유도체화 과정은 시약 MSTFA를 이용하여 37℃에서 30분간 실시하였다.

나. 분석기기 조건

미지 성분의 검출을 위한 screening에 매우 효과적이며, 기지 성분의 정성 시에도 정확한 분자량 측정으로 보다 확실한 성분 정성이 가능한 분리능 가스크로마토그래피/이온비행시간질량분석기(HR-GC/ TOF)를 이용하여 정성 분석하였다.

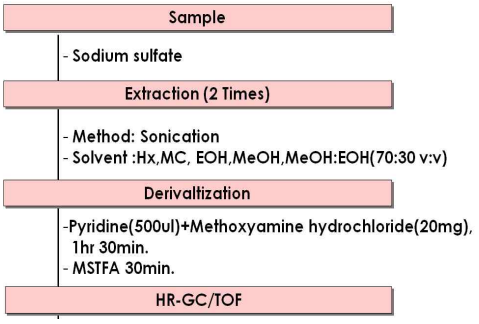


Fig. 30. Analytical procedure

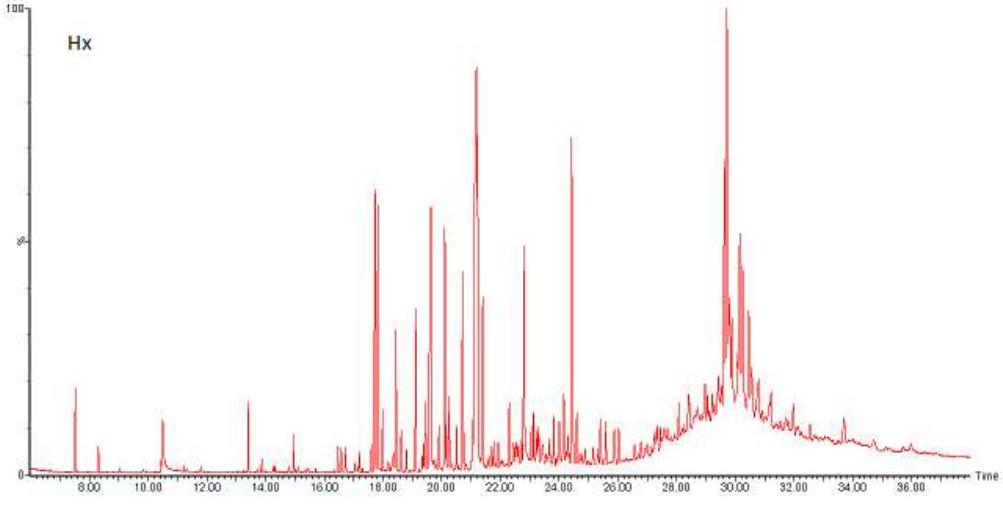
Photo. 2 HR-GC/TOF

Table 25. The condition of HR-GC/TOF

GC (Ailent 7890 A gas chromatograph)		MS (Waters GCT Premier TOF mass spectrometer)	
Column	DB-5MS (30m×0.25mm×0.25㎛)	Ionizing mode	EI
Oven Temp start temp.:	60℃, 3.0min hold	Source Temp.	250℃
	10℃/min to 320℃, 10min hold	Electron Voltage	70eV
Interface temp	280℃	Detector voltage	2300V

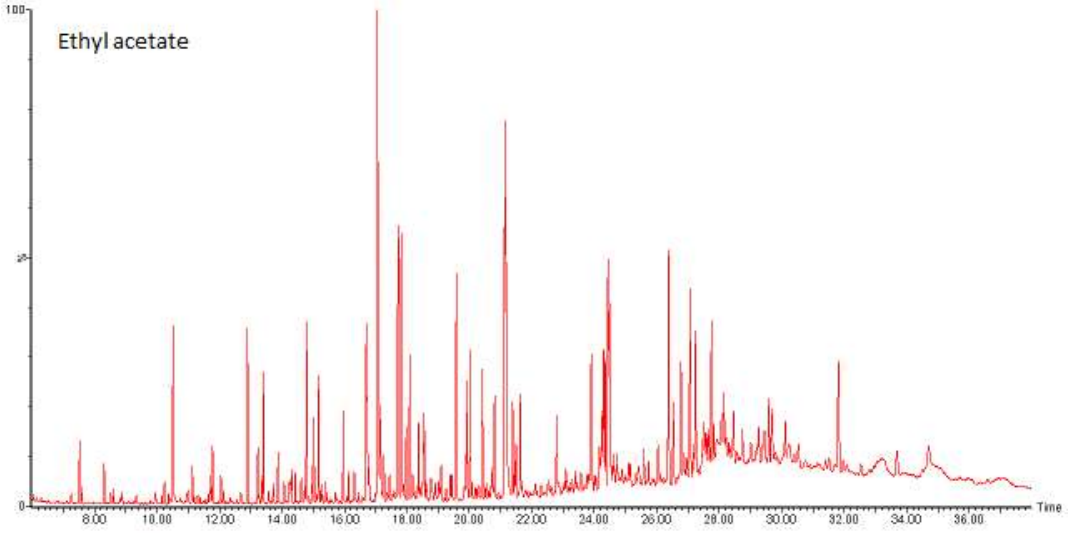
다. 분석결과

(1) 헥산 분획추출물



	R.T(min)	NAME
1	9.03	Heptanoic acid
2	10.45	Octanoic acid
3	10.51	glycerol
4	11.22	Octenoic acid
5	11.8	Nonanoic acid
6	13.41	Malic acid
7	13.87	L-Proline
8	15.46	Dodecanoic acid
9	16.58	Phosphoric acid
10	17.21	Propanetricarboxylic acid
11	17.59	Thiobarbituric acid
12	17.61	Tetradecanoic acid
13	20.25	Heptadecanoic acid
14	21.39	Octadecanoic acid
15	22.23	Nonadecanoic acid
16	22.72	Inositol
17	23.05	Eicosanoic acid
18	24.45	Glucopyranoside
19	26.44	Glucose
20	34.33	Benzoic acid

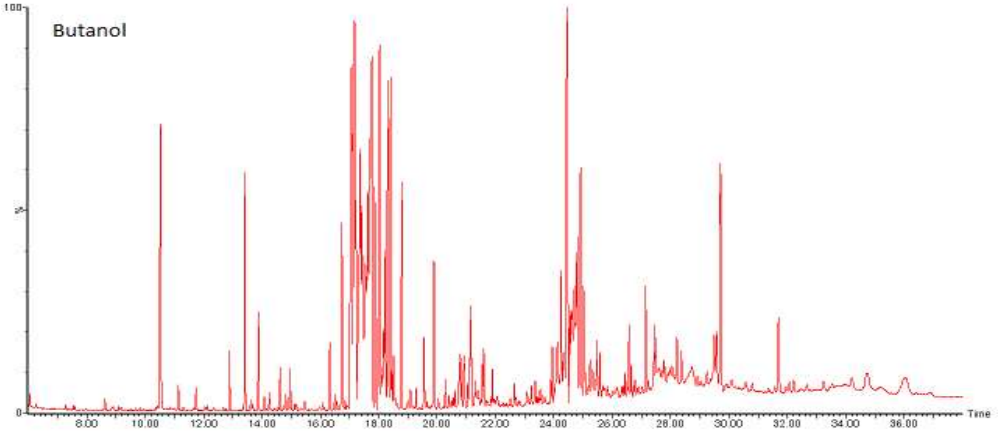
(2) 에틸아세테이트 분획추출물



	R.T(min)	NAME
1	5.99	Pentanoic acid
2	6.29	L-(+)-Lactic acid
3	7.26	Propanoic acid
4	7.52	Hexanoic acid
5	8.52	Ethylmalonate
6	8.85	Butanoic acid

7	10.55	Ethylhexanoic acid
8	10.57	Pentanoic acid
9	10.91	Pyridinecarboxylic acid
10	10.96	Benzeneacetic acid
11	11.14	Butanedioic acid
12	12.07	Valine
13	12.12	Propanedioic acid
14	12.9	Malic acid
15	13.35	Heptanoic acid
16	15.17	Benzoic acid
17	15.96	Heptanedioic acid
18	16.78	Nonadecanol
19	16.93	Undecanedioic acid
20	18.06	Sebacic acid
21	18.56	Cinnamic acid
22	20.03	Ferulic acid
23	20.72	Propionicacid
24	21.2	Galactopyranosiduronic acid
25	25.88	Tetracosenoic acid
26	31.85	Fumarylacetoacetate
27	33.04	Glycerol

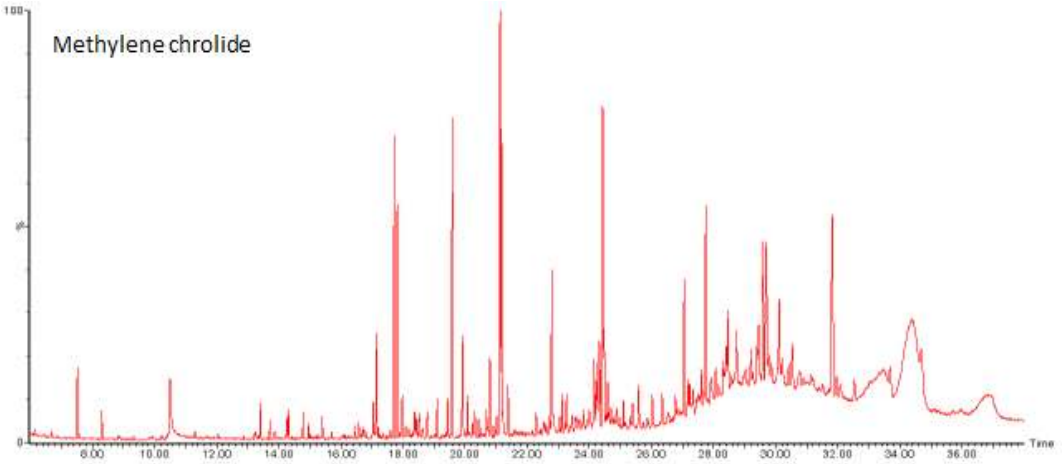
(3) 부탄올 분획추출물



	R.T(min)	NAME
1	8.53	Mono-ethylmalonate
2	8.63	Propanoic acid
3	8.87	Butanoic acid
4	9.69	L-Valine
5	9.82	Ethyl phosphoric acid

6	10.38	Butenoic acid
7	10.54	glycerol
8	10.92	Nicotinic acid
9	11.14	Butanedioic acid
10	13.66	2-Pyrrolidone-5-carboxylic acid
11	13.88	Proline
12	14.25	Alanine
13	14.81	Pentanedioic acid
14	15.17	Benzoic acid
15	17.09	Fructose
16	18.03	glucitol
17	18.17	Acrylic acid
18	18.23	Glucosamine
19	19.58	Hexadecanoic acid
20	20.21	Amino levulinic acid
21	21.10	Tryptophan
22	26.57	Galactopyranosiduronic acid

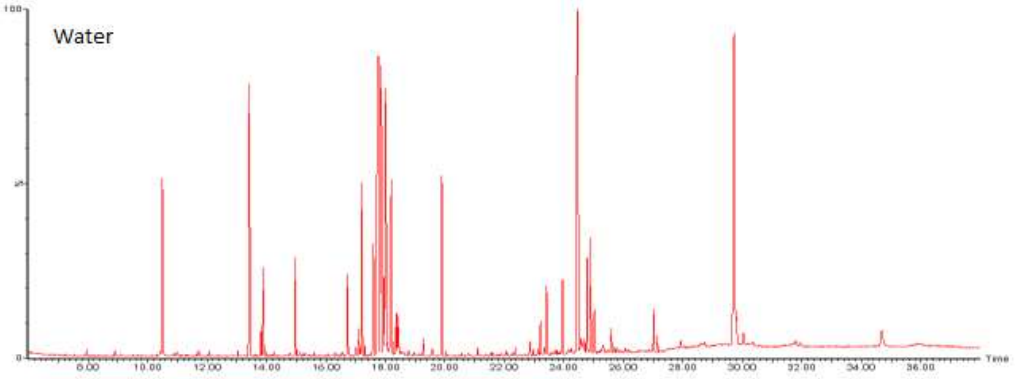
(4) 메틸렌클로라이드 분획추출물



	R.T(min)	NAME
1	5.98	Butanoic acid
2	5.99	Pentanoic acid
3	7.52	Hexanoic acid
4	10.45	Octanoic acid
5	13.4	Malic acid
6	14.78	Butenedioic acid
7	14.96	Ornithine
8	16.69	Benzoic acid

9	17.04	Azelaic acid
10	17.59	Thiobarbituric acid
11	18.61	Pentadecanoic acid
12	20.24	Heptadecanoic acid
13	21.17	Oleic acid
14	25.87	Tetracosenoic acid
15	26.38	Benzoic acid
16	26.92	Tetracosanol
17	27.44	Tetracosenoic acid
18	29.86	Amyrin

(5) 물 분획추출물



	R.T(min)	NAME
1	7.26	Propanoic acid
2	7.96	Alanine
3	9.11	Phosphoric acid
4	9.68	Valine
5	10.43	ë Amino levulinic acid
6	10.98	Butenoic acid
7	11.14	Butanedioic acid
8	13.43	Malic acid
9	13.81	Aspartic acid,
10	13.88	Proline
11	13.96	Butanoic acid
12	14.25	Threonic acid
13	18.49	Glycin
14	18.52	Glucosamine
15	19.57	Hexadecanoic acid
16	23.34	Galactopyranoside

4. 지역별 재배더덕 추출물에 대한 품질관리 조건 설정

추출물에 대한 품질관리하기 위한 기준으로서는 일반세균과 대장균군을 검사하여 조건 설정의 지표로 하였다. 실험 결과, 추출물에서 대장균은 거의 검출되지 않았으며, 일반세균에서는 일부 세균이 검출되었지만, 이는 분말시료에서는 발생할 수 있는 문제로서 식품제조 기준에는 별 영향이 없는 것으로 판단되었다.

가. 일반세균 정량 시험

일반세균 필름배지 실험은 121℃에서 15분 동안 멸균처리된 0.9% (w/v) 생리식염수 (NaCl 8.1g + H_2O 900mL)에 희석 배수가 10배수가 되도록 희석한 후 bag Mixer를 이용하여 강도 강으로 3분 동안 섞어 준다. Loading vol. 1ml을 필름 배지에 넣고 누름판으로 눌러준 후 24시간 동안 37℃에서 배양하였다.

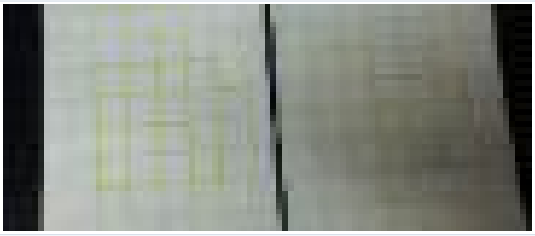
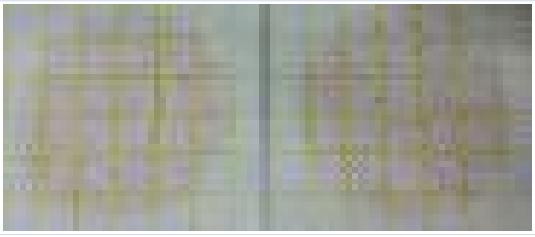
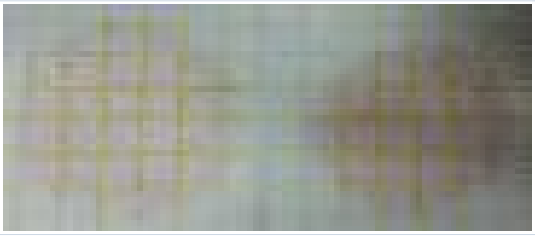
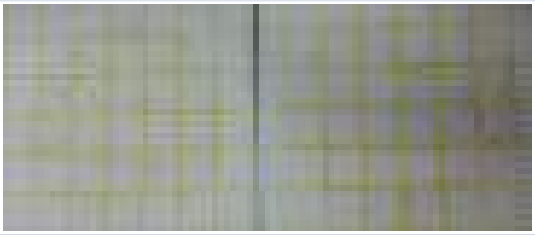
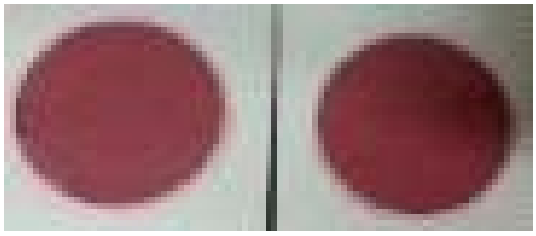
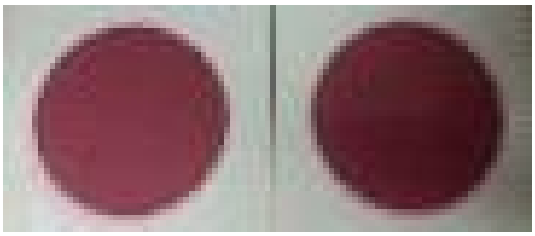
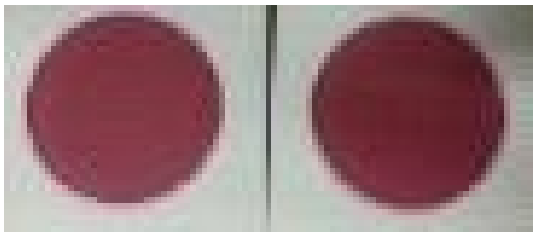
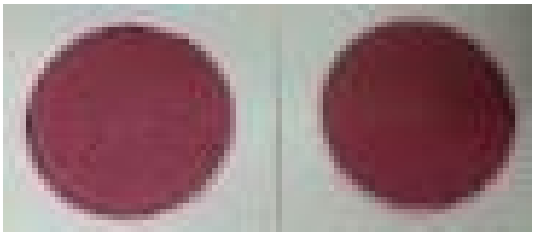
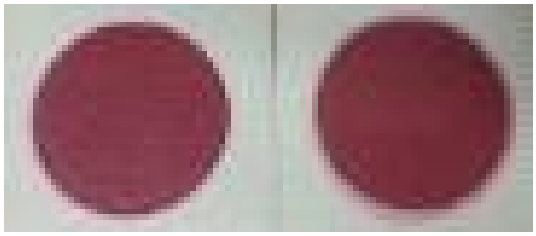
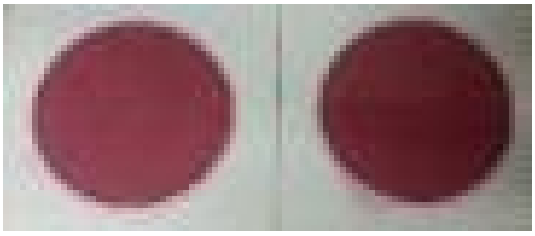
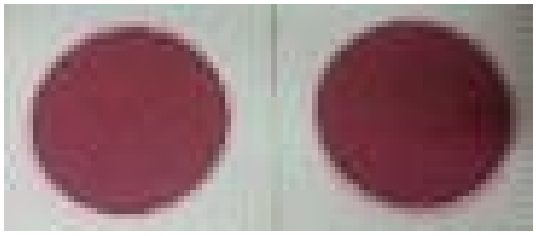
일반세균	
blank	
	
-	
무주	울진
$2.6X10^4$	$3x10^4$
제주	제천
	
$4.6x10^4$	$1.6x10^4$
화순	횡성
	
$8x10^4$	$4.2x10^3$

Fig 31. 지역별 재배 더덕의 일반세균 정량

나. 대장균군 정량 시험

대장균군 필름배지 실험은 121℃에서 15분 동안 멸균처리 된 0.9% (w/v) 생리식염수 (NaCl 8.1g + H_2O 900mL)에 희석 배수가 10배수가 되도록 희석한 후 bag Mixer를 이용하여 강도 강으로 3분 동안 섞어 준다. Loading vol. 1ml을 필름 배지에 넣고 누름판으로 눌러준 후 24시간동안 37℃에서 배양한다.

대장균	
blank	
	
무주	울진
	
제주	제천
	
화순	횡성
	

5. 더덕의 최적 가공적성 및 소재 제조 공정 표준화

본 연구에서는 더덕 원물 처리 공정, 추출최적화 연구를 통한 최적 가공적성을 확립하였다.

가. 더덕의 최적 추출공정 설정

앞에 기술한 바와 같이 중탕, 침적 조건 및 주정 알코올 용매 조성에 따른 추출효율 및 각 추출물의 효능 평가를 실시하여 추출물의 효능이 우수하고 추출효율성을 높일 수 있는 추출공정 개발 결과를 바탕으로 6개 재배지역 중 상대적으로 생리기능성 및 효능물질이 다소 높은 것으로 확인된 제주지역 재배더덕을 선정하였으며, 추출용매는 30% 주정알코올로 선정하여 각 공정을 수행하였다.

나. 원료 세척 및 건조 공정 확립

더덕 시료는 표면이 거칠어서 섬세한 세척이 요구되며, 또한 세척과정 중에 식물조직의 손상을 초래할 수 있으므로 이를 최소화하는 공정 확립이 중요하다. 동결건조, 열풍건조 등 건조방법에 따라서도 추출물의 양 및 유효성분 함량에 차이가 있으므로 원료 표준화 규격화를 위해서는 적절한 건조방법의 선정이 필요하다. 본 연구에서는 경제성의 문제가 있지만 유효성분 함량 및 성분 유실을 최소화할 수 있는 동결건조로 선정하여 제조공정을 아래와 같이 표준화하였다.

<세척 및 건조 공정>

원료 선발: 제주지역 재배 더덕

⇩

원료 정선: 오염원의 제거

⇩

원료 세척: 흐르는 물에 브러쉬 이용 세척

⇩

원료 절단: 절단 크기 결정

⇩

원료 건조: 동결건조

<30% 주정알코올 추출물 제조 공정>

원재료

⇩

절단

⇩

세척

⇩

동결건조

⇩

30% 주정알코올 추출

⇩

여과, 농축 및 멸균

⇩

동결건조

⇩

완성

다. 원료 세절 조건 및 저장온도에 따른 수율 조사

더덕의 건조분말을 시료로 추출할 경우 유효성분은 상대적으로 많이 용출되지만 특유의 점성물질 등으로 여과가 용이하지 않기 때문에 효율성을 극대화할 수 있는 최적의 크기로 절단하는 것이 필요하다. 따라서 5단계로 크기를 달리하여 동결건조 분말 100g의 시료를 30% 주정알코올로 추출하여 수율을 조사하고 최적의 세절 조건을 확립하였다.

10-12mm 7-8mm 5-6mm 1-2mm 분말

Table 26. The Extract yield according to grinding conditions

Sample size (mm)	Weight (g)	Yield (%)
10-12	29.30	29.30
7-8	36.34	36.34
5-6	42.95	42.95
1-2	44.99	44.99
분말	50.43	50.43

Table 27. The Extract yield according to storage temperature

Sample size (mm)	Weight (g)	Yield (%)
5℃	50.96	50.96
15℃	51.28	51.28
25℃	51.09	51.09
35℃	50.87	50.87
45℃	49.55	49.55

분쇄크기별 추출물의 수율은 분말상이 가장 높았지만, 추출 후 여과의 효율성을 고려하여 제조공정의 세절 조건은 5mm 정도 크기로 선정하였다. 그리고 저장온도에 따른 동결건조 분말 추출물의 수율은 온도별 차이가 거의 없었다.

라. 더덕 소재의 물성 변화 평가

(1) 가용성 고형물 함량 변화

동결 건조한 더덕 분말의 저장기간별 가용성 고형물의 함량 변화를 측정하기 위하여, 분말 10g에 증류수 50 mL을 가하여 vortex mixer (IKA MS3 Basic, Germany) 이용 2분 정도 교반한 다음, 원심분리를 행하여 상층액을 여과하였다. 이 여과액을 water bath에 넣어 10±1℃ 정도의 온도가 되었을 때 디지털 당도계 이용하여 측정하였다.

Table 28. Changes in soluble solid of extract of *Codonopsis lanceolata* according to storage period

Extract sample	storage period (days)						
	0	15	30	45	60	75	90
Soluble solid (brix°)	6.2±0.8	6.3±0.5	5.6±0.2	5.2±0.5	4.7±0.4	4.9±0.1	4.2±0.2

*Data represent the mean values±SE of three independent experiments.

더덕의 저장기간 중 가용성 고형물 함량의 변화를 보면, 기간이 경과할수록 감소하는 경향을 보였으며, 이는 더덕의 품질을 유지하는데 장기 저장보다는 최적 저장기간 설정이 필요하다는 것을 시사한다.

(2) 더덕 뿌리 및 건조 분말의 표면 색택 변화

더덕 소재의 표준화를 위해 사용할 원물 더덕 뿌리 및 뿌리를 동결 건조한 분말을 3개월 보관하면서 15일 간격으로 샘플을 취하여 색차계 (Minolta CR-10, Japan)를 이용하여 저장기간별 표면 색택의 변화를 측정하였다. 색택은 Hunter L, a, b값으로 표시하였다.

사진 3. 저장기간별 더덕의 표면 색택 변화

Table 29. Variation of hunter value of roots and feeze-dried powder of *Codonopsis lanceolata* according to storage period

storage period (days)	Hunter value					
	freeze-dried root			freeze-dried root powder		
	L	a	b	L	a	b
0	64.8±1.5	10.3±0.3	23.2±0.7	80.3±0.9	5.0±0.2	11.8±0.3
15	64.2±0.9	11.0±0.2	22.3±0.3	81.0±0.5	4.5±0.2	11.6±0.6
30	61.9±1.2	10.9±0.5	23.1±0.2	79.4±1.2	4.7±0.1	12.5±0.2
45	62.8±1.8	9.5±0.1	23.6±0.5	78.8±0.6	4.9±0.3	13.2±0.7
60	58.3±0.6	8.4±0.3	17.7±0.2	79.8±0.8	4.2±0.5	12.2±0.5
75	53.6±0.8	10.9±0.2	18.7±0.1	76.9±1.1	4.9±0.3	13.1±0.2
90	54.8±1.2	10.0±0.4	18.8±0.3	77.1±0.7	4.4±0.6	12.8±0.4

*Data represent the mean values±SE of ten samples.
L: lightness, a: red/green, b: yellow/blue

3개월 동안의 더덕 원물의 표면 색택 변화를 보면, 건조한 뿌리에서는 다소 표면이 탁해지고 황색이 퇴색되는 경향을 보였지만, 외관상 큰 변화는 없었다. 건조 분말에서는 저장기간 중 거의 변화를 관찰할 수 없어서 장기간 보관에 큰 문제가 없는 것으로 판단되었다.

(3) pH의 변화

더덕 추출물의 안정성에 대한 pH의 영향을 조사하기 위하여 동결건조분말 10g에 10배의 증류수를 가하여 교반한 다음, 밀봉한 후 상온에 15일간 보관하면서 3일 간격으로 샘플을 취하여 pH측정기로 측정하였다.

Table 30. pH variation of extract of *Codonopsis lanceolata* according to storage period

Extract sample	storage period (days)					
	0	3	6	9	12	15
pH	6.6±0.5	6.2±0.2	6.5±0.6	6.3±0.2	5.9±0.3	6.0±0.5

*Data represent the mean values±SE of three independent experiments.

더덕 추출물을 15일 간 저장하면서 pH변화를 조사한 결과, 유의한 수준의 변화를 보이지는 않았다.

마. 원료별, 제형별 최적 비율 설정

주원료 외에 첨가할 부원료와 제형 선정은 원칙적으로 임상시험용 캡슐제형과 건강기능식품 제조 제형으로 분리하여 비율을 설정하였다. 건강기능식품 제조 첨가소재 설정 기준은 선행실험을 통해 호흡기질환에 효능이 있는 것으로 확인된 소재를 선정하였다.

(1) 임상시험용 제형 비율 설정

임상시험을 위한 제형은 캡슐형으로 시험 제조하였으며, 차후 대량으로 제조할 시에 일부 성분과 비율을 다소 수정할 가능성도 있다.

표 31. 캡슐 제형에 사용할 재료 및 비율

성분	본약군 (%)	위약군 (%)
더덕추출물	98.2	-
쌀가루	-	98.2
식용색소 (황색소)	0.8	0.8
식용향료 (인삼향)	1.0	1.0
합계	100	100

(2) 액상 및 과립 제형의 배합 비율 설정

액상 및 과립 제형은 건강기능식품 제조시 첨가소재 등의 설정 기준을 확립하기 위한 것이며, 아래 표에 제시한 배합비를 기준으로 제조한다. 이는 호흡기질환 개선 효능의 제품 제조에 있어서 더덕의 기능성을 극대화할 수 있는 배합 비율이다.

표 32. 액상 제형에 사용할 재료 및 비율

액상 조성물 재료	배합 비율 (%) 1	배합 비율 (%) 2
더덕추출물	70	85
배암차즈기추출물	10	5
산수유추출물	10	5
은행열매추출물	10	5
합계	100	100

표 33. 과립 제형에 사용할 재료 및 비율

과립 조성물 재료	배합 비율 (%) 1	배합 비율 (%) 2
더덕추출물(고형분)	5.0	8.0
덱스트린	1.5	1.5
에리스리톨	42.5	42.5
과즙분말	40.5	37.5
비타민 C	8.3	8.3
무수구연산	0.2	0.2
꿀	2.0	2.0
합계	100	100

바. 저장기간, 저장온도, 분쇄크기에 따른 주요 성분 변화 및 생리활성 검증

(1) 더덕의 주요 효능물질인 Lancemaside A 성분 변화

저장온도, 저장기간, 분쇄크기에 따른 lancemaside A 성분의 변화를 HPLC를 이용하여 측정하였다. lancemaside A 성분은 38.6 min에서 검출되었다.

Table 34. The conditions of HPLC analysis

HPLC conditions	Lancemaside A (mg/mL)	Calibration curve area
-Column; TSKgel ODS-100Z (4.6 mm ID x 150 mm, 5 μm particle size, TOSOH, Tokyo),	0	0
-Mobile phase;0.1% formic acid 함유 27% CH3CN	1	30.3
-Flow rate; 1 mL/min, 35° C	2.5	75.7
-Detector; UV 205 nm	5	151.5
-Injection volumn; 10 μL	10	303.1

Table 35. The Lancemaside A contents according to storage period from *Codonopsis lanceolata*.

Storage period (days)	Lancemaside A (mg/mL)
0	5.28
15	4.61
30	4.62
45	4.22
60	4.61

Table 36. The Lancemaside A contents according to storage temperature from *Codonopsis lanceolata*.

Storage temperature (℃)	Lancemaside A (mg/mL)
-20	4.55
5	4.19
15	3.77
25	4.37
35	3.67
45	3.73

Table 37. The Lancemaside A contents according to grinding size from *Codonopsis lanceolata*.

Grinding size (mm)	Lancemaside A (mg/mL)
10~12	3.42
7~8	3.13
5~6	3.81
1~2	4.22
powder	4.09

저장온도, 저장기간(2개월), 분쇄크기(5단계)에 따른 lancemaside A 성분의 변화를 보면, 저장기간이 길어질수록 또는 저장온도가 높을수록 성분 함량이 다소 감소하였으며, 그리고 분쇄정도는 입자가 미세할수록 lancemaside A 성분이 높게 검출되었다.

(2) 면역세포 생육증진 효과 검증

면역기능 증강효과는 인간 면역세포인 T cell과 B cell (RPMI 8226, KCLB No.10155)을 이용하여 검증하였다. 세포의 생육은 10% FBS를 함유하는 RPMI 1640 배지에서 5% CO_2, 37℃에서 배양하였으며, 면역기능 증강효과는 24 well plate에 세포를 2.5×10^4 cells 농도로 조절한 후, 0.2 μm의 filter로 여과되어진 시료 (0.5 μg/μL)들은 24시간 경과한 각각의 well에 첨가한 후 8일간 다시 배양하였다. 8일 동안 배양하면서 각 well의 세포를 혈구계수기로 세포 수를 측정하였다. 그리고 시료 추출물들을 처리하지 않은 대조구와 비교하여 세포의 생육과 세포 수에 따라 면역 활성을 측정하였다.

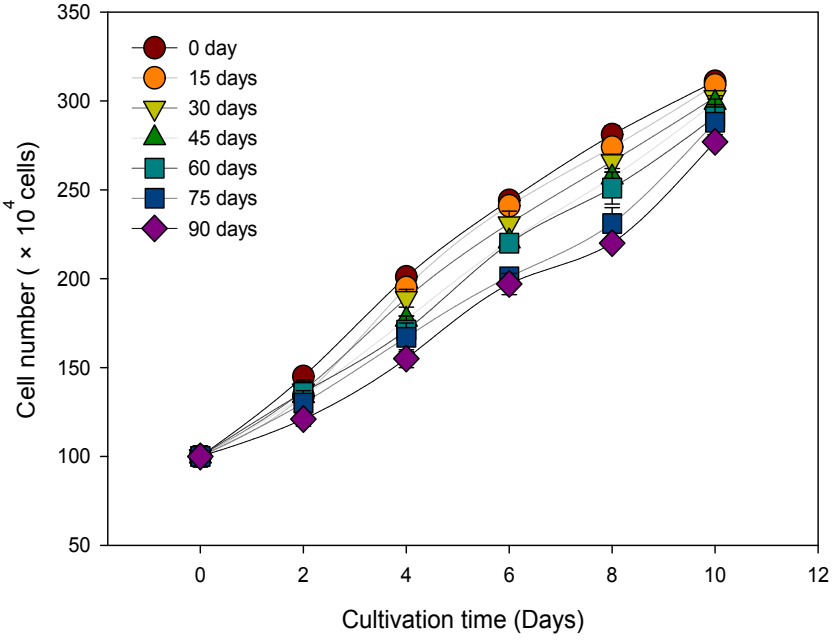


Fig. 32. The cell growth of human T cell line according to storage period from *Codonopsis lanceolata*. The bars represent the standard error.

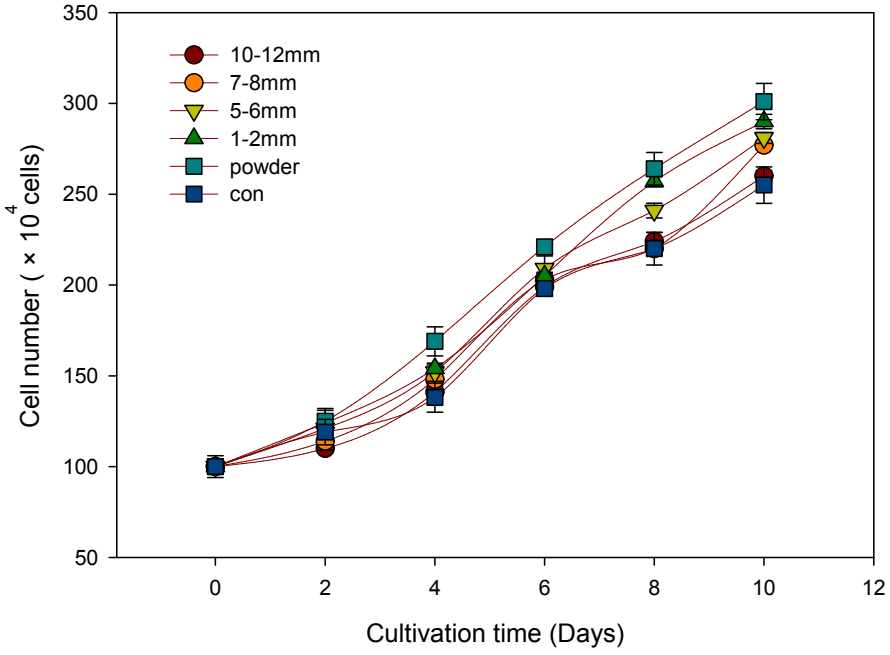


Fig. 33. The cell growth of human T cell line according to grinding size from *Codonopsis lanceolata*. The bars represent the standard error.

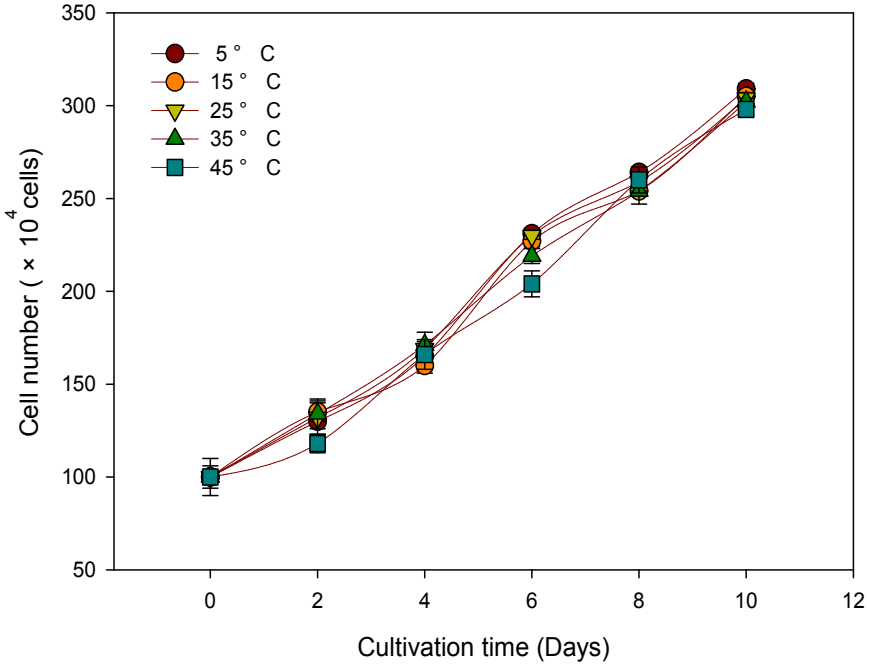


Fig. 34. The cell growth of human T cell line according to storage temperature from *Codonopsis lanceolata*. The bars represent the standard error.

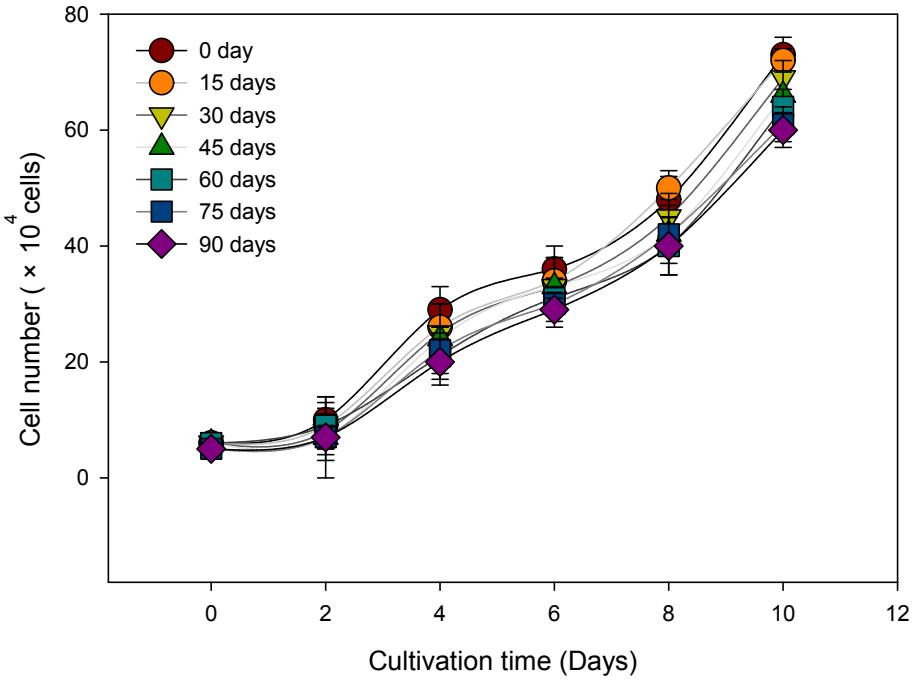


Fig. 35. The cell growth of human B cell line according to storage period from *Codonopsis lanceolata*. The bars represent the standard error.

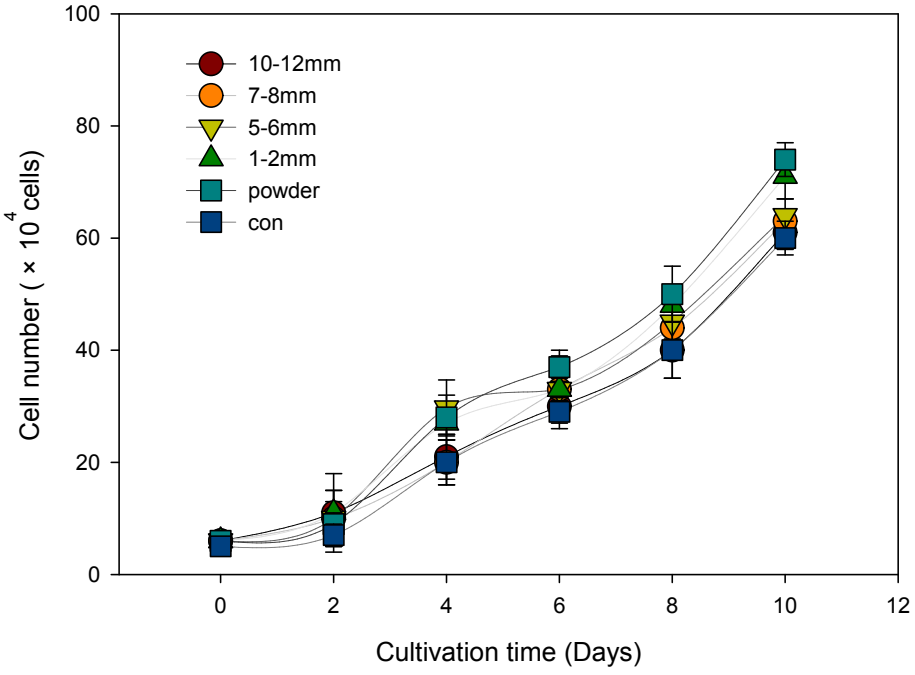


Fig. 36. The cell growth of human B cell line according to grinding size from *Codonopsis lanceolata*. The bars represent the standard error.

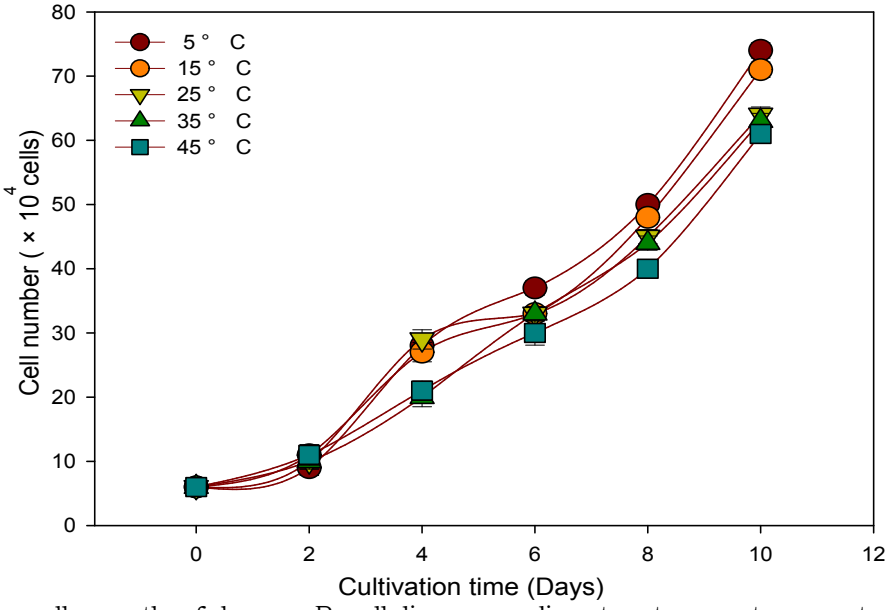


Fig. 37. The cell growth of human B cell line according to storage temperature from *Codonopsis lanceolata*. The bars represent the standard error.

저장기간, 저장온도, 분쇄크기에 따른 더덕 추출물의 인간 면역세포인 T cell과 B cell의 생육촉진 실험결과를 보면, T cell, B cell 모두에서 농도의존적으로 생육촉진을 나타냈으며, 저장기간별, 저장온도별, 분쇄크기별 사이에 큰 차이를 보이지는 않았다.

(3) 인체암세포주에 대한 더덕의 항암 활성 분석

저장기간, 저장온도에 따른 더덕추출물을 시료로 인체암세포주에 대한 항암 효과를 측정하기 위해 MTT (3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5- diphenyltetrazoliumbromide) assay를 실시하여 측정하였다. 자궁암세포인 HeLa, 유방암세포인 MCF-7, 폐암세포인 Calu-6 세포주를 96well plate에 분주하고 37℃, 5%, CO_2 incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 배양한 세포에 시료 농도가 50, 100, 200, 400, 800 ㎍/ml가 되도록 10㎕ 처리한 후, 각각 24시간 배양하였고, 0.2㎎/㎖의 MTT 용액 10㎕를 각 well에 넣고 incubator에서 4시간 동안 배양하였다. 배양 종료 후 상등액을 제거하고 각 well에 100㎕의 DMSO를 첨가하여 상온에서 10분 동안 반응시킨 후 microplate reader로 540nm에서 흡광도를 측정하였고, 세포독성은 시료의 흡광도를 대조군의 흡광도에 대한 백분율로 나타내었다.

Table 38. Cytotoxic activity (IC_{50}values) of *Codonopsis lanceolata* according to storage temperature on three human cancer cell lines

Temperature(℃)	IC_{50}(μg/mL)		
	HeLa	Calu-6	MCF-7
5	628.6 ± 7.1[e]	679.3 ± 6.9[d]	472.7 ± 6.3[e]
15	683.9 ± 6.5[d]	737.5 ± 5.7[c]	558.5 ± 4.7[d]
25	715.3 ± 6.8[c]	762.6 ± 6.2[b]	615.3 ± 6.5[c]
35	753.2 ± 8.2[b]	> 800[a]	683.5 ± 5.4[b]
45	> 800[a]	> 800[a]	> 800[a]

* Data represent the mean values±SE of three independent experiments. Means with the same letter in column are not significantly different at p<0.05 level by Duncan's multiple range test. HeLa; human cervical carcinoma, Calu-6; human pulmonary carcinoma, MCF-7; human breast adenocarcinoma.

Table 39. Cytotoxic activity (IC_{50}values) of *Codonopsis lanceolata* according to storage period on three human cancer cell lines

Period (days)	IC_{50}(μg/mL)		
	HeLa	Calu-6	MCF-7
0	638.7 ± 5.2[e]	736.6 ± 5.8[d]	485.2 ± 6.5[e]
15	632.5 ± 7.3[e]	753.4 ± 6.2[d]	493.6 ± 6.1[e]
30	685.3 ± 5.8[d]	758.3 ± 6.9[cd]	523.5 ± 5.7[d]
45	709.6 ± 5.5[c]	772.4 ± 4.2[bc]	515.3 ± 6.3[d]
60	746.7 ± 6.7[ab]	765.5 ± 5.6[cd]	567.6 ± 7.8[c]
75	735.1 ± 6.2[b]	786.7 ± 5.3[b]	632.7 ± 5.3[b]
90	761.3 ± 7.5[a]	> 800[a]	659.3 ± 7.5[a]

* Data represent the mean values±SE of three independent experiments. Means with the same letter in column are not significantly different at p<0.05 level by Duncan's multiple range test. $IC_{50}$is defined as the extract concentration at which there was a 50% decrease in cell number. HeLa; human cervical carcinoma, Calu-6; human pulmonary carcinoma, MCF-7; human breast adenocarcinoma.

인체암세포주에 대해 저장기간별, 저장온도별로 세포독성 효과를 보면, 25℃ 이하에서 그리고 저장기간이 짧을수록 높게 나타났으며, 특히 MCF-7 세포주에 대한 세포독성 효과는 HeLa 및 Calu-6 세포주에서의 세포독성 효과보다 상대적으로 높았다.

(4) 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 측정

총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량 분석방법은 상기 기술한 방법과 동일하다.

Table 40. Total polyphenol and flavonoid contents according to the concentration of EtOH solvent in *Codonopsis lanceolata*

EtOH Concentration	Total polyphenol content (mg/g extract)	Total flavonoid content (mg/g extract)
EtOH 30%	131.74±0.53	7.07±0.61
EtOH 50%	128.35±0.35	5.85±0.63
EtOH 70%	126.38±0.87	4.54±0.32
EtOH 100%	121.58±1.00	4.45±0.55

*Data represent the mean values±SE of three independent experiments.

Table 41. Total polyphenol and flavonoid contents according to the grinding size in *Codonopsis lanceolata*

Grinding size (mm)	Total polyphenol content (mg/g extract)	Total flavonoid content (mg/g extract)
10~12	96.20±5.30	1.15±0.21
7~8	112.66±3.54	1.22±0.23
5~6	123.60±1.50	3.58±0.38
1~2	126.96±0.79	4.12±0.33
powder	150.85±5.33	5.96±0.50

*Data represent the mean values±SE of three independent experiments.

Table 42. Total polyphenol and flavonoid contents of root extracts from *Codonopsis lanceolata* according to different storage temperature condition.

Storage temperature (℃)	Total polyphenol content (mg/g extract)	Total flavonoid content (mg/g extract)
5	159.52±2.56[a1)]	7.25±0.62[a]
15	156.28±2.28[ab]	6.56±0.45[ab]
25	150.32±2.19[ab]	6.83±0.76[ab]
35	151.25±3.08[ab]	6.35±0.42[ab]
45	148.62±3.53[b]	5.95±0.65[b]

[1)]Data represent the mean values±SE of three independent experiments. Means with the same letter in column are not significantly different at $p<0.05$ level by Duncan's multiple range test.

Table 43. Total polyphenol and flavonoid contents of root extracts from *Codonopsis lanceolata* according to different storage period condition.

Storage period (days)	Total polyphenol content (mg/g extract)	Total flavonoid content (mg/g extract)
0	155.86±1.52[a1)]	7.58±0.15[a]
15	154.18±2.35[a]	7.92±0.21[a]
30	150.28±1.85[ab]	7.25±0.32[ab]
45	151.19±3.16[ab]	6.53±0.26[bc]
60	146.57±2.38[bc]	6.68±0.25[bc]
75	142.72±1.78[c]	6.15±0.18[c]
90	142.15±2.09[c]	6.07±0.31[c]

[1)]Data represent the mean values±SE of three independent experiments. Means with the same letter in column are not significantly different at $p<0.05$ level by Duncan's multiple range test.

추출용매인 주정알코올 농도를 달리한 더덕 추출물의 총 폴리페놀 함량과 플라보노이드 함량을 보면, 모두 30% EtOH 추출물에서 높은 결과를 나타냈다. 이는 본 연구의 소재 표준화를 위한 시료 추출용매를 30% EtOH로 선정한 것과 관련해서 의미있는 결과인 것으로 사료된다. 또한 분쇄크기별로 함량의 변화를 측정한 결과를 보면, 미세한 입자일수록 함량의 증가함을 알 수 있었다. 그리고 총 폴리 페놀과 플라보노이드 함량은 온도가 증가할수록 감소하였고 15 ℃ 이하의 저온에서는 함량이 상대적으로 높았다. 다른 저장 기간 조건에서 저장 기간이 길어질수록 폴리 페놀과 플라보노이드 함량은 감소하는 경향이 있었다.

(5) DPPH radical 소거능

각 추출물을 Choi 등(2003)의 방법에 의한 수소전자공여능에 의해 항산화 활성을 측정하였다. 여러 농도의 시료를 메탄올 (or DMSO) 용매로 용해하여, 900 μL의 DPPH 용액 (100 μM)과 각 시료 100 μL를 혼합하여 교반한다. 이 혼합 시료를 암소에서 30분간 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 수소전자공여능은 각 실험을 3회 반복하여 평균을 낸 다음 대조구에 대한 흡광도의 감소 정도를 다음 식에 의하여 계산하였다.

$An = (A_0 - A)/A_0 \times 100$

An : DPPH radical 소거능에 대한 항산화 활성(%)

A_0 : 시료가 첨가되지 않은 DPPH 용액의 흡광도

A : 반응용액 중의 DPPH와 시료의 반응한 흡광도

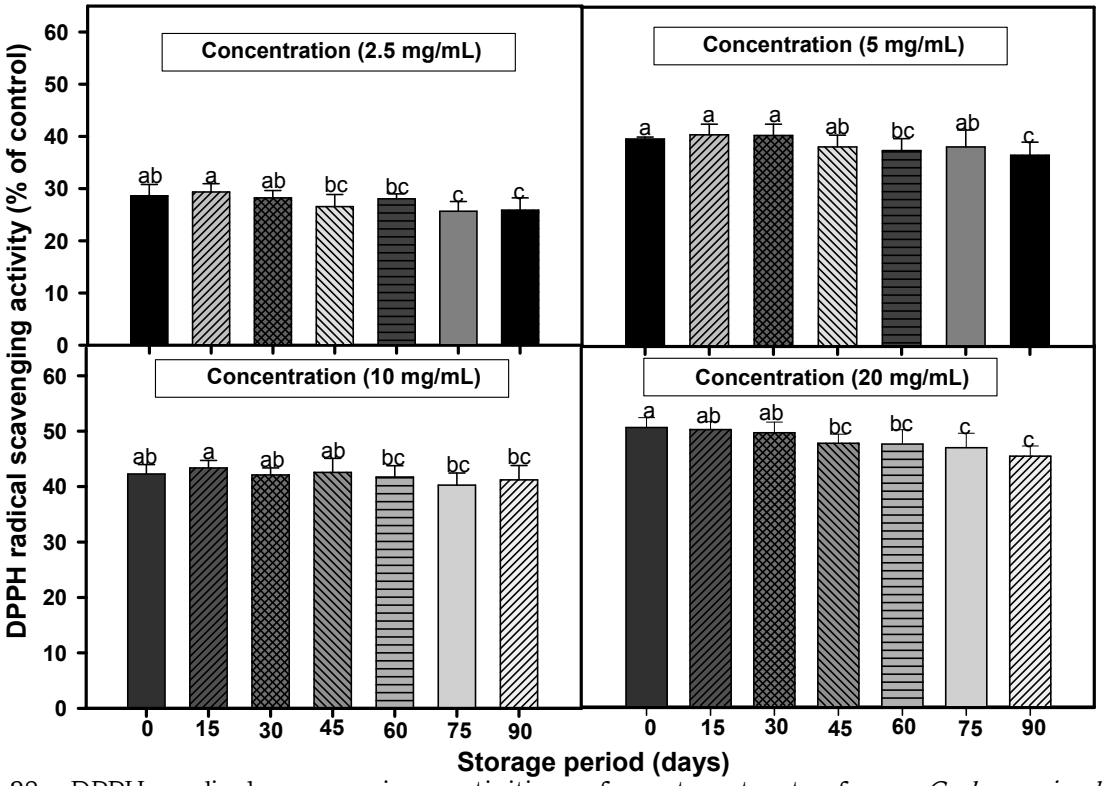


Fig. 38. DPPH radical scavenging activities of root extracts from *Codonopsis lanceolata* according to different storage period condition. The bars represent the standard error. Means followed by the same letter are not significantly different at $p<0.05$.

Table 44. DPPH radical scavenging activities of *Codonopsis lanceolata* according to grinding size

Grinding size (mm)	DPPH radical scavenging activity, % of control					
	Concentration (mg/mL)					
	0.5	1	2.5	5	10	20
10~12	13.64±1.10	14.97±1.60	23.80±1.03	26.35±0.96	28.41±2.24	33.07±0.44
7~8	10.55±0.40	16.35±1.75	23.92±1.37	25.62±2.58	30.74±1.55	44.47±0.19
5~6	12.27±1.45	14.58±1.58	25.31±2.16	27.60±2.29	33.44±3.19	44.04±0.73
1~2	13.01±1.05	18.07±2.04	27.36±0.84	32.18±2.01	31.84±0.80	47.32±0.65
powder	15.81±1.54	21.16±1.72	30.98±2.50	39.08±0.79	33.24±1.92	48.01±2.59

*Data represent the mean values±SE of three independent experiments.

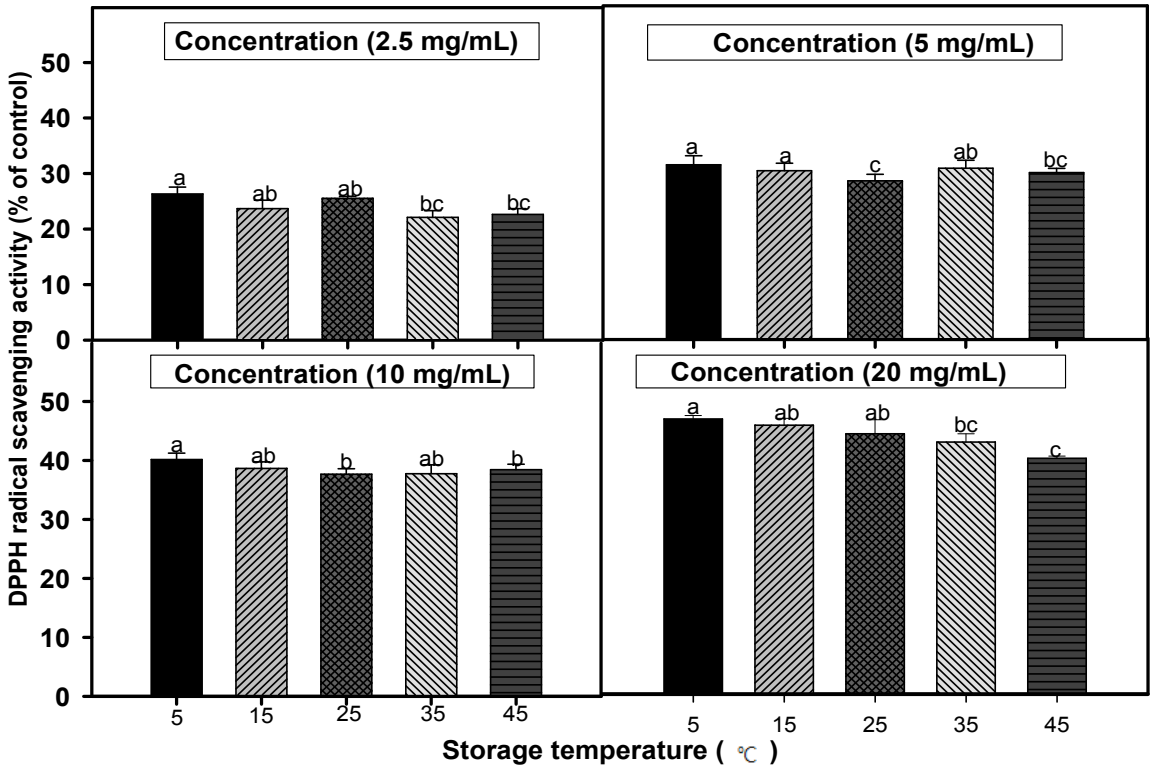


Fig. 39. DPPH radical scavenging activities of root extracts from *Codonopsis lanceolata* according to different storage temperature condition. The bars represent the standard error. Means followed by the same letter are not significantly different at $p<0.05$.

2.5, 5, 10, 20 mg/mL 등 4 가지 농도에서의 저장기간별, 저장온도별, 분쇄크기별 DPPH 소거 활성을 분석한 결과를 보면, 저장기간이 짧을수록 또는 저장온도가 낮고 분쇄입자가 미세할수록 활성이 상대적으로 높게 나타났다. 전체적으로 DPPH 소거활성의 증가는 농도에 비례하는 농도의존적 경향을 나타냈다.

(6) 총 ABTS 양이온(ABTS·+) 소거능

7.4 mM ABTS(2,2'-azinbis-(3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid) 용액과 2.6 mM과황산칼륨(potassium persulphate)을 혼합, 암소에서 약 15시간 반응시킨 후 414 nm에서 흡광도가 1.5가 되도록 희석하였다. 희석한 용액 3 ㎖에 각 농도별로 조제한 시료 150 ㎕를 첨가, vortex mixer로 10초간 진탕하고 실온에 90분간 방치한 후 414 nm에서 흡광도를 측정하였다. 한편, ascorbic acid를 시료와 같은 농도로 조제하여 동일한 방법으로 흡광도를 측정함으로써 비교하였다. 양이온 소거능은 AEAC(relative ascorbic acid equivalent antioxidant capacity)로 나타내었으며, 이는 ascorbic acid의 소거능을 1.000으로 하였을 때 동일농도 시료의 ABTS 양이온 소거능을 나타내는 것으로 다음 식에 의해 계산하였다.

$$RAEAC = \frac{Caa}{\triangle Aaa} \times \frac{\triangle As}{Cs}$$

⊿Aaa : ascorbic acid 넣었을 때 흡광도 변화, Caa : ascorbic acid의 농도

⊿As : 시료 넣었을 때 흡광도 변화, Cs : 시료 농도

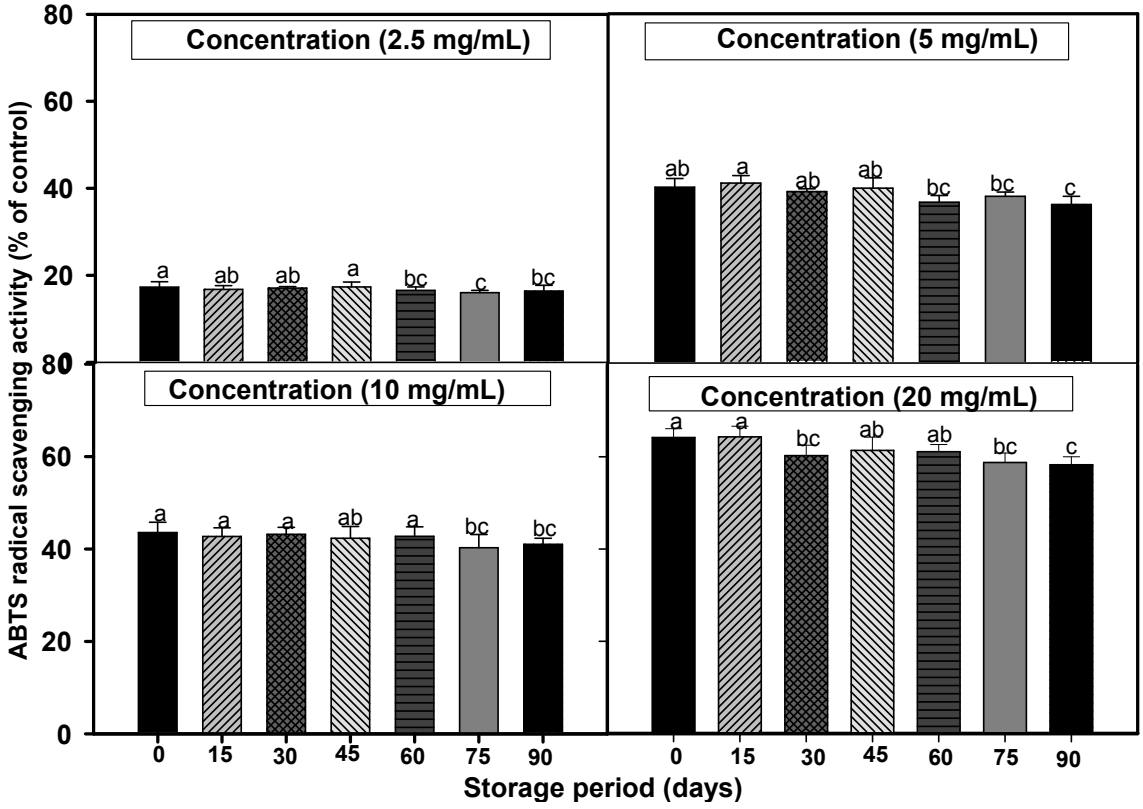


Fig. 40. ABTS radical scavenging activities of root extracts from *Codonopsis lanceolata* according to different storage period condition. The bars represent the standard error. Means followed by the same letter are not significantly different at $p<0.05$.

Table 45. ABTS radical scavenging activities of *Codonopsis lanceolata* according to grinding size

Grinding size (mm)	ABTS radical scavenging activity, % of control					
	Concentration (mg/mL)					
	0.5	1	2.5	5	10	20
10~12	4.57±0.42	5.91±1.17	6.99±0.47	13.29±1.02	21.01±0.82	36.98±0.12
7~8	8.64±0.80	10.50±1.43	12.67±0.61	21.00±1.49	26.74±1.71	42.18±1.17
5~6	8.59±0.98	10.56±1.17	13.98±1.00	26.05±2.19	39.76±1.01	56.78±1.93
1~2	6.61±0.95	10.95±0.65	17.67±0.98	38.06±0.59	45.49±1.53	64.72±1.34
powder	7.04±0.36	9.46±0.26	16.65±0.65	36.38±1.54	43.09±1.00	60.74±0.92

*Data represent the mean values±SE of three independent experiments.

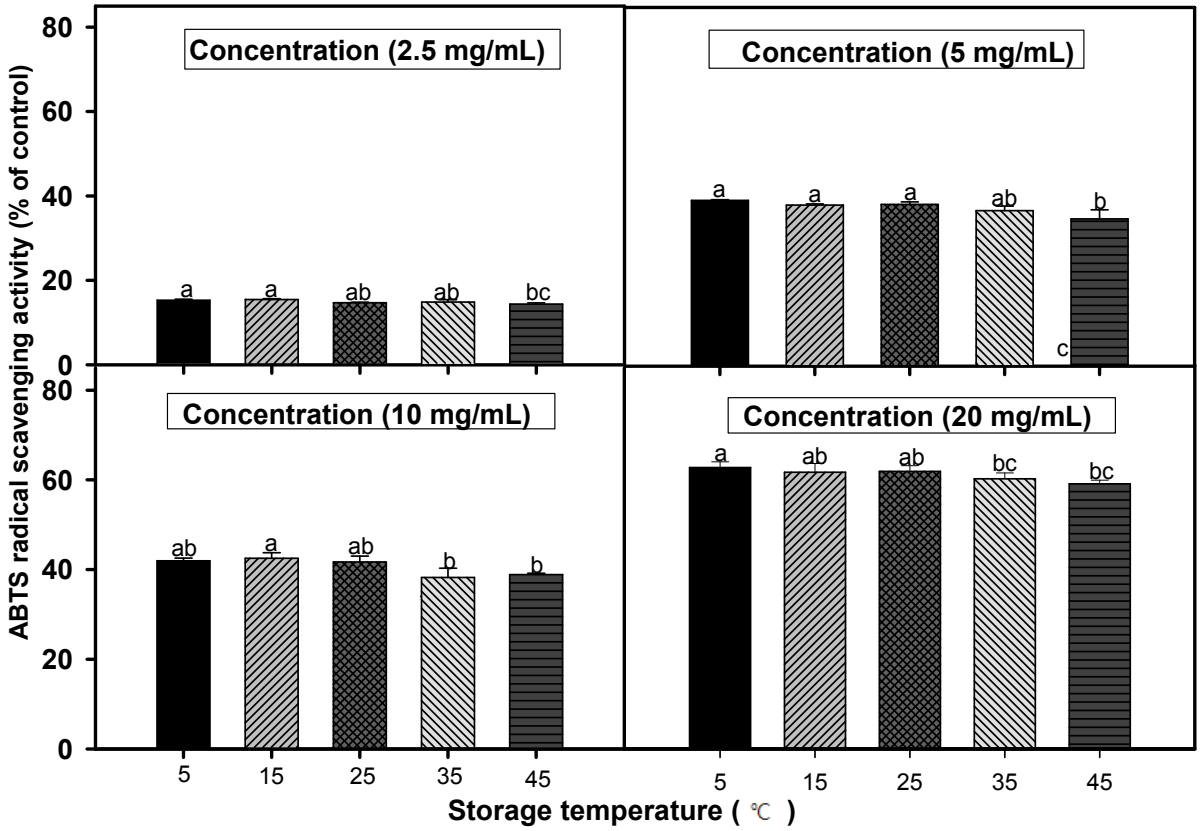


Fig. 41. ABTS radical scavenging activities of root extracts from *Codonopsis lanceolata* according to different storage temperature condition. The bars represent the standard error. Means followed by the same letter are not significantly different at $p<0.05$.

ABTS 양이온 소거활성을 저장기간별, 저장온도별, 분쇄크기별로 분석한 결과를 보면, 추출물의 농도가 증가할수록 비례적으로 증가되는 경향을 보였다. 저장기간과 저장온도에 따라서는 큰 차이를 보이지 않았지만, 분쇄크기에 있어서는 분말상에 가까운 미세한 입자 크기에서 상대적으로 높은 소거활성을 나타냈다.

(7) 아질산염 소거능

시료 추출물의 아질산염 소거작용의 측정은 1mM $NaNO_2$ 20㎕에 시료의 추출액 40㎕와 0.1N HCl(pH 1.2) 또는 0.2M citrate buffer (pH 4.2, 6.0)를 140㎕ 사용하여 부피를 200㎕로 맞추었다. 이 반응액을 37℃ 항온수조에서 1시간 반응시킨 후 2% acetic acid 1000㎕, Griess 시약 (30% acetic acid로 조제한 1% sulfanilic acid와 1% naphthylamine을 1:1 비율로 혼합한 것, 사용직전에 조제) 80㎕를 가하여 잘 혼합시켜 빛을 차단한 상온에서 15분간 반응시킨 후 520nm에서 흡광도를 측정하여 아래와 같이 아질산염 소거능을 구하였다.

$N(\%) = [1-(A-C)/B] \times 100$

N : nitrite scavenging ability

A : absorbance of 1mM $NaNO_2$ added sample after standing for 1hour

B : absorbance of 1$NaNO_2$

C : absorbance of control

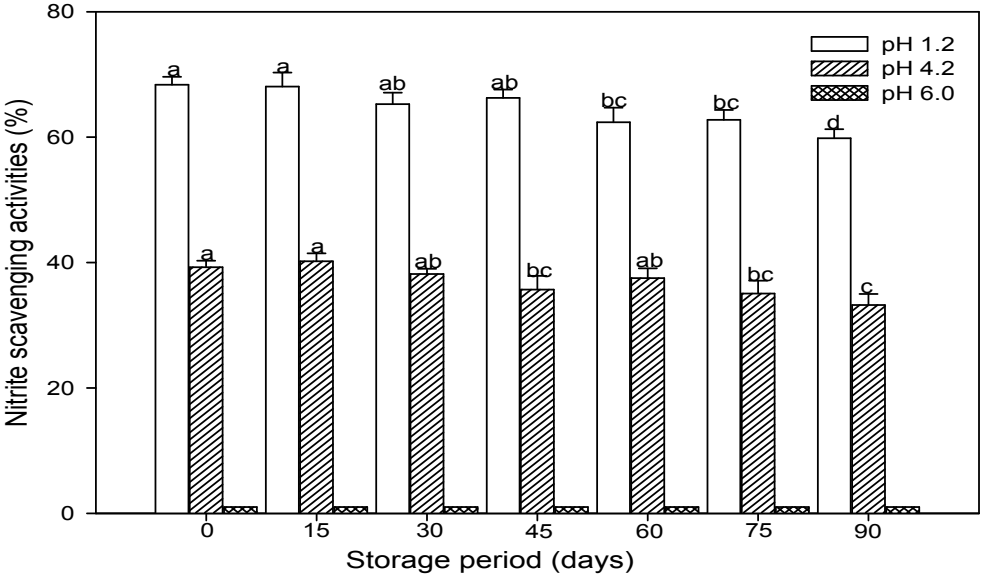


Fig. 42. Nitrite scavenging activities of root extracts from *Codonopsis lanceolata* according to different storage period condition. The bars represent the standard error. Means followed by the same letter are not significantly different at $p<0.05$.

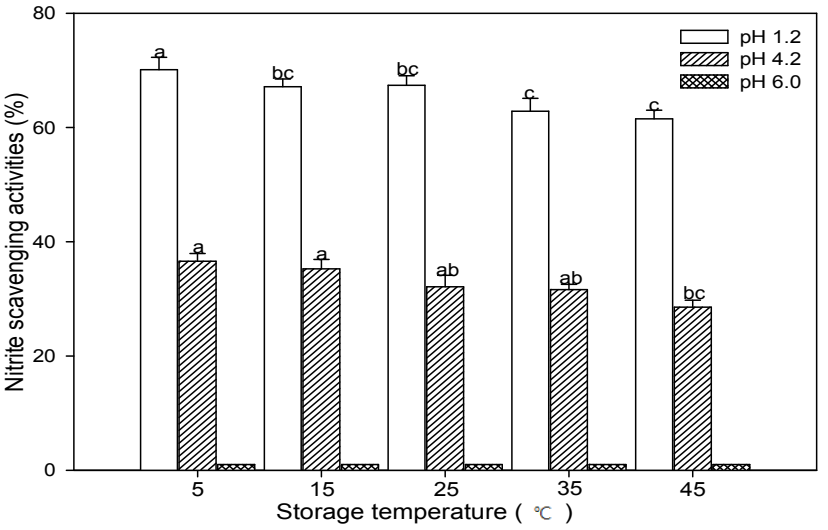


Fig. 43. Nitrite scavenging activities of root extracts from *Codonopsis lanceolata* according to different storage temperature condition. The bars represent the standard error. Means followed by the same letter are not significantly different at $p<0.05$.

아질산염 제거 효과는 저장기간별, 저장온도별 모든 샘플에서 pH 1.2에서 가장 높았다. 그러나 pH 범위 6.0에서는 아질산염 제거 효과에 대한 뚜렷한 탐지는 없었다.

(8) 환원력(reducing power) 측정

Reducing power는 Oyaizu의 방법을 변형하여 측정하였다. 30% ethanol 추출물(10 μg/mL) 30, 60, 90 μL에 0.2M sodium phosphate buffer(pH 6.6) 500 μL, 1% potassium ferricyanide 500 μL를 각각 혼합하여 50oC에서 20분 동안 반응시킨 후 10% trichloroacetic acid 2.5 mL을 가하였다. 위 반응액을 650 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액 500 μL에 증류수 500 μL, 1% ferric chloride 100 μL를 가하여 혼합한 반응액의 흡광도 값을 700 nm에서 측정하였다.

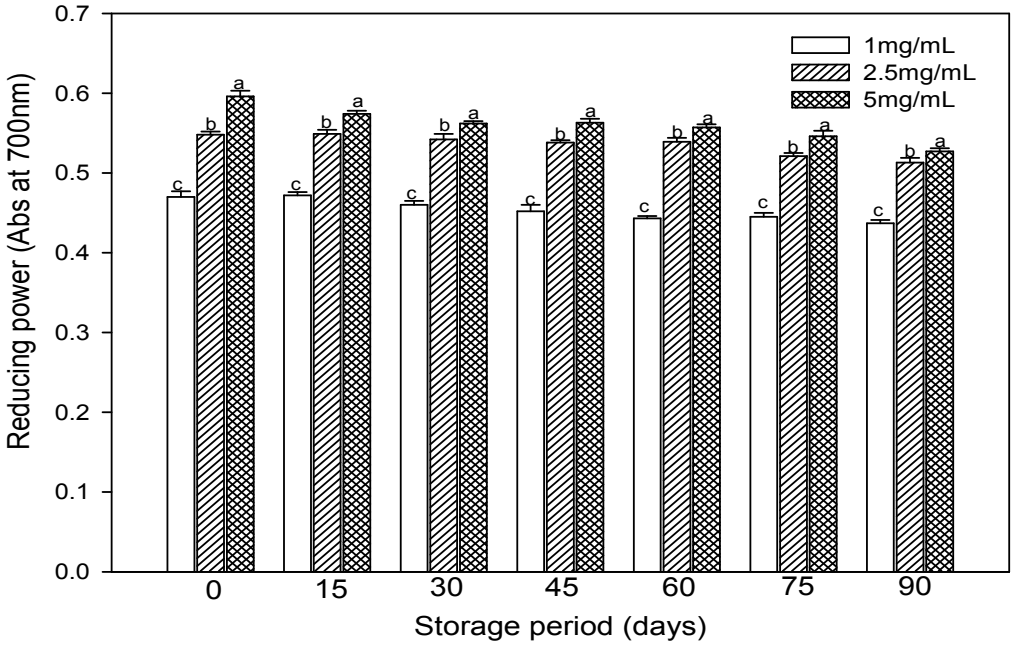


Fig. 44. Reducing power according to the storage period of *Codonopsis lanceolate* (n = 3). The bars represent the standard error. Means followed by the same letter are not significantly different at p<0.05.

Table 46. The Reducing power of *Codonopsis lanceolata* according to grinding size

(Unit: Absorbance)

Grinding Size (mm)	Reducing power		
	Concentration (mg/mL)		
	1	2.5	5
10~12	0.451±0.028	0.473±0.017	0.495±0.025
7~8	0.450±0.024	0.480±0.012	0.504±0.016
5~6	0.451±0.015	0.483±0.028	0.501±0.023
1~2	0.474±0.022	0.482±0.025	0.528±0.008
powder	0.463±0.026	0.555±0.015	0.587±0.029

*Data represent the mean values±SE of three independent experiments.

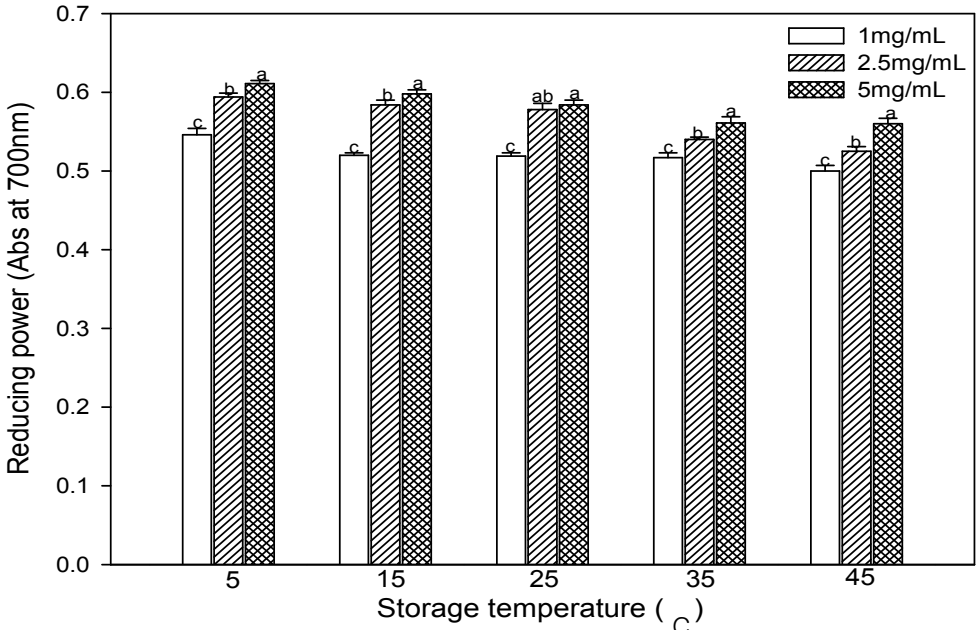


Fig. 45. Reducing power according to the storage temperature of *Codonopsis lanceolate* (n = 3). The bars represent the standard error. Means followed by the same letter are not significantly different at $p<0.05$.

저장기간, 저장온도, 분쇄크기에 따른 환원력을 측정한 실험결과를 보면, 농도가 높아짐에 따라 활성도 증가하여 농도의존적인 경향을 보였다. 전반적으로 분쇄 입자가 미세한 시료에서 환원력이 상대적으로 다소 높은 활성을 보였으며, 저장기간과 저장온도가 높아감에 따라서 활성도 점차 감소하는 경향을 보였다.

(9) Xanthine oxidase 저해 활성 측정

더덕 추출물의 저장기간, 저장온도 및 분쇄크기에 따른 xanthine oxidase 저해활성은 Noro(1983)과 Stirpe(1969) 등의 방법을 변형하여 측정하였다. 즉, 각 시료용액 0.1mL와 0.1M potassium phosphate buffer(pH 7.5) 용액 0.6mL에 2mM xanthine을 녹인 기질액 0.2mL를 첨가하고, 여기에 xanthine oxidase(0.2 U/mL) 0.1mL를 가하여 37℃에서 15분간 반응시킨 후 1N HCl 1mL를 가하여 반응을 종료시킨 다음 반응액 중에 생성된 uric acid의 양을 UV/VIS spectrophotometer를 이용하여 292nm에서의 흡광도로 효소활성을 측정하였다. 이 때 대조구에는 시료 대신 증류수를 0.1mL 첨가하였으며, 반응 정지물로는 20% trichloroacetic acid (TCA) 1mL를 가하여 반응을 정지시키고 여과하여 단백질을 제거한 후 측정하였다. xanthine oxidase 저해활성은 시료용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율, 즉 반응 용액 중에 생성된 uric acid의 백분율로서 나타내어 다음 식으로 구하였다.

$$\text{저해율(\%)} = \left(1 - \frac{\text{반응구의 uric acid 생성량}}{\text{대조구의 uric acid 생성량}}\right) \times 100$$

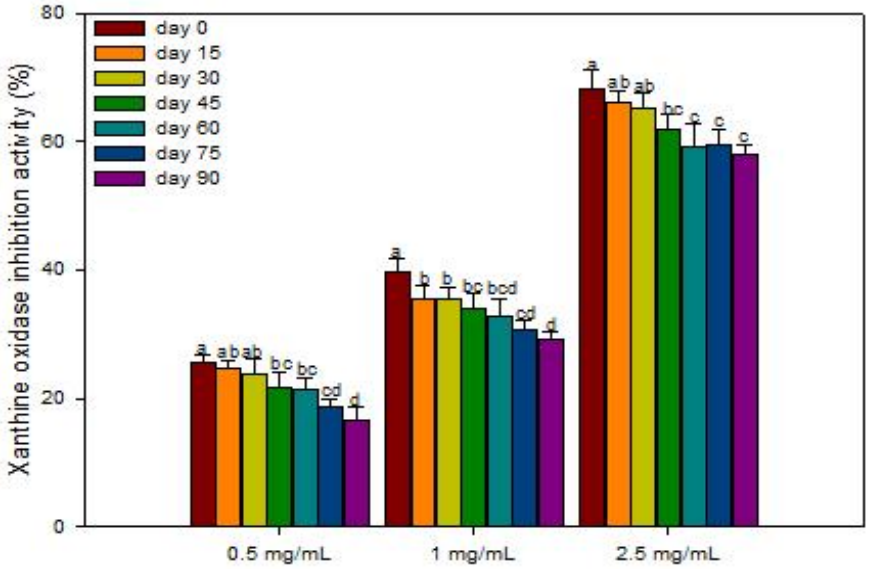


Fig. 46. Xanthine oxidase inhibition activity according to the storage period of *Codonopsis lanceolata* (n = 3). The bars represent the standard error. Means followed by the same letter are not significantly different at $p<0.05$.

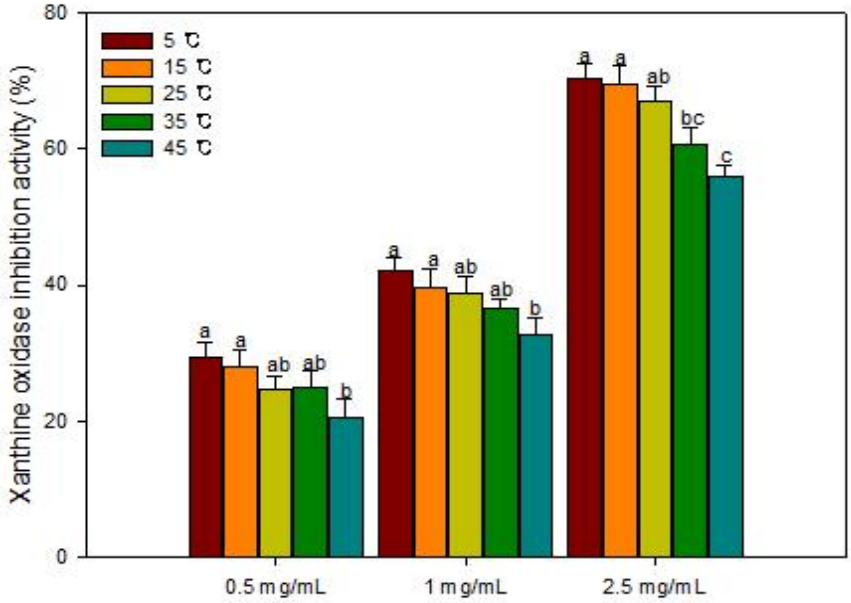


Fig. 47. Xanthine oxidase inhibition activity according to the storage temperature of *Codonopsis lanceolata* (n = 3). The bars represent the standard error. Means followed by the same letter are not significantly different at $p<0.05$.

Table 47. Xanthine oxidase inhibition activity of *Codonopsis lanceolata* according to grinding size

Grinding size (mm)	Xanthine oxidase inhibition activity (%)		
	Concentration (mg/mL)		
	0.5	1	2.5
10~12	11.26±1.21	25.05±2.65	56.23±2.65
7~8	12.98±1.08	26.80±2.18	57.27±3.53
5~6	17.74±1.35	31.99±2.45	64.32±3.78
1~2	18.63±2.31	35.55±1.92	64.57±2.26
powder	25.67±1.87	38.06±2.76	68.26±3.06

*Data represent the mean values±SE of three independent experiments.

더덕의 xanthine oxidase 저해활성을 보면, 저장기간이 길어질수록 또는 저장온도가 높을수록 활성이 낮아지는 경향을 보였으며, 그리고 분쇄크기가 가장 미세한 형태인 분말인 경우가 xanthine oxidase 저해활성이 높게 나타났다.

(10) SOD (SuperOxide Dismutase) 활성 분석

더덕 추출물의 저장온도 및 분쇄크기에 따른 SOD 활성을 측정하였다. 분석방법은 아래에 기술한 항산화효소 분석에서의 SOD 활성 분석법과 동일하다.

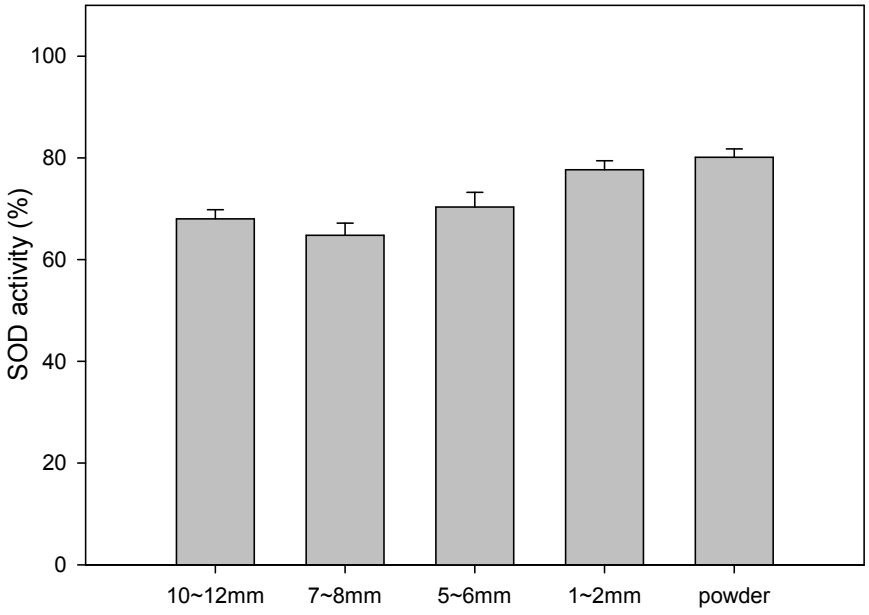


Fig. 48. SOD activities of *Codonopsis lanceolata* according to grinding size

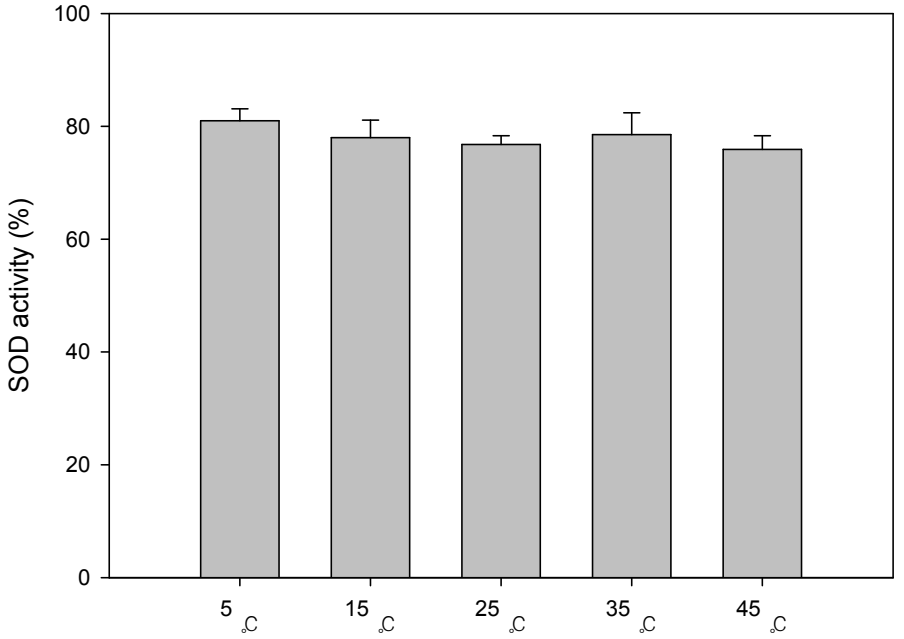


Fig. 49. SOD activities of *Codonopsis lanceolata* according to storage temperature

더덕 추출물의 SOD활성 측정결과를 보면, 저장온도에 따라서는 활성에 차이가 거의 없었으며, 분쇄크기별로 보면 미세한 입자일수록 활성이 높게 나타났다.

(11) 더덕 추출물 분획별 생리기능성 평가

더덕의 표준 추출공정을 설정한 공정으로부터 획득한 30% 주정알코올 추출물을 이용하여 Hexane, MC, EA, BuOH, DW 등의 분획물을 제조하고, 이들 각 분획물의 생리기능성을 평가하였다.

(가) 용매분획 및 용매분획별 수율

제주지역 재배 더덕을 선별하여 세척한 다음 동결건조 후, 30% 주정알코올로 3회 반복 상온 추출한 다음, 감압 농축하여 더덕 추출물을 얻었다. 농축한 더덕 추출물을 동결 건조한 분말 50g을 *n*-hexane, Methylene chloride, Ethyl acetate, Butyl alcohol, D.W.(distilled water) 등의 용매별로 3회 반복하여 분획을 행한 다음, 추출액을 감압농축기로 완전히 농축한 후에 무게를 측정하는 방법으로 각 분획물의 회수율을 조사하였다. 그 결과, 물 추출에서 가장 높은 회수율을 보였고, Ethyl acetate 층에서는 극히 미미한 수준의 수율을 나타냈다. 즉, 추출수율은 노르말핵산 가용부 1.21 g, 메틸렌클로라이드 가용부 0.25 g, 에틸아세테이트 가용부 0.12 g, 부틸알코올 가용부 2.38 g, 물 가용부 37.5 g를 얻을 수 있었다.

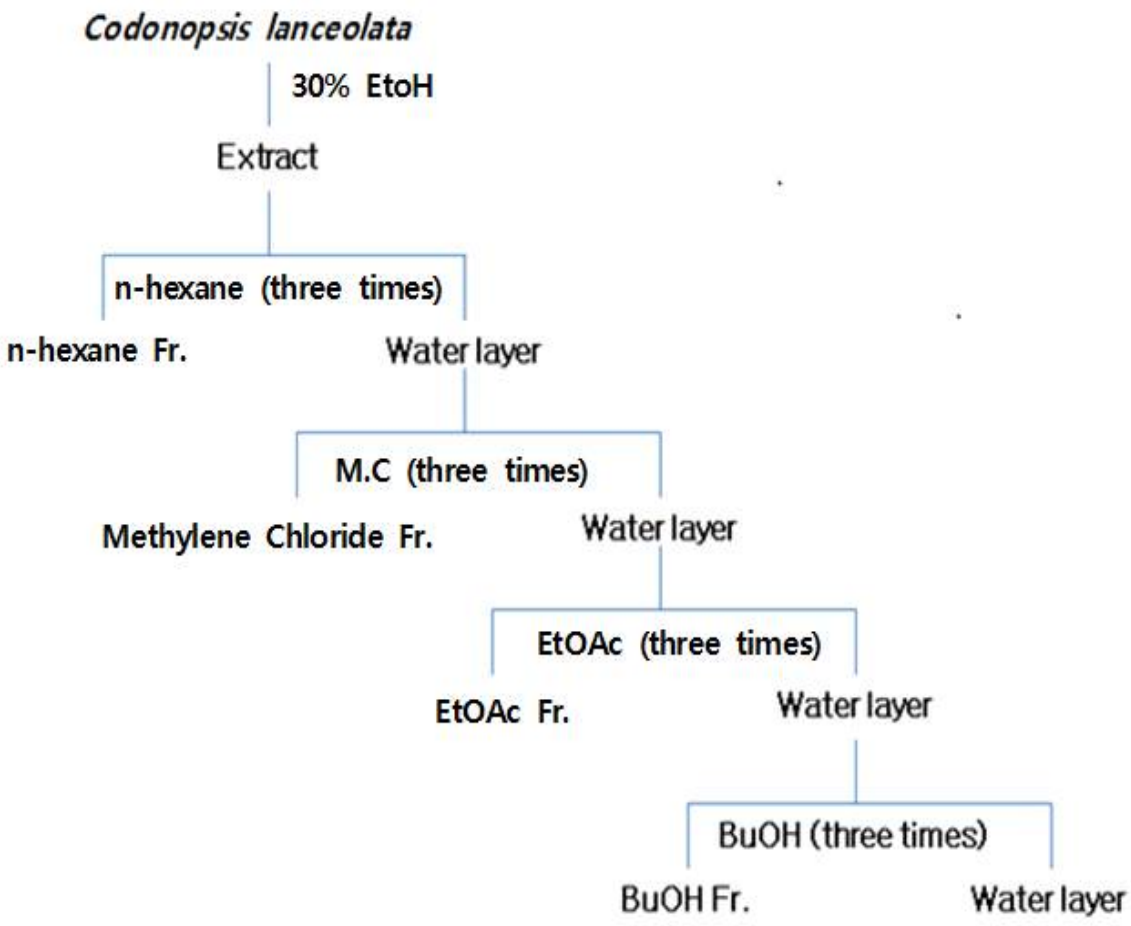


Fig. 50. Extraction and solvent partition in roots of *Codonopsis lanceolata*

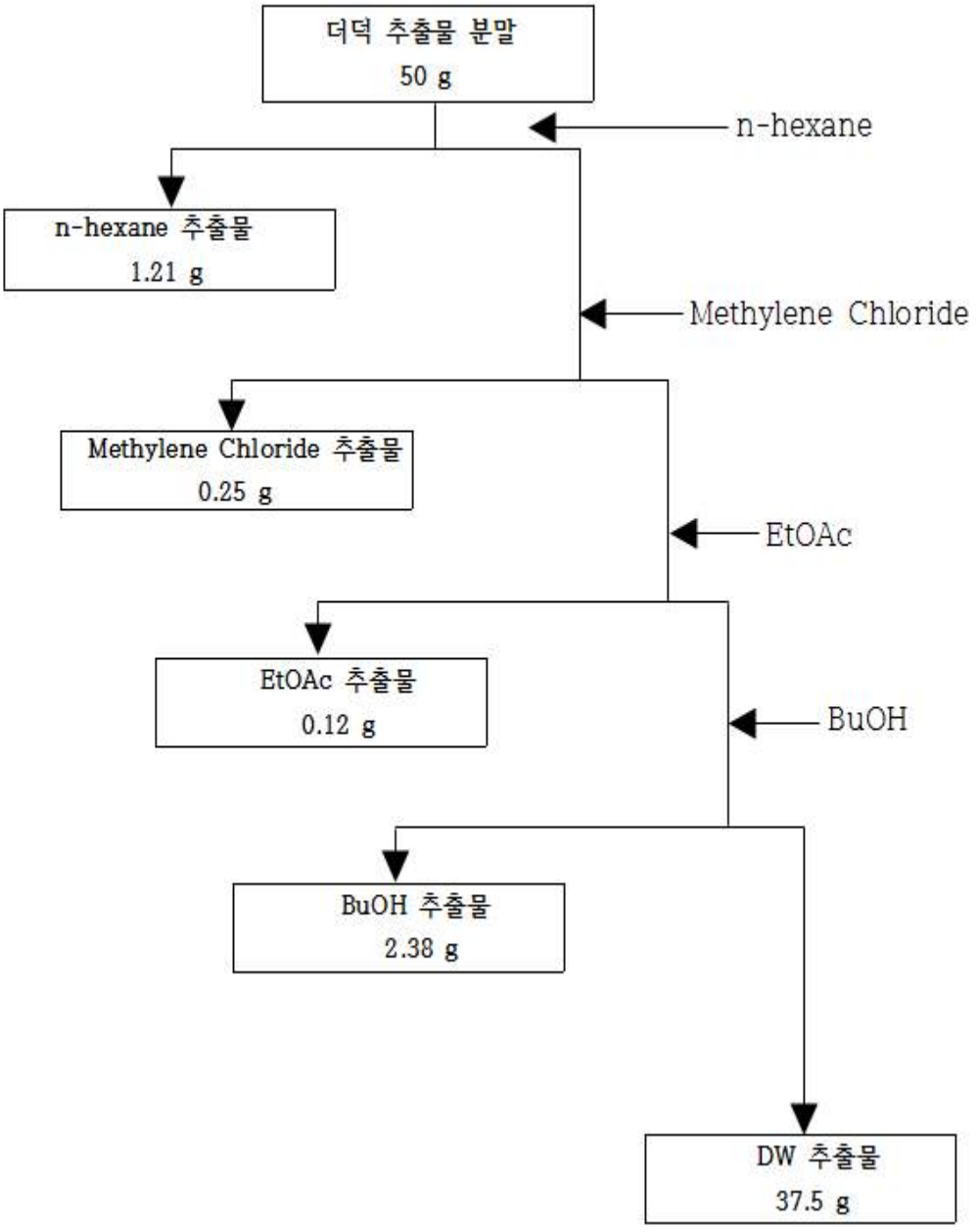


Fig. 51. Yield rate of solvent partition in roots of *Codonopsis lanceolata*

(나) 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 측정

분석방법은 상기 기술한 방법과 동일하다.

Table 48. Total polyphenol and flavonoid contents of different solvent fractions from *Codonopsis lanceolata* extracts

Solvent	Total polyphenol (mg/g extract)	Total flavonoid (mg/g extract)
n-H	108.27±3.62[c]	10.62±0.55[bc]
MC	125.18±2.58[b]	12.25±1.06[b]
EA	153.52±3.18[a]	16.63±1.32[a]
BA	121.35±2.82[b]	12.58±0.86[b]
DW	102.43±3.09[c]	8.75±1.27[c]

[z]Data represent the mean values±SE of three independent experiments.
[y]Meanswiththesameletterincolumnare not significantly different by Duncan's multiple range test at p<0.05 level. n-H: normal hexane, MC: methylene chloride, EA: ethyl acetate, BA: butyl alcohol, DW: distilled water

(다) 항산화 활성 분석

항산화활성은 DPPH 소거활성, ABTS 소거활성, 아질산염 소거활성에 대하여 분석하였으며, 그 분석방법은 상기 기술한 방법과 동일하다.

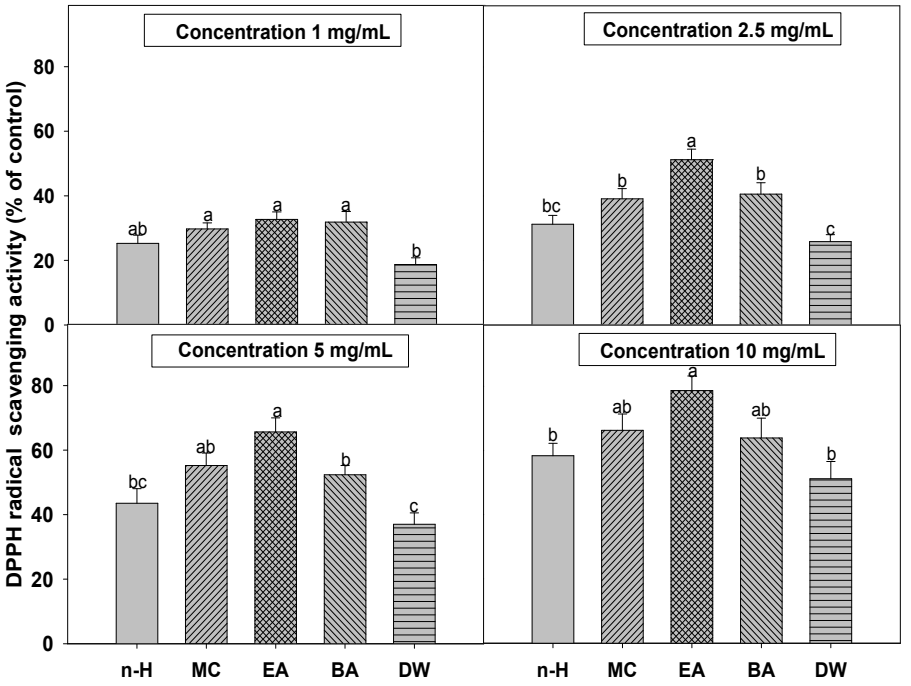


Fig. 52. DPPH radical scavenging activities of root extracts from *Codonopsis lanceolata* according to different solvent fractions. Each bar represent mean±SE of three experiments in duplicate. Means with the same letter in column are not significantly different at p<0.05 level by Duncan's multiple range test. n-H: normal hexane, MC: methylene chloride, EA: ethyl acetate, BA: butyl alcohol, DW: distilled water

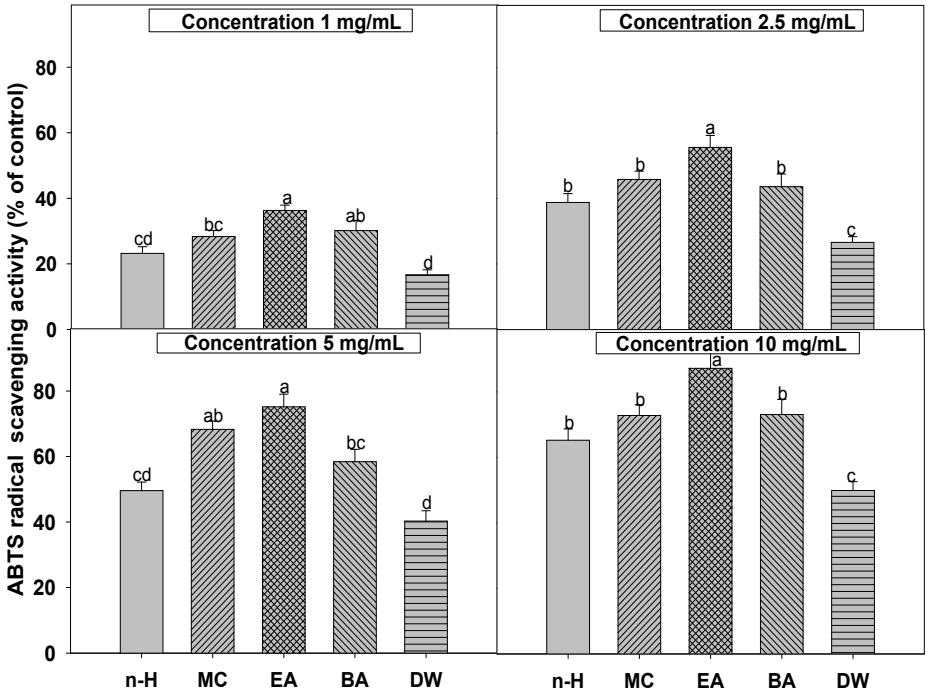


Fig. 53. ABTS radical scavenging activities of root extracts from *Codonopsis lanceolata* according to different solvent fractions. Each bar represent mean±SE of three experiments in duplicate. Means with the same letter in column are not significantly different at $p<0.05$ level by Duncan's multiple range test. n-H: normal hexane, MC: methylene chloride, EA: ethyl acetate, BA: butyl alcohol, DW: distilled water

Table 49. Nitrite scavenging activities of different solvent fractions from *Codonopsis lanceolata* extracts

Solvent	Nitrite scavenging activity(%)		
	pH 1.2	pH 4.2	pH 6.0
n-H	58.53±1.52[bc]	26.52±1.51[c]	ND
MC	60.36±2.38[bc]	33.65±1.36[b]	ND
EA	69.25±2.17[a]	42.18±1.55[a]	ND
BA	63.28±1.86[b]	31.82±2.23[bc]	ND
DW	55.62±1.32[c]	27.23±2.35[c]	ND

[z]Data represent the mean values±SE of three independent experiments.
[y]Meanswiththesameletterincolumnare not significantly different by Duncan's multiple range test at $p<0.05$ level. ND: not detected, n-H: normal hexane, MC: methylene chloride, EA: ethyl acetate, BA: butyl alcohol, DW: distilled water

(라) 항산화효소 활성 분석

① 효소액 조제

시료 0.5g에 Extract Buffer [100 mM K-PO_4 buffer(pH7.5), 100 mM EDTA, 1% PVP, 100 mM PMSF] 2 ml로 균질화하여 15.000g 로 20분간 원심분리한 다음 상층액을 항산화활성 측정에 사용하였다. Ascorbate peroxidase (APX)의 경우 extraction buffer에 위의 조성액에 10mM를 첨가하여 사용하였다. 단백질 정량은 BSA를 표준물질로 사용하여 Bradford (1976)방법에 따라 측정하였다.

② SOD (SuperOxide Dismutase)

SOD효소 활성 검정은 분석용 Kit (Sigma사,19160)를 사용하여 측정하였다. 즉, SOD의 효소 활성이 NBT(Nitroblue tetrazolium)의 환원을 저해하는 능력을 검정하는 photochemical NBT method를 사용하였다. 반응액은 50 mM carbonic buffer (pH 10.2), 0.1 mM EDTA, 0.1 mM Xanthine, 0.025 mM NBT로 하였으며, NBT환원 저해율을 흡광도 450nm에서 측정하였다. 각 시료에 대하여 3회 반복으로 하였으며, SOD효소 활성은 다음의 계산식에 의해 환산하였다.

$$\text{SOD활성 (NBT환원 저해율, \%)} = \{[(A_{blank1}-A_{blank3})-(A_{sample}-A_{blank2})] / (A_{blank1}-A_{blank3})\times 100$$

③ CAT (Catalase)

CAT활성은 Aebi 등(1984)의 방법에 의해 측정하였으며, 반응액은 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0)와 10 mM H2O2로 하였다. CAT 활성은 반응액에 추출액을 가한 다음 240 mM에 2분간의 흡광도 변화를 측정하였다.

④ APX (Ascorbate Peroxidase)

APX 활성은 Nacano and Asada(1981)방법에 따라 ascorbate의 산화 정도를 290nm에서 2분간의 흡광도 변화를 측정하였다. APX의 반응액은 0.5mM ascorbate와 0.2mM H2O2가 첨가된 100mM potassium phosphate buffer (pH 7.5)로 하였다.

⑤ POD (Peroxidase)

POD 활성은 Egley 등 (1983)의 방법에 의해 측정하였으며, 반응액은 최종농도가 40mM K-PO_4 buffer (pH6.9), 1.5mM guaiacol, 6.5mM H_2O_2가 되도록 만든다. POD 활성은 반응액에 sample을 혼합하여 spectrophotometer를 이용해서 470nm에서 2분간 흡광도 변화를 측정하였다.

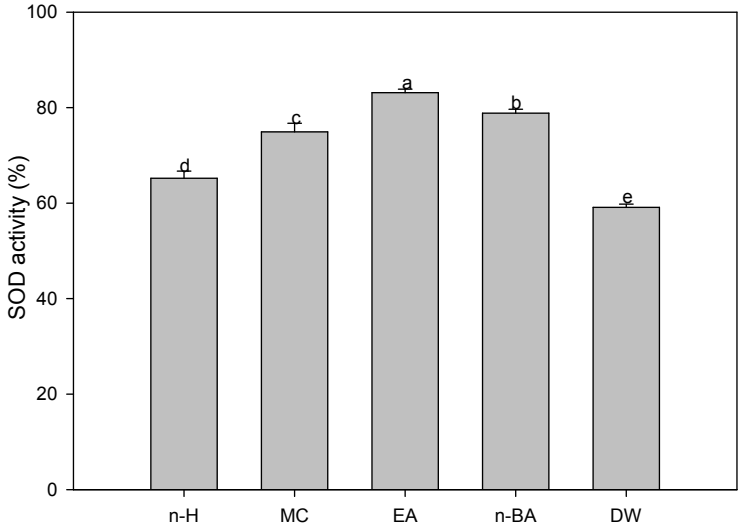


Fig. 54. SOD activities using different solvent fractions of *Codonopsis lanceolata*. Means with the same letter in column are not significantly different at p<0.05 level by Duncan's multiple range test. The bars represent the standard error. n-H: n-hexane, MC: Methylene chloride, EA: Ethyl acetate, BA: Butyl alcohol, DW: distilled water

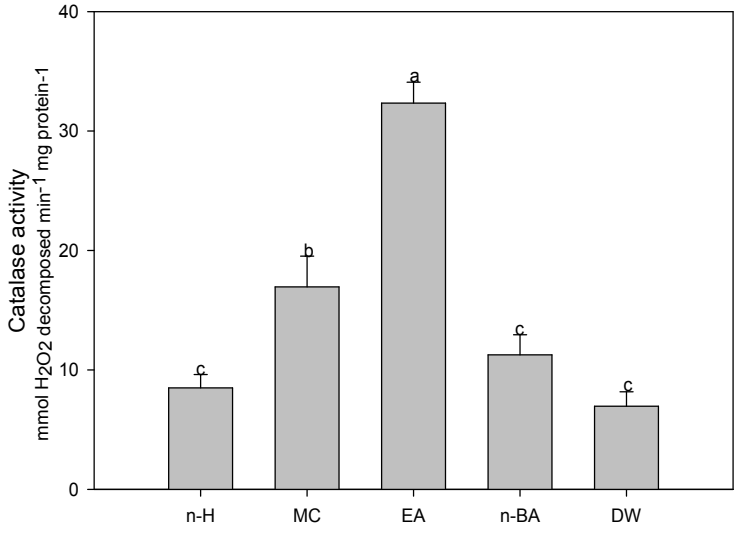


Fig. 55. CAT activities using different solvent fractions of *Codonopsis lanceolata*. Means with the same letter in column are not significantly different at p<0.05 level by Duncan's multiple range test. The bars represent the standard error. n-H: n-hexane, MC: Methylene chloride, EA: Ethyl acetate, BA: Butyl alcohol, DW: distilled water

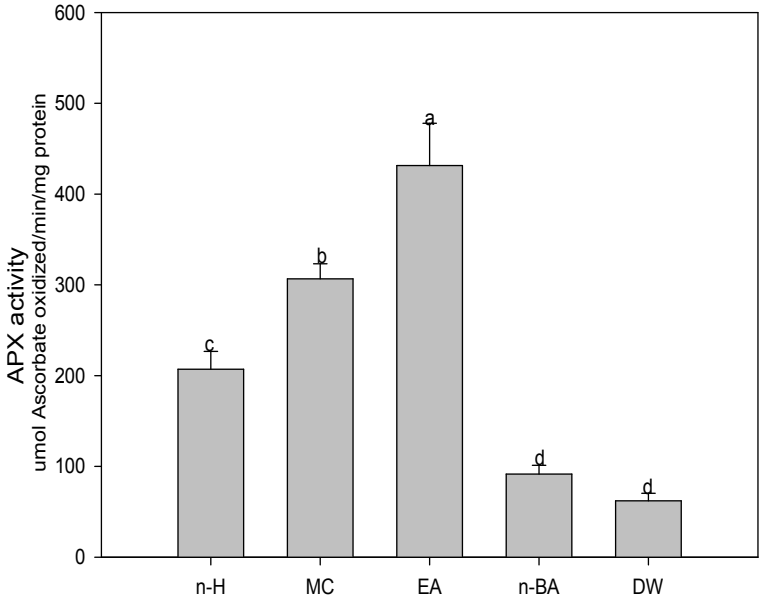


Fig. 56. APX activities using different solvent fractions of *Codonopsis lanceolata*. Means with the same letter in column are not significantly different at p<0.05 level by Duncan's multiple range test. The bars represent the standard error. n-H: n-hexane, MC: Methylene chloride, EA: Ethyl acetate, BA: Butyl alcohol, DW: distilled water

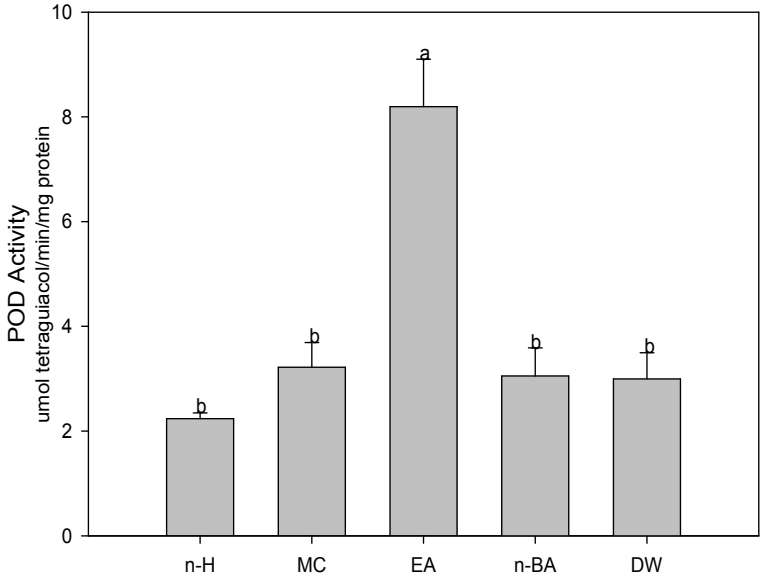


Fig. 57. POD activities using different solvent fractions of *Codonopsis lanceolata*. Means with the same letter in column are not significantly different at p<0.05 level by Duncan's multiple range test. The bars represent the standard error. n-H: n-hexane, MC: Methylene chloride, EA: Ethyl acetate, BA: Butyl alcohol, DW: distilled water

더덕 추출물의 분획별 항산화효소 활성을 보면, 전체적으로 Ethyl acetate 분획에서 가장 높았으며, n-hexane 분획과 DW 분획에서는 상대적으로 활성이 낮게 나타났다.

(마) 인체암세포주에 대한 항암 활성 분석

제주 지역 재배 더덕 추출물의 용매별 분획물을 시료로 인체암세포주에 대한 항암 효과를 측정하기 위해 MTT (3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5- diphenyltetrazoliumbromide) assay를 실시하여 측정하였다. 자궁암세포인 HeLa, 유방암세포인 MCF-7, 폐암세포인 Calu-6 세포주를 96well plate에 분주하고 37℃, 5%, CO_2 incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 배양한 세포에 시료 농도가 50, 100, 200, 400, 800 ㎍/ml가 되도록 10㎕ 처리한 후, 각각 24시간 배양하였고, 0.2㎎/㎖의 MTT 용액 10㎕를 각 well에 넣고 incubator에서 4시간 동안 배양하였다. 배양 종료 후 상등액을 제거하고 각 well에 100㎕의 DMSO를 첨가하여 상온에서 10분 동안 반응시킨 후 microplate reader로 540nm에서 흡광도를 측정하였고, 세포독성은 시료의 흡광도를 대조군의 흡광도에 대한 백분율로 나타내었다.

Table 50. Cytotoxicity of different solvent fractions from *Codonopsis lanceolata* extracts on three human cancer cell lines

Cell line	Solvent	Cell viability (% of control)					
		Concentration (㎍/mL)					
		50	100	200	400	800	1000
HeLa	n-H	52.13±3.21^{c}	48.52±4.06^{d}	37.23±3.05^{e}	31.08±1.98^{d}	22.31±2.06^{e}	20.15±1.18^{e}
	MC	72.59±2.58^{b}	70.28±3.65^{c}	62.31±2.92^{cd}	55.09±3.22^{b}	41.23±3.21^{c}	37.25±1.86^{c}
	EA	92.52±3.52^{a}	92.18±2.93^{ab}	87.15±3.07^{b}	81.26±3.05^{ab}	50.43±2.68^{b}	42.39±2.21^{bc}
	BA	81.65±2.92^{b}	78.51±3.61^{b}	58.63±2.82^{d}	45.18±3.51^{c}	39.26±2.23^{cd}	31.18±2.18^{d}
	DW	99.28±2.83^{a}	95.35±3.27^{a}	96.37±2.59^{a}	89.63±2.85^{a}	83.85±3.52^{a}	83.28±2.73^{a}
Calu-6	n-H	49.06±3.06^{d}	39.26±4.21^{c}	28.62±1.58^{e}	21.03±3.18^{e}	17.08±1.98^{e}	17.35±2.07^{d}
	MC	75.13±2.23^{bc}	75.82±3.06^{bc}	72.29±3.51^{c}	53.28±2.52^{c}	45.18±1.25^{c}	39.02±2.51^{bc}
	EA	86.23±5.92^{ab}	85.19±6.31^{b}	81.39±2.57^{b}	72.52±5.18^{b}	53.19±1.92^{bc}	41.61±2.38^{bc}
	BA	69.54±4.15^{c}	72.05±6.56^{bc}	55.21±2.63^{d}	32.06±2.16^{d}	23.15±2.17^{d}	20.17±3.02^{c}
	DW	97.82±5.81^{a}	96.85±3.62^{a}	96.25±5.71^{a}	93.28±4.22^{a}	89.26±3.82^{a}	86.38±2.33^{a}
MCF-7	n-H	70.51±2.92^{c}	42.58±2.18^{d}	38.18±3.62^{e}	23.06±2.51^{e}	15.03±1.42^{d}	10.17±1.08^{de}
	MC	85.68±3.52^{b}	79.52±3.95^{bc}	58.77±2.68^{c}	50.26±3.26^{c}	35.62±2.38^{c}	23.27±1.53^{bc}
	EA	88.25±4.25^{ab}	83.29±3.77^{b}	71.35±2.08^{b}	65.33±2.67^{b}	42.52±2.26^{bc}	20.15±2.18^{c}
	BA	78.59±2.92^{bc}	63.52±2.63^{c}	41.23±4.03^{de}	32.19±2.78^{d}	26.12±2.53^{cd}	13.09±1.03^{d}
	DW	98.23±3.63^{a}	98.51±2.55^{a}	97.35±3.28^{a}	97.03±3.55^{a}	88.28±3.82^{a}	88.16±2.85^{a}

[z]Data represent the mean values±SE of three independent experiments. [y]Meanswiththesameletterincolumnare not significantly different by Duncan's multiple range test at $p<0.05$ level. n-H: normal hexane, MC: methylene chloride, EA: ethyl acetate, BA: butyl alcohol, DW: distilled water

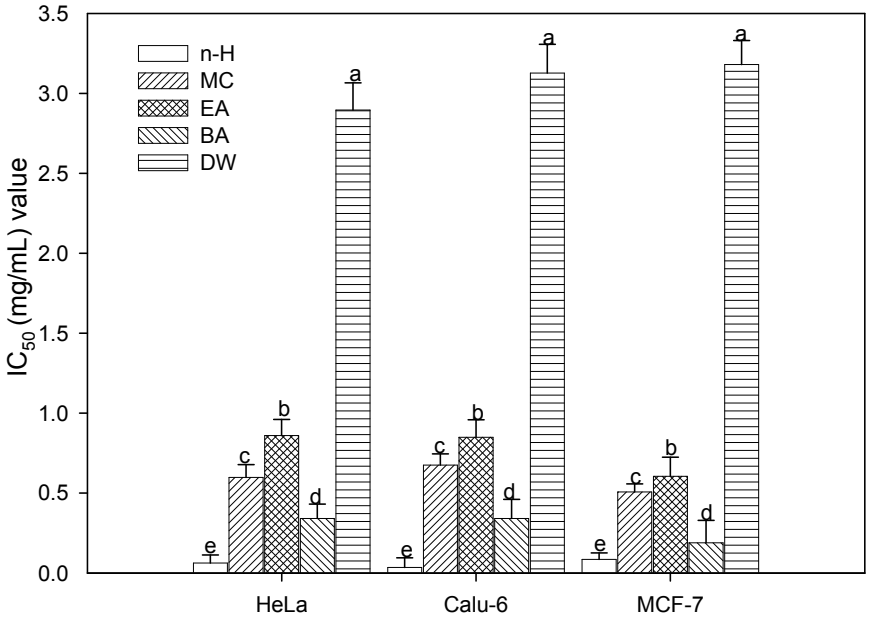


Fig. 58. Cytotoxic activity (IC_{50}values)of *Codonopsis lanceolata* extracts according to different solvent fractions on three human cancer cell lines. IC_{50} is defined as the extract concentration at which there was a 50% decrease in cell number. Each bar represent mean±SE of three experiments in duplicate. Means with the same letter in column are not significantly different at $p<0.05$ level by Duncan' s multiple range test. n-H: normal hexane, MC: methylene chloride, EA: ethyl acetate, BA: butyl alcohol, DW: distilled water

MTT방법에 의한 더덕시료 분획 추출물의 인체암세포주에 대한 세포독성도를 확인한 결과, DW 분획에서는 1000 ug/mL의 고농도에서도 인체암세포주에 대해서 다소 낮은 독성도를 보였는데, n-Hexane, MethyleneChloride, Ethyl Acetate 및 n-BuOH 분획에서는 HeLa, MCF-7, Calu-6 세포주 모두에서 비교적 높은 독성도를 보였다. 특히 n-Hexane 분획에서 높은 세포독성을 나타냈다.

(바) 3T3-L1 cell 이용한 항비만 효과 검정

3T3-L1 세포는 한국세포주은행에서 분양(KCLB NO. 10092.1)받아 배양해 사용하였다. 세포는 10% FBS이 포함된 DMEM을 사용하여 75T-flask에서 5% CO_2, 37℃ incubator에서 배양하였다. 3~4일 후 세포가 confluent하게 되면 0.05% Trypsin/0.53mM EDTA를 처리하여 세포를 분리하고 원심분리기(2000rpm, 2min)에서 세포를 모은 후 세포밀도를 1×10^4 cell/ml로 희석하여 12well plate에 1mL 씩 planting하여 배양하였다. 2일에 한번씩 10% FBS가 포함된 새로운 DMEM 배양액으로 바꿔주고 3~4일 후 세포가 confluent하게 되면 이틀 후에 DMEM 배양액에 5mg/mL insulin, 0.25mM dexamethasone, 0.5mM IBMX가 첨가된 배지를 처리하여 분화를 유도하였다. 2일 후에는 5mg/mL insulin만 포함된 배양액으로 교환하고 2일에 한 번씩 새 배양액으로 갈아주면서 분화를 유도하였다(Mac Dougald OA, Hwang C.S., Fan H., Lane M.D. 1995). 6일째에는 insulin이 함유되어 있지 않은 배양액을 세포를 배양한 후 7일째에 시료를 처리하고 24시간 후에 Oil red O 염색을 실시하였다.

① 세포독성 측정

세포 생존율의 측정을 위한 MTT(methylthiazolyldiphenyltetrazolium bromide) assay는 Sladowski 등의 방법을 따라 행하였다. 배양시킨 3T3-L1 세포를 96well plate에 1X105 cell/well로 분주하여 16~18시간 배양한 후 농도별로 희석한 시료 추출물을 24시간 처리하였다. 5mg/ml로 용해한 MTT용액을 10uL/990ul medium으로 첨가한 후 5% CO2, 37℃에서 3시간 배양하였다. 배양이 끝난 다음 배양액을 제거한 뒤 DMSO 200uL/well로 넣고 20분간 교반하여 ELISA reader로 595nm에서 흡광도를 측정하였다.

② Oil red O 염색

세포 배양액을 버리고 세포를 고정시키기 위해 10% formaldehyde를 50uL 씩 각 well에 넣고 4℃에서 1시간 동안 배양하였다. 그 후에 formaldehyde를 버리고 PBS로 세 번 세척한 후 Oil red O 염색액(Oil red O 0.25g을 isopropyl alcohol 50mL에 녹인 용액을 증류수와 3:2의 비율로 혼합한 후 0.45um filter로 여과한 용액)을 500uL씩 넣고 다시 상온에서 1시간 동안 염색한 후 PBS로 3회 세척하였다. 염색된 세포는 현미경으로 관찰하였으며, 관찰 후 well당 500uL의 isoprophyl alcohol로 지방세포 내 염색된 염색약을 추출하여 spectrophotometer로 520nm에서 흡광도를 측정하였다.

Table 51. Cytotoxicity of different solvent fractions from *Codonopsis lanceolata* in 3T3-L1 preadipocyte cell growth in vitro

Cell name	Solvent	Cell viability (% of control)				
		Concentration (μg/mL)				
		10	25	50	100	200
3T3-L1	n-Hexane	86.24±3.67[a]	83.85±1.77[a]	87.16±9.85[a]	79.08±2.29[a]	79.82±6.35[a]
	Methylene Chloride	95.32±2.34[ab]	92.40±8.04[a]	88.11±2.43[a]	83.63±5.76[a]	84.02±11.93[a]
	Ethyl Acetate	97.87±2.04[ab]	92.46±0.67[ab]	84.91±1.77[a]	84.33±1.87[a]	87.62±3.53[a]
	Butyl alcohol	100.18±12.63[ab]	87.04±0.95[ab]	83.03±6.93[a]	77.37±8.50[a]	75.73±1.38[a]
	DW	91.52±1.51[b]	85.87±1.51[b]	82.61±4.98[a]	85.22±5.27[a]	86.30±9.23[a]

[z]Data represent the mean values±SE of three independent experiments. Means with the same letter in column are not significantly different at $p<0.05$ level by Duncan's multiple range test. DW: distilled water

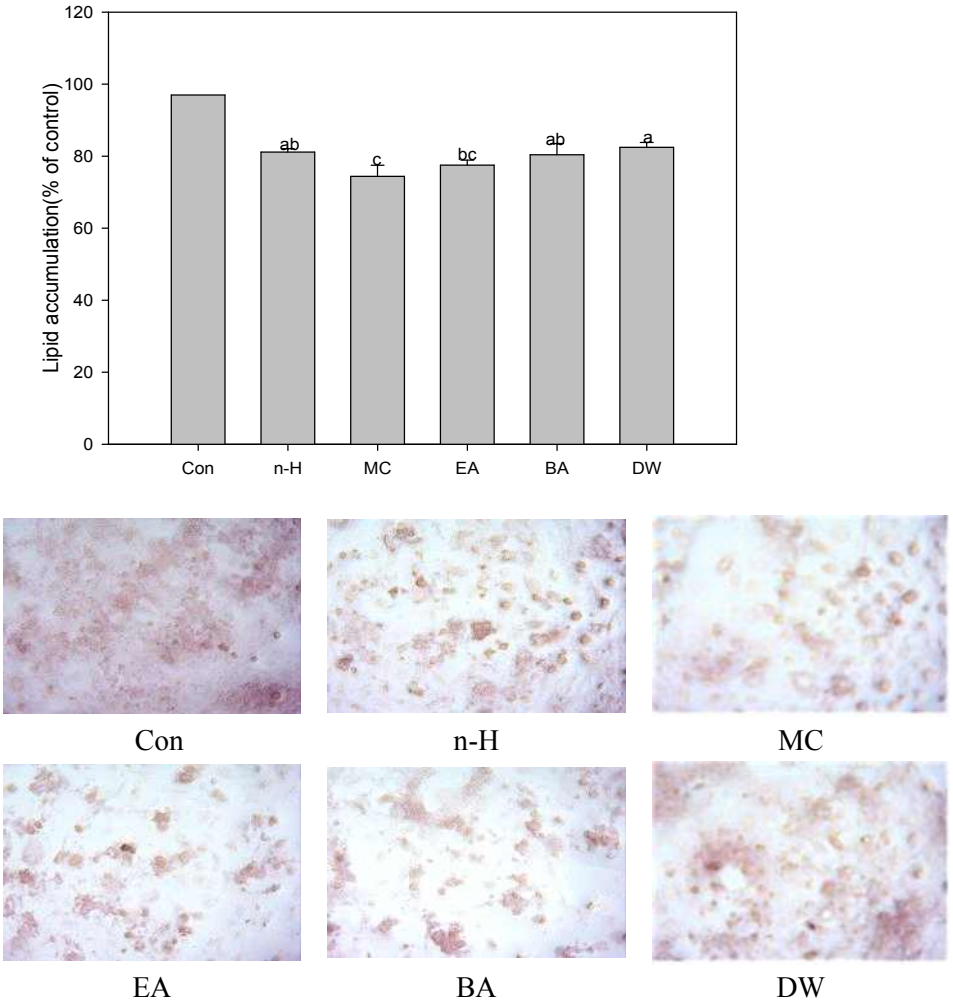


Fig. 59. Effect of solvent fractions on lipid accumulation in 3T3-L1 cells. 3T3-L1 cells were treated with 50 ㎍/mL concentration of solvent fraction extracts from *Codonopsis lanceolata*. The extent of lipid accumulation was expressed as the percentage of control. Cells were fixed and stained with oil red O dye, and images of representative cells captured with a microscope, scanned. The bars represent the standard error. Means with the same letter in column are not significantly different at $p<0.05$ level by Duncan's multiple range test. n-H: normal hexane, MC: methylene chloride, EA: ethyl acetate, BA: butyl alcohol, DW: distilled water

더덕 용매 분획물의 다양한 농도에서의 3T3-L1 cell의 세포생존율을 보면 농도의존적으로 감소하였으며, 특히 부틸알코올 분획에서 다른 분획에서보다 상대적으로 세포독성이 높게 나타났다. 또한 Oil red O 염색을 통해 지방 축적 및 지방세포 분화를 관찰한 결과, 메틸클로라이드 분획에서 상대적으로 높은 효과를 보였다.

6. 30% 주정 및 열수추출 조건에 따른 생리기능성 검증

추출용매 조건에 따른 생리기능성의 차이를 확인하고자 본 연구에서 채택한 30% 주정추출물과 일반적으로 천연물질 추출에서 많이 행해지고 있는 열수추출물의 생리기능성의 변화를 확인하였다.

가. 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 측정

총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 분석방법은 상기 기술한 방법과 동일하다.

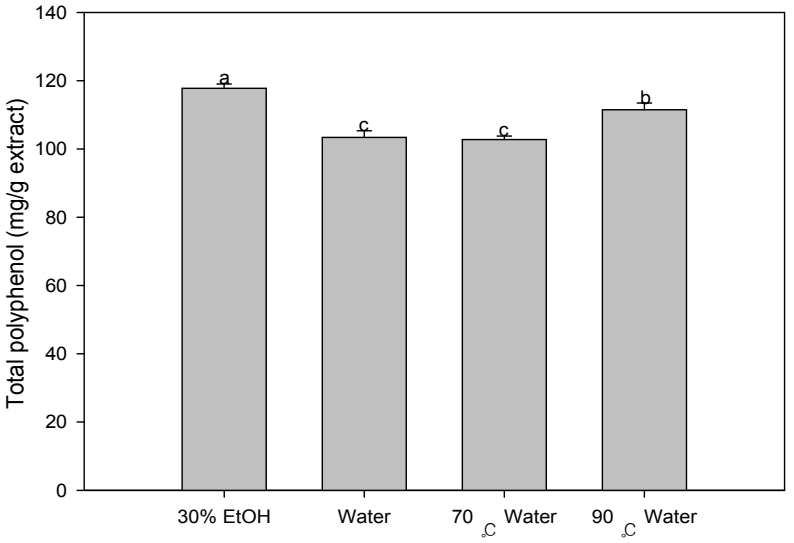


Fig. 60. Total polyphenol contents of root extracts from *Codonopsis lanceolata* according to different extraction solvent. The bars represent the standard error. Means followed by the same letter are not significantly different at $p<0.05$.

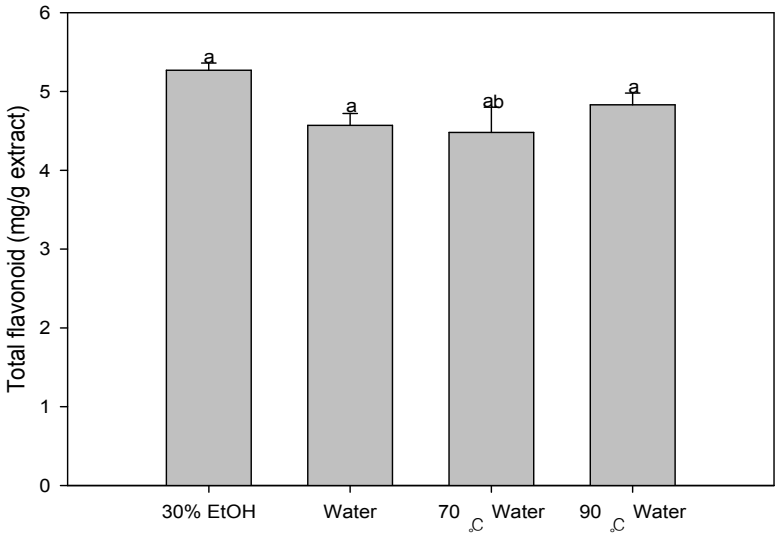


Fig. 61. Total flavonoid contents of root extracts from *Codonopsis lanceolata* according to different extraction solvent. The bars represent the standard error. Means followed by the same letter are not significantly different at $p<0.05$.

Table 52. DPPH radical scavenging activities of root extracts from *Codonopsis lanceolata* according to different extraction solvent.

Extraction solvent	DPPH radical scavenging activity, % of control				
	Concentration (mg/mL)				
	0.5	1	2.5	5	10
30% EtOH	16.83±0.71b	29.42±0.71a	38.61±1.90a	49.40±1.76a	62.01±1.32a
Distilled water	14.17±1.16c	21.95±1.22c	31.85±0.18c	44.07±0.30b	55.29±1.69c
70° C water	17.88±0.18a	27.56±0.35b	29.38±0.61c	42.16±0.61b	53.20±0.96c
90° C water	18.99±0.43a	28.62±0.70b	33.92±0.11b	43.42±1.29b	58.29±0.68b

*Data represent the mean values±SE of three independent experiments. Means with the same letter in column are not significantly different at $p<0.05$ level by Duncan's multiple range test.

Table 53. ABTS radical scavenging activities of root extracts from *Codonopsis lanceolata* according to different extraction solvent.

Extraction solvent	ABTS radical scavenging activity, % of control				
	Concentration (mg/mL)				
	0.5	1	2.5	5	10
30% EtOH	20.20±1.61a	31.01±0.36a	41.57±0.37a	57.33±1.32a	71.49±0.54a
Distilled water	17.12±0.57b	24.70±0.49c	35.29±0.39c	50.68±0.79c	61.62±1.22c
70° C water	18.14±0.85b	26.38±0.72b	37.61±0.85b	52.98±0.74b	59.31±0.19d
90° C water	16.07±0.72b	27.82±0.30b	36.76±0.47bc	53.98±0.60b	65.06±1.28b

*Data represent the mean values±SE of three independent experiments. Means with the same letter in column are not significantly different at $p<0.05$ level by Duncan's multiple range test.

Table 54. Cytotoxicity in RAW 264.7 cell of root extracts from *Codonopsis lanceolata* according to different extraction solvent.

Extraction solvent	Cell viability (% of control)				
	Concentration (μg/mL)				
	50	100	200	400	800
30% EtOH	99.74±3.41a	97.27±2.71a	91.68±3.88a	81.44±1.64a	72.21±1.97b
Distilled water	99.27±3.89a	98.61±3.94a	87.73±2.49ab	79.75±1.03a	75.59±1.57a
70° C water	95.03±1.78ab	94.24±0.81a	90.59±1.27ab	82.65±0.42b	74.03±1.53a
90° C water	93.18±1.72b	88.30±1.05b	85.10±1.80b	82.06±2.67b	72.15±1.87b

*Data represent the mean values±SE of three independent experiments. Means with the same letter in column are not significantly different at $p<0.05$ level by Duncan's multiple range test.

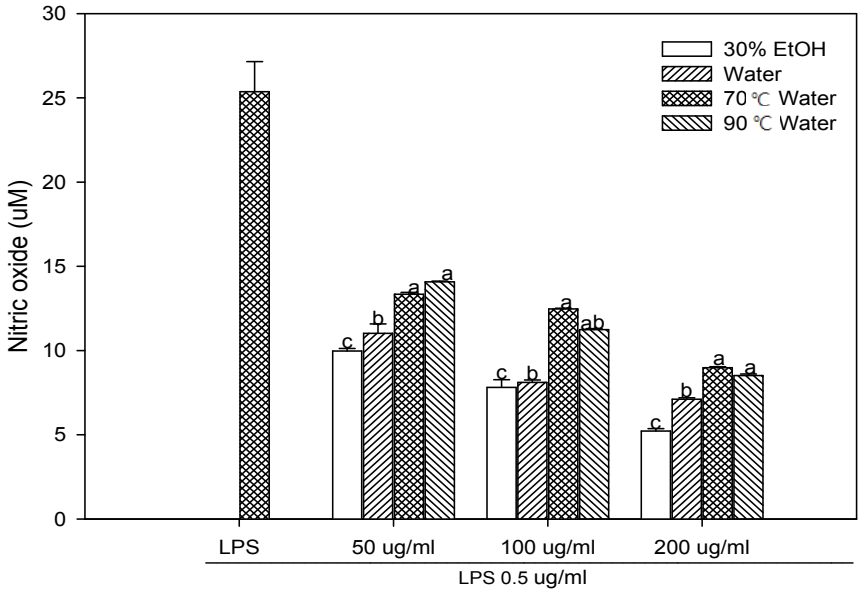


Fig. 62. Effect of *Codonopsis lanceolata* extracts on LPS-induced NO production in RAW264.7 cell. The bars represent the standard error. Means followed by the same letter are not significantly different at $p<0.05$.

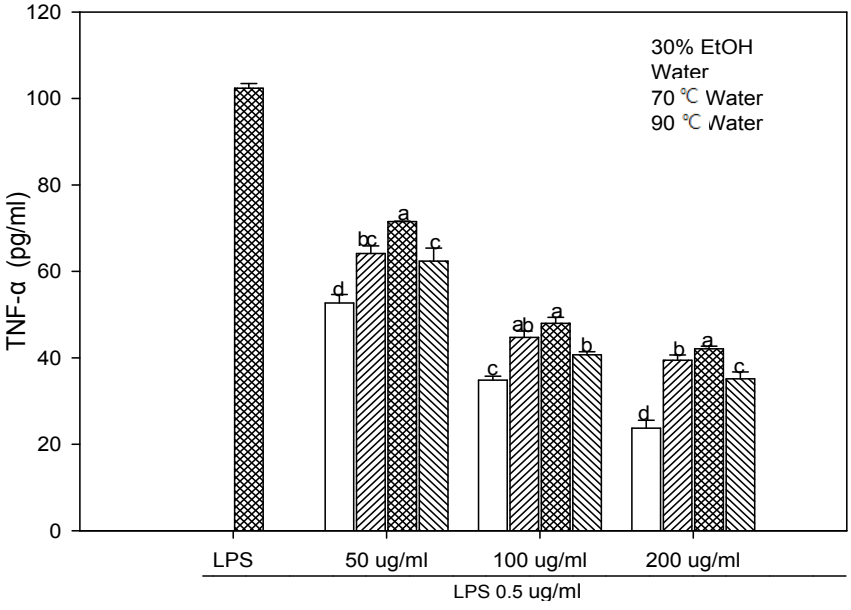


Fig. 63. Effect of *Codonopsis lanceolata* extracts on LPS-induced TNF-α production in RAW264.7 cell. The bars represent the standard error. Means followed by the same letter are not significantly different at $p<0.05$.

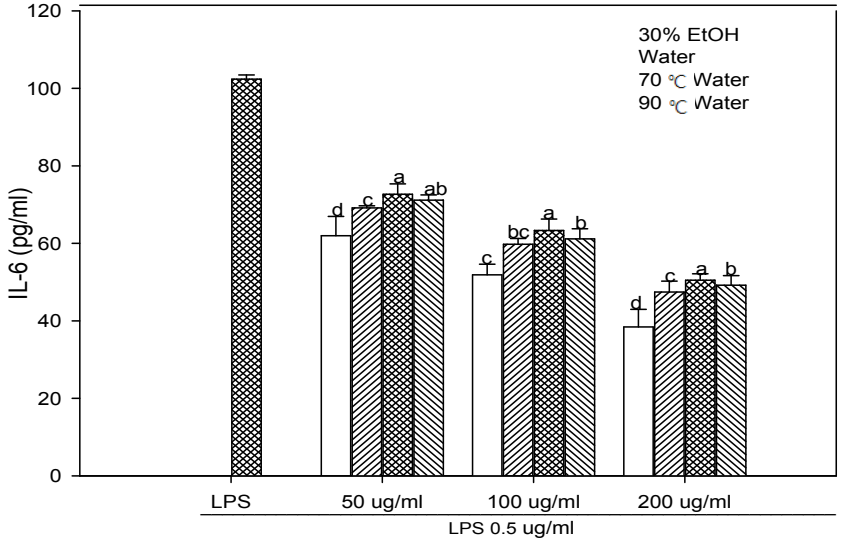


Fig. 64. Effect of *Codonopsis lanceolata* extracts on LPS-induced IL-6 production in RAW264.7 cells. The bars represent the standard error. Means followed by the same letter are not significantly different at p<0.05.

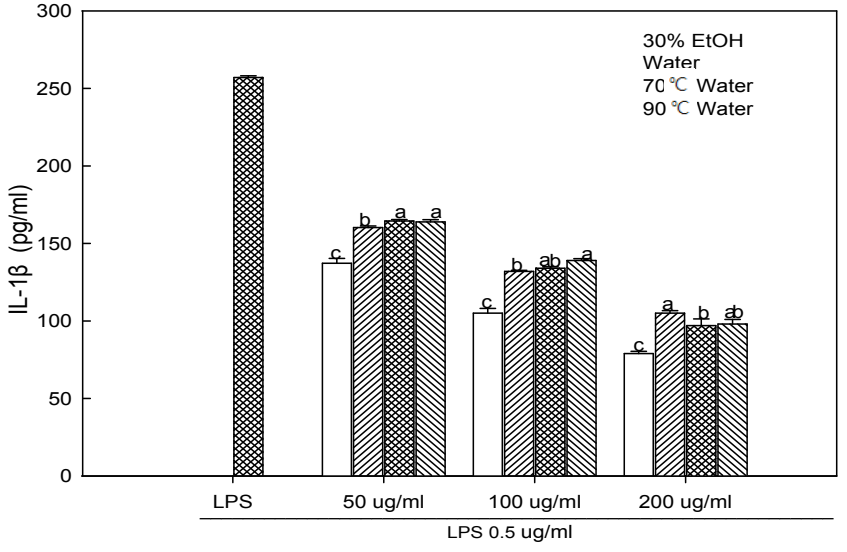


Fig. 65. Effect of *Codonopsis lanceolata* extracts on LPS-induced IL-1β production in RAW264.7 cells. The bars represent the standard error. Means followed by the same letter are not significantly different at p<0.05.

총 폴리 페놀과 플라보노이드 함량은 30 % 주정 추출물에서 가장 많았으며, 다음으로 90℃ 열수추출물에서 많았다. DPPH, ABTS 라디칼 소거 활성 또한 30% 주정 추출물에서 가장 높았으며, 농도의존적으로 증가했다. RAW 264.7 세포에 대한 세포생존력은 200 μg/mL의 농도까지 큰 변화를 보이지 않아 독성은 거의 없음이 확인되었다. LPS로 처리한 실험군에서는 NO 생성을 유의하게 억제하였다. 염증매개체(TNF-α, IL-6 및 IL-1β) 생성에 대한 더덕추출물의 효과를 보면, 30% 주정추출물에서 항염증 활성이 가장 우수하였다.

7. 항천식 관련 면역지표 In Vitro 실험

더덕 추출물을 소재로 항천식 관련 면역조절능을 검증하기 위하여 염증관련 인자에 대한 분석을 행하였다. 즉, interleukin-4, 5, 6, 13 (IL-4, 5, 6, 13), tumor necrosis factor-alpha (TNF-α), interferon gamma (IFN-γ)의 분비 정도를 분석하였다. 실험은 A549 cell line을 이용하여 LPS 염증을 유도한 후, 더덕 추출물을 처리하여 Immunocytochemistry (ICC)효능 분석을 실시하였다.

가. 실험 방법

(1) cell line - A549 cell line
(2) media - RPMI 1640 + 10% FBS + 1% penicillin
(3) seeding - $1*10^5$/well, 18 hr incubation
(4) treatment - LPS 150 μg/mL, 더덕 250 μg/mL, 24 hr incubation
(5) Antibody
IL-4 - Santa Cruz, 1:100
IL-5 - BioLegend, 1:100
IL-13 - Santa Cruz, 1:100
TNF-α - MYBioSource, 1:100
IFN-γ - Santa Cruz, 1:100

나. 실험 결과

(1) Th1-related cytokine

- IFN-γ : LPS 유도구에서 CON구와 비교하여 IFN-γ의 발현량이 증가하였으며, 더덕 투여군에서는 감소하였다.

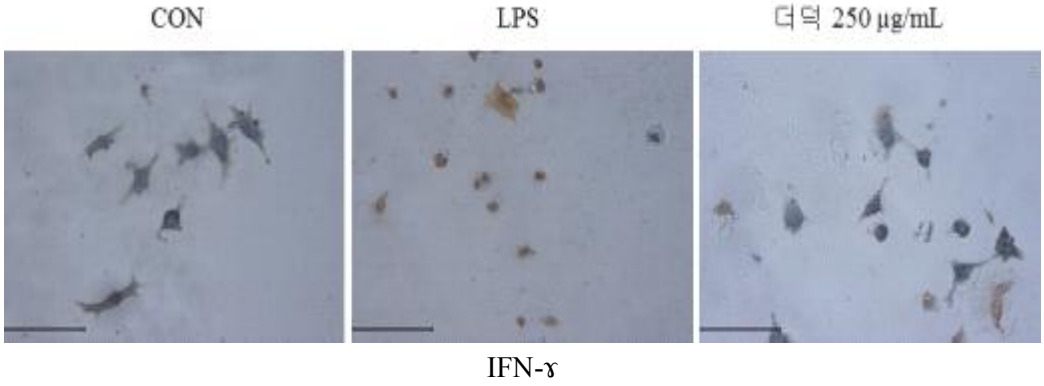
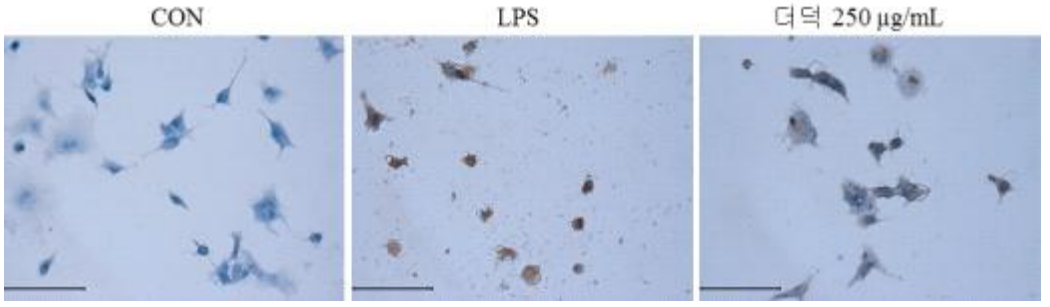


Fig. 66. Th1-related cytokine : IFN-γ 발현량

(2) Th2-related cytokine

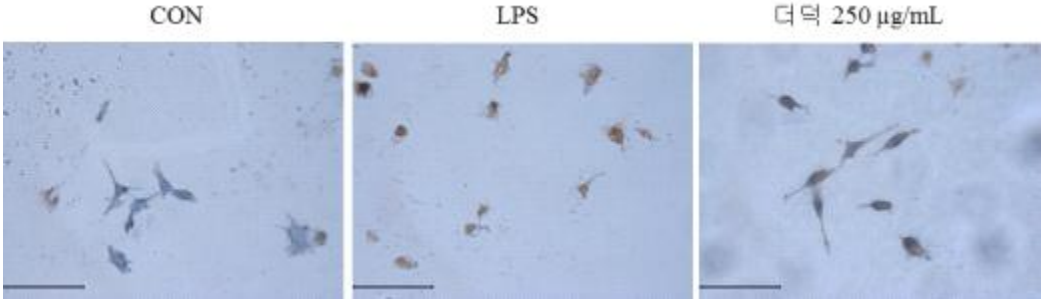
- IL-4 : LPS 유도구에서 CON구와 비교하여 IL-4의 발현량이 증가하였으며, 더덕 투여군에서는 감소하였다



IL-4

Fig. 67. Th2-related cytokine : IL-4 발현량

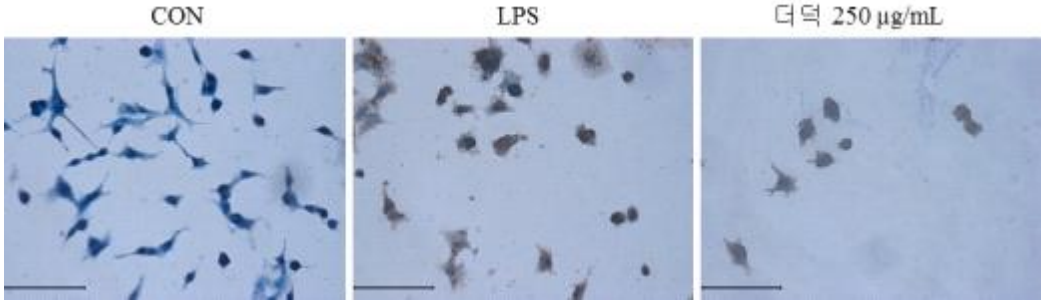
- IL-5 : LPS 유도구에서 CON구와 비교하여 IL-5의 발현량이 증가하였으며, 더덕 투여군에서는 감소하였다



IL-5

Fig. 68. Th2-related cytokine : IL-5 발현량

- IL-13 : LPS 유도구에서 CON구와 비교하여 IL-13의 발현량이 증가하였으며, 더덕 투여군에서는 감소하였다



IL-13

Fig. 69. Th2-related cytokine : IL-13 발현량

본 실험 결과, Th1- & Th2-related cytokines의 발현을 억제하였음을 알 수 있었다. 따라서 더덕은 천식기전의 주요인자인 Th1 & Th2관련 인자(IFN-, IL-4, IL-5, IL-13)를 감소시켰으므로 더덕의 항천식 기전은 Th1과 Th2와 관련되었을 것으로 사료된다.

8. 최적 추출조건 확립 위한 추출용매 농도에 따른 염증관련 인자에 효과 검증

더덕 추출물 원료 생산을 위한 주정알코올의 농도를 최적화하기 위하여 추출용매 농도별 추출물의 염증관련 인자에 대한 실험을 추가 수행하였다. 즉, macrophage 264.7 cells에서 LPS 유발에 의한 IL-1β, IL-6, TNF-α의 발현을 분석하였으며, 아래에 제시한 결과들에서 알 수 있듯이 30% 주정알코올 추출물이 100% 주정알코올 추출물보다는 효과면에서 다소 낮은 결과를 보였지만, 유의한 항염증 효능 및 안전성, 제조공정의 용이성 면에서 적합하다고 판단되어 최적 추출물로 사용하였다. 이 외 다른 모든 실험에도 동일한 시료를 사용하였다.

가. 분석 방법

(1) RAW 264.7 대식세포 배양

RAW 264.7 cell을 10% fetal bovine serum (FBS)이 포함된 DMEM 배지를 사용하였으며, RAW 264.7 cell은 24 well plate에 $2x10^5$를 분주하고 5% CO_2, 37℃에서 배양하였다. 이를 현미경으로 관찰하여 세포가 분화된 것을 확인한 후 시험에 사용하였다.

(2) 세포생존율 측정 (MTT assay)

RAW 264.7 대식세포에 대한 더덕 추출물의 독성을 확인하기 위하여 MTT assay를 실행하였다. 즉, 계대 배양중인 RAW264.7 세포를96 well plate에 세포수를 조정한 다음 더덕 추출물을 첨가하고 1시간 배양 후 LPS 1 ㎍/㎖을 각 well에 처리하였으며, 4시간 후 10% SDS (0.1 N HCL)100 ㎕를 처리하여 18시간 동안 빛을 차단하며 반응시켰다. ELISA reader를 이용해서 각 well의 흡광도를 570 nm 에서 측정하고 대조군의 흡광도와 비교하여 세포생존율을 백분율로 환산하였다

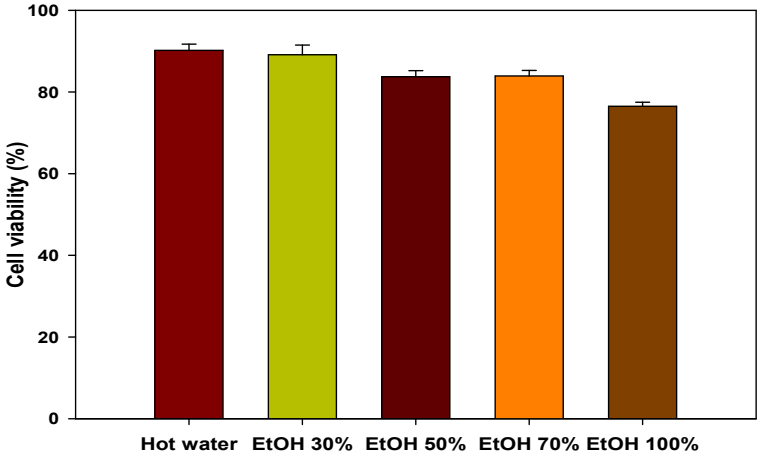


Fig. 70. Effect of *Codonopsis lanceolata* on cell viability in RAW 264.7 cells

(3) 대식세포에서의 NO 생성

RAW264.7 세포 1×106 cell/㎖를5% FBS를 함유한 DMEM에 부유한 후 세포 부유액을 12well plate에 800㎕씩 부착시킨 후 시료를 처리하고 대식세포 자극제인 LPS를 1 ㎍/㎖의 농도로 처리하였다 24시간후에 배양 상등액100 ㎕를 취하여 96 well plate로 옮긴 후100 ㎕ Griess Reagent(Sigma)를 넣고 10분간 실온에서 빛을 차단한 상태로 반응시킨 후 ELISA reader를 사용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다. Sodium nitrite표준 검량선으로부터 대식세포가 분비하는 nitric oxide를 계산하였다.

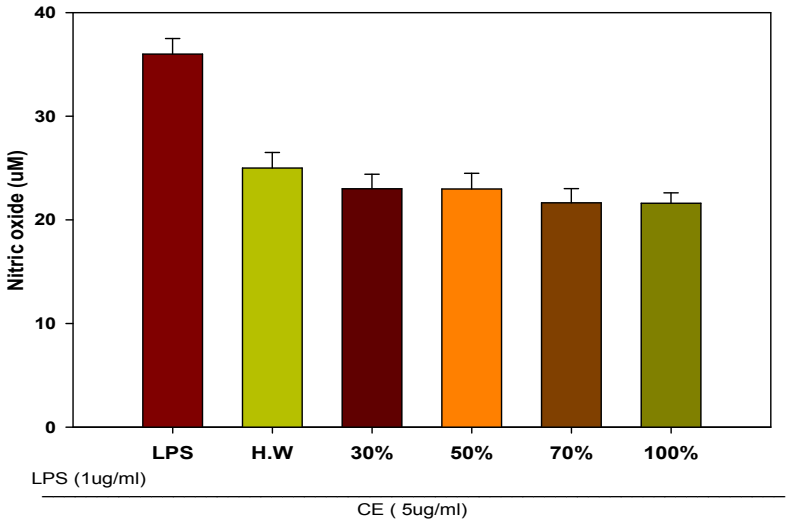


Fig. 71. Inhibition of NO production by *Codonopsis lanceolata* according to the percentage of EtOH solvent on cell viability in RAW 264.7 cells. The bars represent the standard error. CE: *Codonopsis lanceolata* Extracts; HW: hot water.

(4) Cytokines (IL-1β, IL-6, TNF-α)의 측정

Cytokine을 측정하기 위하여 6-well plate에 cell을 분주하고 더덕 추출물을 처치한 다음, 1시간 후에 LPS를 처치하였다. LPS 처치 후 6~12시간 배지를 수거하여 cytokine을 측정하였다. 수거된 배지는 측정 전까지 -70℃에서 보관하였다. IL-1β, IL-6, TNF-α는 ELISA Kit (Pierce endogen, Rockford, IL, USA)를 사용하여 측정하였다.

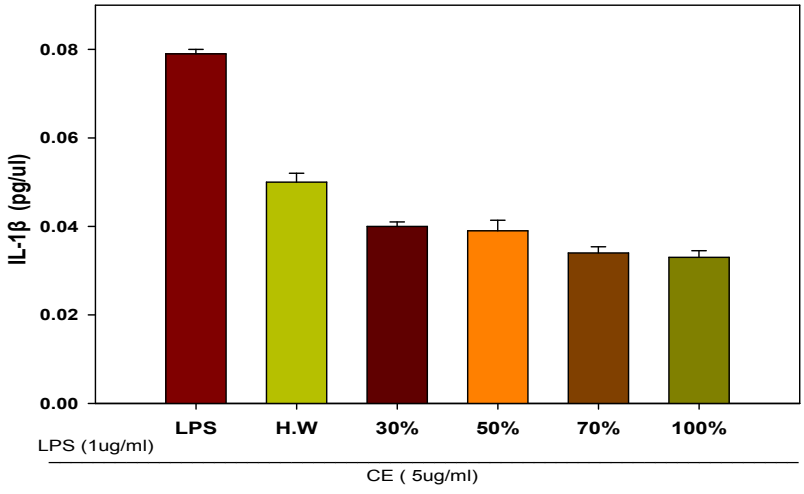


Fig. 72. Effect of *Codonopsis lanceolata* according to the percentage of EtOH solvent on LPS-induced IL-1β in RAW 264.7 cells. The bars represent the standard error. CE: *Codonopsis lanceolata* Extracts; HW: hot water.

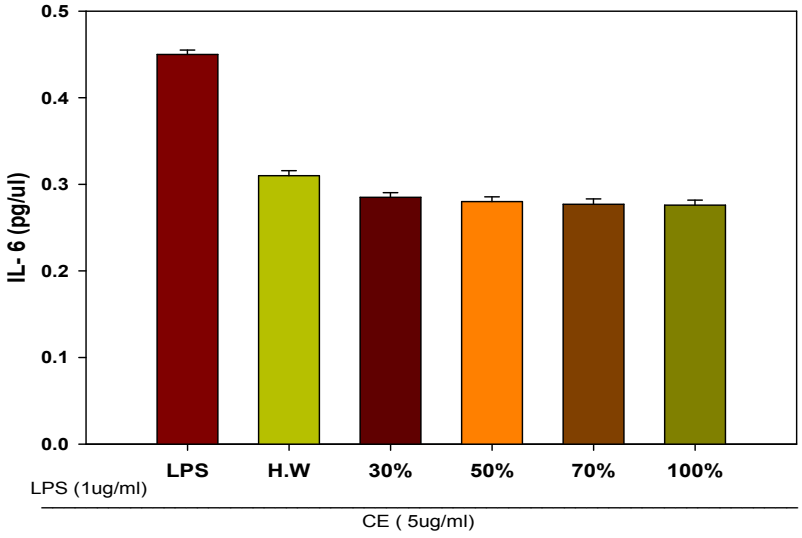


Fig. 73. Effect of *Codonopsis lanceolata* according to the percentage of EtOH solvent on LPS-induced IL-6 in RAW 264.7 cells. The bars represent the standard error. CE: *Codonopsis lanceolata* Extracts; HW: hot water.

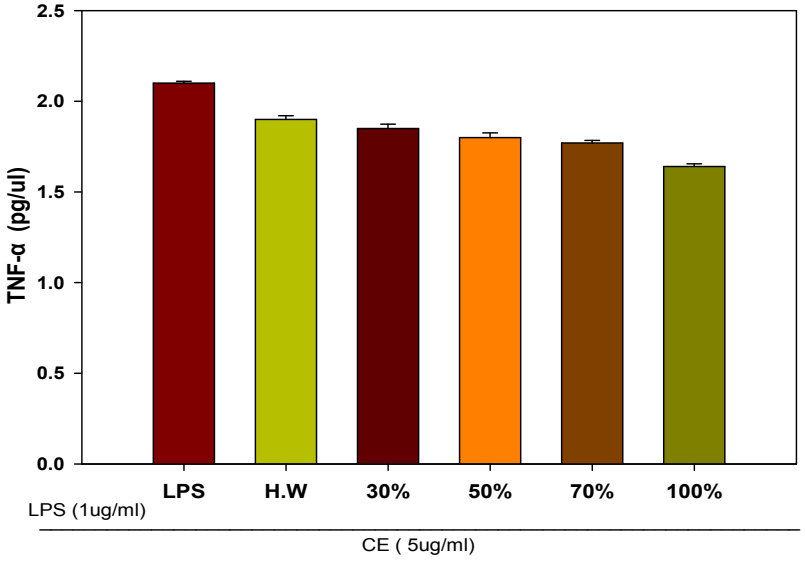


Fig. 74. Effect of *Codonopsis lanceolata* according to the percentage of EtOH solvent on LPS-induced TNF-α in RAW 264.7 cells. The bars represent the standard error. CE: *Codonopsis lanceolata* Extracts; HW: hot water.

9. 더덕 추출물이 천식모델 마우스의 BALF 내 면역세포에 미치는 영향

더덕 추출물의 allergy 천식 및 면역에 대한 효능을 실험적으로 규명하고자 ovalbumin으로 유도한 천식모델 마우스의 기관지 폐포세척액(bronchoalveolar lavage fluid, BALF) 내의 알러지와 관련된 면역물질인 CD3+T cell, CD4+T cell, CD8+T cell, CD19+B cell의 변화를 관찰하고, 면역조직화학적 분석을 행하였다.

가. 분석 방법

(1) 더덕추출물 시료 조제

제주지역 재배더덕 뿌리를 세척하고 동결건조하여 5mm 크기로 세절한 후, 30% 주정알코올로 추출, 농축하여 분말화한 시료를 -50℃에 보관하면서 실험에 사용하였다.

(2) 면역조직화학적 분석

파라핀을 제거한 조직절편을 3% 과산화수소가 포함된 메탄올에 10분간 처리하여 조직 내 peroxidase를 제거하였다. 또한 Antigen retrieval은 끓는 물을 이용하여 구연산나트륨 완충액(0.1M)으로 처리하였다. 슬라이드를 정상적인 혈청과 함께 배양하여 비특이적 결합을 차단한 다음, CD4 (14-9766, eBioscience, San Diego, CA, USA), CD8 (sc-18913, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), CD19 (250585, Abbiotec, San Diego, CA, USA) 등과 같은 primary antibody (1:100에서 1:200으로 희석한)로 1시간 동안 배양하였다. 그 후 비오틴이 부착된 2차 항체와 horseradish peroxidase-conjugated streptavidin를 함께 2시간 동안 배양되었다. 시그널은 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride 기질의 발색액을 사용하여 검색하였고, 세포들은 Mayer’s hematoxylin으로 대조 염색하였다. 양성으로 염색된 세포 수를 측정하기 위해 실험동물 1마리 당 3개 별도로 면역염색된 폐 절편 (n=8 per group)을 5개 무작위로 선택된 비중복 영역 (x200배)에서 세포를 계수하였다.

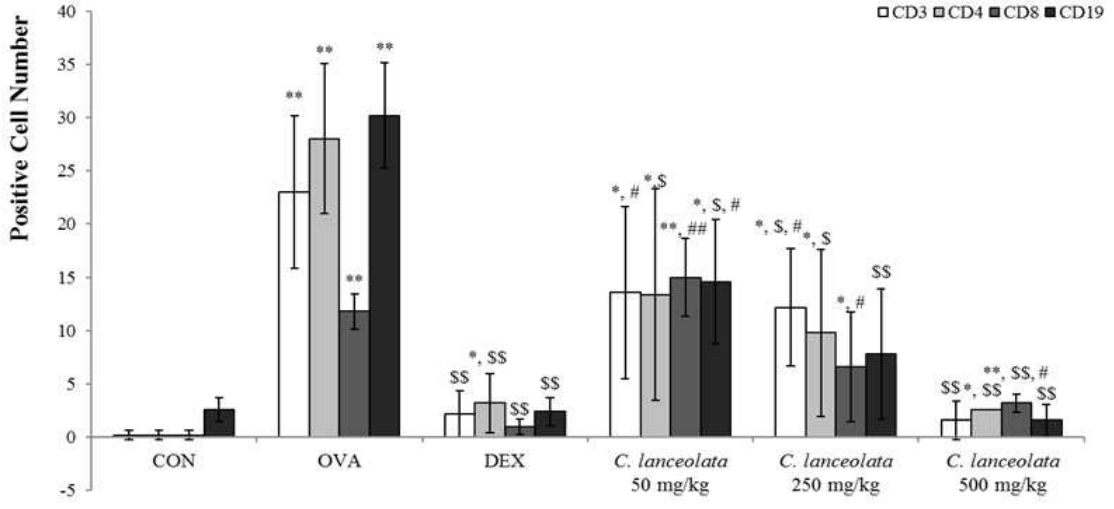


Fig. 75. The results of positive cells counting. N=8. Scale Bar: 100 μm. *$p < 0.05$ vs. control; ** $p < 0.001$ vs. control; $^{\$}$ $p < 0.05$ vs. asthma induction; $^{\$\$}$ $p < 0.01$ vs. asthma induction; $^{\#}$ $p < 0.05$ vs.dexamethasone; $^{\#\#}$ $p <0.01$ vs. dexamethasone.

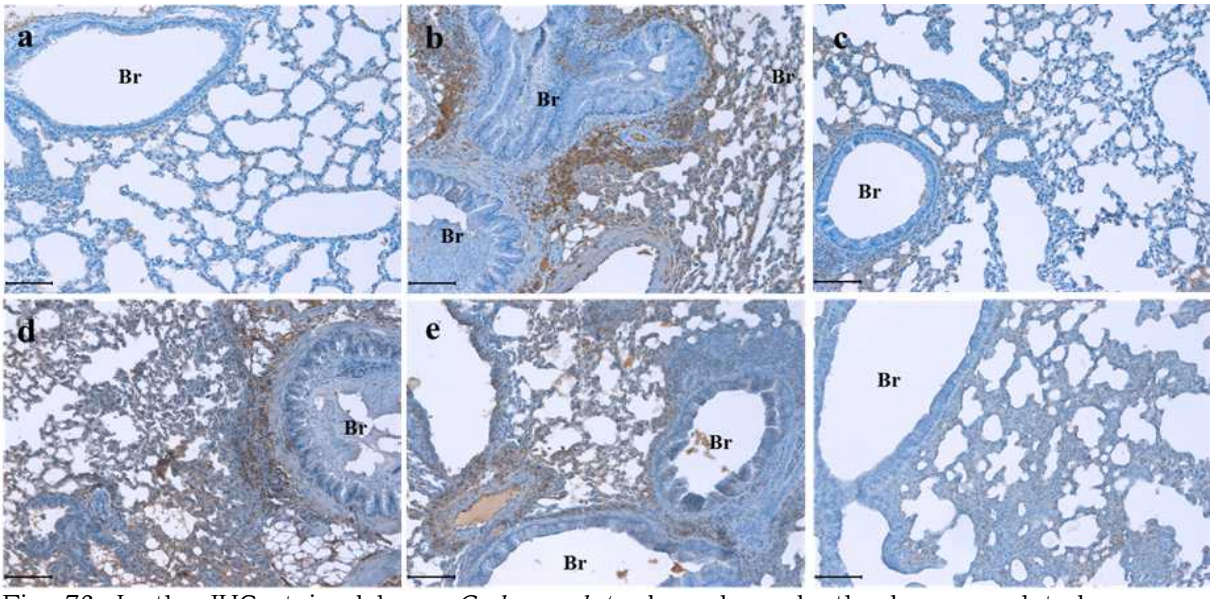


Fig. 76. In the IHC-stained lung, *C. lanceolata* dose-dependently down-regulated the T cell-related factors. Total T cells (CD3) were significantly decreased by *C. lanceolata* treatment. Br, bronchiole; a, vehicle control; b, asthma induction; c, dexamethasone; d, 50 mg/kg/day *C. lanceolata* e, 250 mg/kg/day *C. lanceolata* f, 500 mg/kg/day *C. lanceolata*. Scale bar 100μm

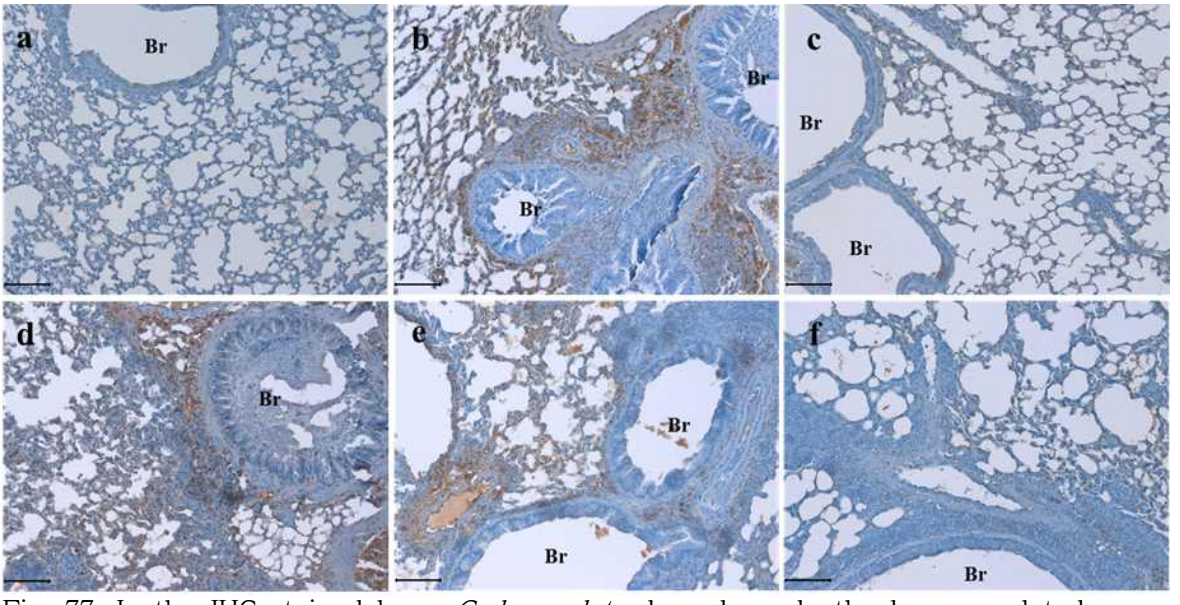


Fig. 77. In the IHC-stained lung, *C. lanceolata* dose-dependently down-regulated the T cell-related factors. *C. lanceolata* dose-dependently controlled helper T cells (CD4). Br, bronchiole; a, vehicle control; b, asthma induction; c, dexamethasone; d, 50 mg/kg/day *C. lanceolata* e, 250 mg/kg/day *C. lanceolata* f, 500 mg/kg/day *C. lanceolata*. Scale bar 100μm

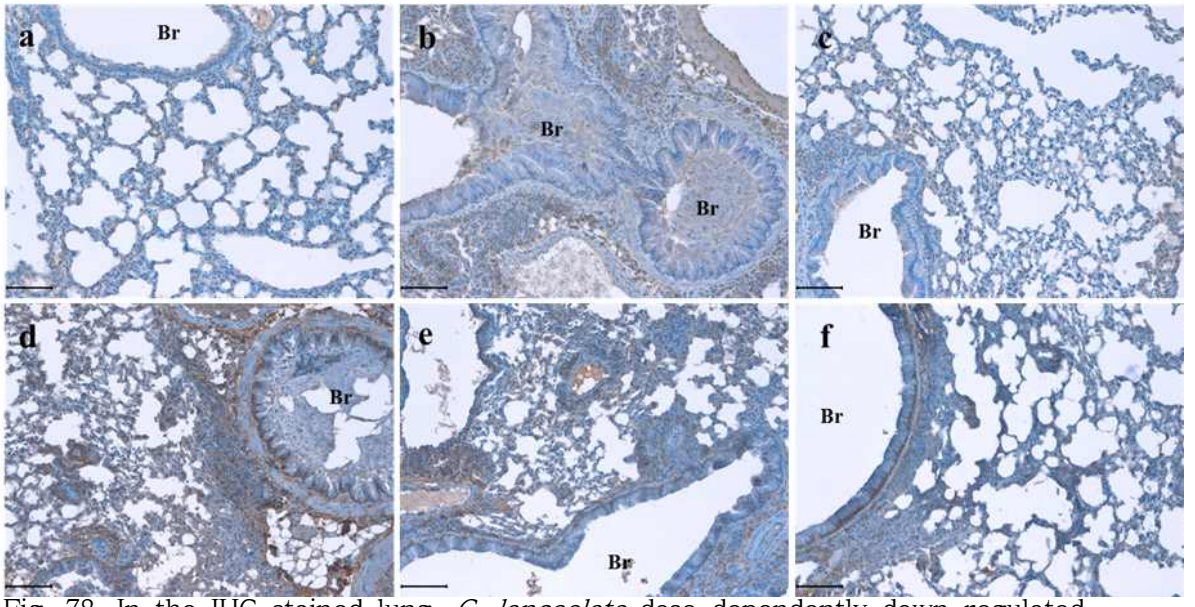


Fig. 78. In the IHC-stained lung, *C. lanceolata* dose-dependently down-regulated the T cell-related factors. *C. lanceolata* inhibited cytotoxic T cells (CD8) in a dose-dependent manner. Br, bronchiole; a, vehicle control; b, asthma induction; c, dexamethasone; d, 50 mg/kg/day *C. lanceolata* e, 250 mg/kg/day *C. lanceolata* f, 500 mg/kg/day *C. lanceolata*. Scale bar 100μm

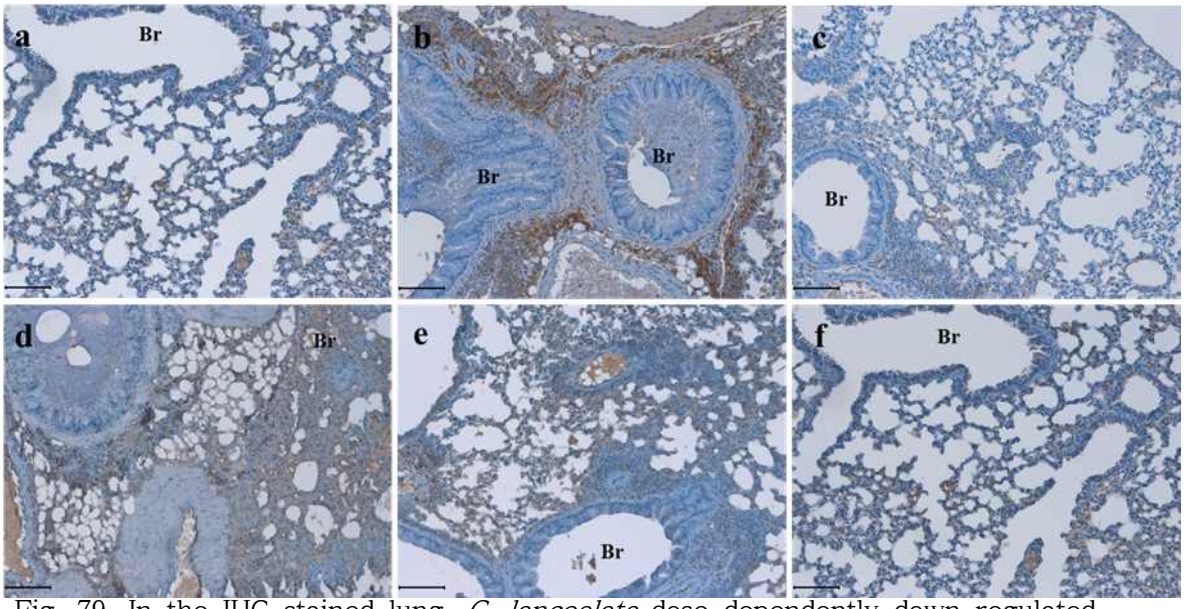


Fig. 79. In the IHC-stained lung, *C. lanceolata* dose-dependently down-regulated the B cell-related factor. *C. lanceolata* significantly decreased the number of B cells (CD19). Br, bronchiole; a, vehicle control; b, asthma induction; c, dexamethasone; d, 50 mg/kg/day *C. lanceolata* e, 250 mg/kg/day *C. lanceolata* f, 500 mg/kg/day *C. lanceolata*. Scale bar 100μm

BALF 내 면역세포에 미치는 영향을 조사한 결과, 알레르기 반응이 활발할 때 증가하는 CD3+T cell, CD4+T cell, CD8+T cell, CD19+B cell은 농도의존적으로 감소하는 결과를 보여 더덕 추출물이 항알레르기 및 항염증의 효능이 있어 기관지천식에 유효한 것으로 생각되었다.

10. 생산 공정 표준화 및 대량생산 공정 확립

가. 생산 공정 표준화

더덕 원료 생산 표준화를 통해 제품 생산을 위한 세부공정의 기준과 규격을 설정하였다.

원료: 1Lot 설정 (지표물질 성분 분석 후 설정)

⇩

추출: 30% 주정알코올 추출

⇩

여과: 여과막 여과

⇩

농축: 고형분 함량 설정(brix), 색상, 기능성분 분석

⇩

포장: 포장재질 및 단위 설정

⇩

살균: 살균방식 및 조건(온도, 시간) 설정

⇩

품질검사: 기능성분 함량 규격 적합여부 등 설정

나. 대량생산 공정 확립

더덕 추출물 시료의 대량생산을 위하여 실험실 수준에서 일차적인 공정을 거친 후, 시료량을 점차 증량해가면서 공정과정을 진행하여 아래와 같은 대량생산 공정을 확립하였다.

(1) 더덕추출물원료 제조공정

(1) 제조공정	(2) 공정, 식품, 식품첨가물	(3) 지표성분 함량변화(mg/g)	(4) 수율(%)
더덕원료 동결건조			
↓			
추출 (30% 주정)			
↓			
여과			
↓			
감압농축		0.13±0.02	
↓			
살균	퓨어덱스트린		
↓			
동결건조			43.4

(2) 더덕추출물 분말제품 제조공정

(1) 제조공정	(2) 공정, 식품, 식품첨가물	(3) 조건	(4) 지표성분 함량변화 (mg/g)	(5)수율 (%)
원료검사 (주) 웰파이토		-입고, 수량확인, 성상확인		
↓				
원료투입		더덕 동결건조 원료		
↓				
주정액(30%) 투입		-원물대비 8배수 이상 투입		
↓				
24h 추출(상온, 침지)		-2h~4h 한번씩 순환 펌프 가동		
↓				
여과(50㎛ 필터여과)				
↓				
2차 추출		-30% 주정액 투입		
↓				
24h 추출				
↓				
여과 (10㎛ 필터여과)				
↓				
농축		-진공도 6.5 스팀온도 78℃	0.13±0.02	
↓	-Brix 26.0 건조감량 대비 30% 덱스트린 추가			
살균		-90℃, 10분 이상		
↓				
동결건조				43.4
↓				
분말과립화	말토덱스트린, 결정셀룰로오스, 이산화규소 첨가		0.11±0.02	
↓				
포장(스틱포장)				
↓				
출고 (주) 웰파이토				

11. 더덕 추출물 유래 지표물질 설정 및 분석법 확립

더덕의 효능물질로는 Lancemaside A로 알려져 있지만, 상용품이 없을 뿐만 아니라 기업 자체 생산능력도 용이하지 않아 표준품 확보가 어려운 관계로 원료의 표준화를 위해 표준물질 확보가 용이하면서 효율적인 소재 표준화가 가능한 더덕의 지표물질 탐색을 위한 다양한 실험을 반복 수행하였다. 이러한 과정을 통해 더덕 원료의 함량 지표는 성분 연구 결과 로베티올린(lobetyolin)으로 설정하였으며, 분석 방법은 아래와 같은 방법으로 설정하였다. Lobetyolin은 기초문헌 조사 결과 천식인자로서 약간의 가능성을 확인하였고, 더덕 추출물에서도 성분이 확인되어 1차 분석법을 확립하였다. 또한 함량 확인 결과, 0.21±0.01% 정도로 나타나 이를 기준으로 회사 자체규정을 확립하여 함량 표준화를 행한다.

가. 표준용액의 조제

본 실험에서 사용된 로베티올린 표준품은 Chemface사의 것을 사용하였다. 검량선 작성을 위해 표준품은 methanol에 녹여 1 mg/mL가 되도록 표준 원액을 제조한 후 단계적으로 희석하여 5 μg/mL, 10 μg/mL, 25 μg/mL, 50 μg/mL, 100 μg/mL, 400 μg/mL로 조제하였다. 로베티올린의 함량을 구하기 위하여 표준용액의 크로마토그램에서 얻은 피크의 농도별 면적에 대하여 검량선을 작성하였다.

나. HPLC 분석

더덕 추출물의 로베티올린 분석을 위한 HPLC 분석 조건은 아래 요약하였다.

용매의 준비
A 용매 - ACN(Acetonitrile)
B 용매 - 0.2% phosphoric acid PH4.61
각 용매는 0.45um 필터로 여과했다. 매일 분석 실험 전에는 vacuum pump와 sonicator로 탈기작업을 수행하였다.

표준품의 준비
Lobetyolin 표준품은 각각 400ug/ml 이하 농도의 표준품을 준비했다. 용액은 0.45um 필터로 여과 후에 사용하였다.

sample의 준비
더덕 30%EtOH 추출물 (300mg/ml)을 100% MeOH(LC용)과 DW를 1:1로 녹여 용액을 만들었다. 각 용액을 vortex mixer로 한 후에 13,000rpm에서 15분 원심분리하고 0.45um 필터로 여과 후에 분석하였다.

분석 조건
장치: HPLC
검출기: 자외부분광광도계(측정파장: 280nm)
컬럼: C18 Analytical(4.6mm I.D.X150mm, 5um)
LN.B14387
이동상: A 용매 - ACN

B 용매 - 0.2% phosphoric acid PH4.61
유속: 0.5ml/min
주입량: 10ul
RT : 24.067분

Time	A(%)	B(%)
0	5	95
10	5	95
11	20	80
20	25	75
25	100	0
26	10	90
30	10	90

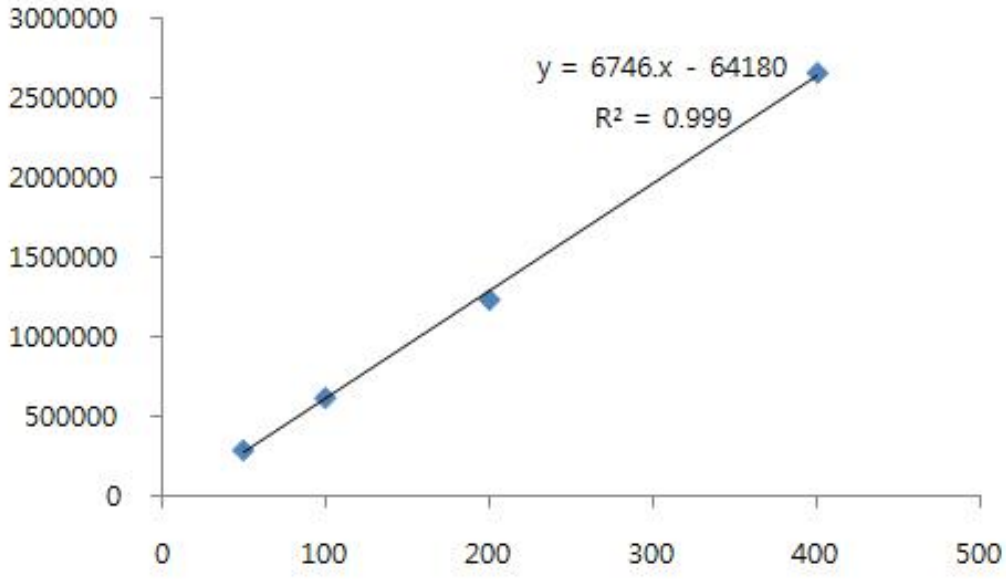


그림 80. 로베티올린 검량선

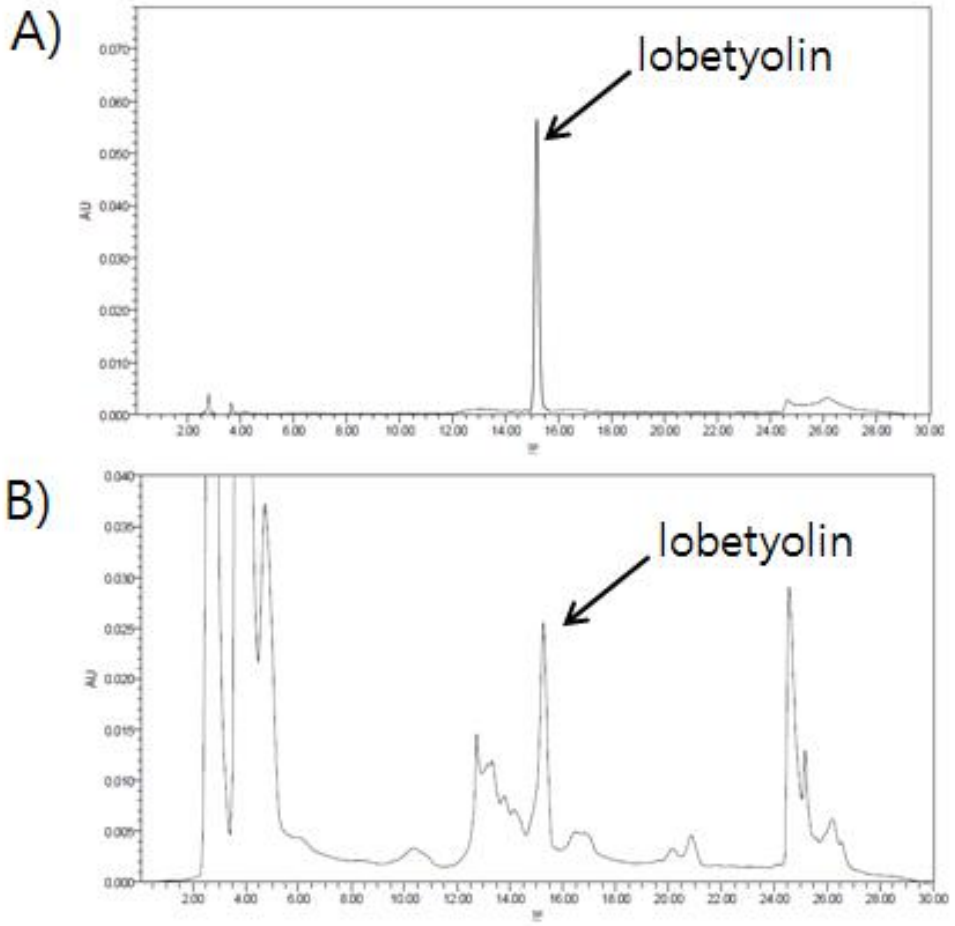


그림 81. 로베티올린 표준품(A) 및 샘플(B)의 분석 크로마토그램

위의 분석법에 의한 로베티올린 분석 범위는 400ug/mL 이하에서 가능하였으며, 분석 크로마토그램은 그림 2와 같다. 위 분석방법을 바탕으로 30% 더덕 주정추출물 내 로베티올린 함량은 0.21±0.01% 이었다.

12. 지표성분 함량기준의 제조공정 표준화

가. 최적 추출분말 제조 위한 건조 조건 표준화

원료물을 적정 조건으로 가공, 제품화하기 위한 과정으로서 더덕 추출물 농축액을 분말화하는 공정을 확립하였는데, Spray Dry하는 것이 향후 제품을 대량생산하는데 있어 원가절감 차원에서 동결건조보다 경제적인 장점이 있었지만, 끈적임이 강한 더덕 농축액의 특성상 다양한 농도로 brix° 를 조절하여 Spray Dry를 시도해 본 결과, 끈적임으로 인해 원료물의 유실율이 상당히 많았다. 따라서 다소 고비용이 예상되지만 동결건조 방법으로 결정하였다.

더덕 추출물 농축액을 동결건조하기 위해서 입자가 끈적이기 않게 분말화하기 위해서 부형제로서 탈지분유 및 말토덱스트린을 사용하여 첨가비율별로 분말 상태를 확인해 보았다.

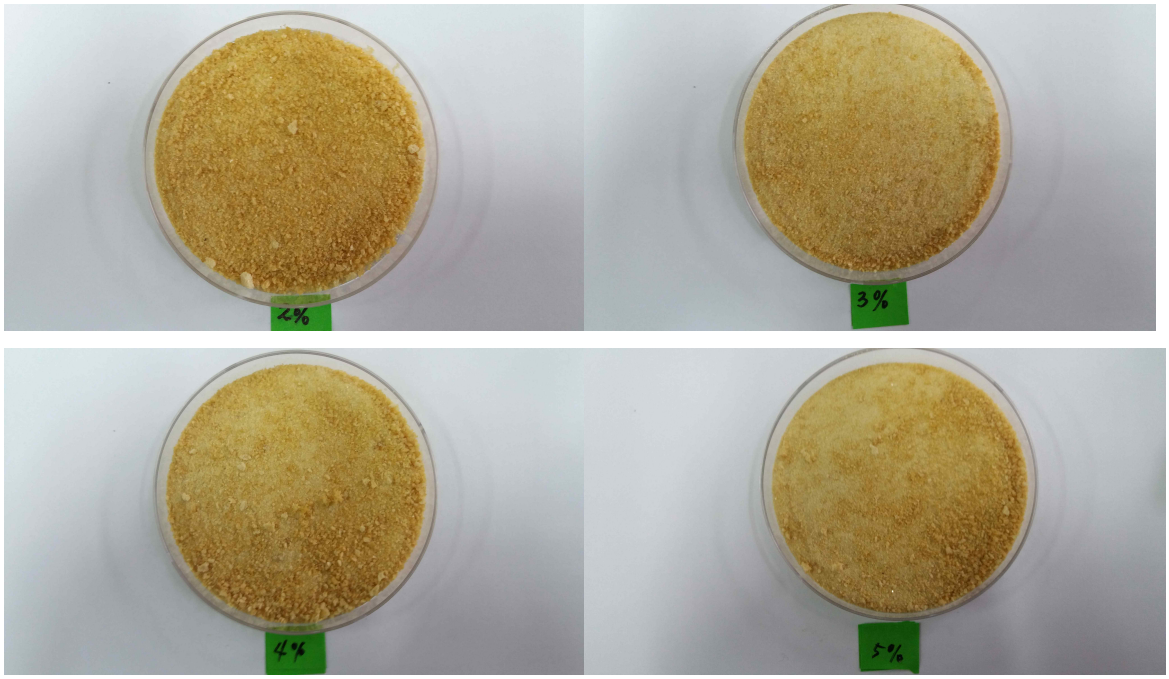


그림 82. 탈지분유 2%, 3%, 4%, 5% 비율로 첨가하여 동결건조한 분말 상태

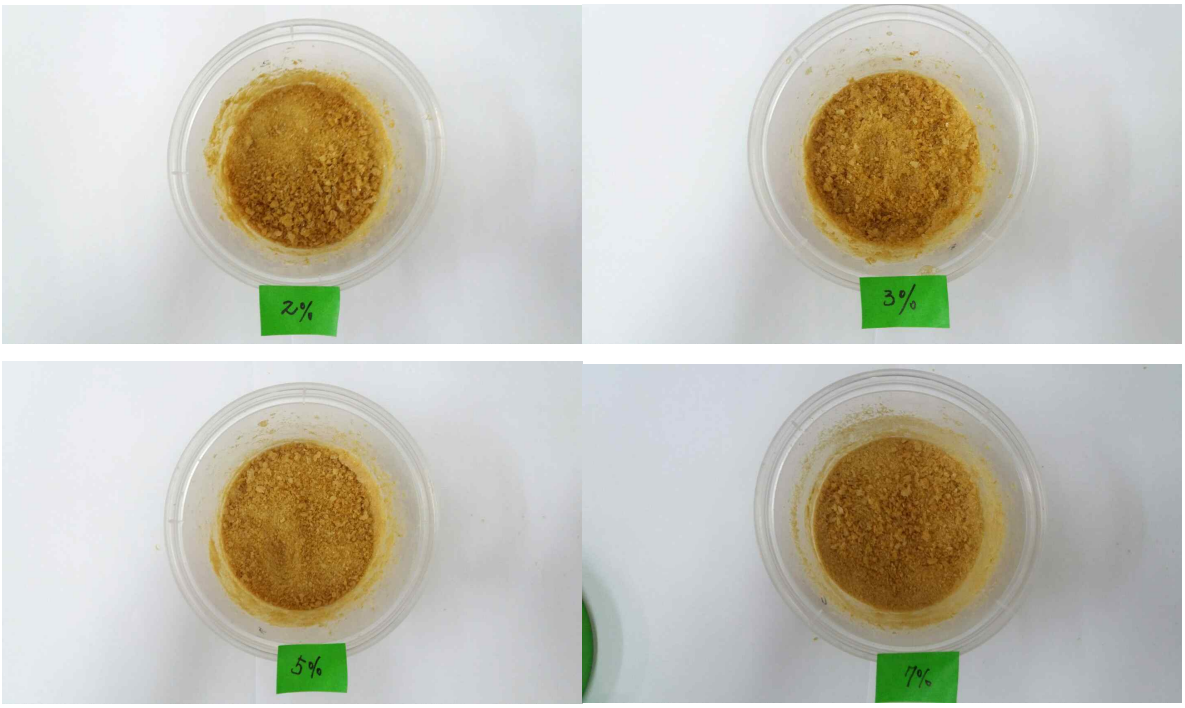


그림 83. 말토덱스트린 2%, 3%, 5%, 7% 비율로 첨가하여 동결건조한 분말 상태

육안으로는 탈지분유, 말토덱스트린 모두 첨가비율에 큰 차이가 없고 끈적임 없이 분말건조되었지만, 상온에서 1일 이상 경과하면 다시 뭉치는 현상이 발생하여 훨씬 더 높은 농도로 혼합해야 되는 것으로 확인되었다. 또한 탈지분유를 사용하는 것은 제품을 음용하는 사람 중 혹시 우유제품에 알레르기가 있는 경우도 있을 수 있어서 탈지분유는 가급적 사용하지 않고 말토덱스트린을 부형제로 첨가하는 것이 적합하다고 판단되었다. 따라서 말토덱스트린의 첨가량을 훨씬 높인 30~50% 농도로 첨가하여 동결건조한 분말 상태를 경시적으로 관찰한 결과, 45% 전후 농도에서 상온에서도 장시간 뭉치지 않고 미세한 분말의 물성을 유지하는 것으로 확인되었다. 제품 제조를 위한 더덕 추출물 건조 분말은 이러한 조건에서 표준화하였다.

나. 더덕 추출물 제조 공정 표준화를 위한 공정도

지표성분 함량을 기준으로 더덕추출물 분말 원료 생산 표준화를 통해 제품 생산을 위한 세부공정의 기준과 규격을 설정하였다.

(1) 제조공정

원재료: 1Lot 설정

⇩

세척: 브러쉬 이용 세척

⇩

동결건조

⇩

세절: 5mm size

⇩

추출: 30% 주정알코올 추출 (용매량 8배수)

⇩

여과: 여과막 여과

⇩

농축: 고형분 함량 설정(brix), 지표물질 분석

⇩

동결건조 (미세분말화 위한 부형제 첨가비율 결정)

⇩

살균: 살균방식 및 조건(온도, 시간) 설정

⇩

품질검사: 지표성분 함량 규격 적합여부 등 설정

(2) 식품 제형, 식품첨가물

더덕 추출물 분말 제형, 부형제로 말토덱스트린 첨가

(3) 기능/지표성분 함량 변화

Lobetyolin 0.1% 이상

13. 더덕 추출물 분말과립 제형 제조 공정

더덕추출물 분말과립 제형을 스틱형 포로 제조하였으며, 이렇게 제조된 제품을 임상시험용 시료로 하였다. 임상시험용 스틱형 포 제조는 GMP 인증기관인 전남 담양군 소재의 비타민하우스(주)에 의뢰, 제조하였으며, 그 제조공정 과정은 다음과 같다.

○ 스틱형 포 제조 공정

원재료: 제주 재배더덕

⇩

세척 후, 동결건조

⇩

세절: 5mm size

⇩

추출: 30% 주정알코올 추출 (용매량 8배수)

⇩

추출물 여과, 농축 및 동결건조

⇩

분말화: 분말화 조건 설정

⇩

분말원료 칭량

⇩

부형제 혼합, 과립화

⇩

건조 및 스틱 포장

⇩

스틱형 포 제조 완료(5g/pk)

14. 건강기능식품 품질 관리를 위한 더덕 추출물 원료의 기준규격 설정 및 물리화학적 특성 분석

더덕 추출물 원료 및 제품의 규격 설정과 품질 관리를 위해 더덕 추출 최적화, 분석 조건 등을 바탕으로 분말 원료 및 제품의 규격을 설정하였다. 분말 원료 제품 규격은 향후 건강기능식품 개별인정형 소재의 제출 자료로 사용될 것이다. 더덕 추출물 분말 원료 규격은 확립된 공정 조건으로 제조한 더덕 분말 원료를 바탕으로 작성하였으며, 제법, 원료 성상, 순도시험을 설정하였고, 확립한 분석조건을 바탕으로 정량법 항을 설정하였다. 순도시험은 일반적인 식품공전에 따른 순도시험 (중금속 함유 여부)을 따랐으며, 그 시험성적은 아래에 제시하였다. 또한 분말 제품 성상, 이물, 대장균 및 대장균군을 설정하였고, 정량법의 경우 원료 규격과 동일하게 lobetyolin물질로 0.1% 이상으로 설정하였다. 관련한 품질보증시험(성상, 이물, 대장균 및 대장균군 등)을 실시하였는데, 그 결과는 아래 표에 제시되어 있다.

가. 원료 성상

더덕 추출물 분말원료 성상의 경우 이미, 이취가 없는 갈색의 건조분말로 명확히 하였다.

나. 유해물질 규격

건강기능식품의 건전성 및 안전성을 확보하기 위하여 원료 또는 제조공정 중에서 오염 또는 잔류 가능성이 있는 유해물질 중 필요한 항목에 대하여 규격을 설정한다. 유해물질에 대한 규격은 유해 중금속(납, 비소, 수은, 카드뮴 등 4종), 대장균 등의 미생물에 대하여 설정하는 것을 원칙으로 한다.

표 55. 더덕 추출물 분말 원료 규격

정량	lobetyolin ($C_{20}H_{28}O_8$: 396.436 g/mol) 0.1% 이상 함유한다.
제법	세절(5mm)한 건조 더덕 1kg에 30% 주정 알코올 8 L를 넣고 24시간 상온, 침지하고 여과한 다음, 다시 30% 주정 알코올 5 L를 넣어 24시간 상온, 침지 추출하여 여과한다. 2회 반복 추출한 여과액을 합하여 감압농축한 엑스를 동결건조하여 분말화한다.
성상	갈색의 건조분말이며, 특이한 냄새가 없고 물에 맑으면서 약간 혼탁하게 녹는다.
순도시험	[중금속] 가) 납 5ppm 이하 나) 비소 5ppm 이하 다) 수은 1ppm 이하 라) 카드뮴 1.5ppm 이하
정량법	더덕 30% 주정알코올 추출물 (300mg/ml)을 100% MeOH(LC용)과 DW를 1:1로 녹여 용액을 만들고, 각 용액을 vortex mixer로 한 후에 13,000rpm에서

<table>
<tr><td></td><td>15분 원심분리하고 0.45um 필터로 여과하여 검액으로 한다.
Lobetyolin 표준품은 methanol에 녹여 1 mg/mL가 되도록 표준 원액을 제조한 후 단계적으로 희석하여 400ug/ml 이하 농도를 표준액으로 한다.
검액 및 표준액 10 μL씩을 가지고 다음 조건으로 액체크로마토그래프법에 따라 시험하여 검액 및 표준품의 피크면적 AS 및 AT를 측정한다.</td></tr>
<tr><td>조작조건</td><td>검출기: 자외부분광광도계(측정파장: 280nm)
컬럼: C18 Analytical(4.6mm I.D.X150mm, 5um)
이동상: A 용매 - ACN, B 용매 - 0.2% phosphoric acid PH4.61
유속: 0.5ml/min
주입량: 10ul
RT : 24.067분
<table>
<tr><th>Time</th><th>A(%)</th><th>B(%)</th></tr>
<tr><td>0</td><td>5</td><td>95</td></tr>
<tr><td>10</td><td>5</td><td>95</td></tr>
<tr><td>11</td><td>20</td><td>80</td></tr>
<tr><td>20</td><td>25</td><td>75</td></tr>
<tr><td>25</td><td>100</td><td>0</td></tr>
<tr><td>26</td><td>10</td><td>90</td></tr>
<tr><td>30</td><td>10</td><td>90</td></tr>
</table></td></tr>
<tr><td>저장법</td><td>기밀용기</td></tr>
</table>

표 56. 더덕 추출물 분말 제품의 성상, 미생물 및 순도시험 결과

문서확인번호 : QNDJ-MBGF-7CZD-PVYD

시험 · 검사성적서

발행번호	R20170605-0012		접수번호	170100203-001
검사완료일	2017-06-05		접수연월일	2017-05-25
제품명	더덕추출분말			
(품목)제조번호			품목제조신고번호	
유형 · 재질 · 품목명	기타기준규격외			
제조(수입)일	2017-04-25	유통(품질유지)기한		
의뢰자	성명	부희옥	업체명	주식회사 웰파이토
	소재지	(61950)광주광역시 서구 치평로 124 4층, 415호(치평동, 케이원오피스타운) 전화번호: 062 - 224 - 8972 팩스번호: 062 - 224 - 8971 전자우편: swb00@hanmail.net		
제조원	업체명		제조국	
	소재지			
시험 · 검사목적	식품 | 기타(기타)			

시험 · 검사 항목 및 결과

시험 · 검사 항목	시험 · 검사 기준	시험 · 검사 결과	판정	비고
성상	기준없음	고유의 향미를 가지고 이미.이취가 없었음	상기실험확인함	
이물	기준없음	불검출	상기실험확인함	
대장균(CFU/g)	기준없음	0	상기실험확인함	
대장균군(CFU/g)	기준없음	0	상기실험확인함	
납(mg/kg)	기준없음	0.0234	상기실험확인함	
카드뮴(mg/kg)	기준없음	0.0346	상기실험확인함	
비소(mg/kg)	기준없음	0.0086	상기실험확인함	
수은(mg/kg)	기준없음	0.002	상기실험확인함	

※ 본 증명서는 인터넷으로 발급되었으며, 발급번호를 통하여 위변조 여부를 확인할 수 있습니다.
또한, 문서하단의 바코드로도 진위확인(스캐너용 문서확인프로그램)을 하실 수 있습니다.

Page 1 of2

15. 개별인정형 기능성 원료 승인 조건 확보

더덕추출물의 개별인정형 기능성 원료 승인을 위해 제출할 관련 근거자료들을 아래에 요약하여 기술한다.

(1) 품목명

더덕추출물 분말

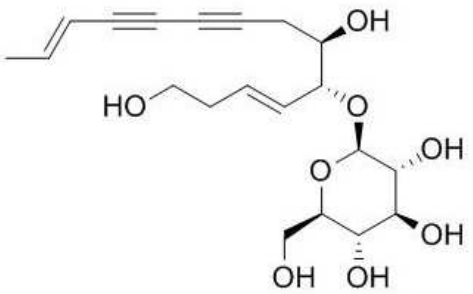
(2) 목표기능

비염 알레르기 등의 과민성 면역 개선

(3) 섭취량

1일 1.8 g

(4) 원료의 성분

원료명	지표성분명	지표성분 구조
더덕추출물 분말	Lobetyolin	

(5) 기준 규격

제안 및 기준 규격	시험항목		기준규격
규격 항목	성상		황색 또는 미색의 분말
	지표성분	Lobetyolin	0.13±0.02 mg/g
	중금속 (mg/kg)	납	3.0 mg/kg 이하
		카드뮴	2.0 mg/kg 이하
		비소	0.5 mg/kg 이하
		수은	0.5 mg/kg 이하
	미생물 (cfu/g)	대장균	음성
		대장균군	음성

가. 기원, 개발경위, 국내· 외에서의 인정 및 사용현황

(1) 기원 및 개발 경위

(가) 기원

○ 신청원료인 더덕은 초롱꽃과(Campanulaceae)에 속하는 다년생 덩굴식물로 주로 한국, 중국, 일본, 대만 등의 산과 들에 자생하는 잠재적 부가가치가 높은 유용작물이며, 뿌리는 비대하고 방추형으로 그 생김새가 인삼과 비슷하여 한방명으로는 '사삼(沙蔘)'이라고도 하며, 예로부터 산삼에 버금가는 뛰어난 약효가 있는 것으로 알려짐.

○ 더덕은 야생더덕(산더덕)과 재배더덕이 있는데, 주로 고산지대에 자생하는 야생더덕이 재배더덕보다 향이 진하고 영양성분이 강하며, 재배더덕은 단백질과 지방함량이 높아 담백한 맛을 더 내는 것으로 알려져 있으며, 현재 국내에서는 재배더덕을 많이 생산하고 있음.

○ 더덕 뿌리에는 사포닌 성분이 들어 있는 것이 특색이며, 이 사포닌은 인삼이나 도라지에 들어있는 주요 성분이기도 하지만, 더덕에는 도라지보다 훨씬 많이 들어 있음.

○ 역사적으로 더덕은 오래 전부터 식용으로 이용해왔다는 기록들이 있는데, '해동역사' 에 보면 고려시대에 이미 더덕을 나물로 먹었다는 기록이 있으며, 조선시대에는 더덕은 비위(비장과 위)를 건강하게 하면서 폐장의 기운을 이롭게 한다고 하여 왕과 왕비의 평상시 밥상인 수라상에 자주 올라가 임금님의 진상품으로 자리잡음. 또한 '조선왕조실록' 에도 정조대왕의 탕약에 인삼 대신 더덕을 사용하였다는 기록이 나와 있음.

○ 여러 문헌에서 더덕에 대해 언급된 내용을 보면, '동의보감' 에서는 더덕은 산에서 나며 잎이 구기자 잎과 비슷하고 음력 2월과 8월에 뿌리를 캐어 말리며, 더덕은 비위를 보하고 폐기를 보충해주며 산기로 음낭이 처진 것을 치료하고, 고름을 빨아내며 종독을 삭히고 오장에 풍기를 흩뜨린다고 함. 또한 '본초강목' 에서도 더덕은 위를 보하고 폐기를 보하며 산기를 다스리고 고름과 종기를 없애며 오장의 풍기를 고르게 한다고 기록됨. '본초비요' 에서는 더덕은 폐기를 보하고 폐를 맑게 하며 간을 기르고, 아울러 비와 신을 이롭게 하며 인삼과 비슷하나 몸집이 가볍다고 기록되어 있음. '단방신편' 에서의 기록을 보면, 더덕은 음부가 가려울 때 더덕가루를 물에 타서 마시면 효과가 있다고 함.

○ 이와 같이 더덕은 역사적으로 우리 민족이 식용으로 많이 이용해왔음을 여러 기록에서 확인할 수 있듯이 건강한 기능성 식품 소재로 개발하는데 아무 문제가 없음을 알 수 있음.

(나) 개발 경위

○ 더덕에는 폐를 맑게 하는 효능이 있어 가슴 통증을 동반한 기침, 가래 등의 기관지 질환 완화와 소염 기능이 뛰어나 예부터 기관지염의 약재로 이용되어 왔음. 또한 더덕은 임파선염, 유선염, 인후염 등의 염증 질환에도 효과가 있으며 피부 해독의 효능이 있어 아토피나 피부 질환에 좋은 것으로 알려져 있음.

○ 더덕의 쓴 맛을 내는 사포닌은 지방분해력이 크고 소화 흡수를 촉진시키며, 세포내 효소 활성화로 신진대사를 촉진하고 에너지를 증가시켜 원기회복, 피로, 무력감, 식욕부진 등을 개선해준다고 하며, 종기가 심할 때나 독충에 쏘였을 때 더덕가루를 바르면 효과가 좋은

것도 바로 이 사포닌의 효과 때문임. 뿌리의 냄새는 특이하며 처음에는 단맛이 나지만 나중에는 쓴맛이 나고, 약리실험에서 더덕은 가래를 삭이는 작용, 기침을 멈추는 작용, 혈압을 낮추는 작용, 보혈강장 작용, 혈중 콜레스테롤을 낮추는 작용, 건위작용, 피로회복 촉진 작용뿐 아니라 자양강장 작용 등이 밝혀졌음. 또 폐열로 마른기침을 할 때, 허로(虛勞)로 인한 기침을 할 때, 수액이 부족하여 목안이 마를 때, 오랜 기침 등에 더덕을 사용하며, 기관지확장증, 폐결핵, 급성 및 만성 기관지염 등에도 좋고, 폐와 비장, 신장을 튼튼하게 해주므로 정력증강에도 매우 효과가 좋은 것으로 알려져 있음.

○ 더덕의 주요 약리기능성 물질은 lancemaside A로 알려져 있으며, 더덕소재의 천식, 알레르기 비염 등 과민성 면역질환 개선 효능에 대한 과학적 입증을 통해 호흡기질환 개선 건강기능식품 소재로의 개발 근거를 마련함

○ 최근 건강에 대한 의식이 변화됨에 따라 천연물을 활용한 기능성 제품에 대한 관심이 높아지고 있음. 천연물을 활용한 기능성 제품은 인체 흡수율이 좋으며 부작용이 적어 각광받고 있음.

○ 2003년말 건강기능식품법의 발효에 따라 많은 천연물유래 소재개발 및 연구가 이루어지고 있으나 제품화단계에서 멈춰지고 있고, 특히 식품회사들의 영세성으로 인해 천연물소재를 이용한 다양한 품목의 개발보다는 기존 고시 물질(홍삼 등)의 다변화를 통한 판매에만 주력하고 있어 새로운 소재개발을 통한 시장개척에는 다른 선진국들에 비해 뒤처지고 있는 실정임.

○ 국내 몇몇 연구진이 천연추출물로부터 천식, 아토피, 관절염 등의 면역조절 치료제 개발을 위한 연구를 수행하고 있으나 아직은 국내 자생식물의 대상이나 면역질환의 적응증 적용범위에 있어 극히 제한적으로 개발되고 있는 실정임.

○ 현대사회는 급격한 산업화 및 환경변화로 인한 대기 중 미세먼지 및 오염물질 등은 유전적 원인과 더불어 체내의 면역체계를 교란시킴으로써 천식이나 아토피와 같은 자가면역질환이 급속히 증가하고 있음. 그러나 기존의 면역치료제인 항히스타민제나 스테로이드 제제 등은 단지 일시적인 증상완화 효과만이 있을뿐 실질적인 면역질환개선 효과를 나타내지 못하고, 자주 사용 시에는 부작용 등이 나타나는 단점을 가지고 있음.

○ 천식과 비염은 모두 만성 염증성 기도 질환으로 역학, 병태생리, 임상적으로 밀접한 관련성이 있어 두 질환이 별개의 질환이라기보다는 표적기관을 달리하여 표현되는 동일한 염증반응에 의한 ‘하나의 기도 질환’(one airway, one disease)으로 인식하고 있음.

○ 알레르기비염은 천식 발병의 중요한 독립적인 위험인자이며, 일반적인 천식의 유병률이 5% 정도인데 반해서 비염 환자의 10~40%에서 천식이 있고 천식 환자의 70~80%에서 비염을 동반하는 것으로 알려져 있고, 알레르기 비염 환자에서 IgE 항체치가 높을수록, 비특이적 기도과민성이 존재할수록 천식의 발병 위험이 높음.

○ 알레르기비염과 천식 치료에 일반적으로 사용하는 화학약제로서 항히스타민제는 흡입스테로이드보다 효과적이지 않다고 하며, 류코트리엔 조절제는 천식과 비염의 치료에 모두 효과적인 것으로 알려져 있음. 알레르기 면역치료는 알레르기질환을 완치시킬 수 있는 유일한 치료로서 천식과 비염의 치료에 모두 효과가 있으며, 특히 꽃가루, 집먼지진드기, 개, 고양이 비듬이 원인 항원일 경우 효과적이라고 함. 최근에 중증천식에서 사용이 증가하고 있는 항 IgE 항체도 천식과 알레르기비염의 치료에 모두 효과 있는 것으로 알려져 있지만, 이러한 합성약제들을 장기간 사용할 경우 많은 부작용을 동반할 수 있으므로 천연물에서

그 효능을 기대할 수 있는 소재의 개발이 시급하다고 봄.

○ 알레르기비염은 원인 알레르겐을 규명하여 환경조절을 통하여 회피하고 약물치료를 통해 상기도염증을 완화시켜 치료하는 내과적 질환으로 천식과 밀접한 관련이 있으므로 더덕 추출물을 이용한 면역치료를 통해 천식과 알레르기비염의 개선 효능을 기대할 수 있다고 봄.

○ 더덕의 효능에 대한 여러 연구들을 보면, 더덕 물추출물을 경구투여할 경우 흉선세포 증식을 촉진하여 면역작용을 증강하는 것으로 보고되고 있으며(서정숙, 1996), 또한 *In vitro* 실험을 통한 더덕 추출물 첨가가 마우스의 면역세포 증식에 미치는 영향에 대한 연구 결과, 더덕 물 추출물 및 에탄올 추출물은 마우스 비장세포를 증식시키고, 더덕 물 추출물은 사이토카인 생성량에도 영향을 주어 면역 기관의 주요 기능을 증진시킬 가능성이 있는 것으로 보고함(Ryu, 2008; Kim *et al.,* 2014).

○ 천식, 알레르기비염과 같은 자가 면역질환들은 장시간의 체질개선을 통한 치료가 필요하며, 이에 따라 부작용 없이 인체 내의 면역반응을 조절하는 기능성식품에 대한 관심이 증가 하고 있음. 특히 면역조절 식품은 특이성이 뛰어나며 부작용이 적어 21세기 질병예방 및 건강증진을 위한 신개념 차세대 신약으로 주목받고 있음. 또한 기존의 식품원료를 이용한 제품개발은 부작용이 적어 개발비용이 적고 상품화 기간이 짧아, 향후 시장을 주도할 것으로 기대됨.

○ 환경오염 및 공해에 의한 기관지관련 질병이 증가추세로, 더덕은 예방적 측면에서 일부 이용되고 있으나, 대부분 1차 가공제품으로서 그 효능을 기대하기는 매우 낮은 편. 따라서 소비자들이 쉽게 찾을 수 있는 다양한 형태의 건강기능성 소재로의 이용 및 관련 제품 개발이 필요함.

○ 과민성면역질환 개선 효능에 대한 연구를 통해 부작용 없이 안전하게 오래 기간 복용할 수 있는 기능성 소재 개발이 요구되는 바, 더덕 추출물은 이러한 요구에 부응할 수 있는 최적의 천연물 소재가 될 것으로 확신함.

(2) 국내 · 외 인정 · 허가 현황

(가) 국내

○ 더덕원료의 경우 국내에서 기능성 원료로 인정, 허가된 사례가 없음.

○ 국내 면역조절 관련 건강기능식품소재 중 면역 과민반응 관련 기능성소재 인정 현황은 아래 표에서와 같이 총 5개의 소재가 개발되어 있으며, 1종의 미생물유래건조물, 4종의 식물추출물이 공개되어 있음.

표 57. 국내 건기식 소재 중 과민면역반응 개선 소재 인정 현황

번호	원료명	인정번호	인정등급	기능(지표)성분	일일섭취량	섭취 시 주의사항
1	*Enterococcus faecalis* 가열처리 건조분말	제2006-23호	생리활성기능 3등급	① *Enterococcus faecalis* FK-23 사균체 ② Cis-박센산	-	-
		제2008-31호	생리활성기능 2등급	Vaccenic acid	*Enterococcus faecalis* FK-23 효소 및 가열처리건조분말로서 1 g/일	임산부, 수유 여성 섭취 삼가
2	구아바잎추출물 등복합물	제2009-16호	생리활성기능 2등급	① Ellagic acid ② EGCG ③ Gallic acid	구아바잎 추출물등 복합물로서 800 mg/일	-
3	다래추출물	제2009-18호	생리활성기능 2등급	① Quinic acid ② Citric acid	다래추출물로서 2 g/일	임산부, 수유기 여성은 섭취 전 의사와 상담
		제2009-58호			액상 다래추출물로서 1.4~1.7 g/일	
4	피카오프레토 분말등복합물	제2010-28호	생리활성기능 2등급	① Total Polyphenol ② Vit C ③ Chlorogenic acid ④ Cinnamic acid	신청원료 중 '아세로라농축물, 계피추출물, 피카오프레토 분말 3종 혼합물'로서 1,350 mg/일	임산부, 수유부, 어린이 섭취 주의
5	소엽추출물	제2010-48호	생리활성기능 3등급	Rosmarinic acid	-	-

(나) 국외

○ 더덕원료는 국외에서 기능성 원료로 인정, 허가된 사례가 없음.

○ 유사원료도 기능성 원료로 인정, 허가된 사례가 없으며, 일본의 湧永제약회사에서 제품개발을 위해 더덕의 효능물질로 알려진 Lancemaside A 성분을 분석하였으나 일본재배 더덕에는 이러한 성분이 거의 없는 것으로 확인되어 현재 대부분 1차적 식품에만 일부 첨가되어 사용되고 있음.

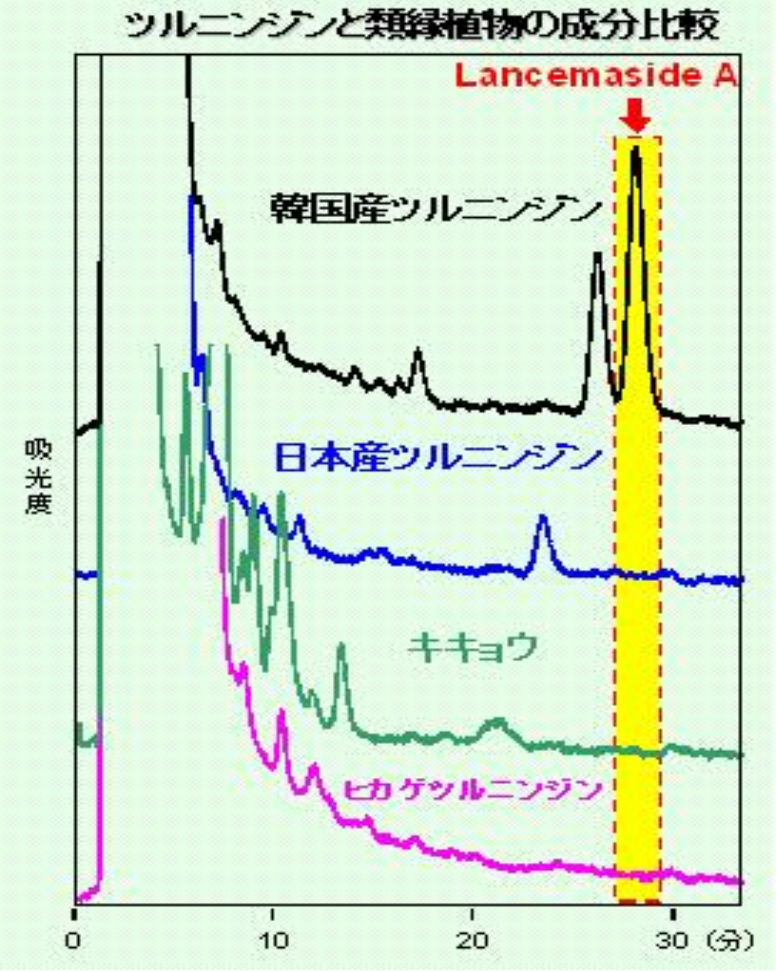


그림. 84. Lancemaside A 함량비교: 일본湧永製薬 자료

(3) 국내 · 외 사용현황

○ 더덕원료의 경우 국내에서 대부분 즉석 조리 및 1차적 가공형태로 사용되고 있으며, 일부 건강식품 등에 부가적으로 첨가되고 있음.

○ 국외에서의 더덕원료의 사용은 거의 없으며, 더덕이 주로 한중일 지역에 자생하는 식물이지만, 예로부터 더덕의 기능성을 활용한 식품 또는 제품 개발은 대부분 한국에서 많이 이루어지고 있음.

나. 제조방법

○ 더덕 추출물 원료 생산을 위한 주정알코올의 농도를 최적화하기 위하여 추출용매 농도별 추출물의 과민성면역의 염증관련 인자에 대한 효능실험을 수행하였으며, 그 결과 30% 주정알코올 추출물이 유의한 항염증 효능 및 안전성, 제조공정의 용이성 면에서 적합하다고 판단되어 시험원료는 30% 주정알코올로 추출하여 농축, 분말화 하였음.

(1) 더덕추출물원료 제조공정표

(1) 제조공정	(2) 공정, 식품, 식품첨가물	(3) 지표성분 함량변화(mg/g)	(4) 수율(%)
더덕원료 동결건조			
↓			
추출 (30% 주정)			
↓			
여과			
↓			
감압농축		0.13±0.02	
↓			
살균	퓨어덱스트린		
↓			
동결건조			43.4

(2) 더덕추출물 분말제품 제조공정도

(1) 제조공정	(2) 공정, 식품, 식품첨가물	(3) 조건	(4) 지표성분 함량변화 (mg/g)	(5)수율 (%)
원료검사 (주) 웰파이토		-입고, 수량확인, 성상확인		
↓				
원료투입		더덕 동결건조 원료		
↓				
주정액(30%) 투입		-원물대비 8배수 이상 투입		
↓				
24h 추출(상온, 침지)		-2h~4h 한번씩 순환 펌프 가동		
↓				
여과(50μm 필터여과)				
↓				
2차 추출		-30% 주정액 투입		
↓				
24h 추출				
↓				
여과 (10μm 필터여과)				
↓				
농축		-진공도 6.5 스팀온도 78℃	0.13±0.02	
↓	-Brix 26.0 건조감량 대비 30% 덱스트린 추가			
살균		-90℃, 10분 이상		
↓				
동결건조				43.4
↓				
분말과립화	말토덱스트린, 결정셀룰로오스, 이산화규소 첨가		0.11±0.02	
↓				
포장(스틱포장)				
↓				
출고 (주) 웰파이토				

다. 원료 및 성분의 특성

(1) 원료 성상

더덕추출물 분말원료 성상의 경우 이미, 이취가 없는 미황색의 가루

○ 더덕추출물 분말원료 규격

<table>
<tr><td>정량</td><td>lobetyolin ($C_{20}H_{28}O_8$: 396.436 g/mol) 0.05% 이상 함유함.</td></tr>
<tr><td>제법</td><td>세절(5mm)한 건조 더덕 1kg에 30% 주정 알코올 8 L를 넣고 24시간 상온, 침지하고 여과한 다음, 다시 30% 주정 알코올 5 L를 넣어 24시간 상온, 침지 추출하여 여과한다. 2회 반복 추출한 여과액을 합하여 감압농축한 엑스를 동결건조하여 분말화함.</td></tr>
<tr><td>성상</td><td>미황색의 건조분말이며, 특이한 냄새가 없고 물에 맑으면서 약간 혼탁하게 녹음.</td></tr>
<tr><td>순도시험</td><td>[중금속]
가) 납 기준치 이하
나) 비소 기준치 이하
다) 수은 기준치 이하
라) 카드뮴 기준치 이하</td></tr>
<tr><td>정량법</td><td>더덕 30% 주정알코올 추출물 (300mg/mL)을 100% MeOH(LC용)과 DW를 1:1로 녹여 용액을 만들고, 각 용액을 vortex mixer로 한 후에 13,000rpm에서 15분 원심분리하고 0.45um 필터로 여과하여 검액으로 함.
Lobetyolin 표준품은 methanol에 녹여 1 mg/mL가 되도록 표준원액을 제조한 후 단계적으로 희석하여 400 μg/ml 이하 농도를 표준액으로 함.
검액 및 표준액 10 μL씩을 가지고 다음 조건으로 액체크로마토그래프법에 따라 시험하여 검액 및 표준품의 피크면적 AS 및 AT를 측정함.</td></tr>
<tr><td>조작조건</td><td>검출기: 자외부분광광도계(측정파장: 280nm)
컬럼: C18 Analytical(4.6mm I.D.X150mm, 5um)
이동상: A 용매 - ACN, B 용매 - 0.2% phosphoric acid PH4.61
유속: 0.5mL/min
주입량: 10μL
RT : 24.067분
<table>
<tr><th>Time</th><th>A(%)</th><th>B(%)</th></tr>
<tr><td>0</td><td>5</td><td>95</td></tr>
<tr><td>10</td><td>5</td><td>95</td></tr>
<tr><td>11</td><td>20</td><td>80</td></tr>
<tr><td>20</td><td>25</td><td>75</td></tr>
<tr><td>25</td><td>100</td><td>0</td></tr>
<tr><td>26</td><td>10</td><td>90</td></tr>
<tr><td>30</td><td>10</td><td>90</td></tr>
</table></td></tr>
<tr><td>저장법</td><td>기밀용기</td></tr>
</table>

(2) 지표성분(Lobetyolin) 및 근거

Lobetyolin

[Catalog No.] CFN99104

[CAS No.] 136085-37-5

[Purity] 97.0%

[M.F] $C_{20}H_{28}O_8$

[Physical Description] Oil

[Solvent] DMSO, Pyridine, Methanol, Ethanol, etc.

[Weight] 10mg

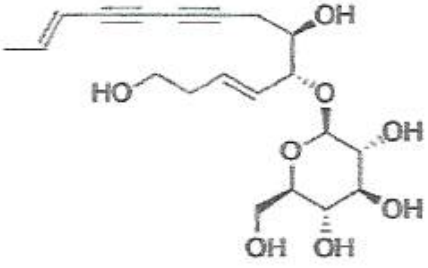
[Lot No.] CFS201702

[Storage] Protected from air and light, refrigerate or freeze(2-8 °C)

[Intended Use] For laboratory use only

[Shelf Life] 2 years

[Chemical Structure]



[Characterization Data Summary]

Analytical Test	Results
Identification by ^{1}H-NMR, HPLC	Consistent with the above structure
Purity tested	97.0%

라. 지표성분에 대한 규격 및 시험방법

(1) 지표성분 분석법 밸리데이션

본 연구는 더덕의 건강기능식품 기능성 인증을 위해 더덕 제품의 함량분석 기준 및 시험방법을 설정을 목표로 한다. 먼저 지표물질인 Lobetyolin의 분석 방법 밸리데이션을 수행하였으며, 건강기능식품 기능성 원료 및 기준·규격 인정 및 품질관리를 위하여 필요한 분석법에 대한 밸리데이션 실시방법을 구체적으로 제시함을 목적으로 하였다. 분석법에 밸리데이션은 '의약품등 분석법의 밸리데이션 가이드라인(식품의약품 안전처 의약품평가부)'에 기초하여 수행되었다.

(2) 분석법 밸리데이션

(가) 직선성 (Linearity)

실험방법이 일정 범위에 있는 검체 중 분석대상물질의 양 (또는 농도)에 대하여 직선적인 측정값을 얻어낼 수 있는지 평가한다.

(나) 정확성 (Accuracy)

본 분석법을 통한 지표물질의 측정값이 이미 알고 있는 참값이나 표준값에 근 접한 정도를 평가한다.

(다) 정밀성 (Precision) 및 회수율(Recovery)

균일한 검체로부터 얻은 시료를 정해진 조건에 따라 측정하였을 때 각각의 측정값들 사이의 반복성(병행정밀성)을 평가하였다.

(라) 검출한계 (Detection Limit)

검체 중에 존재하는 분석대상물질의 검출 가능한 최소량을 평가한다.

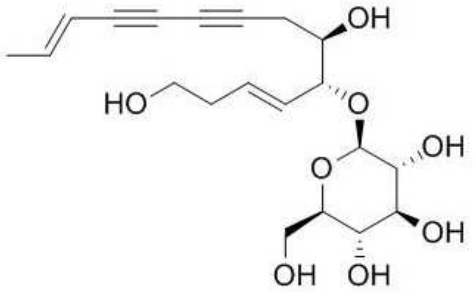
(마) 정량한계 (Quantitation Limit)

적절한 정밀성과 정확성을 가진 정량값으로 표현할 수 있는 검체 중 분석대상물질의 최소량을 측정한다.

(3) 시험방법 및 시험결과

(가) 지표물질(표준품) 및 검체

지표물질은 더덕 유효 성분 중 하나인 Lobetyolin을 선정하였다.



Lobetyolin

Molecular Weight: 396.43[g/mol]

Molecular Formula: $C_{20}H_{28}O_8$

(나) 직선성 및 calibration

분석은 HPLC를 이용하여 분석하며 분석조건은 다음과 같다.

-장치: HPLC
-검출기: 자외부분광광도계
(측정파장: 254nm)
-컬럼: Zorbax extend-C18
Analytical (4.6 x 150mm, 5um)
-이동상: A Acetonitrile
B 인산완충액 (0.2%, pH 3.7)
-유속: 1.0ml/min
-주입량: 10㎕

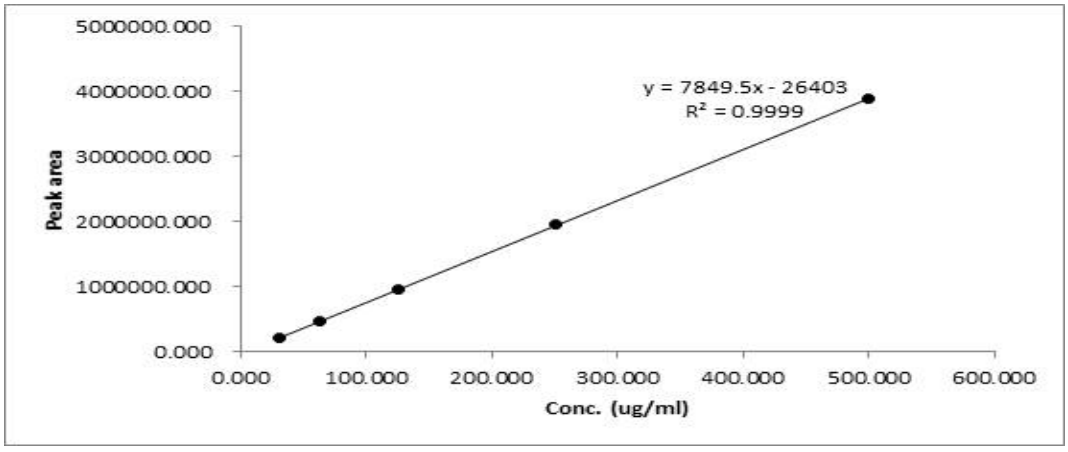
Time	A(%)	B(%)
0	10	90
7	20	80
8	20	80
20	25	75
21	100	0
25	20	80
30	20	80

직선성에 관한 실험결과는 다음과 같다.

Y=7849.5X-26403, Y: 피크면적, X: 농도

	농도(ug/mL)	보정농도	분석값				
			1	2	3	Mean	SD
1	31.25	31.25	215731	205265	206240	209078.667	5781.679
2	62.5	62.5	464549	461247	460740	462179.333	2067.912
3	125	125	954929	948750	941916	948531.667	6509.247
4	250	250	1971479	1970102	1960304	1967295	6093.406
5	500	500	3894814	3883970	3876624	3885136	9150.885

Slope	7858.94	7853.16	7836.49	7849.534
Intercept	-22369.96	-27683.46	-29155.67	26403.028
Correlation coefficient (r2)	0.99988	0.99982	0.99986	1.000



(다) 정확성(Accuracy) _ Intra- Inter- day accuracy (일내, 일간 정확성)

분석법의 Intra-(일내), Inter-(일간) 정확성을 조사하였다.

Compound	Intraday(n=3)		
Concentration (ug/mL)	Detected (ug/mL,mean±S.D)	R.S.D. (%)	Recovery (%)
Lobetyolin			
62.5	61.76 ± 2.47	4.23	98.82
125	125.305 ± 1.33	1.09	100.24
250	258.539 ± 4.38	1.72	103.42
Compound	Interday(n=3)		
Concentration (ug/mL)	Detected (ug/mL,mean±S.D)	R.S.D. (%)	Recovery (%)
Lobetyolin			
62.5	63.22 ± 0.77	1.28	101.16
125	128.03 ± 1.70	1.36	102.43
250	257.69 ± 4.32	1.70	103.08

(라) 정밀성

검체		측정값	평균	표준편차	상대표준편차
농도	측정회수				
62.5	1	486232	482757.2	3085.936	0.639
	2	481588			
	3	483787			
	4	483895			
	5	477218			
	6	483823			

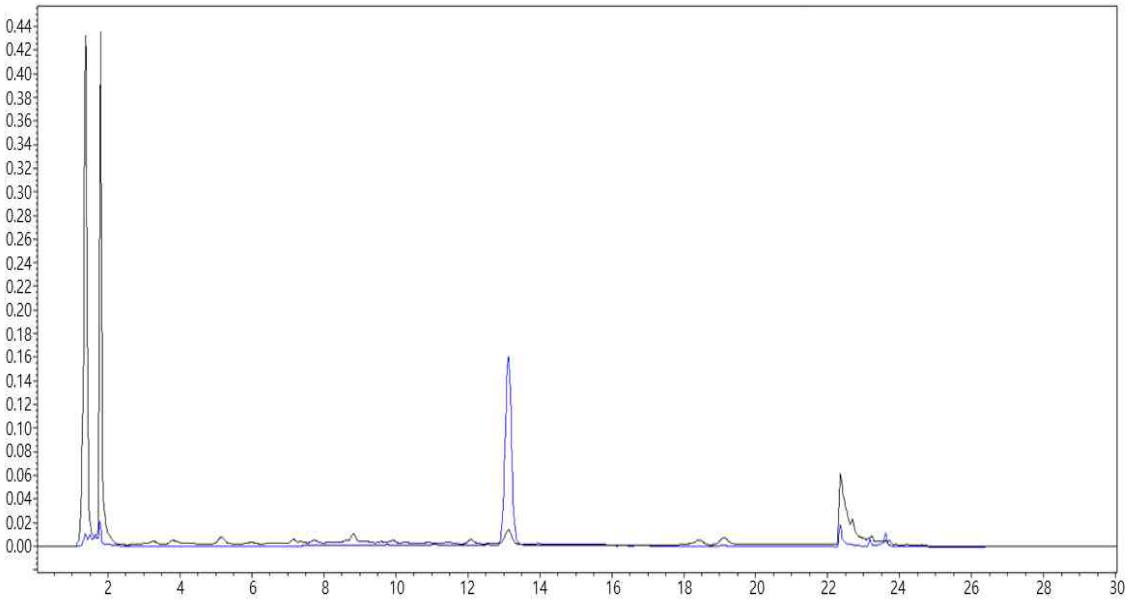
검체		측정값	평균	표준편차	상대표준편차
농도	측정회수				
125	1	998477	985658.2	8355.348	0.848
	2	985868			
	3	992232			
	4	981038			
	5	980154			
	6	976180			

검체		측정값	평균	표준편차	상대표준편차
농도	측정회수				
250	1	2063624	2048660.2	11664.194	0.569
	2	2043781			
	3	2062505			
	4	2042937			
	5	2034954			
	6	2044160			

(4) 더덕에 함유된 지표성분 확인

더덕 추출물에 대한 유효 지표성분인 Lobetyolin 확인을 위하여 HPLC 동시분석을 시행하였다. 더덕 추출물에 대한 HPLC 동시분석결과, 지표(기능)성분인 Lobetyolin이 확인되었으며, 각 지표성분에 대한 최대파장(maximum wavelength)으로 Lobetyolin (254nm)이 확인되었다.

A) Lobetyolin 250ug/ml (파란색)_ 더덕 추출물 50mg/ml (검은색)



마. 유해물질에 대한 규격 및 시험방법

(1) 유해물질에 대한 규격

- 건강기능식품의 건전성 및 안전성을 확보하기 위하여 원료 또는 제조공정 중에서 오염 또는 잔류 가능성이 있는 유해물질 중 필요한 항목에 대하여 규격을 설정한다.
- 유해물질에 대한 규격은 유해 중금속, 미생물에 대하여 설정하는 것을 원칙으로 한다.
- 기능성 원료 및 제품에 대하여 중금속의 경우, 납, 비소, 카드뮴, 수은 등 4가지 개별 중금속 규격을 설정하여야 한다.
- 제품의 제형이 액상인 경우 세균수 항목을 규격에 따라 설정하여야 하며, 액상을 포함한 전체 제형에 대하여 대장균군 항목을 설정하여야 한다.
- 유해물질에 대한 규격은 원칙적으로 3 Lot 이상 시료에 대한 시험결과를 근거로 작성한다.

○ 더덕추출물 원물 기준 규격 (3 Lot)

제안 기준 및 규격	시험항목		제안기준 및 규격	시험성적서		
	성상			미황색 분말		
규격항목	지표성분(mg/g)		Lobetyolin	0.13	0.13	0.13
	중금속	납	3.0 mg/kg 이하	불검출	불검출	불검출
		총비소	2.0 mg/kg 이하	불검출	불검출	불검출
		카드뮴	0.5 mg/kg 이하	불검출	불검출	불검출
		총수은	0.5 mg/kg 이하	불검출	불검출	불검출
	미생물	세균수	10,000 cfu/g	0	0	0
		대장균군	10 cfu/g	0	0	0

(2) 유해물질에 대한 시험방법

- 납: 식품공전 제10. 일반시험법 6. 유해성금속시험법 2) 측정 (2) ICP
- 카드뮴: 식품공전 제10. 일반시험법 6. 유해성금속시험법 2) 측정 (2) ICP
- 총비소: 식품공전 제10. 일반시험법 6. 유해성금속시험법 2) 측정 (2) ICP
- 총수은: 식품공전 제10. 일반시험법 6. 유해성금속시험법 3) 금속별 시험 (5) 수은 ㉯ 금아말감법
- 대장균군: 식품공전 제10. 일반시험법 8. 미생물시험법 5) 대장균군

16. 인체적용시험 결과

더덕추출물에 대한 과민성 면역반응 개선 효능의 임상시험을 수행하기 위하여 알레르기비염 질환을 가진 피험자를 선정하여 시험을 수행하였다. 그 결과에 대한 요약본을 아래에 첨부한다.

Confidential *Clinical Study Report (Ver1.0, 2018.07.24)*

1. 요약 (Synopsis)

임상시험 의뢰자명: ㈜헬파이토	보고서 Volume : Total 64 pages
제품명: 더덕추출물	
주성분명: 더덕추출물	
임상시험 제목: 알레르기비염 질환을 가진 대상자를 대상으로 더덕(Codonopsis lanceolata) 추출물의 과민면역 개선에 대한 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 8주간의 무작위배정, 이중눈가림, Placebo 대조 임상시험	
임상시험조정자: 세명대학교병원 교수 김형준	
임상시험기간: 2018.01.30 ~ 2018.06.01	임상시험단계: 임상시험
임상시험의 목적: 더덕(Codonopsis lanceolata) 추출물의 투여로 과민면역기능의개선에 도움이 되는지 유효성과 안전성을 평가	
임상시험방법: 8주, 무작위 배정, 이중눈가림, 임상시험	
대상자 수(계획된 수 및 분석에 포함된 수): ○ 계획된 대상자 수 - 무작위 배정례수: 60명 - 유효성 분석례수: 60명 ○ 분석에 포함된 수 - 무작위 배정번호 배정 대상자 수: 60명 - Safety 분석 대상자 수: 60명 - FAS 분석 대상자 수: 60명 - PPS 분석 대상자 수: 60명	
임상시험대상: 알레르기비염 질환을 가진 대상자	
선정 · 제외기준: 선정기준 1) 만 18세 이상 65세 미만의 남, 여 피험자 2) 치료를 받지 않고 있는 알레르기비염 질환을 가진 피험자 * TNSS 평가에서 각항목 (콧물/코막힘/코의가려움증/재채기)이 1점이상 3) 본 임상시험에 자의로 참여를 결정하고 임상시험동의서에 서명하고 동의한 피험자	

임상시험 의뢰자명: ㈜웰파이토	보고서 Volume : Total 64 pages
제품명: 더덕추출물	
주성분명: 더덕추출물	

제외기준

1) 더덕(Codonopsis lanceolata) 성분에 알레르기가 있는 피험자
2) 상기도감염 피험자
3) 천식 피험자
4) 스테로이드 제제를 사용하고 있는 피험자
5) 심부전, 심근경색, 뇌졸중 등의 급성 중증 심혈관계 질환을 가진 피험자
6) 시험제품의 흡수에 영향을 줄 수 있는 위장관계 질환 (예: 크론씨 병)이나 위장관계 수술 (단, 5. 단순 맹장수술이나 탈장수술은 제외)의 과거력이 있는 피험자
7) 1개월 이내에 다른 임상시험 또는 임상시험에 참여한 피험자
8) BUN수치가 정상치의2배 이상인 피험자
9) ALT/AST수치가 정상범위에 3배를 넘는 피험자
10) 갑상선질환 피험자
11) Serum creatinine이 1.5mg이상인 피험자
12) 정신질환(우울증, 정신분열증) 피험자
13) 약물 또는 알코올 남용 병력이 있는 피험자
14) 임신 혹은 수유 중인 피험자
    임신 가능성이 있는 가임여성 중 적절한 피임법의 시행을 수용하지 않은 경우
    (단, 불임수술을 받은 여성은 제외)
15) 기타연구자가 연구 참여에 부적합하다고 판단한 자

투여일정:

임상시험용 시험물질의 투약은 피험자가 동의서에 서명하고 스크린을 통하여 선정/제외 기준에 부합하는 피험자들을 시험군과 플라세보군으로 무작위 배정하여, 양쪽군 동일하게 시험물질 인 더덕(Codonopsis lanceolata) 추출물과 플라세보를 기준으로 투여한다.

통계분석방법:

본 임상시험의 대상자로부터 얻어진 자료는 크게 SS(Safety Set), FAS(Full Analysis Set), PP(Per-Protocol)군으로 나뉜다. 본 임상시험의 주 분석 집단(main population)은 FAS(Full Analysis Set)군으로 하고 추가 분석은 PP 군을 대상으로 하며, 안전성에 대한 자료는 SS(Safety Set)을 대상으로 분석하였다.

<유효성 평가>

임상시험 의뢰자명: ㈜헬파이토	보고서 Volume : Total 64 pages
제품명: 더덕추출물	
주성분명: 더덕추출물	

1. 주평가변수:

: 1차 유효성 평가변수인 시험물질을 투여 전 Tcell/B cell (subset포함)과 임상시험용 시험물질 복용 후 8주째 Tcell/B cell (subset포함) 및 IgE의 차이를 분석하였다.

2. 부평가변수

1. 시험물질 투여 전 및 투여 후 8주째의 WBC수치의 변화
2. 시험물질 투여 전 및 투여 후 8주째의 Neutrophile의 변화
3. 시험물질 투여 전 및 투여 후 8주째의 Lymphocyte의 변화
4. 시험물질 투여 전 및 투여 후 8주째의 Monocyte의 변화
5. 시험물질 투여 전 및 투여 후 8주째의 Basophile의 변화
6. 시험물질 투여 전 및 투여 후 8주째의 Eosinophile의 변화
7. 시험물질 투여 전 및 투여 후 8주째의 Nasal symptom의 변화
   (코가려움, 재채기, 콧물, 코막힘 의 변화)
8. 시험물질 투여 전 및 투여 후 8주째의 PG(Prostaglandin)E2의 변화

<u><안전성 평가></u>

임상시험용 제품 투여 후 8주까지 이상반응, 실험실검사 및 활력징후 항목을 비교하였다.

요약 및 결론:

<u>유효성 결과</u>

<u>(1) 주평가변수</u>

<u>임상시험용 제품 투여 후 8주째 IgE, T cell/B cell</u>

FAS에서 IgE에 대한 시험물질 투여 전 및 8주 투여 후 변화량 평균값은 시험군에서 -4.72±24.22이었고, 대조군 변화량 평균값은 1.22±15.82으로 조사되었고 통계적으로 유의한 차이는 없었다(p-value=0.2648).

FAS에서 T cell에 대한 시험물질 투여 전 및 8주 투여 후 변화량 평균값은 시험군에서 4.47±11.92이었고, 대조군 변화량 평균값은 -0.97±15.56으로 조사되었고, 통계적으로 유의한 차이는 없었다(p-value=0.2648). 군내 변화에 대해서는 시험군에서 통계적으로 유의한 차이를 보였다(p-value=0.0491)

FAS에서 CD3에 대한 시험물질 투여 전 및 8주 투여 후 변화량 평균값은 시험군에서

임상시험 의뢰자명: ㈜웰파이로	보고서 Volume : Total 64 pages
제품명: 더덕추출물	
주성분명: 더덕추출물	

2.13±6.11이었고, 대조군 변화량 평균값은 0.03±9.87로 조사되었고, 통계적으로 유의한 차이는 없었다(p-value=0.3257).

FAS에서 CD4에 대한 시험물질 투여 전 및 8주 투여 후 변화량 평균값은 시험군에서 1.88±5.84이었고, 대조군 변화량 평균값은 -0.33±6.49로 조사되었고, 통계적으로 유의한 차이는 없었다(p-value=0.1716).

FAS에서 CD8에 대한 시험물질 투여 전 및 8주 투여 후 변화량 평균값은 시험군에서 0.46±2.91이었고, 대조군 변화량 평균값은 -0.67±3.46으로 조사되었고, 통계적으로 유의한 차이는 없었다(p-value=0.1741).

FAS에서 B cell에 대한 시험물질 투여 전 및 8주 투여 후 변화량 평균값은 시험군에서 -1.81±3.12이었고, 대조군 변화량 평균값은 0.67±6.05로 조사되었고, 통계적으로 유의한 차이를 보였다(p-value=0.0029).
군내 변화에 대해서는 시험군에서 통계적으로 유의한 차이를 보였다(p-value=0.0035)

(2) 부평가변수

- **시험물질 투여 전 및 투여 후 8주째의 WBC수치의 변화**

FAS에서 WBC 대한 시험물질 투여 전 및 8주 투여 후 변화량 평균값은 시험군에서 -0.49±1.41이었고, 대조군 변화량 평균값은 0.14±1.90으로 조사되었고, 통계적으로 유의한 차이는 없었다(p-value=0.1498).

- **시험물질 투여 전 및 투여 후 8주째의 Neutrophile수치의 변화**

FAS에서 Neutrophile에 대한 시험물질 투여 전 및 8주 투여 후 변화량 평균값은 시험군에서 0.70±7.23이었고, 대조군 변화량 평균값은 0.67±10.23으로 조사되었고, 통계적으로 유의한 차이는 없었다(p-value=0.9896).

- **시험물질 투여 전 및 투여 후 8주째의 Lymphocyte수치의 변화**

FAS에서 Lymphocyte에 대한 시험물질 투여 전 및 8주 투여 후 변화량 평균값은 시험군에서 -0.55±6.37이었고, 대조군 변화량 평균값은 0.13±9.32로 조사되었고, 통계적으로 유의한 차이는 없었다(p-value=0.7427).

임상시험 의뢰자명: ㈜헬파이로	보고서 Volume : Total 64 pages
제품명: 더덕추출물	
주성분명: 더덕추출물	

- **시험물질 투여 전 및 투여 후 8주째의 Monocyte수치의 변화**

FAS 에서 Monocyte 에 대한 시험물질 투여 전 및 8 주 투여 후 변화량 평균값은 시험군에서 -0.38±1.44 이었고, 대조군 변화량 평균값은 -0.57±1.55 로 조사되었고, 통계적으로 유의한 차이는 없었다(p-value=0.6369).

- **시험물질 투여 전 및 투여 후 8주째의 Basophile수치의 변화**

FAS 에서 Basophile 에 대한 시험물질 투여 전 및 8 주 투여 후 변화량 평균값은 시험군에서 0.15±0.55 이었고, 대조군 변화량 평균값은 -0.13±0.60 으로 조사되었고, 통계적으로 유의한 차이는 없었다(p-value=0.0618).

- **시험물질 투여 전 및 투여 후 8주째의 Eosinophile수치의 변화**

FAS 에서 Eosinophile 에 대한 시험물질 투여 전 및 8 주 투여 후 변화량 평균값은 시험군에서 0.08±1.43 이었고, 대조군 변화량 평균값은 -0.10±1.52 로 조사되었고, 통계적으로 유의한 차이는 없었다(p-value=0.6313).

- **시험물질 투여 전 및 투여 후 8주째의 Nasal symptom수치의 변화 (코가려움, 재채기, 콧물, 코막힘의 변화)**

FAS에서 Nasal symptom(total)에 대한 시험물질 투여 전 및 8주 투여 후 변화량 평균값은 시험군에서 -4.30±2.73이었고, 대조군 변화량 평균값은 -4.20±2.37로 조사되었고, 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다(p-value=0.8801).
군내 변화에 대해서는 시험군과 대조군 모두 통계적으로 유의한 차이를 보였다(p-value<0.0000)

A. 시험물질 투여 전 및 투여 후 8주째의 Nasal symptom(코가려움)수치의 변화

FAS에서 Nasal symptom(코가려움)에 대한 시험물질 투여 전 및 8주 투여 후 변화량 평균값은 시험군에서 -1.00±0.87이었고, 대조군 변화량 평균값은 -0.70±0.84로 조사되었고, 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다(p-value=0.1769).
군내 변화에 대해서는 시험군과 대조군 모두 통계적으로 유의한 차이를 보였다(p-value<0.0000)

B. 투여 전 및 투여 후 8주째의 Nasal symptom(재채기)수치의 변화

임상시험 의뢰자명: 유웰파이토	보고서 Volume : Total 64 pages
제품명: 더덕추출물	
주성분명: 더덕추출물	

FAS에서 Nasal symptom(재채기)에 대한 시험물질 투여 전 및 8주 투여 후 변화량 평균값은 시험군에서 -1.03±0.85이었고, 대조군 변화량 평균값은 -1.03±0.72로 조사되었고, 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다(p-value=1.0000).
군내 변화에 대해서는 시험군과 대조군 모두 통계적으로 유의한 차이를 보였다(p-value<0.0000)

C. 시험물질 투여 전 및 투여 후 8주째의 Nasal symptom(콧물)수치의 변화

FAS에서 Nasal symptom(콧물)에 대한 시험물질 투여 전 및 8주 투여 후 변화량 평균값은 시험군에서 -1.10±0.92이었고, 대조군 변화량 평균값은 -1.17±0.99로 조사되었고, 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다(p-value=0.7878).
군내 변화에 대해서는 시험군과 대조군 모두 통계적으로 유의한 차이를 보였다(p-value<0.0000)

D. 시험물질 투여 전 및 투여 후 8주째의 Nasal symptom(코막힘)수치의 변화

FAS에서 Nasal symptom(코막힘)에 대한 시험물질 투여 전 및 8주 투여 후 변화량 평균값은 시험군에서 -1.13±0.82이었고, 대조군 변화량 평균값은 -1.30±1.02로 조사되었고, 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다(p-value=0.4887).
군내 변화에 대해서는 시험군과 대조군 모두 통계적으로 유의한 차이를 보였다(p-value<0.0000)

- **<u>시험물질 투여 전 및 투여 후 8주째의 NK cell 수치의 변화</u>**

FAS에서 NK cell에 대한 시험물질 투여 전 및 8주 투여 후 변화량 평균값은 시험군에서 -2.96±5.11이었고, 대조군 변화량 평균값은 -2.59±4.57로 조사되었고, 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다(p-value=0.7686). 군내 변화에 대해서는 시험군과 대조군 모두 통계적으로 유의한 차이를 보였다(p-value=0.0035, 0.0042).

<u>안전성 결과</u>

임상시험기간 동안 발현된 전체 이상반응은 5건으로, 시험군에서 6.67%(2/30명, 3건)이고, 대조군에서 3.33%(1/30명, 2건)으로 두 군간 발현율의 통계적 유의한 차이는 없었다(p-value=1.0000).
시험용 임상시험용 제품과의 관련이 있는 것으로 평가된 이상약물반응은 1건도 발현되지 않았고, 중대한 이상반응이 이상반응의 발현과 동일하게 5건으로, 시험군에서 6.67%(2/30명, 3건)이고, 대조군에서 3.33%(1/30명, 2건)으로 두 군간 발현율의 통계적 유의한 차이는 없었다(p-

임상시험 의뢰자명: ㈜웰파이토	보고서 Volume : Total 64 pages
제품명: 더덕추출물	
주성분명: 더덕추출물	

value=1.0000).

이상반응의 종류별 분포는 발현된 건수를 기준으로, 기타용어가 4건(시험군 2건, 대조군 2건)으로 가장 많이 발현되었고, 그 다음으로 중추 및 말초신경계 장애가 1 건(시험군 1건) 의 순서로 발현되었으며, 세부질환명인 PT 기준으로 상세불명의 사고 가 4건(시험군 2건, 대조군 2건)으로 가장 많이 발현되었고, 그 다음으로 어지럼증이 1 건(시험군 1건) 의 순서로 발현되었다.

결론

본 임상시험을 통해 ㈜웰파이토의 더덕(*Codonopsis lanceolata*)추출물의 알러지비염을 가진 대상자의 과민면역반응 개선에 대한 유효성 측면에서 1차 유효성 평가변수 중 B cell에서 시험군과 대조군(위약군)사이의 유의한 차이가 관찰되었다. 즉 더덕 추출물의 8주 복용한 시험군에서 면역인자 중 B cell에 있어 대조군에 비하여 유의한 하락을 확인 할 수 있었다. 시험기간 중 이상반응은 없었고, 그 밖의 안전성 평가항목에서 특별히 임상시험적으로 유의할 만한 결과는 없었다. 이에 본 임상시험 결과는 임상시험용 제품인 더덕(*Codonopsis lanceolata*)추출물의 알러지비염에 대한 과민면역 개선에 대한 안전성과 유효성을 확인 할 수 있었다.

보고서 작성일: 2018.07.30

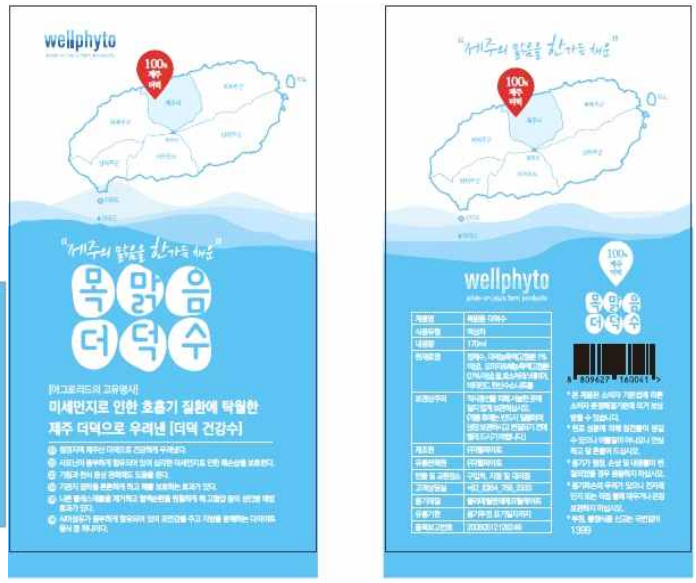
17. 시작품 제작 및 품질관리

가. 브랜드 디자인 및 패키지 디자인 개발

디자인 개발은 더덕 소재 원산지인 제주지역의 청정 이미지를 강조한 컨셉으로 제작하고, 분말형태 및 액상 제형으로 상품화를 추진 계획에 적합한 내용으로 개발함.

그림. 86. 더덕 소재를 이용한 제품의 디자인 시안

<스틱포 제품 디자인>



<스파우트 음료 제품 디자인>

<더덕음료 제품 디자인>

<스틱포 포장Box 디자인>

그림. 87. 더덕 소재를 이용한 분말 및 액상 제형의 최종 디자인

나. 시작품 제작

그림. 88. 더덕 소재를 이용한 분말 및 액상 제형 시제품

다. 제품의 안정성 확보를 통한 유통기한 설정 (공인기관 분석)

(1) 안정성 시험을 위한 가속시험

1) 1차 가속시험

○ 제조 년 · 월 · 일 : 2017. 12. 17

○ 보존조건 : 40℃, 75% RH 이상

○ 가속시험 1차 시험일 : 2018. 01. 18

샘플종류 시험항목	더덕추출물원물	더덕추출물함유제품
지표성분 Lobetyolin(mg/g)	0.13	0.12
대장균	음성	음성
대장균군	음성	음성

2) 2차 가속시험

○ 제조 년 · 월 · 일 : 2017. 12. 13

○ 보존조건 : 40℃, 75% RH 이상

○ 가속시험 1차 시험일 : 2018. 02. 13

샘플종류 시험항목	더덕추출물원물	더덕추출물함유제품
지표성분 Lobetyolin(mg/g)	0.13	0.12
대장균	음성	음성
대장균군	음성	음성

3) 3차 가속시험

○ 제조 년 · 월 · 일 : 2017. 12. 13

○ 보존조건 : 40℃, 75% RH 이상

○ 가속시험 1차 시험일 : 2018. 03. 20

샘플종류 시험항목	더덕추출물원물	더덕추출물함유제품
지표성분 Lobetyolin(mg/g)	0.13	0.13
대장균	음성	음성
대장균군	음성	음성

4) 4차 가속시험

○ 제조 년 · 월 · 일 : 2017. 12. 13

○ 보존조건 : 40℃, 75% RH 이상

○ 가속시험 1차 시험일 : 2018. 04. 18

샘플종류 시험항목	더덕추출물원물	더덕추출물함유제품
지표성분 Lobetyolin(mg/g)	0.12	0.12
대장균	음성	음성
대장균군	음성	음성

5) 5차 가속시험

○ 제조 년 · 월 · 일 : 2017. 12. 13

○ 보존조건 : 40℃, 75% RH 이상

○ 가속시험 1차 시험일 : 2018. 05. 11

샘플종류 시험항목	더덕추출물원물	더덕추출물함유제품
지표성분 Lobetyolin(mg/g)	0.09	0.10
대장균	음성	음성
대장균군	음성	음성

6) 6차 가속시험

○ 제조 년 · 월 · 일 : 2017. 12. 13

○ 보존조건 : 40℃, 75% RH 이상

○ 가속시험 1차 시험일 : 2018. 06. 22

샘플종류 시험항목	더덕추출물원물	더덕추출물함유제품
지표성분 Lobetyolin(mg/g)	0.05	0.10
대장균	음성	음성
대장균군	음성	음성

(2) 안정성 시험을 위한 장기보존 시험 (25℃)

1) 1차 보존시험

○ 제조 년 · 월 · 일 : 2017. 12. 17

○ 보존조건 : 25℃, 60% RH 이상

○ 가속시험 1차 시험일 : 2018. 01. 18

샘플종류 시험항목	더덕추출물원물	더덕추출물함유제품
지표성분 Lobetyolin(mg/g)	0.13	0.11
대장균	음성	음성
대장균군	음성	음성

2) 2차 보존시험

○ 제조 년 · 월 · 일 : 2017. 12. 13

○ 보존조건 : 25℃, 60% RH 이상

○ 가속시험 1차 시험일 : 2018. 02. 13

샘플종류 시험항목	더덕추출물원물	더덕추출물함유제품
지표성분 Lobetyolin(mg/g)	0.13	0.11
대장균	음성	음성
대장균군	음성	음성

3) 3차 가속시험

○ 제조 년 · 월 · 일 : 2017. 12. 13

○ 보존조건 : 25℃, 60% RH 이상

○ 가속시험 1차 시험일 : 2018. 03. 20

샘플종류 시험항목	더덕추출물원물	더덕추출물함유제품
지표성분 Lobetyolin(mg/g)	0.13	0.13
대장균	음성	음성
대장균군	음성	음성

4) 4차 가속시험

○ 제조 년 · 월 · 일 : 2017. 12. 13

○ 보존조건 : 25℃, 60% RH 이상

○ 가속시험 1차 시험일 : 2018. 04. 18

샘플종류 시험항목	더덕추출물원물	더덕추출물함유제품
지표성분 Lobetyolin(mg/g)	0.12	0.12
대장균	음성	음성
대장균군	음성	음성

5) 5차 가속시험

○ 제조 년 · 월 · 일 : 2017. 12. 13

○ 보존조건 : 25℃, 60% RH 이상

○ 가속시험 1차 시험일 : 2018. 05. 11

샘플종류 시험항목	더덕추출물원물	더덕추출물함유제품
지표성분 Lobetyolin(mg/g)	0.10	0.10
대장균	음성	음성
대장균군	음성	음성

6) 6차 가속시험

○ 제조 년 · 월 · 일 : 2017. 12. 13

○ 보존조건 : 25℃, 60% RH 이상

○ 가속시험 1차 시험일 : 2018. 06. 22

샘플종류 시험항목	더덕추출물원물	더덕추출물함유제품
지표성분 Lobetyolin(mg/g)	0.03	0.08
대장균	음성	음성
대장균군	음성	음성

(1) 안정성 시험을 위한 장기보존시험 (35℃)

1) 1차 보존시험

○ 제조 년 · 월 · 일 : 2017. 12. 17

○ 보존조건 : 35℃, 70% RH 이상

○ 가속시험 1차 시험일 : 2018. 01. 18

샘플종류 시험항목	더덕추출물원물	더덕추출물함유제품
지표성분 Lobetyolin(mg/g)	0.13	0.12
대장균	음성	음성
대장균군	음성	음성

2) 2차 보존시험

○ 제조 년 · 월 · 일 : 2017. 12. 13

○ 보존조건 : 35℃, 70% RH 이상

○ 가속시험 1차 시험일 : 2018. 02. 13

샘플종류 시험항목	더덕추출물원물	더덕추출물함유제품
지표성분 Lobetyolin(mg/g)	0.13	0.11
대장균	음성	음성
대장균군	음성	음성

3) 3차 가속시험

○ 제조 년 · 월 · 일 : 2017. 12. 13

○ 보존조건 : 35℃, 70% RH 이상

○ 가속시험 1차 시험일 : 2018. 03. 20

샘플종류 시험항목	더덕추출물원물	더덕추출물함유제품
지표성분 Lobetyolin(mg/g)	0.13	0.13
대장균	음성	음성
대장균군	음성	음성

4) 4차 가속시험

○ 제조 년 · 월 · 일 : 2017. 12. 13

○ 보존조건 : 35℃, 70% RH 이상

○ 가속시험 1차 시험일 : 2018. 04. 18

샘플종류 시험항목	더덕추출물원물	더덕추출물함유제품
지표성분 Lobetyolin(mg/g)	0.12	0.12
대장균	음성	음성
대장균군	음성	음성

5) 5차 가속시험

○ 제조 년 · 월 · 일 : 2017. 12. 13

○ 보존조건 : 35℃, 70% RH 이상

○ 가속시험 1차 시험일 : 2018. 05. 11

샘플종류 시험항목	더덕추출물원물	더덕추출물함유제품
지표성분 Lobetyolin(mg/g)	0.10	0.10
대장균	음성	음성
대장균군	음성	음성

6) 6차 가속시험

○ 제조 년 · 월 · 일 : 2017. 12. 13

○ 보존조건 : 35℃, 70% RH 이상

○ 가속시험 1차 시험일 : 2018. 06. 22

샘플종류 시험항목	더덕추출물원물	더덕추출물함유제품
지표성분 Lobetyolin(mg/g)	0.03	0.12
대장균	음성	음성
대장균군	음성	음성

더덕추출물 원료의 안정성 확보를 위한 장기 및 가속시험을 6개월간 수행한 결과, 더덕추출물 원물에서는 6개월째에 지표성분이 감소하는 경향을 보였으며, 더덕추출물 함유 제품에서는 6개월 보존기간 동안 큰 변화를 보이지 않았다. 따라서 더덕추출물 함유 제품의 유통기한은 1년 6개월로 설정하였다.

18. 더덕 소재를 이용한 산업화 및 마케팅 전략 구축

가. 사업화 계획

(1) 사업화 추진 전략

<사업화 계획 (5개년도)>

(단위: 억원)

구 분		사 업 화 년 도				
년 도		2018년	2019년	2020년	2021년	2022년
사업목표		건강기능식품 개별인정승인 신청	건기식 개별인증 획득	제형별 건강기능식품 1~2종 개발	제형별 건강기능식품 1~2종 개발	제형별 건강기능식품 1~2종 개발
사업화과제		더덕을 이용한 건기식 개발 준비	건기식 개별인증 획득 및 마케팅	더덕을 이용한 건기식 제품 개발	액상 등 건강기능식품 1~2종 개발	제형 다변화를 통한 건강기능식품 1~2종 개발
사업화품목		더덕을 이용한 건강기능식품개발	더덕을 이용한 건강기능식품개발	더덕을 이용한 건강기능식품개발	더덕을 이용한 건강기능식품개발	더덕을 이용한 건강기능식품개발
투자계획	인건비	0.8	1.5	2	3	3
	재료비 및 설비투자비	1	2	2	1	1
	경상운영비	1	1	3	4	4
	계	2.8	4.5	7	8	8
생산계획		-	건강지향식품 1000set	건강기능식품 원료 및 제품 2000 set	건강기능식품 5000set	건강기능식품 10,000set
판매계획	매출 (억원)	-	2	4	7	15
	수출 (만불)	-	0.5	1	3	3
	계	-	2.5	5	10	18

(2) 기존 더덕 관련 제품과의 차별화 및 매출전략

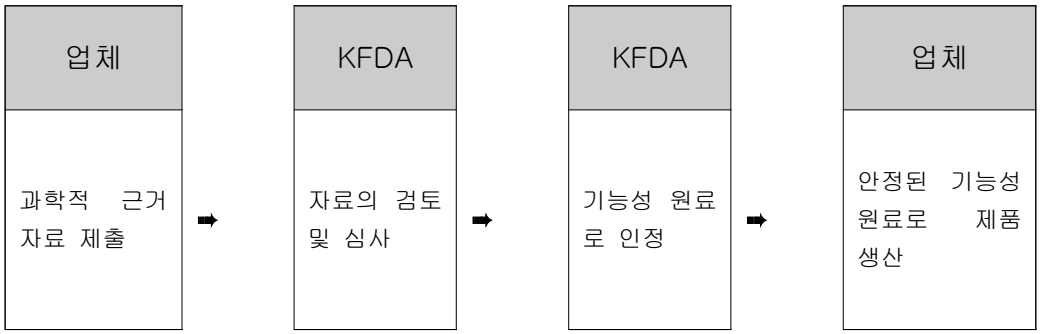
- 더덕 소재는 연구결과 과민성면역 개선 효능이 뛰어나고 원료의 국산화 및 손쉬운 재배가 가능하여 원료 수급율이 좋아 비용절감이 가능
- 국내 더덕 소재의 식품으로서의 이용 현황은 거의 1차적 소비에 그치고 있으며, 효능을 극대화한 고부가가치 제품 개발은 새로운 가치 창출 기대
- 국외의 더덕 관련 제품은 전무하므로 더덕의 기능성을 활용한 제품 개발로 해외수출 기대
- 기존 더덕의 단순 판매비용은 농가기준 kg 3,000원 미만이지만 더덕의 건기식 원료 판매시 kg당 20,000원 이상의 부가가치 창출 예상

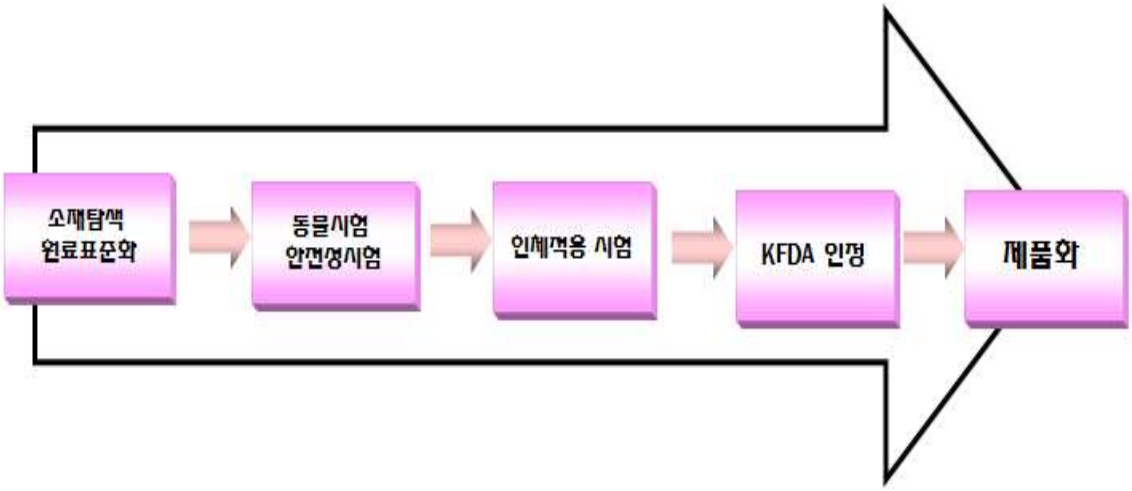
(가) 사업화가능성 SWOT 분석

Strengths (강점)	•100% 더덕 농축액 •임상시험을 통한 기능성 검증 •지적재산권 획득을 통한 신뢰도 •기업의 연구역량 및 유통력	Weaknesses (약점)	•더덕농축액 원가절감 어려움 •창년층, 학생층에 대한 인지도 부족 •과민성면역 개선 제품에 대한 인지도 부족
Opportunities (기회)	•미세먼지의 위협으로부터 목 건강을 지키려는 욕구 증대 •합리적인 가격 •건강에 대한 관심 증가 •건기식 시장의 꾸준한 수요	Threats (위협)	•대기업의 목 건강 관련 제품 출시 러시 •과민성면역개선 대체상품의 등장 •후발주자들과의 치열한 경쟁
SWOT 분석결과			
건강에 대한 관심이 증가하고 건강기능식품 시장에서의 꾸준한 수요가 증가하는 상황에서 안정적인 원료 공급을 바탕으로 한 더덕 100% 농축액을 사용하고, 과학적 데이터를 근거로 한 특허 및 개별인정형 획득을 통한 신뢰도 강화, 기업의 유통력과 연구역량의 강점을 가지고 시장 접근 및 사업화 가능성 강함. 기존 과민성면역 개선 효능 제품에 대해서 주관적인 판단이 많이 적용되기 때문에 과학적 데이터를 근거로 한 더덕에 대한 상품의 등장은 좋은 기회로 적용 가능성이 높음. 동시에 대중들의 인지도 강화 및 대체상품 등장으로 인한 개발경쟁이 치열한 상황에서 기업이 가지고 있는 연구역량과 유통력으로 전략적 마케팅에 대응할 필요가 있음.			

(나) 시장진입을 위한 단계적 전략

- 건강기능식품 제품화 단계





(다) 대학, 연구소, 협력업체, 대기업 등 외부 네트워크 활용 방안

◉ 본 연구개발의 특징 및 장점은 산학연 네트워킹을 이용하여 체계적인 연구장비 활용을 위한 체계를 구축하고 연구 기술개발을 진행함으로써 최단기간, 최저비용, 고효율성을 추구하면서, 건강기능성 식품의 효능을 최대화 할 수 있는 연구를 진행할 수 있다고 봄.

(라) 사업화를 위한 핵심인력 확보 방안

◉ 사업화를 위한 핵심인력은 자체에서 보유하고 있는 석박사 인력과 연구 네트워크를 구축하고 있는 대학, 연구소 등과 유기적인 협조체계를 구축하여 자문을 통해 진행할 예정임.

나. 마케팅 전략

생산, 마케팅 등에 대한 추진전략

◉ 생산계획 (설비 투자 계획 포함)

구분	구분	단위	생산능력	2019년	2010년	2011년	합계
더덕건강지향 식품	제품	kg	500/일	더덕 건강식품 1,500set	더덕 건강식품 2,000set	더덕 건강식품 3,000set	6,500set
더덕건강기능 식품	제품	kg	500/일	더덕 건강식품 1,000set	더덕 건강식품 1,500set	더덕 건강식품 2,000set	4,500set
합계				2,500set	3,500set	5,000set	11,000set

◉ 마케팅 계획

년도	구분	추진계획	비고
2018~	전시회 참가	국내외의 식품전시회 및 식품박람회 참가	
	공급, 유통 채널 확보를 통한 판로개척	관련 부처 기술혁신기관의 해외마케팅 지원사업 등을 활용한 판로확보, 해외 네트워크를 활용한 해외 파트너 확보 등	
	판매전략	개발 제품의 효능을 입증할 수 있는 데이터를 활용한 제품 소개 홍보 브로셔 및 카달로그 제작 홍보	
	On/Off 홍보활동(예시)	언론(지역신문, 전국신문 등) 홍보, 민간단위 소매 판매처 네트워크 활용, off line 홍보. sns (페이스북, 트위터, UCC 등), 네이버, 다음, 암웨이 등 On-Line 홍보방안	

19. 더덕의 건강식품 품목제조 신고

더덕추출농축액을 함유한 액상의 기능성 음료를 제조하여 '목맑음더덕수'라는 제품명으로 품목제조신고를 하였다.

발급번호 : 1Q4P-7JTP-VD31-XWC3-L1EQ

식품(식품첨가물) 품목제조보고서

보고인	성명(법인명) 이기선	생년월일(법인번호) 1969년 01월 24일	
	주소 전라남도 나주시 이슬촌길 87(,31-3,31-42)	전화번호	061 3359630
		휴대전화	011 6203002

영업소	명칭(상호) 좋은영농조합법인	영업등록번호 20060512128
	소재지 전라남도 나주시 이슬촌길 87(,31-3,31-42)	

제품정보	식품의 유형	액상차	요청하는 품목제조 보고번호	20060512128249
	제품명	목맑음더덕수		
	유통기한	제조일로부터 12개월까지		
	품질유지기한			
	원재료 또는 성분명, 배합비율	뒷장에 기재		
	용도 용법	뒷장에 기재		
	보관방법 및 포장재질	뒷장에 기재		
	포장방법 및 포장단위	o 포장방법 : 밀봉포장밀봉포장 o 포장단위 : 100, 450, 500 mL		
	성상	액체식품(가열, 살균제품)		
	품목의 특성 ■ 고열량 · 저영양 식품 해당 여부 [ ]예 [ ]아니오 [○]해당 없음 ■ 할랄인증 식품 해당 여부 [ ]예 [○]아니오			
기타				

「식품위생법」 제37조제5항 및 같은 법 시행규칙 제45조제1항에 따라 식품(식품첨가물) 품목제조 사항을 보고합니다.

2018년 09월 14일

보고인 이기선

전라남도 나주시장 귀하

품목보고번호	20060512128-249				
처리부서	보건소 보건위생과	처리자성명	나광철	처리일자	2018년 09월 14일

본 증명서는 인터넷으로 발급되었으며 식품안전정보포털(http://www.foodsafetykorea.go.kr/) 홈페이지에서 확인할 수 있습니다.

국제공동연구 : 일본이화학연구소

「ツルニンジン由来血圧降下効能物質の特性究明」報告書
(더덕유래 혈압강하 효능물질의 특성 구명)

1. 概要 (개요)

我々は、キキョウ科のつる性多年草であるツルニンジンを材料に、新たな効能を発揮する物質を探索する中で、特にペプチドなどで報告の多いアンジオテンシン変換酵素（ACE）阻害を指標に血圧降下物質に着目して研究を5年間進めてきた。初年度ツルニンジンの熱水抽出物には、ACE阻害活性が見られることを発見し、これを2年目、3年目で固相抽出とHPLCで精製し、4年目でNMRと質量分析によりその活性物質を、Tangshenoside Iと同定した。

今後、合成や生成物の生体での作用の確認が待たれる

[번역]

본 연구진은 초롱꽃과의 덩굴성 다년초인 더덕을 재료로 새로운 효능을 발휘하는 물질을 탐색하는 과정에서, 특히 펩타이드 등으로 보고가 많은 안지오텐신 전환효소 (ACE) 저해를 지표로 한 혈압강하물질에 착안하여 연구를 4년간 진행해왔다. 1년차에는 더덕 열수 추출물에서 ACE 저해활성을 보이는 것을 발견하고 이를 2년차 3년차에 고상 추출하여 HPLC로 정제하여 4년차에는 NMR과 질량분석에 의해 그 활성물질을 Tangshenoside I로 동정했다.

향후 합성물과 생성물에서 생체에서의 작용에 대한 확인이 필요하다고 본다.

2. 序論 (서론)

ツルニンジンはキキョウ科のつる性多年草で、東南アジア一帯の森林に生育する。多くのサポニンを含み、滋養強壮、胃腸整腸、制癌作用、去痰、解毒などの効能があるとされている。韓国では、山菜として根、若芽を食用にする。高麗人参と同じような効能があるといわれ、薬用にもされる。漢方ではツルニンジン属の他種を含め党参（トウジン）と呼ぶ。本グループではこのツルニンジン抽出液から、生理活性の高い成分を同定するため、アンジオテンシン変換酵素（ACE）阻害活性を指標に血圧降下作用成分の探索を目的に研究を行った。

アンジオテンシン変換酵素は、アンギオテンシンIを昇圧作用のあるアンギオテンシンIIに転換するペプチダーゼで、同時に降圧効果のあるブラジキニンなどのキニン類を分解する。これらの作用により血圧上昇を引き起こすため、ACE阻害は血圧降圧剤のメインのターゲットである。ACE阻害を起こす生理活性ペプチドは、ヘビ毒にあることが知られており、既にこのペプチドをモデルとした経口高血圧治療薬カプトプリル（Captopril）が利用されている（文献1,2,3）。食品化学からのアプローチとして種々の食品に含まれるタンパク質のプロテアーゼ消化物からACE阻害ペプチドの探索が広く行われている。このように、AEC阻害は、ペプチドで良く見つかっているため、我々の生体分子の解析技術を用いることで新たな血圧降下作用のある物質が見つかる可能性が高いと考えられた。

[번역]

더덕은 초롱꽃과의 덩굴성 다년초로, 동남아시아 일대의 산림에 자생한다. 많은 사포닌

을 포함, 자양강장, 위장정장, 제암작용, 거담, 해독 등의 효능이 있다고 알려져 있다. 한국에서는 산채로 뿌리, 새싹을 식용으로 한다. 고려인삼과 동등의 효능이 있다고 알려져 있어서 약용으로도 사용된다. 한방에서는 더덕 속의 다른 종을 포함하여 당삼(唐人)이라고 부른다. 본 연구진은 이러한 더덕 추출액에서 생리활성이 높은 성분을 동정하기 위해 안지오텐신 전환효소 (ACE) 저해활성을 지표로 하여 혈압강하작용 성분의 탐색을 목적으로 연구를 수행하였다.

안지오텐신 전환효소는 안지오텐신 I을 승압작용을 하는 안지오텐신 II로 전환하는 펩티다제이며, 동시에 강압효과가 있는 프라지키닌 등의 키닌류를 분해한다. 이러한 작용에 의해 혈압상승을 초래하므로 ACE 저해는 혈압강압제의 주요 대상이다. ACE 저해를 일으키는 생리활성 펩타이드는 뱀 독에 있는 것으로 알려져 있으며, 이미 이 펩티드를 모델로 한 경구 고혈압 치료제 Captopril 가 이용되고 있다 (문헌 1,2,3). 식품화학에서의 접근으로 다양한 식품에 함유된 단백질의 프로테아제 소화 물질에서 ACE 저해 펩타이드의 탐색이 널리 이루어지고 있다. 이와 같이, AEC 저해는 펩타이드에서 잘 발견되기 때문에 본 연구진의 생체분자의 분석기술을 이용하여 새로운 혈압강하작용이 있는 물질이 발견될 가능성이 높다고 생각했다.

3. 方法（방법）

3.1材料

ツルニンジンは、韓国の研究代表者より譲渡された。

アンジオテンシン変換酵素阻害物質は（株）同仁化学研究所製造の「ACE Kit-WST」試薬を利用、その他の試薬は試薬特級、溶媒はHPLCグレードのものを利用した。水は、Milli-Q Referenceで作成したMilliQ水を利用した。

吸光度はキアゲン製のQIAxpertを使用した。固相抽出カラムは、ジーエルサイエンス社製 InertSep C18-B及び固相抽出カラムMonoSpin NH2を、HPLCのカラムもジーエルサイエンス社製Inertsil ODS3（内径4.6mm、長さ150mm）を用いた。高速液体クロマトグラフはAgilent 1260 Infinity バイナリ LC システムを利用した。NMRは日本電子製ECA600 NMR、液体クロマトグラフ質量分析装置は、Thermo Scientific社製EASY-nLC 1000 Liquid Chromatographより導入された試料を純正のnLC-イオン源の付いたQ Exactive™ Hybrid Quadrupole-Orbitrap™ Mass Spectrometerを利用した。

3.2 抽出法

抽出法の手順を下記に示す。

①純水100mLを沸騰させ、その中にツルニンジン粉末を1g入れる。

②1分間加熱し、自然冷却させる。

③抽出した溶液を遠心機（8000rpm、10分）にかけ、上澄み液を回収する。（この上澄み液を「原液」と呼ぶことにする。）

3.3 ACE阻害活性測定方法

アンジオテンシン変換酵素阻害物質は（株）同仁化学研究所製造の「ACE Kit-WST」試薬を用いて発色させ、（株）キアゲン製のQIAxpertを用いて450nmの吸光度を測定することよって定量化した。なお、酵素（Enzyme Working Solution）を入れてから保温器に入れるまでと、保温器から出して指示薬（Indicator Working Solution）を入れるまで、試料は氷で冷却している。また、保温条件は37℃、60分間で行った。

測定手順を下記に示す。

①試料溶液を純水で希釈する。この時、希釈前の試料濃度を1とする。

例）希釈率：1（希釈無し）、1/2、1/3、$(1/3)^2$、$(1/3)^3$、$(1/3)^4$

②全てのチューブに緩衝液（Substrate buffer）を1μLずつ入れる。

③各チューブに①で希釈した試料溶液を1μLずつ加える。

④全発色試料用チューブ（blank 1：阻害物質なし）に純水を1μL加える。

⑤無発色試料用チューブ（blank 2：変換酵素なし）に純水を2μL加え、氷で冷却する。

⑥試料溶液が入った各チューブ及び全発色試料用チューブに酵素（Enzyme Working Solution）を1μLずつ加え、氷で冷却する。

⑦全てのチューブを保温器に入れる。保温条件は37℃、60分間で行う。

⑧全てのチューブを保温器から取り出し、氷で冷却する。

⑨全てのチューブに指示薬（Indicator Working Solution）を10μL加え、室温で10分以上待つ。

⑩450nmの吸光度測定を行う。

⑪下記の式から阻害率を計算する。

$$\text{저해율} = \frac{[\text{blank1의 흡광도값}] - [\text{시료의 흡광도값}]}{[\text{blank1의 흡광도값}] - [\text{blank2의 흡광도값}]}$$

⑫①で希釈した試料濃度に対する阻害率をグラフにプロットし、阻害曲線を描かせる。

⑬⑫の阻害曲線から阻害率50%（IC50%）に相当する試料濃度を求める。即ち、阻害率50%とは発色を50%阻害する時の試料溶液（阻害物質）の活性を示す濃度となる。

⑭一般的に50%阻害する試料溶液濃度を1Unitとすると、下記の式よりUnit（U）を算出することができる。

$$\text{전 Unit (U)} = \frac{\text{전용량}(\mu L)}{\text{저해율 } 50\%}$$

阻害率50%　　：上記⑬で求めた値

但し、今回の実験に於いて、濃縮や希釈（ここでの希釈とは阻害曲線を描かせるための希釈と異なる。）等を行っているので、濃縮無しでの全Unitは下記の通りになる。

$$\text{전 Unit (U)} = \frac{\text{전용량}(\mu L) \times \text{농축희석비율}}{\text{저해율 } 50\% \quad \text{반응시 용량}(\mu L)}$$

反応時容量（3）　：試料溶液、試薬の緩衝液（Substrate buffer）及び酵素（Enzyme Working Solution）各1μL

濃縮希釈割合（1.5）：真空乾燥による濃縮（2倍）、反応時の試薬による希釈（3倍）、

[번역]

3.1 재료

더덕은 한국의 주관기관으로부터 양도되었다.

안지오텐신 전환효소 저해물질은 (주)동인화학연구소 제조의 「ACE Kit-WST」시약을 이용, 기타 시약은 특급 시약, 용매는 HPLC 등급의 것을 이용했다. 물은 MilliQ Reference에서 만든 MilliQ 물을 이용했다.

흡광도는 키아젠 제품의 QIAxpert을 사용했다. 고상추출 컬럼은 지엘사이언스사 제품

InertSep C18-B 및 고상추출 컬럼 MonoSpin NH2를 HPLC 컬럼도 지엘사이언스사 제품 Inertsil ODS3 (내경 4.6mm, 길이 150mm)를 사용하였다. 고속액체크로마토그래프는 Agilent 1260 Infinity 바이널 LC 시스템을 이용했다. NMR은 일본전자 제품 ECA600 NMR 액체크로마토그래프 질량분석 장치는 Thermo Scientific 사의 EASY-nLC 1000 Liquid Chromatograph에서 도입된 시료를 정품 nLC- 이온源이 부착된 Q Exactive ™ Hybrid Quadrupole-Orbitrap ™ Mass Spectrometer를 이용했다.

3.2 추출법

추출 순서는 다음과 같다.

① 증류수 100mL를 끓인 후, 그 안에 더덕 분말 1g을 넣는다.

② 1분간 가열한 다음 자연 냉각시킨다.

③ 추출한 용액을 원심분리기(8000rpm, 10분)에서 원심분리하여 상등액을 회수한다 (이러한 상등액을 원액으로 함).

3.3 ACE저해활성 측정방법

안지오텐신변환효소 저해물질은 ㈜동인화학연구소에서 제조한 「ACE Kit-WST」시약을 사용하여 발색시켰으며(그림1), 또한 ㈜키아겐 제조의 QIAxpert를 이용하여 450nm에서 흡광도를 측정하여 정량화하였다. 또한 효소(Enzyme Working Solution)를 넣은 후 보온기에 넣을 때까지 그리고 보온기로부터 꺼내어 지시약(Indicator Working Solution)을 넣을 때까지 모든 시료는 얼음으로 냉각하여 수행한다. 또한 보온조건은 37℃, 60분간 행한다.

측정순서는 아래와 같다.

① 시료용액을 증류수로 희석한다. 이 때 희석 전 시료농도를 1로 한다.
예) 희석율 : 1 (희석 안함), 1/2, 1/3, (1/3)2, (1/3)3, (1/3)4

② 모든 튜브에 완충용액 (Substrate buffer) 을1㎕씩 넣는다.

③ 각 well에 ①에서 희석한 시료용액을1㎕씩 첨가한다.

④ 전발색시료용 튜브 (blank 1 : 저해물질 없음) 에 증류수1㎕첨가한다.

⑤ 무발색시료용 튜브 (blank 2 : 변환효소 없음) 에 증류수2㎕첨가하고, 얼음으로 냉각한다.

⑥ 시료용액을 넣은 각 튜브 및 전발색시료용튜브에 효소 (Enzyme Working Solution) 를 1㎕씩 첨가하여 얼음으로 냉각한다.

⑦ 모든 튜브를 보온가애 넣는다. 보온조건은37℃ `60분간 행한다.

⑧ 모든 튜브를 보온기로부터 꺼내어 얼음으로 냉각한다.

⑨ 모든 튜브에 지시약 (Indicator Working Solution) 을10㎕첨가하고, 상온에서 10분 이상 놓아둔다.

⑩ 450nm에서 흡광도를 측정한다.

⑪ 아래의 수식을 이용하여 저해율을 계산한다.

$$\text{저해율} = \frac{[\text{blank1의 흡광도값}] - [\text{시료의 흡광도값}]}{[\text{blank1의 흡광도값}] - [\text{blank2의 흡광도값}]}$$

⑫ ①에서 희석한 시료농도에 대한 저해율을 그래프에 저해곡선으로 나타냈다.

⑬ ⑫의 저해곡선으로부터 저해율50% (IC50%) 에 상당하는 시료농도를 구한다. 즉, 저

해율 50%는 발색을 50% 저해할 때의 시료용액(저해물질)의 활성을 나타내는 농도를 의미한다.

⑭ 일반적으로 50% 저해하는 시료용액 농도를 1Unit로 하면, 아래의 식으로 Unit (U)를 산출할 수 있다.

$$\text{전 Unit (U)} = \frac{\text{전용량}(\mu L)}{\text{저해율 } 50\%}$$

저해율50% : 상기⑬에서 구한 값

단지, 본 실험에서는 농축과 희석(여기에서 희석은 저해곡선을 나타내기 위한 희석과는 다름) 등을 행하기 때문에 농축하지 않은 전Unit은 아래와 같다.

$$\text{전 Unit (U)} = \frac{\text{전용량}(\mu L) \times \text{농축희석비율}}{\text{저해율 } 50\% \quad \text{반응시 용량}(\mu L)}$$

반응시 용량 (3) : 시료용액, 시약의 완충액 (Substrate buffer) 및 효소 (Enzyme Working Solution) 각1μL

농축희석비율(1.5) : 진공건조에 의한 농축 (2배), 반응시 시약에 의한 희석 (3배)

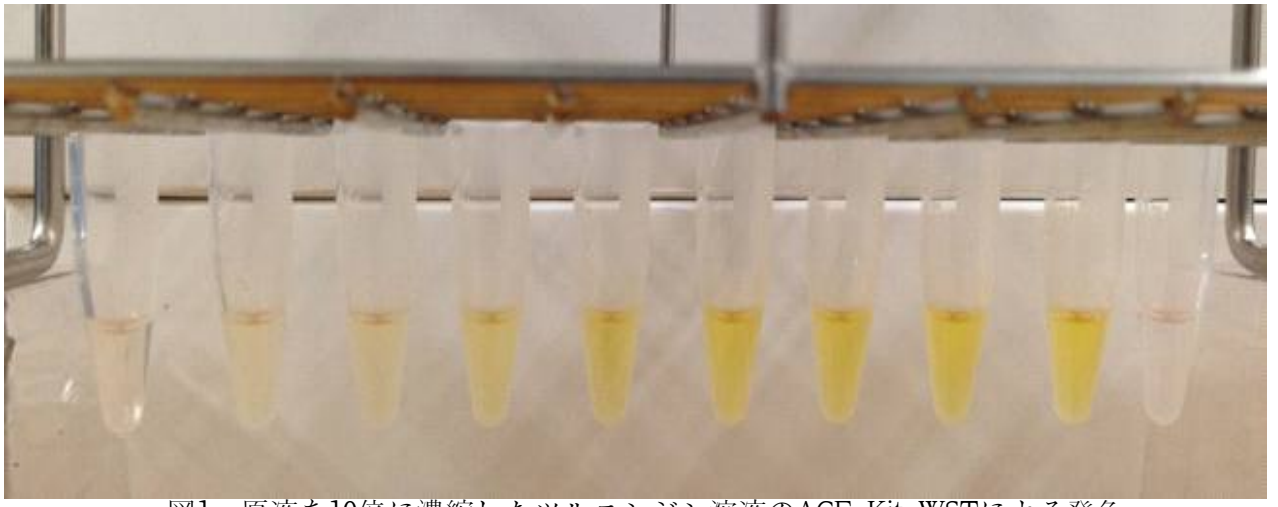


図1. 原液を10倍に濃縮したツルニンジン溶液のACE Kit-WSTによる発色

左から溶液濃度を1, 1/2, 1/3, $(1/3)^2$, $(1/3)^3$, $(1/3)^4$, $(1/3)^5$, $(1/3)^6$に希釈したものである。右の2つは阻害物質なし試料（全発色）と変換酵素なし試料（無発色）のものである。

（그림 1. 원액을 10배로 농축한 더덕용액의 ACE Kit－WST 에 의한 발색
좌로부터 용액농도를 1, 1/2, 1/3, $(1/3)^2$, $(1/3)^3$, $(1/3)^4$, $(1/3)^5$, $(1/3)^6$ 비율로 희석한 것.
우측 2개 샘플은 저해물질 없는 시료(전발색)와 변환효소 없는 시료 (무발색)를 나타냄）

3.4 固相抽出法

固相抽出カラムはジーエルサイエンス（株）製造のInertSep C18-BとMonoSpin NH2を使用した。方法はメーカのインストラクションに従った。

3.5 液体クロマトグラフィー

_Agilent 1260 Infinity バイナリ LC システムにジーエルサイエンス社製Inertsil ODS3（内径4.6mm 、長さ150mm）を付け、A溶媒に0.09％トリフルオロ酢酸（TFA）/MilliQ、B溶媒に80％アセトニトリル（AN）、0.075％TFA/MilliQを用いて、0.2ml/minの流速で0-80％B/64minのグラジエントで溶出した。

3.6 NMR

NMRは理化学研究所CSRS物質構造解析ユニットの越野博士に測定を依頼した。日本電子製ECA600 NMRを用いて、一次元^{1}H-NMR及び2次元TOCSYを測定し既存の報告と比較した（文献4,5,6）。

3.7 質量分析

MALDI-TOF MSは、Bruker 社製rapifleX MALDI Tissuetyperを用いHPLC精製試料を2,5-dihydroxybenzoic acid（DHB）と混合し、Positive, Negativeの量モードで測定した。LC-MS/MSでは、Thermo Scientific社製EASY-nLC 1000 Liquid Chromatographを用い日京テクノス製キャピラリーカラム(0.075 × 100 mm, NTCC-360/75-3-10, Nikkyo Technos Co., Ltd.)にて、0.1％ギ酸/100％アセトニトリルグラジエントにより分離した試料を純正のnLC-イオン源の付いたQ Exactive™ Hybrid Quadrupole-Orbitrap™ Mass Spectrometerを用いてTOP10Methodで分析した（文献7）。

[번역]

3.4 고상 추출법

고상추출 컬럼은 지엘사이언스(주) 제조 InertSep C18-B와 MonoSpin NH2를 사용했다. 방법은 제조업체의 지침에 따랐다.

3.5 액체 크로마토 그래피

Agilent 1260 Infinity 바이널 LC 시스템에 지엘사이언스사 제품 Inertsil ODS3 (내경 4.6mm, 길이 150mm)을 부착하고, A 용매에 0.09% 트리플루오로 아세트산 (TFA) / MilliQ, B 용매에 80% 아세토니트릴 (AN), 0.075% TFA / MilliQ를 사용하여 0.2ml / min의 유속으로 0-80% B / 64min의 글레디언트로 용출했다.

3.6 NMR

NMR은 이화학연구소 CSRS 물질구조분석유닛팀 코시노박사에게 측정을 의뢰했다. 일본 전자 제품 ECA600 NMR을 이용하여 한 차원 1H-NMR 및 2 차원 TOCSY 측정 기존의보고와 비교했다 (문헌 4,5,6).

3.7 질량 분석

MALDI-TOF MS는 Bruker사 제품의 rapifleX MALDI Tissuetyper을 이용하여 HPLC 정제 시료를 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB)와 혼합하여 Positive, Negative 양 모드에서 측정했다. LC-MS/MS에서는 Thermo Scientific 사의 EASY-nLC 1000 Liquid Chromatograph를

이용 日京테크노스사 제품의 모세관컬럼 (0.075 × 100 mm, NTCC-360 / 75-3-10, Nikkyo Technos Co., Ltd.)에서 0.1 % 포름산 / 100 % 아세토니트릴 글레디언트에 의해 분리된 시료를 정품 nLC- 이온源이 부착된 Q Exactive TM Hybrid Quadrupole-Orbitrap TM Mass Spectrometer를 이용하여 TOP10Method으로 분석했다 (문헌 7).

4 結果 (결과)

4.1. 抽出物のACE阻害活性 (추출물의 ACE 저해활성)

4.1.1試料作製

原液200μLを真空乾燥させ、それに純水100μL加えて、2倍濃縮の試料を作製した。

4.12測定結果

測定結果を図2に示す。阻害曲線よりツルニンジンには阻害物質が存在することが分かり、原液を2倍に濃縮した溶液に対して阻害率50%は0.5270となった。

[번역]

4.1.1 시료조제

원액 200μL를 진공건조시킨 후 증류수 100μL 첨가하여 2배 농축의 시료를 조제한다.

4.1.2. 측정결과

측정결과를 그림2에 나타냈다. 저해곡선으로부터 더덕에는 저해물질이 존재한다는 것을 알 수 있으며 원액을 2배로 농축한 용액에 대해 저해율 50% 는 0.5270 였다.

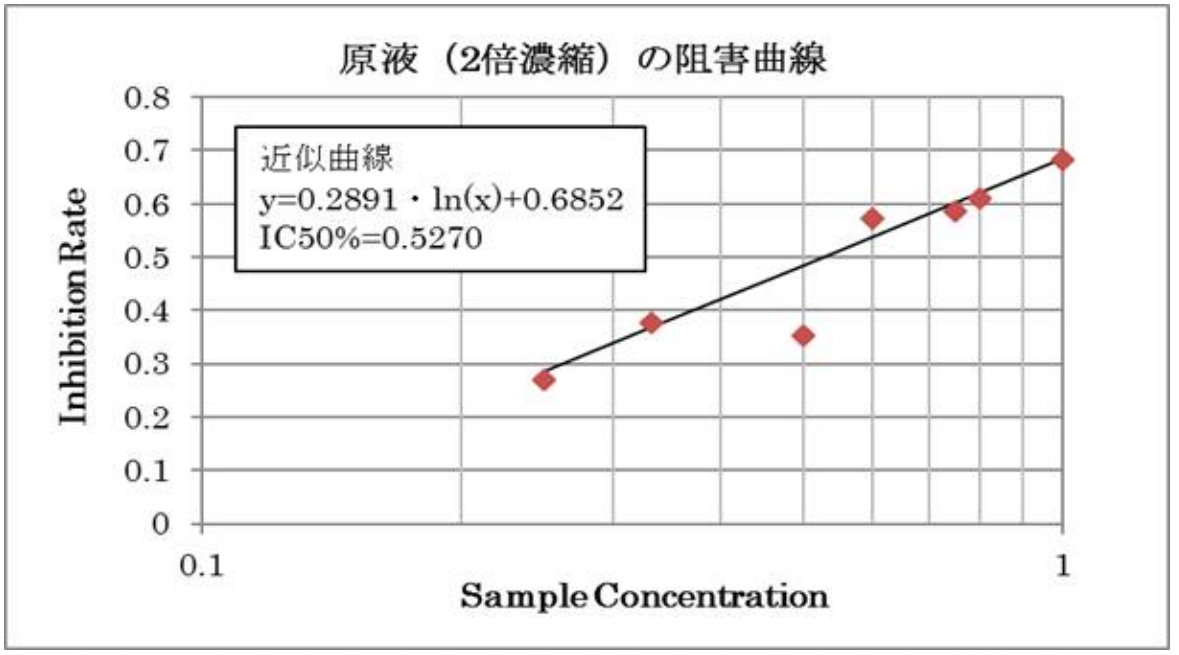


図2．原液を2倍に濃縮した溶液の阻害曲線

（그림2. 원액을 2배로 농축한 용액의 저해곡선）

4.2 InertSep C18-Bによる固相抽出と活性の回収

(InertSep C18-B에 의한 고상추출과 활성의 회수)

4.2.1 試料作製 (시료제작)

固相抽出カラムとしてジーエルサイエンス（株）のInertSep　C18-B（10g/60mL）の大型カラムを用いて、下記の手順で濾過液、洗浄液及び溶出液を作製し、その後、各溶液を真空乾燥させ、それに純水を加えて、試料を作製した。この時、阻害率50%が測定できるように溶液の濃縮を行った。

[번역]
고상추출 컬럼은 지엘사이언스(주)의 InertSep C18-B (10g / 60mL)의 대형 컬럼을 사용하여 아래에 기술한 순서로 여과액, 세정액 및 용출액을 제조한 다음, 각 용액을 진공건조한 후 증류수를 첨가하여 시료를 제작하였다. 이 때, 저해율 50 %가 측정할 수 있도록 용액을 농축하였다.

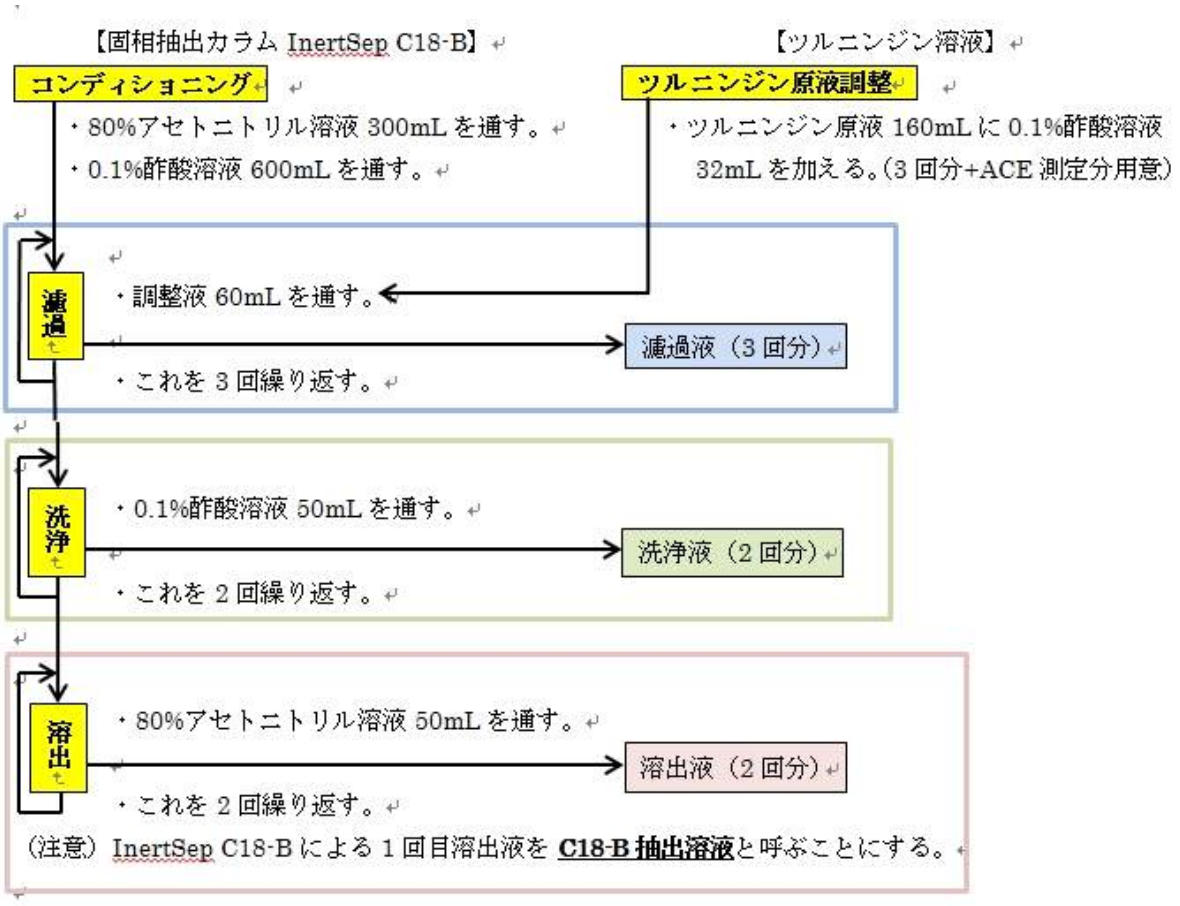


図 1．InertSep C18-B による抽出の手順

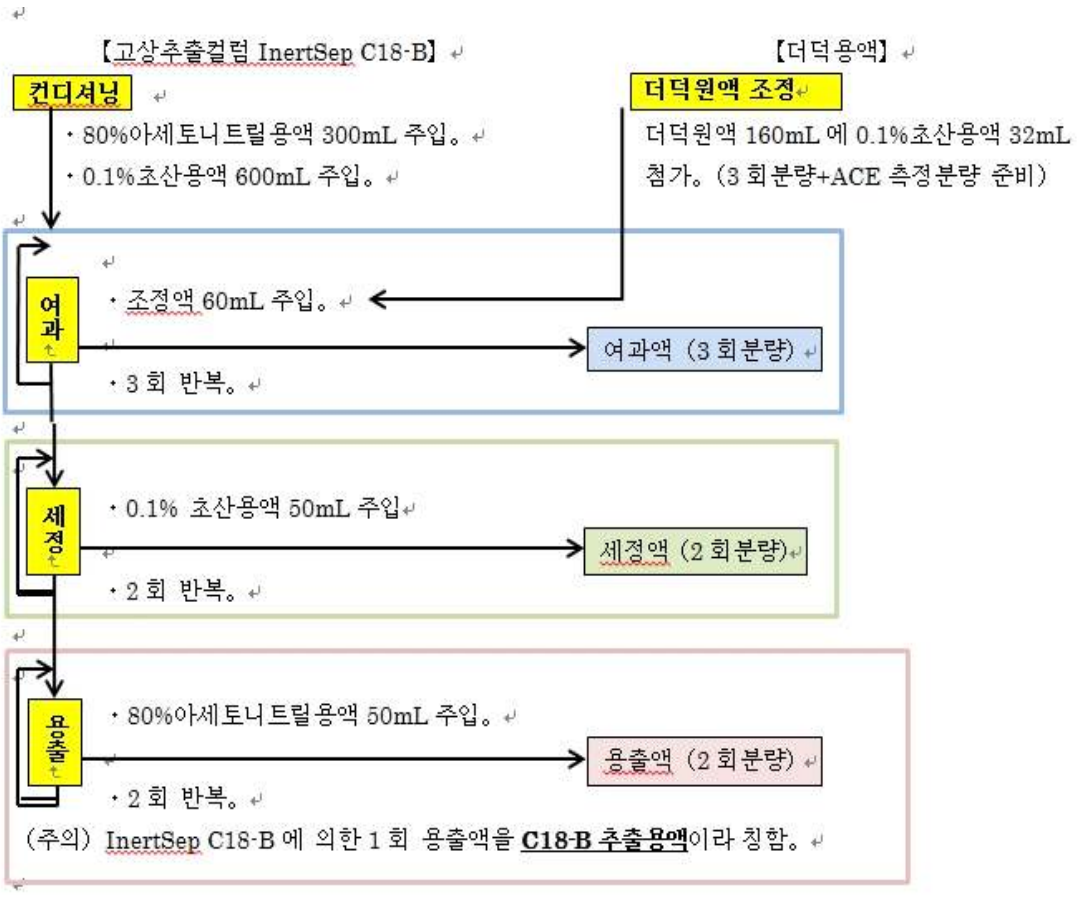


그림 1. InertSep C18-B 에 의한 추출 순서

4.2.2 測定結果 (측정결과)

固相抽出中のカラムの変化を**図3**に示す。濾過の回数が増えるにつれて、カラムフィルタの左側に茶色い線が現れた。この線は洗浄ではほとんど消えなかったが、溶出を行うことによって、色が非常に薄くなった。

各溶液については下記の通り、濃縮を行い、「ACE Kit-WST」試薬を用いて測定を行なった。

原液、調整液及び1回目溶出液の溶液：2倍に濃縮

1回目濾過液、2回目濾過液、3回目濾過液の溶液：3倍に濃縮

1回目洗浄液、2回目洗浄液、1回目溶出液の溶液：10倍に濃縮

各溶液の阻害曲線を図4 に、表１に各溶液の阻害率50%のUnit（U）値を示し、以下のことが分かった。

『原液及び調整液に対して』

· 原液と調整液のユニット量は大まかに一致した。

『濾過液に対して』

· 2回目及び3回目はほぼ同程度の阻害率を示した。

· 1回目は2回目及び3回目と比べるとやや低い阻害率を示したが、1回当たりの調整液のユニット量は約110000Uであることから、半分以上流出したことになる。

· 大半の阻害物質が1回目の濾過で吸着されることが想像される。

『洗浄液に対して』

· 1回目のユニット量が1回当たりの調整液のものの10%程度あることから、阻害物質がやや流出したと考えられる。

· 2回目のユニット量は非常に小さい値であることから、吸着が不安定な阻害物質は1回目で流出しているため、2回目では殆ど流出しなくなったと考えられる。

『溶出液に対して』

· 1回目のユニット量は1回当たりの調整液のものの75%程度であった。

· 2回目のユニット量が非常に小さい値であることから、1回目で阻害物質の殆どが溶出したと考えられる。

『調整液と抽出液の合計に対して』

· 調整液に対して抽出した溶液の合計のユニット量はやや大きな値を示した。理由としては測定時のバラツキが起因しているのではないかと思われるが、詳細は不明である。

[번역]

고상추출 과정에서의 변화를 그림 3에 나타냈다. 여과 횟수가 증가할수록 컬럼필터 좌측에 갈색 선이 나타났다. 이 선은 세척으로는 거의 제거되지 않았지만, 용출을 행함으로서 색이 현저히 옅어졌다.

각 용출액에 대해서는 아래와 같이 농축을 행하고, 「ACE Kit-WST」시약을 이용하여 측정하였다.

원액, 조정액, 여과액 및 1차 용출액의 용액 : 2 배로 농축

1차 여과액, 2차 여과액, 3차 여과액의 용액 : 3 배로 농축

1차 세척액, 2차 세척액, 1차 용출액의 용액 : 10 배로 농축

각 용액의 저해곡선을 그림 4에 그리고 각 용액의 저해율 50 %의 Unit (U) 값을 표 1에 나타냈으며, 다음과 같은 사실을 확인할 수 있었다.

『원액 및 조정액에 대하여』

· 원액과 조정액의 Unit량은 대체적으로 일치했다.

『여과액에 대하여』

· 2 회째는 3 회째와 거의 동등한 정도의 저해율을 보였다.

· 1 회째는 2 회째 및 3 회째와 비교하면 저해율이 다소 낮게 나타났지만, 1 회당 조정액의 Unit량은 약 110000U 이기 때문에 절반 이상 유출된 것으로 보여진다.

· 대부분의 저해물질이 1 회째 여과에서 흡착되는 것으로 추측되었다.

『세정액에 대하여』

· 1 회째의 Unit량이 1 회당 조정액의 10 % 정도 있는 것으로부터, 저해물질이 약간 유출된 것으로 생각된다.

· 2 회째의 Unit량은 매우 작은 값이기 때문에, 흡착이 불안정한 저해물질은 1 회째에 유출되기 때문에 두 번째는 대부분 유출하지 않는 것으로 생각된다.

『용출액에 대하여』

· 1 회째의 Unit량은 1 회당 조정액의 75 % 정도였다.

· 2 회째의 Unit량이 매우 작은 값이기 때문에, 1 회째에 저해물질의 대부분이 용출된 것으로 생각된다.

『조정액과 추출액 통합한 량』

· 조정액에 추출한 용액을 합한 총 Unit량은 다소 많은 량을 나타내었다. 이유는 측정시 오차가 발생한 것이 아닐까 추측되지만, 자세한 것은 불분명하다.

抽出前(추출전)

コンディショニング後(컨디셔닝후)

1 回目濾過後(1 회차 여과후)

2 回目濾過後(2 회차 여과후)

3 回目濾過後(3 회차 여과후)

1 回目洗浄後(1 회차 세척후)

2 回目洗浄後(2 회차 세척후)

1 回目溶出後(1 회차 용출후)

2 回目溶出後(2 회차 용출후)

図3. 固相抽出時のカラムの変化 (그림 3. 고상추출 시의 컬럼의 변화)

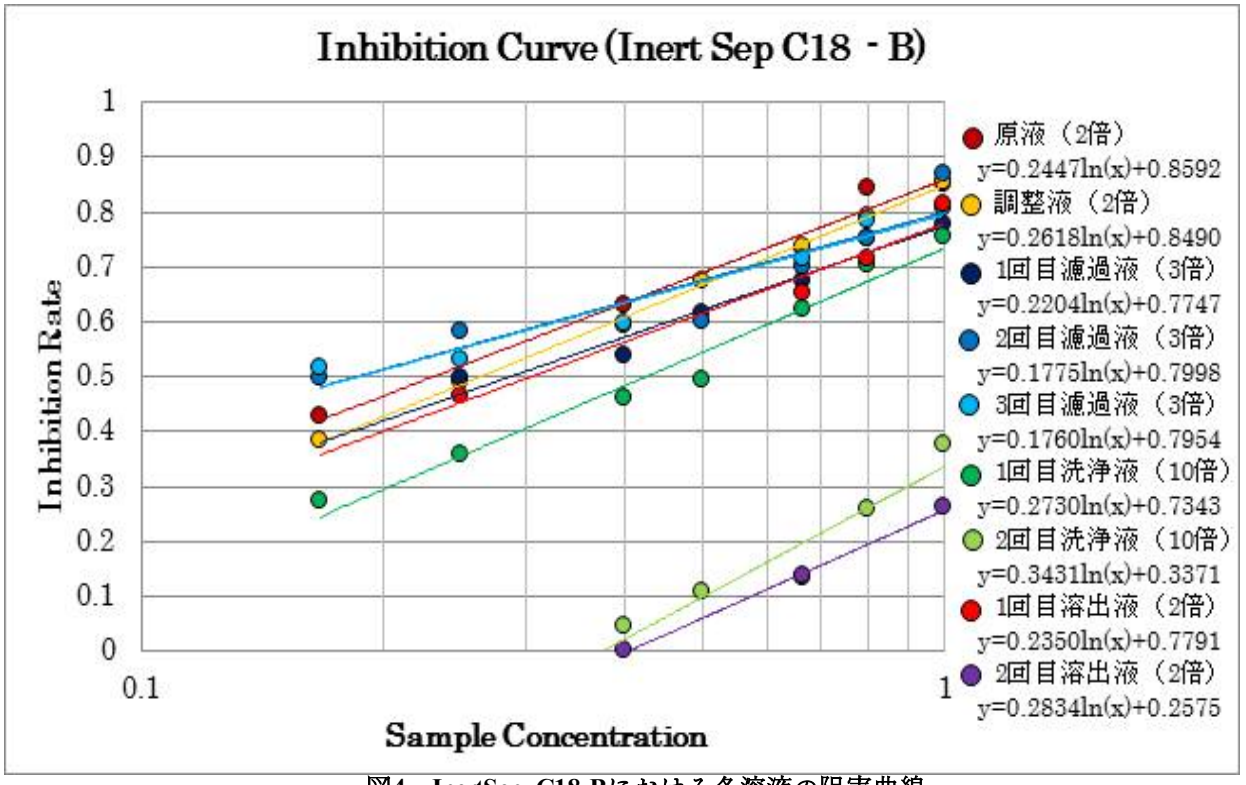


図4. InertSep C18-Bにおける各溶液の阻害曲線

(그림 4. InertSep C18-B에 의한 각 용액의 저해곡선)

表１. InertSep C18-Bにおける各溶液の阻害率50%のUnit（U）算出

(표 1. InertSep C18-B에 의한 각 용액의 저해율 50%의 유닛(U) 산출)

溶液		容量（μL）	阻害率50%	濃縮割合	ユニット（U）
原液		150000	0.2304	2	325515
調整液		180000	0.2637	2	341343
抽出液合計		—	—	—	383992
内訳	1回目濾過液	60000	0.2875	3	69554
	2回目濾過液	60000	0.1847	3	108283
	3回目濾過液	60000	0.1867	3	107141
	1回目洗浄液	50000	0.4239	10	11795
	2回目洗浄液	50000	1.6077	10	3110
	1回目溶出液	50000	0.3049	2	81984
	2回目溶出液	50000	2.3530	10	2167

4.3. MonoSpin NH2による固相抽出と活性の回収
(MonoSpin NH2에 의한 고상추출과 활서의 회수)

4.3.1 その他の固相抽出測定

前処理としてInertSep　C18-Bによる固相抽出で得られた1回目溶出液を更に精製するためにジーエルサイエンス（株）製造のMonoSpin Trial Kit 3（1000μL）を用いて、遠心機による抽出を試みた。この Trial Kit 3にはSCX（ベンゼンスルホン酸基結合型シリカモノリスを固定した固相抽出スピンカラム）、SAX（トリメチルアミノプロピル基結合型シリカモノリスを固定した固相抽出スピンカラム）、CBA（カルボキシル基結合型シリカモノリスを固定した固相抽出スピンカラム）、NH2（アミノプロピル基結合型シリカモノリスを固定した固相抽出スピンカラム）の4種類のカラムがある。

「6．補足資料」の通り、カラムを検討した結果、NH2が他のカラムに比べて多くの阻害物質の吸着及び溶出が見られたので、このカラムを使用して測定を行った。

4.3.2 試料作製

固相抽出スピンカラムとしてジーエルサイエンス（株）のMonoSpin　NH2（1000μL）を用いて、下記の手順で濾過液、洗浄液及び溶出液を作製し、その後、各溶液を真空乾燥させ、それに純水を加えて、試料を作製した。この時、阻害率50%が測定できるように溶液の濃縮を行った。

また、遠心分離機として（株）トミー精工の微量高速遠心機（MC-150）を使用した。

[번역]

4.3.1 기타 고상 측정

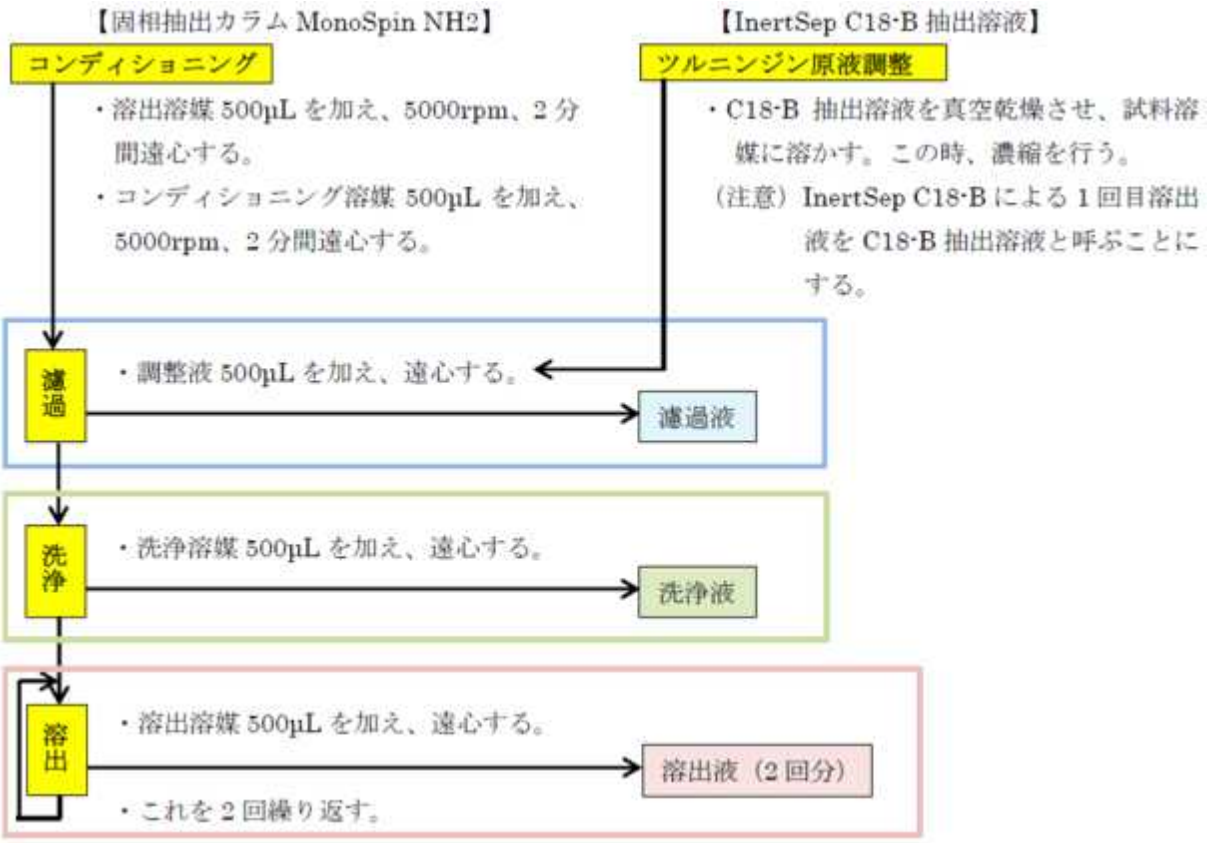
전처리로 InertSep C18-B에 의한 고상추출에서 얻은 첫 번째 용출액을 더욱 정제하기 위하여 지엘사이언스(주) 제조의 MonoSpin Trial Kit 3 (1000μL)를 이용하여 원심분리기를 이용하여 추출을 시도했다 . 이 Trial Kit 3에는 SCX (벤젠술폰산기결합형 실리카모노리스를 고정한 고상추출 스핀 컬럼), SAX (트리메틸아미노프로필기 결합형 실리카모노리스를 고정한 고상추출 스핀 컬럼), CBA (카르복실기결합형 실리카모노리스를 고정한 고상추출 스핀 컬럼) NH2 (아미노프로필기 결합형 실리카모노리스를 고정한 고상추출 스핀 컬럼)의 4 종류의 컬럼이 있다.

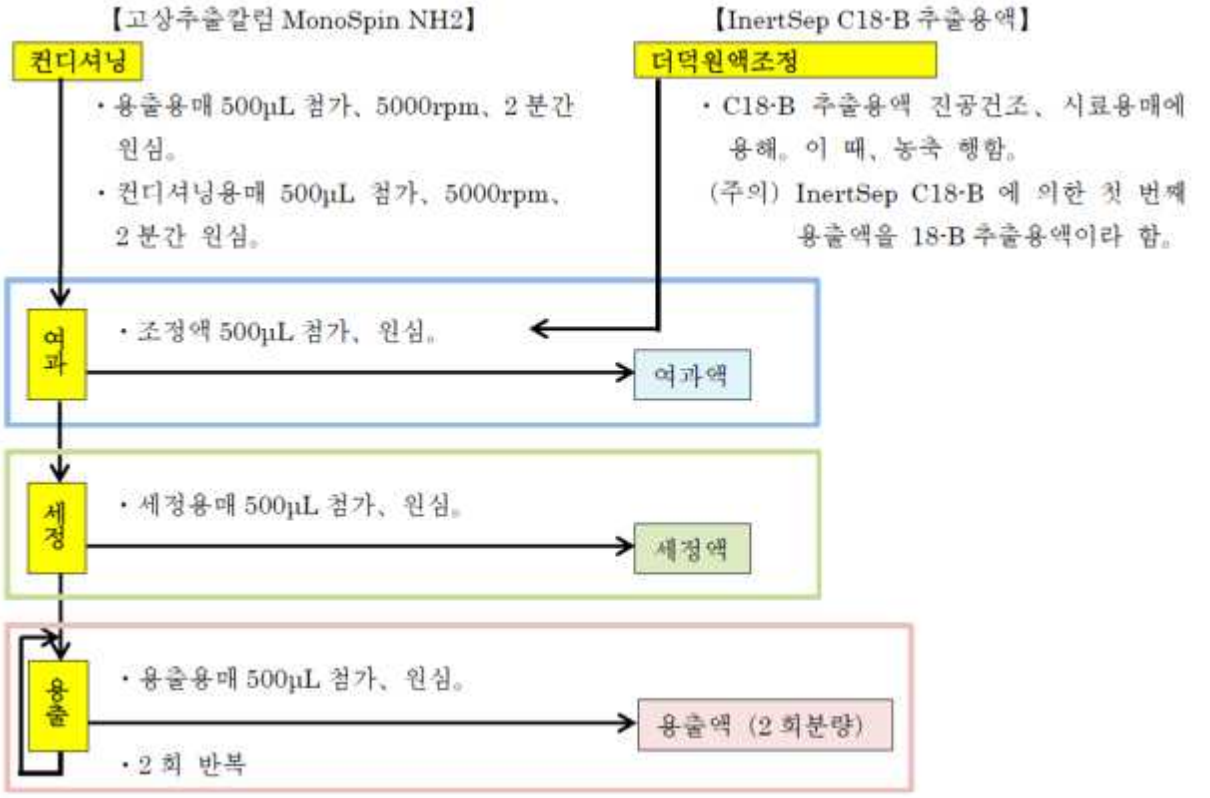
“6. 부록“에서처럼 컬럼을 검토한 결과, NH2가 다른 컬럼에 비해 많은 저해물질의 흡착 및 용출을 보였기 때문에 이 컬럼을 사용하여 측정하였다.

4.3.2 시료 제작

고상추출 스핀 컬럼은 지엘사이언스(주)의 MonoSpin NH2 (1000μL)을 사용하여 아래와 같은 순서대로 여과액, 세척액 및 용출액을 제작한 후, 각 용액을 진공건조시킨 다음 증류수를 가하여 시료를 제작하였다. 이 때, 저해율 50%가 측정할 수 있도록 용액의 농축을 행하였다.

또한 원심분리기는 (주)토미정공의 미량고속원심분리기(MC-150)를 사용했다.





また、標準的な固相抽出として、キット内に同封されている取扱説明書に従って測定を行った。溶媒および遠心機の条件を下記に示す。

溶媒	調整溶媒	水
	コンディショニング溶媒、洗浄溶媒	アセトニトリル：水：酢酸＝90：10：1
	溶出溶媒	アセトニトリル：水：酢酸＝50：50：1
遠心	コンディショニング時	5000rpm、2分間
	濾過時、洗浄時、溶出時	5000rpm、2分間

[번역]
또한 표준 고상추출로는 키트에 동봉된 설명서에 따라 측정을 실시했다. 용매 및 원심분리기의 조건은 다음과 같다.

용매	조정용매	물
	컨디셔닝용매 ·세정용매	아세토니트릴：물：초산＝90：10：1
	溶出溶媒	아세토니트릴：물：초산 ＝50：50：1
원심	컨디셔닝시	5000rpm ·2분간
	여과시 ·세정시 ·용출시	5000rpm ·2분간

4.3.3測定結果

各溶液の阻害曲線を**図5**に、各溶液の阻害率50%のUnit（U）値を**表2**に示し、以下のことが分かった。

『濾過液に対して』

· 濾過液のユニット量から注入した調整液の約39%の阻害物質が流出し、約61%がカラムに残ったと思われる。

『洗浄液に対して』

· 洗浄液のユニット量から注入した調整液の約26%の阻害物質が流出し、大体半分の約35%が残ったと思われる。

『溶出液に対して』

· 1回目溶出液のユニット量から注入した調整液の約32%の阻害物質を抽出することができた。2回目溶出液のユニット量は約5%であり、1桁違うことから、阻害物質は1回目でほとんど溶出されることが分かった。

『調整液と抽出液の合計に対して』

· 調整液と抽出液の合計のユニット量はほぼ一致した。

以上のことより、カラムの阻害物質の保持力がやや弱いと思われるので、溶媒及び遠心機の回転数の検討が必要だと考える。

[번역]
4.3.3 측정결과
각 용액의 저해곡선을 그림 5에, 각 용액의 저해율 50%의 Unit(U)값을 표 2에 나타냈으며, 다음과 같은 결과를 알 수 있었다.
『여과액에 대해서』
• 여과액의 Unit량으로부터 주입한 조정액의 약 36%의 저해물질이 용출되고, 약 61%가 컬럼에 남은 것으로 생각되었다.
『세척액에 대해서』
• 세척액의 Unit량으로부터 주입한 조정액의 약 26%의 저해물질이 용출되고, 약 35%가 컬럼에 남은 것으로 생각되었다.

『용출액에 대해서』

- 1회차 용출액의 Unit량으로부터 주입한 조정액의 약 32%의 저해물질을 추출할 수 잇었다. 2회차 용출액의 Unit량은 약 5%였으며, 1 자리수가 다르게 나타나 저해물질은 1회차에 대부분 용출되는 것을 알 수 있었다.

『조정액과 추출액 통합한 량』

- 조정액과 추출액을 합한 총 Unit량은 거의 일치했다.

이상에서와 같이 컬럼의 저해물질의 유지력이 다소 약하다고 생각되므로, 용매 및 원심분리기의 회전 수의 검토가 필요하다고 생각되었다.

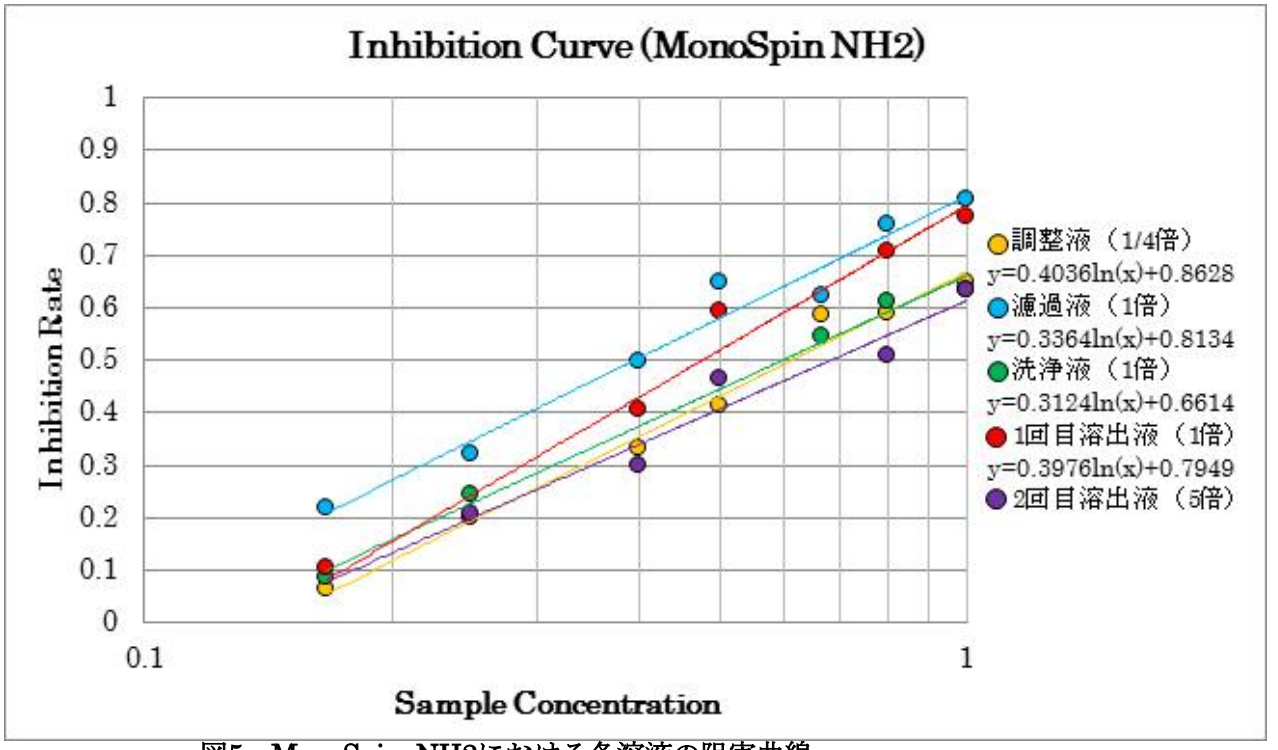


図5. MonoSpin NH2における各溶液の阻害曲線

(그림 5. MonoSpin NH2에 의한 각 용액의 저해곡선)

表2. MonoSpin NH2における各溶液の阻害率50%のUnit（U）算出

(표 2. MonoSpin NH2에 의한 각 용액의 저해율 50%의 Unit (U) 산출)

溶液		容量（μL)	阻害率50%	濃縮割合	Unit（U)
調整液		500	0.6121	1/4	3268
抽出液合計		—	—	—	3304
内訳	濾過液	500	0.3939	1	1269
	洗浄液	500	0.5965	1	838
	1回目溶出液	500	0.4763	1	1050
	2回目溶出液	500	0.6828	5	146

4.4　液体クロマトグラフィー（HPLC）による精製

(액체크로마토그래피(HPLC)에 의한 정제)

4.4.1　0.1%TFAの溶媒の効果

HPLCで用いる0.1%TFAについて、活性測定時に酵素反応条件のｐHを酸性化させてしまう為、前処理として乾燥による除去を試みた。

[번역]
4.4.1 0.1% TFA의 용매 효과
HPLC분석에 사용하는 0.1% TFA에 대해서, 활성측정 시의 효소반응 조건의 pH를 산성화시키기 때문에 전처리로서 건조에 의한 제거를 시도하였다.

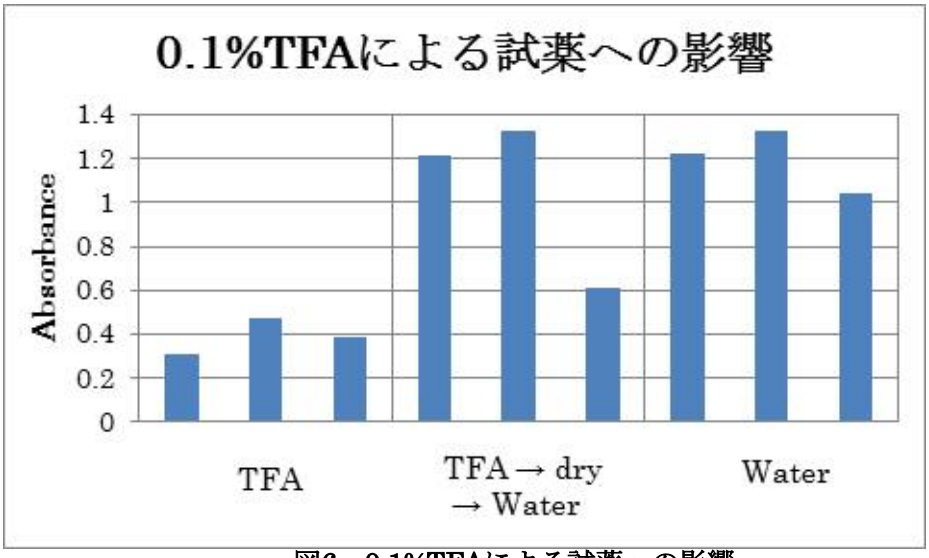


図6.　0.1%TFAによる試薬への影響

図6から分かるように、ややバラツキはあるものの、TFA溶液でACE　Kit-WST試薬に影響を及ぼしていることが分かる。また、乾燥させたものでも、0.6と若干影響しているものが見られた。このことから、本試薬キットに梱包されているSubstrate　bufferがpH7.9であるため、TFAの強い酸性で酵素の働きを鈍らせていることが推測される。完全に乾燥して、TFAを除去することで、活性測定が可能であることが示された。

(그림 6. 0.1% TFA의 시약에 대한 영향)

(그림 6에서 알 수 있듯이 다소 편차는 있지만, TFA 용액에서 ACE Kit-WST 시약에 다소 영향을 미치는 것을 알 수 있다. 또한 건조시킨 시료에서도 0.6 정도로 약간 영향을 미치는 것으로 나타났다. 따라서 본 실험에 사용한 시약 키트에 포함되어 있는 Substrate buffer가 pH7.9이기 때문에 TFA 강한 산성에서 효소의 활성을 떨어뜨리는 것으로 추측된다. 완전히 건조하여 TFA를 제거함으로서 활성 측정이 가능하다는 것을 보여 주었다.)

4.4.2 液体クロマトグラフィーによる1回目の分離

(액체크로마토그래피에 의한 1 회차 분리)

試料作製及び評価方法 (시료제작 및 평가방법)

C18-B抽出溶液（3000μL）を真空乾燥させ、濃度が10倍濃くなるように純水を加えた溶液（300μL）を2つに分けて、液体クロマトグラフィー質量分析装置に2度かけた。その後、フラクション番号毎の溶液10μLを真空乾燥させ、更に純水5μLを加え再び真空乾燥した。阻害物質の濃度を高めるために、乾燥後は水を加え

ず、「ACE Kit-WST」試薬の緩衝液1μLと酵素液1μLのみ加えて、吸光度測定を行った。

[번역]
C18-B 추출 용액 (3000μL)을 진공건조시켜 농도가 10 배 진하게 되도록 증류수를 첨가한 용액 (300μL)을 2 개로 나누고, 액체크로마토그래피 질량분석장치에 2 회 걸었다. 그 후, 각 fraction 번호 용액 10μL를 진공건조시켜 재차 증류수 5μL를 첨가하여 다시 진공건조했다. 저해물질의 농도를 높이기 위해 건조 후에는 증류수를 첨가하지 않고, 「ACE Kit-WST」시약의 완충액 1μL와 효소액 1μL 만 첨가하여 흡광도를 측정하였다.

液体クロマトグラフィー条件

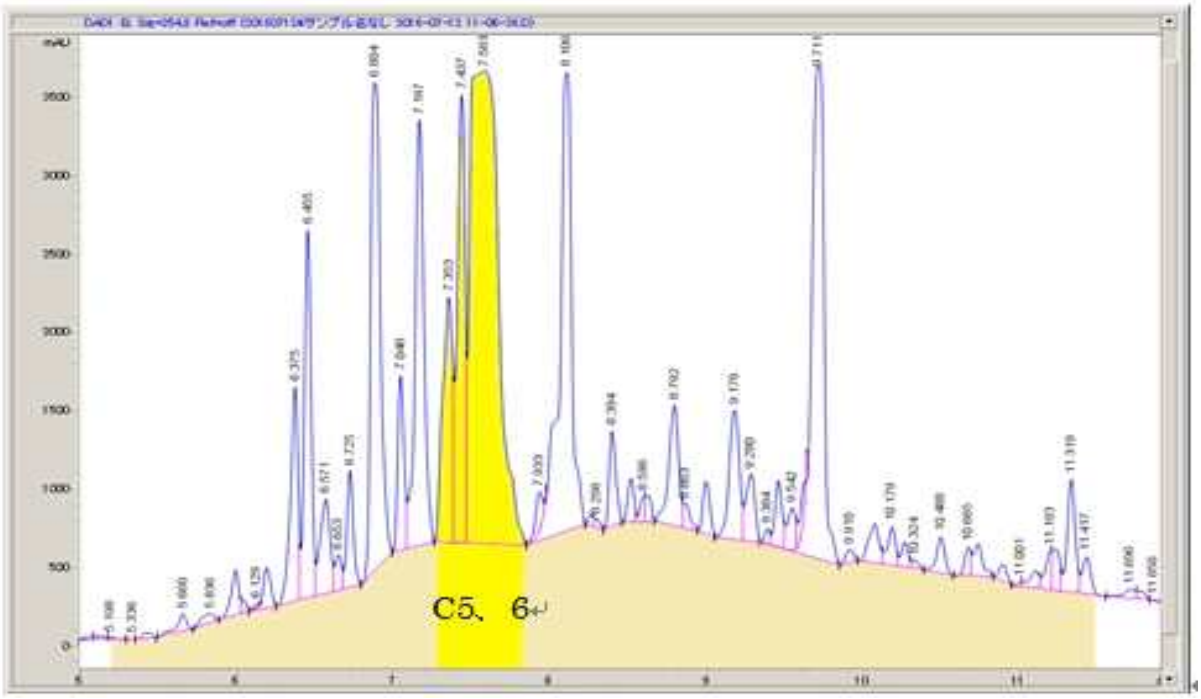
分析装置　1260 Infinity　アジレント・テクノロジー（株）製造
カラム　逆送カラム：Inertsil ODS-3（内径4.6mm 、長さ150mm）粒子径3㎛
ジーエルサイエンス（株）製造
移動相溶媒　A緩衝液：0.09%トリフルオロ酢酸（TFA）
B緩衝液：80%アセトニトリル、0.075%トリフルオロ酢酸（TFA）
溶出　A100%からB100%まで16分間
流量　200μL /min
注入量　約100μL
温度　室温

[번역]
액체크로마토그래피 조건
분석장치　1260 Infinity　애질런트테크놀로지(주) 제조
칼럼　역상칼럼：Inertsil ODS-3（내경4.6mm 、길이150mm）입자경3㎛
지엘사이언스(주)제조
이동상용매　A완충액：0.09% Trifluoroacetic acid（TFA）
B완충액：80%아세토니트릴、0.0075% Trifluoroacetic acid （TFA）
유속　200μL /min
주입량　약100μL　（주의）실제 명기한 분량이 주입되었는지는 불분명
온도　실온

測定結果(측정결과)

液体クロマトグラフィーの波形と分離された溶液の吸光度を図 7 に示す。2度とも液体クロマトグラフィーの波形で大きなピークのフラクション番号C5及びC6で吸光度が低いことから、これらのフラクション番号の溶液内に阻害物質が存在していると思われる。

[번역]
액체크로마토그래피의 파형 및 분리된 용액의 흡광도를 그림 7에 나타냈다. 2 회 분석 모두 액체크로마토그래피의 파형에서 큰 피크 fraction 번호 C5 및 C6에서 흡광도가 낮기 때문에 이들 fraction 번호의 용액내에 저해물질이 존재하고 있는 것으로 생각된다.



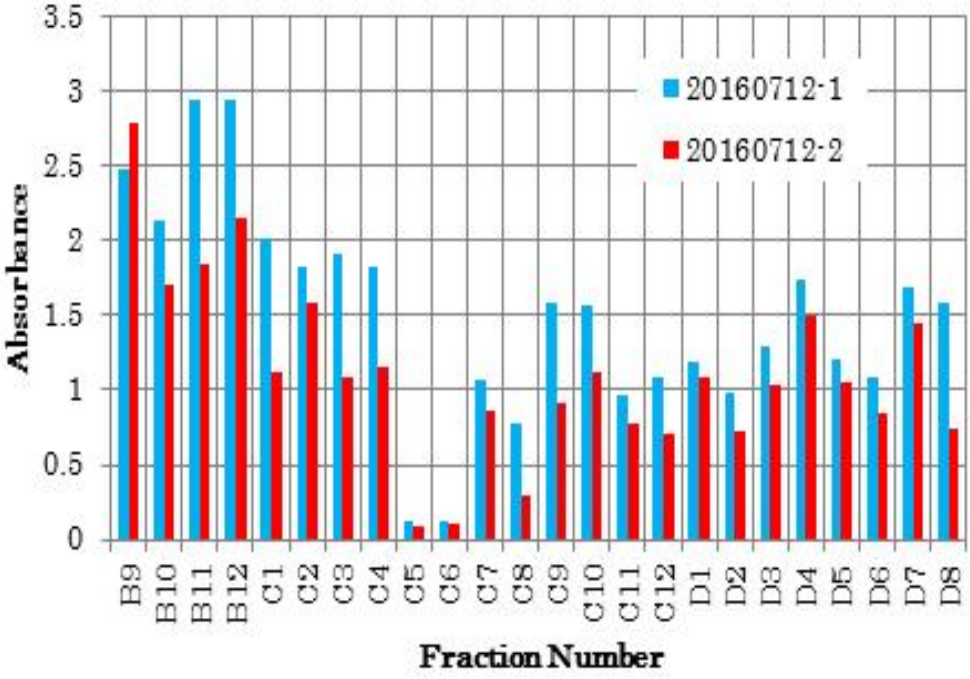


図７．1回目の液体クロマトグラフィーの波形と分離された溶液の吸光度

(그림 7. 1 회차 액체크로마토그래피의 파형과 분리된 용액의 흡강도)

4.4.3 液体クロマトグラフィーによる2回目の分離
(액체크로마토그래피에 의한 2 회째 분리)

試料作製及び評価方法(시료제작 및 평가방법)

1回目の液体クロマトグラフィーで分離されたフラクション番号C5及びC6の溶液（2度分合計860μL）を真空乾燥させ、濃度が約7倍濃くなるように純水を加えた溶液（120μL）を液体クロマトグラフィー質量分析装置にかけた。その後、フラクション番号毎の溶液10μLを真空乾燥させ、更に純水5μLを加え再び真空乾燥した。1回目同様に乾燥後は水を加えず、「ACE Kit-WST」試薬の緩衝液1μLと酵素液1μLのみ加えて、吸光度測定を行った。

[번역]
1 회째 액체크로마토그래피로 분리된 fraction 번호 C5 및 C6의 용액 (2 회 분량 총 860μL)을 진공건조시켜 농도가 약 7 배 진하게 되도록 증류수를 첨가한 용액 (120μL)을 액체크로마토그래피 질량분석장치에 걸었다. 그 후, 각 fraction 번호 용액 10μL를 진공건조시켜 재차 증류수 5μL를 첨가하여 다시 진공건조했다. 1 회째와 마찬가지로 건조 후에는 물을 첨가하지 않고, 「ACE Kit-WST」시약의 완충액 1μL와 효소액 1μL 만 첨가하여 흡광도를 측정하였다.

液体クロマトグラフィー条件

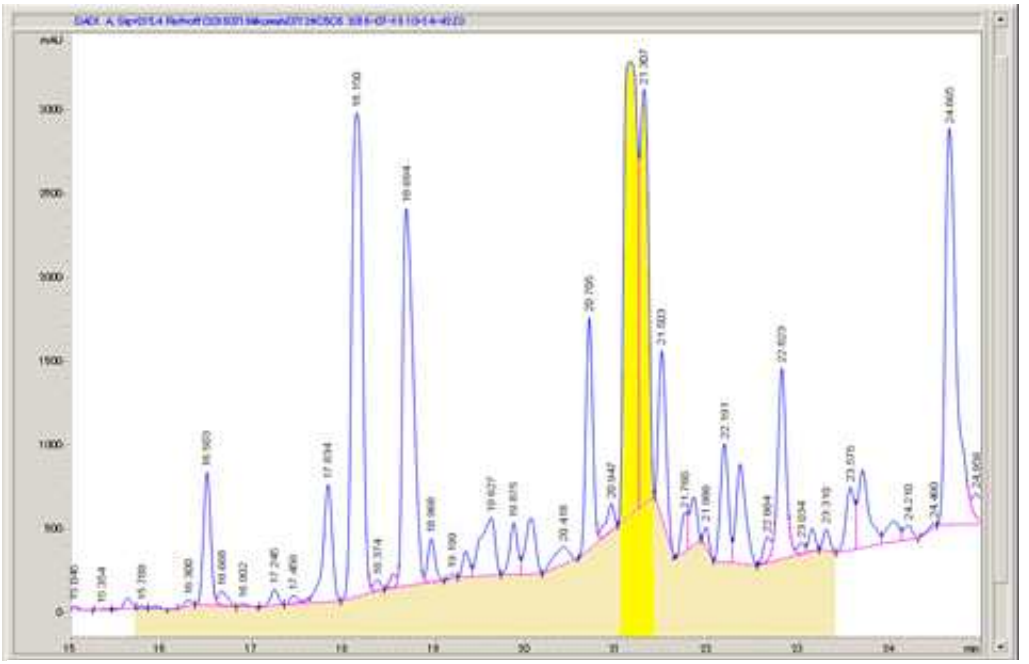
分析装置　1260 Infinity　アジレント・テクノロジー（株）製造
カラム　逆送カラム：Inertsil ODS-3（内径4.6mm 、長さ150mm）粒子径3㎛
ジーエルサイエンス（株）製造
移動相溶媒　A緩衝液：0.09%トリフルオロ酢酸（TFA）
B緩衝液：80%アセトニトリル、0.075%トリフルオロ酢酸（TFA）
流量　1mL /min
注入量　約100μL　（注意）実際、明記した量が注入されたかは不明である。
温度　室温

[번역]
액체크로마토그래피 조건
분석장치　1260 Infinity　애질런트테크놀로지(주) 제조
칼럼　역상칼럼：Inertsil ODS-3（내경4.6mm 、길이150mm）입자경3㎛
지엘사이언스(주)제조
이동상용매　A완충액：0.09% Trifluoroacetic acid（TFA）
B완충액：80%아세토니트릴、0.0075% Trifluoroacetic acid （TFA）
유속　1mL /min
주입량　약100μL　（주의）실제 명기한 분량이 주입되었는지는 불분명
온도　실온

測定結果

液体クロマトグラフィーの波形と分離された溶液の吸光度を図８に示す。液体クロマトグラフィーの波形で大きなピークのフラクション番号C11で吸光度が低いことから、このフラクション番号の溶液内に阻害物質が存在していると思われる。

[번역]
액체크로마토그래피의 파형 및 분리된 용액의 흡광도를 그림 8에 나타냈다. 액체크로마토그래피의 파형에서 큰 피크 fraction 번호 C11에서 흡광도가 낮게 나타나 이 fraction 번호의 용액내에 저해물질이 존재하고 있는 것으로 생각된다.



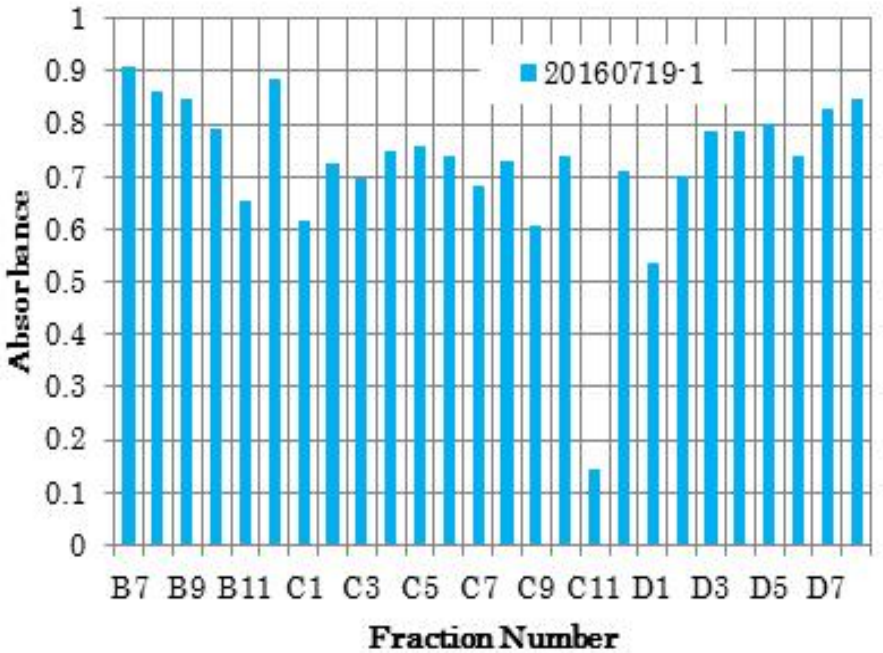


図８．2回目の液体クロマトグラフィーの波形と分離された溶液の吸光度
(그림 8. 2 회째 액체크로마토그래피의 파형과 분리된 용액의 흡강도)

4.4.4 液体クロマトグラフィーによる3回目の分離
(액체크로마토그래피에 의한 3 회째 분리)

試料作製及び評価方法(시료제작 및 평가방법)

2回目の液体クロマトグラフィーで分離されたフラクション番号C11の溶液（360μL）を真空乾燥させ、濃度が3倍濃くなるように純水を加えた溶液（120μL）を液体クロマトグラフィー質量分析装置にかけた。その後、隣り合うフラクション番号の溶液100μLずつを合わせて200μLを真空乾燥した。但し、P2-B9はP2-B10にピークがあるため避け、P2-11と合わせた。1回目同様に乾燥後は水を加えず、「ACE Kit-WST」試薬の緩衝液1μLと酵素液1μLのみ加えて、吸光度測定を行った。

[번역]
2 회째 액체크로마토그래피로 분리된 fraction 번호 C11의 용액 (360μL)을 진공건조시켜 농도가 약 3 배 진하게 되도록 증류수를 첨가한 용액 (120μL)을 액체크로마토그래피 질량분석장치에 걸었다. 그 후, 인접한 fraction 번호 용액 100μL씩 합쳐 200μL를 진공건조시켰다. 단, P2-B9는 P2-B10에 피크가 있기 때문에 피하고 P2-11과 합쳤다. 1 회째와 마찬가지로 건조 후에는 물을 첨가하지 않고, 「ACE Kit-WST」시약의 완충액 1μL와 효소액 1μL 만 첨가하여 흡광도를 측정하였다.

液体クロマトグラフィー条件

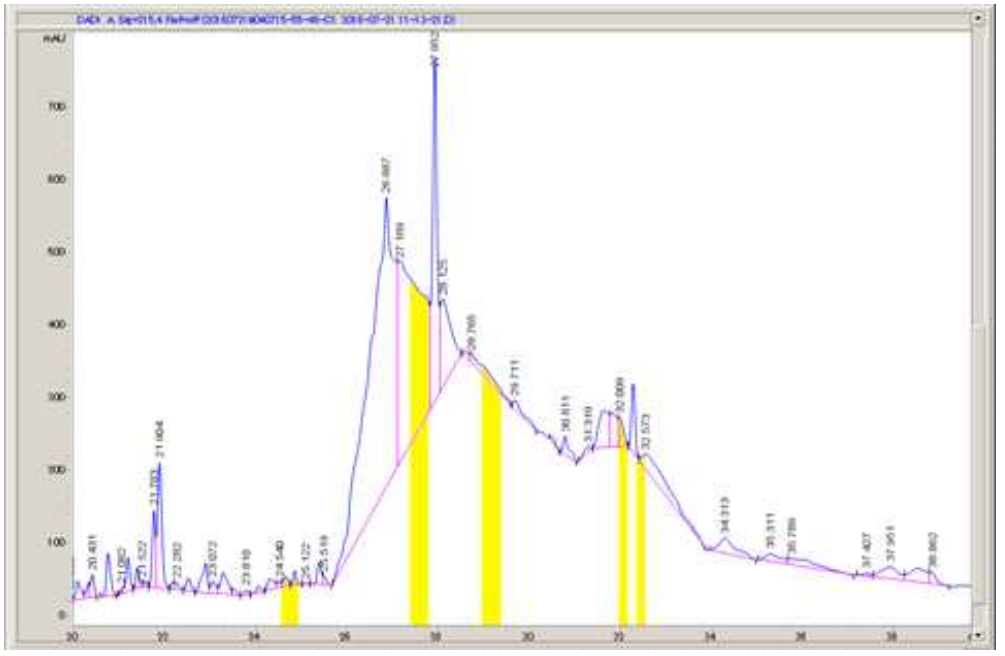
分析装置　1260 Infinity　アジレント・テクノロジー（株）製造
カラム　逆送カラム：Inertsil ODS-3（内径4.6mm 、長さ150mm）粒子径3㎛
ジーエルサイエンス（株）製造
移動相溶媒　A緩衝液：純水
B緩衝液：100%アセトニトリル
流量　1mL /min
注入量　約100μL　（注意）実際、明記した量が注入されたかは不明である。
温度　50℃
ウェルプレート　2枚使用し、フラクション番号はP1-A1、P1-A2、…、P1-H11、P1-H12、P2-A1、P2-A2、…、P2-H11、P2-H12というように並ぶ。

[번역]
액체크로마토그래피 조건
분석장치　1260 Infinity　애질런트테크놀로지(주) 제조
칼럼　역상칼럼：Inertsil ODS-3（내경4.6mm 、길이150mm）입자경3㎛
지엘사이언스(주)제조
이동상용매　A완충액：증류수
B완충액：100%아세토니트릴
유속　1mL /min
주입량　약100μL　(주의) 실제 명기한 분량이 주입되었는지는 불분명
온도　50℃
Wellplate　2 매 사용하여 fraction 번호는 P1-A1, P1-A2, ..., P1-H11, P1-H12, P2-A1, P2-A2, ..., P2-H11, P2-H12와 같이 일렬로 하였다.

測定結果(측정결과)

液体クロマトグラフィーの波形と分離された溶液の吸光度を図９に示す。液体クロマトグラフィーの波形で阻害物質が存在していないと思われるフラクション番号P1-G8、9と比べると、P1-H10、11とP2-A6、7とP2-B9、11とで、吸光度が低いことから、これらのフラクション番号の溶液内に阻害物質が存在していると思われる。

[번역]
액체크로마토그래피의 파형 및 분리된 용액의 흡광도를 그림 9에 나타냈다. 액체크로마토그래피의 파형에서 저해물질이 존재하지 않는 것으로 추측되는 fraction 번호 P1-G8 `9와 비교하면, P1-H10 `11과P2-A6 `7과P2-B9 `11에서 흡광도가 낮게 나타나 이들 fraction 번호의 용액내에 저해물질이 존재하고 있는 것으로 생각된다.



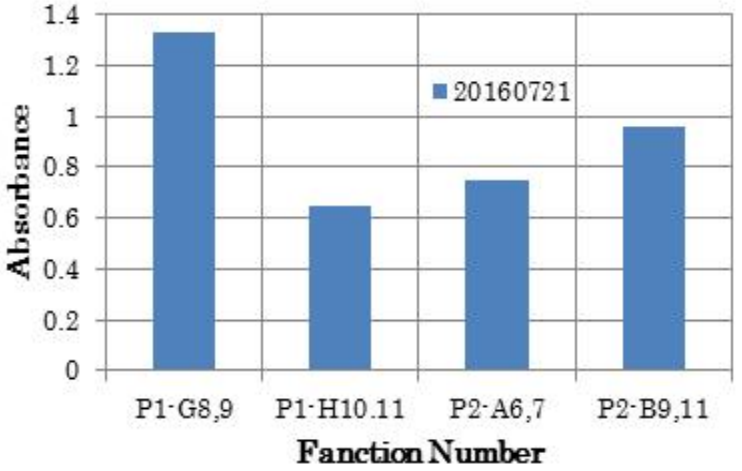
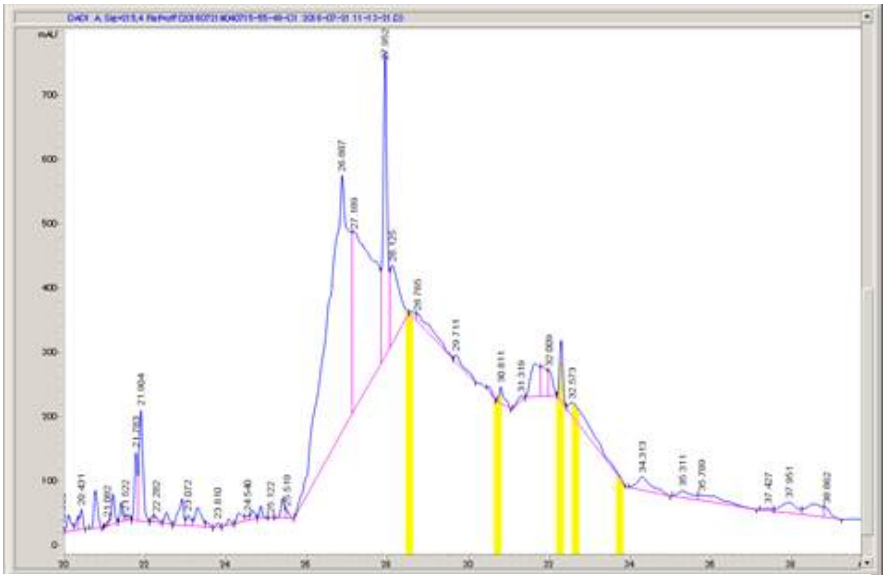


図９．3回目の液体クロマトグラフィーの波形と分離された溶液の吸光度
(그림 9. 3 회째 액체크로마토그래피의 파형과 분리된 용액의 흡강도)

図９から、P1-H10からP2-B11までの阻害物質が広い範囲で検出されていることを検証した。フラクション番号の溶液100μLを用いて、同様な測定を行った結果を図１０に示す。この時、3回目の液体クロマトグラフィーにおいてフラクション番号毎の溶液は時間的等間隔で注入されているので、ある一定の時間を表す量として、P1-A1を0とし、A2を1、A3を2、…としてグラフを作成した。

[번역]
그림 9에서 P1-H10에서 P2-B11까지 저해물질이 광범위하게 검출되는 것을 검증해 보았다. fraction 번호의 용액 100μL를 사용하여 동일한 측정을 한 결과를 그림 10에 나타냈다. 이 때 3 호;째 액체크로마토그래피에서 각 fraction 번호의 용액은 시간적인 간격으로 주입되었기 때문에 일정 시간을 나타내는 양으로서 P1-A1을 0으로 하고, A2를 1, A3을 2로, 등으로 그래프를 작성했다.



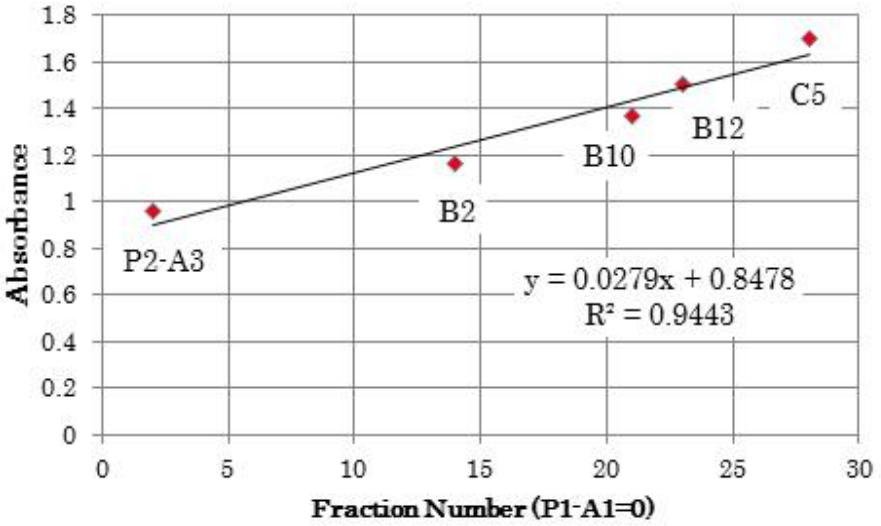


図１０．3回目の液体クロマトグラフィーの波形と分離された溶液の吸光度
（ある一定の時間を表す量として、P1-A1を0とし、A2を1、A3を2、…とした。）
[그림10. 3 회째 액체크로마토그래피의 파형과 분리된 용액의 흡강도
(일정 시간을 나타내는 양으로서 P1-A1을 0으로 하고, A2를 1, A3을 2로, 등으로 했다)]

グラフから分かるように、時間（フラクション番号）に対して、吸光度と比例関係を持つことが分かった。即ち、図１１に示す液体クロマトグラフィーの大きく広い山型の波形の範囲（黄緑色）において、阻害物質が存在していると思われる。

[번역]
그래프에서 알 수 있듯이, 시간(fraction 번호)에 대해 흡광도와 비례 관계를 갖는 것으로 나타났다. 즉, 그림 11에 제시된 바와 같이 액체크로마토그래피의 크고 넓은 산형태의 파형의 범위 (연두색)에서 저해물질이 존재하고 있는 것으로 생각된다.

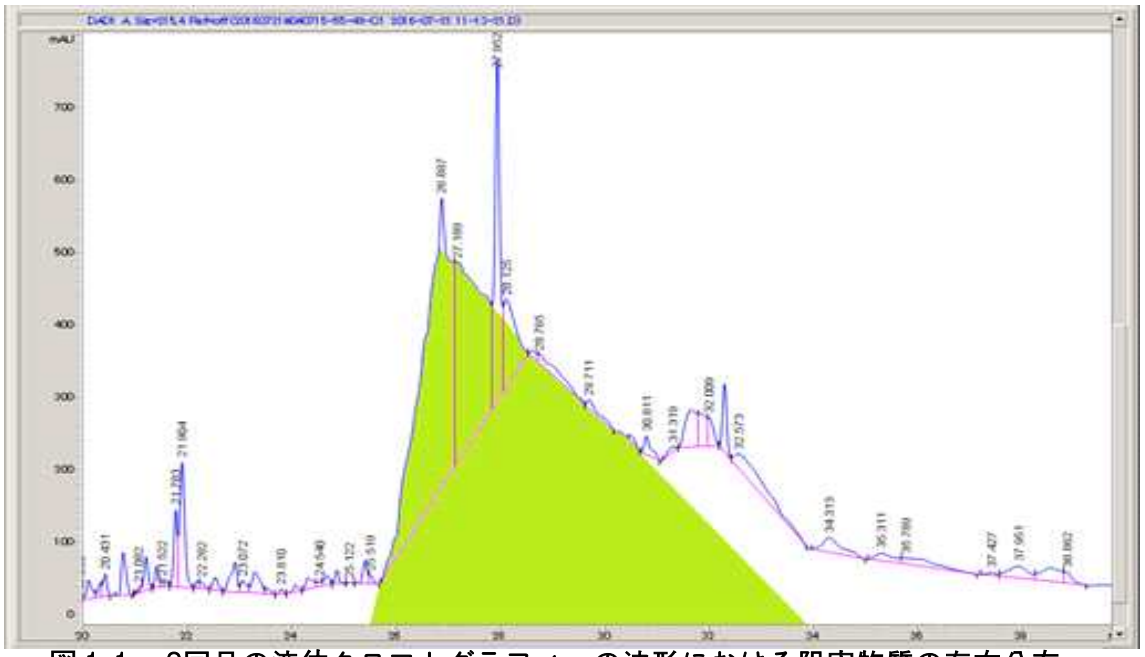


図１１．3回目の液体クロマトグラフィーの波形における阻害物質の存在分布
(그림11. 3 회째 액체크로마토그래피 파형에서의 저해물질 존재 분포)

4.5核磁気共鳴装置による阻害物質の同定
(핵자기공명장치에 의한 저해물질 동정)

3回目の液体クロマトグラフィーで分離されたフラクション番号P1-H8、9の溶液（約200μL）を核磁気共鳴装置にかけて、阻害物質の同定を試みた。

[번역]
3 회째의 액체크로마토그래피로 분리된 fraction 번호 P1-H8, 9 용액 (약 200μL)을 핵 자기공명장치를 이용, 저해물질의 동정을 시도했다.

核磁気共鳴装置の条件
分析装置　　ECA600 NMR　日本電子（株）製造
スペクトラム　　^{1}H-NMR、2D-TOCSY

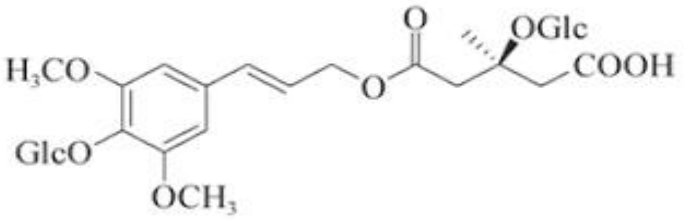
[번역]
핵자기공명장치 조건
분석장치　ECA600 NMR　　일본전자(주) 제조
스펙트럼　　^{1}H-NMR ､2D-TOCSY

測定結果(측정결과)

図１２及び１３にNMRのデータを示す。これらの図において緑枠で囲まれた部分から測定試料はフェニルプロパノイド類であり、赤枠で囲まれた部分からグルコースが2つあることが分かった。液体クロマトグラフィーのピークの大きさからツルニンジンの主要な成分であることが推測されるので、ツルニンジンの属名Codonopsisから論文検索により同属の植物成分の構造式が特定されている物質の中から、フェニルプロパノイド類のものを探し、更にSciFinderを用いて他に似た構造の物質が無いかを確認し、NMRデータを比較した結果、阻害物質を**Tangshenoside Ⅰ**と同定した。

この「ACE　Kit-WST」試薬の阻害物質**Tangshenoside Ⅰ**がアンジオテンシン変換酵素の阻害物質であるかは治験する必要がある。

[번역]
그림 12 및 13에 NMR 데이터를 나타냈다. 이들 그림에서 녹색 테두리로 둘러싸인 부분의 측정시료는 페닐프로파노이드류이며, 빨간색 테두리 부분은 포도당이 2 개 있는 것으로 나타났다. 액체크로마토그래피 피크의 크기로부터 더덕의 주요 성분인 것으로 추측되므로, 더덕의 속명 Codonopsis로 논문 검색하여 같은 속의 식물 성분의 구조식이 특정되어있는 물질 중에서 페닐프로파노이드류의 성분을 탐색하고, 더 나아가 SciFinder를 사용하여 다른 유사한 구조의 물질이 없는지 확인하여, NMR 데이터를 비교한 결과, 저해물질을 Tangshenoside Ⅰ로 동정했다.
이 「ACE Kit-WST」 시약의 저해 물질 Tangshenoside Ⅰ가 안지오텐신 변환효소 저해물질인지는 임상시험 등을 통해 더 확인할 필요가 있다고 본다.



Tangshenoside Ⅰ

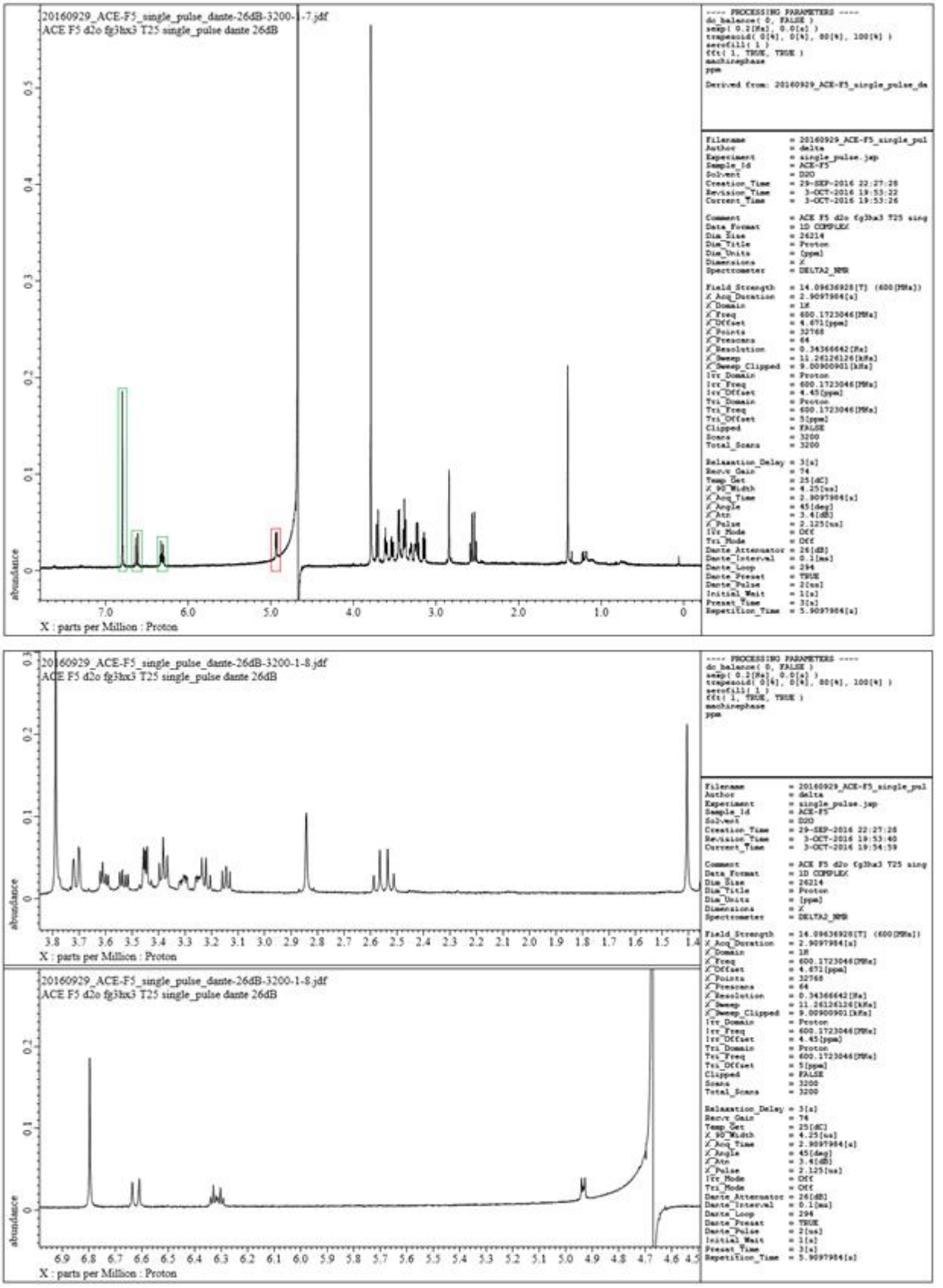


図１２．1次元^{1}H-NMRスペクトル（上図の拡大図を下図に示す）

[그림 12. 1차원 **^{1}H-NMR** 스펙트럼 (위 그림 확대한 그림을 아래 그림에 나타냄)]

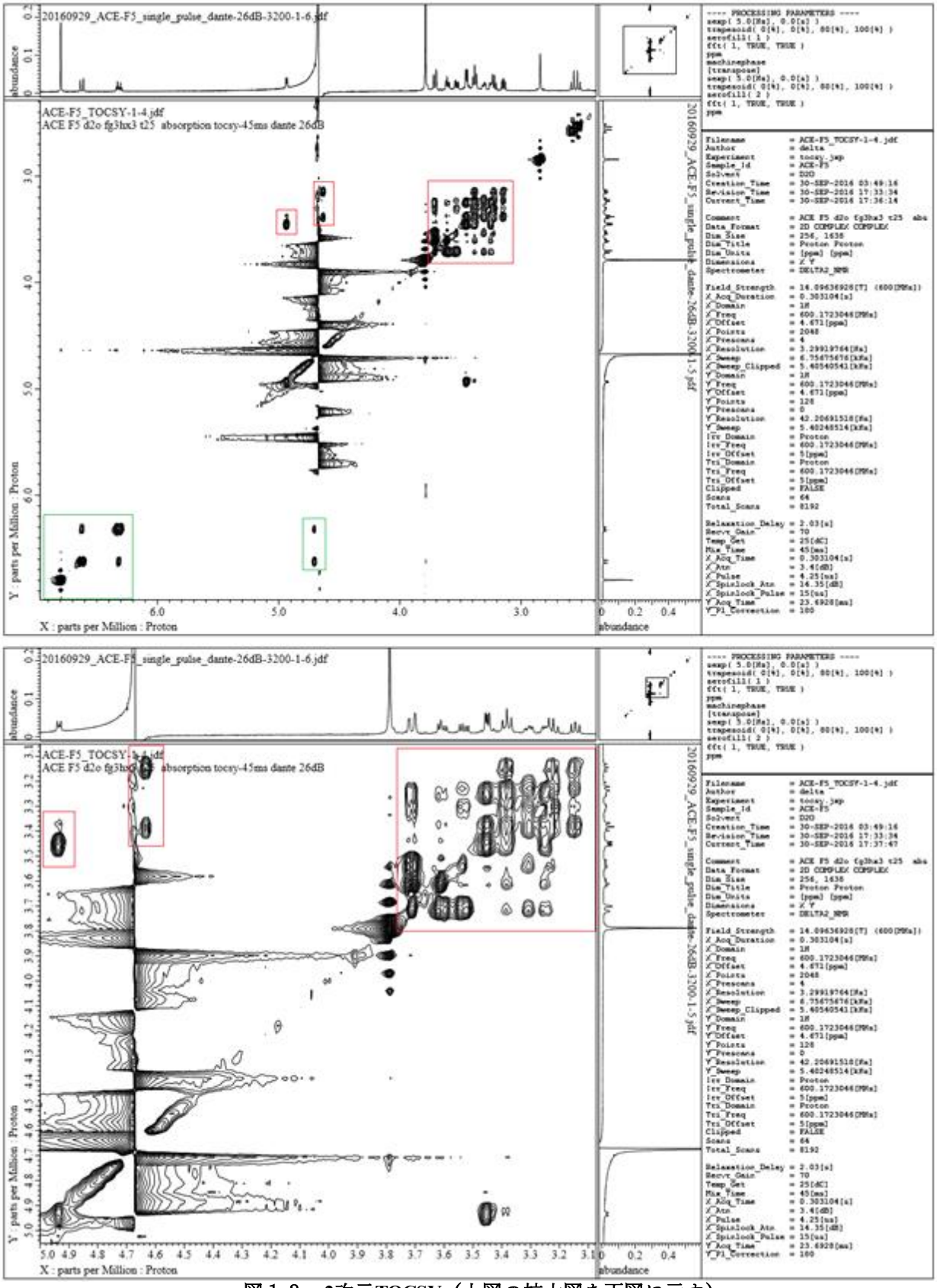


図１３．2次元TOCSY（上図の拡大図を下図に示す）

[그림 13. 2차원 **TOCSY** (위 그림 확대한 그림을 아래 그림에 나타냄)]

4.6 質量分析

HPLC精製画分のMALDI-TOF　MS分析を行ったが、ポジティブモードもネガティブモードもいずれもわずかに分子関連イオン（$[M+H]^+$あるいは$[M-H]^-$）が見える**(図14)**のみで、MS/MS分析による構造情報は得られなかった。

[번역]
7. 질량분석
HPLC 정제분획의 MALDI-TOF MS분석을 행한 결과, 포지티브 모드, 네거티브 모드 모두 미세하게 분자관련 이온$[M+H]^+$ 혹은 $[M-H]^-$) 이 확인될 뿐(그림 14), MS/MS 분석에 따른 구조정보는 얻을 수 없었다.

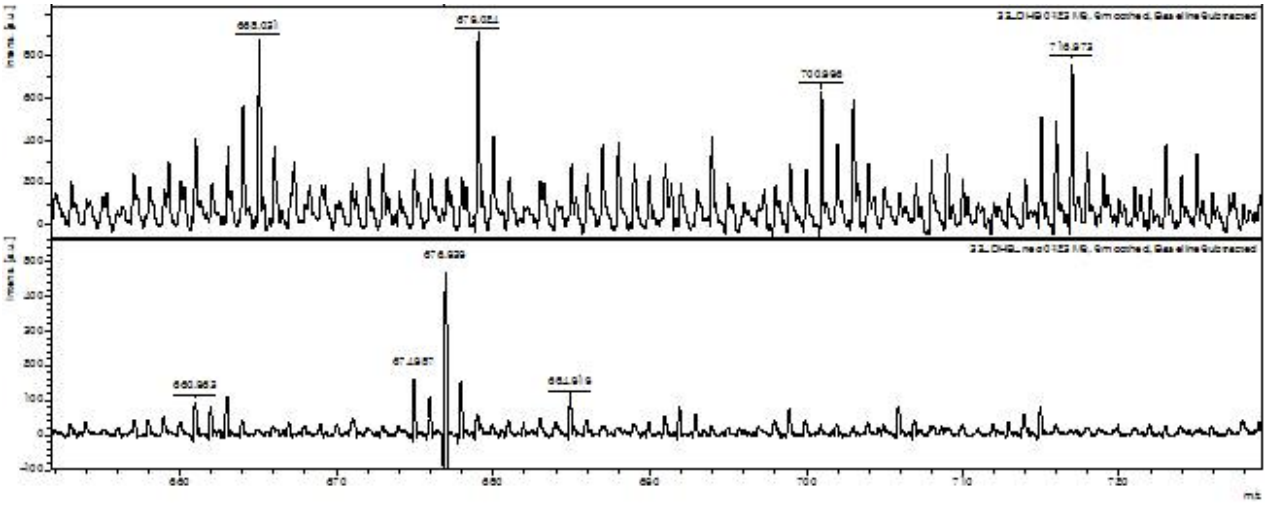


図14　精製画分のMALDI-TOF MSの正（上）・負（下）モードのスペクトル
[그림 14. 정제분획의 MALDI-TOF MS 의 포지티브(상), 네거티브(하) 모드의 스펙트럼]

MALDI-TOF　MSでは、励起レーザー付近のUV吸収もある為、イオン化の効率が低いことが考えられたため、nLC-ESI-MS/MS法による測定を試みた。ネガティブモードのLC-ESI　MSスペクトルで、精製画分からTangshenoside　Ⅰと質量が一致するピークを認めた**(図15)**。TOP10によるデータ依存的MS/MS測定（DDA）においても、667.2をプレカーサーイオンとするMS/MSスペクトルが取得できた**(図16)**。

[번역]
MALDI-TOF MS에서는 여기 레이저 부근의 UV 흡수도 있어서 이온화 효율이 낮은 것으로 생각되었기 때문에 nLC-ESI-MS / MS 법에 의한 측정을 시도했다. 네거티브 모드 LC-ESI MS 스펙트럼에서 정제 분획으로부터 Tangshenoside Ⅰ과 질량이 일치하는 피크를 확인했다 (그림 15). TOP 10에 의한 데이터 의존적 MS / MS 측정 (DDA)에서도 667.2을 Precursor 이온으로 하는 MS / MS 스펙트럼을 얻을 수 있었다 (그림 16).

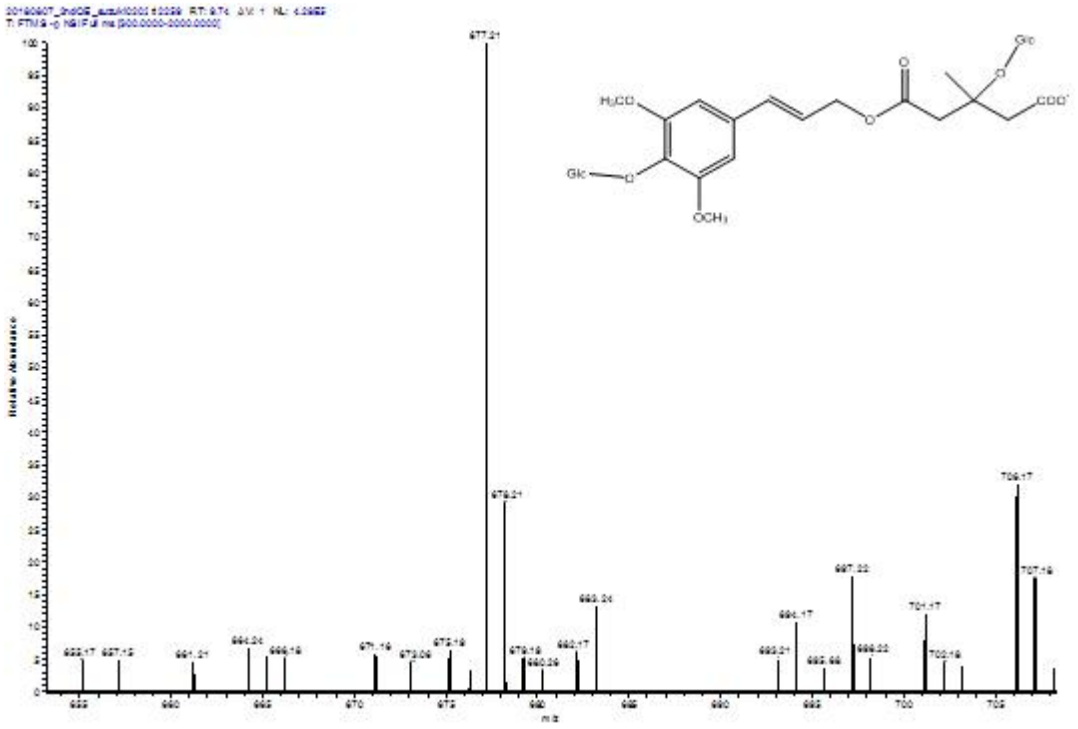


図15　精製画分のｎLC-MS負モードのMSFスペクトル

[그림 15. 정제분획의 nLC - MS 네거티브 모드 MSF 스펙트럼]

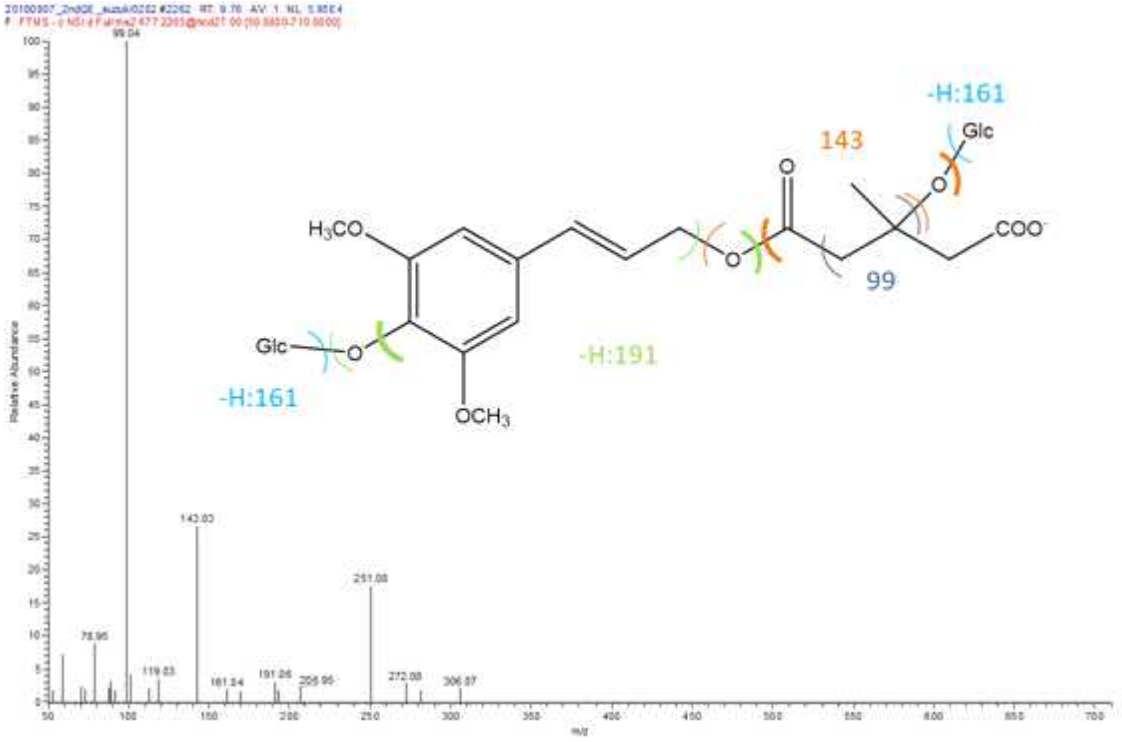


図16　精製画分のｎLC-MS負モードのMS/MSスペクトル

[그림 16. 정제분획의 nLC-MS 네거티브 모드 MS/MS 스펙트럼]

4.6 多量調整の試み

ツルニンジンはキキョウ科のつる性多年草で、東南アジア一帯の森林に生育する。多くのサポニンを含み、滋養強壮、胃腸整腸、制癌作用、去痰、解毒などの効能があるとされている。

ツルニンジン抽出液からアンジオテンシン変換酵素（ACE）阻害活性を指標に血圧降下作用成分の精製を行い、核磁気共鳴装置により阻害物質を**Tangshenoside Ⅰ**と同定した。今期の測定ではこの物質の性質と効率良い抽出の検討を行った。

[번역]
4.6 다량 조정 시도
더덕은 초롱꽃과의 덩굴성 다년초로, 동남아시아 일대의 삼림에 자생한다. 많은 사포닌을 포함, 자양강장, 위장정장, 제암작용, 거담, 해독 등의 효능이 있다고 알려져 있다.
더덕추출액으로부터 안지오텐신 전환효소(ACE) 저해활성을 지표로 혈압강하 작용 성분을 정제하고, 핵자기공명장치에 의해 저해물질을 Tangshenoside I 인 것으로 동정하였다. 이번 측정에서는 이 물질의 특성과 효율성이 좋은 추출법 검토를 실시했다.

１．InertSep C18-B固相抽出における原液濃度の影響

原液抽出及びツルニンジン粉末量の条件

抽出の手順を下記に示す。

①純水300mLを沸騰させ、その中にツルニンジン粉末をそれぞれ3g、9g、15g、30g、60g入れる。なお、60g入れた場合、粉末に純水が吸収され過ぎ、原液が固相抽出するに必要な量が確保できなかったため、純水200mL、粉末40gを追加し、足し合わせた。

②1分間加熱し、自然冷却させる。

③抽出した溶液を遠心機（8000rpm、10分）にかけ、上澄み液を回収する。（この上澄み液を「原液」と呼ぶことにする。）

粉末条件	純水量	粉末量	原液量
10g/L	300mL	3g	267mL
30g/L		9g	245mL
50g/L		15g	201mL 注）
100g/L		30g	200mL
200g/L	300+200mL	60+40g	210mL

注）粉末量15gの時、粉末を入れるのにやや手間取り、純水量がやや少なくなっている可能性がある。

[번역]
8.1. InertSep C18-B 고상 추출에 의한 원액 농도의 영향
원액 추출 및 더덕 분말량의 조건
추출순서를 아래와 같다.
① 증류수 300mL를 끓여 그 안에 더덕 분말을 각각 3g, 9g, 15g, 30g, 60g 넣는다. 또한 60g 넣은 경우, 분말에 증류수가 과도하게 흡수되어 원액이 고상 추출하는데 필요한 양을 확보할 수 없기 때문에 증류수 200mL, 분말 40g을 추가로 넣어 혼합한다.
② 1 분간 가열하여 자연냉각시킨다.

③ 추출한 용액을 원심분리(8000rpm, 10 분)한 후 상등액을 회수한다. (이 상등액을 “원액“으로 칭한다.)

분말조건	증류수량	분말량	원액량
10g/L	300mL	3g	267mL
30g/L		9g	245mL
50g/L		15g	201mL 注)
100g/L		30g	200mL
200g/L	300+200mL	60+40g	210mL

주) 분말량 15g의 경우는 분말을 넣는데 다소 어려움이 있어서 증류수량이 다소 적었을 가능성이 있다.

InertSep C18-B固相抽出

固相抽出カラムとしてジーエルサイエンス（株）のInertSep C18-B（10g/60mL）の大型カラムを用いて、図１5に示す手順で濾過液、洗浄液及び溶出液を作製し、その後、各溶液を真空乾燥させ、それに純水を加えて、測定試料を作製した。この時、阻害率50%が測定できるように溶液の濃縮希釈を行った。

[번역]

InertSep C18-B 고상 추출

고상추출 컬럼은 지엘사이언스(주)의 InertSep C18-B (10g / 60mL)의 대형 컬럼을 이용하였으며, 그림 15에 나타낸 순서대로 여과액, 세정액 및 용출액을 제작한 후, 각 용액을 진공건조하고 그것에 증류수를 첨가하여 측정시료를 제작하였다. 이 때, 저해율 50 %가 측정할 수 있도록 용액을 농축, 희석하였다.

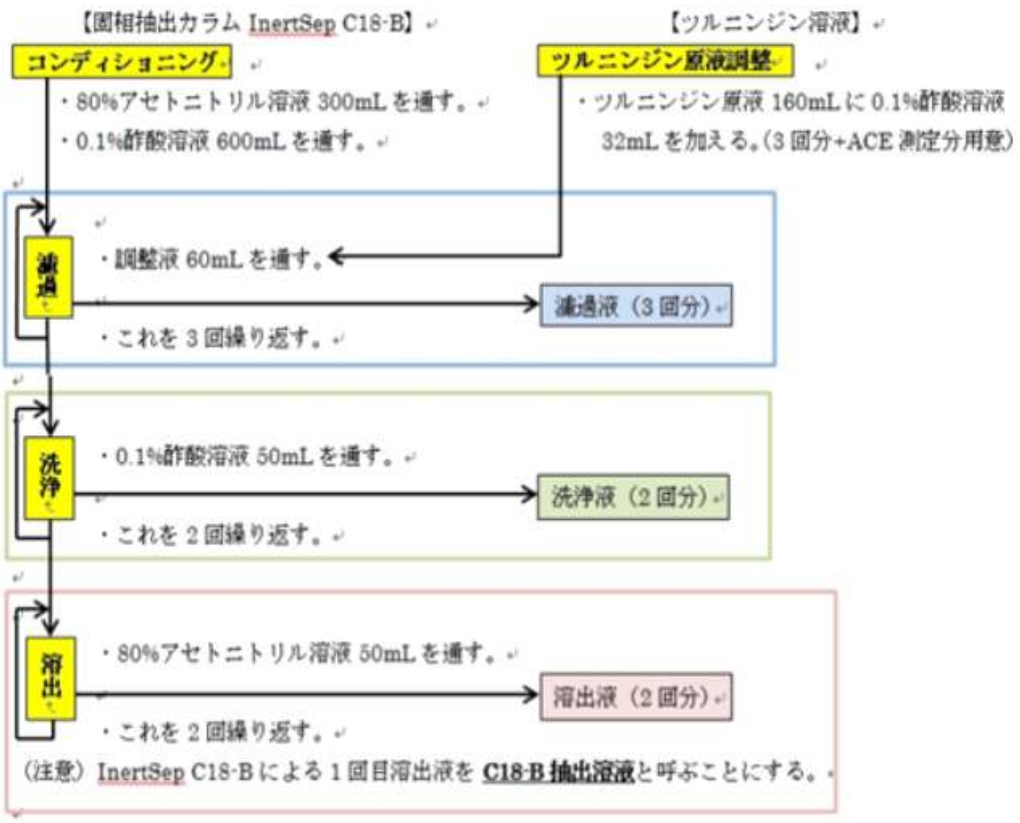
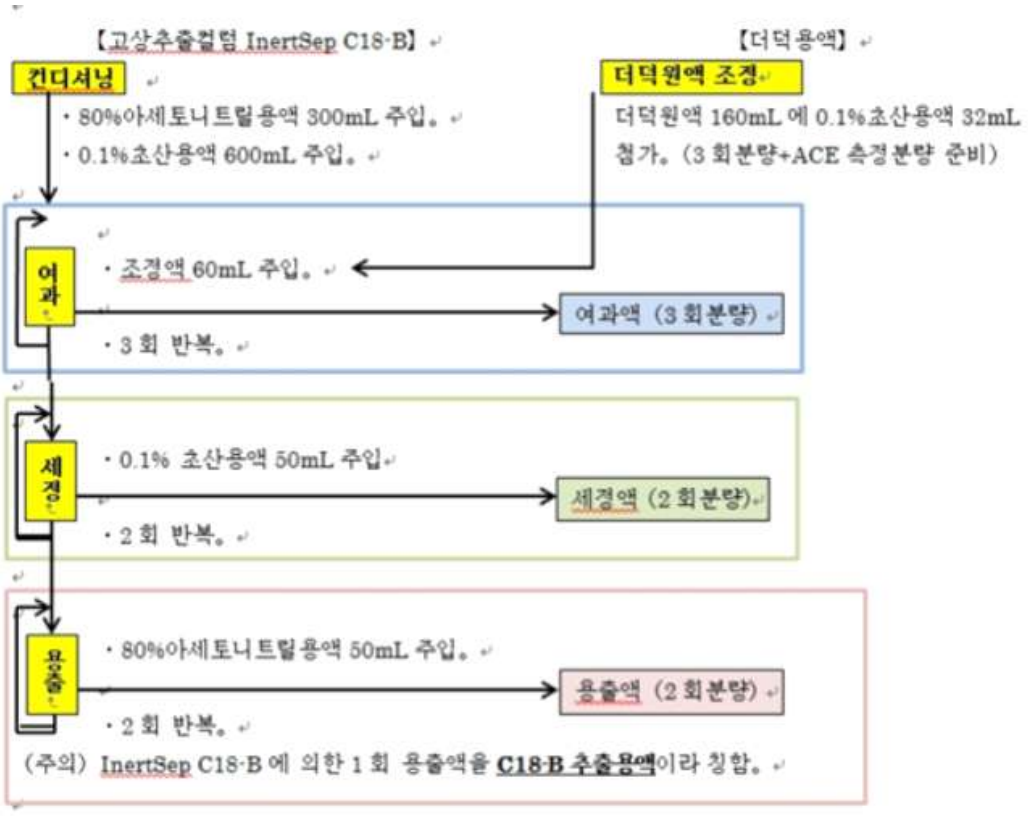


図１5. InertSep C18-Bによる抽出の手順



[그림 15. InertSep C18-B에 의한 추출 순서]

ツルニンジン粉末濃度に対する各溶液の結果を図16-20及び表1に示す。濃度が200g/Lになると粉末が水分を吸収し、ヘドロ状態に近いものになり、原液を抽出するのが困難になるため、これより高濃度の条件では行わなかった。表1より以下のことが分かった。

- 原液及び調整液、抽出液合計（濾過液＋洗浄液＋溶出液）のユニット数は大まかに一致していた。
- 濾過液に対して、1回目のユニット数は2回目、3回目に比べるとやや少ない傾向であった。
- 洗浄液並びに溶出液に関しては、2回目のユニット数は1回目に比べて非常に少なかった。

[번역]
더덕분말 농도에 대한 각 용액의 결과는 그림 16-20과 표 1에 나타냈다. 농도가 200g / L 이 되면 분말이 수분을 흡수하고, 끈적한 상태처럼 되어, 원액을 추출하는 것이 곤란하므로 이보다 고농도의 조건에서 실시했다. 표 1로부터 다음과 같이 확인되었다.
- 원액 및 조정액, 추출액 합계 (여과액 + 세정액 + 용출액)의 단위 수는 대략적으로 일치했다.
- 여과액에 대해서 1 번째 단위 수는 2 번째, 3 번째에 비하면 다소 적은 경향이었다.
- 세정액 및 용출액에 관해서는, 2 번째의 단위 수는 1 번째에 비해 매우 적었다.

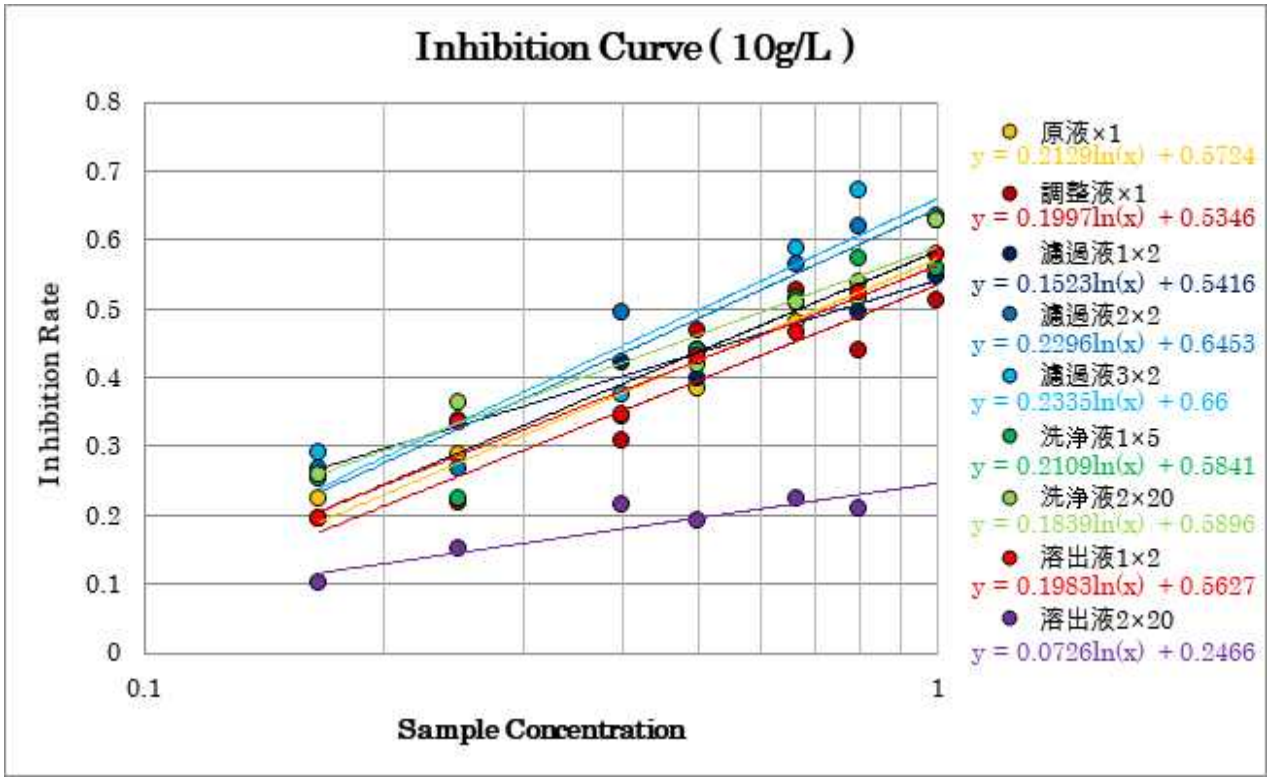


図16. ツルニンジン粉末条件10g/Lの阻害曲線
[그림 16. 더덕분말 조건 10g/L 의 저해곡선]

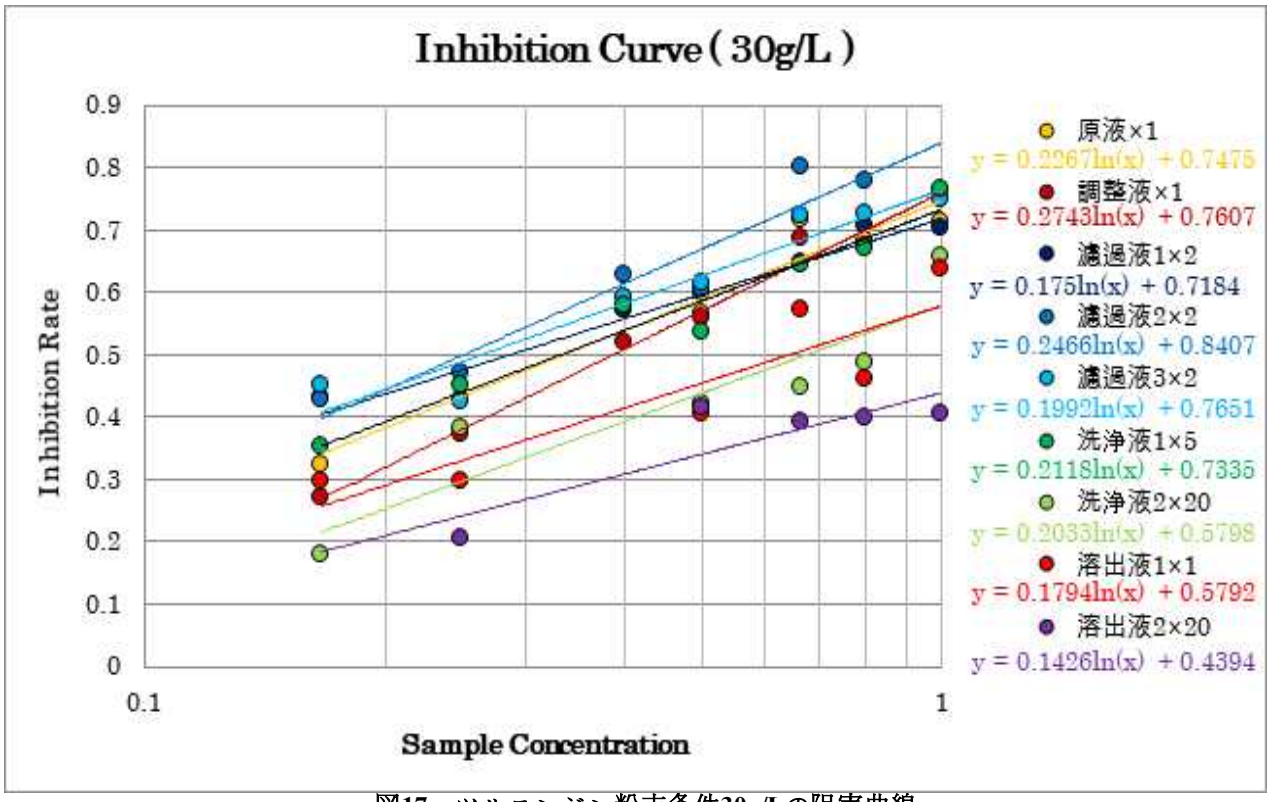


図17. ツルニンジン粉末条件30g/Lの阻害曲線

[그림 17. 더덕분말 조건 30g/L 의 저해곡선]

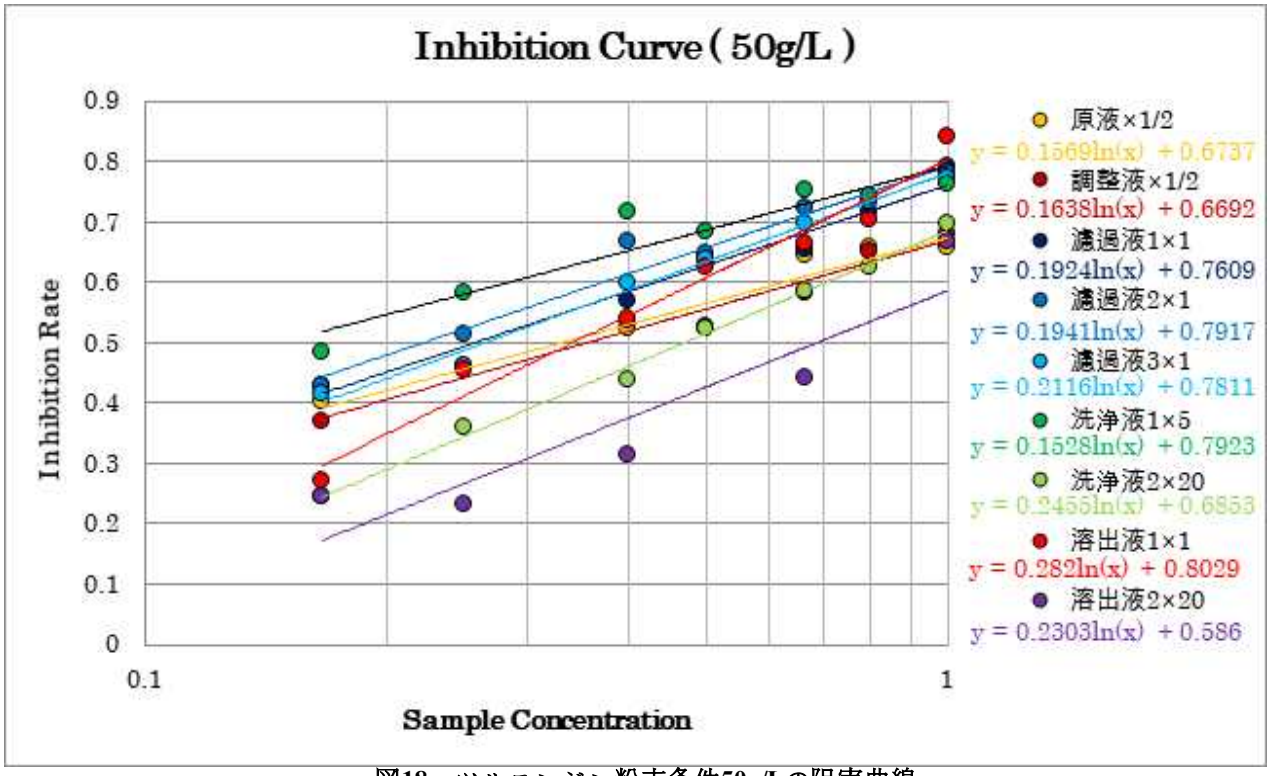


図18. ツルニンジン粉末条件50g/Lの阻害曲線

[그림 18. 더덕분말 조건 50g/L 의 저해곡선]

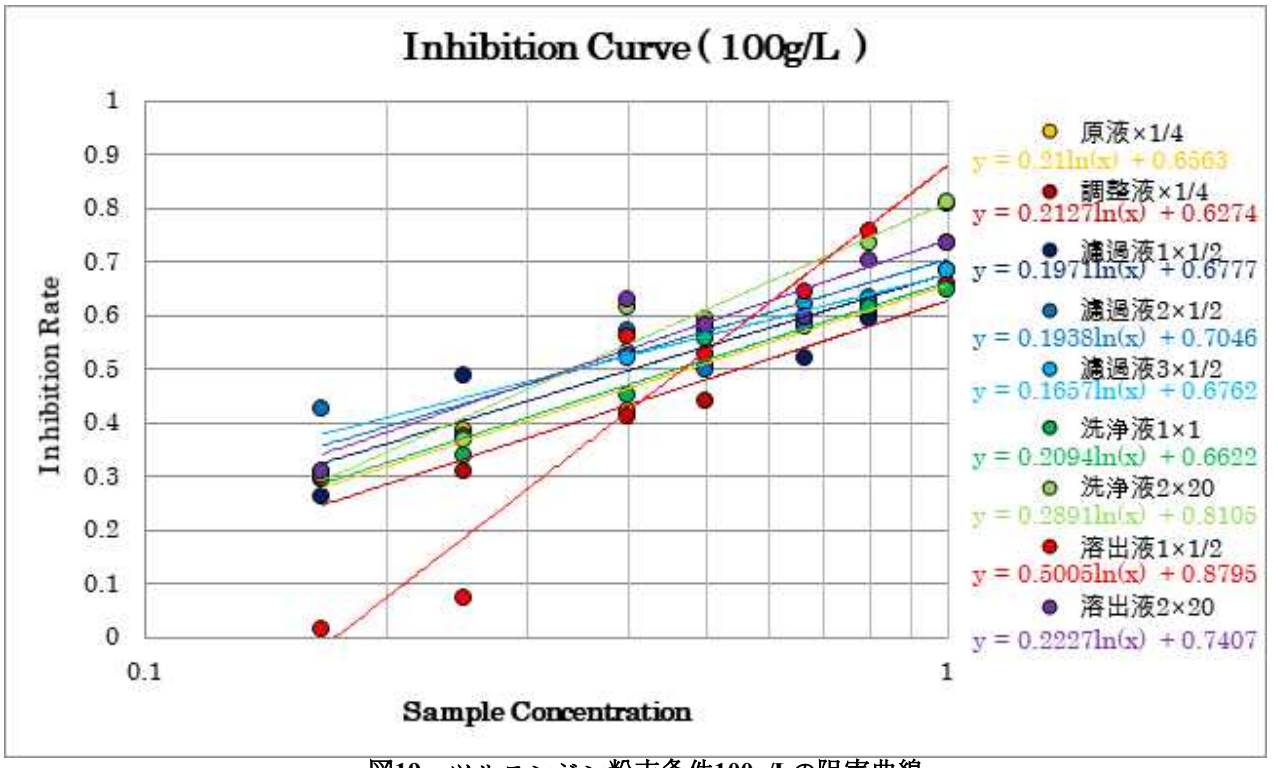


図19. ツルニンジン粉末条件**100g/L**の阻害曲線

[그림 19. 더덕분말 조건 100g/L 의 저해곡선]

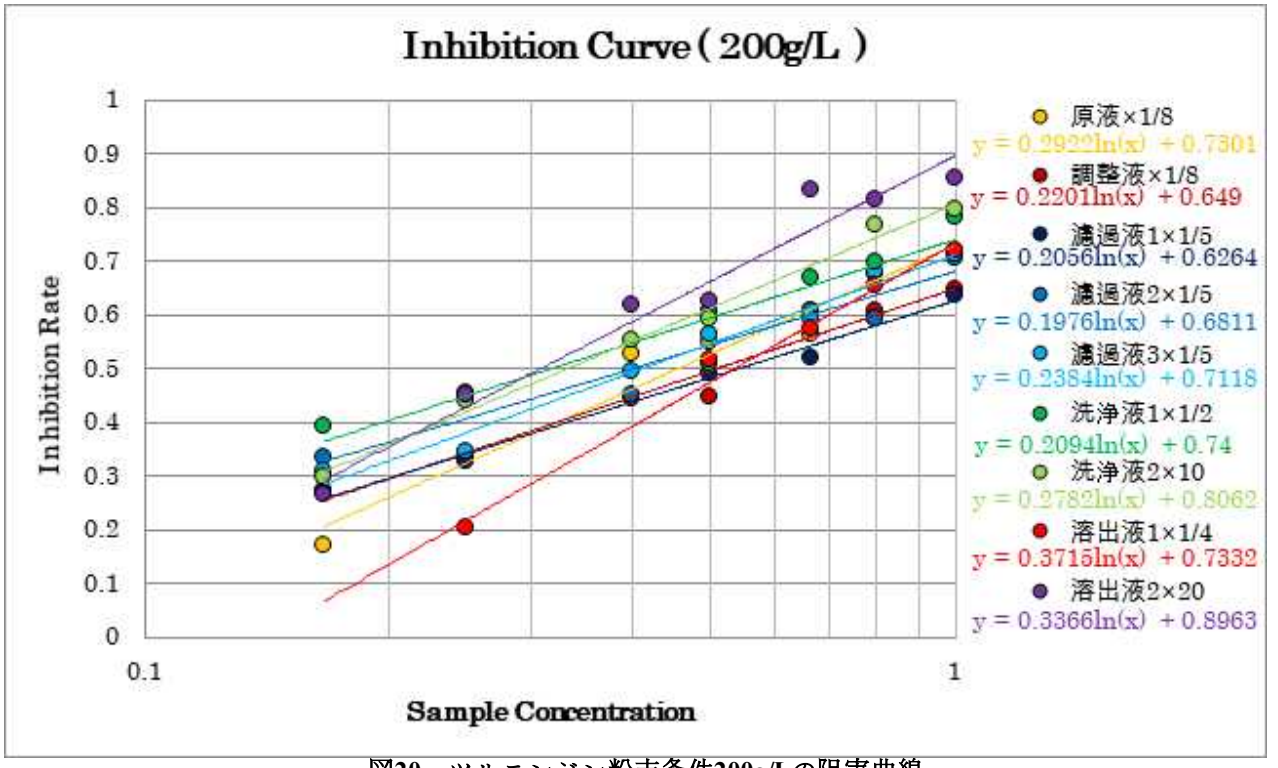


図20. ツルニンジン粉末条件**200g/L**の阻害曲線

[그림 20. 더덕분말 조건 200g/L 의 저해곡선]

表3. 各ツルニンジン粉末条件での阻害率50%とユニット数

[표 3. 각 더덕분말 조건에서의 저해율 50%와 Unit 수]

粉末濃度(분말농도) (g/L)		10	30	50	100	200
原液 (원액)	容量 (μL)	150000				
	濃縮割合 (倍)	1	1	1/2	1/4	1/8
	IC50%	0.71172	0.33563	0.33052	0.47507	0.45499
	ユニット (U)	210756	446923	907648	1262962	2637406
調整液 (조정액)	容量 (μL)	180000				
	濃縮割合 (倍)	1	1	1/2	1/4	1/8
	IC50%	0.84092	0.38658	0.35595	0.54938	0.50816
	ユニット (U)	214052	465623	1011380	1310569	2833770
抽出液合計 (추출액합계)	ユニット (U)	209298	450664	952071	1324661	2746735
濾過液 1回目 (여과액 1회차)	容量 (μL)	60000				
	濃縮割合 (倍)	2	2	1	1/2	1/5
	IC50%	0.76098	0.28708	0.25768	0.40593	0.54076
	ユニット (U)	39423	104501	232845	295617	554778
濾過液 2回目 (여과액 2회차)	容量 (μL)	60000				
	濃縮割合 (倍)	2	2	1	1/2	1/5
	IC50%	0.52710	0.25118	0.22250	0.34794	0.39992
	ユニット (U)	56915	119437	269664	344888	750155
濾過液 3回目 (여과액 3회차)	容量 (μL)	60000				
	濃縮割合 (倍)	2	2	1	1/2	1/5
	IC50%	0.50398	0.26426	0.26489	0.34529	0.41130
	ユニット (U)	59527	113525	225611	347533	729388
洗浄液 1回目 (세정액 1회차)	容量 (μL)	50000				
	濃縮割合 (倍)	5	5	5	1	1/2
	IC50%	0.67115	0.33206	0.14764	0.46089	0.31786
	ユニット (U)	14900	30116	67731	108486	314600
洗浄液 2回目 (세정액 2회차)	容量 (μL)	50000				
	濃縮割合 (倍)	20	20	20	20	10
	IC50%	0.61433	0.67535	0.47011	0.34163	0.33266
	ユニット (U)	4069	3702	5318	7318	15031
溶出液 1回目 (용출액 1회차)	容量 (μL)	50000μL				
	濃縮割合 (倍)	2	1	1	1/2	1/4
	IC50%	0.72892	0.64309	0.34160	0.46849	0.53381
	ユニット (U)	34297	77750	146370	213452	374669
溶出液 2回目 (용출액 2회차)	容量 (μL)	50000				
	濃縮割合 (倍)	20	20	20	20	20
	IC50%	32.798	1.5295	0.68837	0.33932	0.30809
	ユニット (U)	76	1634	3632	7368	8115

ツルニンジン粉末濃度に対する原液、調整液及び濾過液合計のユニット数の変化を図21に示す。共に200g/Lまで比例関係であることが分かった。50g/Lが若干ずれているのは、粉末を入れるのにやや手間取り、他のものと比べて水の蒸発量が多くなったため、濃度が濃くなり、ユニット数が増えたためと思われる。また、洗浄液合計及び溶出液合計のユニット数の変化を図22に示す。洗浄液合計は濾過液合計と異なり、ある程度濃くなると比例関係が失われ、増加する傾向がみられる。溶出液合計でも、ある程度濃くなると比例関係が失われ、逆に減少する傾向がみられる。

このとこから、今回のInertSep　C18-Bでの抽出において、最適な粉末濃度は溶出液合計の比例関係から外れる直前の濃度、即ち、約70～80g/Lと考えられる。

[번역]
더덕분말 농도에 대한 원액, 조정액 및 여과액 합계 단위 수의 변화를 그림 21에 나타냈다. 모두 200g/L까지 비례 관계임을 알 수 있었다. 50g/L이 약간 어긋나 있는 것은 분말을 넣는데 다소 시간이 걸려, 다른 것들에 비해 물의 증발량이 많아졌기 때문에 농도가 짙어지고 단위 수가 늘어났기 때문으로 보인다. 또한 세정액 합계 및 용출액 합계 단위 수의 변화를 그림 22에 나타냈다. 총 세정액은 총 여과액과 달리 어느 정도 농도가 짙어지면 비례관계가 상실되어 증가하는 경향이 보인다. 총 용출액에서도 어느 정도 농도가 짙어지면 비례관계가 사라져서 역으로 감소하는 경향을 보인다.
따라서 InertSep C18-B에서의 추출에 있어서 최적의 분말농도는 총 용출액의 비례관계로부터 이탈 직전의 농도, 즉 약 70 ~ 80g/L 인 것으로 생각되었다.

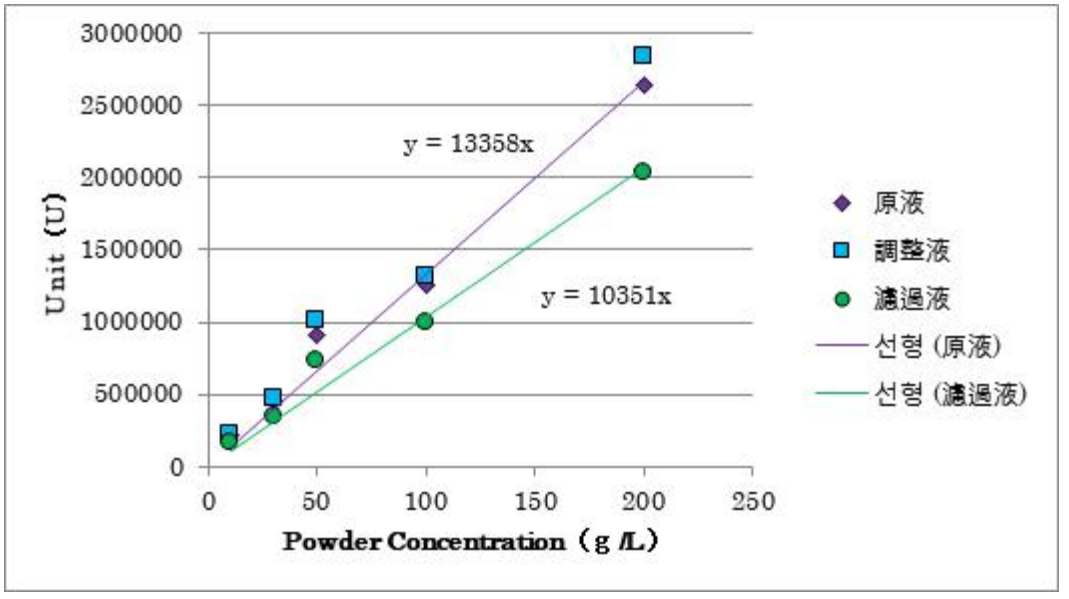


図21. ツルニンジン粉末濃度に対する原液、調整液及び濾過液合計のユニット数の変化
[그림 21. 더덕분말 농도에 대한 원액, 조정액 및 여과액 합계 Unit 수의 변화]

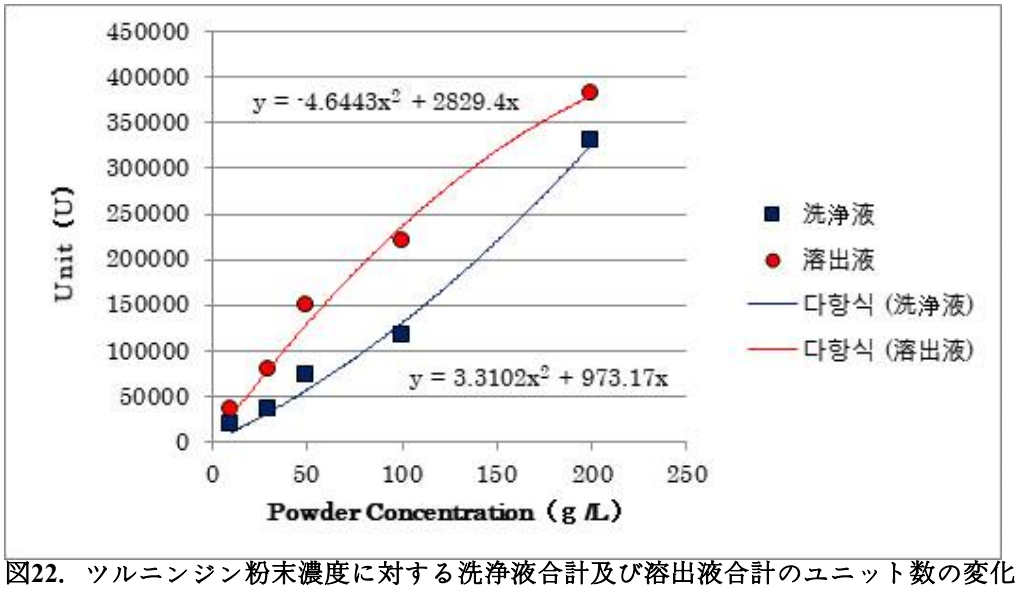


図22. ツルニンジン粉末濃度に対する洗浄液合計及び溶出液合計のユニット数の変化
[그림 22. 더덕분말 농도에 대한 총 세정액 및 총 용출액 Unit 수의 변화]

5. メタノール沈殿による阻害物質（Tangshenoside Ⅰ）の採取

予備実験

阻害物質の抽出において簡易的で有効な方法として、エタノール沈殿法を試みた。予備実験として、どれくらいのエタノール濃度で沈殿するかを調べた。手順を下記に示す。

①純水300mLを沸騰させ、その中にツルニンジン粉末9gを入れ、1分間加熱し、自然冷却させる。この煎じた溶液を遠心機（8000rpm、10分間）にかけ、上澄み液を採取する。

②4℃で一晩置き、更に遠心機（10000rpm、10分間）にかけ、上澄み液を採取し、その上澄み液8mLを真空乾燥させ、その後、純水1mLを加え溶かす。

③更に、70%ギ酸を加え、約pH2.5にし、更に遠心機（10000rpm、20分間）にかけ、上澄み液を採取する。

④濃度が40%以下の溶液に対して、上澄み液100μLに濃度が規定の倍のエタノール液100μLを加えて、規定の濃度にする。この各溶液から1μL 取り出し、それを真空乾燥し、純水2μL を加えて、通常の測定試料1μL でACE測定を行う。

なお、濃度40%でも溶けることを確認したので、更に、濃い濃度を溶液でも調べた。

⑤④の全ての各溶液の濃度にエタノールを加えて一旦40%とし、溶液を合わせた試料溶液を再度遠心機（10000rpm、20分間）にかける。この時、上澄み液約2mLを得ることができた。

⑥上記溶液を9本のチューブに分け、真空乾燥を行い、そのチューブに50%以上の各溶液200μLを加え遠心機（10000rpm、20分間）にかける。40%以下の溶液と同様に、この各溶液から1μL 取り出し、それを真空乾燥し、純水2μL を加えて、通常の測定試料1μL でACE測定を行う。

これらの結果を表2にまとめた。なお、阻害率の値が大きい程、阻害物質の量が多いことを示す。

この表より、エタノール濃度40%以下と50%以上では溶かし方の違いはあるが、ツルニンジン溶液には濃度75~80%で溶け辛くなっているにも関わらず、阻害率は高いことから、沈殿する阻害物質以外の不純物が存在することが推測される。また、阻害物質は高濃度のエタノール溶液にも溶けることから、非常に水に溶け易い物質であり、濃度90%辺りで沈殿する可能性が考えられる。

[번역]
메탄올 침전에 의한 저해물질(Tangshenoside Ⅰ)의 채취
예비 실험

저해물질의 추출에 있어서 간편하고 효과적인 방법으로 에탄올 침전법을 시도했다. 예비실험으로 어느 정도의 에탄올 농도에서 침전되는가를 조사했다. 그 순서는 아래와 같다.
① 증류수 300mL를 끓여 그 안에 더덕분말 9g을 넣고 1 분간 가열하여 자연냉각시킨다. 이 용액을 원심분리기(8000rpm, 10 분간)에서 분리하여 상등액을 취한다.
②4℃에서 하룻밤 놓아두고 다시 원심분리(10000rpm, 10분)하여 상등액을 취하고, 그 상등액 8mL를 진공건조시킨 후, 증류수 1mL를 첨가하여 녹인다.
③ 또한, 70% 포름산을 첨가하여 약 pH 2.5로 다시 원심분리(10000rpm, 20분)하여 상등액을 취한다.
④ 농도 40% 이하 용액에 대해 상층액 100μL 농도가 규정의 2배의 에탄올 용액 100μL를 가하여 규정농도로 한다. 이 각 용액으로부터 1μL를 취해 진공건조하고 증류수 2μL을 가하여 통상의 측정시료 1μL에서 ACE를 측정한다.
또한, 농도 40%에서도 녹는 것을 확인했기 때문에 더 진한 농도의 용액에 대해서도 조사했다.
⑤ ④의 모든 각 용액의 농도에 에탄올을 가하여 일단 40%로 하고, 용액을 합하여 시료용액을 다시 원심분리(10000rpm, 20 분)하였다. 이때 상층액 약 2mL를 얻을 수 있었다.
⑥ 상기 용액을 9개의 튜브로 나누어 진공건조하여 그 튜브에 50% 이상의 각 용액 200μL를 가하여 원심분리(10000rpm, 20 분) 하였다. 40% 이하의 용액에서와 마찬가지로 이러한 각 용액으로부터 1μL 취해서 진공건조하고, 증류수 2μL을 가하여 통상의 측정시료 1μL에서 ACE를 측정한다.
이러한 결과를 표 2에 정리하였다. 또한 저해율 값이 클수록 저해물질의 양도 많은 것을 알 수 있다.
이 표에서 에탄올 농도 40% 이하와 50% 이상에서는 용해 방법의 차이는 있지만, 더덕 용액은 농도 75~80%에서는 용해하기 어려움에도 불구하고 저해율이 높은 것은 침전하는 저해물질 이외의 불순물이 존재하는 것으로 추측된다. 또한 저해물질은 고농도의 에탄올 용액에도 용해되어 물에 용해하기 매우 쉬운 물질이며, 농도 90% 근처에서 침전 가능성을 생각할 수 있다.

表4. エタノール濃度の違いによる阻害物質の溶け易さ

[표 4. 에탄올 농도의 차이에 의한 저해물질의 용해 용이성]

濃度% (농도 %)	阻害率 (저해율)	溶液の状態 (용액상태)	濃度% (농도 %)	阻害率 (저해율)	溶液の状態 (용액상태)
0	0.83	溶ける(용해됨)	50	0.83	溶ける
5	0.87	溶ける	55	0.87	溶ける (白濁) (용해됨(백탁))
10	0.85	溶ける	60	0.87	溶ける (白濁)
15	0.87	溶ける	65	0.84	溶ける (白濁)
20	0.84	溶ける	70	0.84	溶ける (白濁)
25	0.75	溶ける	75	0.87	溶け辛い (잘 용해안됨)
30	0.83	溶ける	80	0.87	あまり溶けない (그다지 용해안됨)
35	0.75	溶ける	90	0.43	全く溶けない (전혀 용해안됨)
40	0.80	溶ける	100	0.16	全く溶けない

5.1 80%エタノール溶液と95%エタノール溶液での検討

予備実験の結果を踏まえて、エタノール濃度が80%の溶液と95%の溶液で以後の検討を行っていく。試料作製手順を下記に示す。

①純水300mLを沸騰させ、その中にツルニンジン粉末9gを入れ、1分間加熱し、自然冷却させる。この煎じた溶液を遠心機（8000rpm、10分間）にかけ、上澄み液を採取する。

②4℃で1晩置き、更に遠心機（10000rpm、10分間）にかけ、上澄み液を採取し、その上澄み液8mLを真空乾燥させ、その後、純水1mLを加え溶かす。

③70%ギ酸を15μL加え、約pH2.5にする。更に、エタノール4mLを加えて、一晩4℃で置き、遠心機（10000rpm、20分間）にかけ、上澄み液と沈殿物（白濁液）を採取する。

④③の上澄み液2mLを取り、それにエタノールを6mL加え、一晩置き、遠心機（10000rpm、20分間）にかけ、上澄み液と沈殿物（白濁液）を採取する。

⑤下記の各溶液を真空乾燥させ、純水2μL を加えて、通常の測定試料1μL でACE測定を行う。

80%エタノール溶液 上澄み液：2μL
沈殿物（白濁液：2μL
95%エタノール溶液 上澄み液：16μL
沈殿物（白濁液：2μL

これらの阻害率の結果を表3に示す。なお、阻害率の値が大きい程、阻害物質の量が多いことを示す。

80%エタノール溶液では、同量の溶液で、上澄み液と沈殿物（白濁液）の阻害率が異なることから、阻害物質は上澄み液の方にあることが推測される。95%エタノール溶液での上澄み液では、80%エタノールの上澄み液を4倍に希釈していているが、測定試料としてその2倍の濃さで測定を行っているため、阻害率はやや高めの値になったと考えられる。もう一方の沈殿物（白濁液）では、阻害率が若干高い値になっていることから、95%エタノール溶液では上澄み液及び沈殿物（白濁液）の両方に存在している可能性が考えられる。

以上のことから、80%エタノール溶液において、阻害物質（TangshenosideⅠ）が上澄み液の方に溶けていることから、沈殿物（白濁液）である不純物を取り除く方法として有効だと思われる。

その他として、エタノール沈殿での実験において、下記のような注意事項があった。

- 真空乾燥した試料にいきなり高濃度のエタノールを入れた場合、白濁したり、溶けないことがある。
- 真空乾燥した試料に少量の純水を加えた場合、ゲル化することがある。
- 最適時間は不明だが、一晩以上低温で保管が必要である。

[번역]

5.1 80% 에탄올 용액과 95% 에탄올 용액에서의 검토

예비실험 결과를 근거로 하여 에탄올 농도가 80%의 용액과 95%의 용액에서 검토를 행하였으며, 시료 제작 순서는 다음과 같다.

① 증류수 300mL를 끓여 그 안에 더덕분말 9g을 넣고 1 분간 가열하여 자연냉각시킨다. 이 용액을 원심분리(8000rpm, 10 분간)하여 상등액을 취한다.

② 4℃에서 하룻밤 놓아두고 다시 원심분리(10000rpm, 10 분)하여쳐 상등액을 취하고, 그 상등액 8mL를 진공건조시킨 후, 증류수 1mL를 가하여 녹인다.

③ 70% 포름산 15μL 가하여 약 pH 2.5로 조정한다. 또한, 에탄올 4mL를 가하여 하룻밤 4℃에 놓아두고 원심분리(10000rpm, 20 분)하여 상등액과 침전물(백탁액)를 취한다.

④ ③의 상층액 2mL를 취하고, 그것에 에탄올 6mL 가하여 하룻밤 놓아두고 원심분리(10000rpm, 20 분)하여 상등액과 침전물(백탁액)를 취한다.

⑤ 아래의 각 용액을 진공건조시켜 증류수 2μL을 가하여 통상의 측정시료 1μL에서 ACE

를 측정한다.

80% 에탄올 용액 상층액 : 2μL

침전물(백탁액) : 2μL

95% 에탄올 용액 상층액 : 16μL

침전물(백탁액) : 2μL

이러한 저해율의 결과를 표 3에 나타냈다. 또한 저해율 값이 클수록 저해물질의 양이 많은 것을 알 수 있었다.

80% 에탄올 용액에서는 같은 양의 용액으로 상등액과 침전물(백탁액)의 저해율이 다르기 때문에 저해물질은 상층액 부분에 있는 것으로 추측되었다. 95% 에탄올 용액에서의 상층액에서는 80% 에탄올의 상층액을 4배로 희석한 것이지만 측정시료로 2배의 농도로 측정을 하기 때문에, 저해율은 약간 높은 값이 되었다고 생각된다. 침전물(백탁액)에서는 저해율이 약간 높은 값으로 되어 있기 때문에 95% 에탄올 용액에서는 상등액 및 침전물(백탁액) 모두에 존재하는 가능성을 생각할 수 있다 .

이상에서와 같이 80% 에탄올 용액에 있어서 저해물질(TangshenosideⅠ)이 상층액에 녹아 있기 때문에 침전물(백탁액)인 불순물을 제거하는 방법으로 유효하다고 생각된다.

그 외 에탄올 침전 실험에 있어서 다음과 같은 주의사항이 있다.

- 진공건조한 시료에 갑자기 높은 농도의 에탄올을 넣을 경우 백탁이 일어나거나 녹지 않는 경우가 있다.
- 진공건조한 시료에 소량의 증류수를 가하면 겔화가 형성될 수 있다.
- 최적시간은 불분명하지만, 하룻밤 이상 저온에 보관할 필요가 있다.

表 5. 80%及び95%濃度のエタノール溶液での阻害率

[표 5. 80% 및 95% 농도의 에탄올 용액에서의 저해율]

	80%エタノール溶液 (80% 에탄올 용액)	95%エタノール溶液 (95% 에탄올 용액)
上澄み液 (상등액)	0.80	0.87
沈殿物(白濁液) 침정물(백탁액)	0.38	0.59

5.2. 遠心濾過による阻害物質（TangshenosideⅠ）の採取

阻害物質の抽出において、別の方法として、遠心濾過法を試みた。手順を下記に示す。

① 前記の95%エタノール溶液の上澄み液8mLを真空乾燥させた後、純水250μLを加えて溶かす。

② 遠心機MC-150を用いて、フィルターMicrocon Ultracel YM-3（3kDa）による遠心濾過を行う。この時の遠心力は約9000Gである。

③ それぞれ1μLの濾過前の溶液、透過液、残存液の各溶液を真空乾燥させ、純水2μL を加えて、通常の測定試料1μL でACE測定を行う。

これらの阻害率の結果を表4に示す。なお、阻害率の値が大きい程、阻害物質の量が多いことを示す。

濾過前の溶液と透過液の阻害率が一致していることから、阻害物質はフィルターを透過していることが考えられる。また、残存液に対しては、やや少ない値になっていていることから、透過しきれていない阻害物質が存在するためだと推測される。

以上のことから、遠心濾過による阻害物質（TangshenosideⅠ）は透過液に含まれることから、不純物を取

り除く方法として若干ではあるが、有効な方法の一つと考えることができる。

[번역]
8.3. 원심여과에 의한 저해물질 (Tangshenoside Ⅰ)의 채취
저해물질의 추출에서 다른 방법으로 원심여과 방법을 시도했다. 그 순서는 아래와 같다.
① 상기의 95% 에탄올 용액의 상등액 8mL를 진공건조시킨 후, 증류수 250μL를 가하여 녹인다.
② 원심분리기 MC-150를 이용하여 필터 Microcon Ultracel YM-3 (3kDa)에 의한 원심여과를 행했다. 이때 원심력은 약 9000G이다.
③ 각각 1μL의 여과 전 용액, 투과액, 잔존액의 각 용액을 진공건조시켜 증류수 2μL을 가하여 통상의 측정시료 1μL에서 ACE를 측정한다.
이러한 저해율의 결과를 표 4에 나타냈다. 또한 저해율 값이 클수록 저해물질의 양이 많은 것을 나타낸다.
여과 전 용액과 투과액의 저해율이 일치하고 있기 때문에 저해물질은 필터를 투과하는 것으로 생각된다. 또한 잔존액에 대해서는 다소 낮은 값으로 나타나 투과하지 않은 저해물질이 존재하기 때문이라고 추측된다.
이상에서와 같이 원심여과에 의한 저해물질 (Tangshenoside Ⅰ)은 투과액에 포함되기 때문에 불순물을 제거하는 방법으로서 미미하지만 효과적인 방법의 하나로 생각할 수 있다.

表6. 遠心濾過による各溶液での阻害率
[표 6. 원심여과에 의한 각 용액에서의 저해율]

濾過前の溶液(여과 전 용액)	透過液(투과액)	残存液(잔존액)
0.97	0.98	0.90

6. 考察

ツルニンジンの熱水抽出物から、（ACE）阻害を認め、これを固相抽出及びHPLCで精製した。酸性HPLCと中性のHPLCの挙動（ピークの半値幅の変化）より、カルボキシル基のような弱酸性基を持つこと、UV吸収よりベンゼン環のような長い安定な共役系を持つことが予想された。この結果は、フェニルアラニン・チロシン・トリプトファン・ヒスチジンなどの環構造を持つアミノ酸の誘導体の可能性も考えられるが、遊離のアミノ酸の吸収との比較から、これらの可能性は低く、当初考えていたペプチド系のACE阻害剤ではないことが、予想された。具体的には、安息香酸やその誘導体の可能性が考えられた。非ペプチド系の化合物が予想されたので、HPLC精製物はNMRとMSによる構造解析を行った。NMRより、既存化合物の報告と比較してTangshenosideⅠであることが判明した。また、質量分析からも、TangshenosideⅠであることを確認することが出来るスペクトルが得られた。

TangshenosideⅠはツルニンジンやヒカゲツルニンジンに含まれる有効成分で、既に血中テストステロン濃度低下抑制（滋養強壮）があるとして、特許が出されているが、ACE阻害による血圧降下作用が予想されることは報告されていない。

今後、動物実験にて、ツルニンジン熱水抽出物やその簡易生成物による血圧降下の作用を調べ、血圧降下物質として確定できるかの判定が強く望まれる。

[번역]

9. 고찰

더덕의 열수추출물로부터 ACE 저해가 인정되어, 이를 고상 추출 및 HPLC로 정제하였다. 산성 HPLC 및 중성의 HPLC의 거동 (피크의 반치 폭의 변화)보다 카르복실기와 같은 약산성기를 가지는 것, UV 흡수보다 벤젠 고리와 같은 긴 안정 공역계를 가지는 것으로 예상되었다. 이 결과는 페닐알라닌 · 티로신 · 트립토판 · 히스티딘 등의 고리 구조를 가진 아미노산 유도체의 가능성도 생각할 수 있지만, 유리 아미노산 흡수와의 비교에서 이러한 가능성은 낮고, 처음에 생각했던 펩타이드계의 ACE 억제제가 아니라는 것이 예상되었다. 구체적으로는, 안식향산이나 그 유도체일 가능성이 있는 것으로 추측되었다. 비펩타이드계 화합물이 예상되었기 때문에, HPLC 정제물은 NMR 및 MS에 의한 구조 해석을 실시했다. NMR분석을 통해 기존 화합물의 보고와 비교하여 Tangshenoside I 인 것으로 밝혀졌다. 또한 질량분석에서도 Tangshenoside I 임을 확인할 수 있는 스펙트럼이 얻어졌다.

Tangshenoside I 은 더덕 혹은 만삼에 포함된 유효성분으로 이미 혈중 테스토스테론 농도저하 억제(자양 강장) 작용이 있는 것으로 특허가 나와 있지만, ACE 억제에 의한 혈압강하 작용이 예상되는 것은 보고되고 있지 않다.

앞으로 동물실험에서, 더덕 열수추출물 및 그 간이 생성물에 의한 혈압강하 작용을 조사하여, 혈압강하 물질로서 확정할 수 있는지의 판정이 강하게 요구된다.

[더덕으로부터 항천식, 혈압강하 작용 생리활성물질 단리 및 약리적 효능 검증]

1. 더덕의 생리활성물질 스크리닝 및 사포닌 분해산물 분리

가. 조추출물 조제 및 용매 분획

더덕 소재에 대하여 성분 분석 및 생리활성을 위하여 용매추출 및 용매분획을 하였다.

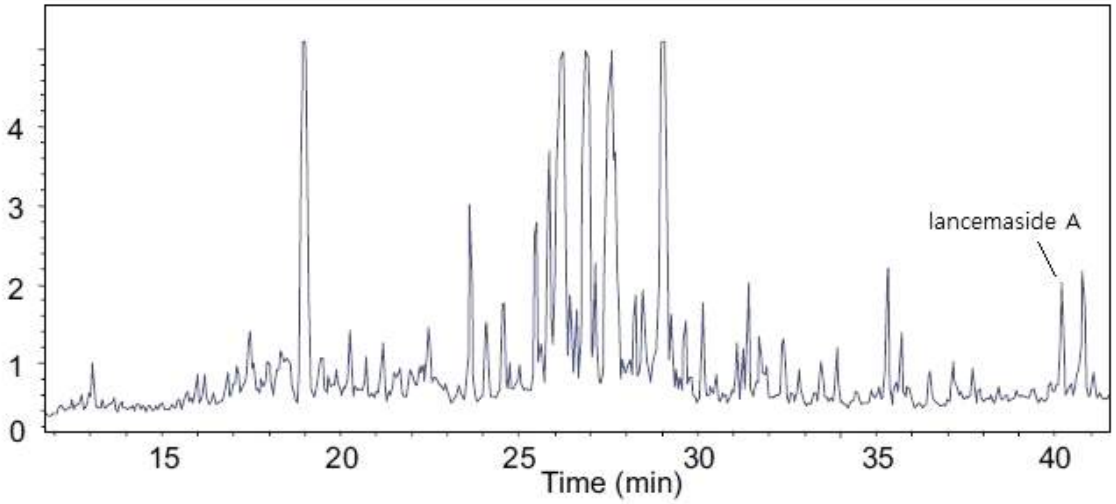
(1) 산지별 lancemaside A함량 비교

국내 산지별 더덕 사포닌의 지표성분으로 파악하고 있는 lancemaside A의 함량을 비교하기 위해 제주, 화순, 울진, 무주, 제천, 횡성 등 6개 지역의 더덕을 구입하여, 각각 열수 추출하여 동결건조한 다음 분말로 하여 분석용 시료로 하였다. 각 산지별 분석용 시료를 각각 0.2 g씩 취하여 70% MeOH을 넣고 50℃에서 30분간 초음파 추출하였다. 이를 13,000 rpm으로 15분간 원심 분리한 다음 상층 1 mL를 취하여 Sep-pak C18 cartridge로 정제한 다음 0.5 μm filter로 여과한 다음 HPLC용 시료로 하였다.

growing districts	lacemaside A (mg/kg)
Jeju	110.2±13.2
Hwasun	103.5±10.1
Uljin	99.4±15.2
Muju	90.1± 9.6
Jecheon	90.9±20.1
Hoengseon	88.2± 8.5

산지별 lancemaside A의 함량을 비교한 결과, 지역별 차이는 크지 않았지만, 제주>화순>울진>무주>제천>횡성 순이었다. 이는 lancemaside A가 한국산 더덕에만 특징적으로 존재한다고 발표한 일본 湧永製藥의 결과와 일치하고 있다.

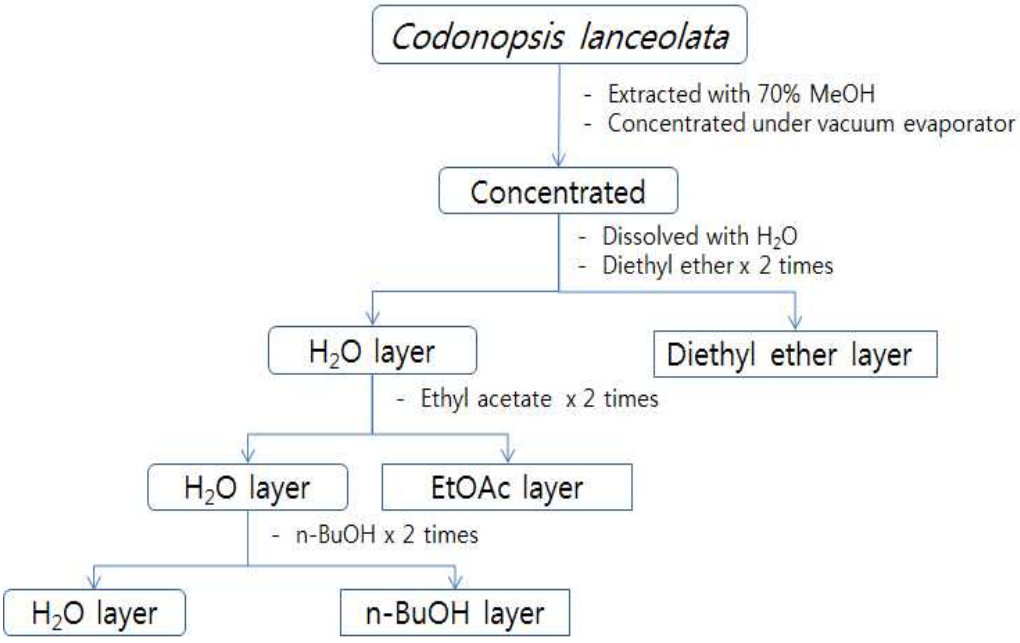
HPLC 분석은 컬럼 TSKgel ODS-100Z (4.6 mm ID x 150 mm, 5 μm particle size, TOSOH, Tokyo), 이동상은 0.1% formic acid 함유 27% CH_3CN 단일용매로 유속 1 mL/min, 35° C로 분석하였고, UV 205 nm에서 검출하였다. Injection volumn은 10 μL로 하였다. 이 조건하에서는 lancemaside A가 약 40 min에 검출되었다.



(2) 조추출물 조제 및 용매 분획

제주산 더덕 건조 시료 1 kg을 4 L의 70% MeOH에 7일간 실온에서 침지시킨 다음, 여과하여 여액은 rotary evaporator로 40℃에서 감압 농축하여 110 g (11%)의 조추출물을 얻었다. 이 조추출물을 용매의 극성에 따라 diethylether, EtOAc, n-BuOH 순으로 용매 분획하여 각각 5.02, 13.03, 43.03 및 40.36 g을 얻었다.

solvent	Yield (g)
Diethyl ether	5.02
EtOAc	13.03
n-BuOH	43.03
H_2O	40.36
Total	101.44



(3) 항천식활성 물질 in vitro 스크리닝방법 확립

천식에서 LTC4, LTD4 및 LTE4 등의 cysteinyl leucotrienes (C-LTs)은 병리학적으로 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 또한 arachidonic acid는 5-LO (5-lipoxygenase)에 의해 C-LTs로 변환되는 지방산 전구체로 잘 알려져 있다. 이 C-LTs는 기도와 평활근을 수축시키고 기관지 점액분비를 증강시키며 혈관투과성을 증가시킴으로써 부종을 초래한다. 따라서 RBL-1세포 (rat basophilic leukemia, 랫트 호염기성 백혈병 세포주) 유래의 5-LO활성을 50% 억제하는 농도 IC_{50}을 측정하여 천식억제 효능을 검정하는 방법을 검토하였다.

5-LO억제활성 측정에는 RBL-1 (大日本製薬)을 사용하고, 이에 따라 arachidonic acid가 5-HETE로 전환하는 효율을 효소활성으로 산출하였다. 즉 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) 수용액에 용해한 시료 (2×10^{-3} M, 5 μL)에 100 mM $CaCl_2$ 수용액 10 μL와 arachidonic acid의 MeOH용액 (10 mg/mL 10 μL)을 가하고 37℃에서 5분간 preincubation하였다. 여기에 0.15 M sucrose, 0.5 mM EDTA 및 1 mM glutathione을 함유하는 25 mM phosphate buffer (pH 7.4) 안에 RBL-1세포 (1×10^{7} cell/mL)를 분산시킨 현탁액 475 μL를 첨가하고 교반하고, 37℃에서 3분간 반응시켰다. 그 후 MeOH 500 μL를 가하여 반응을 정지시키고 이 용액을 20℃, 4,000 rpm으로 15분간 원심분리 하였다. 이 상등액 400 μL를 분취하여 HPLC 분석을 하였다. HPLC 분석은 COSMOSIL 5 C_{18}-MS (4.6 mm ID× 150 mm), 이동상은 0,04% acetic acid를 함유하는 60% CH_3CN 수용액으로 용출하고, UV 235 nm에서 측정하였다. 양성대조군으로는 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) 수용액에 용해한 6-gingerol (1×10^{-3} M, 5 μL)을 사용하였다. 시료를 첨가하지 않았을 때의 5-HETE 전환율을 100%로 하고 각 시료를 첨가하였을 때의 5-HETE 전환율과의 차이 [100 (%) - 5-HETE 전환율 (%)]을 5-LO 억제율로 하였다.

3회 반복시험 결과 n-BuOH분획, 즉 조사포닌 분획에서 5-LO 억제율이 74.3±8.3%로 가장

높게 나타나, 기존의 결과와 마찬가지로 사포닌분획에서 천식억제 활성이 있음을 강하게 시사하였다. 또한 H_2O 분획에서도 32.3±2.5%로 나와 H_2O 분획에 대한 연구도 필요한 것으로 사료된다.

Fraction / Inhibition (%)	CD	CC	CB	CW	CT	6-gingerol	DMSO
1 st	8.0	11.0	81.0	30.0	60.0	92.0	2.0
2 nd	6.0	14.0	77.0	35.0	60.0	89.0	5.0
3 rd	9.0	18.0	65.0	32.0	77.0	102.0	0.0
Average	7.7	14.3	74.3	32.3	65.7	94.3	2.3
S.D.	1.5	3.5	8.3	2.5	9.8	6.8	2.5

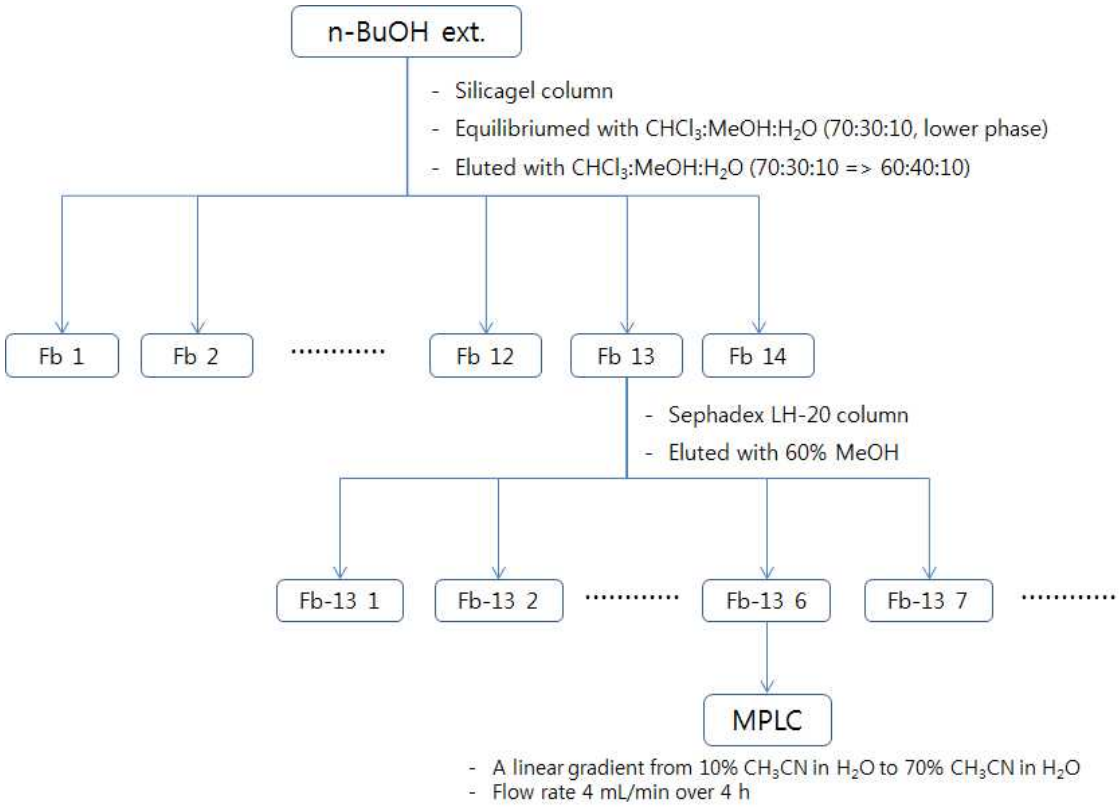
※ CD: Diethyl ether fraction, CC: $CHCl_3$ fraction, CB: n-BuOH fraction, CW : H_2O fraction, CT: crude extract

나. 추출물로부터 사포닌의 분획 단리

조사포닌을 얻기 위해 n-BuOH 분획 20 g에 대하여 $CHCl_3$:MeOH:H_2O (70:30:10, 하층) 용액으로 평형화시킨 silica gel을 column에 충진한 다음 $CHCl_3$:MeOH:H_2O 비율을 75:25:10에서 60:40:10으로 순차적으로 14분획 (Fb 1~Fb 14)을 용출하였다. 이 중 Fr. 13 (3.5 g)을 Sephadex LH-20 column을 이용하여 이동상으로 60% MeOH로 용출하여 분취하였다. Fb-16 6분획을 MPLC (이동상은 10% CH_3CN in H_2O => 70% CH_3CN in H_2O, 유속 4 mL/min, 4시간)로 lancemaside 19.5 mg을 얻었다.

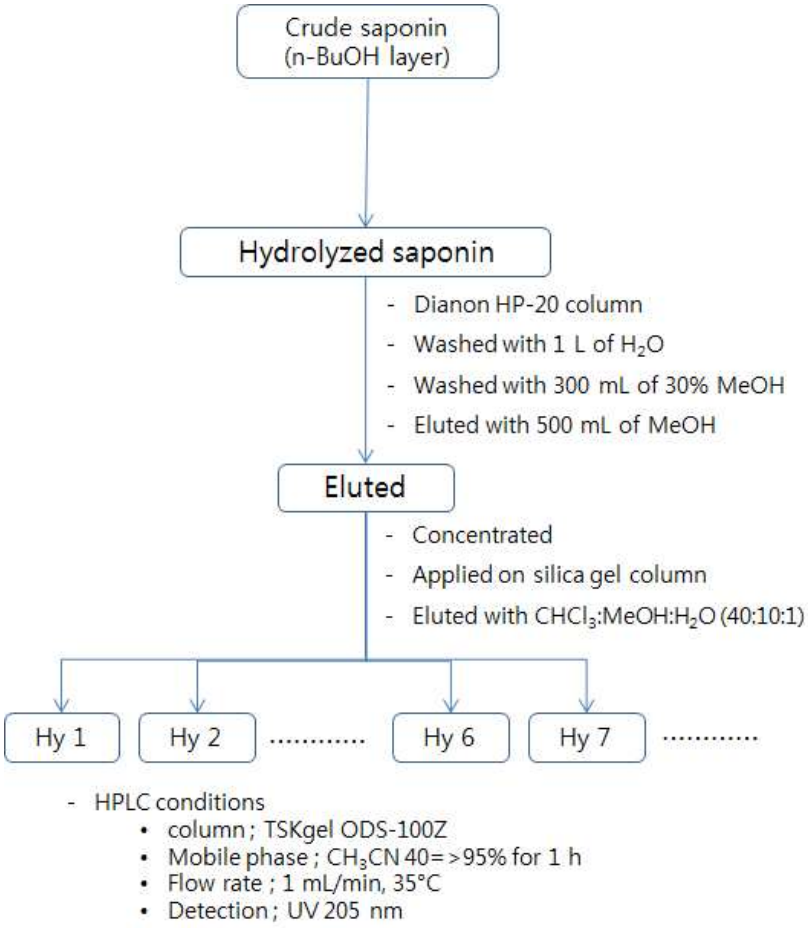
※ 전개용매 n-BuOH:EtOAc:H_2O (6:3:1)를 이용하여 TLC로 확인

Experimental no.	Lancemaside A (mg)
1	19.4
2	18.2
3	21.5
4	17.5
5	23.2
6	17.0
Average	19.5
SD	2.4


n-BuOH ext.
- Silicagel column
- Equilibriumed with $CHCl_3$:MeOH:H_2O (70:30:10, lower phase)
- Eluted with $CHCl_3$:MeOH:H_2O (70:30:10 => 60:40:10)
Fb 1
Fb 2
Fb 12
Fb 13
Fb 14
- Sephadex LH-20 column
- Eluted with 60% MeOH
Fb-13 1
Fb-13 2
Fb-13 6
Fb-13 7
MPLC
- A linear gradient from 10% CH_3CN in H_2O to 70% CH_3CN in H_2O
- Flow rate 4 mL/min over 4 h

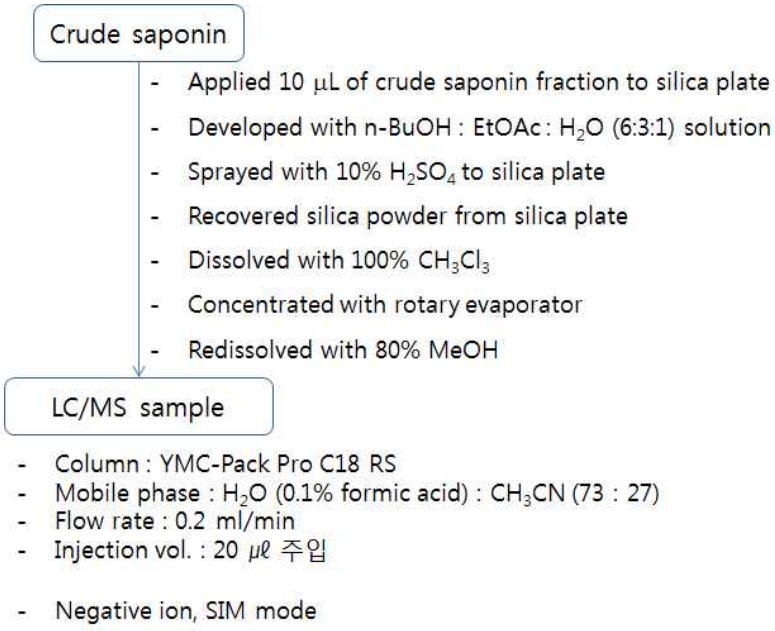
다. 가수분해효소에 의한 더덕사포닌의 가수분해

더덕에는 사포닌 성분이 많이 함유되어 있는 것으로 알려져 있고, 사포닌은 triterpene 성분이 당과 결합되어 있는 형태이다. 대부분의 사포닌은 인체에 섭취된 후에 장에서 장내세균에 의해 대사를 받아 당부분이 떨어져 나가는 것으로 알려져 있다. 따라서 0.5 mol/L sodium acetate buffer (pH 5.0) 1,000 mL에 β-glucuronidase와 더덕 조사포닌 20 g을 가하여 37°C에서 6시간 분해하였다. 가수분해액을 Diaion HP-20에 가하고 물 1 L와 300 mL 30% MeOH로 세척한 다음 500 mL MeOH로 용출하였다. 용출액을 농축하고 silicagel컬럼 ($CHCl_3$:MeOH:H_2O=40:10:1)로 용출하였다. HPLC 분석은 컬럼 TSKgel ODS-100Z, 이동상은 CH_3CN과 H_2O를 사용하였고 1시간동안 CH_3CN을 40~95%로 올리는 linear gradient를 이용하였고, 유속 1 mL/min, 35°C, UV 205 nm에서 분석하였다. 현재 HPLC 분석결과 해석과 MPLC에 의한 분리 및 구조결정을 진행하고 있다.



라. 추출물의 지표성분 설정 및 분석법 확립

추출물의 지표성분으로 설정한 lancemaside A와 그 가수분해 산물에 대한 분석법을 확립하기 위해 조사포닌 용액 10 μL를 Silica TLC plate에 적용하고, n-BuOH : EtOAc : H_2O (6:3:1) 용액으로 전개하였다. 한쪽 끝을 10% H_2SO_4로 발색시켜 lancemaside A와 그 가수분해 산물을 확인한 후 silica plate로부터 silica 분말을 긁어내어 $CHCl_3$로 용출하였다. 이를 농축한 다음 다시 80% MeOH에 녹여 LC/MS의 시료로 하였다. LC/MS의 조건은 Column : YMC-Pack Pro C18 RS, Mobile phase : H_2O (0.1% formic acid) : CH_3CN (73 : 27), Flow rate : 0.2 ml/min, Injection vol. : 20 ㎕로 하였다.



2. 더덕으로부터 생리활성물질 화합물의 동정 및 항천식, 혈압강하 효능 생리활성물질의 약리효능 분석

가. 더덕으로부터 생리활성물질 화합물의 분리, 정제, 구조 동정

(1) 더덕의 약리활성

더덕 (*Codonopsis lanceolata*)은 전통적 한약재로서 오랜 역사를 가지고 사용되어 왔다. 최근 더덕의 약리학적인 연구에 대한 수많은 논문들이 보고되고 있다. 이들 연구를 보면 더덕은 혈당을 조절하고, 면역력을 증가시키며, 조혈 등 뿐 아니라 식욕 증가 등의 활성을 갖고 있다고 보고하고 있다. 임상적으로는 식욕감퇴, 소화불량, 피로, 노이로제, 염증 등에 사용되고 있다. 더덕은 부작용이 없는 안전한 생약재로 간주되고 있으며, 때때로 인삼을 대신하는 강장제로도 사용되고 있다. 또한 최근에 수많은 연구가 항암활성, 항산화, 항궤양 및 항균 활성에 집중되고 있다. 또한 더덕의 화학적 성분은 스테롤, 단당류, 다당류, 배당체, 알칼로이드, 휘발성정유, 트리테르펜, 아미노산 및 무기물 등 그 조정이 매우 복잡하다. 이러한 복잡한 화학적 성분이 생약의 약리활성의 기본이 된다.

최근 수많은 더덕의 성분에 대한 연구가 이루어졌다. 이러한 결과를 종합해 살펴보면 이러한 다양한 화학적 성분이 각각 인간의 건강에 서로 다른 효능을 가지고 있음을 보여주고 있다. 특히 더덕에는 10종 이상의 배당체가 알려져 있으나, 본 과제에서는 더덕에서 혈중 testosterone의 농도 감소를 회복시킨다고 보고된 바 있는[1] 배당체 lancemaside A를 더덕으로 분리 정제하여 그 구조를 결정하였다.

(2) 조추출물 조제 및 용매 분획

본 실험에 공시한 재료는 제주도에서 재배한 3년근 더덕을 농가로부터 구입하여 사용하였다.

1차년도에 동결 건조한 더덕 분말 50g을 EtOH 30%, 50%, 70%, 100% 비율로 3회 반복 3회 반복 추출한 다음, 추출액을 감압농축기로 완전히 농축한 후에 무게를 측정하는 방법으로 에탄올 비율별 회수율을 조사하였다. 그 결과 EtOH 30%와 50%, 70% 추출물에서보다 상대적으로 높은 회수율을 보였으며, EtOH 100% 추출물에서는 낮은 수율을 보였다. 본 실험에서는 용

매를 가능하면 사용하지 않을 목적으로 30% 주정알코올을 사용하였다.

표 1. 주정알코올 비율에 따른 추출효율 비교

Solvent	Yield (g)
30% EtOH	14.59±0.44
50% EtOH	14.50±0.55
70% EtOH	13.22±0.09
100% EtOH	6.33±0.48

제주산 더덕 건조 시료 8 kg을 20 L의 30% 주정알코올에 7일간 실온에서 침지시킨 다음 (3회 반복), 여과하여 여액은 rotary evaporator로 40℃에서 감압 농축하여 910 g (11.4%)의 조추출물을 얻었다. 이 조추출물을 용매의 극성에 따라 diethylether, EtOAc, n-BuOH 순으로 용매분획하여 각각 41.2, 92.5, 300.1 및 350.6 g을 얻었다.

표 2. 더덕 추출물의 각 분획별 추출

Solvent	Yield (g)
Diethyl ether	41.2
EtOAc	92.5
n-BuOH	300.1
H_2O	350.6
Total	784.4

(3) 사포닌의 분획으로부터 lancemaside A의 단리

조사포닌을 얻기 위해 n-BuOH 분획 200g을 물에 현탁하여 Dianon HP20 (Mitsubishi Chemical Ind., Japan) 컬럼을 통과시키고, 물로 세척한 다음 MeOH로 용출하였다 (148g). 이 MeOH 용출액에 대하여 $CHCl_3$:MeOH (70:30) 용액으로 평형화시킨 silica gel을 column에 충진한 다음 $CHCl_3$:MeOH 비율을 75:25에서 60:40으로 순차적으로 용출하여 Fr 1 (4.2g), Fr. 2 (6.5g), Fr. 3 (3.9g), Fr. 4 (5.5g), Fr. 5 (8.8g), Fr. 6 (12.5g), Fr. 7 (8.8g), Fr. 8 (6.4g)을 얻었다. 이 중 Fr. 7 (1.4g)을 MPLC (RP-18, Waters) 이동상은 0.1% formic acid 함유 27% CH_3CN 단일용매로 유속 1 mL/min, 35° C에서 (UV 205 nm) 반복하여 lancemaside 45.5mg을 얻었다.

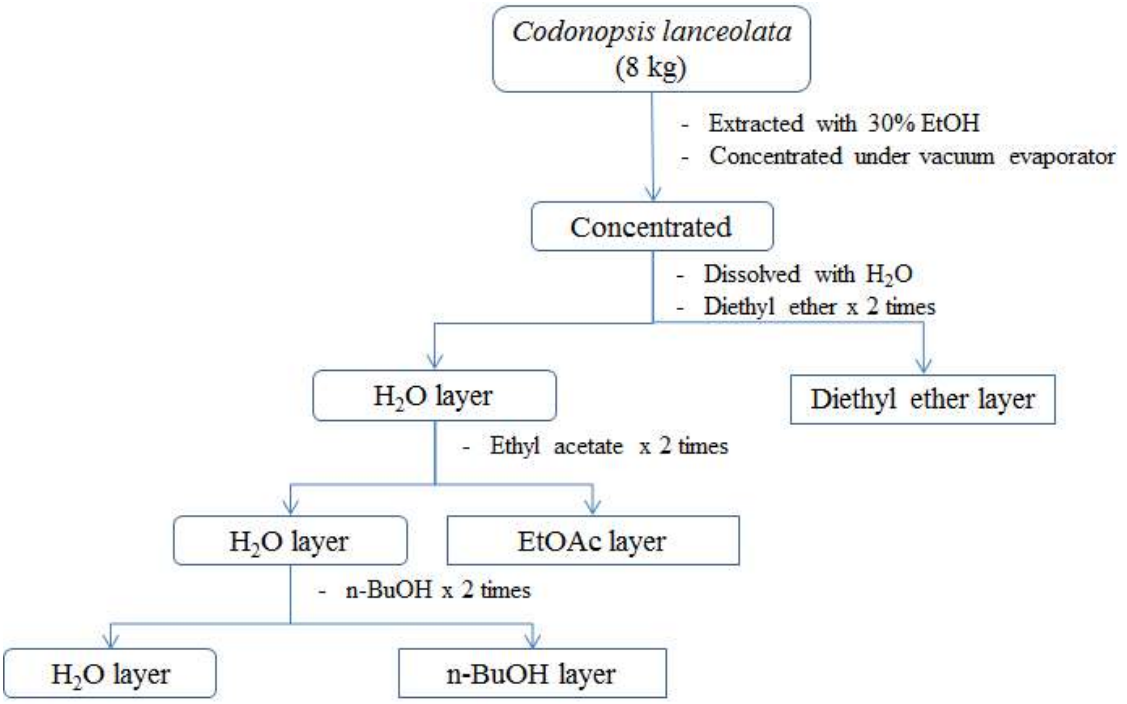


그림 1. 추출물로부터 사포닌의 분획 단리

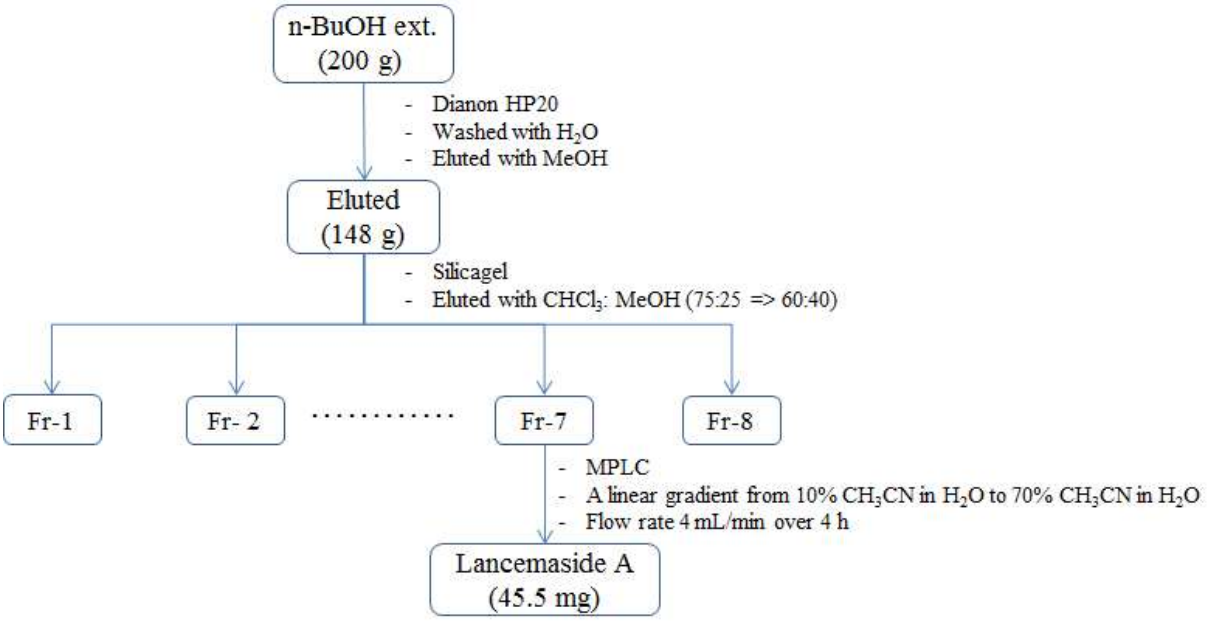


그림 2. n-BuOH 분획으로부터 lancemaside A의 분리 정제

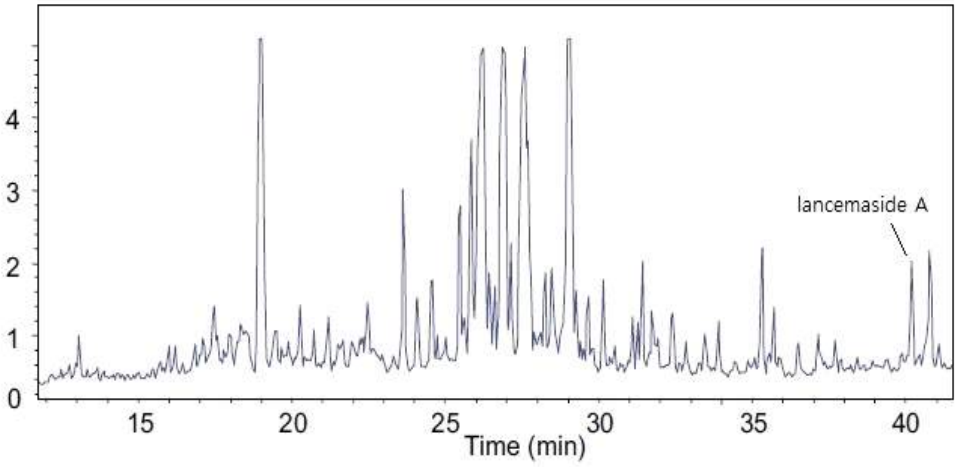


그림 3. 더덕 사포닌 분획의 HPLC 크로마토그램

(4) Lancemaside A의 가수분해

(가) 산가수분해

n-BuOH로부터 단리된 물질 25 mg을 30 ml MeOH에 녹이고 3 ml의 HCl을 가하고 2시간동안 환류시켰다. 환류한 반응액을 얼음물에 넣고 EtOAc로 추출하였다. EtOAc층을 농축하여 얻었고, 이를 TLC (n-BuOH:EtOAc:H_2O=6:3:1)로 정제하여 lancemaside A의 가수분해산물(aglycone)을 얻었다.

(나) 알칼리가수분해

n-BuOH로부터 단리된 물질 50 mg을 3% KOH-MeOH (50 ml)에 넣고 30분 환류시켰다. 반응액을 얼음물에 놓고 $CHCl_3$로 추출하였다. 이를 물로 세척한 다음 농축하고 MPLC를 반복하여 lacemaside A의 알칼리 가수분해물을 얻었다.

(5) 가수분해산물의 구조결정

^{1}H-NMR (500 MHz), ^{13}C-NMR (125 MHz)는 각각 Varian Inova 500 NMR spectrometer와 JEOL α-500 NMR spectrometer로 측정하였다. 내부표준물질로는 TMS (tetramethyl silane)로 δ값(ppm)으로 나타내었다. HR-ESI-MS는 Waters Micromass Q-Tof micromass spectrometer를 사용하였다.

n-BuOH로부터 단리된 물질은 3-O-β-D-glucuronoglucosyl-3-β,16-α-dihydroxyolean-12-en-28-oic acid 28-O-β-D-xylopyranosyl(1→3)-α-L-arabinopyranosyl-(1→4)-α-L-rhamnopyranosyl(1→3)-α-Larabinopyranosyl ester로 밝혀졌고, 이 물질은 개미취(*Aster tartaricus*)로부터 methyl ester로 단리된 aster saponin Hc로 이미 보고된 바 있다[2].

(4)에서 lancemaside A를 산가수분해한 물질을 MS와 NMR을 통하여 구조를 결정한 결과 lancemaside A의 aglycone인 echinocystic acid였고, 알칼리 가수분해산물은 lancemaside A의 prosapogenin인 3-O-β-D-glucuronoglucosyl-3-β,16-α-dihydroxyolean-12-en-28-oic acid로 밝혀졌다.

Lancemaside A; 흰색의 무정형 분말로서 HR-ESI-MS (negative mode): *m/z* 1189.5588 $[M-H]^-$ (Calcd for $C_{57}H_{89}O_{26}$, 1189.5642), ^{1}H-NMR 및 ^{13}C-NMR 데이터는 표 2, 표 3과 같다.

알칼리 가수분해산물인 Prosapogenin; 무정형 고체로서 HR-ESI-MS (negative mode): *m/z* 809.4322 $[M-H]^-$ (Calcd for $C_{42}H_{65}O_{15}$, 809.4323), ^{1}H-NMR 및 ^{13}C-NMR 데이터는 표 3, 표 4와 같다.

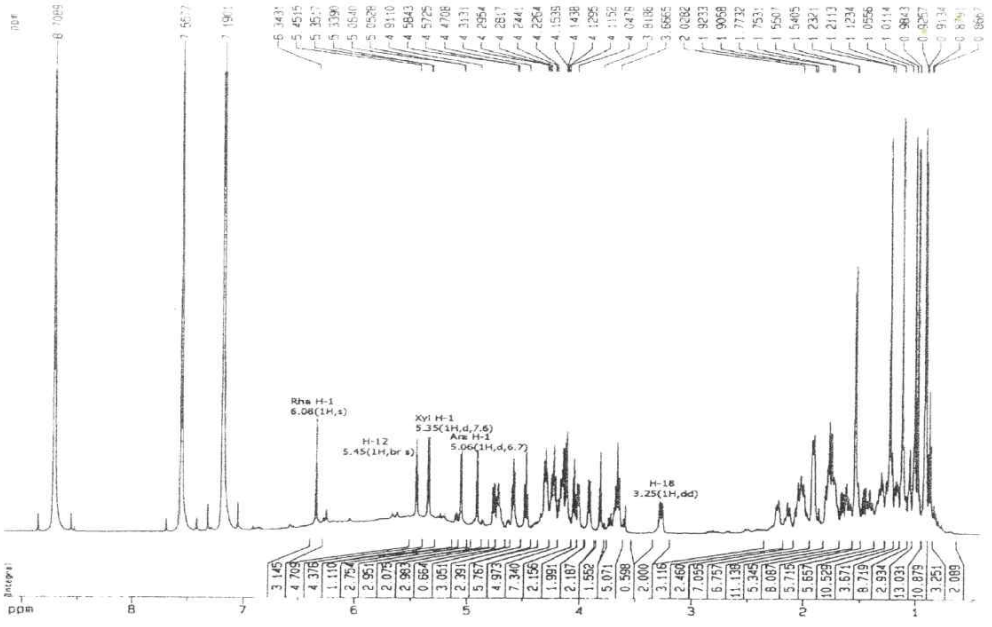


그림 4. Lancemaside A의 ^{1}H-NMR spectra (pyridine-d5)

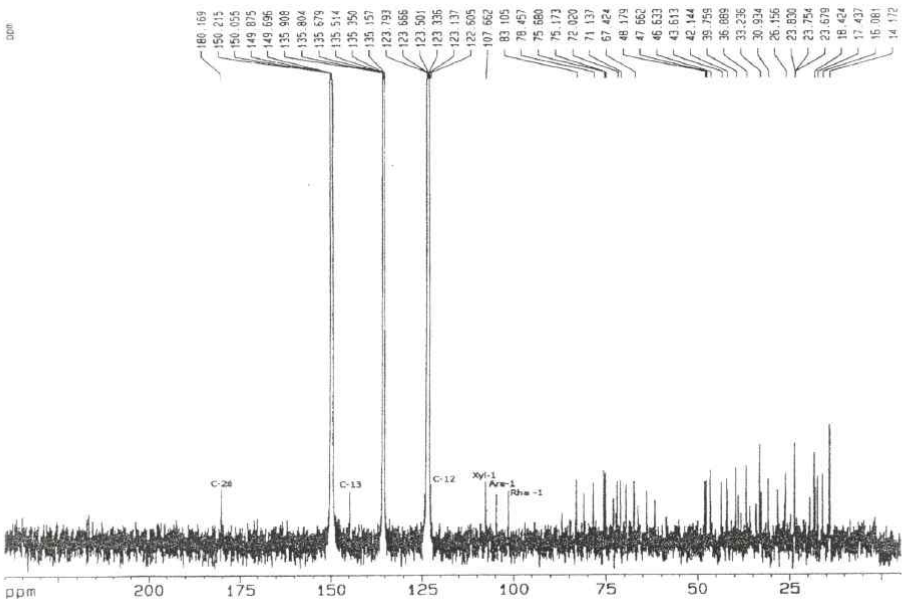


그림 5. Lancemaside A의 ^{13}C-NMR spectra (pyridine-d5)

표 3. Lancemaside A와 그 가수분해산물의 ^{1}H-NMR spectral Data (pyridine-d5)

Position	Lancemaside A	Echinocystic acid	Alkali hydrolysate
H-1	1.39 (overlap)	1.37 (overlap)	1.42 (overlap)
	0.87 (overlap)	0.85 (overlap)	0.89
2	2.22 (overlap)	2.18 (overlap)	2.24 (overlap)
	1.86 (overlap)	1.81 (overlap)	1.86 (overlap)
3	3.38 (dd, 11.9, 3.0)	3.36 (dd, 11.9, 4.1)	3.40 (dd, 11.7, 4.3)
5	0.79 (d, 12.0)	0.78 (d, 12.3)	0.80 (overlap)
9	1.73 (overlap)	1.72 (t, 7.8)	1.77 (overlap)
12	5.57 (br s)	5.57 (t-like)	5.60 (t-like)
16	5.27 (br s)	5.28 (br s)	5.23 (br s)
18	3.57 (overlap)	3.57 (dd, 13.7, 4.1)	3.59 (dd, 14.9, 3.4)
19	2.74 (t, 13.2)	2.78 (t, 13.8)	2.81 (t, 12.9)
	1.33 (br d, 14.2)	1.34 (overlap)	1.35 (overlap)
21	2.42 (br t, 12.4)	2.43 (dt, 4.2, 12.8)	2.49 (dt, 4.6, 12.9)
	1.29 (overlap)	1.28 (overlap)	1.28 (overlap)
22	2.31 (overlap)	2.32 (overlap)	2.41 (overlap)
	2.19 (overlap)	2.19 (dt, 4.2, 12.8)	2.24 (overlap)
23	1.28 (3H, s)	1.26 (3H, s)	1.28 (3H, s)
24	0.98 (3H, s)	0.97 (3H, s)	0.96 (3H, s)
25	0.81 (3H, s)	0.80 (3H, s)	0.82 (3H, s)
26	1.05 (3H, s)	1.05 (3H, s)	1.00 (3H, s)
27	1.83 (3H, s)	1.83 (3H, s)	1.85 (3H, s)
29	1.00 (3H, s)	1.00 (3H, s)	1.04 (3H, s)
30	1.14 (3H, s)	1.14 (3H, s)	1.16 (3H, s)
glcA-1	5.04 (d, 7.3)		5.02 (d, 7.8)
5	4.73 (d, 9.2)		4.44 (d, 9.5)
ara-1	6.51 (br s)		
rha-1	5.72 (br, s)		
Rha-6	1.71 (br s)		
xyl-1	5.19(d, 7.4)		
xyl-1′	5.24 (d, 7.8)		

표 4. Lancemaside A와 그 가수분해산물의 ^{13}C-NMR spectral Data (pyridine-d5)

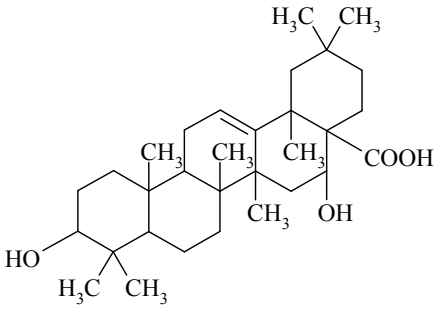
Carbon	Lancemaside A	Echinocystic acid	Alkali hydrolysate		Lancemaside A
C-1	38.7	39.0	38.6	Glucuronic acid	
2	26.6	28.2	26.5	1	107.2
3	89.0	78.1	88.9	2	75.5
4	39.5	39.4	39.4	3	78.2
5	55.8	55.9	55.8	4	73.4
6	18.3	18.8	18.4	5	77.9
7	33.4	33.6	33.4	6	172.8

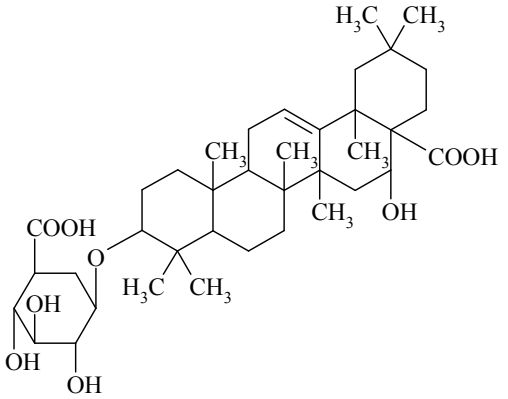
8	39.9	39.9	39.8	Arabinose	
9	47.0	47.3	47.0	1	93.4
10	36.9	37.4	36.9	2	75.1
11	23.7	23.8	23.7	3	69.4
12	122.8	122.8	122.3	4	65.8
13	144.3	145.1	145.0	5	62.7
14	42.0	42.1	42.0	Rhamnose	
15	36.1	36.2	36.1	1	100.9
16	74.0	74.8	74.7	2	71.8
17	49.5	48.9	48.8	3	72.7
18	41.2	41.5	41.3	4	83.3
19	47.1	47.3	47.2	5	68.4
20	30.9	31.0	31.0	6	18.3
21	35.9	36.1	36.1	Xylose (inner)	
22	32.1	32.9	32.8	1	106.1
23	28.1	28.7	28.1	2	74.9
24	16.9	16.6	16.9	3	87.0
25	15.6	15.7	15.5	4	68.9
26	17.5	17.5	17.4	5	66.8
27	27.1	27.2	27.2	Xylose (terminal)	
28	175.9	180.0	179.9	1	106.0
29	33.2	33.3	33.3	2	75.3
30	24.7	24.7	24.6	3	78.1
				4	70.9
				5	67.3

표 5. Lancemaside A 및 Echinocystic acid의 MS spectra

	Isolated m/z	Major Products ions (m/z)
Lancemaside A	1189 $[M-H]^-$	647 (100)*
	647	629 (43), 571 (57), 525 (25), 471 (100), 407 (30)
	471	425 (21), 409 (30), 407 (100)
	407	391 (100), 377 (46)
Echinocystic acid	471 $[M-H]^-$	425 (26), 409 (44), 407 (100)
	407	391 (100), 377 (46)

*Relative abundances (%)





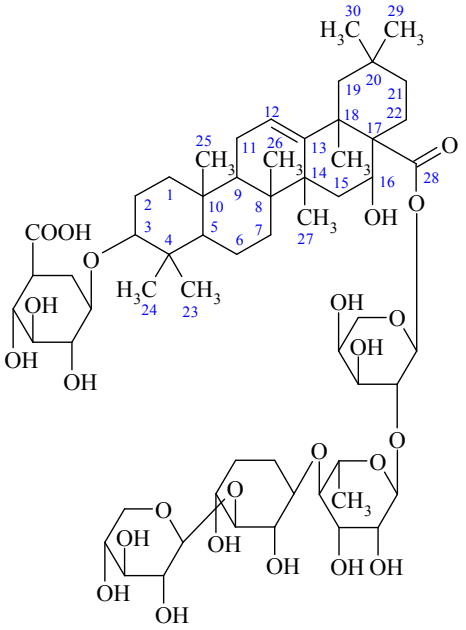


그림 6. Lancemaside A 및 그 산알칼리 가수분해산물의 구조식

(5) 수증류증류를 통하여 얻은 더덕 정유의 성분분석

더덕(*Codonopsis lanceolata*)으로부터 정유성분을 분석하였다. 생더덕 300g을 수증기증류장치를 이용하여 정유성분 0.54g을 얻었다 (0.18 wt%). 정유성분을 GC/MS를 통하여 분석하였다. 이를 Agilent W9N08 GC/MS Library로 통하여 분석한 결과 표 7과 같다. 총 56가지의 성분이 검출되었으며 각 성분들을 작용기별로 분류하여 peak area%로 나타내면 carboxylic acid류가 51.32%로 가장 많았고, alcohol류 23.37%, aldehyde 8.03%, hydrocarbon류 7.73%, ester류 4.67%, ketone류 0.77%, 기타 화합물 3.78%로 총 99.67%였다.

그림 7. 수증기증류장치 (Steam distillation Extraction)

표 6. GC-MS 분석조건

Model	Agilent 689/5973i GC/MSD
Column	DB-5MS(30m × 0.25mm × 0.25μm)
Injector Temp.	280℃
Oven Temp.	40℃ (3 min) → 250℃ (rate 5℃/min) → 300℃ (rate: 10℃/min for 10min)
Library	Agilent W9N08 GC/MS Library

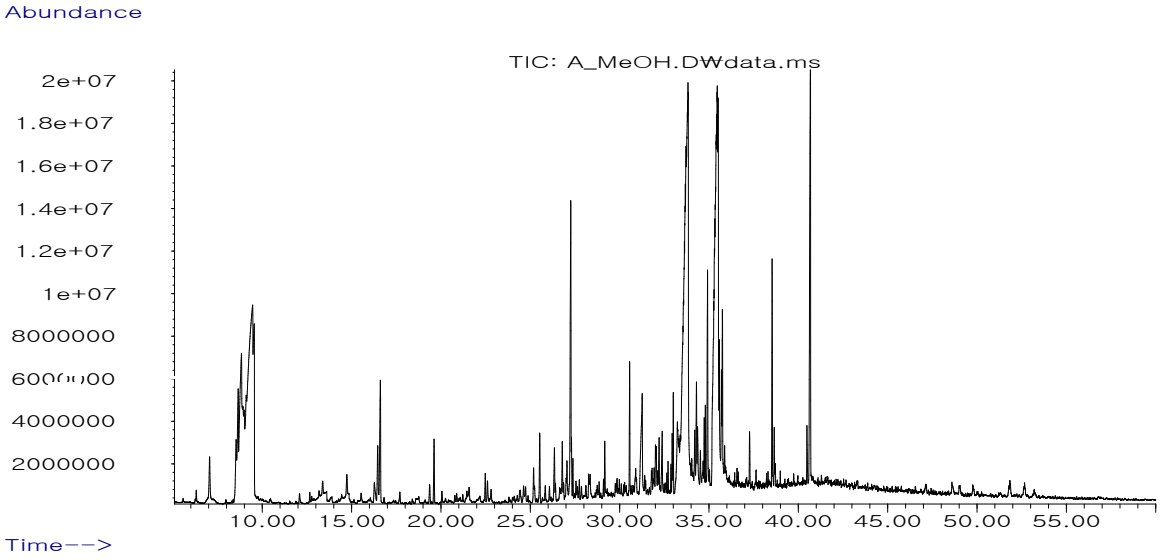


그림 8. 더덕의 정유의 GC-MS 크로마토그램

표 7. 더덕 정유중의 정유성분

Peak No	RT	Area%	Library/ID	Similality
1	7.059	0.59	Hexanal	95
2	8.539	2.45	(E)-2-Hexenal	98
3	8.841	6.46	(Z)-3-Hexen-1-ol	97
4	9.106	12.39	(E)-2-Hexen-1-ol	90
5	14.735	0.24	Benzeneacetaldehyde	94
6	16.463	0.62	Linalool L	97
7	16.609	1.35	Nonamal	93
8	19.37	0.19	α-4-trimethyl-α-3-Cyclohexene-1-methanol	91
9	19.618	0.53	Decanal	98
10	22.481	0.23	Undecanal	91
11	22.605	0.20	2-Methoxy-4-vinylphenol	96
12	25.188	0.30	Dodecanal	95
13	25.533	0.61	Caryophyllene	99
14	26.354	0.39	1,5,9,9-Tetramethyl-1,4,7-cycloundecatriene	98
15	26.792	0.56	trans-β-Ionone	97
16	27.008	0.16	Eremophilene	99
17	27.057	0.30	β-Selinene	99
18	27.267	3	Butylated Hyderoxytoluene	98
19	27.305	0.32	2,4-di-tert-butylphenol	97
20	27.386	0.28	Tridecanal	99
21	28.353	0.32	Dodecanoic acid	99
22	29.104	0.12	Tetradecanal	98
23	30.562	0.87	Hexadecanal	95
24	30.897	0.31	Z-11-Tetradecenoic acid	95
25	31.265	1.98	Tetradecanoic acid	99
26	31.783	0.15	2-Dodecenal	83
27	31.816	0.15	Tetradecanal	99
28	31.935	0.26	Pentadecanoic acid	98
29	32.21	0.47	2-Hydroxycyclopentadecanone	98
30	32.383	0.62	Pentadecanoic acid	99
31	32.648	0.10	(Z,Z)-9,12-Octadecadienoic acid	99
32	32.712	0.18	Methyl-(7E,10E,13E)-7,10,13-hexadecatrienoate	93
33	32.875	0.16	7,9-Di-tert-butyl-1-oxaspiro(4,5)deca-6,9-diene-2,8-dione	98
34	33.004	0.54	Methylpalmitate	99
35	33.236	1.43	Methyl-8,11,14-heptadecatrienoate	91
36	33.328	0.51	cis-9-Hexadecenoic acid	90
37	33.415	0.17	Palmitoleic acid	97
38	33.679	20.9	n-Hexadecanoic acid	99
39	34.209	1.44	Heptadecanoic acid	98
40	34.36	0.68	cis-10-Heptadecenoic acid	95
41	34.522	0.35	Octadecanoic acid	96
42	34.673	0.18	E-15-Heptadecenal	97
43	34.738	0.38	(Z,Z)-9,12-Octadecadienoic acid	99
44	34.798	0.41	Methyl linolenate	99
45	34.922	1.78	Phytol	96
46	35.305	14.54	Linoleic acid	98
47	35.516	3.55	Linolenic acid	99
48	35.581	1.09	Octadecanoic acid	99
49	35.878	0.14	Linoleic acid	98
50	36.575	0.13	1-Eicosene	91
51	37.639	0.16	2-[(E)-(1H-benzimidazol-6-ylimino)methyl]-4-methoxy-6-nitrophenol	95
52	38.536	1.41	Bis(2-ethylhexyl) phthalate	98
53	38.655	0.29	3-Phenyl-1,4(E)-dodecadiene	93
54	38.709	0.16	n-Propyl linolenate	95
55	40.486	0.38	Dioctyl sebacate	93
56	40.675	4.81	Squalene	99
	total	92.29		

나. 항천식활성 물질 in vitro 스크리닝

(1) 5-LO 억제활성

천식에서 LTC4, LTD4 및 LTE4 등의 cysteinyl leucotrienes (C-LTs)은 병리학적으로 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 또한 arachidonic acid는 5-LO (5-lipoxygenase)에 의해 C-LTs로 변환되는 지방산 전구체로 잘 알려져 있다. 이 C-LTs는 기도와 평활근을 수축시키고 기관지 점액분비를 증강시키며 혈관투과성을 증가시킴으로써 부종을 초래한다. 따라서 RBL-1 세포 (rat basophilic leukemia, 랫트 호염기성 백혈병 세포주) 유래의 5-LO활성을 50% 억제하는 농도 IC_{50}을 측정하여 천식억제 효능을 검정하는 방법을 검토하였다.

5-LO억제활성 측정에는 RBL-1 (Sumitomo Dainippon Pharma Co., Ltd.)을 사용하고, 이에 따라 arachidonic acid가 5-HETE로 전환하는 효율을 효소활성으로 산출하였다. 즉 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) 수용액에 용해한 시료 (2×10^{-3} M, 5 μL)에 100 mM $CaCl_2$ 수용액 10 μL와 arachidonic acid의 MeOH용액 (10 mg/mL 10 μL)을 가하고 37℃에서 5분간 preincubation 하였다. 여기에 0.15 M sucrose, 0.5 mM EDTA 및 1 mM glutathione을 함유하는 25 mM phosphate buffer (pH 7.4) 안에 RBL-1세포 (1×10^{7} cell/mL)를 분산시킨 현탁액 475 μL를 첨가하고 교반하고, 37℃에서 3분간 반응시켰다. 그 후 MeOH 500 μL를 가하여 반응을 정지시키고 이 용액을 20℃, 4,000 rpm으로 15분간 원심분리 하였다. 이 상등액 400 μL를 분취하여 HPLC 분석하였다. HPLC 분석은 COSMOSIL 5 C_{18}-MS (4.6 mm ID × 150 mm), 이동상은 0,04% acetic acid를 함유하는 60% CH_3CN 수용액으로 용출하고, UV 235 nm에서 측정하였다. 양성대조군으로는 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) 수용액에 용해한 6-gingerol (1×10^{-3} M, 5 μL)을 사용하였다. 시료를 첨가하지 않았을 때의 5-HETE 전환율을 100%로 하고 각 시료를 첨가하였을 때의 5-HETE 전환율과의 차이 [100 (%) - 5-HETE 전환율 (%)]을 5-LO 억제율로 하였다.

본 실험에서는 30% 주정알코올 추출물을 용매 분획한 4개의 분획, 즉 Et_2O, $CHCl_3$, n-BuOH 및 H_2O분획에 대해 5-LO 억제활성에 대해 살펴보았다. 3회 반복시험 결과 더덕 시료의 각 분획은 모두 농도의존적으로 5-LO 억제활성을 보였으나 10mg/kg 이상에서는 억제활성이 증가하지 않았다. 또한 10mg/kg 농도에서 5-LO 억제활성을 보면, n-BuOH > H_2O > $CHCl_3$ > Et_2O분획 순으로 활성이 높게 나타났으며, 특히 사포닌 분획 (n-BuOH 분획)에서 5-LO 억제율이 74.3±4.3%로 가장 높게 나타났다. 또한 H_2O 분획에서도 65.7±9.8% 억제율을 보였으나 Et_2O, $CHCl_3$분획에서는 거의 억제율을 나타내지 않았다.

사포닌 분획 (n-BuOH 분획)을 컬럼으로 분획한 각 분획에 대해서는 추후에 실험할 예정이다.

표 8. 더덕 추출물의 각 분획별 농도에 따른 5-LO활성 억제효과

Fraction	5-LO Inhibition rate (%)			
	2.5 mg/mL	5 mg/mL	10 mg/mL	20 mg/mL
Et_2O	2.0±1.1	4.7±2.5	7.7±1.1	8.0±1.3
$CHCl_3$	4.3±2.2	9.4±2.5	14.3±3.5	16.3±1.8
n-BuOH	18.9±2.2	52.1±2.4	74.3±4.3	78.2±4.3
H_2O	13.1±2.8	28.9±4.4	65.7±9.8	60.0±5.6
6-gingerol	52.4±2.1	80.1±3.8	94.3±6.8	96.2±2.8
DMSO	0.2±1.1	1.1±1.2	2.3±2.5	2.1±2.1

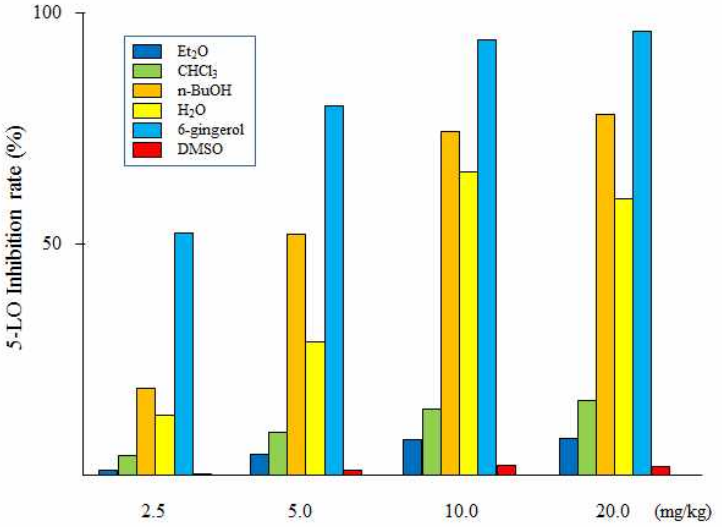


Fig. 9. 더덕 추출물의 각 분획별 농도에 따른 5-LO활성 억제효과

(2) 더덕 추출물 및 더덕사포닌 가수분해산물 기관지질환 세균에 대한 항균활성

본 실험에 사용된 *Corynebacterium diphtheriae*는 디프테리아균이라 하며 그람양성균으로 환자의 인후두 및 비강의 점막을 감염시켜 증식한다. 인두부의 종창 및 확대에 의해 때때로 기도가 막혀 숨을 쉴 수 없게 되어 질식사를 일으키기도 한다. 또한 *Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae*는 그람양성의 간균으로 폐렴간균이라고도 하며, 구강이나 장관에 존재하는 균이지만, 가끔 호흡기 감염증, 요로감염증 등을 일으키는 균이다. 그리고 *Streptococcus pyogenes*는 건강한 사람의 인후나 소화관 또는 표피에 보통 존재하는 세균의 일종이지만, GAS (Group of Sterptococcus) 감염증이라 불리는 각종 화농성 질환과, 생산하는 독소에 의한 전신성 질환, 또는 감염 후에 일종의 합병증으로 일어나는 면역성 질환 등 다양한 질환의 원인이 되는 균이다.

기관지질환을 유발하는 세균에 대한 더덕의 효능을 검정하고자, 30% 주정알코올 더덕 추출물 및 가수분해산물을 시료로 하여 균배양용 액체배지(meat extract 1%, tryptone 1%, NaCl 0.5%, glucose 0.2%, yeast extract 0.3%, pepton 0.1% pH7.3)에 첨가하여 항균효과를 조사하였다. 세균배양용 배지는 blood agar base (Difco 0045)를 변형하여 이용하였으며, 항균활성 검정은 한천배지확산법(disk agar plate diffusion method)으로 측정한다. 즉, 각 시험미생물에 적합한 배지에 10^7 CFU/mL 농도로 시험미생물을 배양한 soft agar를 petri dish에 분주한 후 paper disc를 올려놓고 시료 추출물 40 μL씩 분주 후 배양하여 저해환의 생성을 관찰하였다. 24시간 이내에 저해환 (ring)이 생성된 경우 항균활성이 양성인 것으로 판정하였으며, 저해환의 직경을 측정, 비교하였다.

표 9. 항균활성시험에 사용된 균주 및 배양조건

Strains	Cultivation conditions
Corynebacterium diphtheriae (KCCM 40413)	37℃, Trypticase Soy Agar (BBL211043) with 5% defibrinated Sheep blood
Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae (KCCM 41285)	37℃, Nutrient Agar
Streptococcus pyogenes (KCCM 11817)	37℃, Trypticase Soy Agar (BBL211043) with 5% defibrinated sheep blood

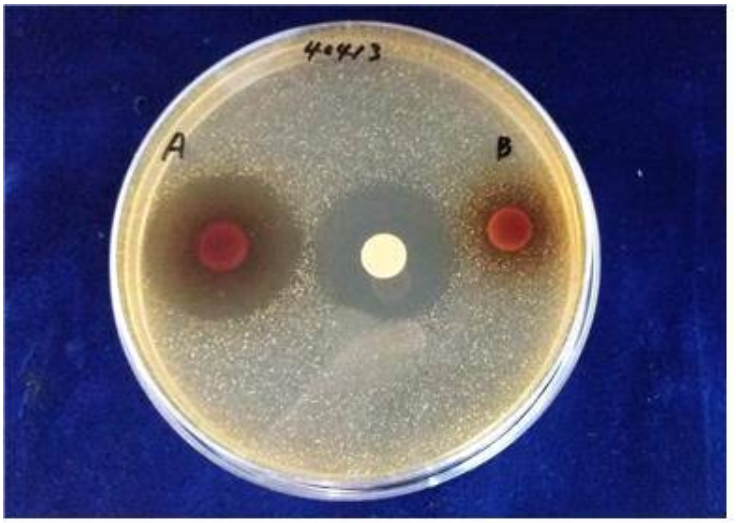


Fig. 10. 더덕 추출물 및 그 가수분해산물의 *C. diphtheriae*에 대한 억제활성 (한천배지 확산법)
A: 30% EtOH extract of *C. lanceolata*, B: Hydrolyzed extract of *C. lanceolata*

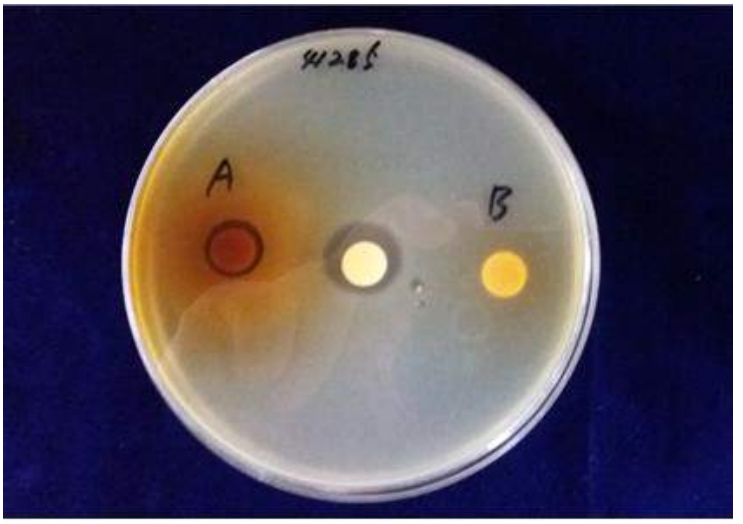


Fig. 11. 더덕 추출물 및 그 가수분해산물의 *K. pneumoniae subsp. pneumoniae*에 대한 억제활성 (한천배지 확산법)
A: 30% EtOH extract of *C. lanceolata*, B: Hydrolyzed extract of *C. lanceolata*

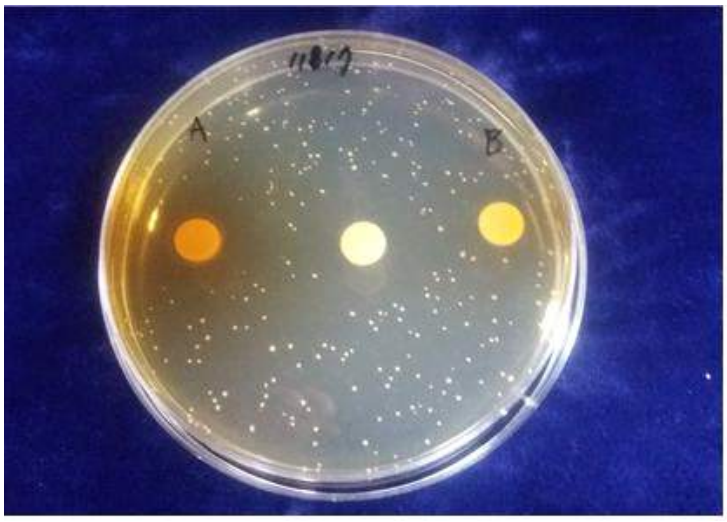


Fig. 12. 더덕 추출물 및 그 가수분해산물의 *S. pyogenes*에 대한 억제활성 (한천배지 확산법)
A: 30% EtOH extract of *C. lanceolata,* B: Hydrolyzed extract of *C. lanceolata*

이와 같이 3종류의 기관지질환 유발 세균에 대한 더덕 추출물 및 그 가수분해산물의 항균활성 검정 결과, 30% 주정알코올 더덕 추출물이 가수분해산물과 비교하여 상대적으로 다소 활성이 높았으며, 특히 *C. diphtheriae*에서는 현저히 높은 활성을 나타냈다. 그러나 *S. pyogenes* 에서는 거의 활성을 나타내지 않았다.

다. 급성 마우스 천식 모델의 항염증 효능

(1) 시험목적

본 시험은 BALB/c 마우스에서 ovalbumin으로 asthma를 유발하고 더덕을 투여하여 폐 기관지 세척액 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) 중 총 백혈구 수 및 differential cell count, IgE와 lung의 H&E, PAS stain, immunohistochemistry를 분석함으로써 항천식 효능을 평가하기 위하여 수행하였다.

(2) 시험방법

(가) 시험일정

2016년 03월 22일	동물입수
2016년 03월 27일	체중측정 및 실험동물군 분리
2016년 03월 28일, 04월 04일	OVA i.p 투여
2016년 04월 11일 - 15일	OVA inhalation, 경구투여
2016년 04월 16일	부검
2016년 04월 16일 - 06월 13일	분석
2016년 06월 13일	결과보고

(나) 시약

○ 천식 유발물질

① 명　　칭: Ovalbumin (Albumin from chicken egg white, OVA)

② 보관조건: 냉장

③ Catalog 번호: A5503

④ 공 급 원: Sigma Aldrich, Louis, MO, USA

⑤ 시약번호: 2016-AA-004-1

○ 면역 보조물질

① 명　　칭: Aluminum hydroxide (Alum)

② 보관조건: 냉장

③ Catalog 번호: 77161

④ 공 급 원: Thermo Fisher Scientific lnc, Waltham, MA, USA

⑤ 시약번호: 2016-AA-004-2

○ 양성대조물질

① 명　　칭: Dexamethasone (DEX)

② 보관조건: 실온

③ 제조번호: 13099

④ 공 급 원: SAMNAM Pharm, 충남, 대한민국

⑤ 시약번호: 2016-AA-004-3

○ 투여물질 - 1

① 명　　칭: 멸균 생리식염수(N/S)

② 보관조건: 실온

③ Lot No.: 12062

④ 공 급 원: JW Pharmaceutical, 서울특별시, 대한민국

⑤ 시약번호: 2016-AA-004-4

○ 투여물질 - 2

① 명　　칭: 더덕 30% EtOH 추출물

② 보관조건: 실온

③ 공 급 원: ㈜웰파이토

④ 시약번호: 2016-AA-004-5

(다) 시험계 및 사육환경

○ 시험계

① 동물정보

종 및 계통		특정병원체 부재(SPF) 마우스, BALB/c mouse
공 급 원		Samtako Korea
선정사유		본 시험에 사용하는 마우스는 천식시험에 널리 사용되며 풍부한 시험기초 자료가 축적되어 있어 시험결과의 해석 및 평가에 참고할 수 있으며, 관련문헌에 근거하여 선택하였다.
성별		암컷
주령	입수 시	5
	투여 시	6

② 검역 및 순화

입수 후 6일간 시험을 실시하는 동물실내에서 순화시키고, 매일 1회 이상 관찰하였다.(SOP-AT-004)

③ 식별

동물은 순화기간에는 적색 유성 매직으로, 투여 및 관찰기간에는 흑색 유성 매직을 이용한 미부표식법을 사용하여 식별한다. 사육상자에는 개체식별카드를 부착하였다.(SOP-AN-001)

○ 사육환경

① 환경조건 및 측정

동물은 온도 23±3 ºC, 상대습도 55±15 %, 환기횟수 10-20회/hr, 조명시간 12 시간 및 조도 150-300 Lux로 유지되는 사육구역에서 사육하였다.(SOP-AN-004)

② 사육상자 및 사육밀도

동물은 적량의 깔개를 담은 폴리카보네이트 사육상자에서 순화, 투여기간에 4 마리 이하/사육상자로 사육하였다.(SOP-AN-004)

③ 군분리

순화기간 중 건강한 것으로 판정한 동물의 체중을 측정하여 순위화하고, 각 군의 평균체중이 균일하게 분포하도록 '시험군 구성'과 같이 무작위 분배하였다.(SOP-AN-001)

(라) 시험군 구성, 투여량 설정 및 투여

○ 시험군 구성

군	성별	동물 수	동물번호	OVA		투여량(mg/kg)		투여액량 (μL/g)
				감작량 (μg/head)	야기량 (%)	DEX	더덕	
G1	F	8	1 - 8	20	0	0	0	28
G2	F	8	9 - 16	20	5	0	0	28
G3	F	8	17 - 24	20	5	1	0	28
G4	F	8	25 - 32	20	5	0	50	28
G5	F	8	33 - 40	20	5	0	250	28
G6	F	8	41 - 48	20	5	0	500	28

○ 투여물질 조제

① 복강주사 투여물질의 조제

OVA 20 μg+ Alum 1 mg+ N/S 500 μL/ head 로 투여하였다. 투여해야할 동물 마리수는 loss를 계산하여 50마리이므로 OVA 1000 μg + Alum 50 mg + N/S 25 mL로 환산하여 조제하였다.

② 5% OVA sol. inhalation 투여물질의 조제

OVA 1 g+ N/S 20 mL (5% OVA Sol.)로 만들어 vortexing 하여 투여하였다.

③ 양성대조물질 조제

Dexamethasone은 정량의 물질을 생리식염수에 넣고 vortexing하여 용해시켜 최종 투여 액량에 맞게 조제한다. 단, 완전용해가 되지 않으니 투여 시 vortexing 하였다.

④ 더덕의 조제

고농도는 100 mg의 더덕을 칭량하여 5.6 mL의 생리식염수에 용해시켜 사용한다. 중농도는 50 mg의 더덕을 칭량해 5.6 mL의 생리식염수에 용해시키고, 저농도는 더덕 10 mg을 칭량해 5.6 mL의 생리식염수에 용해시켜 사용한다. 조제는 투여 당일 조제한다.

⑤ 조제빈도

투여물질들은 투여 당일 조제하였다.

○ 투여

투여경로 및 선택이유	논문에 근거하여 OVA 복강주사 및 inhalation으로 asthma induction을 실시하였다.
투여횟수 및 기간	1. 복강투여는 주 1회로 2주간 감작하고, D15부터 5일간 inhalation 야기 및 더덕과 양성대조물질의 투여를 진행하였다. 단 더덕과 양성대조물질의 투여는 오전에 진행하고, inhalation은 오후에 진행하였다. 2. OVA 무야기군(G1) 및 OVA 유도군(G2)은 생리식염수를 투여하였다.
투여액량 산출	계획된 일자에 측정한 체중을 기준으로 정해진 투여액량에 맞게 산출한다. 단, 감작은 체중과 상관없이 마리당 일정량을 투여하였다.
투여방법	복강주사 시 1 mL 주사기를 이용하여 조제한 투여물질을 투여하며, inhalation 시 nebulizer (NE-U17, OMRON, Minato-ku, Tokyo, Japan)을 사용하여 투여하였다.

○ 관찰 및 검사 항목

① 일반증상 관찰

모든 시험군의 동물에 대하여 입수일부터 부검일까지 매일 1회 이상 증상관찰을 실시하였다.

② 체중 및 사료량

P6, D3, D6, D10, D13, D17, D20에 실시하였다.

③ 부검 (SOP-AS-010)

최종 부검일 날(D20) 모든 mouse를 부검하였다.

각 group에서 앞 번호 4마리는 BALF, spleen을 채취하고 나머지는 lung, spleen을 채취한다. Serum은 모든 mouse에서 채취하였다.

④ 조직 및 장기의 보존

- spleen 및 Lung

부검 시 1/2은 액체질소에 넣어 급속동결한 후 초저온냉동고에 보관하여 PCR/western blot용으로 활용하고, 1/2은 10% 포르말린 용액에 보관하여 조직병리 및 immunohistochemistry용으로 활용하였다.

- BALF

첫 번째 채취한 BALF는 1번 튜브, 두 번째, 세 번째 채취한 BALF는 2번 튜브에 같이 넣었다. 1번 튜브는 5분간 3000 rpm에서 원심분리 후 상층액을 3번으로 옮긴 후 남은 pellet과 PBS 20 μL를 넣어 섞어주었다. 2번 튜브는 5분간 3000 rpm에서 원심분리 후 상층액을 버리고 pellet과 PBS 60 μL를 넣어 섞어준 후 1번의 20 μL와 섞어 총 80 μL로 혈구분석을 실시하였다.

⑤ 채혈

채혈은 심장 채혈을 실시하였다.

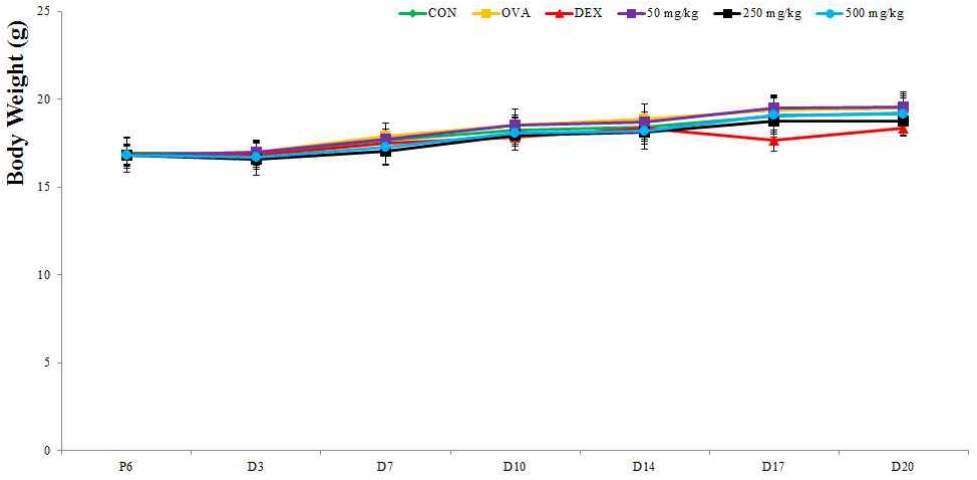
(3) 시험결과

(가) 일반증상관찰

- 실험기간 중 특별한 증상은 없었다.

(나) 체중 측정결과

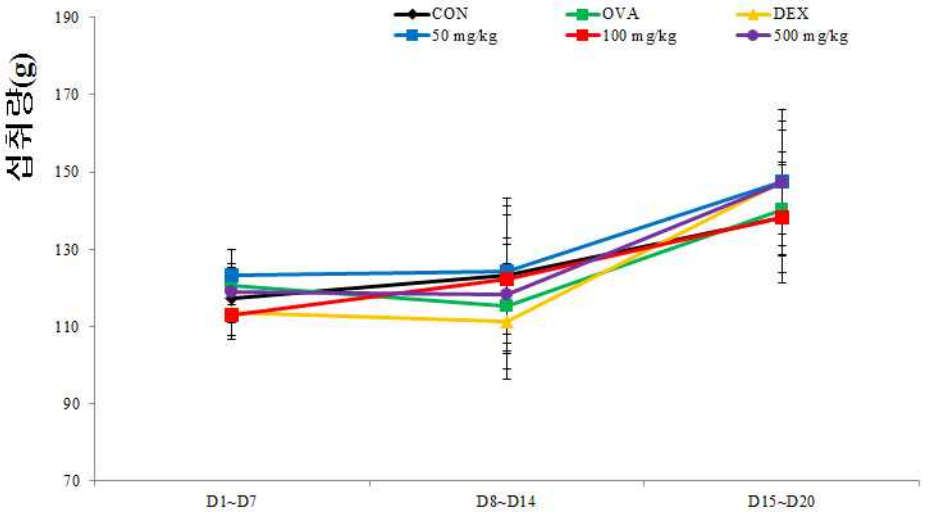
- 그룹간의 체중에 대한 차이가 없었다.



체중 측정 결과

(다) 사료량 측정결과

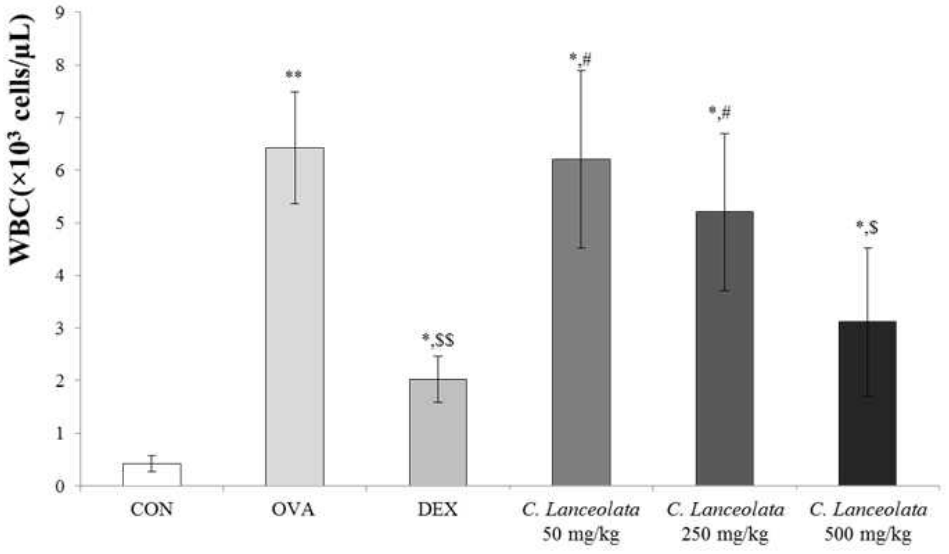
- 그룹간의 사료량에 대한 차이가 없었다.



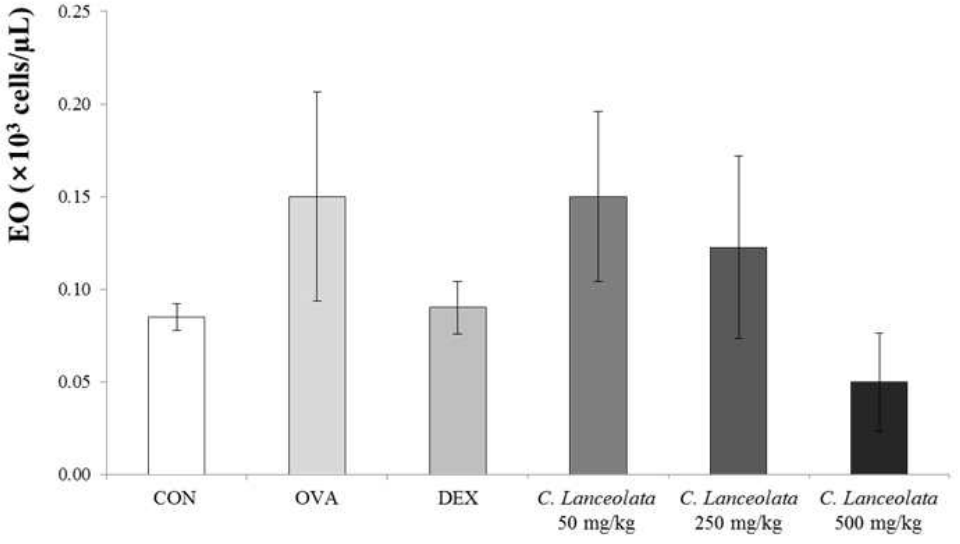
사료량 측정결과

(라) Differential cell count

- WBC : OVA 유도군에서 CON과 비교하여 유의성 있게 증가하였고 더덕 농도별 투여군에서는 농도 의존적으로 감소하였다.

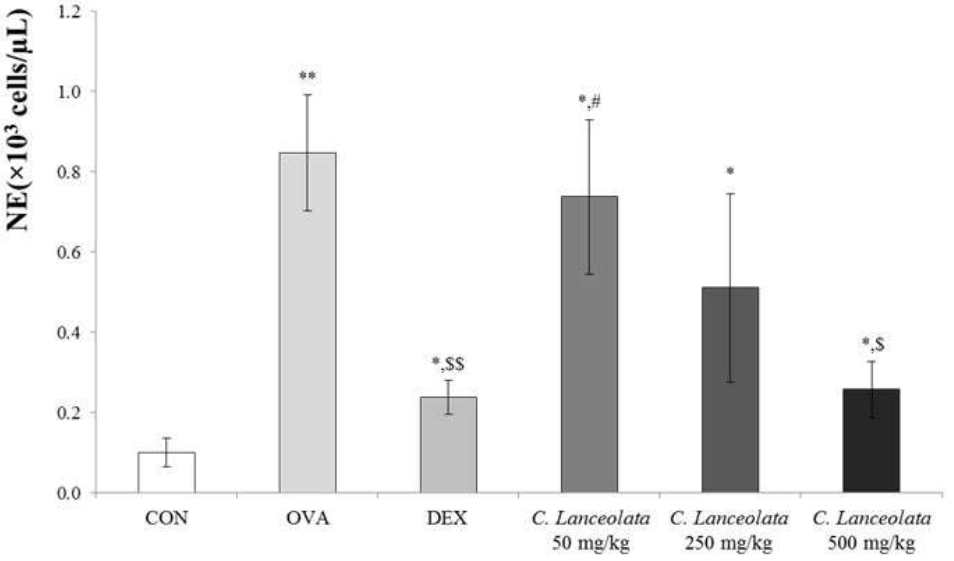


- eosinophil : OVA 유도군에서 CON과 비교하여 증가하였고 더덕 농도별 투여군에서도 농도별로 감소하였다.



eosinophil 결과

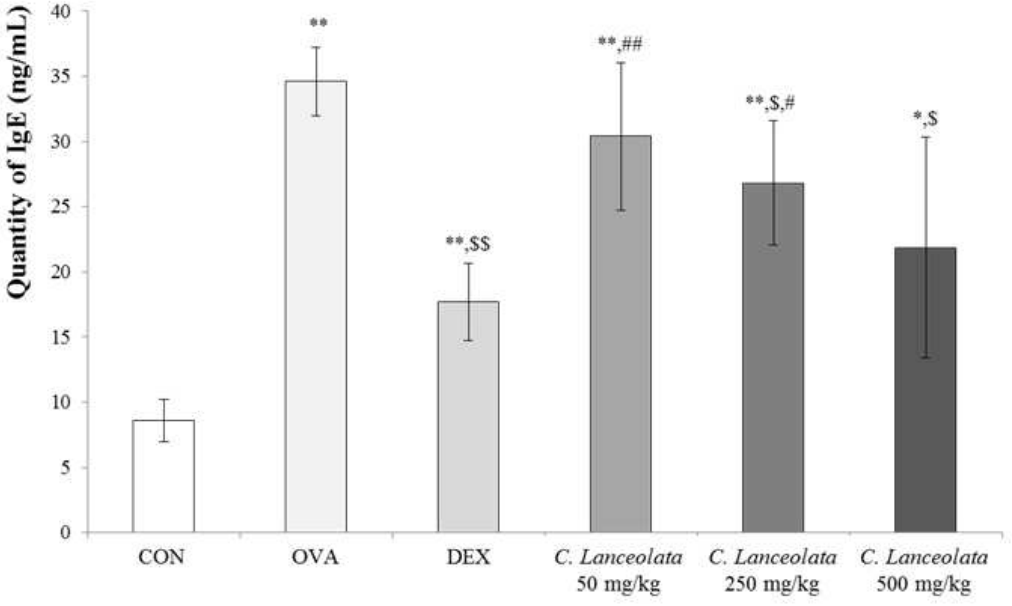
- neutrophil : OVA 유도군에서 CON과 비교하여 유의성 있게 증가하였고 더덕 농도별 투여군에서는 농도 의존적으로 감소하였다.



neutrophil 결과

(마) IgE

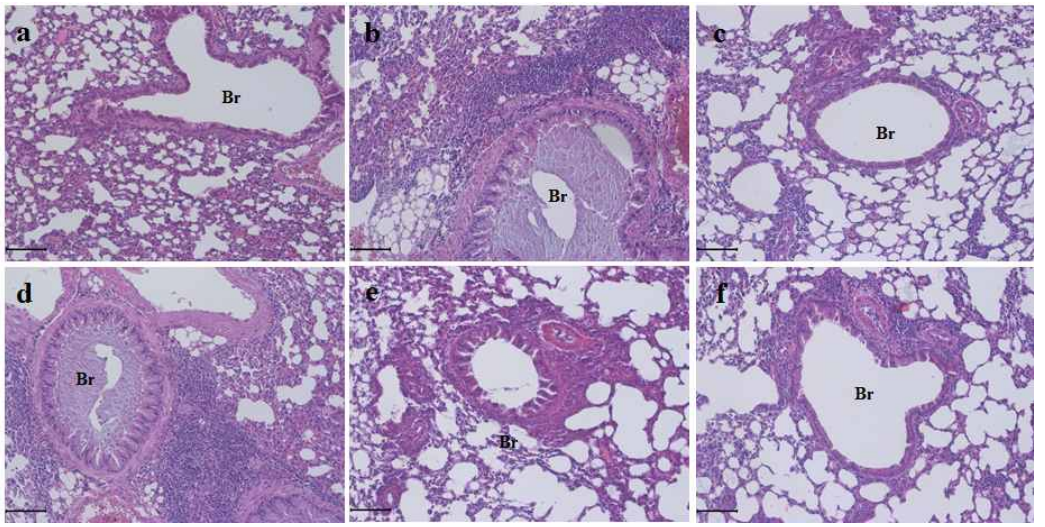
- OVA 유도군에서 CON과 비교하여 유의성 있게 증가하였고 더덕 농도별 투여군에서는 농도 의존적으로 감소하였다.



IgE 결과

(바) H&E stain

- OVA 유도군에서 CON과 비교하여 eosinophil, mucus, epithelial hyperplasia가 증가하였고 양성대조군은 control과 비슷하게 감소하였으며 더덕 농도별 투여군에서는 농도 의존적으로 감소하였다.



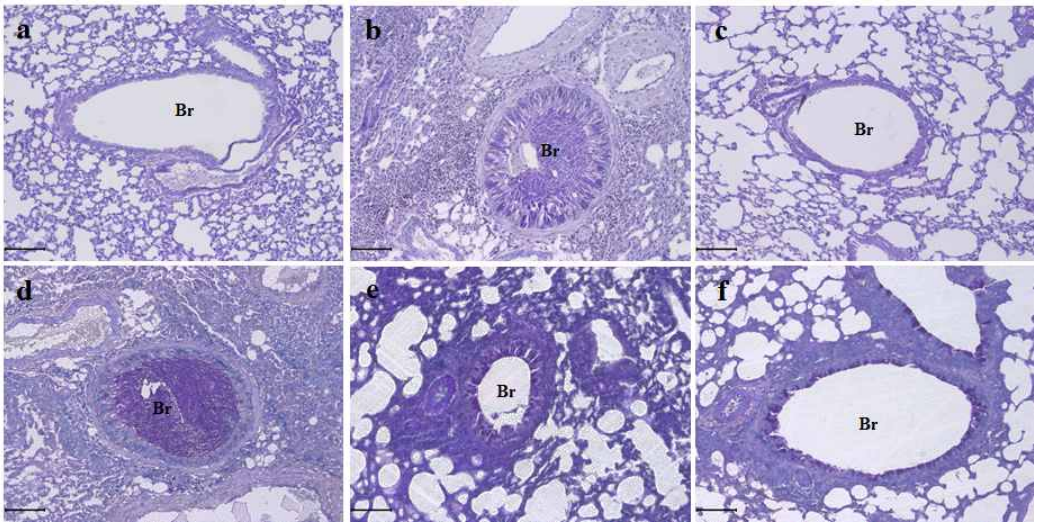
H&E stain

a: CON b: OVA c: DEX d: *C. lanceolata* 50 mg/kg

e: *C. lanceolata* 250 mg/kg f: *C. lanceolata* 500 mg/kg

(사) PAS stain

- OVA 유도군에서 CON과 비교하여 mucus가 증가하였고 양성대조군은 control과 비슷하게 감소하였으며 더덕 농도별 투여군에서는 농도 의존적으로 감소하였다.



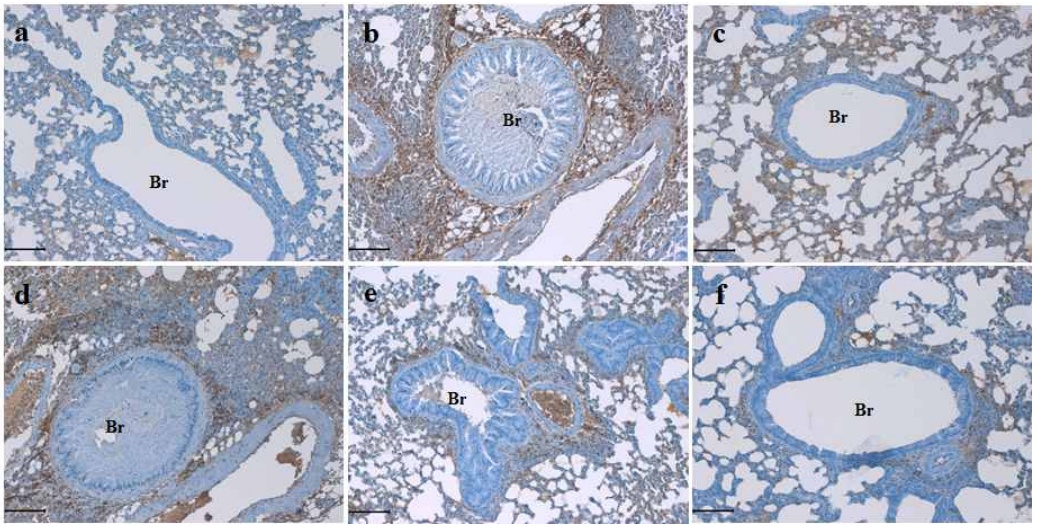
PAS stain

a: CON b: OVA c: DEX d: *C. lanceolata* 50 mg/kg

e: *C. lanceolata* 250 mg/kg f: *C. lanceolata* 500 mg/kg

(아) Immunohistochemistry

- IFN-γ : OVA에서 CON과 비교하여 IFN-γ의 발현량이 증가하였고 양성대조군은 control과 비슷하게 감소하였다. 더덕 농도별 투여군은 농도 의존적으로 감소하였다.

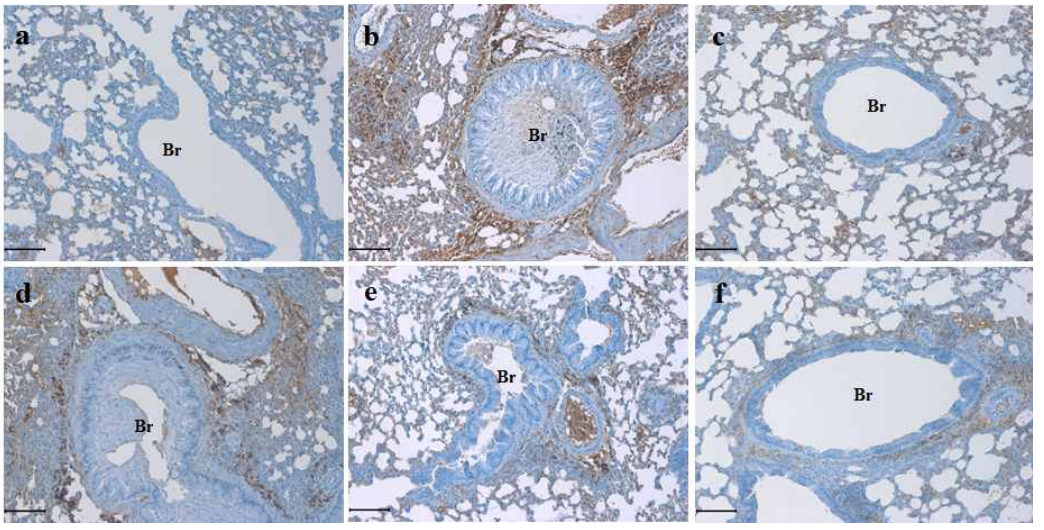


IFN-γ

a: CON b: OVA c: DEX d: *C. lanceolata* 50 mg/kg

e: *C. lanceolata* 250 mg/kg f: *C. lanceolata* 500 mg/kg

- IL-4 : OVA에서 CON과 비교하여 IL-4의 발현량이 증가하였고 양성대조군은 control과 비슷하게 감소하였다. 더덕 농도별 투여군은 농도 의존적으로 감소하였다.

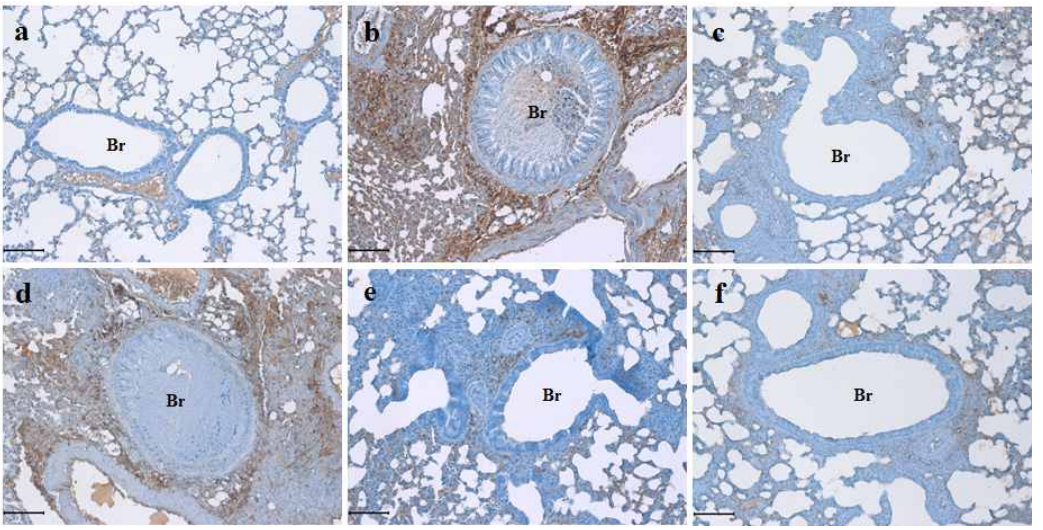


IL-4

a: CON b: OVA c: DEX d: *C. lanceolata* 50 mg/kg

e: *C. lanceolata* 250 mg/kg f: *C. lanceolata* 500 mg/kg

- IL-5 : OVA에서 CON과 비교하여 IL-5의 발현량이 증가하였고 양성대조군은 control과 비슷하게 감소하였다. 더덕 농도별 투여군은 농도 의존적으로 감소하였다.

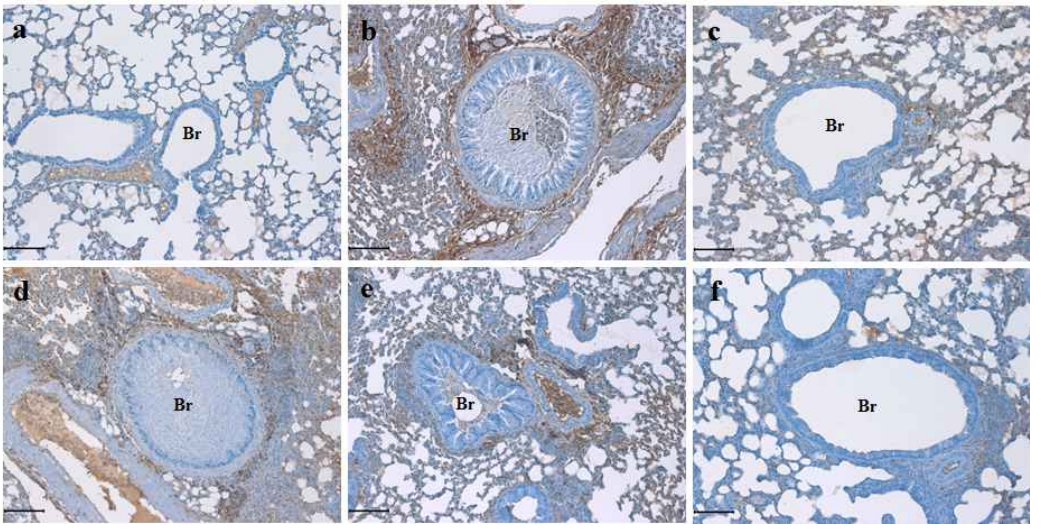


IL-5

a: CON b: OVA c: DEX d: *C. lanceolata* 50 mg/kg

e: *C. lanceolata* 250 mg/kg f: *C. lanceolata* 500 mg/kg

- IL-13 : OVA에서 CON과 비교하여 IL-13의 발현량이 증가하였고 양성대조군은 control과 비슷하게 감소하였다. 더덕 농도별 투여군은 농도 의존적으로 감소하였다.

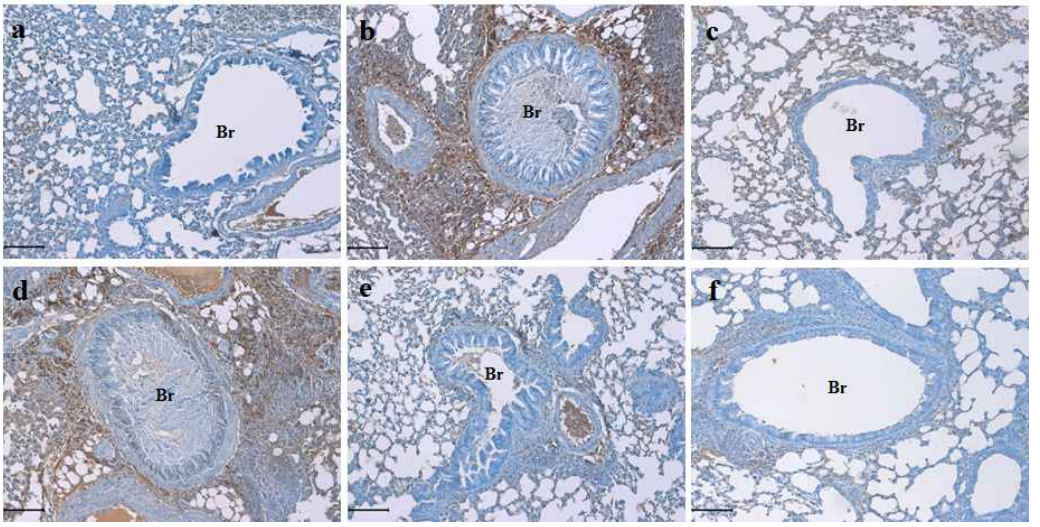


IL-13

a: CON b: OVA c: DEX d: *C. lanceolata* 50 mg/kg

e: *C. lanceolata* 250 mg/kg f: *C. lanceolata* 500 mg/kg

- TNF-α : OVA에서 CON과 비교하여 TNF-α의 발현량이 증가하였고 양성대조군은 control과 비슷하게 감소하였다. 더덕 농도별 투여군은 농도 의존적으로 감소하였다.

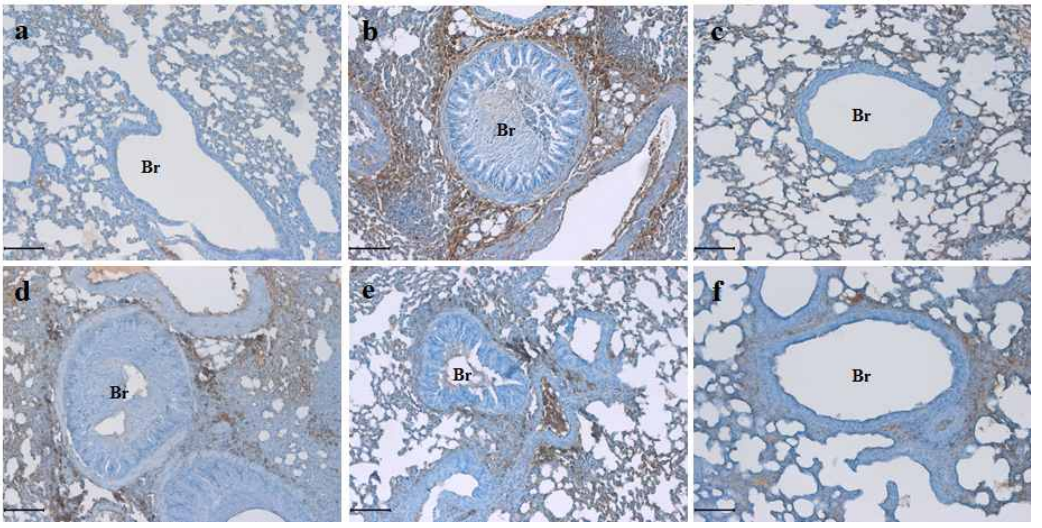


TNF-α

a: CON b: OVA c: DEX d: *C. lanceolata* 50 mg/kg

e: *C. lanceolata* 250 mg/kg f: *C. lanceolata* 500 mg/kg

- IL-6 : OVA에서 CON과 비교하여 IL-6의 발현량이 증가하였고 양성대조군은 control과 비슷하게 감소하였다. 더덕 농도별 투여군은 농도 의존적으로 감소하였다.



IL-6

a: CON b: OVA c: DEX d: *C. lanceolata* 50 mg/kg

e: *C. lanceolata* 250 mg/kg f: *C. lanceolata* 500 mg/kg

(4) 결론

BALF 내 WBC와 eosinophil, neutrophil, IgE의 변화에서 WBC, neutrophil, IgE는 더덕의 농도별 투여군에서 농도 의존적으로 감소함을 확인하였고, WBC, neutrophil, IgE에서 500 mg/kg에서 양성대조군과 비슷하게 감소함을 확인하였다. lung의 조직병리학적 분석인 H&E stain에서는 더덕 농도별 투여군에서 asthma의 대표적인 조직병리학적 특징인 mucus, inflammatory cell, hyperplasia가 농도 의존적으로 감소한 것을 확인할 수 있었다. mucus를 확인하는 PAS stain 염색결과에서도 더덕 농도별 투여군에서 mucus가 농도 의존적으로 감소함을 확인할 수 있었다.

Immunohistochemistry의 결과에서는 IFN-γ, IL-4, IL-5, IL-13, IL-6, TNF-α의 발현량은 OVA에서 CON과 비교하여 발현량이 증가하였고 양성대조군은 CON과 비슷하게 감소하였다. 또한 더덕의 농도별 투여군은 농도 의존적으로 감소하였다. 이러한 결과로 더덕의 항천식 효능이 있는 것을 확인할 수 있었다.

3. 가수분해산물의 생리활성물질 유효성 평가 및 대량분리 정제

가. 더덕사포닌의 가수분해 산물 분리, 정제 및 구조동정

(1) 더덕사포닌 분획

본 2차년도 연구에서 실험에 공시한 재료는 제주도에서 재배한 3년근 더덕을 농가로부터 구입하여 사용하였다. 제주산 더덕 건조 시료 8 kg을 20 L의 30% 주정알코올에 7일간 실온에서 침지시킨 다음 (3회 반복), 여과하여 여액은 rotary evaporator로 40℃에서 감압 농축하여 910 g (11.4%)의 조추출물을 얻었다. 이 조추출물을 용매의 극성에 따라 diethylether, ethyl acetate, normal butanol 순으로 용매 분획하여 각각 41.2, 92.5, 300.1 및 350.6 g을 얻었고, 여기에서 얻어진 n-BuOH 분획을 사포닌분획으로 하였다(표 1).

표 10. 더덕 추출물의 각 분획별 추출

Solvent	Yield (g)
Diethyl ether	41.2
Ethyl acetate	92.5
normal butanol	300.1
Water	350.6
Total	784.4

(2) 사포닌의 분획으로부터 lancemaside A의 단리

조사포닌을 얻기 위해 n-BuOH 분획 200g을 물에 현탁하여 Dianon HP20 (Mitsubishi Chemical Ind., Japan) 컬럼을 통과시키고, 물로 세척한 다음 MeOH로 용출하였다 (148g). 이 MeOH 용출액에 대하여 $CHCl_3$:MeOH (70:30) 용액으로 평형화시킨 silica gel을 column에 충진한 다음 $CHCl_3$:MeOH 비율을 75:25에서 60:40으로 순차적으로 용출하여 Fr 1 (4.2g), Fr. 2 (6.5g), Fr. 3 (3.9g), Fr. 4 (5.5g), Fr. 5 (8.8g), Fr. 6 (12.5g), Fr. 7 (8.8g), Fr. 8 (6.4g)을 얻었다. 이 중 Fr. 7 (1.4g)을 MPLC (RP-18, Waters) 이동상은 0.1% formic acid 함유 27% CH_3CN 단일용매로 유속 1 mL/min, 35° C에서 (UV 205 nm) 반복하여 lancemaside 45.5mg을 얻었다.

(3) 산가수분해

n-BuOH로부터 단리된 물질 25 mg을 30 ml MeOH에 녹이고 3 ml의 HCl을 가하고 2시간동안 환류시켰다. 환류한 반응액을 얼음물에 넣고 EtOAc로 추출하였다. EtOAc층을 농축하여 얻었고, 이를 TLC (n-BuOH:EtOAc:H_2O=6:3:1)로 전개하였고, 전개된 사포닌은 10% sulfuricacid 용액을 분사하여 110° C 핫플레이트에 10분간 놓아 둔 후, 육안 및 254 nm UV 하에서 전개를 확인하였다. 각각의 사포닌이 전개된 silica plate의 silica powder를 회수하여 100% chloroform에 용출시킨 후, 상온의 rotary evaporator로 농축하여 농축된 시료는 80% MeOH로

회수하여 lancemaside A의 가수분해산물 (aglycone)을 얻었다.

(4) 알칼리가수분해

n-BuOH로부터 단리된 물질 50 mg을 3% KOH-MeOH (50 ml)에 넣고 30분 환류시켰다. 반응액을 얼음물에 놓고 $CHCl_3$로 추출하였다. 이를 물로 세척한 다음 농축하고 MPLC를 반복하여 lacemaside A의 알칼리 가수분해물을 얻었다.

(5) 가수분해산물의 구조결정

산 및 알칼리 가수분해로부터 얻어진 가수분해산물에 대해 ^{1}H-NMR (500 MHz), ^{13}C-NMR (125 MHz)는 각각 Varian Inova 500 NMR spectrometer와 JEOL α-500 NMR spectrometer로 측정하였다. 내부표준물질로는 TMS (tetramethyl silane)로 δ값 (ppm)으로 나타내었다. HR-ESI-MS는 Waters Micromass Q-Tof micromass spectrometer를 사용하였다.

n-BuOH분획 단리물질은 Lancemaside A (3-O-β-D-glucuronoglucosyl-3-β,16-α-dihydroxyolean-12-en-28-oic acid 28-O-β-D-xylopyranosyl(1→3)-α-L-arabinopyranosyl-(1→4)-α-L-rhamnopyranosyl(1→3)-α-Larabinopyranosyl ester)로 밝혀졌고, 이 물질은 개미취(*Aster tartaricus*)로부터 methyl ester로 단리된 aster saponin Hc로 이미 보고된 바 있다[2].

lancemaside A를 산가수분해한 물질을 MS와 NMR을 통하여 구조를 결정한 결과 lancemaside A의 aglycone인 echinocystic acid였고, 알칼리 가수분해산물은 lancemaside A의 prosapogenin인 3-O-β-D-glucuronoglucosyl-3-β,16-α-dihydroxyolean-12-en-28-oic acid임을 알 수 있었다.

Lancemaside A; 흰색의 무정형 분말로서 HR-ESI-MS (negative mode): *m/z* 1189.5588 $[M-H]^-$ (Calcd for $C_{57}H_{89}O_{26}$, 1189.5642)로서 lancemaside A로 동정한 바 있다.

알칼리 가수분해산물인 Prosapogenin; 무정형 고체로서 HR-ESI-MS (negative mode): *m/z* 809.4322 $[M-H]^-$ (Calcd for $C_{42}H_{65}O_{15}$, 809.4323) ^{1}H-NMR 및 ^{13}C-NMR 데이터를 통하여 각각 동정하였다.

나. 더덕의 사포닌분획이 혈압에 미치는 영향

(1) 시험목적

본 실험은 3차년도 결과에서 항천식활성을 가진 것으로 나타난 더덕추출물의 사포닌 분획에 대해, renin-angiotensin계 활성화를 동반하는 식염 비감수성 고renin형 유전적 고혈압 모델인 SHRSP를 이용하여 더덕 사포닌층의 혈압 강하작용에 대해 검토를 하였다. 또 고용량의 angiotensin 변환효소 (ACE) 저해제인 lisinopril과 병용하였을 때의 효과에 대해서도 검토하였다.

(2) 시험방법

표 11. 시험일정

2017년 02월 20일	동물입수
2017년 02월 25일	체중측정 및
2017년 02월 26일, 04월 29일	일반 랫트용 사료 및 수도수
2017년 05월 03일	실험동물 군 분리
2017년 05월 04일~05월 18일	더덕 사포닌분획, lisinopril 투여
2017년 05월 19일~05월 29일	결과 분석

(3) 시약

(가) ACE 저해제

① 명칭 : Lisinopril hydrate ≥98%

② 보관조건 : 상온

③ 공급원 : Avention, USA

(나) 투여물질

① 명칭 : 더덕 사포닌분획 (CLS)

② 보관조건 : 상온

③ 공급원 : 충북대학교

(4) 시험계 및 사육환경

(가) 시험계

① 동물정보

- 종 및 계통

고혈압 자연발생 랫트* (SHR, Spontaneously hypertensive rat) (Funabashi Co., Ltd. Japan)

*SHR (Spontaneously hypertensive rat)은 일본 경도대학에서 Wistar Kyoto 랫트의 혈압이 높은 동물을 선택 교배하여 1963년 SHR (고혈압 자연발생랫트)로서 확립된 고혈압질환 모델동물임

Fig. 13. SHR rat (Spontaneously hypertensive rat)

- 선정사유

본 시험에 사용하는 랫트는 renin-angiotensin계 활성화를 동반하는 식염 비감수성 고renin형 유전적 고혈압 모델임

- 성별 : 숫컷

(나) 사육환경

① 환경조건 및 측정

동물은 온도 23±3 ºC, 상대습도 55±15 %, 환기횟수 10-20회/hr, 조명시간 12 시간 및 조도 150-300 Lux로 유지되는 사육구역에서 사육하였다.

② 사육상자 및 사육밀도

동물은 적량의 깔개를 담은 폴리카보네이트 사육상자에서 순화, 투여기간에 4 마리 이하/사육상자로 사육하였다.

③ 군분리

순화기간 중 건강한 것으로 판정한 동물의 체중을 측정하여 순위화하고, 각 군의 평균체중이 균일하게 분포하도록 '시험군 구성'과 같이 무작위 분배하였다.

(5) 시험군 구성, 투여량 설정 및 투여

(가) 시험군 구성

숫컷 SHR에게 일반 랫트용 사료 및 수도수로 13주까지 사육하였다. 13.5주령에 동물을 다음과 같이 6그룹으로 나누었다.

표 12. 각 그룹별 시료 및 양성대조물질 투여량

군	성별	동물수	투여량 (mg/kg)	
			Lisinopril	더덕 사포닌분획 (CLS)
Control	M	7	0	0
CLS50[1)]	M	8	0	50
CLS100[2)]	M	8	0	100
CLS200[3)]	M	8	0	200
Lisinopril[4)]	M	10	20	0
CLS100+Lisinopril[5)]	M	10	20	100

[1), 2), 3)] 더덕 사포닌분획 (CLS) 50, 100, 200 mg/kg/day, [4)] Lisinopril 20 mg/kg/day, [5)] 더덕사포닌분획 100 mg/kg/day + lisinopril 20 mg/kg/day

(나) 투여물질의 조제

① Lisinopril의 조제

Lisinopril은 정량의 물질을 음용수에 넣고 용해시켜 음료수에 섞어 2주간 투여하였다

② 더덕 사포닌분획의 조제

고농도는 더덕 사포닌분획은 100 mg의 더덕을 칭량하여 5.6 mL의 생리식염수에 용해시켜 사용하였다. 더덕 사포닌 분획은 1일 2회, 50, 100 및 200 mg/kg/day으로 2주 동안 경구 투여하였다

③ 조제빈도

투여물질들은 투여 당일 조제하였다.

(3) 투여

더덕 사포닌분획은 1일 2회, 50, 100 및 200 mg/kg/day으로 2주 동안 경구 투여하였고, 양성대조군인 lisinopril은 음료수에 섞어 2주간 투여하였다. 대조군은 일반사료와 lisinopril 함유되지 않은 음용수를 섭취하도록 하였다.

(6) 관찰 및 검사항목

(가) 일반증상

모든 시험군의 동물에 대하여 입수일부터 시험종료일까지 사료량, 생존률 등 일반 증상을 매일 1회 이상 관찰하였다.

(나) 혈압

시험기간 중 tail-cuff법에 의해 수축기 혈압을 측정하였다.

Fig. 14. MRBP system (IITC Life Science, USA)

(7) 시험결과

(가) 일반증상

시험기간 중 각 실험그룹에서 사료량, 생존률 등 특별한 이상은 없었다.

(나) 체중

시험기간 중 각 실험그룹에서 체중에 유의한 차이는 나타나지 않았다.

표 13. 투여기간 중 체중변화

	animals	age (weeks) / Weight (g)				
		13.1	13.8	14.3	14.8	15.8
Control	7	239±2	245±3	260±5	265±3	279±5
CLS50[1)]	8	232±3	243±4	255±4	262±4	280±3
CLS100[2)]	8	238±3	245±1	258±1	266±2	281±4
CLS200[3)]	8	240±4	247±3	261±4	269±2	275±1
Lisinopril[4)]	10	235±4	244±2	258±2	270±4	285±1
CLS100+Lisinopril[5)]	10	239±2	246±4	260±4	265±5	283±4

(다) 혈압측정

용매만의 대조군에서는 시험기간을 통하여 지속적인 수축기 혈압의 상승이 관찰되었다. 또한 CLS그룹 (50, 100 및 200 mg/kg/day)에서도 대조군에 비해 유의한 혈압강하는 보이지 않았다. Lisinopril그룹에서는 수축기 혈압이 대조군에 비해 크게 저하하였고, 시험기간을 통하여 CLS보다 커다란 혈압강하작용을 나타내었다. 또 CLS+Lisinopril 그룹에서는 Lisinopril그룹과 비슷한 혈압강하효과를 나타내었다. SHRSP에서 혈압강하작용의 발현은 Lisinopril그룹에서는 투여개시 후 1.3주에 관찰되었고, 나머지 그룹에서는 유의한 혈압강하작용을 나타내지 않았다.

표 14. 수축기 혈압에 대한 영향

(단위: mmHg)

	animals	age (weeks) / Weight (g)				
		13.1	13.8	14.3	14.8	15.8
Control	7	203±1	200±5	216±6	225±6	236±5
CLS50[1)]	8	201±2	201±2	214±2	215±4	235±4
CLS100[2)]	8	203±5	205±3	214±4	219±2	225±2
CLS200[3)]	8	202±2	200±1	211±3	222±4	230±4
Lisinopril[4)]	10	203±5	178±2*	152±2*	155±2*	150±2*
CLS100+Lisinopril[5)]	10	201±5	171±3*	145±1*	150±3*	147±1*

[1), 2), 3)] 더덕 사포닌분획 (CLS) 50, 100, 200 mg/kg/day, [4)] Lisinopril 20 mg/kg/day, [5)] 더덕사포닌분획 100 mg/kg/day + lisinopril 20 mg/kg/day

* 대조군과 유의한 차이가 있음 (P<0.05: repeated measures two-way ANOVA and one-way ANOVA on rank transformed data)

(8) 결론

작용기전으로부터 보면 ACE 저해제인 lesinopril이 혈압강하작용을 갖는 것은 당연하다고 할 수 있다. 그러나 더덕 사포닌분획 단독투여군에서는 혈압이 떨어지지 않았고, 또한 더덕사포닌분획과 lesinopril 병용 투여하였을 때도 lesinopril 단독 투여하였을 때와 비교하여 유의한 혈압강하를 나타내지 않았다. 이와 같은 결과를 종합할 때 더덕 사포닌분획은 혈압강하작용을 갖지 않는다고 할 수 있다.

다. 효능분석을 통해 선별된 생리활성 물질의 유효성 평가 및 대량분리 정제

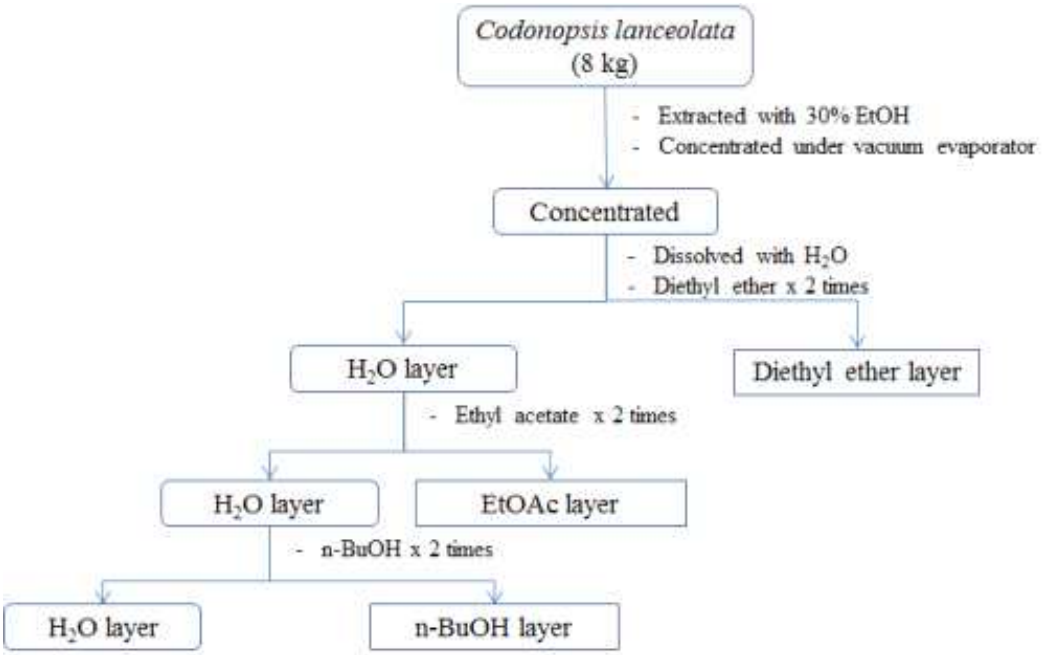
더덕은 많은 연구자에 의해 지방억제효과, 항비만 및 항염증효과가 있는 것이 보고되고 있다[1), 2), 3)]. Lancemaside A는 monocyte 및 macrophage에서 염증을 억제하는 것으로 보고되고 있고[4)], 또한 TNBS로 유도된 대장염 마우스에서 NF-kB를 억제하여 대장염을 완화한다는 보고도 있다[5)].

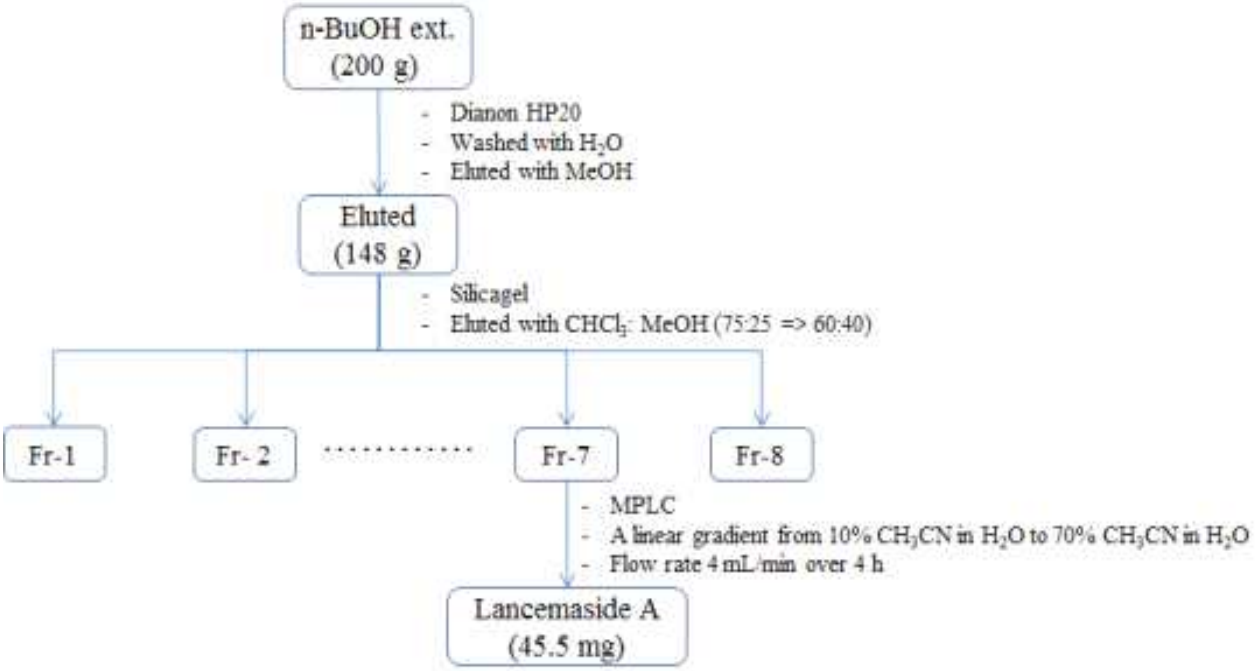
또한 본 연구에서 3차년도 항천식활성 물질 in vitro 스크리닝 (5-lipoxygenase (5-LO) 억제활성) 결과, 30% 주정알코올 추출물을 용매 분획한 4개의 분획의 10mg/kg 농도에서 5-LO 억제활성을 보면, n-BuOH > H_2O > $CHCl_3$ > Et_2O분획 순으로 활성이 높게 나타났으며, 특히 사포닌 분획 (n-BuOH 분획)에서 5-LO 억제율이 74.3±4.3%로 가장 높게 나타났다. 또한 H_2O 분획에서도 65.7±9.8% 억제율을 보였으나 Et_2O, $CHCl_3$분획에서는 거의 억제율을 나타내지 않았다. 따라서 더덕의 n-BuOH분획을 컬럼을 통하여 조사포닌을 얻고, MPLC를 사용하여 생리활성물질이라 추정되는 lancemaside A를 대량 정제하였다.

표 15. 더덕 추출물의 각 분획별 농도에 따른 5-LO활성 억제효과

Fraction	5-LO Inhibition rate (%)			
	2.5 mg/mL	5 mg/mL	10 mg/mL	20 mg/mL
Et_2O	2.0±1.1	4.7±2.5	7.7±1.1	8.0±1.3
$CHCl_3$	4.3±2.2	9.4±2.5	14.3±3.5	16.3±1.8
n-BuOH	18.9±2.2	52.1±2.4	74.3±4.3	78.2±4.3
H_2O	13.1±2.8	28.9±4.4	65.7±9.8	60.0±5.6
6-gingerol	52.4±2.1	80.1±3.8	94.3±6.8	96.2±2.8
DMSO	0.2±1.1	1.1±1.2	2.3±2.5	2.1±2.1

조사포닌을 얻기 위해 n-BuOH 분획 200g을 물에 현탁하여 Dianon HP20 (Mitsubishi Chemical Ind., Japan) 컬럼을 통과시키고, 물로 세척한 다음 MeOH로 용출하였다 (148g). 이 MeOH 용출액에 대하여 $CHCl_3$:MeOH (70:30) 용액으로 평형화시킨 silica gel을 column에 충진한 다음 $CHCl_3$:MeOH 비율을 75:25에서 60:40으로 순차적으로 용출하여 Fr 1 (4.2g), Fr. 2 (6.5g), Fr. 3 (3.9g), Fr. 4 (5.5g), Fr. 5 (8.8g), Fr. 6 (12.5g), Fr. 7 (8.8g), Fr. 8 (6.4g)을 얻었다. 이 중 Fr. 7 (1.4g)을 MPLC (RP-18, Waters) 이동상은 0.1% formic acid 함유 27% CH_3CN 단일용매로 유속 1 mL/min, 35° C에서 (UV 205 nm) 반복하여 lancemaside 45.5mg을 얻었다.


Codonopsis lanceolata
(8 kg)
- Extracted with 30% EtOH
- Concentrated under vacuum evaporator
Concentrated
- Dissolved with H2O
- Diethyl ether x 2 times
H2O layer
Diethyl ether layer
- Ethyl acetate x 2 times
H2O layer
EtOAc layer
- n-BuOH x 2 times
H2O layer
n-BuOH layer


n-BuOH ext.
(200 g)
- Dianon HP20
- Washed with H2O
- Eluted with MeOH
Eluted
(148 g)
- Silicagel
- Eluted with CHCl3: MeOH (75:25 => 60:40)
Fr-1
Fr-2
Fr-7
Fr-8
- MPLC
- A linear gradient from 10% CH3CN in H2O to 70% CH3CN in H2O
- Flow rate 4 mL/min over 4 h
Lancemaside A
(45.5 mg)

4. 가수분해산물의 생리활성물질 유효성 평가 및 대량분리 정제

가. 더덕추출물의 항염증 효과검증

우리나라의 평균수명은 국민의 생활환경이 개선되고 의학이 진보함에 따라 급속하게 늘어나고 있으므로 우리나라는 지금 세계에서 손꼽는 장수국가로 되어가고 있다. 그러나 인구의 급속한 노령화와 함께 생활습관병 환자와 이에 따르는 치매 등 요양 보호가 필요한 환자의 증기는 심각한 사회문제로 되고 있다.

생활습관병과 노화에서 그 원인이나 병의 근본이 되는 중요한 것의 하나로 만성 염증을 들 수 있다. 비만은 체지방이 과잉으로 축적된 상태로 정의되고, 지방조직에서는 지방세포의 비대화(중성지방 축적량의 증가)와 지방세포수의 증가를 그 원인으로 들 수 있다. 비만의 지방조직에서는 지방세포 자신의 변화뿐 아니라 혈관신생과 세포외 기질의 증가, macrophage 및 호중구, T 임파구 등 면역을 담당하는 세포의 침윤이 알려져 있다. 이들의 조직학적 변화로 일어나는 염증이 국소적으로 지방세포에서 분비되는 생리활성물질 (adipocytokine)의 생산조절의 혼란을 유도하여 metabolic syndrome의 형성에 관여한다.

또 생활습관병 이외에도 염증을 주요한 원인으로 하는 질환이 많이 존재하고, 그 대표적인 자가면역질환인 류마티스성 관절염과 알러지성 질환인 아토피성 피부염도 염증성 질환으로 불리고 있다. 이처럼 염증반응 대부분은 질병과 깊은 관련이 있어 과잉의 염증반응을 제어하는 것은 생활습관병을 비롯한 많은 질병을 예방 및 개선하는데 유효하다고 할 수 있다. 이러한 기본적인 배경 하에 더덕 추출물의 항염증 효과에 대해 살펴보았다.

염증은 감염 또는 외상 등으로 조직이 손상되었을 때 체내에서 일어나는 생체방어반응이다. 구체적으로는 물리적 자극 (기계적 손상, 열, 방사선, 관선, 이물질 등)이나 화학적 자극 (강산, 강알칼리 등), 또는 병원미생물, 기생충 감염, 자기항체 등의 면역 항원이 원인이 되어 국소적인 발적, 종창, 동통, 발열 등의 4가지 반응을 일으킨다. 염증은 생체에 가해지는 손상의 종류가 무엇이든 거의 공통된 경로를 따르고 있다. 우선 국소의 혈관 투과성이 항진되어 부종이 일어나고, 이어서 백혈구의 염증 부위에 대한 침윤이 일어나고, 마지막으로 육아 형성을 거쳐 치료되는 것으로 알려져 있다. 순환기 장애나 삼출현상이 일어나는 삼출성 병변을 급성염증이라 부르지만, 수일 내에 치료과정이 진행되지 않고 세포나 섬유의 증식이 나타나는 증식성 병변으로 염증이 만성화되는 것을 만성 염증이라 한다.

여러 가지 자극에 대해 염증반응이 4가지 특징이 나타나는 것은 이들의 특징이 화학적 촉매물질 (chemical mediator)에 의해 유도되기 때문이다. 염증반응을 일으키는 chemical mediator 많이 존재하지만, 열감 및 발적은 histamine, serotonin, prostaglandin E_2, bradykinin, NO, prostaglandin I_2 등이 혈관의 확장작용을 촉진하기 때문이고, 종창은 histamine, serotonin, bradykinin, prostaglandin E_2, leucotriene C_4 등이 혈관투과성을 항진시키기 때문이다. 동통은 bradykinin, prostaglandin E_2, leucotriene B_4 등이 지각신경계를 자극하여 생기는 것이고, 발열은 interleukin 1B, TNF-α, interleukin 6, interferon γ, NO 등이 체온조절중추를 높은 수준으로 설정하는 것이 원인으로 알려져 있다.

또 염증 시에 비만세포에서는 TNF-α 등의 염증성 adipocytokine과 chemokine 등 생산이 항진되고 adiponectin과 같은 항염증성 adipocytokine의 생산 감소가 일어나 염증성 변화를 초래

한다. 이러한 생산조절의 혼란이라고 하는 지방조직 기능의 이상에 의해 인슐린저항성을 비롯한 당뇨병이나 비만, 지질이상증 등의 생활습관병과 관련 있으므로 연구과제로서 아주 중요한 위치를 차지하고 있다.

대부분 염증은 그 원인을 제거하면 진정되지만, 염증 원인을 제거할 수 없거나 원인을 제거하여도 진정되지 않는 원인 불명의 난치성 염증성 질환은 특히 숙주의 면역응답성을 비롯한 염증야기 내적 인자 또는 유전 소인으로 이루어진 숙주요인이 관여하는 질환으로 항염증 전략에서 매우 중요하다.

일산화질소 (nitric oxide, NO)에 의한 각종 바이러스성 감염에 관여하는 메커니즘으로서, NO와 그에 따른 peroxinitrite (ONOO ·) 등의 반응성 질소산화물 등이 염증반응을 촉진하고, 염증성 mediator로서 기능하고 있다. NO에는 혈관 평활근 이완작용 이외에 염증성 병변에 특정적으로 나타나는 부종, 즉 혈관 투과성 항진작용을 일으키는 활성이 인정되고 있다. 또한 NO가 prostaglandin (PG)의 생합성을 촉진하는 것으로 보고되고 있다.

NO는 염증 부위에서 호중구와 macrophage에 의해 생산되는 활성산소의 하나인 superoxide (O_2^-)와 반응하여 ONOO · 등의 NO보다도 반응성이 높은 분자를 만들어내는 것으로 알려져 있다. ONOO · 는 최대의 산화력과 세포독성을 갖는다. ONOO · 는 활성산소 (ROS)와 활성질소 (RNS)를 생성한다. ROS 및 RNS는 염증, 동맥경화증, 암 등과 같은 많은 질병에 관여하고 있다. O_2^-는 생체에 대해 전혀 다른 2가지 작용을 동시에 가지고 있다. 하나는 면역시스템에 관여한다. 면역관여 세포인 호중구와 macrophage는 그 표면이 세균가 항원-항체 복합체로 자극되면 NADPH oxidase가 다량의 O_2^-를 생성하게 된다. 이 O_2^-는 활성산소로 작용하여 살균작용을 갖는다. 그러나 O_2^-가 과잉으로 생성되면 생체는 염증반응을 일으켜 자가면역질환, 암, 알코올성 간염 등으로 진행될 수도 있다고 알려져 있다.

현재 항염증약으로 스테로이드성 항염증제 (SAIDs), 비스테로이드성 항염증제 (NSAIDs), 항류마티스제, 면역억제제 등이 많아 이용되고 있다.

SAIDs는 단백질인 lipocolchine의 생성을 촉진한다. Lipocolchine은 인지질로부터 arachidonic acid를 유리시키는 작용을 갖는 phopholipase A2 (PLA2)의 활성을 억제한다. 이에 의해 염증부위에서 cyclooxygenase-2 (COX-2)의 유도를 억제한다. COX-2의 억제에 의해 PG에 의한 혈관확장, 혈관투과성 항진에 의해 일어나는 백혈구의 유주에 기인하는 염증반응과 bradykinin 증강작용에 의한 통증을 억제한다. 그러나 스테로이드 요법 시에 문제가 되는 것은 부작용이다. 부작용 대부분은 감염증이 있고, 그 외에도 당뇨병, 심근경색, 무균성 뼈 괴사, 소화 궤양, 병적인 골절 등이 인정되고 있다.

또 NSAIDs는 arachidonic acid cascade에서 COX를 저해하여 PG 생성을 억제하여 항염증 작용을 나타낸다. SAIDs에 비해 작용이 약하기 때문에 심한 부작용은 적지만, PG의 생리활성을 저해해버리므로 위장장해, 기관지천식, 신장장해 등의 부작용이 인정되고 있다.

또 동통에 관해서도 황산 모르핀과 그 밖의 진통제, 마약성 진통제는 급성 및 만성 통증에 가장 효과적인 것으로 알려져 있다. 그러나 이들은 내성과 부작용 문제가 일어나기 때문에 임상적으로 응용할 때는 주의가 필요하다.

항류마티스제는 류마티스성 관절염 (RA)의 치료제로서 염증자체를 억제하는 작용은 갖지 않지만, RA의 면역이상을 수식함으로써 RA의 활동성을 조절하고 있다. 항류마티스제는 그 작용기전으로부터 면역조절약과 면역억제제로 분류하고 있다. 그러나 항류마티스제는 부작용의 발현률이 매우 높아, 가장 많은 부작용은 소화기 증상과 마진으로 가벼운 정도라면 치료를 계속

한다. 그러나 그중에 혈액장해, 신장장해, 간질성 폐렴 등 생명과 관련된 심한 부작용도 있다. 면역억제제는 비특이적 면역억제법의 하나이고, 교원병을 포함한 전신성 자가면역질환을 비롯하여 면역 이상이 병의 원인과 관여하는 많은 질병에 사용한다. 그러나 자가면역질환은 자기 자신에 대한 면역반응이 주요한 병이기 때문에 면역억제제로 조절하지만, 효과는 비특이적으로 골수억제, 2차 발암과 같은 중대한 부작용이 일어날 수 있다.

이처럼 항염증에 관한 약에는 부작용도 있고, 사용하는 사용자 생활의 질을 저하할 가능성이 있다. 따라서 안심하고 섭취할 수 있는 항염증제의 연구 개발이 중요하다고 생각된다.

현대 생활에서 균형 잡히지 않은 식생활과 스트레스가 많은 생활환경 중에 어떻게 건강하게 살아가는가는 중요한 일이다. 건강하게 일생을 마칠 수 있는 건강수명을 늘리기 위해서는 나빠진 병을 치료하는 치료의학보다 병이 되는 시기를 늦추는 예방의학의 개념이 필요하다. 사람의 건강을 지탱하는 영양소를 6대 영양소라 하지만, (-)의 요인이 많은 현대사회에서는 6개 영양소만으로는 보충할 수 없는 영양소를 보충할 수 있는 식품을 health food라 부르고 예방의학에서는 매우 필요한 것으로 간주하고 있다.

Health food의 구체적인 기능을 식품의 제3차 기능을 갖는 것이다. Health food가 갖는 생리작용이 생활습관병을 비롯한 현대사회에서 문제가 되는 여러 질병의 예방에 유효하다고 생각할 수 있다.

항염증을 갖는 식품은 많이 보고되고 있다. 예를 들어 포도속 *Vitis vinifera* (FG) 유래의 발효포도 착즙찌꺼기는 비만세포의 탈과립에 반응하여 항염증 및 항알러지 작용을 갖는다. 또 머루의 뿌리와 줄기에 들어있는 stilbene계 화합물은 강한 활성산소소거능을 갖는 항산화작용 및 항염증작용이 보고되었다. 인도네시아와 말레이시아에서 재배되고 있는 붉은 생강을 이용한 사람의 임상시험에서는 hyaluronic acid, 혈소판 및 C 반응성 단백질 등 염증 파라케터의 저하가 관찰되어 진통작용과 항염증작용이 보고되었다. 중국 광서지방을 중심으로 마시고 있는 감차는 혈관투과성항진 억제작용을 갖는 항염증 항알러지 식품이라고 보고되고 있다. 이처럼 항염증작용을 갖는 식품에 대한 보고는 많이 존재하지만, 이들을 식생활에 도입하여 염증의 예방 및 경감효과를 기대하고 있다.

따라서 고령화가 빠르게 진행하고 있는 우리나라에서는 염증성 질환에 의한 환자의 증가는 점점 증가할 것으로 예상한다. 이들의 치료에는 의약품을 이용하는 것이 일반적이지만, 앞에서 설명하였던 것처럼 SAIDs나 NSAIDs, 항류마티스제, 면역억제제에는 부작용을 갖는 것이 많아서 안전성에 대한 우려가 크다. 따라서 누구라도 안심하고 안전하게 장기간 섭취할 수 있고, 염증성 질환의 예방과 개선에 효과가 있는 health food가 필요할 것으로 예상한다.

여기에서는 더덕 추출물 및 분획에 대하여 carageenan 부종 모델 마우스 시험과 NO 생성억제시험을 이용하여 항염증 작용을 살펴보았다.

(1) 재료 및 방법

(가) 스크리닝

스크리닝은 carageenan 부종 모델 마우스를 이용하여 시료를 평가하였다. 각 시료에는 각 지역별로 채취한 더덕, 무작위로 채취한 것을 이용하여 각각을 건조한 다음 30% 주정에탄올에 담가 상온에서 1주일 추출하였다. 추출액을 여과하고 감압 건조하여 얻어진 것을 실험에 사용하였다.

(나) 더덕 EtOH 추출물의 조제

실험에 공시한 재료는 제주도에서 재배한 3년근 더덕 Codonopsis lanceolata을 농가로부터 구입하여 사용하였다. 제주산 더덕 건조 시료 8 kg을 20 L의 30% 주정알코올에 7일간 실온에서 침지시킨 다음 (3회 반복), 여과하여 여액은 rotary evaporator로 40℃에서 감압 농축하여 910 g (11.4%)의 조추출물을 얻었다. 이 조추출물을 용매의 극성에 따라 diethylether, ethyl acetate, normal butanol 순으로 용매 분획하여 에테르층, 에틸아세테이트층, 부탄올층 및 물층을 얻었고, 여기에서 얻어진 부탄올층을 사포닌분획으로 하였다.

표 16. 더덕 추출물의 각 분획별 추출

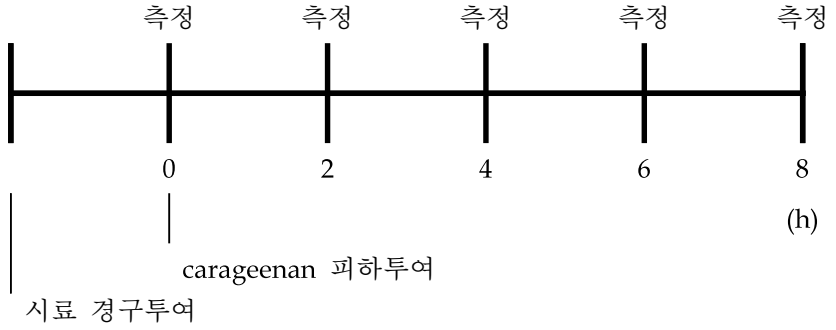
Solvent	Yield (g)
Diethyl ether	41.2
Ethyl acetate	92.5
normal butanol	300.1
Water	350.6
Total	784.4

(다) 실험동물, 사육 및 관리

실험동물로는 ddY 마우스, 숫컷, 9주령 (Samtako Korea)을 사용하였다. 마우스 사육실은 온도 (25±0.5℃), 습도 (60±3%), 명암주기 12시간의 환경조건에서 사육하였다. 물과 사료 (MR stock, 일본농산공업)은 자유로이 섭취하도록 하였다.

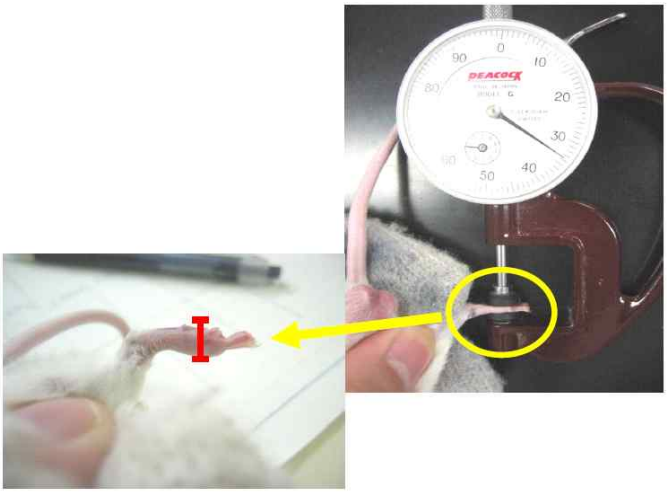
(라) Carageenan 부종 모델 마우스 실험 순서

마우스의 오른쪽 발바닥의 용적과 두께를 측정하고 (0시간), 증류수로 현탁한 시료를 250 mg/kg, 500 mg/kg의 용량이 되도록 마우스에 경구투여하였다. 대조군으로는 동량의 증류수를 경구투여 하였다. 1시간 후 오른쪽 발바닥에 생리식염수로 용해한 1% Carageenan (COSMO BIO)을 50 μL 주사 투여하였다. 주사 후 각 시간마다 오른쪽 발바닥의 용적과 두께를 측정하였다.



(마) 발바닥 두께의 증가량 측정

Carageenan에 의해 마우스 발바닥에 유도된 부종의 정도를 각 시간마다 발바닥의 두께와 용적의 증가량으로 평가하였다. 측정 순서는 그림과 같다. 두께의 증가량에 대해서는 두께측정기(Peacock)를 사용하였고, 마우스 오른쪽 발바닥이 수평으로 펼쳐지도록 고정하여 측정기의 앞부분이 오른쪽 발바닥 돌기 부분의 중앙에 오도록 하여 측정하였다.



(바) 발바닥 용적의 증가량 측정

샘플 튜브에 물을 채우고 난 다음 시린지로 물을 2/3 정도 빨아올린다. 그리고 마우스 오른쪽 발을 표시해놓은 곳까지 샘플 튜브에 넣은 다음, 표시해놓은 곳까지 시린지의 물을 넣는다. 이때 시린지에 남은 물을 마우스 발의 용적으로 하여 기록하였다.

(2) 결과

(가) 스크리닝 결과

스크리닝은 carageenan 부종 모델마우스 시험을 이용하여 시료의 항염증 작용을 평가하였다. carageenan 부종의 최고점에 달하는 주사 4시간 후의 두께와 용적에 초점을 맞추어 시료 대신에 증류수를 투여한 대조군과 비교하여 부종형성 억제율이 20% 이상이면 △로 표시하고, 부종형성 억제율이 45% 이상이면 ◎로 표시하였다.

스크리닝 결과 더덕의 사포닌분획에서 가장 강한 부종형성억제작용 즉, 항염증작용이 나타났다. 따라서 사포닌분획에 대해서만 검토하기로 하였다.

Fraction	Inhibition rate (%)			
	250 mg/kg		500 mg/kg	
	thickness	volumn	thickness	volumn
Et_2O	X	X	X	X
Ethylacetate	X	X	X	X
n-BuOH	△	◎	◎	◎
H_2O	X	X	△	△

(나) 추출물의 활성

① Carageenan 부종 모델마우스 시험

더덕의 부탄올층 투여군에서는 250 mg/kg 투여군과 500 mg/kg 투여군에서 유의하게 부종을 억제하였다. 두께의 증가량에서는 대조군을 100%로 하였을 때, 250 mg/kg 투여군에서 2시간째 31.5%, 4시간째 53.1%를 억제하였다. 또한 용적 증가율에서도 250 mg/kg 투여군과 500 mg/kg 투여군에서 농도의존적으로 부종형성 억제 경향을 보였다.

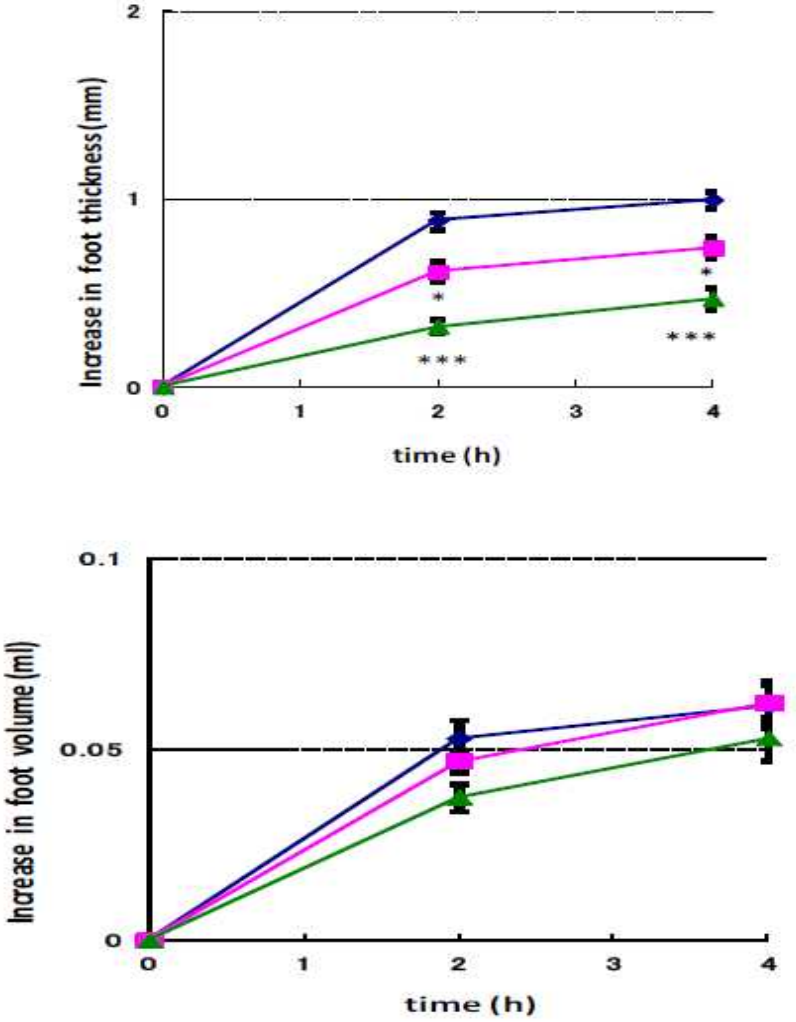


Fig. 15. Carageenan 부종 모델마우스에서 더덕 부탄올층의 항부종효과

◆ 대조군 (증류수), ■ 더덕 부탄올층 250 mg/kg, ▲ 더덕 부탄올층 500 mg/kg

Each value represents mean ± S.E. (n=6), * : $p<0.05$, *** : $p<0.005$ vs Control.

② 일산화질소 (NO) 생성억제효과 시험

더덕 부탄올층은 MTT assay 결과 3.125~200 μg/mL의 범위에서 세포생존률 저하를 보이지 않았다. 또 더덕 부탄올층은 대조군에 비해 25~250 μg/mL에서 농도 의존적으로 유의하게 NO 생성을 억제하였다. 25 μg/mL에서는 12.5%, 50 μg/mL에서는 28.5%, 100 μg/mL에서는 44%, 200 μg/mL에서는 43%의 생성억제 작용을 보였다.

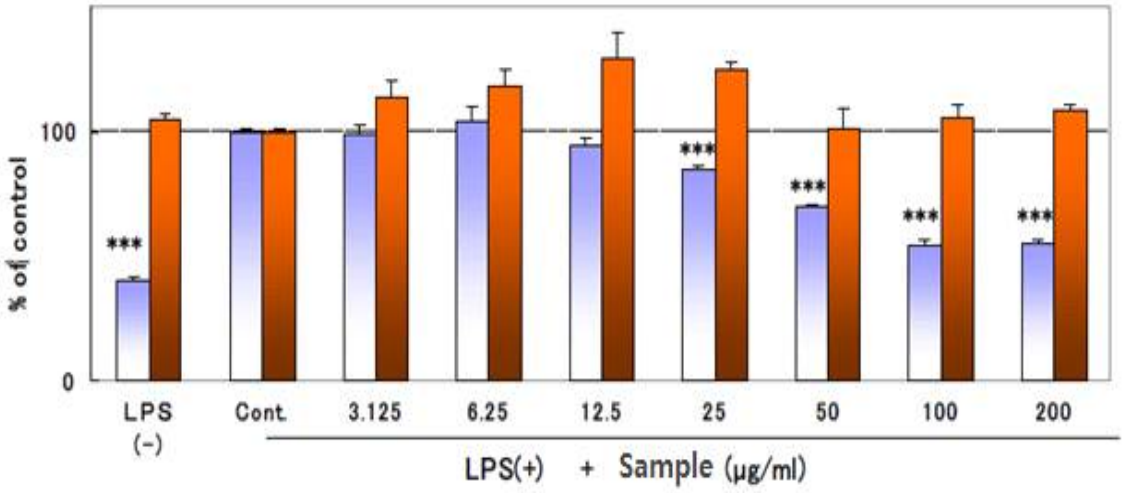


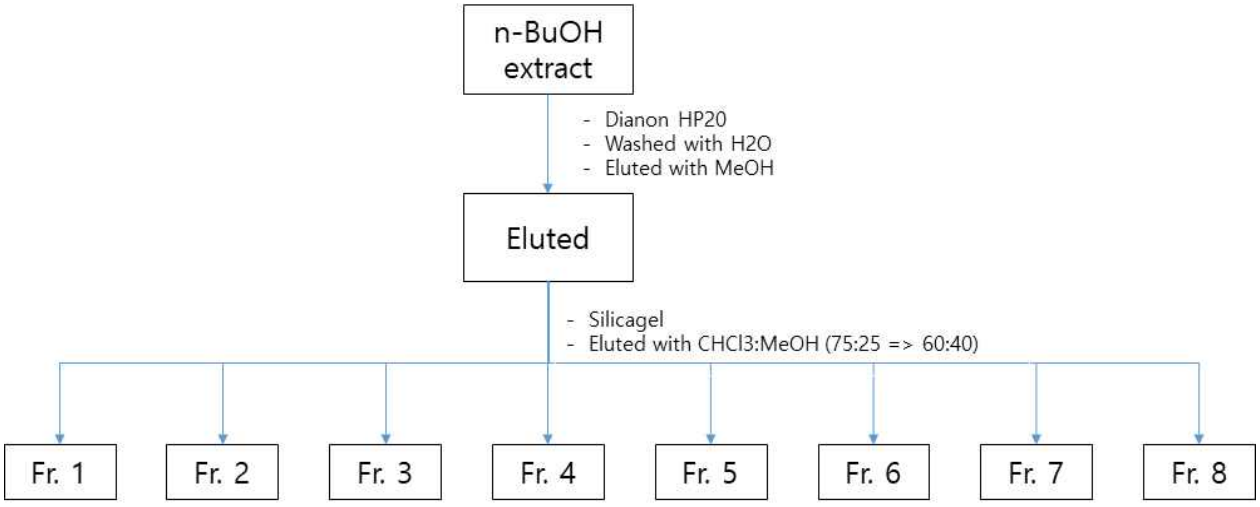
Fig. 16. 더덕 부탄올층이 RAW264.7 세포의 생존율에 미치는 영향과 세포의 NO 생성에 미치는 영향

(NO 생성률, 세포생존률)

Each value represents mean ± S.E. (n=6), * : p<0.05, *** : p<0.005 vs Control.

③ 부탄올층 분획의 억제활성

더덕의 부탄올층을 column chromatography로 분리하여 8개의 분획을 얻었다. 각각의 분획에 대해 carageenan 부종 모델마우스시험을 한 결과, Fr-7은 유의한 carageenan 부종 억제활성을 나타냈다. 두께의 증가량에서는 대조군을 100%로 하였을 때 투여후 2시간에 53.2%, 4시간째 33.7%, 6시간째 45.6%를 억제하였다. 또 Fr-8에서도 6시간째 22.7%를 억제하였다. 용적의 증가량은 대조군을 100%로 하였을 때 Fr-7에서 6시간째 51.9%를 억제하였다.



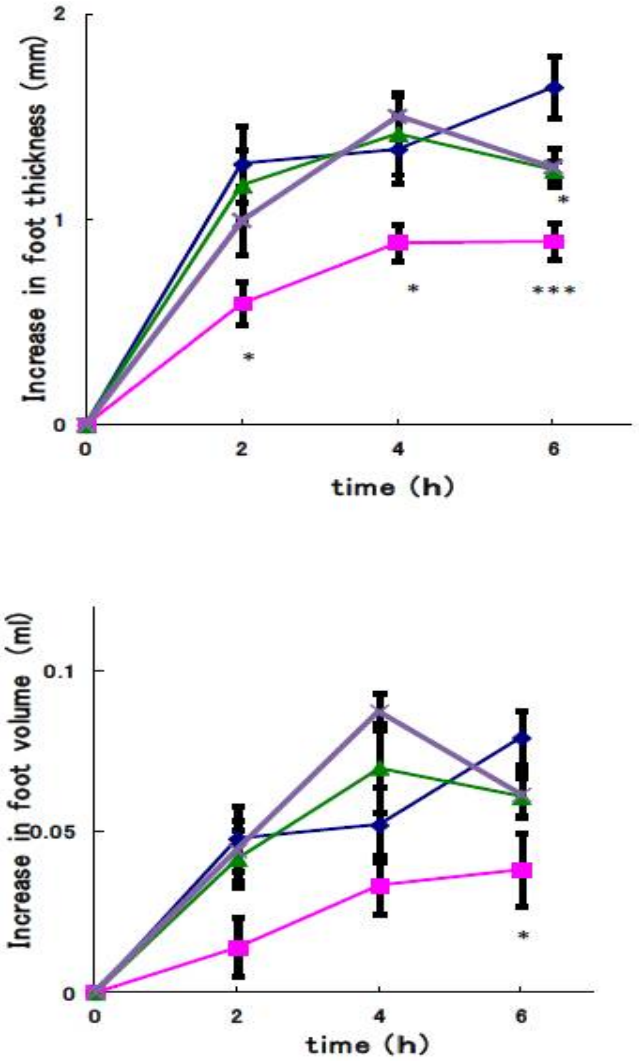


Fig. 17. Carageenan 부종 모델마우스에서 더덕의 부탄올층 분획의 항부종작용에 미치는 영향
◆; 대조군 (증류수), ■; Fr-7 1,000 mg/kg, ▲; Fr-8 1,000 mg/kg, ×; F-5 1,000 mg/kg

(3) 결론

본 연구결과 더덕 (Codonopsis lanceolata)의 부탄올층에 carageenan 부종 모델마우스에서 부종형성 억제작용 (in vivo)과 Gress법에 의한 일산화질소 (NO) 생성억제작용 (in vitro)dl 확인되었다.

염증은 다양한 염증발생경로를 거쳐 생기는 복잡한 현상이므로 하나의 염증 발생 경로에 대한 억제효과를 갖는다 해도 그것을 함염증효과라고 하는 것은 곤란하다. 그러나 염증 발생 경로에 대해 항염증적으로 반응하는 염증 모델을 실험적으로 만들어내기도 어렵다고 생각된다. 임상실험에서 조차 대상으로 하는 염증질환의 종류에 따라 대상약물의 효과에 현저하게 차이가 나올 정도이므로 동물실험의 단계에서 단일한 방법으로 효과를 검정하기는 쉽지 않다. 함염증효과를 검정하는 방법에는 매우 많은 종류가 있고, 그중 이번 연구에서는 비교적 자주 이용되는 carageenan에 의한 부종의 억제효과를 지표로 하여 항부종작용을 살펴보았다.

Carageenan 부종 모델마우스 시험에서 더덕 추출물의 부탄올층은 500 mg/kg 투여하였을 때 대조군 (증류수)에 대해 발바닥의 부종을 유의하게 억제하였다. Carageenan 부종 모델마우스 시험에서 종창은 금성삼출에 의한 종창이다. 유해자극이 생체 내에 작용하면 국소에서 미소유주가 일어난다

(새포반응). 혈관반응은 열감, 발적이라고 하는 염증반응의 주요한 증상의 기초를 이룬다. 한편 혈관투과성 항진은 백장단백을 수반하여 물이 혈관 밖으로 새어 나감에 따라 일어난다. 이것이 염증에 의한 종창의 원인이 된다. Carageenan은 Cyclooxygenase 2 (COX-2)를 활성화한다. PGE2는 염증이 일어났을 때 동통과 종창에 깊이 관여하고 있다. 염증반응이 강할수록 PG의 생산은 강하게 일어난다는 것이 밝혀져 있어 항염증물질을 찾는데 커다란 지표로서 PG 생산저해활성, COX 저해활성이 이용되고 있다.

더덕의 부탄올층은 Carageenan 부종을 억제하기 때문에 COX 저해작용 또는 COX가 관여하는 arachidonic acid cascade에서 PGE2 생산을 억제하는 작용이 있을거라 생각된다.

일산화질소 (NO)는 혈관확장과 신경전달물질을 갖고 있어 항염증작용과 면역작용에서 중요한 물질로서 알려져 있다. 구체적으로는 내피세포유래 평활근이완인자 (EDRF)로서 혈관 평활근 이완작용을 갖고 있어 혈관유지작용을 하고 있다. 또 중추 또는 말초신경에서 신경전달물질로서 작용하고 있다. 그러나 NO는 COX-2, phospholipase A2 (PLA2)를 S-nitrosylation하여 효소활성을 증강시키고, PGE2의 생산을 항진시키는 것으로 알려져 있다. 또 염증이 일어났을 때에는 interferon γ, TNF-α, interleukin 1β (IL-1β) 등의 염증성 cytokine의 생산유도를 매개로 하여 유도형 NO 합성효소 (iNOS)가 발현되고, 항상 발생하는 구성형 NO 합성효소 (cNOS)에 의한 NO 생성보다도 장시간에 이르는 과잉의 NO 생산이 인정되고 있다. NO 자체에 높은 화학적 반응은 없지만 NO는 superoxide (O_2^-)와 반응하여 강력한 세포저해활성을 갖는 peroxynitrite ($ONOO^-$)를 생성한다. 이 $ONOO^-$가 세포상해와 혈관투과성 항진을 일으켜 염증반응을 촉진시킨다. 따라서 과잉의 NO가 염증반응을 촉진하는 작용을 갖는다고 생각된다. 이 연구에서는 RAW264.7 세포를 사용하여 NO 생산억제작용 시험을 하였다. 그 결과 더덕 부탄올층 (25~200 mg/kg)에서 농도의존적으로 유의한 NO 생산억제작용이 확인되었다.

활성성분의 정제를 위해 더덕 부탄올층의 분획을 하였다. Carageenan 부종 모델마우스 시험을 지표로 하여 Fr. 6에서 Carageenan 부종억제작용이 인정되었다. 활성물질의 분리 결과 이 층에서는 lancemaside A를 단리화여 동정하였다. 또한 더덕 부탄올층에서는 MTT 시험결과 세포독성이 보이지 않았다.

본 연구에서 더덕 부탄올층의 Carageenan 부종억제작용과 NO 생산억제작용을 확인하였고, 이를 통하여 더덕 부탄올층은 항염증작용이 있음을 알았다. 앞으로 염증성 cytokine 생성억제작용, 염증반응과 면역반응을 조절하는 전사인자인 NF-kB의 활성저해작용, 그리고 여러 가지 염증모델시험 (in vivo)를 통하여 항염증반응을 확인해볼 가치가 있는 것으로 생각된다. 부종억제작용과 NO 생산억제작용을 갖는 더덕 부탄올층의 용도로서 기능성 식품 등을 떠올릴 수 있으며 항염증이라는 목적으로 사회공헌이 기대되는 health foodfhtj 유용한 식품소재임을 시사한다.

나. 더덕추출물의 항고혈압 효과검증 (in vitro)

(1) 고혈압

고혈압이란 혈관의 내압이 일정 기준을 넘고 있는 상태를 말한다. 혈압은 심박출량과 말초혈과저항에 의해 규정된다. 심박출량은 심장의 수축력과 순환혈액량의 2가지 인자에 의해, 말초혈관저항은 혈관의 탄력성과 혈관 직경 등의 인자에 의해 규정된다. 고혈압은 크게 2종류로 나눌 수 있다. 하나는 본태성 고혈압이라고 하는 것으로 고혈압의 90% 이상이 이에 해당한다. 본태성 고혈압은 원인이 명확하지 않고 유전적요인과 환경요인이 관여하는 것으로 알려져 생활습관병의 하나이다. 또 다른 하나는 속발성 고혈압이라 하며 원인이 명확한 고혈압을 말한다. 속발성 고혈압에는 신동맥의 일부가 좁아져 생기는 신혈관성 고혈압, 신사구체를 원인으로 하는 신성 고혈압, 부신의 종양이나 당질 코르티코이드 호르몬의 과잉분비에 의한 내분비성 고혈압이 있다. 고혈압은 자각증상으로서 그다지 현저한 변화가 없지만 병적으로 높은 동맥 내압이 지속되면 심장 혈관계에 고혈압성 장기 장해를 일으키는 질환이다. 고혈압에 의 해 일어나는 장기 질환으로는 심장좌심실비대, 우심실예비능 저하, 좌심실부전, 중추신경계의 뇌출혈, 신장의 신세동맥장해에 의한 신경화증 등이 있다. 또한 고혈압에 복수의 인자가 관여하는 것으로 뇌경색이나 심근경색 등의 동맥경화성 질환을 일으킨다.

이처럼 본태성 고혈압의 발병원인은 명확하지 않으나 심박출량이나 말초혈관저항의 상승에 관여하는 협압상승인자는 해명되고 있다. 협압상승인자에는 교감신경계, renin-angiotensin (RA)계, 나트륨 등이 있다. 교감신경계 (sympathetic nervous system)은 심신의 작용에 의해 혈압 및 심장기능을 조절하는 혈압조절기구이다. 교감신경 기능항진은 말초교감신경 말단으로부터 noradrenaline, 부신피질로부터 adrenaline을 분비하여 noradrenaline은 세동맥 (arteriole) 수축을 일으켜 신장에서 나트륨의 배출을 억제하며, adrenaline은 심박수 (heart rate), 심박출량 (cardiac output)의 증가, renin 분비 촉진, 혈압상승을 일으킨다.

Renin-angiotensin (RA)계는 신장의 사구체세포에서 만들어진 renin에 의해 간장 유래의 angiotensinogen이 angiotensin I으로 변환된다. Angiotensin I은 폐나 혈관내피세포의 막표면에 존재하는 Angiotensin I 변환효소 (Angiotensin Convertin Enzyme, ACE)에 의해 Angiotensin II로 변환된다. Angiotensin II는 혈관수축 (vasoconstriction), 부신피질에서 aldosterone 분비와 날세동맥 (efferent arteriole) 수축 등을 촉진하여 혈압을 상승시킨다.

나트륨은 체내에서 체액량을 증가시켜 심장에서 박출하는 혈액량이 증가함으로써 혈압이 상승한다. 또한 말초동맥벽의 세포 내에 나트륨이 증가하면 혈관벽이 부어올라 말초혈관 저항이 증가함으로서 혈압이 상승된다. 그밖에도 신장에 대해 근위로부터 원위세뇨관으로부터의 나트륨 재흡수를 증가시키는 인슐린, 혈관평활근세포의 수축성을 갖는 endoserine과 thromboxan 등 많은 인자들이 관여하고 있다.

혈압이 높은 상태가 계속되면 뇌졸중, 심근경색, 신장장해 등의 합병증의 증상이 나타난다고 알려져 있고, 고혈압은 심혈관질환 등 가장 위험한 인자이다. 국민건강영양조사의 2016년 고혈압 유병률을 우리나라 전체 인구에 적용하면 국내 고혈압 유병인구는 1,100만명이 넘는 것으로 추정된다. 그러나 실제 고혈압으로 진단 받은 사람은 약 890만 명에 그친다. 꾸준히 치료받는 사람은 573만 명으로 전체 유병자의 64%로 더 낮다. 고혈압 조절률은 이보다도 낮은

44%에 불과하다. 고혈압을 가지고 있는 사람의 대부분 약물 치료는 받지만 치료 지속율이 낮아서 많은 사람들이 혈압 조절에 실패하는 것으로 해석된다. 따라서 고혈압의 치료 및 예방은 중요한 과제이다. 고혈압은 유전적인 요인과 더불어 식생활, 운동, 흡연, 음주, 스트레스 등이 깊이 관여하고 있어 생활습관을 개선하여 그 진행을 예방할 수가 있다.

더덕은 식품으로서 각각의 기능이 보고되고 있어 최근 생활습관병의 증가, 의료비의 증가, 나아가 더덕의 이용증대 면에서 더덕의 생리특성, 특히 고혈압 억제활성에 대해 알아보고자 하였다. 혈압조절 메커니즘의 하나인 renin-angiotensin계의 주요 효소인 Angiotensin I 변환효소 (Angiotensin Convertin Enzyme, ACE) 저해제가 고혈압 치료약의 제1 선택약으로 이용되어 왔지만, 부작용의 관점에서 온화한 효과를 가지면 부작용이 적은 식품에 주목이 집중되고 있다.여기에서는 더덕의 고부가가치화에 의한 이용확대를 목적으로 더덕 추출물의 ACE 저해활성을 살펴보고 그 이용확대에 대한 가능성을 살펴보고자 하였다.

(2) 재료 및 방법

(가) 시료조제

실험에 공시한 재료는 제주도에서 재배한 3년근 더덕 Codonopsis lanceolata을 농가로부터 구입하여 사용하였다. 제주산 더덕 건조 시료 8 kg을 20 L의 30% 주정알코올에 7일간 실온에서 침지시킨 다음 (3회 반복), 여과하여 여액은 rotary evaporator로 40℃에서 감압 농축하여 910 g (11.4%)의 조추출물을 얻었다. 이 조추출물을 용매의 극성에 따라 diethylether, ethyl acetate, normal butanol 순으로 용매 분획하여 에테르층, 에틸아세테이트층, 부탄올층 및 물층을 얻었고, 여기에서 얻어진 부탄올층을 사포닌분획으로 하였다. 사포닌 분획을 100 mM 붕산완충액 (pH 8.3)에 용해한 것을 시료로 하였다.

(나) HPLC를 이용한 ACE 저해활성 측정

ACE 저해활성 측정법은 Cushman and Cheung이 개발한 효소반응 조건에 Horiuchi 등이 설정한 HPLC를 이용한 생성물 정량법을 조합한 방법을 이용하였다.

100 mM 붕산완충액 (pH 8.3)에 용해한 토끼 간유래의 ACE (최종농도 10 mU/mL)에 시료 및 NaCl 수용액 (최종농도 250 nM)을 첨가하여 혼합액으로 하였다. 혼합액을 37℃에서 5분간 예비가온하고, 기질인 hippuryl histidyl leucine (HHL 최종농도 3 nM)을 가하고 효소반응을 시작한다. HHL 최종농도는 HHL에 대한 Km=1.3 nM이므로 효소반응속도가 최대속도 Vmax가 되는 3 nM로 하였다. 반응액을 37℃에서 60분간 배양한 다음 1 M HCl을 첨가하여 반응을 정지시켰다. 반응액 중에 유리된 hippuric acid (HA)를 HPLC로 정량하였다. 정량에 이용한 HPLC의 조건은 다음과 같다. Column은 Inertsil ODS-3 (GL Science Inc.)을 사용하였고, column 온도는 상온으로 하였다. 이동상은 MeOH : 10 mM KH_2PO_4 = 1:1의 혼합액으로 하여 유속은 0.5 mL/min로 하였다. 또 생성물 정량은 UV 228 nm에서 검출하였다. 또한 ACE 저해율의 계산은 다음과 같이 하였다.

저해율 (%) = (1 - A/B) X 100

A; 시료용액을 이용하였을 때의 hippuric acid의 피크면적

B; 시료용액 대신에 100 mM 붕산완충액 (pH 8.3)을 첨가하였을 때 hippuric acid의 피크면적

즉 시료용액 대신에 100 mM 붕산완충액을 이용한 것을 저해율 0%로 하여, 실험마다 측정하여 피크면적의 감소율을 저해활성율로 하였다.

Sample (10 μL)
60 mU/mL ACE from rabbit lung* (20 μL)
1M NaCl (30 μL)
⇩ 37℃ for 5 min
Addition of substrate (6 mM HHL* 60 μL)
⇩ 37℃ for 60 min
Addition of 1 M HCl (60 μL)
⇩
Detection of product (HA) byHPLC analysis

HPLC analysis
column: Inertsil ODS-3 (GL Science Inc.)
Mobile phase; MeOH : 10 mM KH_2PO_4 = 1:1
Adjust pH 3.0 with H_3PO_4
Flow rate: 0.5 mL/min
Detection; UV 228 nm

Fig. 18. Assay of ACE inhibitory activity

* Final concentration of 10 mU/mL, * Hip-His-Leu (Final concentration of 3 mU/mL)

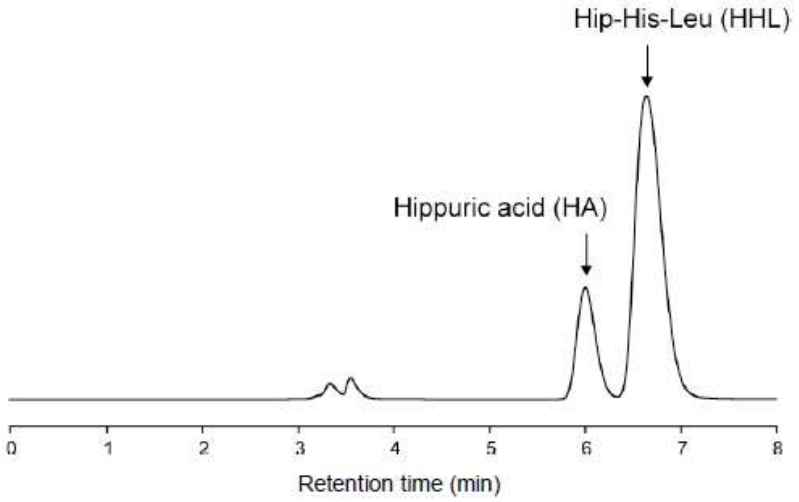


Fig. 18. Chromatogram of hippuric acid by RP-HPLC analysis

(다) 추출온도와 ACE 저해활성

더덕을 분쇄하여 얻어진 분말 5 g을 30% EtOH 100 mL를 가하고 25℃에서 24시간, 80℃에서 2시간, 4℃에서 24시간 각각 추출하였다. 추출액을 여과하여 얻은 액을 동결건조하여 더덕추출물로 하였다. 더덕 추출물을 100 mM 붕산완충액 (pH 8.3)에 용해한 것을 시료로 하였다.

(라) 추출시간과 ACE 저해활성

더덕을 분쇄하여 얻어진 분말 5 g을 30% EtOH 100 mL를 가하고 25℃에서 추출하였다. 추출

시간을 10분, 30분, 1시간, 2시간, 6시간, 12시간, 24시간으로 하고 각각 여과한 액을 동결건조하였다 동결건조한 추출물을 3 mg을 다시 100 mM 붕산완충액 (pH 8.3)에 용해하여 0.3% (w/v) 시료용액으로 하였다.

(마) 더덕추출물의 열처리

0.5% (w/v) 더덕추출물 용액 (더덕추출물 1 mg을 100 mM 붕산완충액 (pH 8.3) 200 mL에 용해)를 IWAKI Thermo Alumni Bath ALB-121 (Asahi Technoglass)를 이용하여 60, 80, 120, 140℃에서 1시간 배양하였다. ACE 저해활성은 위의 방법에 따라 측정하였고, 25℃ 1시간 실온에서 처리한 그룹의 저해활성을 100%로 하여 상대활성으로 평가하였다.

(바) 더덕 추출물의 pH 처리

더덕추출물을 각종 완충액에 용해하여 1시간 상온에서 처리하였다. 본 실험에 이용한 각 완충액을 표 1에 나타내었다. 처리 후 3배량의 100 mM 붕산완충액 (pH 8.3)을 가하고 HCl와 NaOH를 이용하여 pH 8.3으로 조정하였다. 그리고 조정한 1.0% (w/v) 더덕추출물 용액을 이용하여 ACE 저해활성을 측정하였다. ACE 저해활성은 위의 방법에 따라 측정하였고, 100 mM 붕산완충액 (pH 8.3)에 용해하여 1시간 실온에서 처리한 그룹의 저해활성을 100%로 하여 상대활성으로 평가하였다.

표 17. List of treatment buffers system for pH test of the n-BuOH layer

Buffer system	Concentration	pH
Na-citrate	100 mM	3.0
Na-citrate	100 mM	4.0
Na-acetate	100 mM	5.0
Na-acetate	100 mM	6.0
HEPES	100 mM	7.0
EPPS	100 mM	8.0
Na-Borate	100 mM	8.3
CHES	100 mM	9.0

(3) 결과

(가) 더덕추출물의 ACE 저해활성

더덕 추출물의 사포닌 분획을 100 mM 붕산완충액 (pH 8.3)에 용해한 것을 시료로 하여 ACE 저해활성을 측정하였다. 그 결과 모든 농도에서 ACE 저해활성이 인정되었다 ACE 저해활성은 농도 83 μg/mL에서 20.8%, 417 μg/mL에서 48.0%, 833 μg/mL에서 66.3%,로 농도 의존적으로 저해하였다.

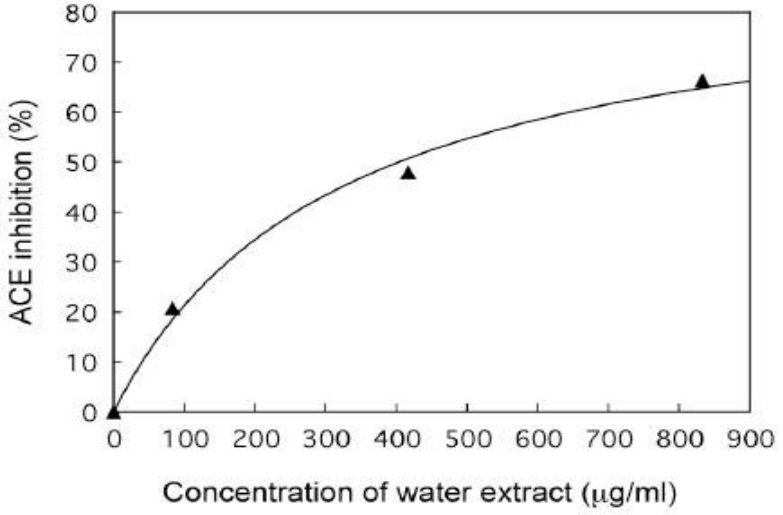


Fig. 19. ACE inbibitory activity of n-BuOH layer from Codonopsis lanceolata

(나) 추출온도와 ACE 저해활성

추출온도에 따른 ACE 저해활성의 차이를 살펴보았다. 추출온도 및 시간 조건은 실용성의 관점 및 기능성 시험에 자주 이용되는 조건으로 하였다. 30% EtOH 추출물에서 ACE 저해활성이 농도의존적이므로 저해농도 50%가 되는 IC50값을 구하였다. IC50값은 약리학적인 연구에서 저해효과가 50%가 되는 실험계 내에서 저해제 농도이다. 여기에서는 IC50값은 추출물이 ACE 의 효소반응을 반수 저해하기 위해 필요한 추출물의 농도로 나타내고, 보다 낮은 값을 나타내는 것은 저해제로서 활성이 강한 것을 나타낸다. 그 결과 ACE 저해활성의 IC50값은 4℃ 추출물에서 421 μg/mL, 25℃ 추출에서 197 μg/mL, 그리고 80℃ 추출에서 404 μg/mL로서 25℃ 추출에서 가장 높은 ACE 저해활성을 보였다. 또한 합성약물인 Captopril의 IC50값은 4.9 nM 이었다. 한편 각각의 온도조건에서 추출물 수량 (중량)은 추출에 이용한 더덕분말 중량을 100%로 하여 4℃ 추출3.98±0.44%, 25℃ 추출에서 3.99±0.15%, 그리고 80℃ 추출에서 3.51±0.61%로서 추출물 수량은 온도에 상관없이 큰 차이가 없었다. 이러한 결과로부터 추출온도는 25℃로 하였다.

표 18. Effects of extraction temperature and time on ACE inhibitory activity of 30% EtOH extract

Extraction		ACE inhibition IC50 (μg/mL)	Extracts yield % (w/w)
Temp. (℃)	Time (h)		
4	24	421	3.98±0.44
25	24	197	3.99±0.15
80	2	404	3.51±0.61

(다) 추출시간과 ACE 저해활성

추출시간과 ACE 저해활성을 검토하였다. 추출시간 10분에서 10.8%, 1시간에서 22.9%, 6시간에서 38.3%로 저해활성이 증가되는 것이 확인되었다. 그 후 24시간 추출까지는 일정한 저해활성이 유지되었다.

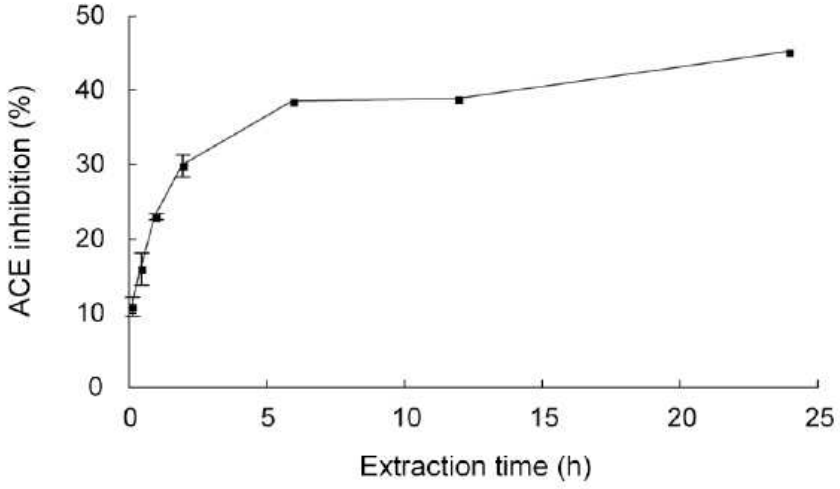


Fig. 20. Effects of extraction time on ACE inhibitory activity of 30% EtOH extract

(라) 더덕추출물의 열 및 pH 안정성

더덕추출물의 부탄올층의 열 및 pH 안정성을 확인하였다. 열에 대한 안정성을 알기 위해 부탄올층을 각 온도조건에서 1시간 처리하였다. 그 결과 25℃에서의 ACE 저해활성을 100%로 하였을 때 60℃에서는 93.6%, 100℃에서는 88.7%, 140℃에서도 87.7%의 상대활성이 유지되었다.

다름으로 pH 조건에 대한 안정성을 알아보기 위해 부탄올층을 25℃에서 각 pH 조건하에서 1시간 처리하였다. 그 결과 pH 8.3에서 저해활성을 100%로 하였을 때 pH 3.0에서는 95.4%, pH 6.0에서는 100%, 그리고 pH 9.0에서는 94.1%의 상대활성을 나타내었다. 이상으로부터 부탄올층 중에 존재하는 ACE 저해활성 성분은 열 및 pH에 대해 안정한 물질임을 알 수 있었다.

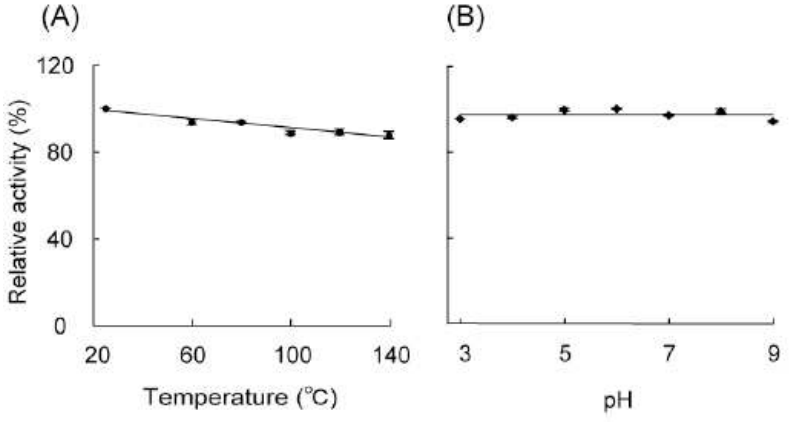


Fig. 21. Temperature and pH stability of n-BuOH layer on ACE inhibitory activity
(A) Temperature stability; (B) pH satability. Bar=S>E. (n=3)

(4) 고찰

이번 in vitro 연구에서 더덕추출물의 부탄올층은 농도 의존적으로 ACE 저해활성을 나타내었, 여기에는 ACE 저해활성과 관계된 활성물질이 있는 것으로 판단된다. 또한 더덕추출물 부탄올층의 열 및 pH에 대한 안정성의 결과 활성 물질은 열에 대해서도 안정하고 pH에 대해서도 안정한 물질임을 알 수 있었다. 그러나 추출온도를 검토한 결과에서는 추출 시의 온도에 의해 저해활성이 크게 차이가 나고 있어, 이들 결과로부터 추출에서 효소반응 등의 작용에 의해 생성된 생성물이 ACE 저해활성을 나타내고, 일단 생성된 물질은 열과 pH에 대해 안정한 물질이라 생각된다.

한편 앞서 renin-angiotensin계 활성화를 동반하는 식염 비감수성 고renin형 유전적 고혈압 모델인 SHRSP를 이용하여 더덕 사포닌층의 혈압 강하작용에 대해 검토를 하였을 때 더덕 사포닌분획 단독투여군에서는 혈압이 떨어지지 않았고, 또한 더덕사포닌 분획과 lesinopril 병용 투여하였을 때도 lesinopril 단독 투여하였을 때와 비교하여 유의한 혈압강하를 나타내지 않았다. 여기에서 작용기전으로부터 보면 ACE 저해제인 lesinopril이 혈압강하작용을 갖는 것은 당연하다고 할 수 있다. 또한 ACE 저해활성을 in vitro에서 살펴보았을 때 활성이 인정되었다. 따라서 이에 대해서는 ACE 저해활성 기전에 대하여 좀 더 상세한 연구가 뒷받침되어야 할 것으로 사료된다.

[국내 자생 더덕의 우량품종 선발, 육성 및 생물공학적 기법을 이용한 대량생산 시스템 확립]

1. 우리나라의 주요지역에 분포하는 더덕의 우량품종 선발 및 주요지역 품종의 성분분석

가. 한국과 일본산 더덕의 생육 및 무기성분 함량 비교

한국산(평창) 및 일본산(나가노현)의 2년생 더덕의 뿌리(생체중 7.5～8.0g)를 공시재료로 하였다. 이들 공시재료를 우송정보대학 시험포에 각각 100주씩 정식하여 재배하였으며, 본엽이 2매 이상 출현했을 때부터 15일 간격으로 초장, 엽폭, 엽장 및 분지수 등의 생육을 조사했다. 수확 후 초장, 엽폭, 엽장 및 분지수 등의 생육 및 근장, 근경, 생체중 등의 수량조사를 하였다. 또한 수확한 더덕의 잎, 줄기, 뿌리의 부위별 무기성분을 분석하였다.

(1) 연구방법

(가) 무기성분 분석

시료를 600° C로 12시간 회화하고 습식분해법(Woo and Ryoo, 1983)으로 분해하여 탈이온 증류수로 정량하고 검액하였다. 마쇄한 한국산과 일본산 더덕의 잎, 줄기, 뿌리 등 각각 2g에 진한 질산 10 ml를 가하여 처음에는 낮은 온도로 가열하고 점차 고온으로 가열하면서 분해하였다. 분해액이 백색 투명하게 되면 냉각시키고 분해액에 증류수를 가하고 100 ml로 정량한 후 여과하여 여액을 분석시료로 하였다. 각 무기성분의 정량은 유도결합플라스마 분광광도기(ICP, Inductively Coupled Plasma, 3300DV, PerkinElmer Optima, USA)를 이용하여 분석하였다, 분석조건은 다음과 같다. 가스유속은 plasma 15 l/min, auxiliary 0.5 l/min, nebulizer 0.8 l/min이였으며, RF power 1,300 watts, 유속 1.0 ml/min, speed 18.48 rpm, sample flow rate 1.0 ml/min, sample flush time 30sec, sample flush rate 4.0 ml/min, delay time 30sec이었다(Jung et al., 2012).

(나) 통계분석

통계분석은 SAS 프로그램(SAS, 9.2, Institute Inc, USA)을 이용하여 Duncan’s multiple range test(p=0.05)로 분석하였다.

(2) 연구결과

(가) 한국산과 일본산 더덕의 생육 및 수량

Table 1. Comparison of growth characteristics in Korean and Japanese *Codonopsis lanceolata*

Varieties[z]	Plant heigth (cm)	Leaf			Leaf color (SPAD-501 value)	Stem diameter (mm)	Flowering day
		length (cm)	width (cm)	thickness (mm)			
Korean	338.7a[y]	5.3a	3.1a	0.35a	30.6a	4.0a	July 27
Japanese	373.6b	6.1b	3.5b	0.49b	36.5b	5.1b	Aug. 10

[z]Korean variety : Pyeongchang, Japanese variety : Naganoken
[y]Values followed by common letters in the same column are not significantly different(P=0.05, Duncan's multiple range test).

한국산과 일본산 더덕의 지상부의 생육을 비교한 결과는 Table 1과 같다. 초장은 일본산이 373.6cm로 한국산에 비해 생육이 왕성한 것으로 나타났다. 엽장, 엽폭 및 엽의 두께 또한 초장과 동일한 결과로 일본산이 각각 6.1cm, 3.5cm, 0.49mm로 한국산 더덕에 비해 높은 결과로 유의성이 인정되었다. 그러나 개화일은 한국산이 7월 27일부터 개화가 시작되어 일본산에 비해 약 2주정도 빠른 것으로 나타났다. 동일 지역에서의 재배 후, 생육비교를 했던 본 연구에서 일본의 산악지대인 나가노(Nagano)산 더덕의 엽의 생육이 한국산에 비해 양호한 것으로 나타나 상이한 결과를 보였다.

Table 2. Comparison of root characteristics in Korean and Japanese *Codonopsis lanceolata*

Varieties[z]	Length (cm)	Diameter (mm)	Fresh weight(g)	
			main root	Lateral root
Korean	19.8a[y]	21.2b	35.4b	5.6a
Japanese	20.5a	15.6a	29.4a	9.6b

[z]Korean variety : Pyeongchang, Japanese variety : Naganoken
[y]Values followed by common letters in the same column are not significantly different(P=0.05, Duncan' s multiple range test).

지하부의 특성은 근장의 경우, 한국산과 일본산이 각각 19.8cm, 20.5cm로 유의성이 없었으나, 근경은 한국산이 21.2mm로 일본산에 비해 굵은 것으로 나타나 유의성이 인정되었다. 뿌리의 총생체중은 한국산과 일본산이 각각 41.0g, 39.0g으로 큰 차이가 없었다. 그러나 뿌리 부위에 따른 생체중에 있어 주근은 한국산이 35.4g으로 일본산에 비해 높은 것으로 나타났던 반면, 분기근은 일본산이 9.6g으로 높게 나타났다. Yoon and Lee(2000)는 토양수분포텐셜이 낮을수록 세근량이 많아진다고 하였으나, 동일한 재배지에서의 생육비교를 했던 본 연구의 결과, 뿌리의 부위별 생장의 차이는 토양수분에 의한 것이 아닌 자생지역에 따른 지하부의 생육형에 차이가 있는 것으로 생각되었다.

(나) 한국산과 일본산 더덕의 부위별 무기성분 함량

Table 3. Comparison of inorganic components contained in the Korean and Japanese *Codonopsis lanceolata*

Varieties[z]	Measurement sites	Inorganic elements(ppm)					
		Na	Mg	P	S	K	Ca
Korean	Leaf	80.45	3198	2539	4.388	28864	5130
	Vine	55.16	1457	2395	2.452	29561	2757
	root	35.67	793.9	1354	0.926	6566	1014
Japanese	Leaf	62.74	2085	2298	3.5	25888	5499
	Vine	151.9	1223	2988	1.026	25986	2773
	root	87.43	952.9	2094	2.053	7364	1064

[z]Korean variety : Pyeongchang, Japanese variety : Naganoken

각각의 무기성분 함량은 지역에 관계없이 한국산과 일본산 모두 지하부에 비해 지상부에 많이 함유되어 있었으며, 특히 K의 함량이 가장 많은 것으로 나타났다. 더덕의 부위별 대량원소 함량의 경우, Na, Mg, P, S, Ca은 한국산은 잎〉 줄기〉 뿌리의 순으로 많았으며, 일본산은 Mg, Ca은 한국산과 동일한 결과로, 잎〉 줄기〉 뿌리의 순으로 많았던 반면, Na과 P은 줄기에서 가장 많은 함유량을 보였다. K은 한국산과 일본산 모두 줄기〉 잎〉 뿌리 순으로 높은 함량을 나타냈다. 지역에 따른 대량원소의 함량에 있어 Na은 일본산의 줄기에서, Mg은 한국산의 잎에서 현저하게 높은 것으로 나타났다. P은 잎에서는 한국산, 줄기 및 뿌리에서는 일본산이 조금 높은 함량을 보였다. Ca의 경우, 일본산과 한국산의 지역적 차이에 따른 함량의 고저는 없었다.

Table 4. Comparison of inorganic components contained in the Korean and Japanese *Codonopsis lanceolata*

Varieties[z]	Measurement sites	Inorganic elements(ppm)						
		Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Pb
Korean	Leaf	24.74	289.1	0.388	1.399	33.05	62.29	2.785
	Vine	7.64	57.1	0.215	0.814	7.588	21.9	0.479
	root	11.34	281.4	1.034	0.199	2.37	7.353	0
Japanese	Leaf	27	177.8	2.116	0.219	5.328	28.25	2.003
	Vine	8.39	65.79	0.456	0.135	3.58	13.37	1.164
	root	10.67	174.4	0.186	0.104	2.788	9.835	0

[z]Korean variety : Pyeongchang, Japanese variety : Naganoken

미량원소에 있어 더덕의 부위별 함량은 Co는 한국산은 뿌리, 일본산은 잎에 가장 많이 함유되어 있는 것을 볼 수 있었으며, 기타의 무기원소는 지역에 관계없이 잎에 가장 많이 함유되어 있는 것으로 나타났다. 지역별 미량원소의 함량차를 보면 Mn의 경우 한국산과 일본산의 함량 차이는 거의 없었으나, Ni, Cu 및 Zn은 한국산이 일본산에 비해 조금 많은 함유량을 보였다.

Fe는 잎과 뿌리에서는 한국산, 줄기에서는 일본산이 조금 많은 함량을 나타냈다. 영양적 의미보다 공해성분으로서 인체에 독성을 가질 수 있는 Pb은 한국산과 일본산 모두 잎과 줄기에서 미량 함유되어 있었으나, 식용부위인 뿌리에서는 전혀 검출되지 않았다.

본 연구의 결과 한국산과 일본산의 지역에 따른 더덕의 무기성분 함량에는 다소의 차이가 있는 것으로 나타나, 생약의 부위에 따른 무기 금속원소의 함유량에 차이가 있다는 Lee(1992)의 보고와 일치했다.

나. 한국의 10개 지역으로부터 수집했던 더덕의 생육, 무기성분 및 영양성분의 비교

(1) 연구방법

우리나라의 10개 지역(Fig. 1)으로부터 수집했던 더덕의 종자를 공시재료로 하였다. 2014년 4월 20일, 버미큐라이트에 파종하여 우송정보대학의 무가온 비닐하우스 내에서 최아시켰다. 본엽 출현시 버미큐라이트와 원예용 상토를 1:1의 비율로 혼합하여 충진한 직경 15cm의 비닐포트에 1주씩 정식하여 각 지역 당 40포트씩 재배하였으며, 본엽이 2매 이상 출현했을 때부터 15일 간격으로 초장, 엽폭, 엽장 및 분지수 등의 생육을 조사했다. 동년 10월 17일 수확하여 근장, 근경, 생체중 등의 수량조사를 하였다. 또한 수확한 각 지역의 더덕 뿌리에 함유된 무기성분을 분석하였다.

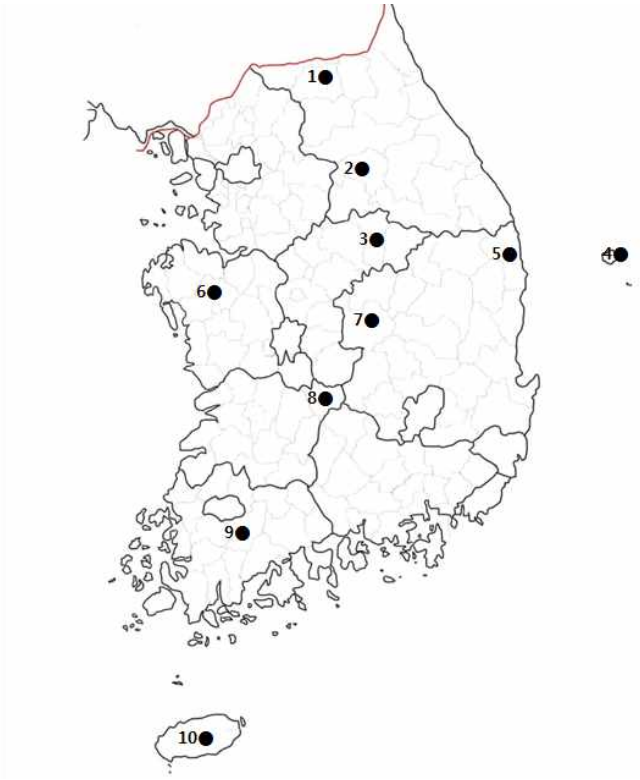


Fig. 1. Collection sites of *Codonopsis lanceolata* accessions in Korea
1. Hwacheon, 2. Heongseong,
3. Jecheon, 4. Ulleungdo,
5. Uljin, 6. Yesan, 7. Sangju,
8. Muju, 9. Hwasun,
10. Jejudo

(가) 무기성분 분석

시료를 600° C로 12시간 회화하고 습식분해법(Woo & Ryoo, 1983)으로 분해하여 탈이온 증류수로 정량하고 검액하였다. 마쇄한 각 지역의 더덕 괴근 2g에 진한 질산 10 ml를 가하여 처음에는 낮은 온도로 가열하고 점차 고온으로 가열하면서 분해하였다. 분해액이 백색 투명하게 되

면 냉각시키고 분해액에 증류수를 가하고 100 ml로 정량한 후 여과하여 여액을 분석시료로 하였다. 각 무기성분의 정량은 유도결합플라스마 분광광도기(ICP, Inductively Coupled Plasma, 3300DV, PerkinElmer Optima, USA)를 이용하여 분석하였다, 분석조건은 다음과 같다. 가스유속은 plasma 15 l/min, auxiliary 0.5 l/min, nebulizer 0.8 l/min이였으며, RF power 1,300 watts, 유속 1.0 ml/min, speed 18.48 rpm, sample flow rate 1.0 ml/min, sample flush time 30sec, sample flush rate 4.0 ml/min, delay time 30sec이었다(Jung et al., 2012).

(나) 일반성분 분석

시료의 일반성분은 AOAC 법(AOAC, 1990)에 의하여 분석하였다. 수분은 105℃ 상압건조법, 회분함량은 550℃에서 직접회화법을 이용하여 분석하였다. 조단백질 함량은 micro-Kjeldahl 법을 이용한 단백질 자동분석기(Kjeltec protein analyzer, Tecator, Sweden)로, 조지방 함량은 Soxhlet 법을 이용하여 분석하였다.

(다) 탄수화물(당) 분석

▪ 수용성 탄수화물 분석

수용성 탄수화물의 분석을 위하여 2.0 ml 튜브에 건조시료 0.1g을 넣고 증류수 1 ml를 첨가하여 25℃에서 250rpm으로 4시간 진탕하고 원심분리기를 이용하여 14,000rpm, 4℃조건에서 20분 동안 원심분리하여 얻어진 상등액을 수용성 탄수화물 분석용으로 사용하였다. 표준용액은 증ㄹ수 1l에 glucose(Sigma) 0.1g을 녹여 100ppm의 stock sloution을 만든 후, 다시 희석하여 10, 20, 30, 40, 50 ppm으로 만드어 이용하였다. 표준용액과 blank와 표준용액 농도범위 안에 포함되도록 적절히 희석된 용액을 2ml씩 취하여 test tube에 넣고 얼음물에 담근 후 0.2% anthrone 시약 4ml를 각각 test tube에 넣은 후 고루 섞어 100℃로 끓는 물에 7분30초동안 발색시키고 얼음물로 발색을 정지시킨 다음 분광광도계로 630nm에서 비색정량하였다.

▪ 불수용성 탄수화물 분석

수용성 탄수화물 분석을 위해 추출된 상등액을 제거한 잔여물을 불수용성 탄수화물 분석을 위한 시료로 사용하였다. 잔여물에 증류수 1ml를 첨가하고 25℃에서 4시간을 진탕 후, 14,000rpm, 4℃ 조건에서 20분 동안 원심분리하여 상등액을 버리는 과정을 두 번 더 실시하여 세척을 한 후 잔여물을 80℃에서 1시간 동안 건조시켰다. 여기에 증류수 0.6ml를 첨가하여 100℃에서 15분간 열탕한 후 식힌 다음, 9.2N HCLO4 0.6ml를 넣고 15분동안 stirring한 후 14,000rpm, 20분 동안 원심분리하여 상등액을 보관하였다. 남은 잔여물에 다시 4.6N HClO4 0.6ml를 첨가하여 위와 동일한 과정으로 원심 분리하여 얻은 상등액을 먼저 보관한 상등액과 혼합하여 불수용성 탄수화물 분석용 시료로 사용하였다. 추출된 용액은 수용성 탄수화물 분석 방법과 동일한 Anthrone법을 이용하여 분광광도계로 630nm에서 비색정량 하였다.

(라) 통계분석

통계분석은 SAS 프로그램(SAS, 9.2, Institute Inc, USA)을 이용하여 Duncan’s multiple range test(p=0.05)로 분석하였다.

(2) 연구결과

(가) 10개 지역 더덕의 생육 및 수량

Table 5. Comparison of growth characteristics of *Codonpsis lanceolata* accessions collected in Korea

Accession	Plant height (cm)	Leaf width (cm)	Leaf length (cm)	No. of branches	Flowering day
1. Hwacheon	242.3abc[z]	4.4cde	6.7de	16.1a	Aug. 4
2. Heongseong	252.6ab	4.1bc	6.7de	23.3b	Aug. 5
3. Jecheon	237.9abc	4.4cde	6.6cde	21.3b	Aug. 9
4. Ulleungdo	217.1a	4.1bc	6.6cde	22.2b	Aug. 6
5. Uljin	240.3abc	4.1bc	6.9e	21.5b	Aug. 8
6. Yesan	231.2ab	4.8e	6.4cd	22.1b	Aug. 10
7. Sangju	238.6abc	4.4cde	5.8b	22.5b	Aug. 10
8. Muju	258.3bc	3.9b	5.9b	21.7b	Aug. 18
9. Hwasun	273.9c	4.3bcd	6.3bc	22.8b	Aug. 20
10. Jejudo	226.2ab	3.4a	4.9a	23.9b	Aug. 24

[z]Values followed by common letters in the same column are not significantly different(P=0.05, Duncan's multiple range test).

우리나라 10개 지역으로부터 수집·재배한 더덕의 생육특성은 표와 같다. 공시했던 전 계통 중에서 가장 초장이 낮았던 것은 울릉도산 계통(No. 4)의 217.12cm, 가장 컸던 것은 화순산 계통(No. 9)의 273.9cm이었다. 전 지역이 200cm를 넘는 초장으로, 지주를 필요로 하지 않는 왜성의 개체는 볼 수 없었다. 또한 제주도산 계통(No. 10)을 제외하고, 대체적으로 중북부지방산(No. 1~No. 7)의 계통이 남부지방산(No. 8~No. 9)보다도 초장은 낮아지는 경향을 볼 수 있었다. Kim(2003)은 생육지에 따른 더덕의 개체당 엽수 및 초장은 고도의 유의성이 인정된다고 하였으나, 조금의 지역적인 차이는 있었으나 화순산 계통에서 가장 컸던 것을 제외한 다른 지역의 계통들은 큰 차이가 없었던 본 연구와는 조금 상이한 결과였다.

지상부를 상부(초장 120cm 이상), 중부(60~120cm) 및 하부(지표면으로부터 약 60cm)의 3부분으로 나누어 각 부위마다 3매의 잎을 측정하였다. 그 결과, 엽폭 및 엽장은 예산산 계통(No. 6)과 울진산 계통(No. 5)에서 각각 4.8cm, 6.9cm로 가장 컸다. 이것에 비해 가장 작았던 것은 제주도간 계통(No. 10)에서 각각 3.4cm, 4.9cm였다. 그 외의 계통의 엽폭 및 엽장은 각각 3.9~4.4cm 및 5.8~6.7cm의 범위로 계통간의 큰 차이는 인정되지 않았으며, 또한 산지와의 관련도 인정되지 않았다.

주경을 제외한 길이 5cm 이상의 분지수를 조사한 결과 화천산 계통(No. 1)에서는 16.1개로 적었지만, 그 외의 모든 계통에서의 분지수는 21.3~23.9개의 범위로 계통간의 차 또는 산지와의

관련성은 인정되지 않았다.

개화는 8월 초순부터 시작되었다. 개화개시일이 가장 빨랐던 것이 화천산 계통(No. 1)의 8월 4일이었던 것에 비해 가장 늦었던 것은 제주도산 계통(No. 10)의 8월 24일로 양자간에 20일정도의 차이가 있었다. 즉, 산지가 북부에서 남부로 내려올수록 개화도 늦어지는 경향을 볼 수 있었으며, 중북부지방산 계통이 남부지방산 계통보다 약 2주간정도 빨리 개화됐다.

Lee et al.(1996)은 한국의 중남부지방산 계통의 개화가 남부지방산보다 약 10일 빠르다고 보고하였다. 또한 한국산(백운산)과 일본산(hachioji) 계통과의 생장특성의 비교에서 개화 개시일에 큰 차가 인정되지 않았으나, 일본산이 조금 빠른 경향을 보였다(Kim, 1993)고 하였다. 본 실험의 결과에서도 중북부지방산 계통이 남부지방산보다 빨리 개화되는 것을 확인하였다.

Table 6. Comparison of root characteristics of *Codonpsis lanceolata* accessions collected in Korea at harvest

Accession	Length (cm)	Diameter (mm)	Fresh weight (g)
1. Hwacheon	7.7ab[z]	13.8a	8.3a
2. Heongseong	8.0ab	15.8bcd	8.9a
3. Jecheon	7.8ab	15.8bcd	10.1ab
4. Ulleungdo	7.9ab	14.3abc	9.0a
5. Uljin	7.6ab	15.6bcd	9.7a
6. Yesan	7.8ab	16.4cd	8.8a
7. Sangju	7.5ab	15.8bcd	8.7a
8. Muju	8.6b	15.3bcd	11.0ab
9. Hwasun	7.5ab	16.1cd	8.6a
10. Jejudo	7.1a	18.7d	13.1b

[z]Values followed by common letters in the same column are not significantly different(P=0.05, Duncan's multiple range test).

지하부의 형태 및 수량은 위의 표와 같다. 비대했던 주근부의 근장은 무주산 계통(No. 8)이 8.6cm로 가장 길었으며, 제주도산 계통이 가장 짧은 결과를 나타냈다. 그 외의 지역은 7.5~8.0cm의 범위로, 계통 및 산지에 따른 간의 큰 차이는 인정되지 않았다. 근경은 화천산 계통(No. 1)이 13.8mm로 가장 가늘었으나, 그 외의 계통 간에 있어 유의차는 인정되지 않았다. 근중은 제주도간 계통(No. 10)이 13.1g으로 가장 무거웠으나, 그 외의 계통 간에는 큰 차이 없이 8.3~11.0g의 범위였다(Table 6).

(나) 10개 지역 더덕의 무기성분 분석

Table 7. Comparison of inorganic components contained in the *Codonpsis lanceolata* roots collected in Korea

Accession[z]	Inorganic elements(ppm)					
	Na	Mg	P	S	K	Ca
1. Hwacheon	35.67	793.9	1354	0.926	6566	1014
2. Heongseong	203.7	2045	5599	3.538	14512	1786
3. Jecheon	37.44	1013	1731	1.64	6122	1157
4. Ulleungdo	61.22	1547	838.2	2.44	11361	2201
5. Uljin	154.5	1195	377.8	2.291	13780	3000
6. Yesan	36.8	1010	1512	2.679	5477	1446
7. Sangju	24.34	1214	2002	2.117	11376	1768
8. Muju	165.5	762.8	2533	1.513	10466	1420
9. Hwasun	77.53	1315	2145	1.633	7009	1496
10. Jejudo	91.17	1158	868.3	2.16	8600	1611

우리나라 10개 지역으로부터 수집・재배한 더덕 뿌리의 무기성분 함량은 위의 표와 같다. 무기성분의 함량은 계통 간에 무기원소별 함량의 차이는 보였으나, 모든 계통에서 대량원소인 K, Ca 및 P 등의 함량이 가장 많았다. 특히 횡성산 계통(No. 2)의 경우, 대량원소의 함량은 기타 지역에 비해 많이 함유되어 있는 것으로 나타났다. Ca은 울진산 계통(No. 5), P은 횡성산 계통(No. 2)에서 각각 3000ppm과 5599ppm으로 높은 함량을 보였다.

Table 8. Comparison of inorganic components contained in the *Codonpsis lanceolata* roots collected in Korea

Accession[z]	Inorganic elements(ppm)						
	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Pb
1. Hwacheon	11.34	281.4	0	0.199	2.37	7.353	0
2. Heongseong	26.3	114.6	0.027	1.287	8.574	20.91	0
3. Jecheon	15.48	104.2	0	0.276	2.129	12.21	0
4. Ulleungdo	29.83	180.8	0.229	0.272	4.762	12.15	0
5. Uljin	52.31	550.5	1.244	0.706	5.196	18.08	1.347
6. Yesan	8.557	154.2	0.034	0.644	4.519	19.06	0.356
7. Sangju	15.72	210.5	0.095	0.640	7.507	17.96	0
8. Muju	38.93	207.3	0.224	1.526	5.421	18.63	0
9. Hwasun	16.93	155.7	0.028	0.028	4.028	12.66	0
10. Jejudo	63.92	507.4	1.188	1.7	7.321	21.86	0

미량원소에 있어 Fe의 함량은 울진산 계통(No. 5)과 제주도산 계통(No. 10)이 각각 550.5ppm, 507.4ppm으로 가장 많은 함유량을 보였다. 그 외의 모든 계통 또한 타 미량원소에 비해 Fe의 함량이 가장 많았다. Co는 화천산 계통(No. 1)과 제천산 계통(No. 3)에서는 함유되지 않았던 반면, 타 지역에서는 극미량 함유되어 있었다. Ni은 모든 계통에서 극미량 함유되어 있었으며, Pb은 울진산 계통(No. 5)과 예산산 계통(No. 6)에서 극미량 함유되어 있었던 것에 비해 기타 모든 지역에서는 관찰되지 않았다.

본 연구의 결과, 지역에 따른 무기성분의 함량 차이가 확인되어, 재배지에 따라 더덕의 주요 무기성분 함량은 차이를 보이며(Lee et al., 1995), 인삼(Ko et al., 1996)에 있어서도 유사한 결과를 보인다는 보고와 일치하였다. 그러나 이 같은 결과가 자생지의 환경 및 토양 등의 생육환경에 의한 것인지는 금후 연구할 필요가 있을 것으로 생각되었다.

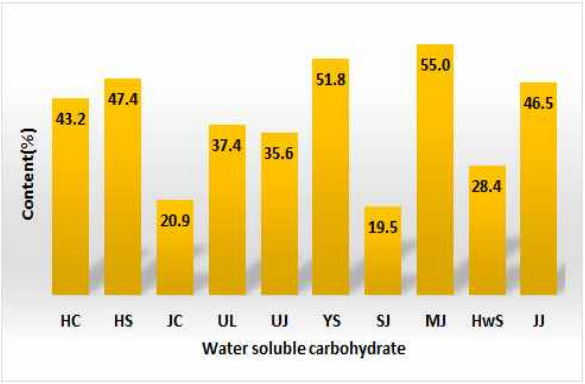
(다) 10개 지역 더덕의 일반성분 분석

Table 9. Comparison of proximate composition of *Codonpsis lanceolata* accessions collected in Korea

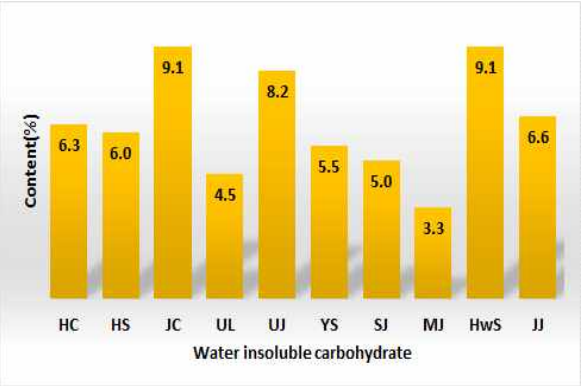
Accession	General nutrients(%)				
	Moisture	Crude protein	Crude fat	Crude fiber	Crude ash
1. Hwacheon	81.89	2.55	0.42	2.51	0.99
2. Heongseong	76.69	2.49	0.50	3.07	1.38
3. Jecheon	78.66	1.64	0.41	2.55	0.93
4. Ulleungdo	82.14	1.31	0.37	2.72	1.01
5. Uljin	81.89	1.65	0.44	3.12	0.96
6. Yesan	77.72	2.93	0.46	2.55	1.11
7. Sangju	83.84	2.51	0.39	2.79	0.89
8. Muju	81.69	3.76	0.33	2.22	1.01
9. Hwasun	77.12	1.68	0.33	2.38	0.74
10. Chejudo	85.98	2.25	0.36	2.18	1.29

우리나라 10개 지역으로부터 수집·재배한 더덕 뿌리의 일반성분 함량은 위의 표와 같다. 수분함량을 제외한 더덕의 일반성분은 지역에 따른 함량의 차는 있었으나, 대체적으로 조단백질(1.31～3.76%)과 조섬유(2.18～3.12%)의 함량이 가장 높은 것으로 나타났다. 수분함량은 제주도산 계통(No. 10)에서 85.98%로 타 지역에 비해 조금 높은 것으로 나타났으나, 그 외 지역은 76.69～82.14%의 범위로 큰 차이는 없었다. 조단백질은 울릉도산 계통(No. 4)이 1.31%로 가장 낮았던 것에 비해 무주산 계통(No. 8)이 3.76%로 가장 높은 함량을 보였다. 조지방의 함량은 0.33～0.50%의 범위로 지역적인 차이는 볼 수 없었으나, 남부지방으로 갈수록 함량이 조금 낮아지는 경향을 나타냈다. 조섬유는 횡성산 계통(No. 2)과 울진산 계통(No. 5)에서 3% 이상의 함량을 보였으며, 북부지방에 비해 남부지방 계통이 낮은 것으로 나타났다. 조회분의 함량은 지역에 따른 일정한 경향없이 0.74～1.38%의 범위로 큰 차가 없었다(Table 4). 더덕은 재배 및 서식장소에 따라 일반성분은 특징적인 차이가 없었으며(Lee, 1984), 생육온도에 따른 더덕 뿌리의 일반성분 함량은 고온조건인 30℃에서 가장 높았다(Lee et al., 1992)고 하였다. 본 연구의 결과, 더덕의 뿌리에서 조단백질과 조섬유의 함유량은 지역적 차이를 보였으며, 또한 평균기온이 높은 남부지방의 계통에서 북부지방 계통에 비해 뚜렷한 일반성분의 함량 증가는 나타나지 않아 상이한 결과를 보였다.

(라) 10개 지역 더덕의 탄수화물 분석



WSC



WISC

Fig. 2. 10개 지역 더덕의 탄수화물 함량 비교
HC: Hwacheon, HS: Hoengseong, JC: Jecheon, UL: Ulleungdo, UJ: Uljin,
YS: Yesan, SJ: Sangju, MJ: Muju, HS: Hwasun, JJ: Jejudo

수용성 탄수화물함량은 무주(55%), 예산(51.8%), 횡성(47.4%), 제주(46.5%), 화천(43.2%), 울릉도(37.4%), 울진(35.6%), 화순(28.4%), 제천(20.9%), 상주(19.5%) 순으로 높았다.
불수용성 탄수화물함량은 제천, 화순, 울진, 제주, 화천, 횡성, 예산, 상주, 울릉도, 무주 순으로 높았다.

(마) 10개 지역의 PCR을 이용한 유연관계 분석

○ 식물재료
10지역의 더덕의 뿌리를 건조시켜 준비하였다

○ DNA추출 및 순도분석
더덕의 뿌리를 액체질소를 이용하여 마쇄한 후 NucleoSpin DNA extract kit (Macherey-Nagel, Germany) 을 사용하여 추출하였다. 추출된 DNA는 순도와 농도를 측정 한 후 -20℃ 에 보관하면서 사용하였다.

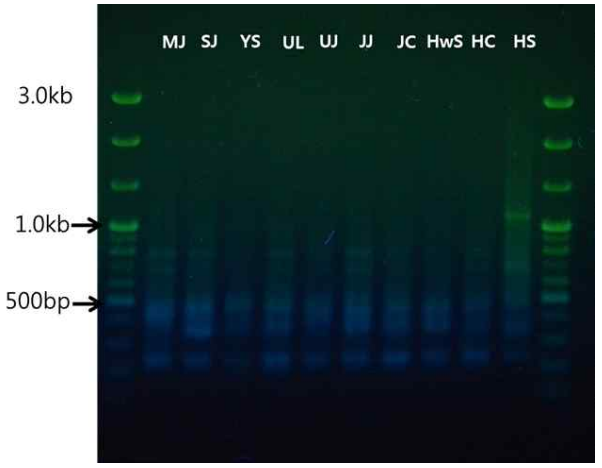
○ DNA 증폭
DNA의 증폭은 Williams 등(1990)의 방법을 기초로 유전자증폭기 (SwiftTM MaxPro, Esco Micro Pte. Ltd., Singapore)로 하였다. PCR 반응액은 10× PCR buffer 0.5 μl, 10 mM dNTP 0.5 μl, primer 1 μl, Taq DNA polymerase (5U/μl) 0.25 μl, 그리고 template DNA 20 ng 을 넣고 멸균수를 넣어 총 25 μl 로 조제하였다. PCR 반응은 94℃ 에서 2분간 초기 열처리 후, 94℃ 에서 1분, 37℃ 에서 1분, 그리고 72℃ 에서 2분 동안 45회 반복 후, 마지막으로 72℃ 에서 5분간 반응시켰다. 반응이 끝난 PCR 산물은 1.2% agarose gel에 60 V 에서 90분간 전기영동하여 Eco dye (EcoDye^{TM} DNA Staining Solution, BIOFACT Co., Ltd., Korea)로 염색하고, UV

transilluminator (UltraSlim UV Transilluminator, BIOFACT Co. Ltd., Korea)에서 밴드를 확인하였다. 촬영된 사진의 증폭산물을 1 kp DNA Ladder(Solgent, Korea)를 기준으로 특정 bp에서 증폭산물의 유무에 따라 '1'과 '0'으로 데이터를 정리하여 genet을 구분하였다.

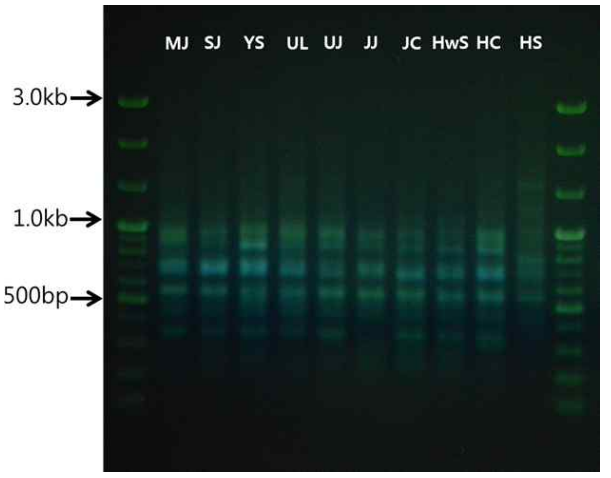
Table 10. The selected primers

Primer	Nucleotide sequence	Primer	Nucleotide sequence
OP A-01	CAGGCCCTTC	OP A-11	CAATCGCCGT
OP A-02	TGCCGAGCTG	OP A-12	TCGGCGATAG
OP A-03	AGTCAGCCAC	OP A-13	CAGCACCCAC
OP A-04	AATCGGGCTG	OP A-14	TCTGTGCTGG
OP A-05	AGGGGTCTTG	OP A-15	TTCCGAACCC
OP A-06	GGTCCCTGAC	OP A-16	AGCCAGCGAA
OP A-07	GAAACGGGTG	OP A-17	GACCGCTTGT
OP A-08	GTGACGTAGG	OP A-18	AGGTGACCGT
OP A-09	GGGTAACGCC	OP A-19	CAAACGTCGG
OP A-10	GTGATCGCAG	OP A-20	GTTGCGATCC

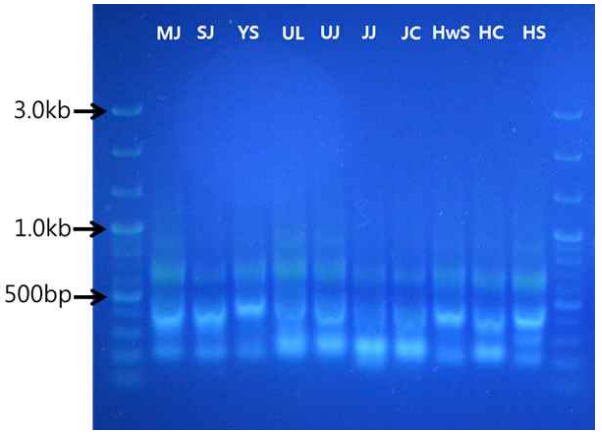
The primers were from Operon Co.



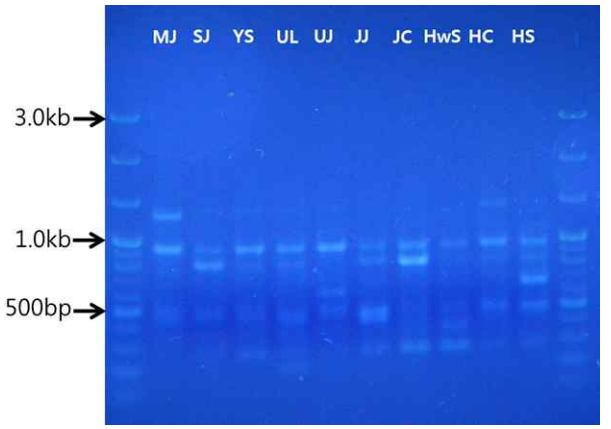
OPA04



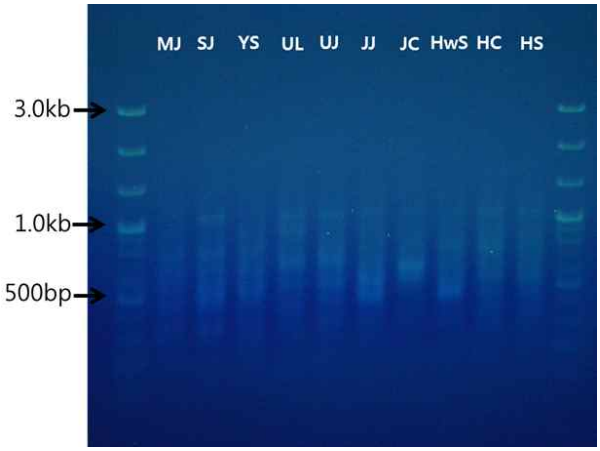
OPA05



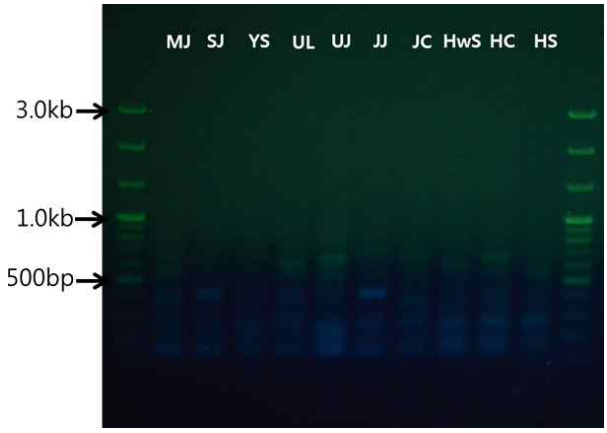
OPA09



OPA10



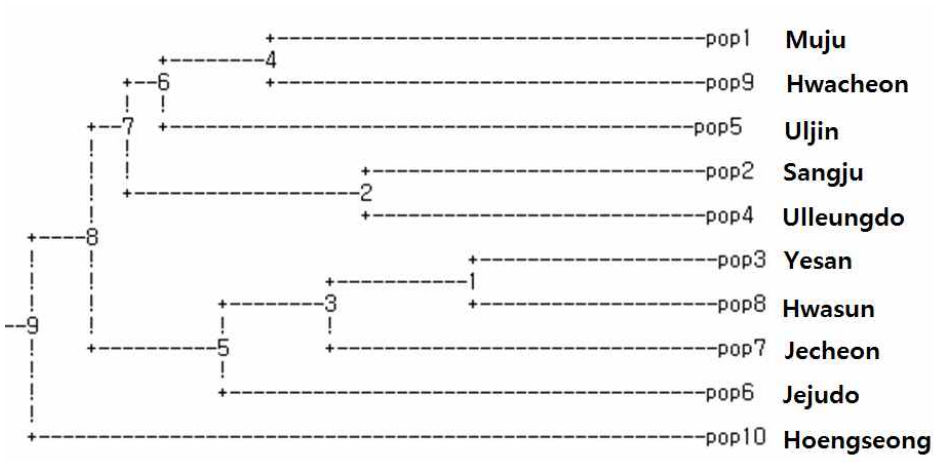
OPA16



OPA19

HC: Hwacheon, HS: Hoengseong, JC: Jecheon, UL: Ulleungdo, UJ: Uljin, YS: Yesan, SJ: Sangju, MJ: Muju, HS: Hwasun, JJ: Jejudo

20개의 primer를 사용하여 전기영동한 결과 밴드가 구분되는 프라이머 6개를 확인할 수 있었다.



Between	And	Length
9	8	1.92715
8	7	1.21514
7	6	1.21878
6	4	3.22693
4	pop1	13.59669
4	pop9	13.59669
6	pop5	16.82361
7	2	7.47693
2	pop2	10.56545
2	pop4	10.56545
8	5	4.05606
5	3	3.14337
3	1	4.35057
1	pop3	7.70753
1	pop8	7.70753
3	pop7	12.05810
5	pop6	15.20147
9	pop10	21.18468

(바) 더덕의 염색체

우리나라 10개 지역으로부터 수집한 더덕의 세포학적 동정을 목표로 실험한 결과 지역에 관계없이 모두 2n=2x=16의 염색체를 가지고 있는 것으로 확인되었다.

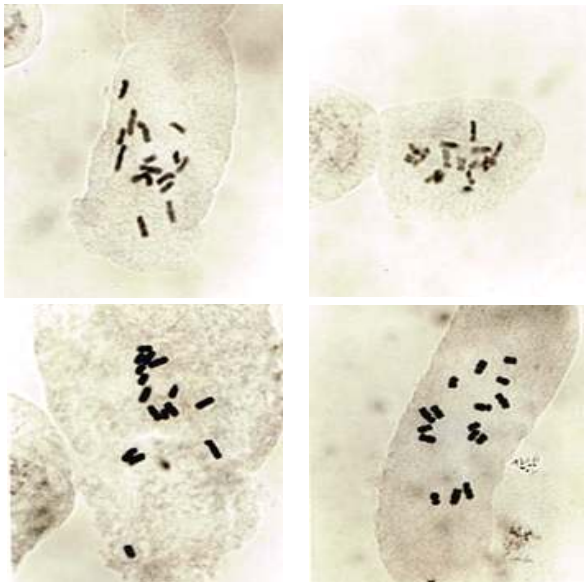


Fig. 3. Somatic chromosomes of *Codonopsis lanceolata*
A. Hwacheon, B. Ulleungdo, C. Muju, D. Jejudo

다. 적심 및 적화 처리가 더덕의 수량에 미치는 영향

(1) 연구방법

청주에서 채취한 1년생 묘를 공시재료로, 적심은 주경 및 분지장이 30, 60, 90, 120cm의 위치에서 처리하였으며, 적화는 출뢰기부터 개화 종료 시까지 30, 50 및 100%로 처리하여 지하부의 수량 및 형태를 조사하였다.

(2) 연구결과

(가) 적심처리

Table 11. Effect of topping treatment on root characteristics of *Codonopsis lanceolata* 'Cheongju' at transplanting

Treatmentz (cm)	Fresh weight (g)		Length (cm)	Diameter (mm)
	Main root	Lateral root		
Control	7.5 ± 1.8	-	9.2 ± 1.3	6.8 ± 1.2
30	7.6 ± 1.5	-	8.3 ± 1.0	7.7 ± 0.4
60	7.4 ± 1.7	-	7.4 ± 0.9	8.9 ± 1.0
90	7.9 ± 1.2	-	8.2 ± 0.6	9.1 ± 0.3
120	7.5 ± 1.4	-	8.4 ± 0.8	8.8 ± 1.0

[z]Topping treatments at 30, 60, 90 and 120cm height above soil surface.
Each value represents the mean±S.E.

정식 시 지하부의 형질은 위와 같다. 각 처리에 공시했던 괴근의 생체중은 7.4～7.9g, 근장 및 근경은 각각 7.4～9.2cm 및 6.8～9.1mm였다.

Table 12. Effect of topping treatment on root characteristics of *Codonopsis lanceolata* 'Cheongju' at harvest

Treatment[z] (cm)	Fresh weight (g) Main root	Lateral root	Length (cm)	Diameter (mm)
Control	53.0 ± 5.2	15.1 ± 2.5	20.5 ± 1.5	25.0 ± 2.5
30	32.3 ± 3.4	7.6 ± 1.5	19.8 ± 1.4	25.5 ± 2.1
60	36.0 ± 3.5	13.2 ± 1.3	19.5 ± 0.9	25.9 ± 2.1
90	37.8 ± 3.5	13.9 ± 2.0	20.4 ± 2.1	21.1 ± 1.8
120	43.2 ± 3.8	18.6 ± 2.7	18.9 ± 1.6	26.9 ± 2.0

[z]Topping treatments at 30, 60, 90 and 120cm height above soil surface.
Each value represents the mean±S.E.

수확 후 지하부의 형질을 조사한 결과는 표와 같다. 주근의 생체중은 30, 60 및 90cm 적심구에서 대조구에 비해 감소하였지만, 120cm 적심구에서는 대조구와 거의 같은 값을 나타냈다. 그러나 측근의 생체중은 적심을 하여도 감소하지 않고 120cm 적심구에서는 오히려 증가했다. 근장 및 근경 모두 적심에 의한 영향은 거의 볼 수 없었다. 이상의 결과로부터 초기 생육에서의 적심은 수량감소를 자져오지만, 120cm의 적심처리에서는 수량의 감소없이 지하부 수량은 무적심(대조구)와 거의 비슷한 것으로 나타나, 더덕재배 생력화를 위한 유효한 수단의 하나로 생각되었다.

(나) 적화처리

Table 13. Effect of flower thinning on root characteristics of *Codonopsis lanceolata* 'Cheongju' at transplanting

Flower thinning treatment (%)	Length (cm)	Diameter (mm)	Fresh weight (g)
0 (Control)	10.2 a[z]	6.3 a	8.8 a
30	9.9 a	6.6 a	8.2 a
50	9.6 a	6.3 a	8.6 a
100	10.0 a	6.1 a	8.0 a

[z]Values followed by common letters in the same column are not significantly different (P=0.05, Duncan's multiple range test).

정식 시 지하부의 형질은 다음과 같다. 각 처리에 공시했던 괴근의 근장 및 근경은 각각 10.2～9.6cm 및 6.1～6.6mm였으며, 생체중도 8.0～8.8g의 범위로 처리간에 유의성은 인정되지 않았다.

Table 14. Effect of flower thinning on root characteristics of *Codonopsis lanceolata* 'Cheongju' at harvest

Flower thinning treatment (%)	Length (cm)	Diameter (mm)	No. of lateral roots	Fresh weight (g)
0 (Control)	16.6 a[z]	14.9 a	4.3 ab	29.8 b
30	16.8 a	15.1 a	3.8 ab	32.3 ab
50	17.6 a	15.6 a	2.8 b	33.6 ab
100	18.2 a	15.9 a	5.3 a	39.9 a

[z]Values followed by common letters in the same column are not significantly different (P=0.05, Duncan's multiple range test).

수확 후 지하부의 형질을 조사한 결과는 위와 같다. 근장은 적화처리에 의해 대조구보다 조금 길어지는 경향으로, 100% 적화처리구에서 18.2cm로 가장 길었지만 처리구간에 유의성은 인정되지 않았다. 근경도 적화처리에 관계없이 대조구와의 유의성은 인정되지 않았다. 분기근수는 50% 적화처리구에서 가장 낮은 값을 나타냈지만, 다른 처리구에서는 3.8～5.3으로 큰 차는 없었다. 생체중은 적화처리에 의해 증가하였으며, 그 중 100% 적화처리는 무처리에 비해 30%의 수량증가를 나타냈다. 이상의 결과로부터 더덕도 개화기에 달한 성주의 화뢰 제거에 의해 개화결실에 의한 에너지의 소비를 억제하면 뿌리의 축적물질을 소비하는 일없이 수량의 증가가 기대되므로 더덕재배에 있어 지하부수량의 증가를 위한 하나의 방법이 될 수 있을 것으로 생각된다.

라. 삽목에 의한 대량번식

더덕 번식 시 삽목의 효과를 알아보고자 본 실험을 실시하였다. 1년생 더덕묘를 공시재료로 하여 지상부의 1~3절과 4~6절의 부위를 10cm의 길이로 잘라 무처리와 루톤분을 처리하여 삽수부위별 효과를 알아보았다. 또한 지상부 1~3절 부위를 삽수로 하여 Paclobutrazol과 Uniconazol을 각각 1, 5 및 10 mg/L의 농도로 12시간 침지하여 처리하였다.

Table 15. Effect of internode position on adventitious root formation from the cutting of *Codonopsis lanceolata*

Variety	Internode position	Rootone treatment	No. of roots per cutting	Length of longest root (cm)	Rooting percentage
Korean 'Cheongju'	1-3	Yes	2.3 a[z]	1.5 a	21
		NO	0.0 b	0.0 b	0
	4-6	Yes	0.3 b	0.1 b	3
		NO	0.0 b	0.0 b	0

[z]Values followed by common letters in same column are not significantly different (P=0.01, Duncan's multiple range test).

더덕의 삽수부위에 의한 부정근의 형성율과 지하부 특성에서 발근수와 근장은 절간의 1～3절 부위의 루톤 분의처리했던 경우에 가장 좋은 결과를 보였다. 또한 부정근 형성율도 비슷한 결과로 절간의 1～3절 부위의 루톤 분의처리구에서 21%로, 다른 처리구에 비해 높은 형성을 보였다.

Table 16. Effect of paclobutrazol and uniconazol soaking treatments on promotion of adventitious root formation from the cutting of *codonopsis lanceolata*

Treatment	Conc. (mg/L)	No. of roots per cutting	Length of longest root (cm)	Rooting percentage (%)
Control		7.0 c[z]	5.9 ab	24
Rootone powder		12.5 b	7.0 a	69
Pachobutrazol	1	13.7 b	5.6 ab	86
	5	19.2 a	5.6 ab	88
	10	21.1 a	6.8 ab	95
Uniconazol	1	11.2 b	5.4 b	53
	5	2.5 d	2.7 c	24
	10	0.8 d	0.3 d	62

Measurement took place 4 weeks after cutting.
[z]Values followed by common letters in same column are not significantly different (P=0.01, Duncan's multiple range test).

생장조절제의 삽수 침지처리에 의한 부정근 형성율과 지하부 특성에서 발근수는 paclobutrazol 5 및 10mg/L 처리구에서 19.2～21.1개로 대조구의 약 3배정도 많았지만, uniconazol 처리구에서는 농도가 높을수록 발근수는 현저하게 감소하는 경향이 인정되었다. 최대근장은 uniconazol 5 및 10mg/L 처리구를 제외한 다른 구에서는 5.4～7.0cm의 범위로 유의성이 인정되지 않았다. 부정근 형성율은 대조구가 23%였던 것에 비해 paclobutrazol 침지처리구에서는 처리농도에 관계없이 현저히 높았다. 특히 10mg/L 용액의 침지처리구에서는 95%로 대조구의 약 4배정도였다.

2. 제품생산을 위한 균일한 재료의 원활한 공급체계 확립

가. 선발된 우량품종의 농가실증 시험을 통한 농가의 재배생산체계 확보

(1) 연구방법

(가) 재배조건 및 생육조사

2014년 10월 채종한 청주, 평창, 제주지역의 더덕 종자를 공시재료로 하였다. 각 지역의 종자들을 2015년 4월 초, 청주(충북 청주시 청원구 오근장동), 평창(강원도 평창군 방일면) 및 제주(제주시 오등동)의 더덕재배지에 파종하였다(Fig. 4).

파종 및 재배조건은 노지에 폭 120cm, 높이 15~20cm의 두둑을 만든 후, 재식거리는

20×20cm로 하여 파종하였으며, 시비 및 관수는 각 농가의 관행으로 관리하였다. 지주설치는 각 지역의 더덕이 6~7절 이상 생장하였을 때 하였으며, 제주의 경우, 무지주 재배(제주 재배농가의 관행)를 하였다.

지상부의 생육조사는 2015년 9월초, 초장, 엽장 및 엽폭, 분지수를 조사하였으며, 개화일은 개화시부터 조사를 실시하였다. 또한 9월말, 수확하여 뿌리의 생체중, 근장, 근경 및 분기근 등의 수량을 조사하였다. 또한 각 지역의 배수성 유무확인을 위하여 염색체수를 조사하였다.

A B C

Fig. 4. Cultivation region of *Codonopsis lanceolata.*

A: Cheongju B: Pyeongchang C: Jeju

(나) 염색체수 조사

유백색의 신선한 3개 지역의 더덕의 근단을 1cm 정도 채취하여 콜히친 0.05% 수용액에 2~3시간 상온에서 전처리한 후, 95% 에탄올과 빙초산(3:1)의 혼합용액으로 1일 정도 냉장상태에서 고정하였다. 이를 1N HCl 용액에 다시 침치하여 온도 60℃, RPM 120으로 조절한 수조에서 가수분해한 후, 2% aceto-orcein 용액에 침지한 후, 광학현미경으로 염색체수를 조사하였다.

(2) 연구결과

재배지역의 차이에 따른 청주, 평창 및 제주 더덕의 생육특성은 Table 17과 같다.

염색체의 수는 지역에 관계없이 모든 지역에서 2n=2x=16으로, 염색체의 배가없이 2배체로 존재하는 것을 알 수 있었다(Fig. 5)

A B C

Fig. 5. Somatic chromosomes of *Codonopsis lanceolata.*

A: Cheongju B: Pyeongchang C: Jeju

Table 17. Comparison of growth characteristics of *Codonopsis lanceolata* accessions by cultivated regions.

Cultivation region	Accession	Plant height(cm)	Leaf		No. of branches	Flowering day
			width(cm)	length(cm)		
Cheongju	Cheongju	221.5 bcd[z]	4.3 cd	6.5 c	18.7 a	Jul. 24
	Pyeongchang	218.6 bcd	4.2 cd	6.3 c	22.2 a	Jul. 20
	Jeju	192.0 a	3.8 bc	5.2 ab	23.6 a	Jul. 27
Pyeongchang	Cheongju	215.4 bcd	4.4 cd	6.3 c	18.2 a	Jul. 20
	Pyeongchang	228.7 cd	4.6 d	6.6 c	20.8 a	Jul. 18
	Jeju	201.3 ab	3.5 ab	5.0 ab	21.5 a	Jul. 23
Jeju	Cheongju	211.4 bc	4.5 d	6.2 c	19.8 a	Jul. 28
	Pyeongchang	232.4 d	3.8 bc	6.5 c	21.0 a	Jul. 23
	Jeju	206.1 ab	3.2 a	4.7 a	21.6 a	Aug. 7

[z]Values followed by common letters in the same column are not significantly different(P=0.05, Duncan' s multiple range test).

초장은 제주에서 재배하였던 평창산이 232.4cm로 가장 컸던 것으로 나타났다. 그러나 청주 및 제주산은 채종지에서의 생육이 좋았던 반면 기타의 지역에서는 조금 억제되는 경향을 보였다. 특히 제주산은 지역에 관계없이 2m전후의 낮은 초장을 나타냈다. 엽폭 및 엽장은 제주산의 경우 재배지역에 관계없이 각각 3.2~3.8cm와 4.7~5.2cm로 가장 낮은 결과를 보여 초장과 유사한 결과를 보였다. 청주산은 재배지역의 차이가 엽의 생장에는 큰 영향을 미치지 않았던 반면, 평창산은 엽폭과 엽장이 채종지에서 각각 4.6cm와 6.6cm로 조금 높은 것으로 나타났다. 분지수는 재배지역의 차이에 관계없이 모든 계통에서 18.2~23.6개의 범위로 유의성은 인정되지 않았다. 개화일은 재배지역의 온도가 높을수록 늦어지는 경향을 보였으며, 특히, 제주를 재배지역으로 하였던 모든 계통의 경우, 평균기온이 가장 낮은 재배지역인 평창에서 재배하였던 것에 비해 5~15일정도 늦게 개화하는 것을 볼 수 있었다.

Table 18. Comparison of root characteristics of *Codonopsis lanceolata* accessions by cultivated regions.

Cultivation region	Accession	Root		No. of lateral roots	Fresh weight (g)
		length(cm)	diameter(mm)		
Cheongju	Cheongju	7.8 ab[z]	16.8 ab	5.2 ab	9.5 ab
	Pyeongchang	7.7 ab	15.8 bc	5.5 ab	10.1 ab
	Jeju	8.7 c	13.8 a	5.1 ab	11.7 bc

	Cheongju	7.5 ab	14.5 ab	5.4 ab	9.3 ab
Pyeongchang	Pyeongchang	7.6 ab	15.6 ab	5.2 ab	9.7 ab
	Jeju	7.6 ab	15.2 ab	5.3 ab	11.8 bc
	Cheongju	7.8 bc	15.8 bc	4.9 a	8.1 a
Jeju	Pyeongchang	7.5 ab	16.4 ab	5.4 ab	8.9 a
	Jeju	7.1 a	18.7 c	6.3 c	13.1 c

[z]Values followed by common letters in the same column are not significantly different(P=0.05, Duncan's multiple range test).

재배지역의 차이에 따른 청주, 평창 및 제주 더덕의 지하부 특성은 Table 18과 같다.

근장은 채종지와 타 지역을 재배지역으로 했을 경우, 청주 및 평창산은 재배지역에 따른 큰 차이는 볼 수 없었으나, 제주산의 경우, 청주를 재배지역으로 하였을 때 8.7cm로 채종지에 비해 약 1.2배 이상 증가하는 것으로 나타났다. 근경은 청주와 평창산은 채종지에서의 재배가 타 지역에서의 재배에 비해 거의 유사한 결과를 보였으나, 제주산의 경우, 채종지에 비해 현저히 작아지는 것으로 나타났다. 분기근의 수는 제주산은 채종지에 비해 타 지역에서의 재배에 의해 적어지는 것으로 나타났던 것에 비해 청주 및 평창산은 재배지역의 상이에 따른 차이는 없었다. 생체중은 제주산 더덕이 모든 지역에서 청주 및 평창산보다 수량은 높은 것으로 나타났다. 그러나 제주산은 채종지에서 재배했던 경우, 13.1g으로 가장 높은 수량을 보였으나, 재배지역의 차이에 따라 수량의 감소를 볼 수 있었다. 반면, 청주와 평창산은 제주를 재배지역으로 하였던 것에 비해 채종지를 재배지역으로 하였을 때가 조금 높은 수량을 보였다(Fig. 7).

이상의 결과로부터 본 연구팀의 연구 결과, 우량계통으로 선발된 제주산은 초장은 타 계통에 비해 조금 작았던 것에 비해 수량은 높은 것으로 나타나, 금후 재배와 선발 및 교배육종에 이용할 수 있을 것으로 판단되었다. 또한 재배지역에 따른 수량의 감소는 보였으나 타 계통에 비해 높아 각 지역에서의 재배생산은 가능할 것으로 생각되었다. 특히 재배적인 측면에서 볼 때, 지주재배와 무지주 재배의 생육 및 지하부 수량성에 큰 차이는 없을 것으로 생각되어 더덕의 재배생력화 가능성도 시사되었다.

나. 선발된 우량품종의 기내대량생산시스템 확립

(1) 연구방법

(가) 배지선발

기내에서 무균배양중인 더덕 식물체의 엽절편(0.8×0.8cm)과 절이 포함된 줄기 절편체(0.8cm)를 배양재료로 사용하였다(이하 절이라고 표기함). 기관분화에 적합한 배지선발을 위하여 MS, White, B5 배지 구성물질의 적정농도(1/4, 1/2, 1, 2x) 실험은 sucrose 3%, pH 5.8로 조절한 후 agar 0.8%를 첨가하였으며, sucrose 실험(1, 3, 5, 7%)은 MS배지를 기본으로 pH 5.8로 조절한 후 agar 0.8%를 첨가하였다. pH(3.8, 4.8, 5.8, 6.8, 7.8) 및 agar 농도실험(0.4, 0.6, 0.8, 1.0 1.2%)은 MS배지 구성물질 및 sucrose 농도 실험의 결과를 바탕으로, 더덕의 엽절편 및 줄기 절편을 각각 sucrose 5%를 첨가한 1/2MS배지를 기본배지로 하여 치상하였으며 6주간 배양하였다. 모

든 실험은 petri dish당 6절편으로 하여, 완전 임의배치법 10반복으로 비교, 분석하였다. 배양조건은 25±1℃, 40μmol · m^{-2} · s^{-1}의 광으로 16시간 조명하였으며, 배양 6주 후, 신초 및 부정근의 수와 길이 등을 조사하였다.

(나) 생장조절제 첨가

① 단용처리

더덕의 엽절편과 절로부터의 기관분화를 왕성하게 유도할 수 있는 생장조절물질의 종류 및 농도를 알아보기 위하여 옥신류(IAA, IBA, NAA)와 사이토카이닌류(BA, kinetin, TDZ)를 각각 0, 0.1, 0.5, 1, 5, 10 mg/L 농도로 첨가하여 배양하였다.

기본배지는 1/4MS, sucrose는 5%, pH는 5.8로 조절하였으며, agar 0.6%를 첨가하였고, pH는 5.8로 조절하였다. 배양조건은 25±1℃, 40μmol · m^{-2} · s^{-1}의 광으로 16시간 조명하였으며, 6주간 배양한 후 신초 및 부정근의 수와 길이 등을 조사하였다.

② 혼용처리

단용실험 결과 기관형성에 좋은 결과를 보인 시토키닌과 옥신을 선발하여 kinetin 1 mg/L와 NAA 0.1, 0.5, 1.0 mg/L, IAA 1, 5, 10 mg/L, IBA 1, 5, 10 mg/L를 혼용하고, IBA 10 mg/L와 kinetin 0.1, 0.5, 1 mg/L, BA 0.1, 0.5, 1 mg/L, TDZ 0.1, 0.5, 1 mg/L를 혼용첨가한 배지에 배양하였다.

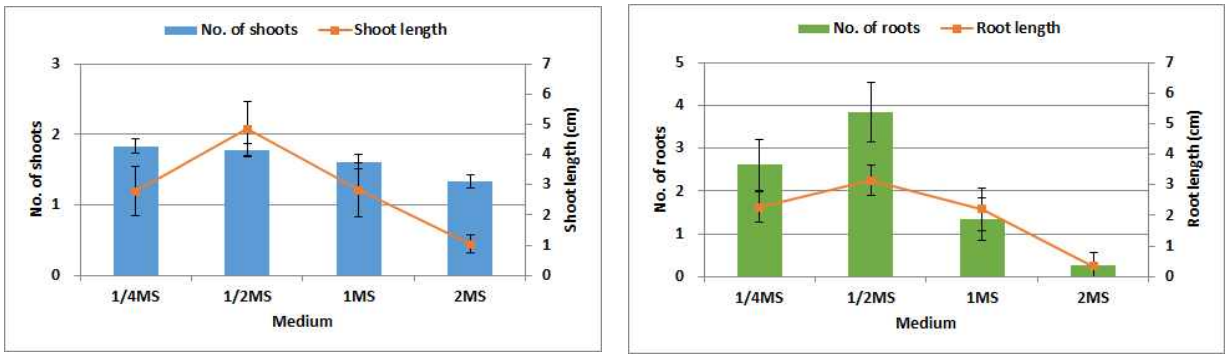
(다) 환경요인

배양온도에 따른 생장효과를 알아보기 위하여 더덕의 절을 배양재료로 각각 15, 20, 25, 30℃에서 40μmol · m^{-2} · s^{-1}의 광으로 16시간 조명하였으며, 6주간 배양한 후 신초 및 부정근의 수와 길이 등을 조사하였다.

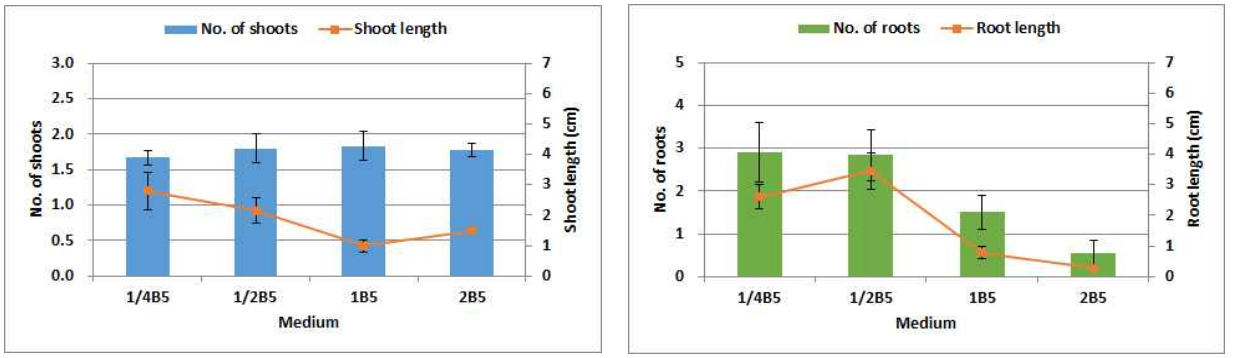
(2) 연구결과

(가) 배지선발

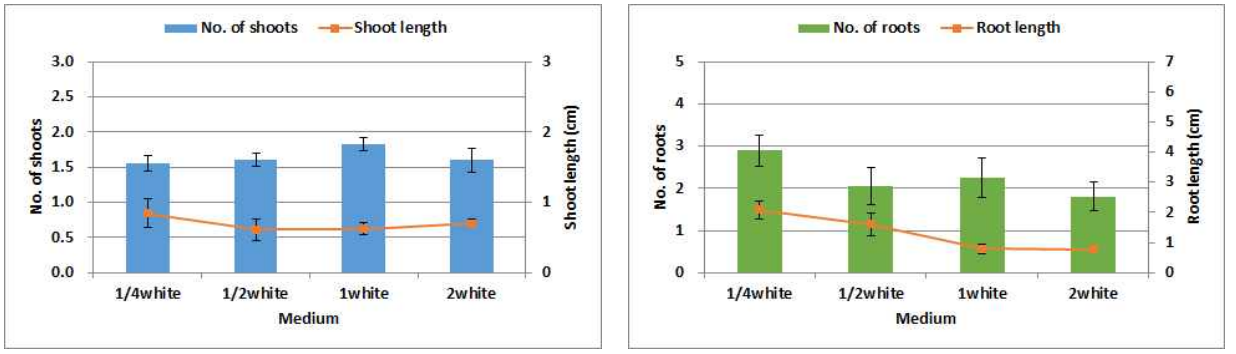
① 적정배지구성물질 농도



A



B



C

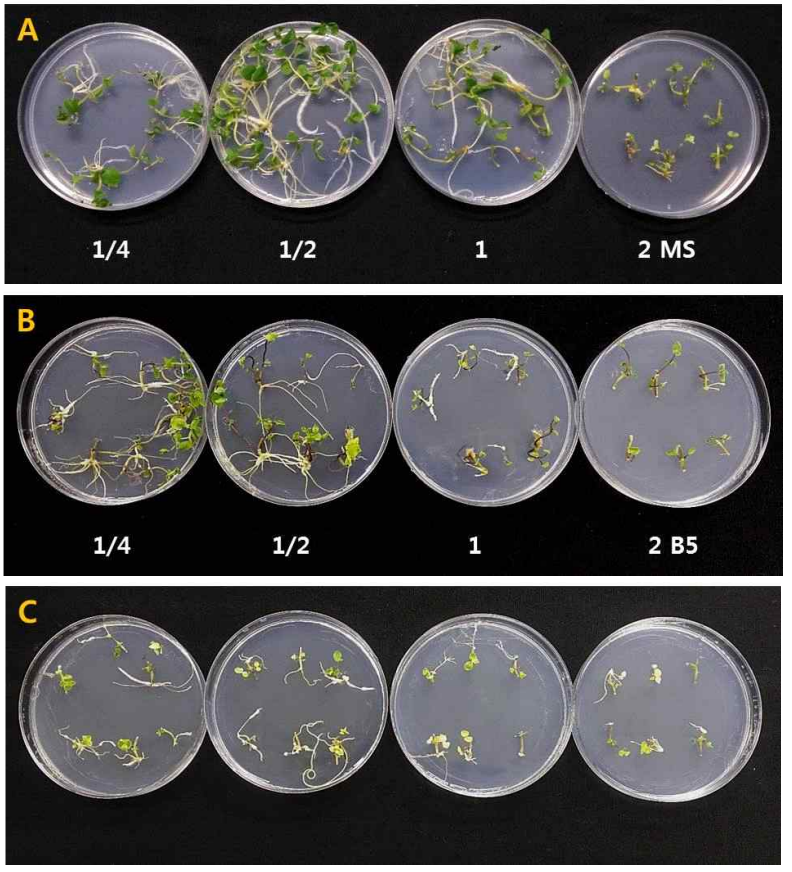


Fig. 6. Effects of culture media on shoot and adventitious root formation from node of *Codonopsis lanceolata* for 6 weeks in culture.

A : MS medium B : B5 medium C : White medium

더덕의 기내배양에 있어 기관형성은 배지구성물질의 종류, 농도 및 더덕의 배수성에 관계없이 엽절편보다 줄기절편체를 재료로 배양하였을 때 양호한 결과를 나타냈으며, 엽절편의 경우 대부분 반응이 없었다. 신초의 형성은 무기염의 농도가 높을수록 억제되는 경향을 보였던 반면, 신초의 생장은 무기염의 농도에 따른 일정한 경향은 볼 수 없었으며 1/2MS배지와 1/2B5배지에서 4.9cm로 가장 높은 결과를 나타냈다. 부정근의 형성 또한 신초의 형성과 유사한 경향으로, 무기염의 농도가 높을수록 억제되는 것으로 나타났으며, 1/2MS배지에서 3.8개로 가장 많은 형성을 보였다. 부정근의 생장은 무기염의 농도가 가장 높았던 2MS배지에서 0.3cm로, 생장의 둔화가 현저하였던 것에 비해 1/2MS배지에서 3.2cm로 왕성한 생장을 보였다.

② Sucrose 농도

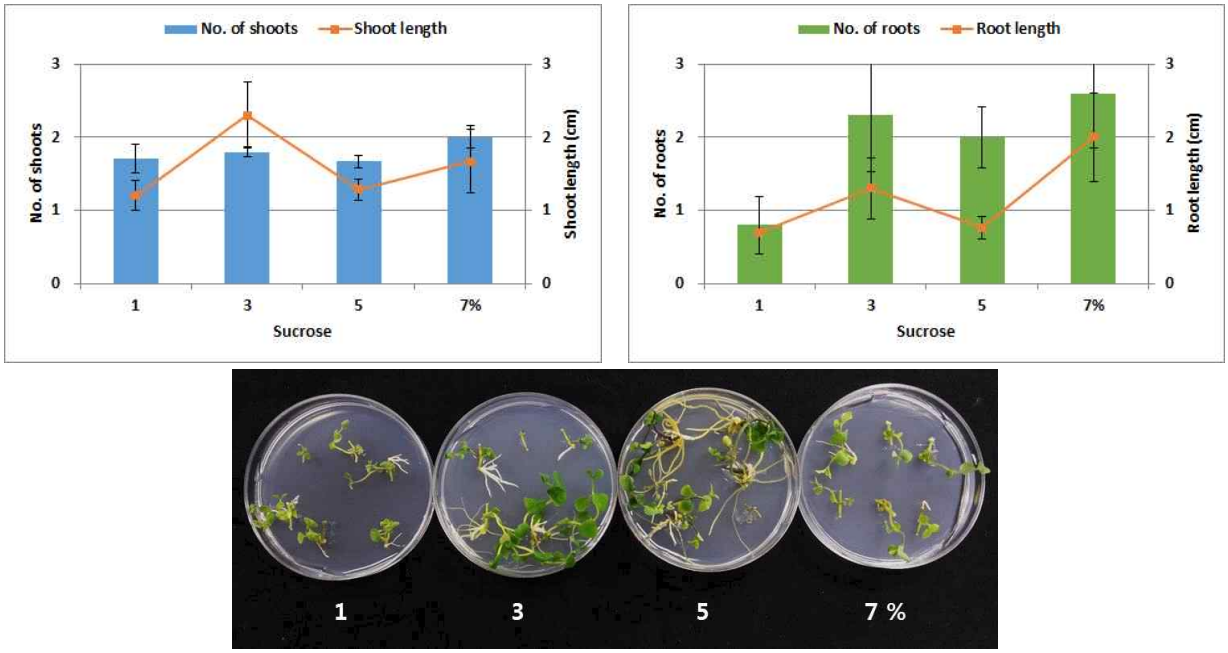


Fig. 7. Effects of sucrose concentration on shoot and adventitious root formation from node of *Codonopsis lanceolata* for 6 weeks in culture.

더덕의 신초 형성은 농도가 높을수록 양호한 결과를 보였던 것에 비해, 신초의 생장은 농도의 고저에 따른 일정한 경향은 없었으며, 3% 농도구에서 2.3cm로 양호한 결과를 보였다. 부정근의 형성은 1%의 저농도구에서 0.8개로 억제되는 것으로 나타났으며, 그 외의 농도구에서는 2.0~2.6개의 범위로 큰 차가 없었다. 부정근의 생장은 농도에 따른 일정한 경향은 없었으나, 7% 농도구에서 2.0cm로 다른 농도구에 비해 조금 높은 결과를 보였다.

③ pH

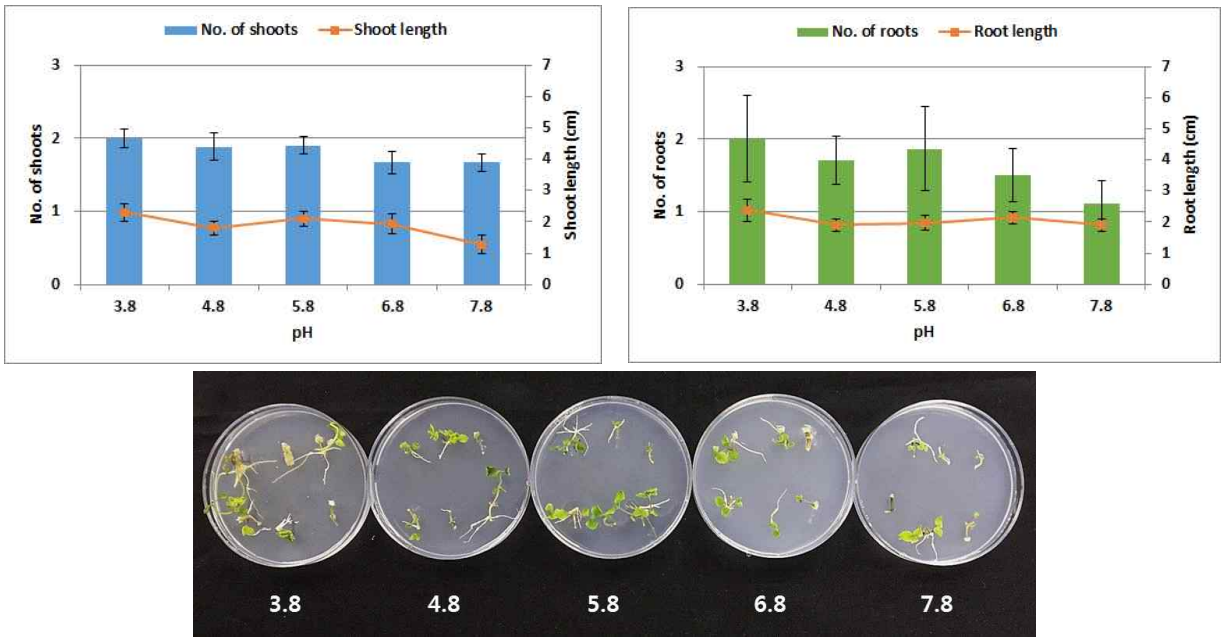


Fig. 8. Effects of pH on shoot and adventitious root formation from node of *Codonopsis lanceolata* for 6 weeks in culture.

더덕의 신초 형성은 pH가 낮을수록 조금 많아졌으며, 신초의 생장도 산성도가 가장 높았던 pH 3.8에서 2.3cm로 양호한 결과를 보였다. 부정근의 형성 또한 신초의 형성과 유사한 경향으로 산성도가 높을수록 많은 형성을 보였다. 부정근의 생장은 pH 3.8에서 2.4cm로 조금 높은 결과를 보였으나, 그 외의 처리구는 1.9~2.1cm의 범위로 차이가 없었다.

④ Agar 농도

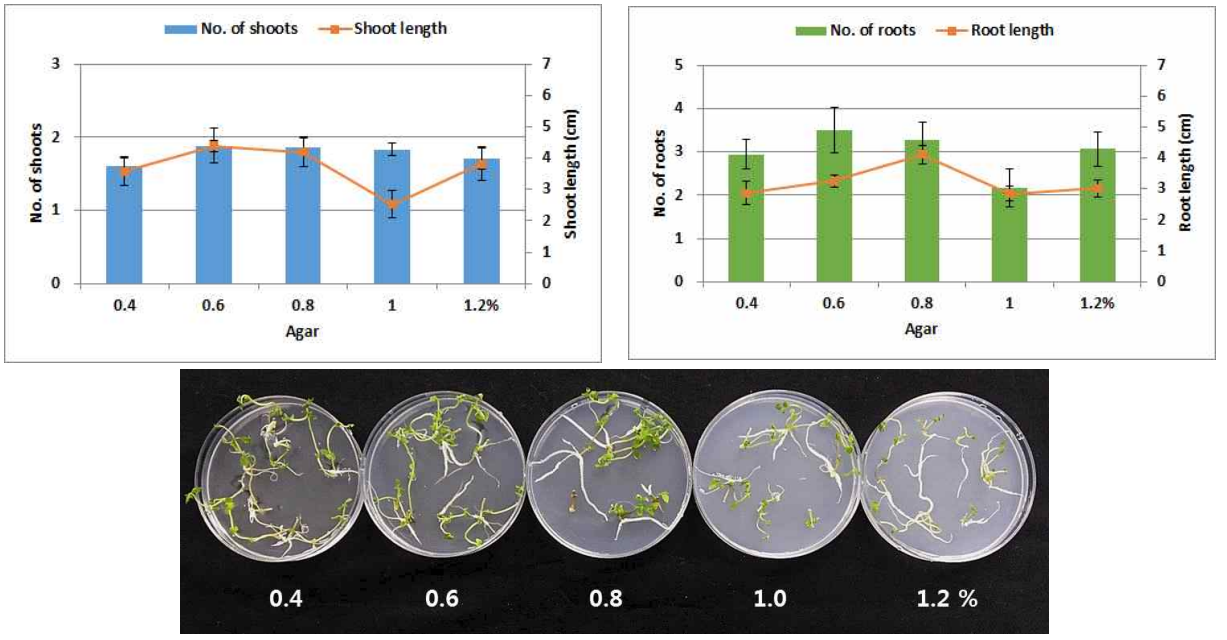


Fig. 9. Effects of agar concentration on shoot and adventitious root formation from node of *Codonopsis lanceolata* for 6 weeks in culture.

더덕의 신초의 형성은 모든 농도구에서 1.6~1.9개의 범위로 차이가 없었던 반면, 신초의 생장은 농도의 고저에 따른 일정한 경향은 없었으며, 0.6%와 0.8% 농도구에서 각각 4.4cm, 4.2cm로 왕성한 생장을 보였다. 부정근의 형성 또한 신초의 생장과 유사한 결과로 0.6%와 0.8% 농도구에서 높은 형성을 나타냈다. 부정근의 생장은 0.8% 농도구에서 4.1cm로 가장 높은 결과를 보였으며, 그 외의 농도구는 2.8~3.3cm의 범위로 큰 차이가 없었다.

(나) 생장조절제 첨가

① 단용처리

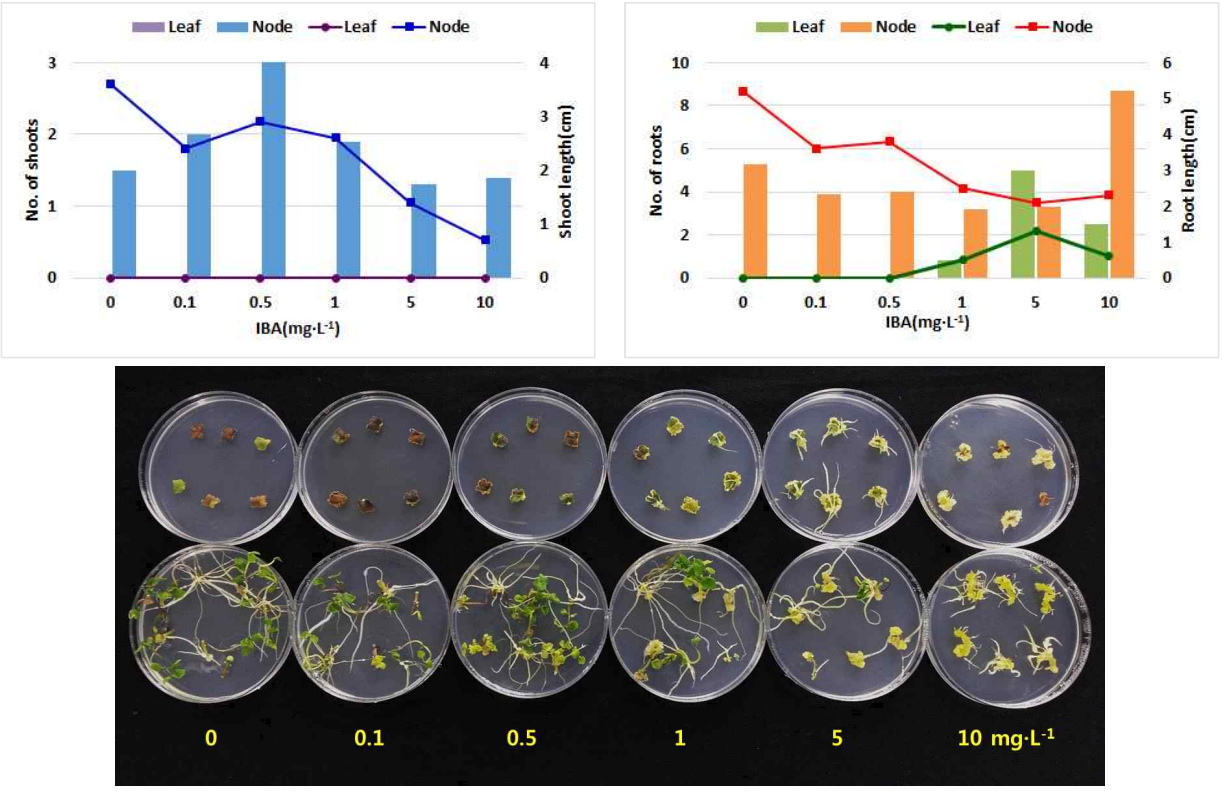


Fig. 10. Effects of IBA on shoot and adventitious root formation from leaf and node of *Codonopsis lanceolata* for 6 weeks in culture.

기내 배양에 의한 '더덕'의 대량번식에 미치는 생장조절제의 효과를 알아보고자 엽절편(0.8cm^2)과 절(0.8cm)을 배양재료로 사용하여 배양하였다. Auxin의 경우, IBA에서는 절을 재료로 0.5 mg・L^{-1} 첨가배지에서 신초의 형성이 양호한 반면 생장은 무첨구에서 좋았다. 부정근은 절을 재료로 10 mg・L^{-1} 첨가배지에서 절편체당 8.7개로 가장 높은 형성을 보였으나 생장은 저조하였다.

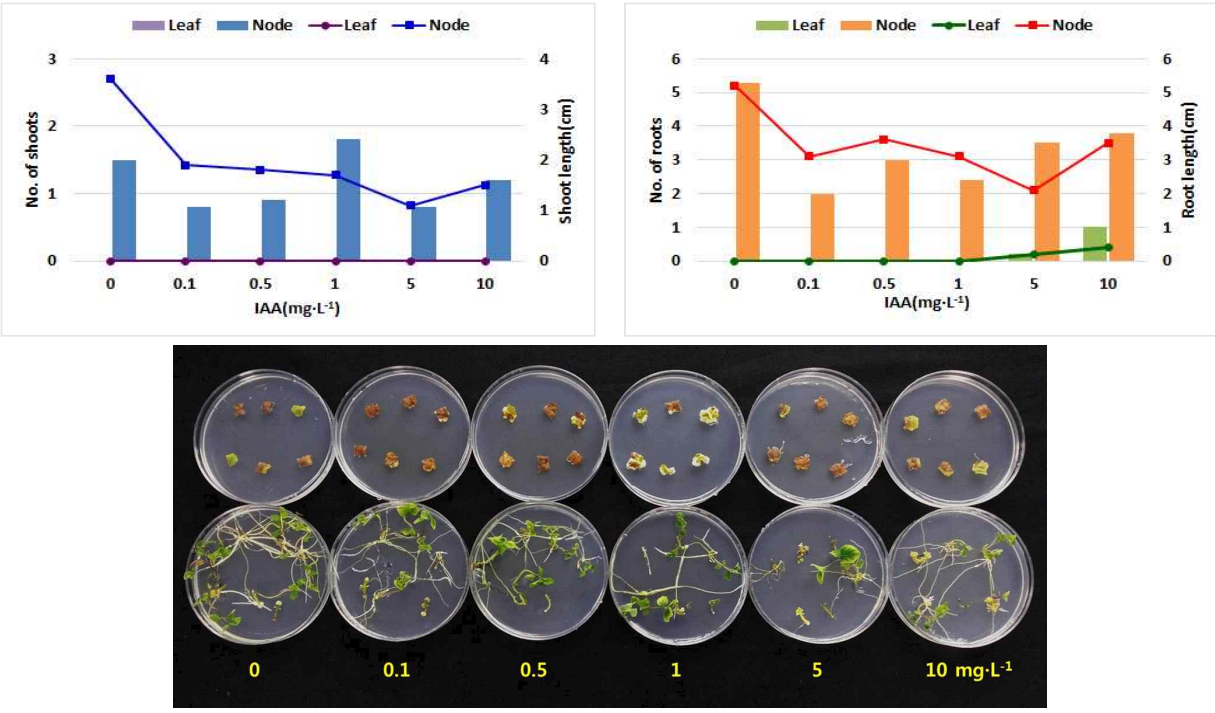


Fig. 11. Effects of IAA on shoot and adventitious root formation from leaf and node of *Codonopsis lanceolata* for 6 weeks in culture.

IAA는 신초의 형성은 절을 배양재료로 1.0 mg · L^{-1} 첨가배지에서, 신초의 생장은 무첨가구에서 왕성한 결과를 나타냈다. 부정근은 절을 재료로 무첨가 배지에서 가장 많은 부정근의 형성을 보였으며, 생장 또한 가장 좋았다. 따라서 IAA는 더덕의 부정근 형성 및 생장에 억제적으로 작용하는 것으로 생각되었다.

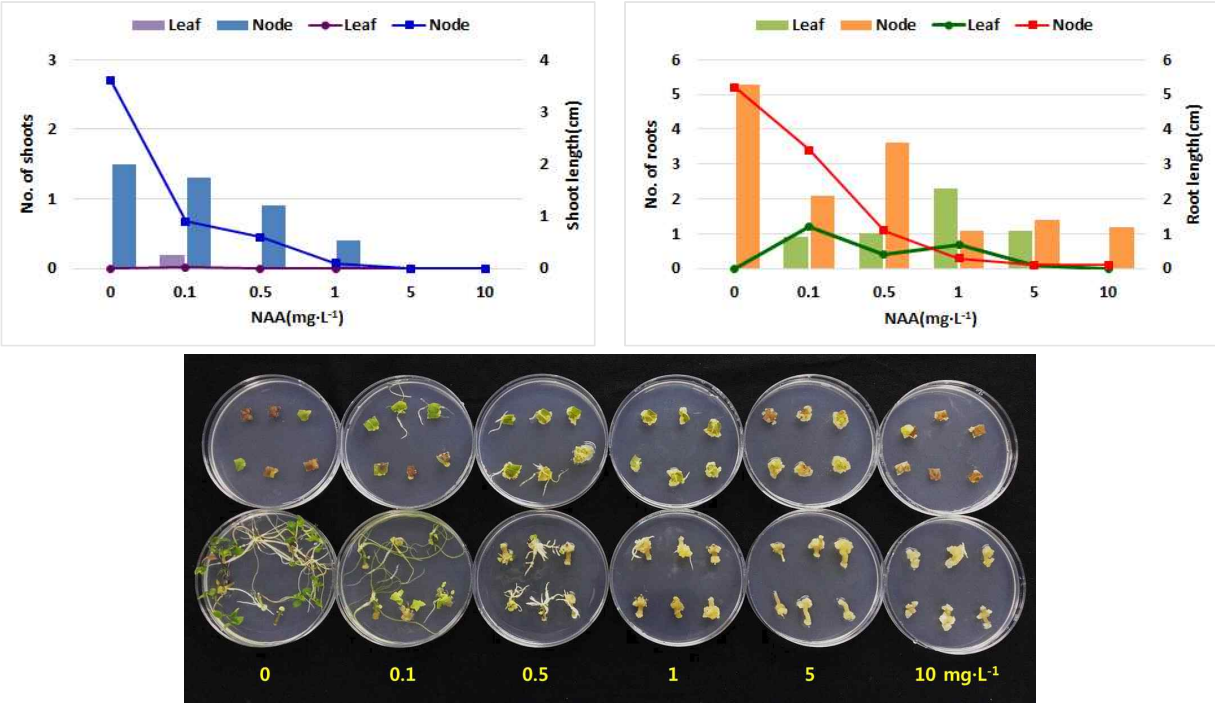


Fig. 12. Effects of NAA on shoot and adventitious root formation from leaf and node of *Codonopsis lanceolata* for 6 weeks in culture.

NAA의 경우도 엽절편보다 절을 배양한 경우에 양호한 결과로 NAA의 농도가 높을수록 신초의 형성 및 생장은 저조한 경향을 보였다. 부정근의 형성 및 생장도 신초의 결과와 유사한 경향으로 무첨가 배지에서 부정근의 형성 및 생장이 왕성했다.

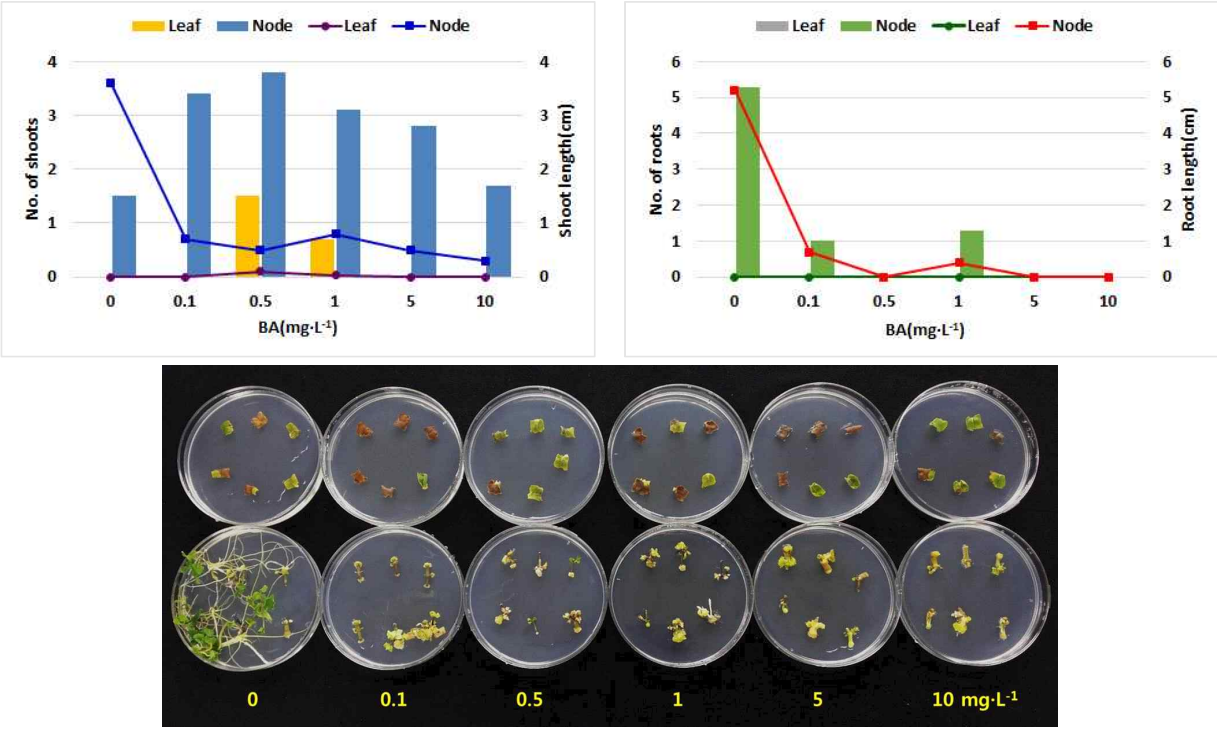
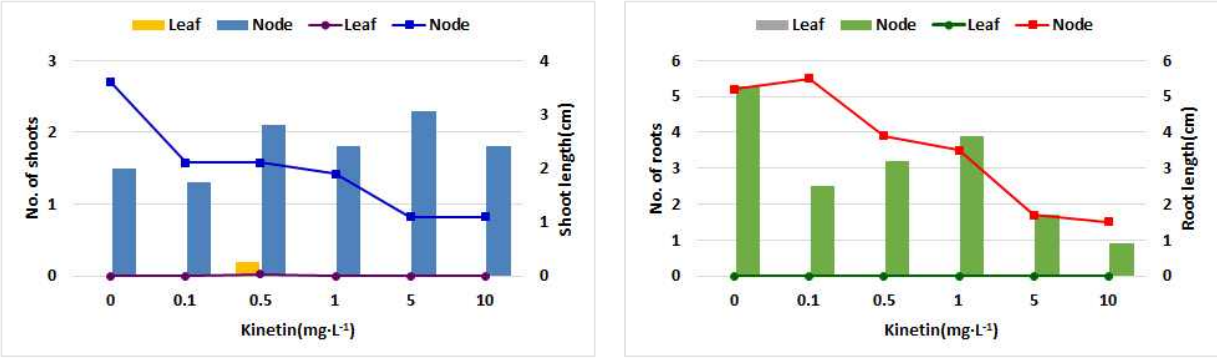


Fig. 13. Effects of BA on shoot and adventitious root formation from leaf and node of *Codonopsis lanceolata* for 6 weeks in culture.

Cytokinin의 경우, BA는 절을 재료로 0.5 mg · L^{-1} 첨가배지에서 가장 양호한 신초의 형성을 보였는데 절편체당 3.8개가 형성되었으나, 생장은 저조하여 무첨가 배지에서 가장 좋았다. 부정근 또한 무첨가구에서 양호한 결과를 보였다.



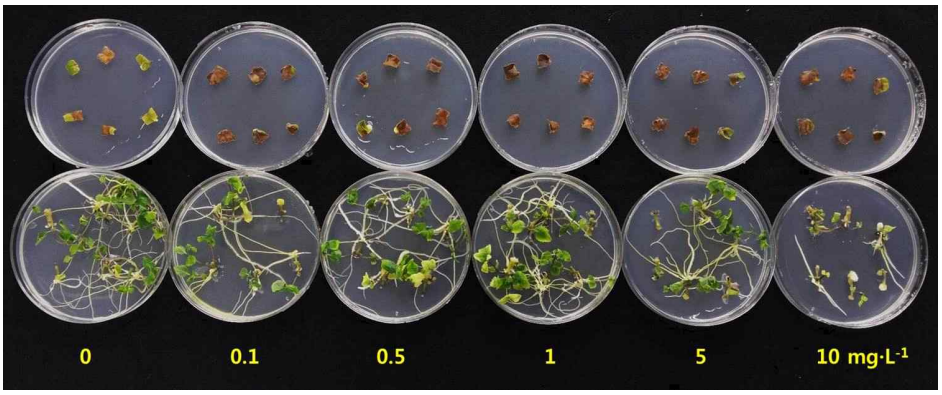


Fig. 14. Effects of kinetin on shoot and adventitious root formation from leaf and node of *Codonopsis lanceolata* for 6 weeks in culture.

Kinetin은 절을 재료로 5.0 mg · L^{-1} 첨가배지에서 양호한 신초의 형성을 보였으나 생장은 저조하였다. 부정근은 무첨가구에서 양호한 형성을 보인반면 부정근 생장은 0.1 mg · L^{-1} 첨가구에서 좋았다.

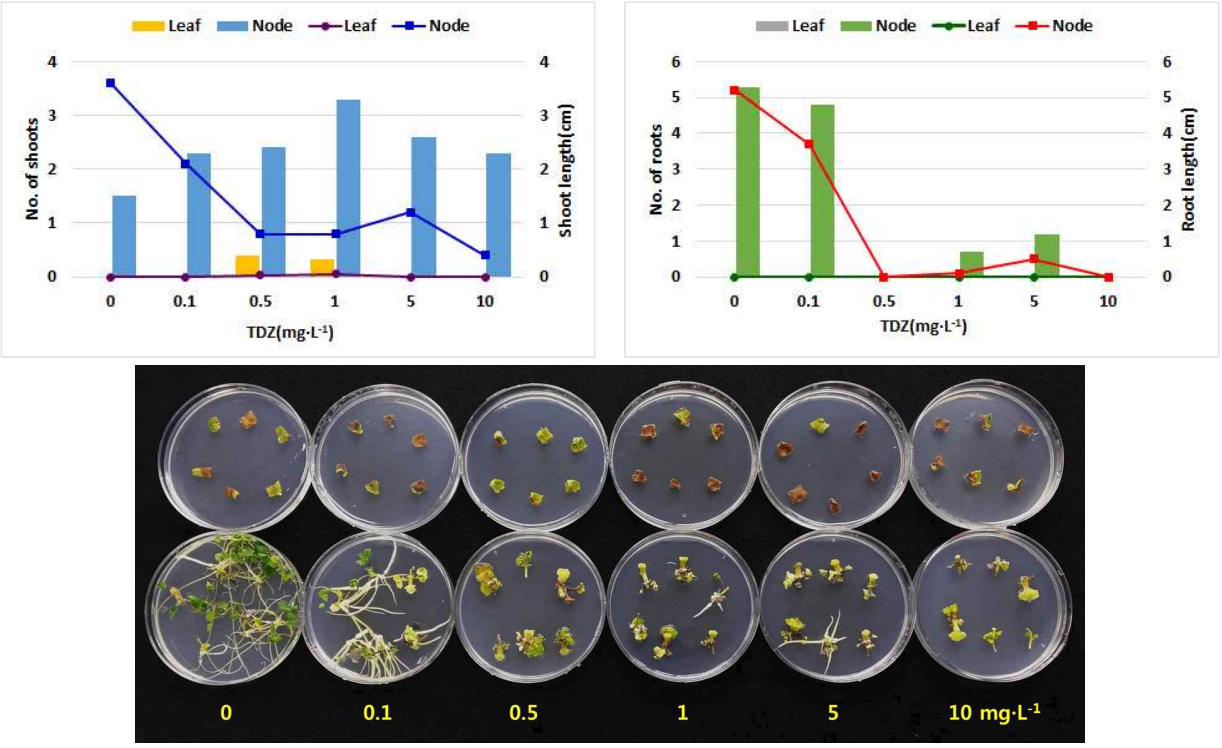


Fig. 15. Effects of TDZ on shoot and adventitious root formation from leaf and node of *Codonopsis lanceolata* for 6 weeks in culture.

TDZ는 절을 재료로 한 경우, 농도가 높아질수록 신초의 형성이 좋아 1.0 mg · L^{-1} 첨가구에서 절편체당 3.3개로 가장 양호하였다. 신초의 생장은 무첨가구에서 양호한 결과를 보였다. 엽절편은 극히 미미한 반응을 나타냈다. 부정근의 형성은 0.5 mg · L^{-1} 이상의 농도로 첨가할수록 급격히 저하되는 결과를 보였으며 생장 또한 비슷한 양상을 나타내었다.

② 혼용처리

Kinetin 1 mg/L와 NAA(0.1, 0.5, 1 mg/L), IAA(1, 5, 10 mg/L), IBA(1, 5, 10 mg/L)를 혼용첨가하여 배양한 결과는 아래와 같다.

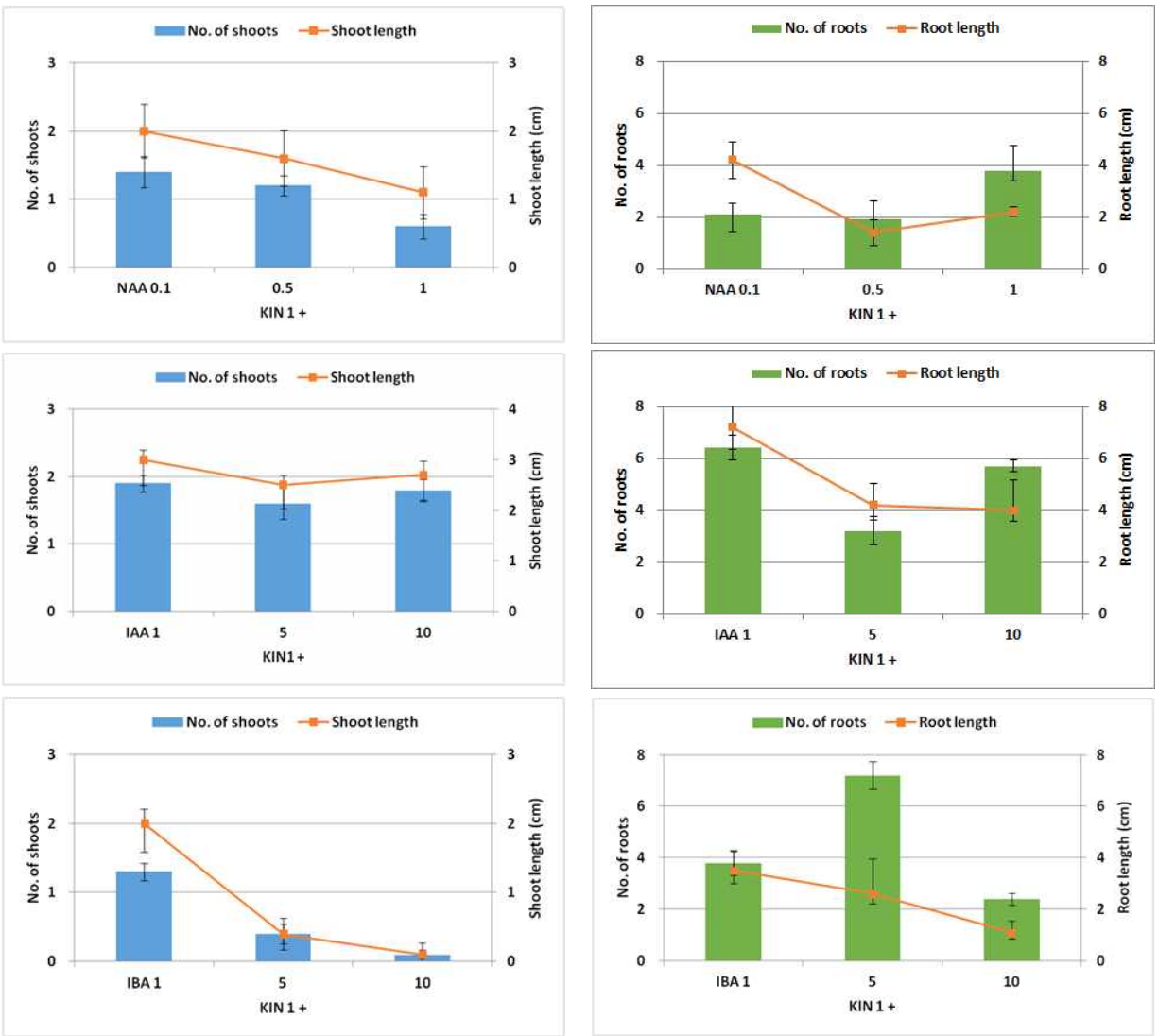


Fig. 16. Effects of kinetin, NAA, IAA, and IBA on shoot and adventitious root formation from node of *Codonopsis lanceolata* for 6 weeks in culture.

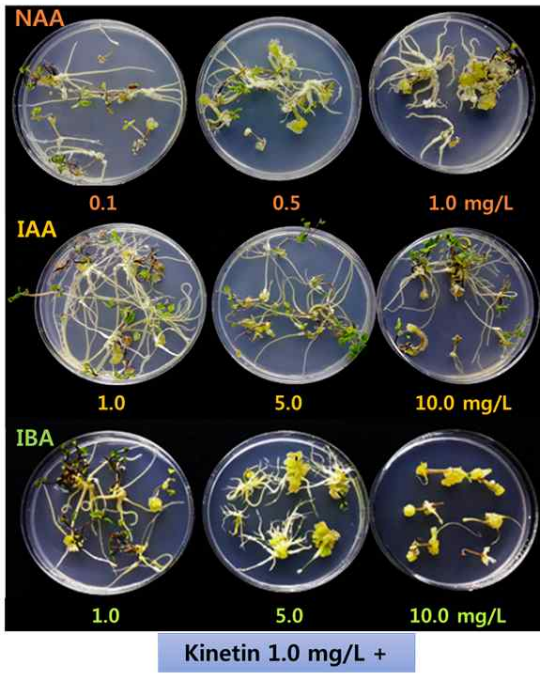
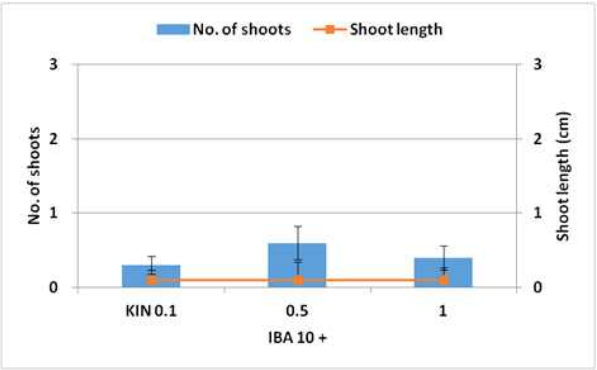
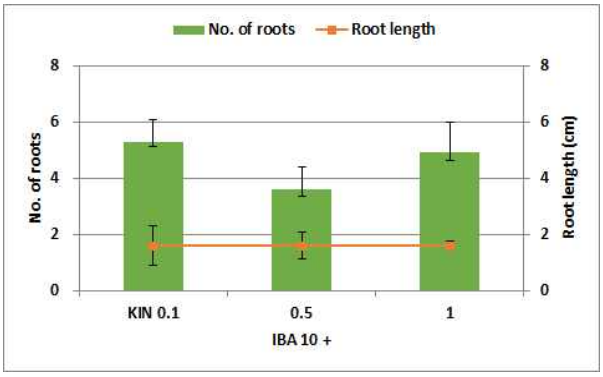


Fig. 17. Effects of kinetin and NAA, IAA, IBA on shoot and adventitious root formation from node of *Codonopsis lanceolata* for 6 weeks in culture.

신초의 경우 형성은 kinetin과 IAA 혼용처리구에서 양호한 경향으로 IAA 농도에 따른 차이는 없었다. Kinetin 1 mg/L와 IAA 1 mg/L의 혼용배지에서 1.9개의 신초가 형성되었다. 신초의 생장 또한 IAA 첨가구에서 3cm로 왕성한 신초의 생장을 보였다. 부정근의 경우 kinetin 1 mg/L와 IBA 5 mg/L 혼용구에서 7.2개의 가장 많은 부정근이 형성된 반면 부정근의 생장은 IAA 1mg 혼용배지에서 가장 왕성하였다.

IBA 10 mg/L와 kinetin(0.1, 0.5, 1 mg/L), BA(0.1, 0.5, 1 mg/L), TDZ(0.1, 0.5, 1 mg/L)를 혼용첨가하여 배양한 결과는 아래와 같다.





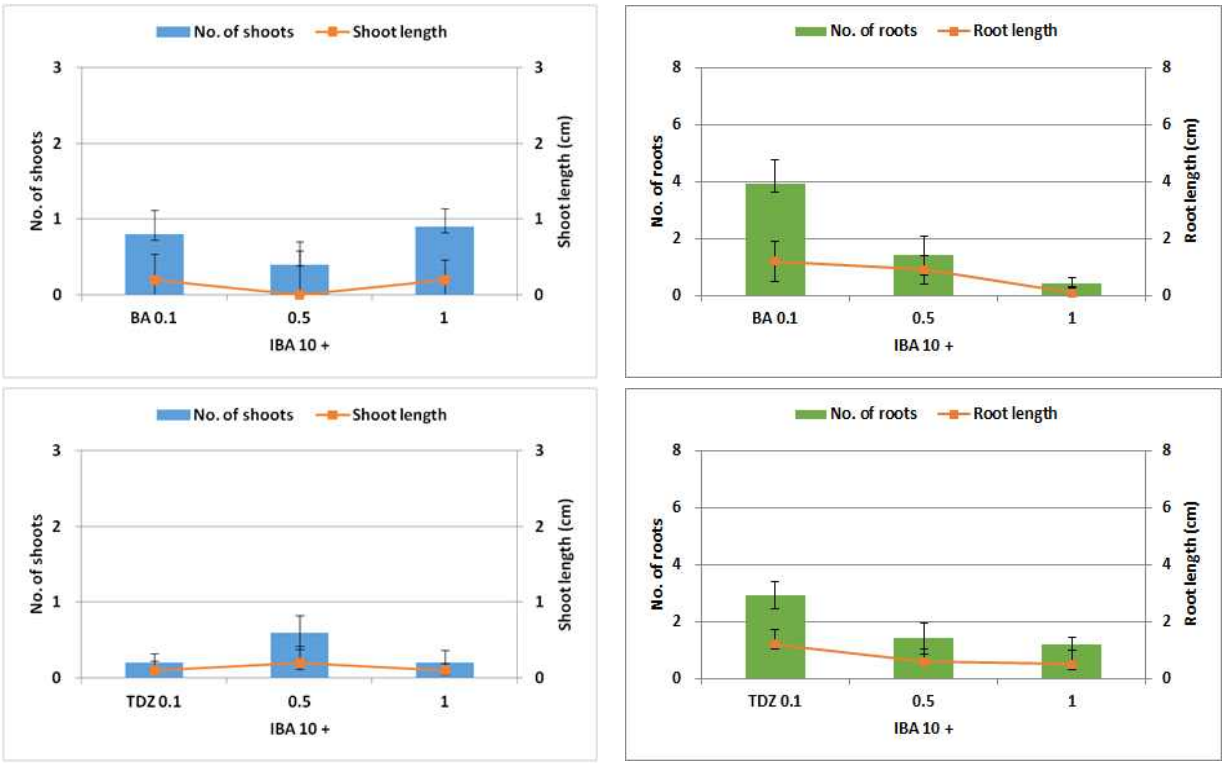


Fig. 18. Effects of IBA, kinetin, BA and TDZ on shoot and adventitious root formation from node of *Codonopsis lanceolata* for 6 weeks in culture.

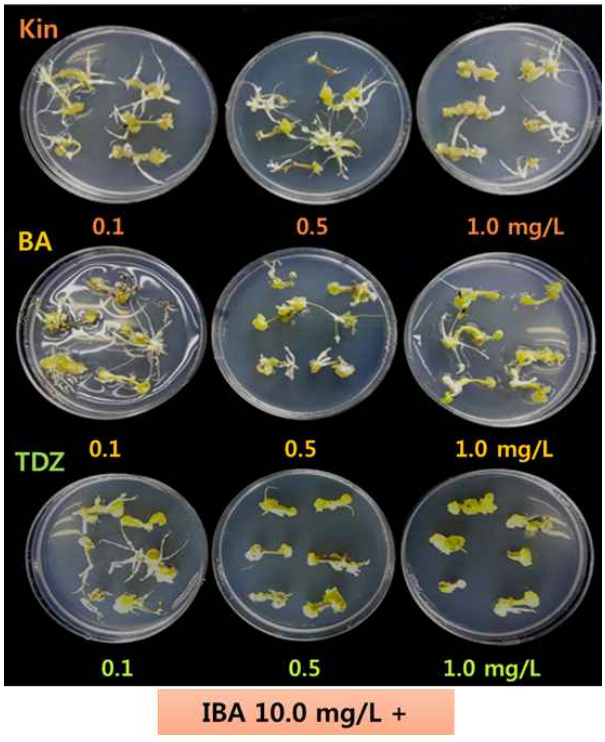


Fig. 19. Effects of IBA and kinetin, BA, TDZ on shoot and adventitious root formation from node of *Codonopsis lanceolata* for 6 weeks in culture.

신초의 경우 모든 처리구에서 0.2개~0.9개로 저조한 신초형성을 보였다. 부정근의 경우 IBA와 kinetin 혼용구에서 양호한 경향으로 kinetin 0.1 mg/L가 첨가된 배지에서 가장 많은 부정근의 형성되었다. 부정근의 생장 또한 kinetin이 첨가된 배지에서 농도와 관계없이 1.6cm로 왕성한 생장을 보였다.

(다) 환경요인

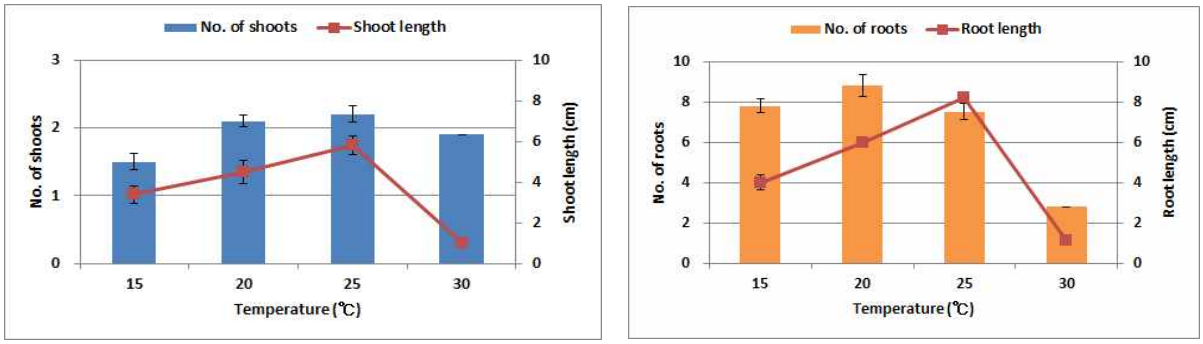


Fig. 20. Effects of culture temperature on shoot and adventitious root formation from node of *Codonopsis lanceolata* for 8 weeks in culture.

배양온도에 따른 생장효과를 알아보기 위하여 더덕의 절을 배양재료로 각각 15, 20, 25, 30℃에서 배양한 결과 신초의 형성 및 생장은 25℃에서 2.2개, 5.8cm로 유의한 결과를 볼 수 있었다. 신초의 형성은 15℃에서, 생장은 30℃에서 가장 저조한 결과를 보였다. 부정근은 20℃에서 8.8개의 높은 형성을 보였고, 25℃에서 8.2cm로 왕성하였으며 고온인 30℃에는 가장 낮은 부정근의 형성 및 생장(2.8개, 1.1cm)을 나타냈다.

다. 기외 순화체계 확립

(1) 연구방법

(가) 더덕의 생육 및 수량에 미치는 배양토의 영향

① 시비조건 및 토양분석

2014년 10월, 제주에서 수확한 1년생 더덕의 뿌리(4~8g)를 공시재료로 하였다. 2015년 4월, 상토(Potground H, Klasman, 독일), 피트모스(Sunshine, Genuine, 캐나다), 펄라이트(삼손, 한국), 버미큐라이트 등의 혼합비율을 달리한 6종류의 배양토를 설정하여(Table 19), 1/2000a wagner pot에 이들의 토양을 단용 또는 혼용으로 4kg씩 충진한 후, 1주씩 식재하여 재배하였다. 각 처리구당 8반복으로 하였다. 2015년 10월초, 초장, 엽의 특성, 분지수 및 절간장 등의 지상부의 생육조사를 실시하였으며, 9월말, 수확하여 뿌리의 생체중, 근장, 근경 및 분기근 등의 수량을 조사하였다. 기타 재배법은 농촌진흥청 산채류 표준재배법에 준하여 관리하였다.

Table 19. Soil composition used in the study.

Treatment	Soil composition
S	Compost only
SV	Compost : Vermiculite = 2 : 1
SVP	Compost : Vermiculite : Perlite = 2 : 1 : 1
Pm	Peatmoss only
PmV	Peatmoss : Vermiculite = 2 : 1
PmVP	Peatmoss : Vermiculite : Perlite = 2 : 1 : 1

Table 20. Physio-chemical properties of the soil used in the experiment.

Treatment	Mineral elements(%)				
	T-N	P	K	Ca	Mg
S	0.251	0.18	0.26	2.83	0.12
SV	0.503	0.14	2.63	0.27	3.19
SVP	0.579	0.13	2.07	0.26	4.61
Pm	0.361	0.09	1.15	0.15	0.10
PmV	0.426	0.16	4.54	0.02	3.76
PmVP	0.261	0.16	2.71	0.01	2.74

(나) 더덕의 생육 및 수량에 미치는 온도의 영향

① 온도 및 차광처리

2014년 무주에서 채종했던 더덕종자를 공시재료로, 2015년 3월 2일 파종하여 우송정보대학 유리온실에서 최아시켰다. 본엽 출현 후, 직경 15cm의 비닐포트에 1주씩 이식하였으며, 5월 15일 생물환경조절실의 15, 20, 25 및 30℃실에 반입하여, 자연광과 한랭사로 자연광을 90% 차광한 차광조건에서 생육시켰다. 동년 9월 5일, 지상부의 생육조사를, 또한 9월 15일, 수확하여 근장, 근경, 생체중 등의 수량조사를 하였다. 또한 수확한 각 온도구의 더덕 뿌리에 함유된 일반성분을 분석하였다.

- 일반성분 분석

온도별 실험에서 수확한 뿌리의 건조물을 시료로 하여 일반성분은 AOAC 법(AOAC, 1990)에 의하여 분석하였다. 수분은 105℃ 상압건조법, 회분 함량은 550℃에서 직접회화법을 이용하여 분석하였다. 조단백질 함량은 micro-Kjeldahl 법을 이용한 단백질 자동분석기(Kjeltec protein analyzer, Tecator, Sweden)로, 조지방 함량은 Soxhlet 법을 이용하여 분석하였다.

② DIF 처리

실험 1과 동일한 공시재료로, 2015년 3월 10일 파종하여 본엽 출현 후, 직경 15cm의 비닐포트에 1주씩 이식하였으며, 4월 20일 생물환경조절실에 반입하여 항온처리(15, 20, 25 및 30℃)와 변온처리(25℃/20℃, 20℃/25℃, 30℃/15℃ 및 15℃/30℃)의 조건으로 생육시켰다. 변온처리는 일몰직전의 오전 6시부터 오후 6시까지를 주온으로, 오후 6시부터 오전 6시까지는 야온으로 하여 온도변환을 하였다. 동년 7월 2일, 지상부의 생육조사를, 또한 7월 8일, 지하부를 수확하여 수량조사를 하였다.

(2) 연구결과

(가) 더덕의 생육 및 수량에 미치는 배양토의 영향

① 지상부 생육

Table 21. Effect of soil composition on growth characteristics of *Codonopsis lanceolata*.

Soil composition[z]	Plant height (cm)	Leaf width (cm)	Leaf length (cm)	Stem diameter (cm)	No. of branches	No. of nodes	Leaf color (SPAD-502)
S	135.9 a[y]	7.3 a	3.7 a	4.2 a	13.9 a	21.8 a	30.5 a
SV	215.7 c	7.8 ab	4.0 b	4.3 a	23.1 c	26.7 a	44.6 c
SVP	197.7 bc	7.6 ab	4.0 b	4.5 a	17.9 ab	24.8 a	36.5 b
Pm	152.4 ab	7.4 a	3.8 a	4.3 a	15.8 ab	22.7 a	30.7 a
PmV	218.4 c	8.2 b	4.1 b	4.3 a	22.0 c	24.8 a	43.4 c
PmVP	168.2 ab	7.8 ab	4.1 b	4.4 a	13.9 a	23.4 a	31.3 a

[z]Refer to Table 1.

[y]Values followed by common letters in the same column are not significantly different(P=0.05, Duncan's multiple range test).

더덕의 지상부 생육에 미치는 배양토의 영향은 Table 21과 같다. 초장은 상토를 단용으로 하였을 경우, 135.9cm로 가장 낮은 생육을 보였던 것에 비해 상토와 피트모스를 버미큐라이트와 2:1의 비율로 혼합한 배양토에서 각각 215.7cm와 218.4cm로 왕성한 생육을 나타냈다. 엽폭은 파트모스와 버미큐라이트를 2:1의 비율로 혼합한 배양토에서 8.2cm로 높은 결과를 나타냈으며, 그 외의 배양토에서는 7.4~7.8cm의 범위로 큰 차이는 없었다. 엽장은 상토와 피트모스를 단용으로 하였을 경우, 각각 3.7cm와 3.8cm로 낮은 결과를 보였으며, 혼용의 배양토에서는 큰 차이가 없었다. 경경은 배양토의 종류에 관계없이 모든 배양토에서 4.2~4.5cm의 범위로 유의성이 인정되지 않았다. 분지수 또한 지상부와 유사한 결과로, 상토와 피트모스를 버미큐라이트와 2:1의 비율로 혼합한 배양토에서 가장 많은 분지의 형성을 볼 수 있었으며, 지상부의 생육이 낮을수록 분지의 형성은 저하되는 것을 알 수 있었다. 절수은 모든 배양토에서 21.8~26.7절의 범위로 유의성이 인정되지 않았으며, 대체적으로 6절 이후부터 절간의 신장이 왕성하여 넝쿨성으로 변해가는 경향을 보였다. 엽색은 상토와 피트모스의 단용구에서 낮은 결과를 나타냈던 반면 상토와 피트모스를 버미큐라이트와 2:1의 비율로 혼합한 배양토에서 각각 44.6과 43.4로 다른 배양토에 비해 유의하게 높은 결과를 보였다.

이상의 결과로부터 더덕의 지상부 생육을 위한 적정배양토는 상토 및 피트모스의 단용이 아닌 보수, 보비, 통기성 및 양분의 보존능 등이 뛰어난 버미큐라이트의 혼용 배양토가 유의할 것으로 생각되었다.

② 지하부 생육

Table 22. Effect of soil composition on root characteristics of *Codonopsis lanceolata*.

Soil composition[z]	Length (cm)	Diameter (cm)	No. of lateral roots	Fresh weight(g)	Dry weight (g)
S	17.1 a[y]	1.9 a	3.2 a	18.9 a	6.6 a
SV	18.2 a	1.9 a	4.4 b	31.0 bc	10.5 bc
SVP	19.7 ab	1.9 a	3.5 a	28.8 bc	9.1 b
Pm	17.6 a	2.0 a	3.8 ab	21.5 ab	7.3 a
PmV	21.7 b	2.0 a	5.9 c	35.6 c	12.7 c
PmVP	20.1 b	2.4 b	3.0 a	23.3 ab	8.9 b

[z]Refer to Table 1.
[y]Values followed by common letters in the same column are not significantly different(P=0.05, Duncan' s multiple range test).

더덕의 지상부 생육에 미치는 배양토의 영향은 Table 22와 같다. 근장은 상토를 기본으로 단용 또는 혼용했던 배양토에 비해 피트모스를 기본으로 혼용한 배양토에서 생장이 좋은 것으로 나타났다. 근경은 피트모스, 버미큐라이트와 펄라이트를 2:1:1로 혼용한 배양토에서 2.4cm로 가장 높은 결과를 얻었던 반면, 그 외의 배양토에서는 1.9~2.0cm의 범위로 큰 차이가 없었다. 분기근은 상토 및 피트모스를 버미큐라이트와 2:1의 비율로 혼용한 배양토에서 각각 4.4개와 5.9개로 가장 많은 형성을 보였으나, 그 외의 배양토에서는 낮은 분기근 형성을 나타냈다. 뿌리의 생체중은 초장의 생육과 유사한 결과로 피트모스와 버미큐라이트를 2:1의 비율로 혼용한 배양토에서 35.6g으로 높은 결과를 얻었다. 뿌리의 건물량은 모든 배양토에서 대체적으로 생체중에 비해 70%이상 감소하는 것으로 나타났다.

이상의 결과로부터 더덕의 수량성 향상을 위하여 배양토는 피트모스와 버미큐라이트를 혼용하는 것이 좋을 것으로 생각된다. 실제 재배 시, 토양으로의 적용은 피트모스와 버미큐라이트 공히 보수력과 통기성이 다른 배양토에 비해 우수한 점으로 볼 때, 더덕 재배를 위해 보수력과 통기성이 뛰어난 토양의 혼용은 더덕의 생산력 향상에 도움을 줄 것으로 판단되었다.

(나) 더덕의 생육 및 수량에 미치는 온도의 영향

① 온도 및 차광처리에 따른 더덕의 생장과 수량

Table 23. Effects of air temperature and light intensity on growth of *Codonopsis lanceolata*

Temperature (℃)	Light intensity[z]	Plant height (cm)	Leaf width (cm)	Leaf length (cm)	No. of branches
15	H	229.4 d[y]	4.2 ab	4.6 ab	17.3 de
	L	148.6 c	5.3 c	5.6 c	12.2 bc
20	H	218.9 d	4.3 ab	4.5 ab	19.4 e
	L	159.5 c	4.9 bc	5.1 bc	14.3 cd
25	H	223.9 d	4.5 ab	4.7 ab	17.1 de
	L	160.4 c	4.6 bc	4.9 bc	12.9 bc
30	H	85.2 a	3.8 a	4.0 a	6.4 a
	L	129.7 b	4.7 bc	5.1 bc	11.0 b

[z]H, high light intensity(=natural light); L, low intensity(=10% natural light)
[y]Values followed by common letters in the same column are not significantly different(P=0.05, Duncan' s multiple range test).

온도 및 차광처리에 따른 더덕의 지상부의 생육에 대한 조사결과는 Table 23과 같다

자연광조건하에서는 15, 20 및 25℃의 어느 온도구에서도 초장은 218.9～223.9cn의 범위로 유의차는 인정되지 않았다. 그러나 30℃구에서는 85.2cm로 다른 온도구보다 생장이 현저히 억제되었다. 또한 15, 20 및 25℃의 차광구에서는 자연광에 비해 초장이 유의하게 낮았지만, 온도간의 유의차는 인정되지 않았다. 그러나 30℃구에서는 차광구가 자연광조건에 비해 역으로 초장의 생장이 좋았다. 엽의 크기는 자연광조건하에서는 30℃구에서 조금 작아졌지만, 어느 온도구에서도 유의한 차는 인정되지 않았다. 그러나 엽의 크기는 차광처리에 의해 커졌으며, 특히, 15 및 30℃구에서 엽면적의 확대가 현저하였다. 분지수도 자연광조건하에서는 30℃에서 현저히 감소하였지만, 15, 20 및 25℃의 온도구간의 유의차는 없었다. 15, 20 및 25℃ 온도구에서는 차광하는 것에 의해 분지수는 유의하게 감소하였지만, 30℃구에서는 오히려 많아졌다(Table 28).

Table 24. Effects of air temperature and light intensity on root characteristics of *Codonopsis lanceolata*

Temperature (℃)	Light intensity[z]	Length (cm)	Diameter (mm)	Fresh weight(g)	No. of lateral roots
15	H	9.7 c[y]	9.3 c	20.2 d	12.2 d
	L	8.2 bc	7.2 bc	6.4 c	7.7 c
20	H	8.4 bc	8.7 bc	19.5 d	12.5 d
	L	6.5 b	6.3 b	9.3 c	5.1 c
25	H	6.8 b	8.0 bc	6.0 c	6.0 c
	L	6.4 b	7.3 bc	5.2 bc	4.6 bc
30	H	3.0 a	3.7 a	0.5 a	0.5 a
	L	4.2 a	6.1 b	2.1 ab	1.3 ab

[z]H, high light intensity(=natural light); L, low intensity(=10% natural light)

[y]Values followed by common letters in the same column are not significantly different(P=0.05, Duncan' s multiple range test).

온도 및 차광처리에 따른 더덕의 지하부의 형질 및 수량에 대한 조사결과는 Table 24와 같다.

근장 및 근경은 자연조건하에서는 온도의 상승과 함께 짧고 가늘어졌으며, 특히 30℃구에서는 생장이 매우 억제되는 것으로 나타났다. 차광조건하에서는 15, 20 및 25℃ 온도구간의 유의성은 인정되지 않았다. 30℃의 차광조건하에서는 자연조건하와 같이 근장은 현저히 억제되었던 반면 근경의 억제는 작아 자연조건하의 근경과 유의한 차는 인정되지 않았다. 근의 생체중은 지하부의 생육에는 유의차가 인정되지 않았던 자연조건하의 15℃와 25℃의 생체중은 각각 20.2g과 6.0g으로 큰 차를 볼 수 있었다. 이 같은 결과는 15℃구에서는 분기근의 수가 15.2로 잘 발달했던 것에 비해 25℃구에서는 6.8로 적었던 이들 두 온도구간에서의 분기근 수의 차이에 의한 것으로 생각된다. 15, 20 및 25℃의 어느 온도구에서도 차광처리에 의한 생체중의 감소는 현저하였다. 30℃에서는 자연조건하에 비해 차광구의 생체중이 높은 것으로 나타났으나, 양자 간의 유의차는 인정되지 않았다(Table 24).

본 실험의 결과로부터 더덕의 지상부 생육은 조금 저온인 20～25℃조건에서 가장 좋았으며, 지하부의 수량은 이보다 낮은 온도에서 양호한 것을 알 수 있었다.

차광은 한여름의 고온시에 기온 및 지온을 낮게하는 효과가 있어, 실제재배에 있어서도 차광

처리는 유효하지만, 한편으로 지하부의 생산을 저하시키는 결과로부터 적온이하의 시기는 자연조건하에서 재배해야할 것으로 생각된다. 즉, 더덕의 재배에 있어 고온시의 차광처리는 식물의 생리작용에 미치는 직접적인 영향을 목적으로 했던 것이 아닌 광선을 피하는 것에 의해 기온 및 지온의 저하효과를 이용했던 것이라 말 할 수 있다.

이상의 결과로부터, 한여름의 고온 하에서는 차광에 의해 지상부 및 지하부의 생육저해가 경감되는 것이 시사되어, 여름의 고온 시의 대책으로 차광재배가 유효할 것으로 생각된다.

② 온도의 차에 따른 일반성분 함량 분석

Table 25. Comparison of proximate composition due to difference of temperature in *Codonpsis lanceolata*

Temperature (℃)	General nutrients(%)					
	Moisture	Crude protein	Crude fat	Crude fiber	Crude ash	Sugar
15	18.0	3.5	1.3	5.1	3.5	39.0
20	20.1	3.3	1.3	4.4	3.6	37.5
25	25.7	2.3	0.7	3.7	2.7	37.4
30	12.6	6.1	1.8	10.7	4.5	35.8

일반성분 함량은 온도에 따른 함량의 차는 있었으며, 30℃ 온도구에서 가장 높은 것으로 나타났다. 수분함량은 25℃ 온도구에서 25.7%로, 타 온도구에 비해 조금 높은 것으로 나타났으며, 30℃ 온도구에서 가장 낮은 함량을 보였다. 조단백질은 25℃ 온도구가 2.3%로 가장 낮았던 것에 비해 30℃ 온도구에서 6.1%로 높은 함량을 보였다. 조지방, 조섬유 및 조회분 또한 조단백질과 유사한 결과로, 30℃ 온도구에서 높은 결과를 나타냈다. 당질의 함량은 모든 온도구에서 35.8～39.0%의 범위로, 큰 차이가 없었다(Table 25).

③ 변온처리에 따른 더덕의 생장과 수량

Table 26. Effects of DIF on growth of *Codonopsis lanceolata*

Day/Night Temperature (℃)	Plant height (cm)	Leaf width (cm)	Leaf length (cm)	No. of branches
15/15(0)[y]	13.8 a[z]	2.8 ab	1.6 a	0.2 a
20/20(0)	19.2 ab	2.9 ab	2.0 ab	0.5 a
25/25(0)	46.4 d	2.5 a	1.9 ab	1.7 b
30/30(0)	20.8 ab	3.1 b	2.4 b	0.3 a
25/20(+5)	36.5 c	2.8 ab	1.9 ab	0.1 a
20/25(-5)	30.3 b	2.9 ab	2.0 ab	0.1 a
30/15(+15)	37.7 c	3.2 b	2.0 ab	0.6 a
15/30(-15)	13.0 a	2.6 a	1.7 a	0.3 a

[y]DIF value

[z]Values followed by common letters in the same column are not significantly different(P=0.05, Duncan' s multiple range test).

주야온 변온처리(DIF)에 의한 지상부의 생육에 대한 조사결과는 Table 26과 같다.

초장은 25℃ 항온처리구와 +DIF 처리구에서 높은 결과를 보였던 반면, 야온이 주온보다 높은 -DIF구에서는 생장이 억제되는 것으로 나타나, 야온의 변화가 더덕의 생장에 영향을 주는 하나의 요인이라 생각되었다. 엽장과 엽폭은 항온구와 변온에 따른 큰 영향은 없었으며, 거의 같은 결과를 보였다. 분지수는 25℃ 항온처리구에서 1.7개로, 다른 처리구와 유의차가 인정되었으나, 그 외의 처리구는 0.1~0.6개의 범위로 큰 차이가 없었다(Table 10). 이 같이 분지수가 적었던 것은 초기생육단계로 분지의 발달이 왕성하지 못했기 때문이라 생각되었다. 주야온처리에 의한 식물의 생장과 줄기의 신장은 일정온도에 비해 -DIF처리에 의해 더욱 억제되며(Mortensen과 Moe, 1992; Bertran과 Kalsen, 1994), 주야온의 변온처리에 의한 엽의 원기(Erwin 등, 1989)와 식물의 형상, chlorophyll 함량(Tangeras, 1979; Moe, 1990) 등에 영향을 미친다고 하였지만, 본 실험에서는 야온의 증가가 더덕의 신장에는 영향을 주는 것으로 나타났으나, 엽의 크기 및 식물의 형상에는 거의 영향이 없는 것으로 나타났다. 이 같은 결과는 주야온의 변환은 식물의 생장이 가장 발달하는 시기에 큰 영향을 미치는 것에 대해 본 실험이 초기 생육단계에서의 처리라는 점과 식물체에 의한 반응이 다른 점 등에 의한 것으로 생각되었다.

Table 27. Effect of DIF on root characteristics of *Codonopsis lanceolata*

Day/Night Temperature (℃)	Length (cm)	Diameter (mm)	Fresh weight(g)	No. of lateral roots
15/15(0)[y]	7.5 c[z]	5.2 a	2.1 ab	2.2 ab
20/20(0)	8.6 d	5.5 a	2.3 ab	1.5 a
25/25(0)	10.1 e	6.7 b	6.0 d	3.8 c
30/30(0)	5.0 b	5.6 a	2.8 b	2.7 b
25/20(+5)	8.2 cd	6.2 ab	5.6 cd	5.1 d
20/25(-5)	6.8 c	5.8 a	5.0 c	4.7 cd
30/15(+15)	7.1 c	6.0 ab	5.9 d	5.1 d
15/30(-15)	3.2 a	5.3 a	1.5 a	0.9 a

[y]DIF value

[z]Values followed by common letters in the same column are not significantly different(P=0.05, Duncan's multiple range test).

주야온 변온처리(DIF)에 의한 지하부의 형질 및 수량에 대한 조사결과는 Table 27과 같다.

근의 생체중은 지상부의 생육과 동일한 양상으로, 25℃ 항온처리구와 +DIF 처리구에서 높은 결과를 보였으며, 특히 15℃, 20℃의 항온처리구 및 -15 DIF처리구에 비해 2.5배 이상의 증가량을 보였다. 이 같은 결과로부터 더덕의 지하부 비대는 야온이 주온보다 높을수록 억제되는 것으로 생각되었으며, -DIF처리는 지하부의 발달에 영향을 준다는 보고(Nilwik, 1981)와 일치하였다. 또한 근장은 30℃ 항온처리구와 -15 DIF처리구에서 짧았으나, 그 외의 처리구에서는 큰 차가 없었다. 근경은 25℃ 항온처리구에서 6.7mm로 높은 결과를 보였으나, 그 외의 처리구에서는 5.2~6.2mm의 범위로 큰 차가 없었다. 분기근 수는 항온처리에 비해 변온처리구에서 많은 결과를 보였으나, -15 DIF처리구의 경우 0.9개로 가장 적었다(Table 27).

이상의 결과로부터 더덕의 초기생육 단계에서 주야온의 차는 지상부 생육 및 지하부의 비대에 큰 영향을 미치는 것으로 생각되었으며, 통상의 재배환경조건은 아니지만 초기생육단계에서의 온도변환은 수량증대를 가져올 수 있을 것으로 생각되었다.

3. 우량품종의 품종개량 및 배수체 식물의 대량번식법 개발

가. 선발된 우량품종의 기능성물질(2차대사산물) 함량 증가를 위한 품종개량

(1) 연구방법

(가) 종자 및 기내 배양체의 콜히친 침지처리

2015년 채종한 '제주산'의 더덕종자를 기내 무균파종 후, 생장시킨 배양식물체의 절편체를 공시재료로 하였다. 종자처리는 여과지 2매를 깔은 직경 9 cm의 패트리디쉬에 0, 0.05, 0.01, 0.5 및 1.0%의 콜히친 수용액을 20 ml씩 넣은 후, 50립의 종자를 침지처리 하였으며, 발아촉진을 위하여 5℃의 저온 조건하에서 3, 6, 12 및 24시간동안 두었다. 각 처리는 3반복으로 하였다. 침지처리 후, 각 종자를 멸균수로 3～4회 씻은 다음, 버미큐라이트와 피트모스를 1:1의 비율로 혼합한 배양토에 파종하여 25℃의 항온실에서 최아시켰다. 자엽이 출현했을 때 발아조사를 하였으며, 본엽이 6매 이상 출현했을 때 엽을 채취하여 배수성의 유무를 확인하였다. 또한 기내 배양체의 콜히친 처리는 약 1 cm의 길이로 자른 더덕의 절을 10 ml의 비이커에 0.01, 0.05 및 0.1%의 콜히친 수용액을 40 ml씩 넣은 후, 1, 6 및 12시간 침지처리하였다. 침지처리 후, 각 절편체를 멸균수로 3～4회 씻은 다음, MS배지에 각각 5개씩 치상하였으며 각 처리는 9반복으로 하였다. 배양조건은 25±1℃, 40 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$의 광도로 16시간 조명하였다.

(나) 염색체수 조사

유백색의 신선한 더덕의 근단을 1cm 정도 채취하여 콜히친 0.05% 수용액에 2~3시간 상온에서 전처리한 후, 95% 에탄올과 빙초산(3:1)의 혼합용액으로 1일 정도 냉장상태에서 고정하였다. 이를 1N HCl 용액에 다시 침치하여 온도 60℃, RPM 120으로 조절한 수조에서 가수분해한 후, 2% aceto-orcein 용액에 침지한 후, 광학현미경으로 염색체수를 조사하였다.

(다) Cytometry를 이용한 DNA 함량 분석

각 처리구의 식물체 잎을 약 05×05 cm의 크기로 자른 후, HR-A액(Patec사, Germany)을 첨가한 다음, 조직을 으깨어 DNA를 추출하였다. 이 용액에 HR-B액(Patec사, Germany)을 첨가하여 염색한 다음, Flow cytometry(Patec PA-1, Germany)를 이용하여 DNA함량의 배가 유무를 확인하였으며, 이 결과로 배수성을 판정하였다.

(라) 통계분석

통계분석은 SAS 프로그램(SAS, 9.2, Institute Inc, USA)을 이용하여 Duncan's multiple range test(p=0.05)로 분석하였다.

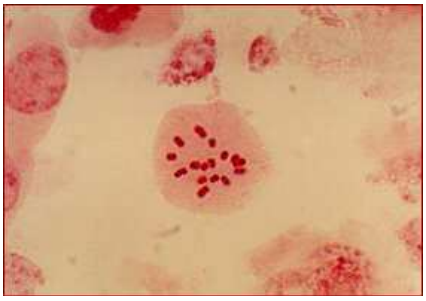
(2) 연구결과

더덕 종자의 콜히친의 침지처리 농도 및 시간이 발아와 배수체 유도에 미치는 영향은 Table 28과 같다.

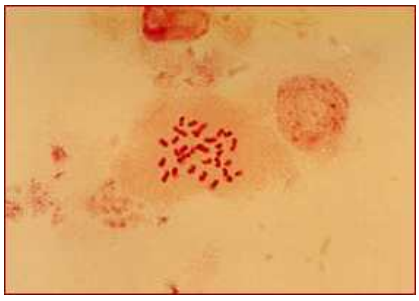
Table 28. Effect of colchicine on chromosome doubling and germination of *Codonopsis lanceolata* seeds.

Conc. (%)	Soaking time(hrs)	No. of seeds treated	No. of seeds germinated	% of germination	No. of tetraploids
Control		150	90	60	0
0.05	3	150	45	30	0
0.1		150	33	22	0
0.5		150	15	10	0
1.0		150	0	0	0
0.05	6	150	36	24	3
0.1		150	24	6	0
0.5		150	3	16	1
1.0		150	15	2	0
0.05	12	150	6	6	0
0.1		150	0	4	0
0.5		150	0	0	0
1.0		150	0	0	0
0.05	24	150	3	2	0
0.1		150	0	0	0
0.5		150	0	0	0
1.0		150	0	0	0

종자의 발아율은 콜히친 농도가 높을수록 또한 침지시간이 길수록 저하되는 경향이었다. 특히, 12시간 및 24시간 침지처리의 경우, 0.1% 이상의 농도구에서 전혀 발아가 되지 않는 것으로 나타났다. 무처리구를 제외한 16개의 처리구에서 총 180개체가 발아되었으나, 6시간, 0.05% 및 0.5% 농도 처리구에서 각각 3개체와 1개체가 4배체(2n=4x=32, Fig. 26)로 유도되었던 반면, 그 외의 모든 처리구에서는 4배체를 확인할 수 없었다.



Dipolid(2n=2x=16)



Tetraploid(2n=4x=32)

Fig. 21. Chromosomes in diploid and tetraploid *Coconopsis lanceolata*

2배체 및 4배체 식물의 초기생육에 있어 지상부 특성을 비교한 결과는 Table 29와 같다.

Table 29. Comparison of growth characteristics between diploid and tetraploid *Codonopsis lanceolata*.

Ploidy	Plant height (cm)	Leaf		No. of leaves	Stomata size	
		length (cm)	width (cm)		length (μm)	width (μm)
Diploid	18.1b[z]	4.4a	3.0a	17.0a	15.1a	9.7a
Tetraploid	13.4a	4.8a	3.1a	8.0b	19.9b	13.0b

[z]Values followed by common letters in the same column are not significantly different (P=0.05, Duncan' s multiple range test).

초장은 2배체에서 18.1cm였던 것에 비해 4배체는 13.4cm로 4배체가 조금 작았다. 4배체 식물은 일반적으로 지상부 생육이 양호하다(Tan and Dunn, 1973; Esen et al., 1978)고 알려져 있으나, 본 실험에서는 그것과 다른 결과를 나타냈다. 또한 엽폭 및 엽장에서는 4배체와 2배체 간에 차이는 없었으나, 엽수는 4배체에서 반감했다(Table 34). 기공의 크기는 4배체가 2배체에 비해 약 1.3배 커져, 뽕나무(Park, 1994), lettuce(Eenink and Alvarez, 1975) 등 많은 식물에서 인정되고 있는 결과와 동일했다.

A B A B

Fig. 22. Comparison of morphology and root characteristics between diploid (A) and tetraploi (B) of *Codonopsis lanceolata*.

지하부의 형태적 특성은 Table 30과 같다.

주근의 생체중은 2배체에서 0.5g였었으나, 4배체에서는 2.2g으로 액 4배의 증가를 보였다. 또한 근장 및 근경도 4배체가 각각 8.5cm 및 8.0mm로 2배체보다 컸으며 유의성이 인정되었다. 분기근의 형성은 없었다(Fig. 22).

Table 30. Comparison of root characteristics between diploid and tetraploid *Codonopsis lanceolata*.

Ploidy	Fresh weight (g)	Root length (cm)	Root diameter (mm)	No. of lateral roots
Diploid	0.5a[z]	5.3a	4.1a	0
Tetraploid	2.2b	8.5b	8.3b	0

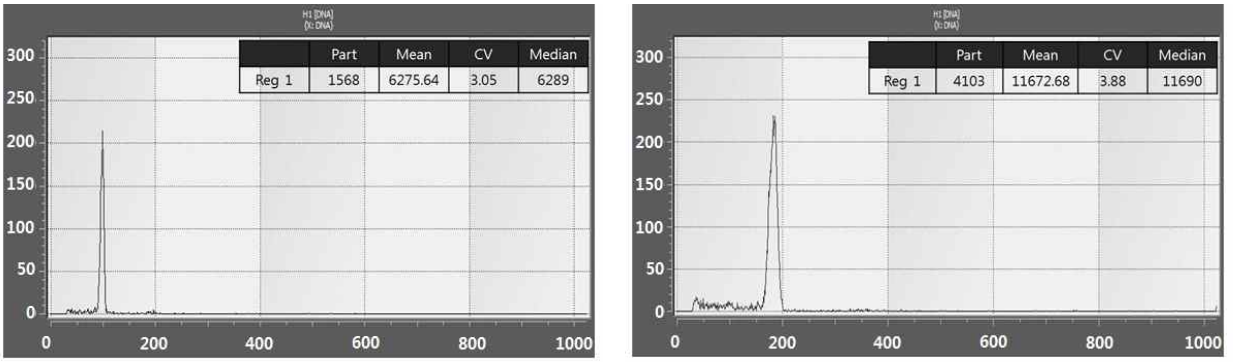
[z]Values followed by common letters in the same column are not significantly different (P=0.05, Duncan' s multiple range test).

기내배양 중인 더덕의 절의 절편체를 이용한 식물체 재생과 배수체의 유도에 미치는 콜히친의 침지처리 농도 및 시간의 영향은 Table 30과 같다.

Table 31. Effect of colchicine on chromosome doubling and plant regeneration of *Codonopsis lanceolata* explants

Conc. (%)	Soaking time(hrs)	No. of explants treated	No. of explants regenerated	% of regeneration	No. of tetraploids
0.01		45	19	42.2	0
0.05	1	45	16	35.6	0
0.1		45	11	24.4	0
0.01		45	13	28.9	1
0.05	6	45	17	37.8	5
0.1		45	10	22.2	3
0.01		45	18	40.0	2
0.05	12	45	15	33.3	2
0.1		45	7	15.6	1

식물체 재생율은 침지시간에 따른 일정한 경향은 볼 수 없었으나, 농도가 높아짐에 따라 재생율은 낮아지는 것으로 나타났다. 모든 처리구에서 총 126개체의 식물체가 재생되었으며, 6시간 이상의 모든 농도구에서 4배체(2n=4x=32) 식물을 얻을 수 있었다. 특히, 0.05% 6시간 침지처리한 경우, 5개체의 4배체 식물이 유도되어 재생 식물체 수 대비 약 29.4%의 높은 획득율을 보였다. 그러나 콜히친의 농도에 관계없이 1시간 침지처리한 경우 4배체의 식물은 유도되지 않았다. 또한 염색체의 배가작용이 있는 것으로 알려져 있는 oryzalin처리도 동시에 행하였으나, 모든 처리구에서 4배체를 얻을 수 없었다(자료 미제시).



Dipolid Tetraploid

Fig. 23. Comparison of DNA contents between diploid and tetraploid *Coconopsis lanceolata*. Flow histograms showing DNA measurements of nuclei from leaves

엽의 DNA 함량의 배가유무를 확인하기 위하여 Flow Cytometry를 이용, GAIN 값을 535로 고정시킨 후, 한 결과, G_1 phase의 DNA 함량 peak는 2배체는 98.7, 4배체는 182.4로, DNA 함량이 배가됨을 확인할 수 있었다(Fig. 23). Kim 등(2003)은 도라지의 경우, 4배체의 획득을 위하여 콜히친 0.01%와 0.05% 농도의 1시간과 12시간 침지처리가 적당하다고 하였으나, 본 실험의 결과에서는 모든 처리구에서 4배체가 유도되지 않은 것으로 나타났으며, 식물의 종에 따라 그 농도 및 침지시간의 정도에 큰 차이가 있을 것으로 생각되었다.

2배체 및 4배체 식물의 형태적 특성을 비교한 결과는 Table 32와 같다.

Table 32. Comparison of growth characteristics between vitro cultured diploid and tetraploid *Coconopsis lanceolata.*

Ploidy	Plant height (cm)	Stem diameter (mm)	Leaf length (cm)	Leaf width (cm)	No. of leaves	Root length (cm)
Diploid	10.4±0.6b[z]	0.9±0.2a	1.5±0.3a	1.3±0.3a	10.0±1.3a	5.5±1.1a
Tetraploid	7.3±0.4a	1.3±0.3b	2.4±0.2b	2.1±0.2b	12.0±1.0a	10.1±1.8b

[z]Values followed by common letters in the same column are not significantly different (P=0.05, Duncan' s multiple range test).

초장은 종자처리와 동일한 결과로 2배체가 10.4cm로 조금 컸으며 유의성이 인정되었다. 경경은 2배체에 비해 4배체가 두꺼워지는 것으로 나타났다. 엽장 및 엽폭은 4배체가 각각 2.4cm와 2.1cm로 2배체에 비해 유의하게 커지는 것을 볼 수 있었으나, 엽수는 배수성에 관계없이 비슷한 결과였다. 또한 엽색은 2배체에 비해 4배체의 식물에서 더욱 진한 녹색을 보였다. 근장 또한 4배체가 10.1cm로 2배체에 비해 길어졌으며, 굵어지는 것으로 나타났다(Fig. 26).

A B A B

Fig. 24. Comparison of morphologic characteristics between in vitro cultured diploid (A) and tetraploid (B) *Coconopsis lanceolata*.

이상의 결과에서 콜히친의 종자처리의 경우, 6시간, 0.05% 및 0.5% 농도 처리구에서 각각 3개체와 1개체의 4배체를 획득하여 종자 발아수 대비 2.2%의 낮은 유도율을 보였다. 그러나 기내배양에서 얻었던 배양체의 콜히친 처리는 종자처리에 비해 높은 유도율(11.1%)로 4배체를 유도할 수 있는 것으로 나타났다(Table 31). 이는 흰꿀풀(*Prunella vulgaris* for. *albiflora*)의 4배체 유도에 있어 콜히친의 종자처리에 비해 기내배양에서 얻은 절편체의 침지처리가 약 9.6배 정도 높은 4배체의 획득율을 가져온다(Kwon et al., 2015)는 보고와 유사한 결과였다.

따라서 더덕의 경우, 콜히친을 종자에 직접 처리하는 것보다 세포분열이 왕성한 기내배양의 절편체에 처리하는 것이 4배체 식물체의 유도에 효과적임을 알 수 있었으며, 더덕의 품종개량을 위한 4배체 식물체의 효율적인 획득을 위한 하나의 방법으로 이용될 수 있을 것으로 판단되었다.

나. 생물공학적 기법을 이용한 배수체 식물의 대량번식법 개발

(1) 연구방법

(가) 배지선발

기내에서 무균배양중인 2배체와 4배체 식물체의 절이 포함된 줄기 절편체(0.8cm)를 배양재료로 사용하였다(이하 절이라고 표기함). 기관분화에 적합한 배지선발을 위하여 MS 배지 구성물질의 적정농도(1/4, 1/2, 1, 2x) 실험은 sucrose 3%, pH 5.8로 조절한 후 agar 0.8%를 첨가하였으며, sucrose 실험(1, 3, 5, 7%)은 1/4MS배지를 기본으로 pH 5.8로 조절한 후 agar 0.8%를 첨가하였다. pH(3.8, 4.8, 5.8, 6.8, 7.8) 및 agar 농도실험(0.4, 0.6, 0.8, 1.0 1.2%)은 MS배지 구성물질 및 sucrose 농도 실험의 결과를 바탕으로, 2배체와 4배체 더덕의 줄기 절편을 각각 sucrose 5%와 7%를 첨가한 1/4MS배지를 기본배지로 하여 치상하였으며 6주간 배양하였다. 모든 실험은 petri dish당 6절편으로 하여, 완전 임의배치법 10반복으로 비교, 분석하였다. 배양조건은 25±1℃, 40μmol · m^{-2} · s^{-1}의 광으로 16시간 조명하였으며, 배양 6주후, 신초 및 부정근의 수와 길이 등을 조사하였다.

(나) 생장조절제 첨가

○ 단용처리

4배체 더덕의 엽절편과 절로부터의 기관분화를 왕성하게 유도할 수 있는 생장조절물질의 종류 및 농도를 알아보기 위하여 옥신류(IAA, IBA, NAA)와 사이토카이닌류(BA, kinetin, TDZ)를 각각 0, 0.1, 0.5, 1, 5, 10 mg/L 농도로 첨가하여 배양하였다.

기본배지는 1/4MS배지로, sucrose는 7%, agar 0.6%를 첨가하였으며, pH는 5.8로 조절하였다. 배양조건은 25±1℃, 40μmol · m^{-2} · s^{-1}의 광으로 16시간 조명하였으며, 6주간 배양한 후 신초 및 부정근의 수와 길이 등을 조사하였다.

○ 혼용처리

단용실험 결과 기관형성에 좋은 결과를 보인 시토키닌과 옥신을 선발하여 TDZ 0.5 mg/L와 NAA 0.1, 0.5, 1 mg/L, IAA 0.1, 0.5, 1 mg/L, IBA 0.5, 1, 5 mg/L를 혼용하고, IBA 5 mg/L와 kinetin 0.1, 0.5, 1 mg/L, BA 0.1, 0.5, 1 mg/L, TDZ 0.1, 0.5, 1 mg/L를 혼용첨가한 배지에 배양하였다.

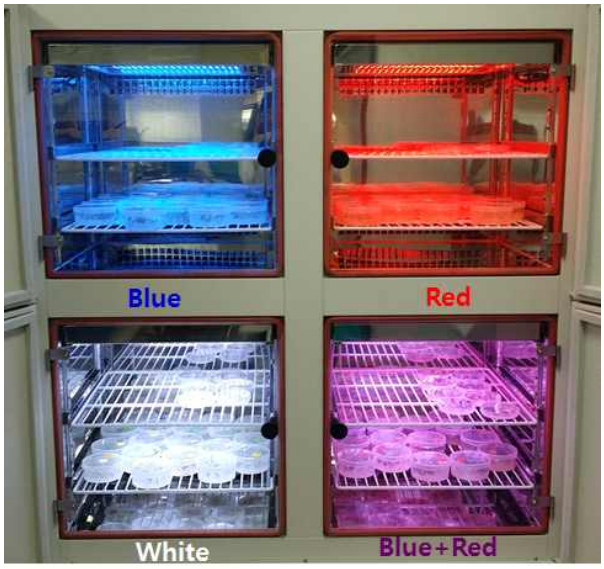
기본배지는 1/4MS, sucrose 7%, pH 5.8로 조절하였으며, agar 0.6%를 첨가하였다. 배양조건은 25±1℃, 40μmol · m^{-2} · s^{-1}의 광으로 16시간 조명하였으며, 6주간 배양한 후 신초 및 부정근의 수와 길이 등을 조사하였다.

(다) 환경요인

배양온도에 따른 생장효과를 알아보기 위하여 4배체 더덕의 절을 배양재료로 각각 15, 20, 25, 30℃에서 40μmol · m^{-2} · s^{-1}의 광으로 16시간 조명하였으며, 6주간 배양한 후 신초 및 부정근의 수와 길이 등을 조사하였다.

(라) LED 광원

더덕의 기내배양 시 신초 및 부정근 형성에 미치는 LED 광원 및 광도의 영향을 조사하기 위해 형광등, 청색, 적색, 흰색 및 혼합(blue+red) LED의 5가지 서로 다른 광원의 50, 100 μmol · m^{-2} · s^{-1}의 광도하에서 절을 배양하였다.



(2) 연구결과

(가) 배지선발

① 적정배지구성물질 농도

4배체 더덕의 신초 형성은 무기염의 농도가 낮을수록 증가하는 경향으로 1/4MS배지에서 2.3개로 높은 형성을 나타냈으며 무기염의 농도가 가장 높았던 2MS배지에서 0.8개로 저조한 결과를 나타냈다. 신초의 생장도 신초의 형성과 같은 경향을 보여 1/4MS배지에서 3.9cm로 가장 왕성한 생장을 보였다. 부정근의 형성 및 생장 또한 무기염의 농도가 낮을수록 증가되는 경향으로, 특히 1/4MS배지의 경우 4.2개, 5.9cm로 가장 높은 부정근의 형성 및 생장을 나타냈다.

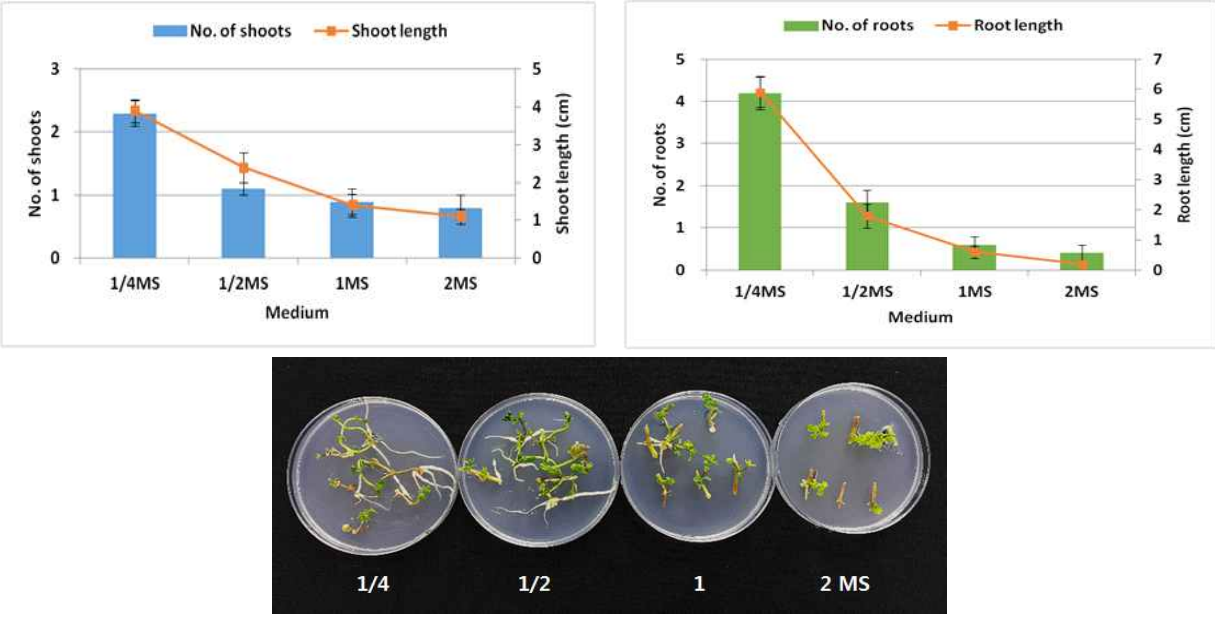


Fig. 25. Effects of culture media on shoot and adventitious root formation from node of tetraploid *Codonopsis lanceolata* for 6 weeks in culture.

*Wasabia japonica*의 경우, 신초의 증식은 무기염의 농도에 비례하며(Park *et al.*, 2007), 저농도의 무기염은 *Prunella vulgaris* for. a*lbiflora*의 경우 부정근 형성(Kwon *et al.*, 2012), *Hypericum patulum*(Hwang et al., 2009)은 부정근의 형성 및 생장에 효과적인 것으로 알려져 있다. 본 실험의 결과, 2배체와 4배체 더덕의 신초의 생장과 부정근의 형성 및 생장은 무기물의 농도에 따라 그 효과가 다른 것으로 나타나, 동일 식물이라도 배수성에 따라 각 기관분화 및 생장에 미치는 MS 배지내의 무기염 농도에 대한 요구도는 차이가 있는 것으로 생각되었다.

② Sucrose 농도

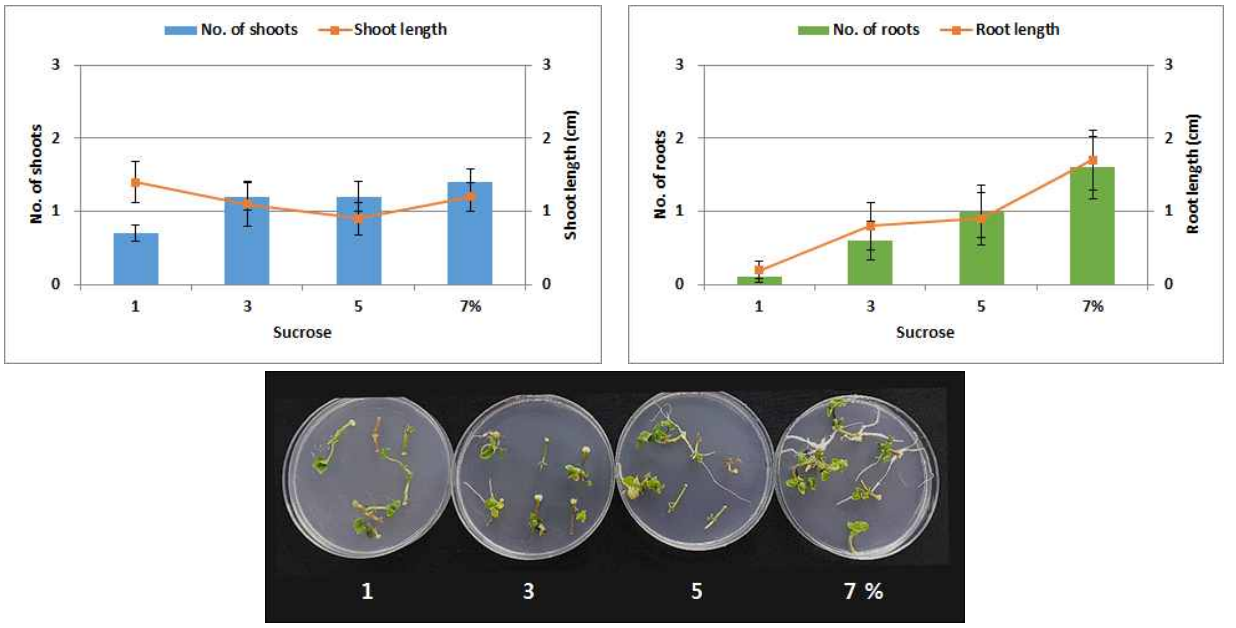


Fig. 26. Effects of sucrose concentration on shoot and adventitious root formation from node of tetraploid *Codonopsis lanceolata* for 6 weeks in culture.

4배체 더덕의 경우, 신초의 형성은 농도가 높아질수록 조금 증가되는 것으로 나타던 반면 신초의 생장은 농도가 낮을수록 왕성하여 1%농도에서 1.4cm로 양호한 결과를 보였다. 부정근의 형성은 sucrose 농도가 높을수록 증가되는 것으로 나타났으며, 특히 7% 농도구에서 양호한 부정근의 형성을 보였다. 부정근의 생장 또한 형성의 결과와 같은 경향을 보여 7%의 농도구에서 1.7cm로 높은 생장을 나타냈다.

③ pH

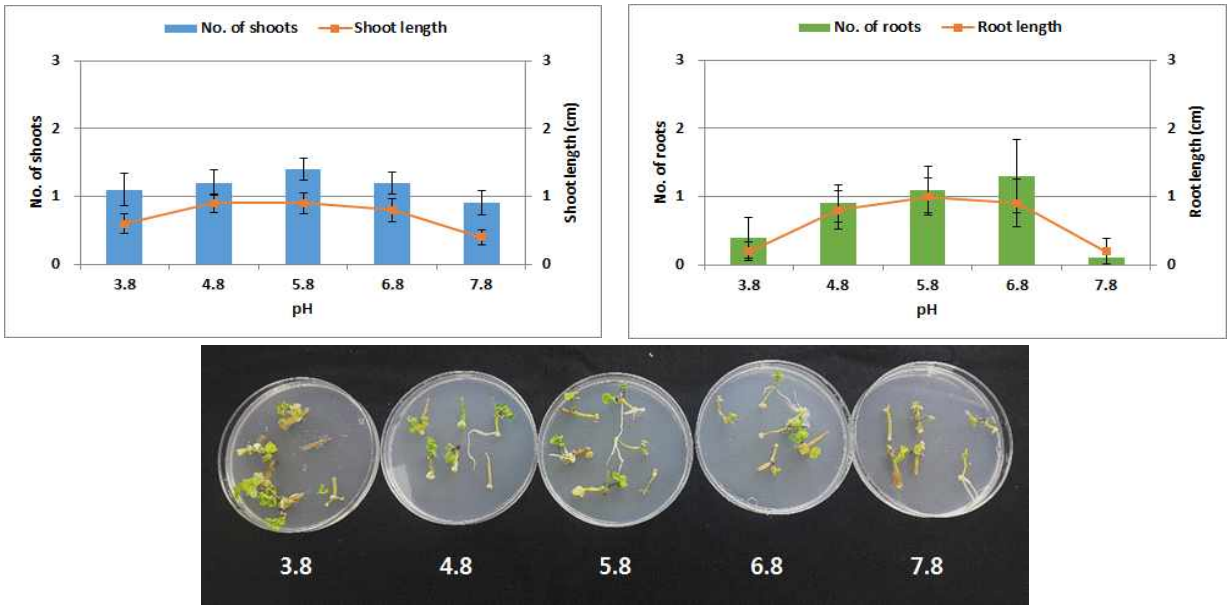


Fig. 27. Effects of pH on shoot and adventitious root formation from node of tetraploid *Codonopsis lanceolata* for 6 weeks in culture.

4배체 더덕의 신초의 형성은 pH5.8에서 1.4개로 양호한 결과를 나타냈으며 생장도 pH4.8~5.8에서 조금 좋았다. 부정근의 형성은 pH가 높을수록 양호하여 pH6.8에서 1.3개로 좋았으며 생장은 pH 4.8~6.8에서 0.8~1.0cm로 다른 처리구에 비해 양호한 생장을 보였다.

④ Agar 농도

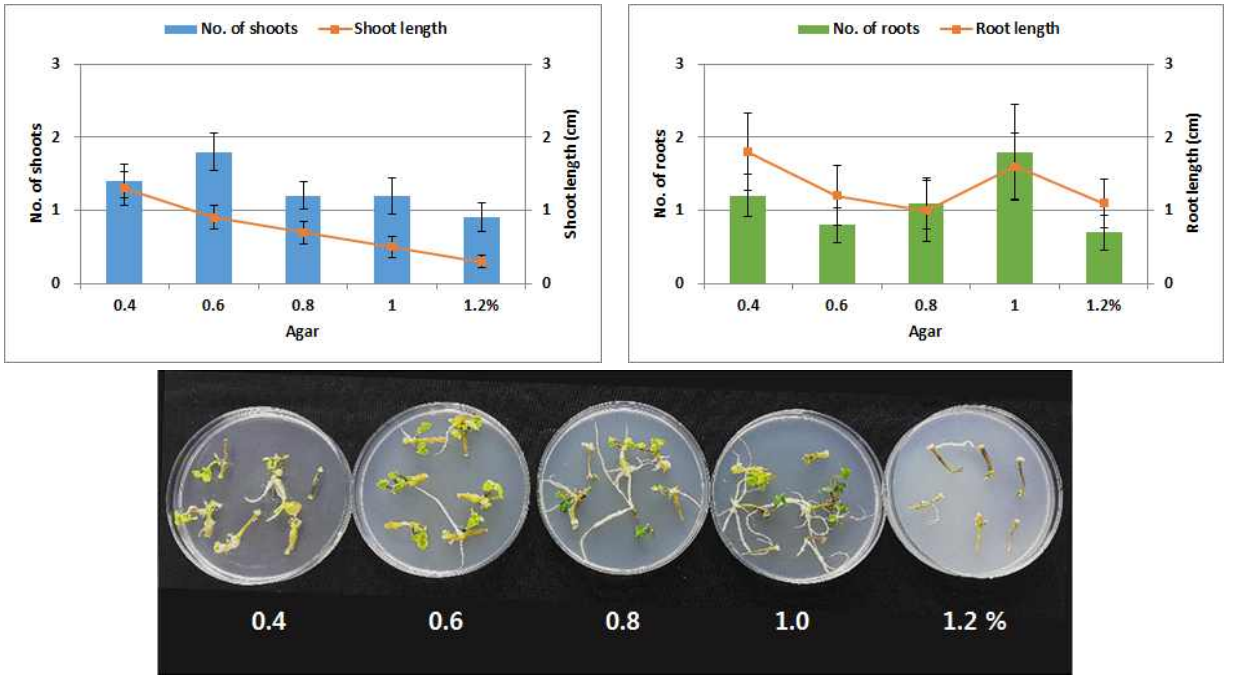


Fig. 28. Effects of agar concentration on shoot and adventitious root formation from node of tetraploid *Codonopsis lanceolata* for 6 weeks in culture.

4배체 더덕의 신초형성은 농도가 높을수록 조금씩 억제되는 것으로 나타났다. 신초의 생장 또한 유사한 결과를 보였으며, 0.4% 농도구에서 1.3cm로 양호한 신초의 생장을 나타냈다. 부정근의 형성은 농도가 높아짐에 따라 증가되는 경향을 보였으며, 1% 농도구에서 1.8개로 가장 높은 결과를 나타냈다. 부정근의 생장은 0.4% 농도구에서 1.8cm로, 다른 농도구에 비해 조금 높은 결과를 보였다.

⑤ 활성탄 농도

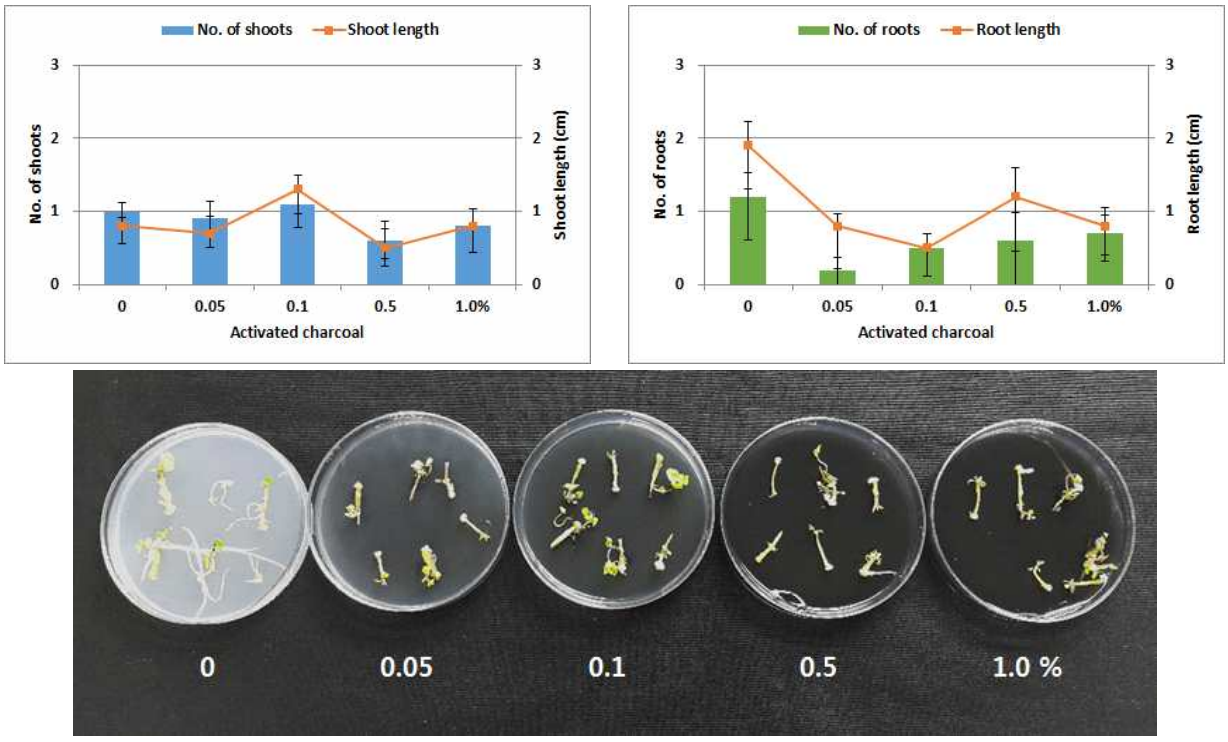


Fig. 29. Effects of activated charcoal concentration on shoot and adventitious root formation from node of *Codonopsis lanceolata* for 6 weeks in culture.

4배체 더덕의 신초의 형성은 처리구간 큰 차이가 없었으며 생장은 0.1%에서 조금 좋았다. 부정근은 활성탄의 첨가가 억제적으로 작용하여 무첨가구에서 가장 많이 형성되었으며 생장 또한 무첨가 배지에서 왕성한 생장을 보였다.

(나) 생장조절제 첨가

① 단용처리

기내 배양에 의한 4배체 더덕의 대량번식에 미치는 생장조절제의 효과를 알아보고자 엽절편($0.8cm^2$)과 절(0.8cm)을 배양재료로 사용하여 배양하였다.

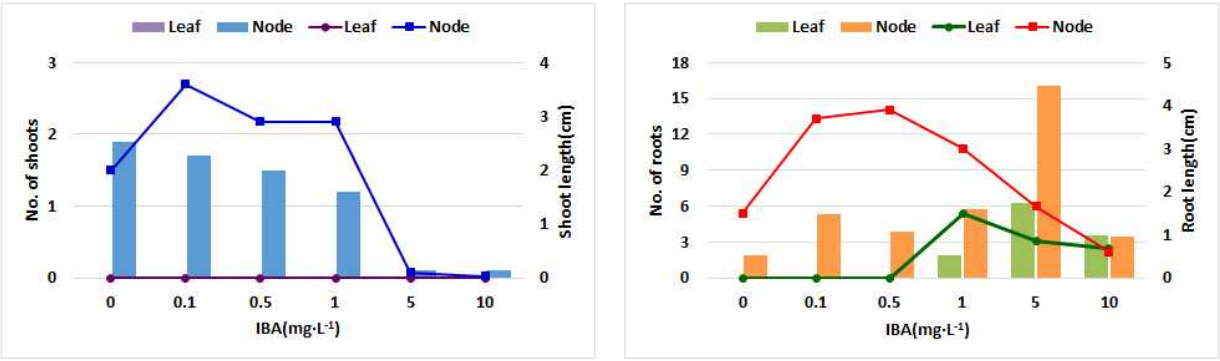


Fig. 30. Effects of IBA on shoot and adventitious root formation from leaf and node of tetraploid *Codonopsis lanceolata* for 6 weeks in culture.

생장조절제인 IBA, IAA, NAA, BA, kinetin 및 TDZ를 선택하여 첨가해 배양하였을 경우, IBA는 엽절편을 배양재료로 농도가 높을수록 양호하였으며 5 mg · L^{-1} 첨가구에서 부정근의 형성이 양호하였으며 절의 경우에는 신초의 형성은 첨가구보다 무첨가 배지에서 더 높았으나 생장은 IBA 0.1 mg · L^{-1} 에서 가장 좋았다. Callus의 경우 IBA의 농도가 높아질수록 노란색의 callus가 많이 유기되는 경향이었다.

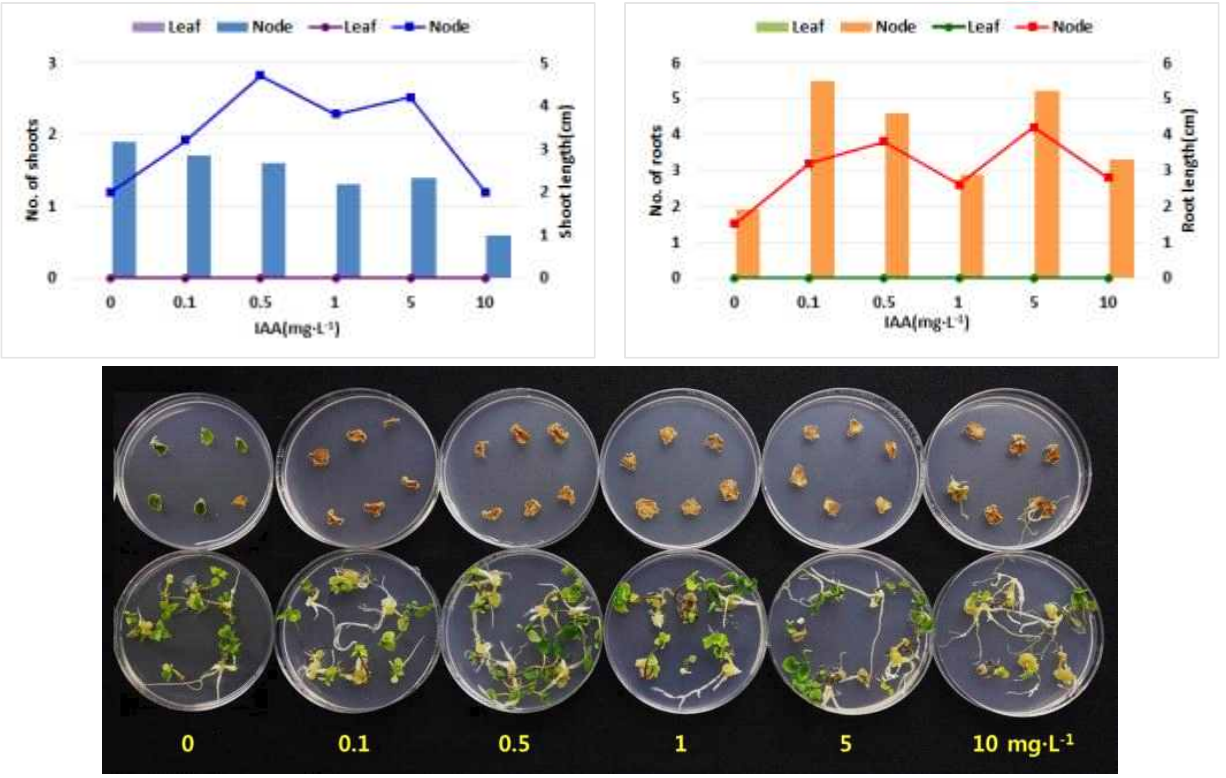


Fig. 31. Effects of IAA on shoot and adventitious root formation from leaf and node of tetraploid *Codonopsis lanceolata* for 6 weeks in culture.

IAA의 경우 절을 배양재료로 신초의 형성은 무첨가구에서 양호하였으며 생장은 0.5 mg · L^{-1}

첨가배지에서 좋은 결과를 나타내었다. 부정근의 형성은 IAA 첨가에 의해 촉진되는 경향이었으며 특히 IAA 0.1 mg · L^{-1} 배지에서 가장 많이 형성되었고 생장은 5 mg · L^{-1} 배지에서 왕성하였다.

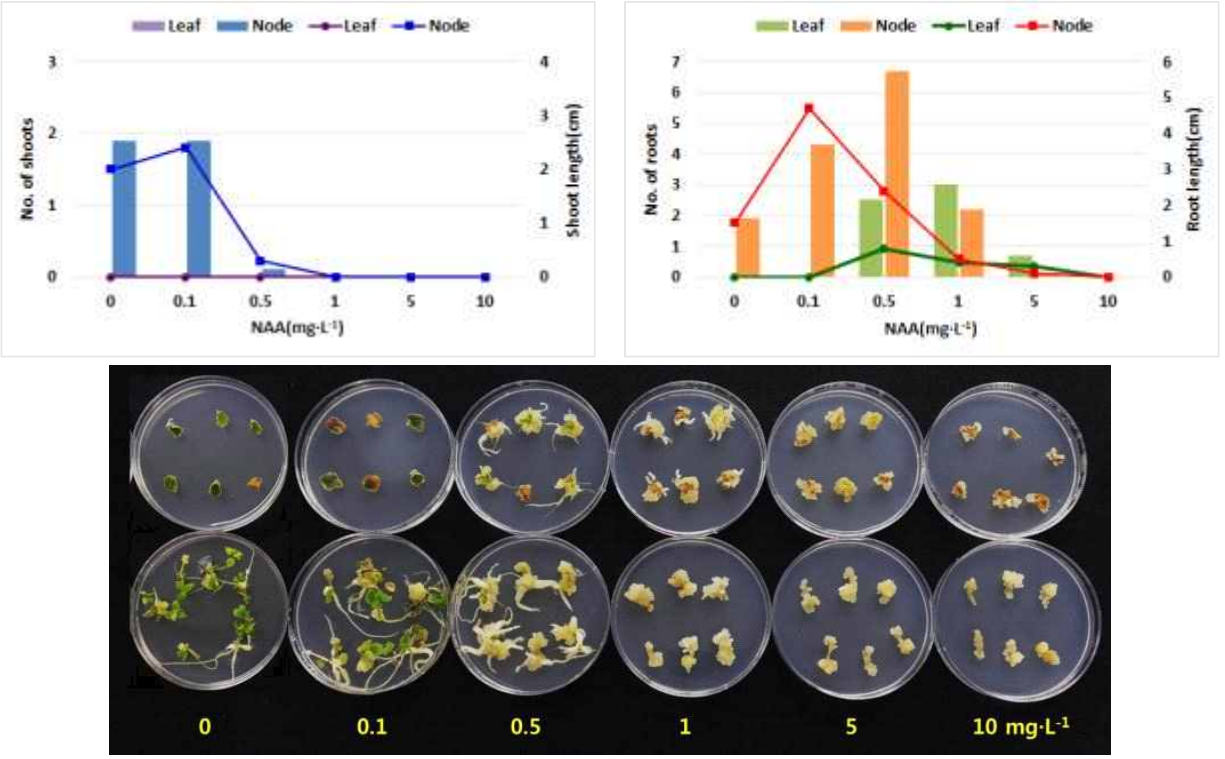
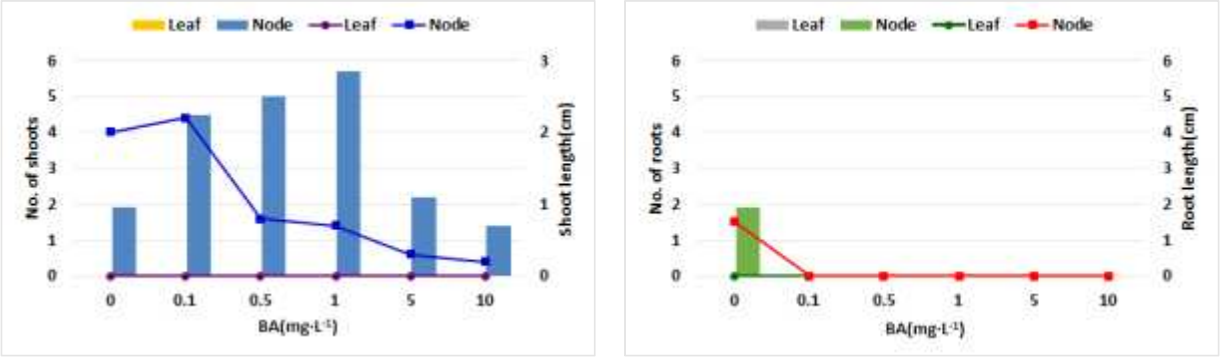


Fig. 32. Effects of NAA on shoot and adventitious root formation from leaf and node of tetraploid *Codonopsis lanceolata* for 6 weeks in culture.

NAA는 4배체 더덕의 신초 및 생장에 억제적으로 작용하였으며 많은 callus가 유기됨을 알 수 있었다. 신초의 경우 절을 배양재료로 NAA 0.1 mg · L^{-1} 첨가를 제외한 나머지 농도 처리구에서는 극히 미미한 형성을 보이거나 전혀 관찰되지 않았다. 부정근은 NAA 0.5 mg · L^{-1} 배지에서 가장 많이 형성된 반면 생장은 0.1 mg · L^{-1} 배지에서 양호한 반응을 보였다.



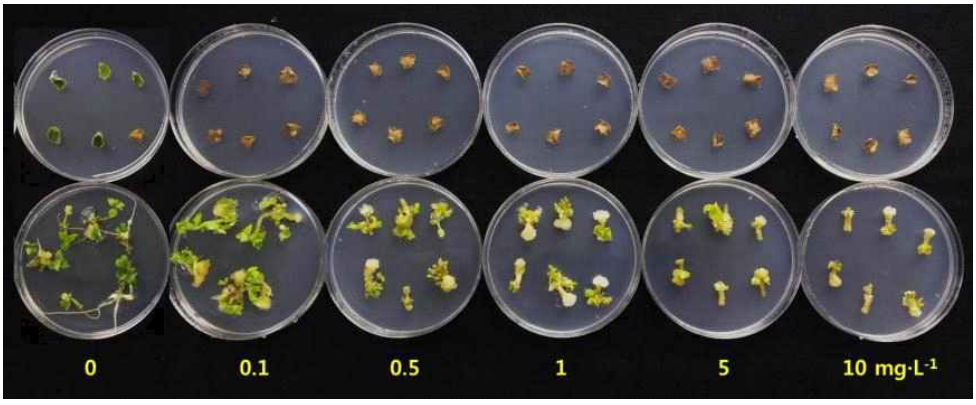


Fig. 33. Effects of BA on shoot and adventitious root formation from leaf and node of tetraploid *Codonopsis lanceolata* for 6 weeks in culture.

BA는 엽편을 재료로한 경우 반응이 나타나지 않았으며 절의 경우에는 BA의 농도가 증가할수록 많은 신초의 형성을 보여 1.0 mg · L^{-1} 첨가구에서 가장 많은 신초가 형성된 반면 0.1 mg · L^{-1} 배지에서 가장 좋은 생장을 나타냈다. 부정근은 무첨가구를 제외한 나머지 BA첨가구에서는 전혀 형성되지 않았다.

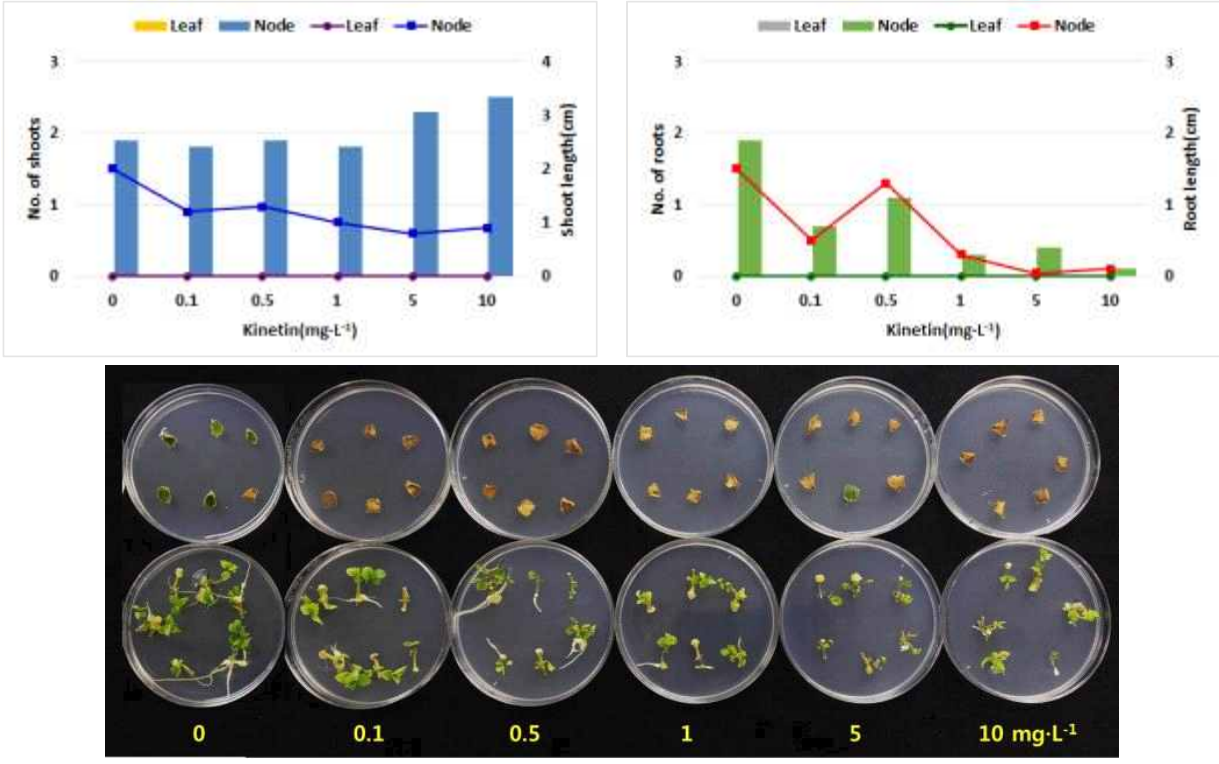


Fig. 34. Effects of kinetin on shoot and adventitious root formation from leaf and node of tetraploid *Codonopsis lanceolata* for 6 weeks in culture.

Kinetin은 절을 배양재료로 한 경우에만 신초 및 부정근의 형성을 나타내었으며 신초는 10

mg・L^{-1} 배지에서 가장 많은 형성을 보인 반면 생장은 가장 저조하였다. 부정근은 무첨구에서 양호한 형성 및 생장을 보였다.

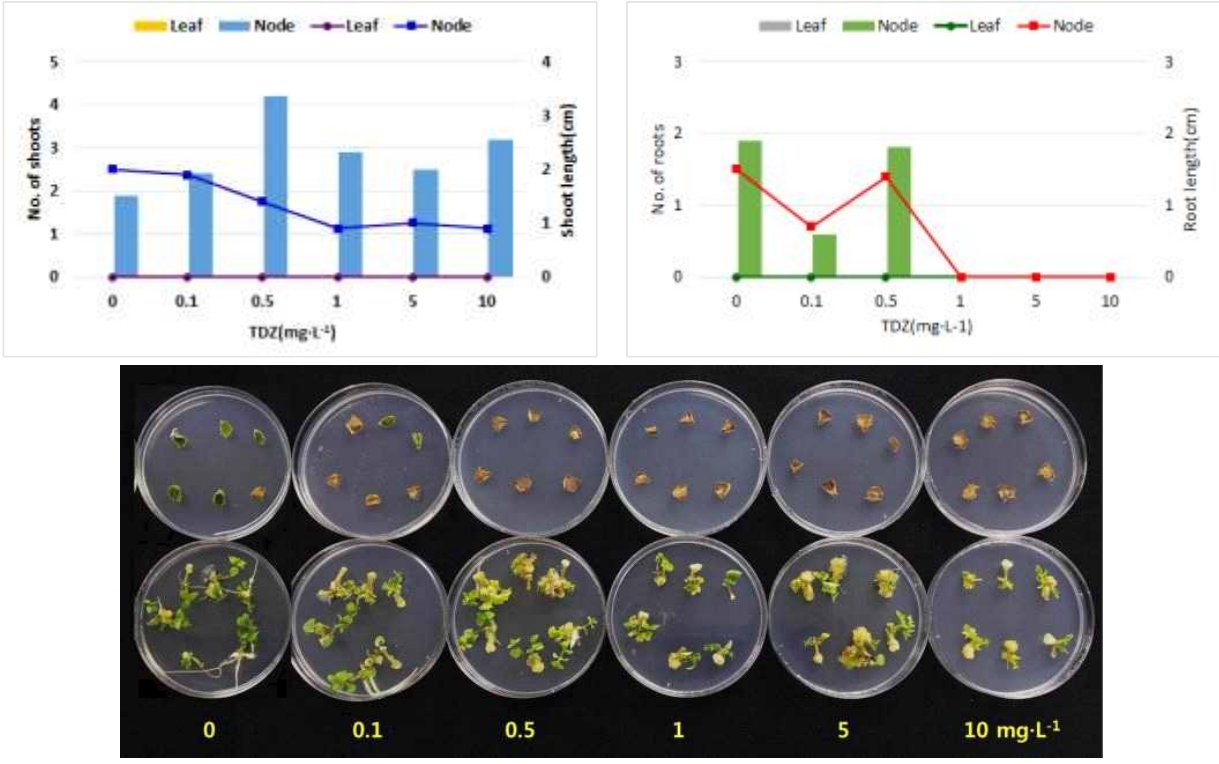
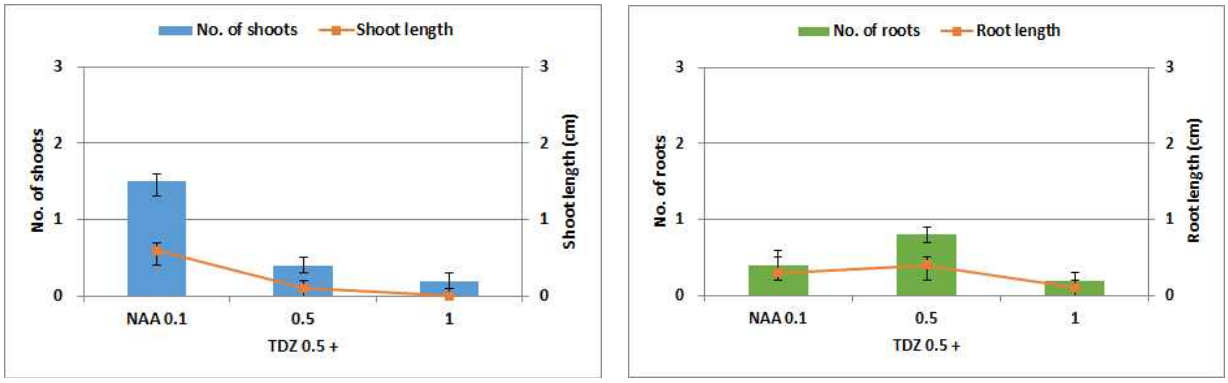


Fig. 35. Effects of TDZ on shoot and adventitious root formation from leaf and node of tetraploid *Codonopsis lanceolata* for 6 weeks in culture.

TDZ의 경우 신초의 형성은 0.5 mg・L^{-1} 첨배지에서 가장 많이 형성되었으나 비정상적인 신초의 모습을 나타냈다. 신초의 생장은 무첨가배지에서 양호하였다. 부정근은 무첨가구와 0.5 mg・L^{-1} 첨가구에서 양호한 형성 및 생장을 나타냈다.

② 혼용처리

TDZ 0.5 mg/L와 NAA(0.1, 0.5, 1 mg/L), IAA(0.1, 0.5, 1 mg/L), IBA(0.5, 1, 5 mg/L)를 혼용첨가하여 배양한 결과는 다음과 같다.



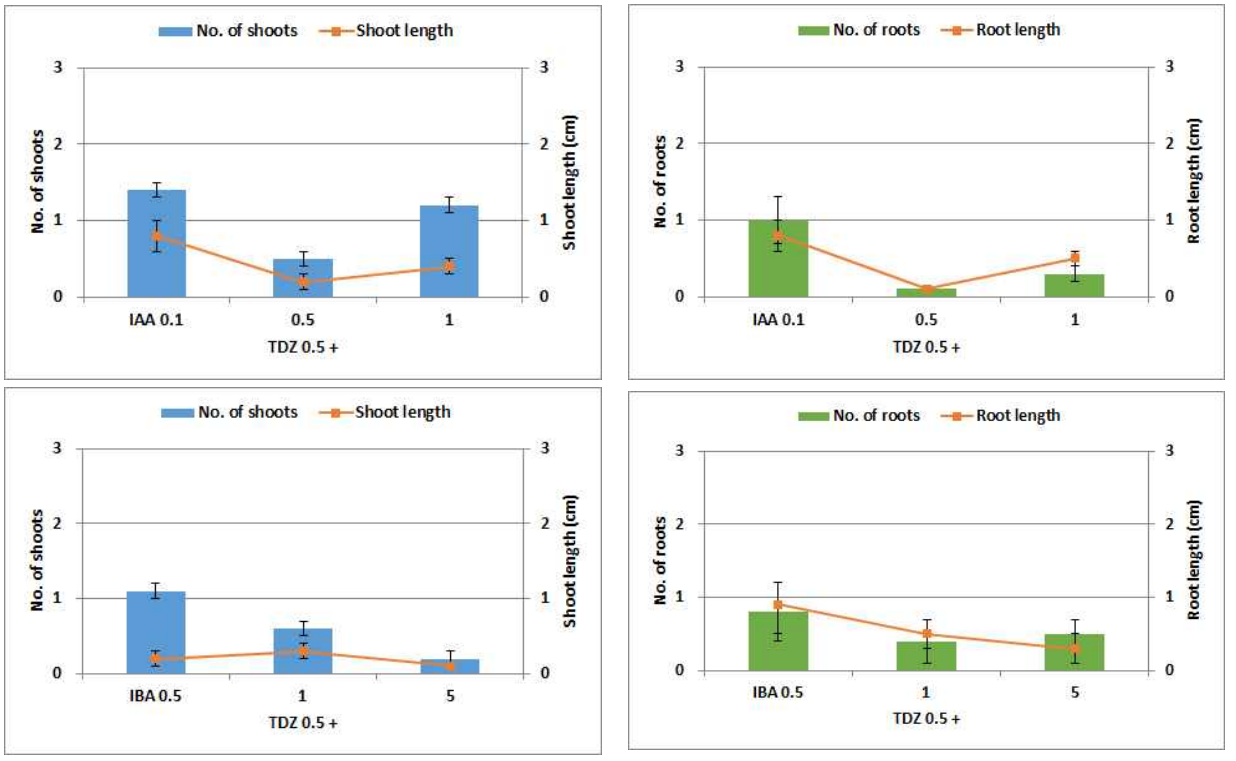


Fig. 36. Effects of TDZ, NAA, IAA and IBA on shoot and adventitious root formation from node of *Codonopsis lanceolata* for 6 weeks in culture.

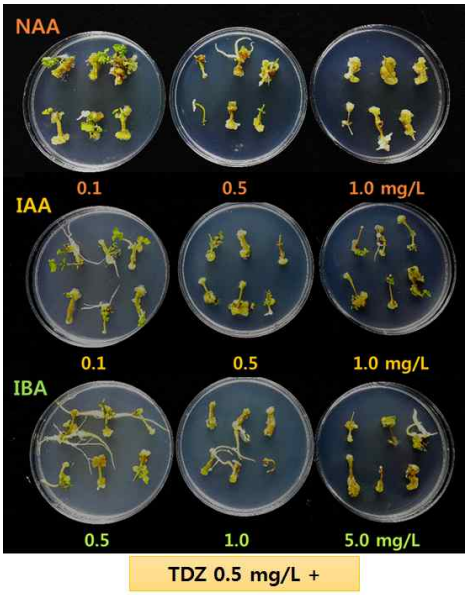


Fig. 37. Effects of TDZ and NAA, IAA, IBA on shoot and adventitious root formation from node of *Codonopsis lanceolata* for 6 weeks in culture.

4배체 더덕에 있어 신초의 경우 TDZ 0.5 mg/L와 NAA 0.1 mg/L 혼용 첨가구에서 1.5개로 양호한 형성을 보였으며 옥신의 농도가 증가할수록 저조한 결과를 보였다. 부정근은 TDZ 0.5 mg/L와 IAA 0.1 mg/L 혼용, TDZ 0.5 mg/L와 IBA 0.1 mg/L 혼용배지에서 각각 1, 0.8개로 다른 처리구에 비해 양호한 결과를 보였으며 생장도 부정근 형성의 결과와 유사하였다.

IBA 5 mg/L와 kinetin(0.1, 0.5, 1 mg/L), BA(0.1, 0.5, 1 mg/L), TDZ(0.1, 0.5, 1 mg/L)를 혼용첨가하여 배양한 결과는 다음과 같다.

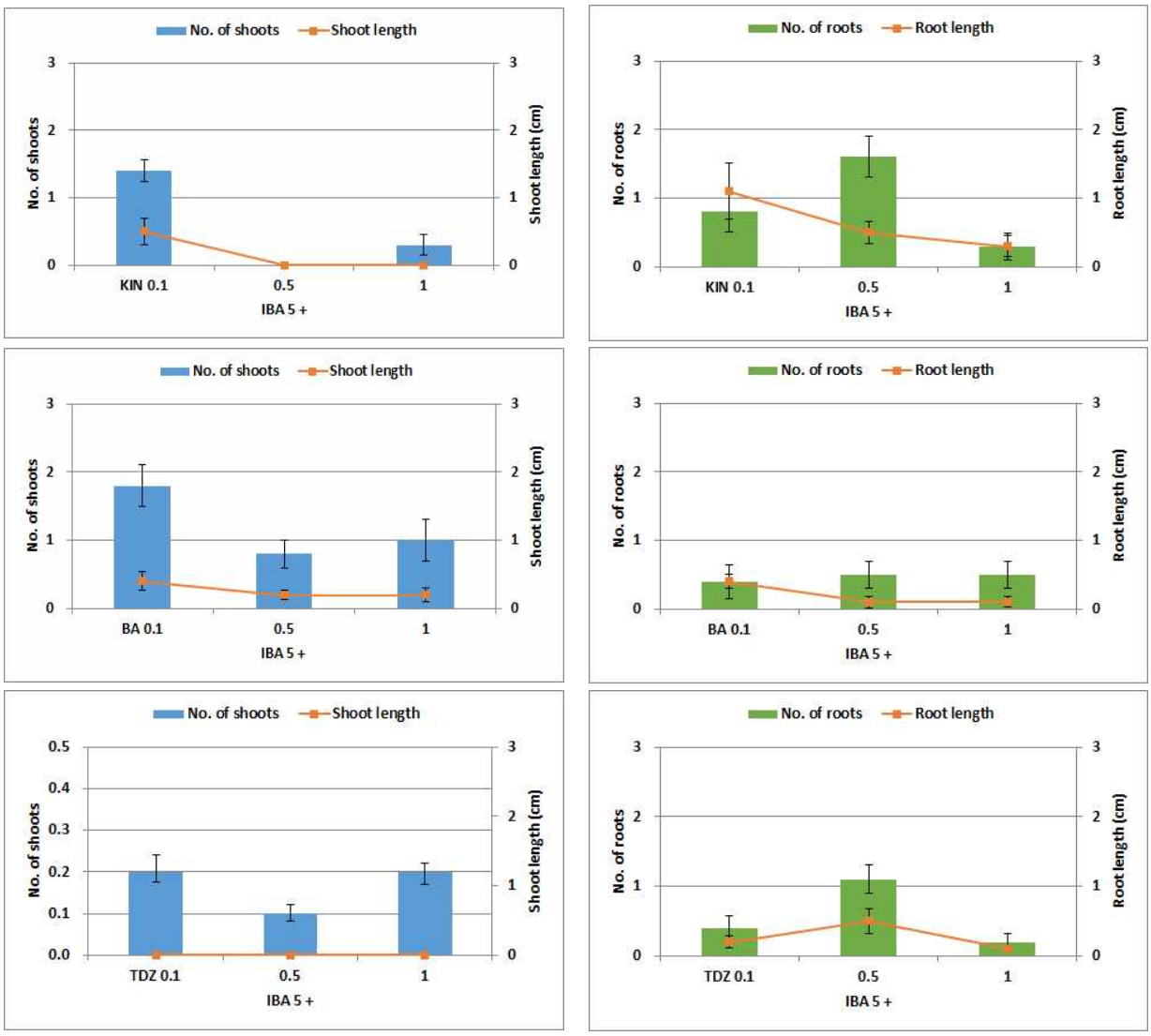


Fig. 38. Effects of IBA, kinetin, BA and TDZ on shoot and adventitious root formation from node of *Codonopsis lanceolata* for 6 weeks in culture.

신초형성의 경우 대부분의 처리구에서 저조한 경향으로 IBA 5mg/L와 BA 0.1 mg/L 혼용구에서 1.8개의 양호한 형성을 보인 반면 TDZ이 첨가된 배지는 01~0.2개로 미미하였다. 부정근은 시토키닌의 농도가 0.5 mg/L로 첨가된 배지에서 양호한 결과를 보였는데 IBA 5 mg/L와 kinetin 0.5 mg/L 혼용배지에서 1.6개로 다른 처리구에 비해 높은 형성을 보였다.

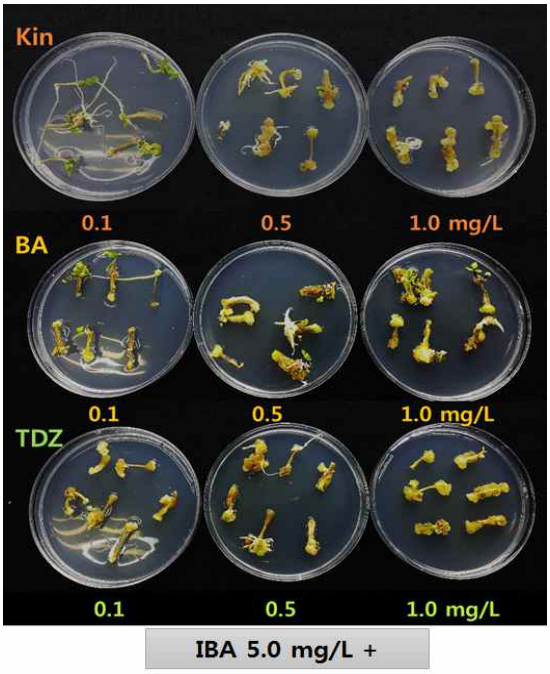


Fig. 39. Effects of IBA, kinetin, BA and TDZ on shoot and adventitious root formation from node of *Codonopsis lanceolata* for 6 weeks in culture.

(다) 환경요인

배양온도에 따른 생장효과를 알아보기 위하여 4배체 더덕의 절을 배양재료로 각각 15, 20, 25, 30℃에서 배양한 결과 신초의 경우 20, 25℃에서 1.7~1.8개의 양호한 형성을 보였으며 25℃에서 3.5cm로 높은 생장을 보였다. 부정근은 20℃에서 8.7개의 가장 많은 형성을 보인 반면 생장은 25℃에서 4.7cm로 양호하였다.

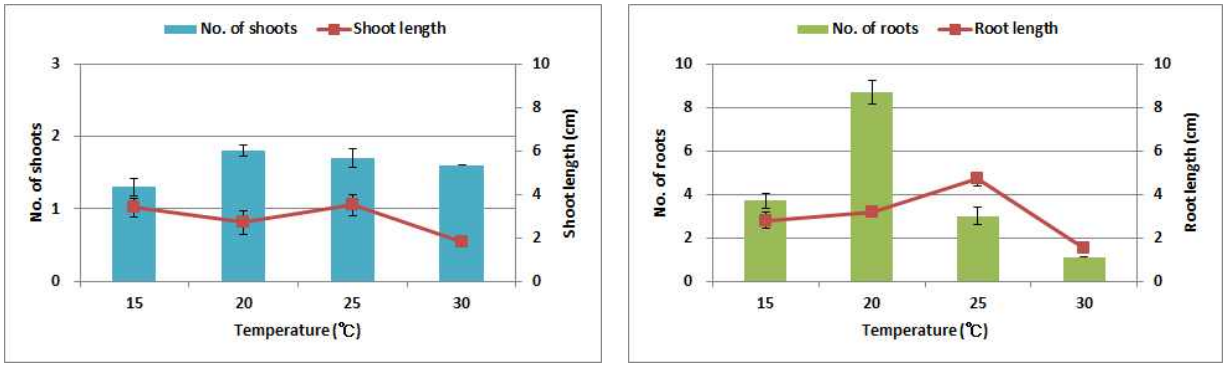
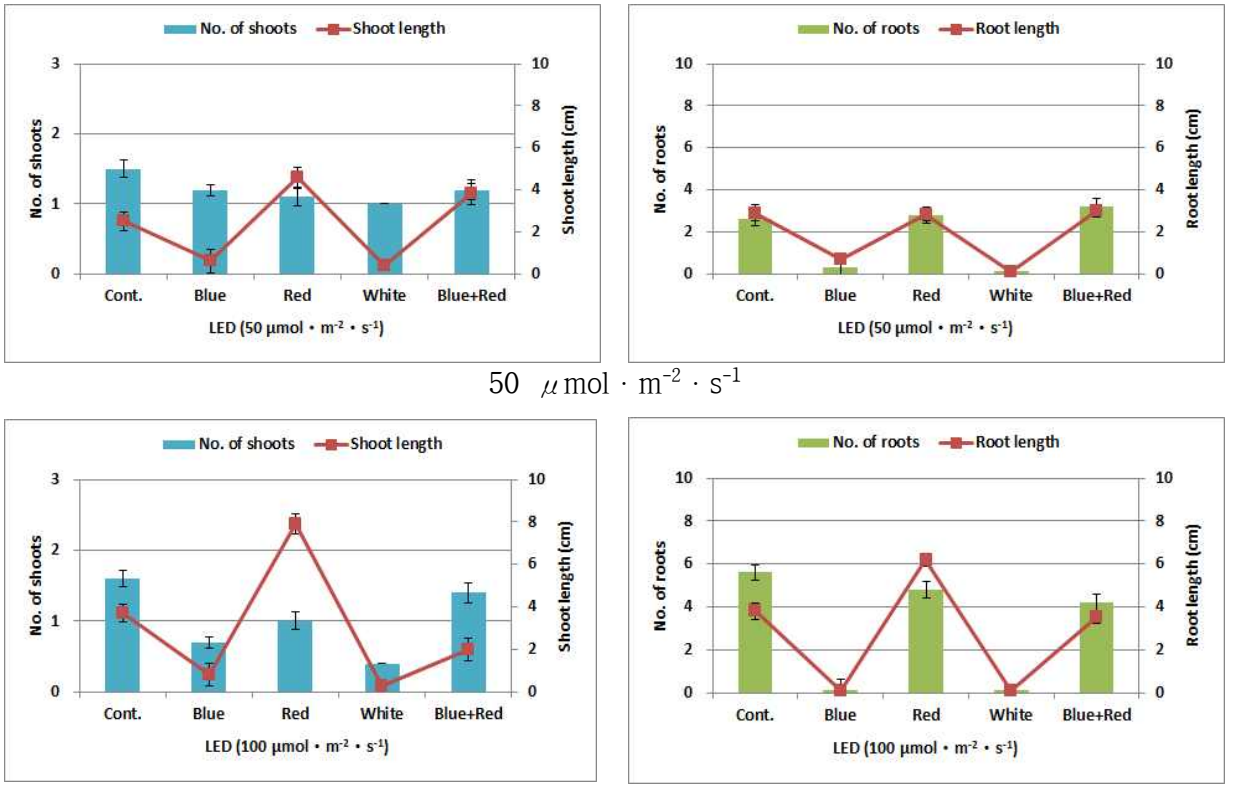


Fig. 40. Effects of culture temperature on shoot and adventitious root formation from node of tetraploid *Codonopsis lanceolata* for 8 weeks in culture.

(라) LED 광원

LED 광원에 따른 4배체 더덕의 생장에 미치는 영향을 조사한 결과 50 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$의 광도에서 신초의 형성은 형광등에서 1.5개로 양호하였으며, 생장은 red와 blue+red 혼합광에서 각각 4.6cm와 3.8cm로 좋았다. 100 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$의 광도의 경우 blue와 white 처리구에서 50 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$보다 더 저조한 신초의 형성을 보여 blue와 white LED는 오히려 4배체 더덕의

신초의 형성 및 생장에 억제적 영향을 주는 광원으로 생각되었다. 부정근의 경우 형성은 형광등에서 5.6개로 양호한 결과로 광도가 높을수록 증가하는 경향을 보였다. 부정근의 생장은 red 처리구에서 6.2cm의 왕성한 생장이 관찰되었고 광도가 높을수록 좋았다. 미미한 부정근 형성을 나타낸 blue나 white는 부정근 형성 및 생장에는 적합하지 않은 광원으로 판단되었다.



50 μmol · m^{-2} · s^{-1}

100 μmol · m^{-2} · s^{-1}

Fig. 41. Effects of LED on shoot and adventitious root formation from node of tetraploid *Codonopsis lanceolata* for 8 weeks in culture.

다. N, P, K의 시비처리가 더덕의 생육에 미치는 영향

(1) 연구방법

(가) 시비조건 및 토양분석

제주에서 수확한 1년생 더덕의 뿌리(4～8g)를 공시재료로, 우송정보대학 부속실습림의 토양 4kg을 충진한 1/2000a wagner pot에 1주씩 식재하여 재배하였다. 토양분석은 표토를 채취하여 음건한 후, pH는 이온전극법, 유기물은 Tyurin법, 유효인산은 Lancaster법 및 치환성염류는 1N-NH4OAc법으로 측정하였다. 시비조건은 pot당 질소:인산:칼리=6g:7g:3g을 기준으로, 무비료구(T0), 무질소구(T1), 무인산구(T2), 무칼리구(T3) 및 질소, 인산, 칼리의 모두를 시비한 구(완전구, T4)로 설정하였으며, 각 처리구당 20반복으로 하였다. 시험기간 중의 온도와 습도는 지상 1m의 높이에서 자동기록계(온도: TR-71, 습도:TR-72, Ondotori, Japan)로 매일 30분 동안 자동기록하여 조사한 결과를 평균하였다(Fig. 44). 2015년 9월초, 초장, 엽의 특성, 분지수 및 절간장 등의 지상부의 생육조사를 실시하였으며, 9월말, 수확하여 뿌리의 생체중, 근장, 근경 및 분

기근 등의 수량을 조사하였다. 기타 재배법은 농촌진흥청 산채류 표준재배법에 준하여 관리하였다.

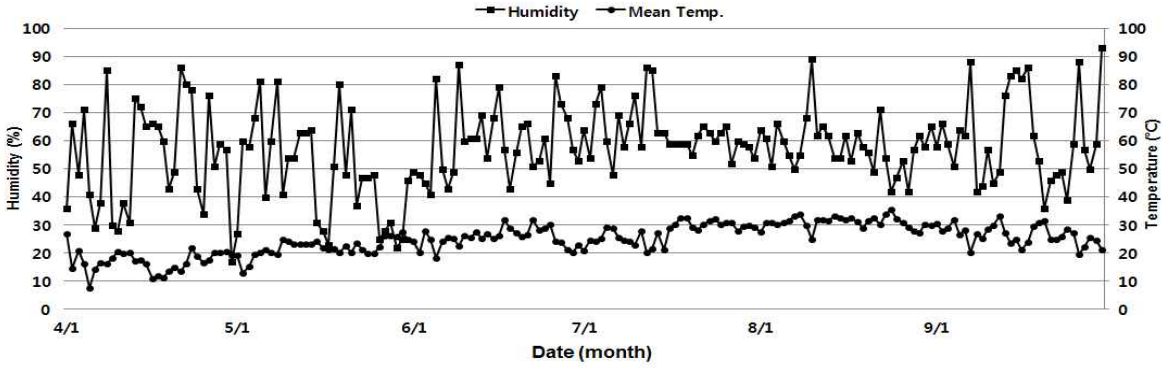


Fig. 42. Seasonal change in mean air temperature and humidity during experimental period.

(나) 무기성분 분석

시료를 600° C로 12시간 회화하고 습식분해법(Woo & Ryoo, 1983)으로 분해하여 탈이온 증류수로 정량하고 검액하였다. 마쇄한 더덕 시료 500 mg에 진한 질산 8 ml를 가하여 처음에는 낮은 온도로 가열하고 점차 고온으로 가열하면서 분해하였다. 분해액이 백색 투명하게 되면 냉각시키고 분해액에 증류수를 가하고 100 ml로 정량한 후 여과하여 여액을 분석시료로 하였다. 각 무기성분의 정량은 유도결합플라스마 분광광도기(ICP, Inductively Coupled Plasma, 3300DV, PerkinElmer Optima, USA)를 이용하여 분석하였다, 분석조건은 다음과 같다. 가스유속은 plasma 15 l/min, auxiliary 0.5 l/min, nebulizer 0.8 l/min이였으며, RF power 1,300 watts, 유속 1.0 ml/min, speed 18.48 rpm, sample flow rate 1.0 ml/min, sample flush time 30sec, sample flush rate 4.0 ml/min, delay time 30sec이었다.

(다) 통계분석

통계분석은 SAS 프로그램(SAS, 9.2, Institute Inc, USA)을 이용하여 Duncan’s multiple range test(p=0.05)로 분석하였다.

(2) 연구결과

(가) N, P, K의 시비처리가 지상부 생육에 미치는 영향

본 연구에 사용했던 토양의 이화학적 성질은 Table 33과 같다. 공시토양의 pH는 5.7로 산성이었으며, 유기물의 함량은 1.5%, 유효인산은 125 mg・kg이었다. 치환성 Ca: K: Mg: Na=3.78: 1.26: 0.23: 0.27로 Mg이 조금 결핍된 상태였다.

Table 33. Chemical properties of soil used in the experiment.

	pH	OM (%)	CEC ($cmol^+$・kg)	P_2O_5 (mg・kg)	Ex. cation ($cmol^+$・kg)			
					Ca	K	Mg	Na
Soil	5.7	1.7	12.4	125	3.78	1.26	0.23	0.27

시비량의 차이에 따른 더덕의 지상부 생육을 조사한 결과는 Table 34와 같다.

초장은 무비료구(대조구, T0)에 비해 모든 시비처리구에서 양호한 결과를 보여 유의성이 인정되었으며, 특히 완전구(T4)에서 266.8cm로 가장 높은 것으로 나타났다. 엽의 생장에 있어 엽폭은 무질소구(T1)와 완전구(T4)에서 각각 4.9cm, 4.8cm로 유의성이 인정되었던 반면, 엽장은 T4구에서 8.9cm로 가장 길었으며, 그 외의 시비처리구는 7.2~8.2cm의 범위로 큰 차가 없었다. 경경은 시비에 의해 두꺼워지는 결과를 보였으나, 비료의 종류에 따른 차이없이 4.5~4.7cm의 범위였다. 분지수는 무질소구(T1)에서 21.8개로 가장 낮은 결과를 얻었던 것에 비해, 완전구(T4)에서 30.8개로 분지의 형성이 왕성한 것으로 나타났다. 절수의 경우, 초장과 유사한 경향으로, 시비처리에 의해 지상부의 생육이 왕성함에 따라 절수가 증가하는 것을 볼 수 있었으며, 완전구(T4)에서 29.8개로 가장 많은 결과를 나타냈다. 또한 절간의 생육은 시비에 관계없이 5절 이후부터 넝쿨성으로 되어 급격한 절간의 신장을 보였다.

가장 길었던 절간은 시비의 종류에 따라 다소 차이는 보였으나, 8~13절이었으며, 최상위의 절간에서는 신장이 현저히 둔화되는 경향을 보였다.

Table 34. Effect of N, P, K fertilizers application on growth of *Codonopsis lanceolata.*

Treatment[z]	Plant height (cm)	Leaf		Stem diameter (cm)	No. of branches	No. of nodes	Leaf color (SPAD-502)
		width (cm)	length (cm)				
T0	149.7 a[y]	3.7 a	7.2 a	3.7 a	22.8 ab	16.8 a	23.7 a
T1	199.5 b	4.9 b	7.9 ab	4.7 b	21.8 a	19.9 ab	25.5 a
T2	223.6 b	4.3 ab	8.2 ab	4.7 b	28.3 bc	25.0 bc	42.8 b
T3	235.3 bc	3.9 a	7.1 a	4.5 b	27.1 bc	26.3 bc	46.6 b
T4	266.8 c	4.8 b	8.9 b	4.6 b	30.8 c	29.8 c	43.5 b

[z]Fertilization conditions were set in per pot nitrogen: active phosphorus acid: potassium = 6g: 7g: 3g as a standard, a non fertilizer group (T0), non nitrogen group (T1), non phosphorus (T2), non potassium group (T3) and fertilized all nitrogen, phosphorus, potassium group (T4)

[y]Values followed by common letters in the same column are not significantly different (p=0.05, Duncan's multiple range test).

본 연구의 결과, 이 같은 결과는 생육후기의 기온저하에 의한 것으로 생각되었다(Fig. 45). 엽록소 함량은 무비료구(T0)와 무질소구(T1)를 제외한 모든 시비처리구에서 42.8~46.6의 범위로 높은 함량을 나타냈다.

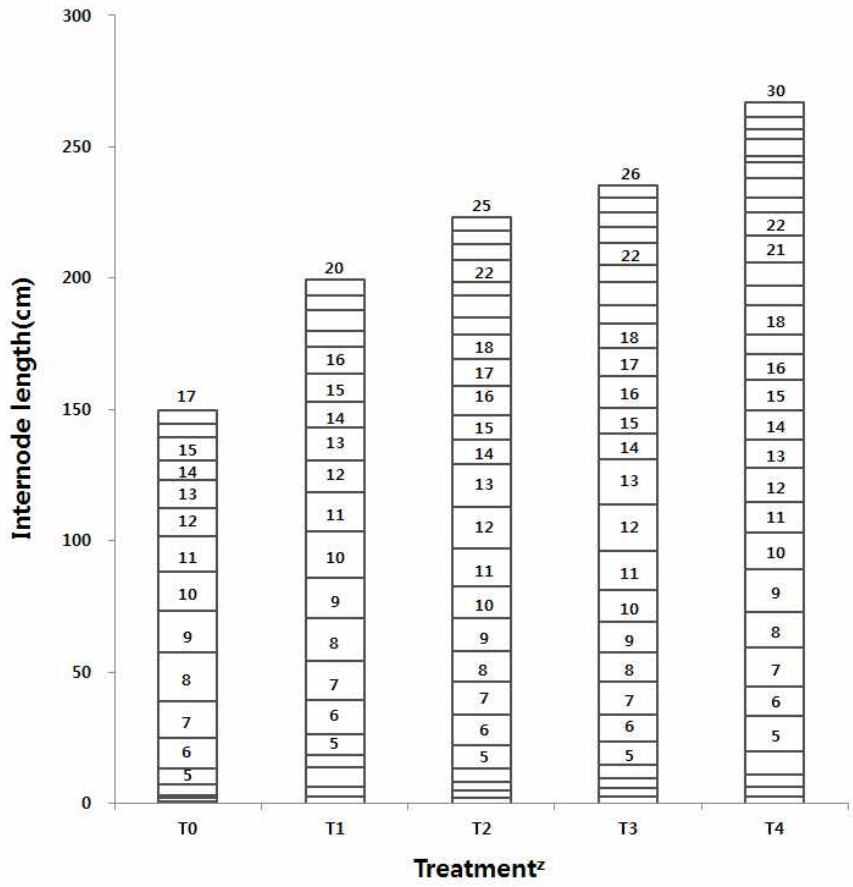


Fig. 43. Comparison of internode length in *Codonopsis lanceolata* as affected by N, P and K fertilizers application.

[z]Fertilization conditions were set in per pot nitrogen: active phosphorus: potassium = 6g: 7g: 3g as a standard, a non fertilizer group (T0), non nitrogen group (T1), non phosphoric acid (T2), non potassium group (T3) and fertilized all nitrogen, phosphorus, potassium group (T4)

(나) N, P, K의 시비처리가 지하부 생육에 미치는 영향

시비량의 차이에 따른 더덕의 지하부 생육을 조사한 결과는 Table 35와 같다.

근장은 무비료구(T0)가 19.5cm였던 것에 비해 시비처리에 의해 길어지는 것으로 나타났으며, 특히 완전구(T4)에서 25.7cm로 가장 길어 다른 처리구와의 유의성이 인정되었다. 근경 또한 근장과 유사한 경향을 보였으나, 무칼리구(T3)와 완전구(T4)에서 각각 2.4cm와 2.5cm로 양호한 결과를 나타냈다. 근의 생체중은 완전구(T4)에서 57.0g으로 다른 시비처리구에 비해 높은 수량을 보였다. 특히 무비료구(T0)에 비해 약 2배 이상 증가하는 것으로 나타나, 생산량 향상을 위하여 3요소 비료의 시비가 필요할 것으로 판단되었다. 분기근의 수는 완전구(T4)에서 25.4개로, 가장 왕성한 분기근의 형성을 보였던 것에 비해 그 외의 처리구는 10.1～19.0개의 범위로 유의성은 없었다.

Table 35. Effect of N, P, K fertilizers application on root characteristics of *Codonopsis lanceolata*.

Treatment[z]	Length (cm)	Diameter (cm)	Fresh weight (g)	Dry weight (g)	No. of lateral roots
T0	19.5 a[y]	1.9 ab	27.8 a	7.4 a	19.0 a
T1	23.9 c	2.0 b	28.6 a	7.5 a	10.3 a
T2	21.7 b	1.8 a	30.5 a	6.8 a	10.1 a
T3	24.4 c	2.4 cd	42.3 b	9.7 b	18.5 a
T4	25.7 d	2.5 d	57.0 c	13.9 c	35.4 b

[z]Fertilization conditions were set in per pot nitrogen: active phosphorus: potassium = 6g: 7g: 3g as a standard, a non fertilizer group (T0), non nitrogen group (T1), non phosphorus (T2), non potassium group (T3) and fertilized all nitrogen, phosphorus, potassium group (T4)

[y]Values followed by common letters in the same column are not significantly different (p=0.05, Duncan' s multiple range test).

(다) N, P, K의 시비처리가 뿌리의 무기성분 함량에 미치는 영향

시비량의 차이에 따른 뿌리의 무기성분 함량을 분석한 결과는 Table 36과 같다.

뿌리의 대량원소함량의 경우, 시비량의 차이에 따른 일정한 경향은 볼 수 없었으나, Na, Mg, P 및 Ca은 무칼륨구(T3)에서 가장 높은 함량을 보였던 반면, 완전구(T4)의 경우, 대조구에 비해 조금 적거나 비슷한 함량을 나타냈다. K은 무칼륨구(T3)에서 가장 낮은 함량을 나타냈다. 미량원소함량 또한 시비량의 차이에 따른 일정한 경향을 볼 수 없었으며, Mn과 Fe은 각각 완전구(T4)와 무칼륨구(T3)는 높은 함량을 나타내었으며, Cu와 Zn은 무인산구(T2)에서 9.592ppm, 22.57ppm로 다른 시비처리구에 비해 높은 함량을 보였다. 그러나 Al은 무비료구(T0)에서 가장 높은 결과를 보여 N, P, K의 시비에 함량의 흡수가 억제되는 것으로 나타났다.

Table 36. Comparison of mineral nutrients content in the roots of *Codonopsis lanceolata* fertilized with N, P and K.

Treatment[z]	Mineral nutrients(ppm)						
	Na	Mg	P	K	Ca	Mn	Fe
T0	205.6	948.2	505.3	10599	1972	38.01	1025.3
T1	149.6	996.9	689.6	13669	2004	32.52	954.4
T2	197.2	1122.0	460.3	10370	2102	40.31	1145.8
T3	240.2	1401.0	1010.3	7880	2213	29.57	1213.2
T4	166.7	1034.0	519.3	8704	1725	45.31	854.5

Treatment[z]	Mineral nutrients(ppm)						
	Cr	Ba	Cu	Zn	Ti	Al	V
T0	2.763	50.68	4.825	14.51	31.64	738.2	4.026
T1	3.473	83.12	5.500	15.99	9.36	525.9	5.093
T2	1.917	33.93	9.592	22.57	21.24	674.7	4.350
T3	2.563	66.83	8.323	21.48	〈 0	707.8	3.929
T4	2.186	50.95	6.251	15.33	20.89	737.1	5.150

[z]Fertilization conditions were set in per pot nitrogen: active phosphorus: potassium = 6g:7g: 3g as a standard, a non fertilizer group (T0), non nitrogen group (T1), non phosphoric acid (T2), non potassium group (T3) and fertilized all nitrogen, phosphorus, potassium group (T4)

이상의 결과로부터, 뿌리의 무기성분 함량은 무질소구(T1)의 경우, Na, Mg, Cu 및 Al, 무인산구(T2)는 P, 무칼리구(T3)는 Mn, 완전구(T4)는 Ca, Fe 및 Zn 등에서 다른 시비처리구에 비해 함유량이 낮아지는 것으로 나타났다. 이처럼 질소, 인산 또는 칼리의 결핍은 더덕의 뿌리생장에 있어 토양 중의 무기물의 흡수에 큰 영향을 미치는 하나의 요인으로 생각되었다. 따라서 금후 더덕의 뿌리 비대생장을 위한 다양한 비료의 종류, 시비량 및 토양 등 시비조건에 대한 검토가 필요할 것으로 판단되었다.

라. 2배체 및 4배체 더덕 부정근의 배양기간별 성분 변화

(1) 연구방법

기내배양된 2배체 및 4배체 더덕의 뿌리를 액체현탁배양하여 증식한 부정근을 공시재료로 하였다. 2배체 및 4배체 더덕의 뿌리를 절단하여 삼각플라스크에 1, 2, 3개월 동안 현탁배양 한 후 수확하여 무기성분, 일반성분, 아미노산, 유리당 함량을 분석하였다.

(가) 무기성분 분석

시료를 600° C로 12시간 회화하고 습식분해법(Woo and Ryoo, 1983)으로 분해하여 탈이온 증류수로 정량하고 검액하였다. 마쇄한 더덕의 뿌리 2g에 진한 질산 10 ml를 가하여 처음에는 낮은 온도로 가열하고 점차 고온으로 가열하면서 분해하였다. 분해액이 백색 투명하게 되면 냉각시키고 분해액에 증류수를 가하고 100 ml로 정량한 후 여과하여 여액을 분석시료로 하였다. 각 무기성분의 정량은 유도결합플라스마 분광광도기(ICP, Inductively Coupled Plasma, 3300DV, PerkinElmer Optima, USA)를 이용하여 분석하였다, 분석조건은 다음과 같다. 가스유속은 plasma 15 l/min, auxiliary 0.5 l/min, nebulizer 0.8 l/min이였으며, RF power 1,300 watts, 유속 1.0 ml/min, speed 18.48 rpm, sample flow rate 1.0 ml/min, sample flush time 30sec, sample flush rate 4.0 ml/min, delay time 30sec이었다(Jung et al., 2012). (Jung et al., 2012).

(나) 일반성분 분석

시료의 일반성분은 AOAC 법(AOAC, 1990)에 의하여 분석하였다. 수분은 105℃ 상압건조법, 회분함량은 550℃에서 직접회화법을 이용하여 분석하였다. 조단백질 함량은 micro-Kjeldahl 법을 이용한 단백질 자동분석기(Kjeltec protein analyzer, Tecator, Sweden)로, 조지방 함량은 Soxhlet 법을 이용하여 분석하였다.

(다) 유리당함량 분석

시료 5 g을 칭량하여. 80% methanol 100 mL를. 넣.고. 13,000rpm에서 3분 동안 균질화하였다. 이 균질체를 환류냉각기를 부착한 추출장치에 옮긴 후 80℃에서 2시간 동안 추출한 후 여과하였다. 이 추출조작을 2회 반복하여 모은 여액을 45℃에서 감압·농축한 후 증류수를 넣어 100 mL로 정용하였다. 이렇게 조제한 시료용액은 -70℃에서 냉동 보관하면서 분석하였다.

(2) 연구결과

(가) 배양기간별 무기성분 함량

재배더덕 뿌리와 더덕 2배체, 4배체 식물의 배양기간별 무기성분을 분석한 결과 칼륨의 함량이 대체적으로 높은 것으로 나타났으며, 기내 부정근보다는 포장재배한 더덕이 더 많았다. 인은 칼륨과 달리 재배더덕보다 부정근에서 양호한 것으로 나타났으며, 2배체는 배양기간이 길수록 많은 반면 4배체는 기간이 길수록 감소하였다. 아연과 망간의 경우 재배더덕보다 기내 배양된 부정근에서 양호한 함량을 보여 2배체는 배양기간이 길수록, 4배체는 배양기간이 적을수록 아연의 함량이 높았다.

Table 37. Comparison of mineral nutrients contained in adventitious roots of diploid and tetraploid *Codonopsis lanceolata*

/100g

Cultivation type	Ploidy	Culture period (month)	Mineral nutrients(ppm)								
			Na	Mg	P	K	Ca	Zn	Fe	Mn	Cu
			g	g	g	g	g	mg	mg	mg	mg
Field	2x		0.01	0.01	0.01	0.22	0.10	2.03	10.59	0.14	-
in vitro culture	2x	1	0.01	0.01	0.02	0.11	0.05	1.68	5.74	0.14	-
		2	0.01	0.01	0.05	0.08	0.05	2.60	5.82	0.73	-
		3	0.02	0.01	0.07	0.11	0.05	4.57	5.67	0.43	-
	4x	1	0.01	0.01	0.07	0.11	0.08	3.57	8.13	2.43	-
		2	0.01	0.01	0.02	0.09	0.05	2.48	9.52	0.15	-
		3	0.01	0.01	0.02	0.11	0.11	1.26	4.61	0.15	-

(나) 배양기간별 일반성분 함량

재배더덕 뿌리와 더덕 2배체, 4배체 식물의 배양기간별 일반성분을 분석한 결과 수분을 제외한 조단백질, 조지방, 조섬유소, 조회분의 함량이 기내배양 부정근보다 재배더덕에서 더 많은 것으로 나타났다. 수분의 경우 2배체와 4배체 모두 배양기간이 길수록 함량이 감소하는 경향이었으며 조지방, 조섬유 조회분 함량은 배양기간이 길수록 증가하였다.

Table 38. Comparison of proximate composition in adventitious roots of diploid and tetraploid *Codonopsis lanceolata*

/100g

Cultivation type	Ploidy	Culture period	General nutrients(%)				
			Moisture	Crude protein	Crude fat	Crude fiber	Crude ash
			g	g	g	g	g
Field	2x		81.82	3.24	0.35	2.84	1.01
		1	94.66	2.55	0.09	1.35	0.47
	2x	2	93.16	1.89	0.18	1.63	0.44
in vitro		3	92.78	3.09	0.31	1.52	0.56
culture		1	94.58	1.92	0.16	1.12	0.45
	4x	2	94.27	1.79	0.19	1.59	0.40
		3	93.97	1.77	0.20	1.90	0.49

(다) 유리당 함량

더덕의 포도당, 과당, 엿당 함량을 분석한 결과 기내배양 부정근보다 재배더덕 뿌리에서 과당의 함량이 높게 나타났다. 그러나 대부분이 불검출 되어 추후 재실험이 요구되었다.

Table 39. Comparison of free sugars content in adventitious roots of diploid and tetraploid *Codonopsis lanceolata*

/100g

Cultivation type	Ploidy	Culture period	General nutrients(%)		
			Glucose	Fructose	Matose
			g	g	g
Field	2x		-	2.87	-
		1	-	0.20	0.41
	2x	2	-	-	-
in vitro		3	0.45	0.45	-
culture		1	-	-	-
	4x	2	-	-	-
		3	-	0.17	-

4. 바이오리엑터(bioreactor)를 이용한 배양근 생산시스템 확립

가. 더덕의 부정근 생장에 미치는 액체현탁배양

(1) 연구방법

액체 현탁배양 시 더덕 부정근 증식에 효과적인 배지를 선발하기 위하여 적정 생장조절제의 종류 및 농도(IBA, NAA, IAA 0.5, 1, 2mg·L^{-1}), 적정 sucrose 농도(1, 3, 5, 7%), 적정 배지구성물질 농도(1/4, 1/2, 1, 2MS)에 대하여 조사하였다. 공시재료로 IBA 1 mg·L^{-1}이 첨가된 고체배지에서 유도된 부정근(1cm) 0.5g을 사용하였으며, 50mL 액체배지가 들어있는 100mL 삼각플라스크에 배양하였다.

적정 생장 호르몬의 종류 및 농도의 기본배지는 MS배지로, sucrose는 3%를 첨가하였으며, pH는 5.8로 조절하였다. 적정 sucrose, 배지구성물질 농도 실험의 기본배지는 생장조절물질 실험결과 효과를 나타낸 IBA 2mg·L^{-1}이 첨가된 배지로, pH는 5.8로 조절된 액체배지를 사용하였다. 모든 실험의 배양조건은 암조건하에서 110rpm으로 현탁배양 하였으며, 배양 6주후 부정근의 무게를 조사하였다.

(2) 연구결과

(가) 생장조절제 선발

액체 현탁배양 시 더덕 부정근의 형성을 위한 적정 생장 호르몬의 종류 및 농도를 알아보고자 IBA, NAA와 NAA를 각각 첨가하여 배양한 결과는 다음과 같다.

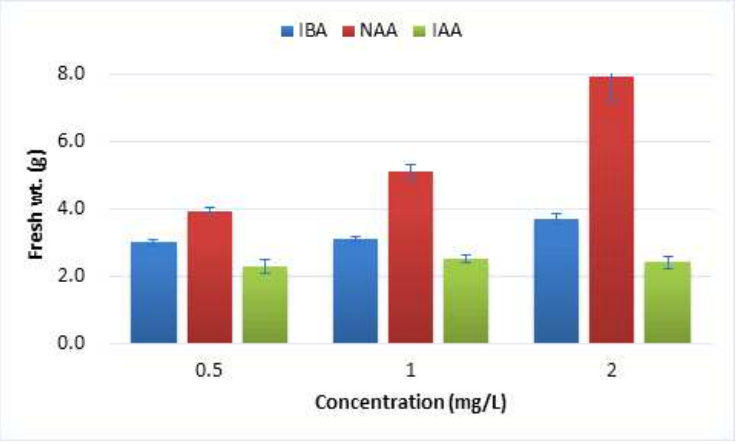


Fig. 44. Effect of PGR on adventitious root proliferation and growth in root suspension culture of *Codonopsis lanceolata*

IBA를 0.5~2 mg·L^{-1} 농도로 첨가하여 배양한 경우 IBA의 농도가 증가할수록 부정근의 생장이

왕성한 것으로 나타났다. 특히 IBA 2 mg·L^{-1} 첨가구에서 양호한 부정근의 생장을 보였으나 약간의 캘러스도 함께 유기되는 것으로 나타났다. 특히 부정근의 왕성한 생장은 배양 3주 후부터 관찰되었다. NAA의 경우도 농도가 증가할수록 부정근의 생장이 높았으나 NAA 1 mg·L^{-1} 첨가부터 왕성한 캘러스의 유기도 함께 관찰되었으며 특히 NAA의 농도가 2 mg·L^{-1} 인 경우에 대부분의 부정근이 캘러스화 되는 경향을 나타냈다. IAA의 경우에는 농도의 고저와 관계없이 부정근의 형성 및 생장이 저조하여 더덕의 부정근 생장에는 적합하지 않은 종류로 판단되었다.

(나) Sucrose 농도

현탁배양 배지로 적당한 sucrose 농도를 알아보고자 1~7%의 농도로 처리하여 배양한 결과 부정근의 증식은 sucrose의 첨가가 효과적임을 알 수 있었는데 sucrose의 농도가 높아질수록 부정근의 생장이 왕성한 경향으로 5%와 7%에서 가장 많은 부정근의 증식을 보였다.

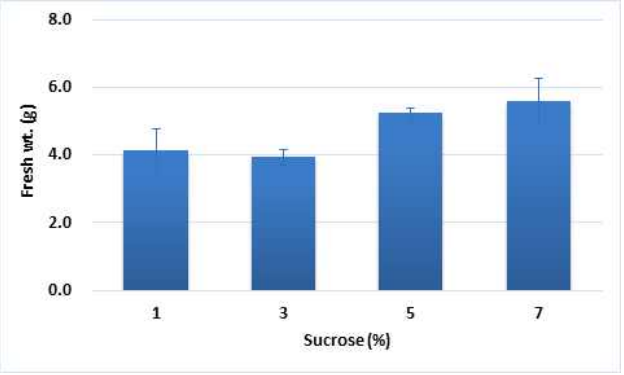


Fig. 45. Effect of sucrose on adventitious root proliferation and growth in root suspension culture of *Codonopsis lanceolata*

(다) 무기물 농도

더덕의 현탁배양 시 적정 무기물 농도를 알아보고자 배양한 결과 부정근의 증식은 MS배지에 첨가되는 무기물의 농도가 1/2~1배가 첨가된 배지에서 양호한 생장을 나타냈다. 고농도의 무기물이 첨가된 처리구인 2MS배지의 경우 다른 처리구에 비해 부정근의 생장이 저조하였으며 또한 캘러스의 유기도 관찰되었다.

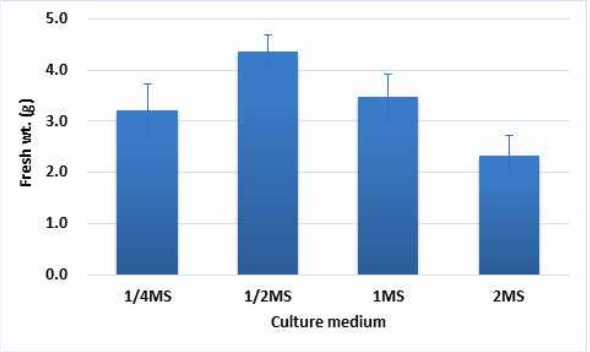


Fig. 46. Effect of culture media on adventitious root proliferation and growth in root suspension culture of *Codonopsis lanceolata*

나. 바이오리엑터(bioreactor)를 이용한 배양근 생산시스템 확립

(1) IBA 농도

3L 바이오리엑터에 sucrose 3%가 첨가된 기본 MS배지에, IBA 0.5~2 mg・L^{-1}로 달리 첨가한 배지에 두달 간 배양한 결과는 다음과 같다. 총 생체중은 IBA의 농도가 낮아질수록 높은 경향으로 IBA 0.5 mg・L^{-1} 첨가구에서 가장 왕성한 증식을 보였다. IBA 0.5 mg・L^{-1}가 가장 적당한 농도로 생각되었다.

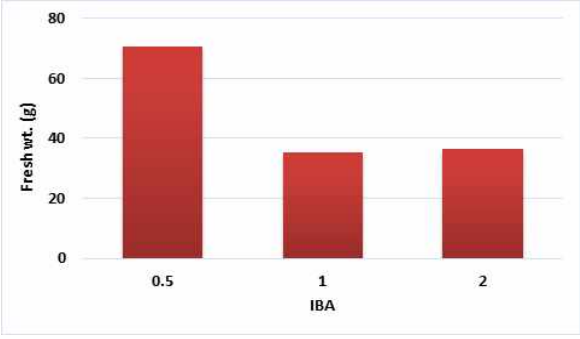


Fig. 47. Effect of IBA concentration on cultured root proliferation and growth in bioreactor culture of *Codonopsis lanceolata*

(2) NAA 농도

3L 바이오리엑터에 sucrose 3%가 첨가된 기본 MS배지에, NAA 0.5, 1, 2 mg・L^{-1}로 달리 첨가하여 배양한 결과 많은 양의 캘러스가 증식되었다. NAA의 농도가 높아질수록 증가하는 경향으로 NAA 2 첨가구에서 가장 왕성한 캘러스의 증식을 보였다. NAA 처리의 경우 정상적인 부정근의 형태로 증식되지 않고 부정근의 캘러스화가 이루어면서 IBA와 비교하여 왕성한 생장을 보였는데 추후 NAA와의 혼용 실험이 필요할 것으로 생각되었다.

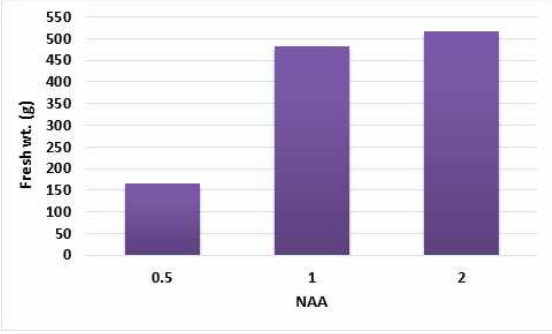


Fig. 48. Effect of NAA concentration on cultured root proliferation and growth in bioreactor culture of *Codonopsis lanceolata*

(3) MS배지 농도

기본 MS배지의 농도를 1/4, 1/2, 1로 하고, IBA 0.5 mg/L, sucrose 3%, pH5.8로 조절한 배지에 배양한 결과는 다음과 같다. 배양 3주 후부터 MS배지의 농도가 낮을수록 빠르게 부정근이 형성되었으며 부정근의 길이가 길게 성장하는 것으로 나타났다. 따라서 부정근의 길이로 인하여 배양 4주 후부터는 배지내에서 움직이지 않고 정치된 상태에서 증식하였다.

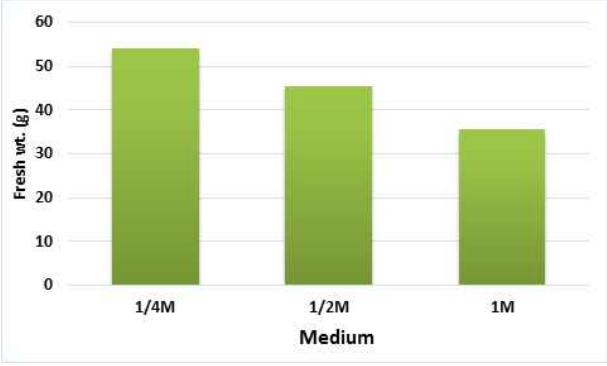


Fig. 49. Effect of MS media on cultured root proliferation and growth in bioreactor culture of *Codonopsis lanceolata*

(4) Sucrose 농도

3L 바이오리엑터에 IBA 0.5 mg/L가 첨가된 기본 1/4MS배지에, sucrose를 3~7%로 달리 첨가하여 부정근을 배양한 결과 3~5%가 첨가된 배지에서 왕성한 경향이었으며 농도가 높을수록 생장이 저조한 경향이었다.

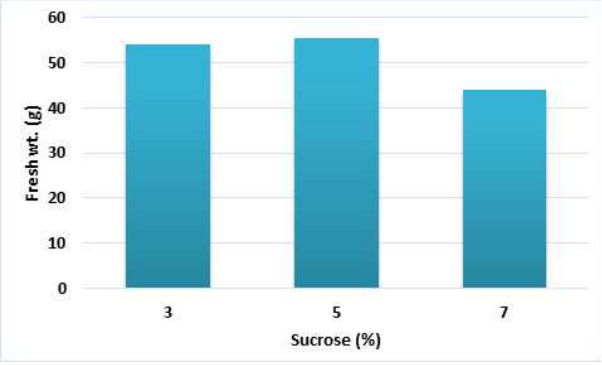


Fig. 50. Effect of sucrose concentration on cultured root proliferation and growth in bioreactor culture of *Codonopsis lanceolata*

(5) 생물반응기내 공기주입량

본 실험은 더덕의 bioreactor 배양 시 공기 주입량에 따른 부정근의 생육 및 배지 소모량을 비교하기 위해 실시하였다. Bioreactor 배양 시 공기 주입량을 0.1vvm, 0.2vvm, 0.3vvm로 처리하였고, 8주 배양 후 생육조사 하였다. 부정근의 생장은 0.1vvm 처리가 양호하였다. 이는 공기 주입량이 적은 0.1vvm 처리가 배지의 소모가 적어 양호한 결과로 나타나는 것으로 생각되었다.

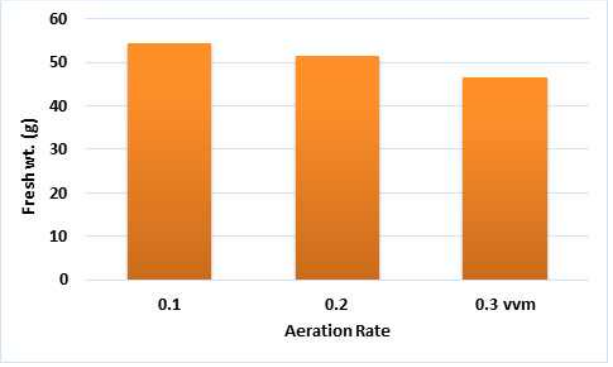


Fig. 51. Effect of aeration rate on cultured root proliferation and growth in bioreactor culture of *Codonopsis lanceolata*

(6) LED 광원

1L 바이오리엑터에 IBA 0.5 mg/L가 첨가된 기본 1/4MS배지에, sucrose를 5%로 첨가하여 청색, 적색, 혼합 LED 광에서 배양하였다. LED 광원에 따른 더덕의 부정근은 혼합광에 양호한 증식을 보인 반면 청색광에는 생장이 아주 저조하였다. 적색광에서의 부정근은 길이 생장은 좋았으나 가늘고 길게 형성되어 생체중은 낮은 경향으로 대조구나 혼합광보다는 부정근 증식이 낮은 것으로 판단되었다. 또한 추후 광원에 따른 더덕의 유효물질의 함량을 조사하여 부정근의 증식 뿐만 아니라 품질면에서도 우수한 배양근 생산 조건을 확인할 필요가 있을 것으로 생각되었다.

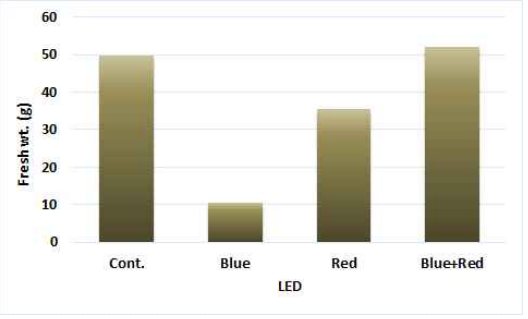


Fig. 52. Effects of LED on cultured root proliferation and growth in bioreactor culture of *Codonopsis lanceolata*

(7) 생물반응기의 용량에 따른 배양근

3, 5, 10L 생물반응기에 기본 1/4MS배지에 IBA 0.5 mg/L, sucrose 5%를 첨가하고, pH5.8로 조절한 배지에 배양한 결과는 다음과 같다. 배양 3주 후부터 부정근이 형성되는 것이 관찰되었는데 생물반응기의 용량과 관계없이 배양 50일후에 수확이 가능하였다. 부정근이 형성되기 위해서는 일정한 양분의 공급과 시간이 필요한 것으로 생각되었다. 그러나 배양용량에 따라 배양근 생산량이 증가되는 경향이 큰 것으로 나타났다. 따라서 생산시기는 비슷하나 생산량의 증가에 효과적인 10L 처리구가 효과적으로 더덕 부정근을 생산하는데 적합한 것으로 판단되었다.

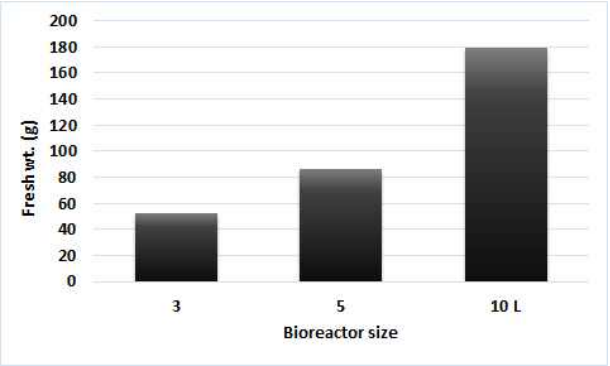


Fig. 53. Effect of bioreactor volume on cultured root proliferation and growth in bioreactor culture of *Codonopsis lanceolata*

2-2. 연구개발성과

1. 국내외 논문게재

No	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCI여부(SCI/비SCI)	게재일	등록번호
1	Regional Comparison of Physiochemical Properties of *Codonopsis lanceorata*	Korean J. Crop Sci.	Soo Jeong Kwon	60(2): 248-252	Korea	한국작물학회	비SCI	2015.06.30	
2	Comparison of Growth Characteristics and Inorganic Components between Korean and Japanese *Codonopsis lanceorata*	Korean J. Crop Sci.	Soo Jeong Kwon	60(2): 253-256	Korea	한국작물학회	비SCI	2015.06.30	
3	Immune Cells Activity, Nitrite Scanvenging and ABTS Radical Scavenging Activity of Extracts from *Codonopsis lanceolata* according to the Concentration of Ethanol Solvent and Culture Region	Korean J. Plant Res.	Hee-Ock Boo	29(3): 289-296	Korea	한국자원식물학회	비SCI	2016.06.30	
4	Effect of Temperature Variable on Growth and Inorganic Nutrients Contents of *Codonopsis lanceolata*	Korean J. Crop Sci.	Soo-Jeong Kwon	61(2): 131-137	Korea	한국작물학회	비SCI	2016.06.30	
5	Effect of Colchicine on Chromosome Doubling in *Codonopsis lanceolata*	Korean J. Plant Res.	Soo-Jeong Kwon	29(3): 347-354	Korea	한국자원식물학회	비SCI	2016.06.30	
6	Effects of Medium Compositions on Organogenesis in the *In Vitro* Cultured Diploid and Tetrploid *Codonopsis lanceolata*	J. Korean Soc. Int. Agric.	Soo-Jeong Kwon	28(3): 371-378	Korea	한국국제농업개발학회	비SCI	2016.09.30	
7	Effects of N, P and K Fertilizers Application on Growth, Yield and Inorganic Components Content in *Codonopsis lanceolata*	J. Korean Soc. Int. Agric.	Soo-Jeong Kwon	28(3): 379-384	Korea	한국국제농업개발학회	비SCI	2016.09.30	
8	In Vitro Cytotoxicity	Korean J.	Hee-Ock	31(3):19	Korea	한국자원	비SCI	2018.06.30	

	against Human Cancer Cell and 3T3-L1 Cell, Total Polyphenol Content and DPPH Radical Scavenging of *Codonopsis lanceolata* according to the Concentration of Ethanol Solvent	Plant Res.	Boo	5-201		식물학회			
9	Comparison of Total Polyphenol, Total Flavonoid Content and Antioxidant Activity of *Codonopsis lanceolata* Extracts Stored at Different Temperatures and for Different Durations	Korean J Community Living Sci	Hee-Ock Boo	29(3): 361-370	Korea	한국지역사회생활과학회	비SCI	2018.08.30	
10	*Codonopsis lanceolata* and Nelumbo nucifera Gaertn. root extracts for functional food: metabolic profiling by MS, FTIR and fluorescence and evaluation of cytotoxicity and anti-obesity properties on 3T3-L1 cell line	European Food Research Technology	Hee-Ock Boo	243:689-700	Germany	Springer	SCI	2017.03.10	
11	Effect of Extraction Solvent on In Vitro Anti-inflammatory, Antioxidant activity, Total Phenol and Flavonoid Contents in *Codonopsis lanceolata*	J. Crop Sci. Biotech.	Hee-Ock Boo	21(3)	Korea	한국작물학회	SCI급 SCOPUS	2018.09.30	
12	Cytotoxic Effect on Human Cancer Cells and Antioxidant Activity of Extracts of *Codonopsis lanceolata* Root using Different Solvent Fractions	J. Crop Sci. Biotech.	Hee-Ock Boo	21(3)	Korea	한국작물학회	SCI급 SCOPUS	2018.09.30	
13	Evaluation of Cytotoxicity on Human Cancer Cells, Antioxidant and Immune Cell	Horticultural Science and Technology	Hee-Ock Boo	36(6)	Korea	한국원예학회	SCI	2018.12	

	Activities of Extracts of *Codonopsis lanceolata* Roots Stored at Different Temperatures and for Different Durations								
14	알레르기 비염 질환자를 대상으로 한 더덕(*Codonopsis lanceolata*) 추출물의 과민면역반응 개선에 대한 유효성 및 안전성 평가	대한한방부인과학회지		31(4)	Korea	대한한방부인과학회	비SCI	심사중	

2. 국내 및 국제학술회의 발표

No	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
1	2015년 한국자원식물학회 춘계학술발표회/생물주권과 생물산업	부희옥,박정훈,정재훈,김학현,권수정,이문순	2015.04.24.	안동대학교 국제교류관 대회의장	Korea
2	2015년 한국작물학회 춘계학술대회 작물생산과 창조경제	권수정,박태연,이문순,부희옥,우선희,조갑연,김학현	2015.05.28. ~29	국립식량과학원(전주)	Korea
3	2015년 한국작물학회 춘계학술대회 작물생산과 창조경제	권수정,박태연,이문순,부희옥,우선희,조갑연,김학현	2015.05.28. ~29	국립식량과학원(전주)	한국
4	2015년 한국작물학회 춘계학술대회 작물생산과 창조경제	권수정,박태연,이문순,부희옥,우선희,조갑연,김학현	2015.05.28. ~29	국립식량과학원(전주)	한국
5	2015년 한국작물학회 춘계학술대회 작물생산과 창조경제	부희옥,박정훈,김학현,권수정,이문순	2015.05.28. ~29	국립식량과학원(전주)	한국
6	7th International Symposium on Frontiers in Agricultural Proteome Research, and 2nd AOAPO conference in Korea, 2015	Soo Jeong KWON, Young Ja MOON, Gab Yeon CHO, Hee Ock BOO, Moon Soon LEE, Sun Hee WOO, Hag Hyun KIM	2015.09.23. ~24	Jungwon University	Korea
7	7th International Symposium on Frontiers in Agricultural Proteome Research, and 2nd AOAPO conference in Korea, 2015	Yong-Beom CHO, Hee-Ock Boo, Hag-Hyun KIM, Keun-Yook CHUNG, Sun-Hee WOO, Moon-Soon LEE	2015.09.23. ~24	Jungwon University	Korea
8	2015 한국약용작물학회 심포지엄 및 추계학술발표대회	권남우, 김재연, 김혜림, 조용범, 김정현, 박근태, 신창섭, 연평식, 이문순	2015.10.15.	전주, 국립원예특작과학원	한국
9	2016년 한국자원식물학회	Hee-Ock Boo, Jeong-Hun		제주도,	한국

	정기총회 및 춘계학술발표회	Park, Jae-Hoon Jeong, Hag-Hyun Kim, Soo-Jeong Kwon and Moon-Soon Lee	2016.04.28. ~30	상효수목원	
10	2016년 한국작물학회 춘계학술대회	Hee-Ock Boo, Jeong-Hun Park, Hag-Hyun Kim, Soo-Jeong Kwon, Moon-Soon Lee	2016.04.21. ~22	통영, 마리나리조트	한국
11	2016년 한국작물학회 춘계학술대회	Soo-Jeong Kwon, Dong-Yeon Seo, Gab-Yeon Cho, Swapan Kumar Roy, Moon-Soon Lee, Hee-Ock Boo, Sun-Hee Woo and Hag-Hyun Kim	2016.04.21. ~22	통영, 마리나리조트	한국
12	2016년 한국작물학회 춘계학술대회	Soo-Jeong Kwon, Dong-Yeon Seo, Gab-Yeon Cho, Moon-Soon Lee, Young-Ja Moon, Hee-Ock Boo, Sun-Hee Woo and Hag-Hyun Kim	2016.04.21. ~22	통영, 마리나리조트	한국
13	2016년 10th World Congress on Polyphenols Applications	Hee-Ock Boo, Jeong-Hun Park, Hag-Hyun Kim, Soo-Jeong Kwon and Moon-Soon Lee	2016.06.29. ~07.01.	Instituto Superior de Engenharia do Porto, Portugal	Portugal
14	한국약용작물학회 2016년 추계학술발표회	부희옥, 박정훈, 김학현, 권수정, 이문순	2016.10.13. ~14	전남 여수, 히든베이호텔	한국
15	9th Asian Crop Science Association Conference	Soo Jeong Kwon, Ha Nule Hwang, Young Ja Moon, Gab Yeon Cho, Hee Ock Boo, Moon Soon Lee, Sun Hee Woo, Hag Hyun Kim	2017.06.04. ~07	제주국제컨벤션센터 (서귀포)	Korea
16	9th Asian Crop Science Association Conference	Soo Jeong Kwon, Eun Ji Han, Young Ja Moon, Gab Yeon Cho, Hee Ock Boo, Moon Soon Lee, Sun Hee Woo, Hag Hyun Kim	2017.06.04. ~07	제주국제컨벤션센터 (서귀포)	Korea
17	9th Asian Crop Science Association Conference	Soo Jeong Kwon, Ui Gun Lee, Young Ja Moon, Gab Yeon Cho, Hee Ock Boo, Moon Soon Lee, Sun Hee Woo, Hag Hyun Kim	2017.06.04. ~07	제주국제컨벤션센터 (서귀포)	Korea
18	9th Asian Crop Science Association Conference	Hee Ock Boo, Jeong Hun Park, Hag Hyun Kim, Soo Jeong Kwon, and Moon Soon Lee	2017.06.04. ~07	제주국제컨벤션센터 (서귀포)	Korea
19	9th Asian Crop Science Association Conference	Hee Ock Boo, Jeong Hun Park, Hag Hyun Kim, Soo Jeong Kwon, and Moon Soon Lee	2017.06.04. ~07	제주국제컨벤션센터 (서귀포)	Korea
20	CROP SCIENCE SOCIETY OF JAPAN 일본작물학회	Hee-Ock Boo, Jeong-Hun Park, Hag-Hyun Kim, Soo-Jeong Kwon, Moon-Soon Lee, and Sun-Hee Woo	2018.03.29. ~30	일본, 우쓰노미야대학 미네캠퍼스	Japan
21	2018년 한국작물학회 임시총회 및 춘계학술대회	권수정, 스와판, 문영자, 이문순, 부희옥, 김학현	2018.04.19. ~20	여수컨벤션센터	한국

22	2018년 한국작물학회 임시총회 및 춘계학술대회	권수정, 스와판, 문영자, 이문순, 부희옥, 김학현	2018.04.19. ~20	여수컨벤션센터	한국
23	2018년 한국작물학회 임시총회 및 춘계학술대회	부희옥, 박정훈, 김학현, 권수정, 이문순	2018.04.19. ~20	여수컨벤션센터	한국
24	2018년 한국작물학회 임시총회 및 춘계학술대회	부희옥, 박정훈, 신정화, 김학현, 권수정, 이문순	2018.04.19. ~20	여수컨벤션센터	한국

3. 지식재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신품종, 프로그램)

No	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국 명	출원			등 록			기여율
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	
1	더덕추출물을 유효성분으로 포함하는 항산화,항암,항비만 또는 면역증진용 조성물	대한민국	(주)웰파이토	2016.02.25	10-2016-0022424				100
2	더덕 추출물의 제조방법 및 이의 용도	대한민국	(주)웰파이토	2016.12.19	10-2016-0173611				100
3	더덕 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 항염증용 조성물 또는 천식 예방 또는 치료용 조성물	대한민국	(주)웰파이토	2018.01.25	10-2018-0009277				100
4	더덕 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 항염증용 조성물 또는 천식 예방 또는 치료용 조성물	대한민국	(주)웰파이토	2018.04.02	10-2018-0037941				100
5	더덕추출물을 유효성분으로 함유하는 항천식용 조성물	대한민국	충북대학교 산학협력단	2018.07.23	10-2018-0085299				100
6	가수분해산물 및 정유 제조방법	대한민국	충북대학교 산학협력단	2018.07.23	10-2018-0085301				100
7	2배체 및 4배체 더덕의 기내 배양용 조성물 및 이를 이용한 더덕의 대량배양방법	대한민국	충북대학교 산학협력단	2018.07.25	10-2018-0086450				100
8	더덕 추출물을 포함하는 기능성 건조 분말 및 액상 음료 제조방법	대한민국	(주)웰파이토	2018.09.07	10-2018-0106934				100
9	더덕추출물을	대한민국	(주)웰	2016.02.	10-2016-0	(주)웰파	2018.01.	제10-18170	100

	유효성분으로 포함하는 항산화,항암,항비만 또는 면역증진용 조성물		파이토	25	022424	이토	04	53호	
10	더덕 추출물의 제조 방법 및 이의 용도	대한민국	(주)웰파이토	2016.12.19	10-2016-0173611	(주)웰파이토	2018.08.27	제10-1894156호	100

4. 사업화 현황

No	사업화 방식	사업화 형태	지역	사업화명	내용	업체명	매출액		매출 발생년도	기술 수명
							국내	국외		
1	자기실시	기술보유자 직접사업화	국내 국외	목맑음 더덕청	더덕추출물 분말을 이용하여 비염알레르기 등 과민성면역 개선을 위한 목맑음더덕청(淸) 개발	(주)웰파이토	7,500,000		2018	
2	자기실시	기술보유자 직접사업화	국내	목맑음 더덕수	미세먼지 등 각종 환경오염에서 오는 기관지질환 및 비염알레르기를 개선하기 위한 목을 맑게 하는 더덕수 개발	(주)웰파이토			2018	

5. 교육 및 지도활용

No	교육명	주요내용	활용년도
1	더덕의 고기능성 천연향장소재 응용 위한 전문인력양성	안전하고 건강한 천연 향장제품 생산을 위해 고기능의 더덕 소재 이용가치를 탐색하고, 이를 응용하여 다양한 기능성 신제품을 개할 할 수 있는 전문 인력을 양성하고자 지도함	2015
2	연구인력의 기술지도 : 생물공학적 기술을 이용한 품종 육성	기내배양을 이용한 4배체 식물 육성 - 4배체 식물의 유기과정 - 기내 배양체의 콜히친 처리시 각 단계별 조작방법 - 순화법 - 기타 등	2016
3	연구인력의 기술지도 : 생물공학적 기술을 이용한 4배체 포도품종 육성	기내배양을 이용한 4배체 목본식물의 효율적 육성법 - 4배체 식물의 유기과정의 이론적 설명 - 배수체 유도제를 이용한 기내 배양체 처리 조작법 - 배수체 확인 및 조사방법 - 기내 대량생산법 및 기회순화법 - 기타 등	2016
4	연구인력의 기술지	생물공학적 기술을 이용한 배수체 약용식물의 효율적 유도법	2018

	도 : 약용식물(괴근류)의 기능성물질 고함유의 우량품종 육성 및 배양근 생산	- 배수체 유도제의 세포분열시의 작용에 관한 이론적 설명 - 타 작물(배수체 식물)의 기능성 물질 고함유 사례 설명 - 배수체 확인 및 조사방법 (flow cytometry의 사용 및 판독법) - 배양근 생산을 위한 기초적 과정 설명	

6. 홍보실적

No	제목	홍보유형	매체명	홍보일	활용년도
1	더덕 배양근 대량생산 연구 박차	월간잡지	이코노미 Time 21	2017년 4월	2017
2	이문순교수팀, 더덕의 천식억제 연구 관심	지방일간지	충청미디어	2018년 7월11일	2018
3	'사포닌・아미노산 함량높은 더덕' 품종개량 성공..배양근 생산	Internet/PC통신	연합뉴스	2018년 7월31일	2018
4	(주)웰파이토 '항염증 및 항알레르기 효능 더덕추출물 함유 제품개발'	Internet/PC통신	스페셜경제	2018년 8월23일	2018

기타 포상 및 수상실적

No	종류	포상명	포상내용	포상대상	포상일자	포상기관
1	국내학술회의발표	우수발표상 (포스터)	2015년 한국작물학회 춘계학술대회에서 우수발표상을 수상	권수정	2015.05.29	한국작물학회

3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

3-1. 목표

- 더덕 소재의 생리기능성 및 작용기전 구명
- 더덕으로부터 천식, 고혈압 예방과 치료 효능의 작용물질 분리 및 효능 검증
- 더덕을 이용한 항천식, 혈압강하 효능의 건강기능식품 개발을 위한 제조공정의 최적화 및 최적 가공적성, 표준화 확립
- 더덕 유래 항천식, 혈압강하 기능성 소재 개별인정형 원료의 승인을 위한 조건 확보
- 개발된 제품에 대한 식품학적 효능 검증 및 안정성 평가
- 더덕의 생리활성물질 분리 정제 및 구조 동정, 표준화를 위한 지표성분 설정
- 더덕 소재로부터 항천식, 혈압강하 활성 갖는 생리활성물질 스크리닝
- 생리활성물질의 유효성 평가 및 대량분리 정제
- 항천식, 혈압강하 효능 시제품 제조 및 안정성 평가
- 기능성 성분 함량이 높은 우량품종 선발에 의한 품종육성 및 대량생산시스템 확립

3-2. 목표 달성여부

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차년도 (2014~2015)	제1세부과제: 더덕의 식품 소재화 및 항천식과 혈압강하 효능 건강기능식품 개발	더덕 소재 최적 추출공정 확립	100	- 원재료의 추출용매, 온도, 시간 등에 의한 추출 공정 최적화 - 추출용매별, 분획별 최적 추출 수율 - 상온추출, 열수추출, 환류냉각 추출, 효소분해 추출공정에 따른 추출물 제조 효율 조사
		더덕의 지역별, 추출조건별 추출물의 생리기능성 검증 및 미지 물질 분석	100	- 지역별, 분획별, 추출용매별 추출물에 대한 면역증강, 항산화 및 항산화효소 활성, 항암활성, 항비만 효능 분석 - HR-GC/TOF 적용한 더덕의 미지 물질 분석
		추출물의 품질관리 조건 설정	100	- 추출물에 대해 일반세균, 대장균군 시험을 통해 품질관리 조건 설정
	[국제공동연구] 더덕 유래 혈압강하 작용물질의 단리정제	더덕유래 혈압강하 효능물질의 특성 구명	100	- 한국산 더덕 추출물로부터 ACE(안지오텐신전환효소) 저해활성을 지표로 혈압강하 효능물질을 탐색하고 분리, 정제 - 효능물질의 ACE 활성 확인
	제1협동과제: 더덕으로부터 항천식, 혈압강하 작용 생리활성물질 단리 및 약리적 효능 검증	더덕 소재로부터 항천식, 혈압강하 활성 갖는 생리활성물질 스크리닝 더덕의 생리활성물질 및 사포닌 분해산물 분리	100	- 더덕의 추출용매별 추출물 조제 - 추출물로부터 분획 단리 - 가수분해효소에 의한 더덕사포닌의 가수분해 - 추출물의 지표성분 설정 및 분석법 확립

	제2협동과제: 국내 자생 더덕의 우량품종 선발, 육성 및 생물공학적 기법을 이용한 대량생산 시스템 확립	우리나라의 주요지역에 분포하는 더덕의 우량품종 선발 및 주요지역 품종의 성분분석	100	- PCR을 이용한 유전적 변이 탐색 - 형태 및 해부학적 관찰 : · 지상부 및 지하부의 특성 · Flow Cytometry를 통한 DNA함량 - 주요지역에 분포하는 더덕의 일반 및 무기성분 분석비교(잎, 줄기, 뿌리) · 일반성분비교 : 수분, 조단백질 등 · 무기성분비교 : Inductively coupled · 유리당함량 분석 : HPLC로 분석
2차년도 (2015~2016)	제1세부과제: 더덕의 식품 소재화 및 항천식과 혈압강하 효능 건강기능식품 개발	더덕의 식품 소재화 가공공정 및 생산공정 표준화 및 대량생산공정 확립	100	- 원료의 식품소재로서의 적합성 평가 위한 최적 가공적성, 물성변화 등 평가 - 제조 공정 및 대량생산 공정의 표준화 - 원료에 대한 품질관리 조건의 설정 및 분석 - 건강기능식품 개발 위한 원료별, 제형별 최적 비율 설정 - 기간의 경과에 의한 주요 성분 변화 분석 실험 - 주원료, 부원료의 배합비율 기준설정 통한 안정적 건강기능식품 개발 및 생산공정 표준화 및 대량생산 공정 확립 - 항천식 효능 in vitro실험 - 과민성면역 개선 관련 인체적용시험 진행 위한 CRO 전문 모니터링에 의한 컨설팅
	[국제공동연구] 더덕 유래 혈압강하 작용물질의 단리정제	더덕 유래 혈압강하 작용물질의 단리정제(이화학연구소)	100	- 더덕 추출물과 더덕 추출물을 고체산 촉매를 이용하여 분해·유도체화한 성분을 ACE 저해활성을 지표로 혈압강하작용 성분을 단리·정제함
	제1협동과제: 더덕으로부터 항천식, 혈압강하 작용 생리활성물질 단리 및 약리적 효능 검증	더덕으로부터 생리활성물질 화합물의 분리, 정제, 구조 동정	100	- 더덕에서 lancemaside A 및 가수분해산물에 대한 화학구조 결정
		더덕 및 더덕사포닌 가수분해산물의 항천식, 혈압강하 효능 생리활성물질의 약리효능 분석	100	- 기관지 질환세균 및 5-lipoxygenase (5-LO) 억제효과 - 급성 마우스 천식 모델의 항염증 효능
	제2협동과제: 국내 자생 더덕의 우량품종 선발, 육성 및 생물공학적 기법을 이용한 대량생산	제품생산을 위한 균일한 재료의 원활한 공급체계 확립	100	- 선발된 우량품종의 농가실증 시험을 통한 농가의 재배생산체계 확보 · 재배요건 및 생육특성 조사
				- 선발된 우량품종의 기내대량생산시스템 및 기외순화체계 확립 · 기내배양에 의한 대량번식법

	시스템 확립			·기외순화체계 확립
3차년도 (2016~2017)	제1세부과제: 더덕의 식품 소재화 및 항천식과 혈압강하 효능 건강기능식품 개발	더덕의 개별인정형 기능성 소재로서의 승인조건 확보를 위한 지표성분 및 제조공정 표준화, 인체적용시험	100	- 지표성분 설정 : 물질분리, 정제 및 기능/지표 성분 설정 - 지표성분 함량 기준의 제조공정 표준화 : 추출, 농축, 건조, 분말화 조건 표준화 - 임상시험용 스틱포 제형의 제품 제조 및 인체적용시험 - 추출물 및 시제품의 안정성 평가실험(장기, 가속시험) - 건강기능식품 품질 관리를 위한 기능성 성분(지표성분), 미생물 관련(세균수, 대장균군 등) 분석
	[국제공동연구] ○더덕 유래 혈압강하 작용물질의 단리정제	더덕 유래 생리활성 물질의 구조해석과 특성의 해명	100	- 더덕 유래의 정제된 유효성분(일본이화학연구소 분담의 고혈압관련 성분)을 고도의 기기분석을 활용하여 정밀한 극미량 성분의 구조도 결정함
	제1협동과제: 더덕으로부터 항천식, 혈압강하 작용 생리활성물질 단리 및 약리적 효능 검증	• 천식예방 및 치료, 혈류개선 효능의 시제품에 대한 기능성 검증 • 더덕사포닌 가수분해산물의 분리, 정제, 구조 동정 • 효능분석을 통해 선별된 생리활성 물질의 유효성 평가 및 대량분리 정제	100	- Sephadex LH-20 및 MPLC에 의한 대량 분리정제 - 더덕사포닌 가수분해산물의 분리 및 생리활성 - Angiotensin converting enzymes(ACE) 저해활성측정 - 혈류개선 동물모델 실험: 고혈압 관련 동물실험은 혈류개선 Factor로 실험 수행
	제2협동과제: 국내 자생 더덕의 우량품종 선발, 육성 및 생물공학적 기법을 이용한 대량생산 시스템 확립	선발된 우량품종의 기능성물질(2차대사산물) 함량 증가를 위한 품종개량	100	- 종자 및 기내 배양체의 4배체 유도물질의 침지처리 - 형태 및 해부학적 관찰에 의한 4배체 식물의 확인 - 더덕의 일반 및 무기성분 분석비교
		생물공학적 기법을 이용한 배수체 식물(부정근 및 캘루스)의 대량번식법 개발	100	- 대량번식을 위한 기내 무균 배양된 배수체 식물의 엽절편과 절을 재료로 이용 적정배지선발, 생장조절제의 단용 및 혼용, 적정환경조건, LED 광원 조사

4차년도 (2017~2018)	제1세부과제: 더덕의 식품 소재화 및 항천식과 혈압강하 효능 건강기능식품 개발	더덕 이용한 면역조절, 혈압강하 효능의 기능성식품 대량생산 및 산업화 방안 구축	100	- 개별 인정형 기능성 원료 승인 조건 확보 - 산업화 및 마케팅 전략 구축 - 더덕의 건강기능식품 품목제조 신고
	[국제공동연구] 더덕 유래 혈압강하 작용물질의 단리정제	더덕 유래 생리활성물질의 구조해석	100	- 3차년도 연구에 이어서 구조해석 규명 연구 계속 수행
	제1협동과제: 더덕으로부터 항천식, 혈압강하 작용 생리활성물질 단리 및 약리적 효능 검증	• 가수분해산물의 효능분석 통해 선별된 생리활성물질 유효성 평가 및 대량분리 정제 • 가수분해산물의 천식, 고혈압 예방 등의 시제품에 대한 기능성 검증	100	- MPLC에 의한 생리활성물질의 대량 분리정제 - 가수분해산물의 면역조절 효능 및 ACE 저해활성 분석
	제2협동과제: 국내 자생 더덕의 우량품종 선발, 육성 및 생물공학적 기법을 이용한 대량생산 시스템 확립	• 바이오리엑터를 이용한 배양근 생산시스템 확립	100	- 삼각플라스크에서 증식된 더덕의 부정근 및 캘루스를 재료로 이용 · 적정 접종밀도, 적정 배지, 생물반응기 내 공기주입량에 따른 생장량 · LED 광원에 부정근 및 캘루스의 생장 조사 · 이상의 결과에 따라 생물반응기의 용량증가에 따른 연구 진행 · 더덕 우량품종의 부정근 배양기간별 기능성 물질 함량의 변화

3-3. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등)

4. 연구결과의 활용 계획 등

○ 더덕소재 최적 추출공정기술 확보로 관련 산업계와의 기술제휴 등을 통해 산업화에 활용할 계획임
○ 식품으로서의 소비패턴이 대부분 1차 가공에 한정되었던 더덕소재를 고부가가치화함으로서 건강기능식품 제조에 적극 활용할 수 있을 것임
○ 더덕 소재의 과민성면역 개선 효능분석 결과를 근거로 차별화된 고기능성 식품 생산에 활용
○ 더덕소재로부터 혈압강하 효능물질을 동정함으로서 기존의 합성화학약제를 대체하는 천연물 유래 항고혈압 약제 개발에의 활용 가능성
○ 지역사회 특산품 개발에 있어서 활용될 지자체 정책 자료로 제공
○ 국내 자생 및 재배 약용식물의 고부가가치화를 통해 농가 경제 활성화
○ 더덕사포닌 가수분해산물의 고기능성 천연소재로서의 활용가능성 제시
○ 기능성이 강화된 더덕의 대량생산기술 확립으로 고기능성 식품제조를 위한 천연소재의 안정적 공급
○ 품종육성법 및 생물공학적 기술의 다양한 응용기법의 각 산업체 및 연구단체에서의 활용
○ 우수한 품종개발 및 보급을 위한 데이터베이스로 이용

붙임. 참고문헌

Woo, S. J. and S. S. Ryoo. 1983. Preparation methods for atomic absorption and spectrophotometry of food samples. Korea J. Food Sci. Technol. 15 : 225-231.

Lee, S. R. 1992. Chemical constituent of Cynochum wilfordi, *Codonopsis lanceolata* and *Lxeris sonchifolia*. J. of Oriental Bot. Res. 5(1) : 25-29.

Jung, H. I., Y. B. Yun, O. D. Kwon, D. J. Lee, K. Back, and Y. I. Kuk. 2012. Differences in rice quality and physiochemical component between Protox inhibitor-herbicide resistant transgenic rice and its non-transgenic counterpart. Korean J. Weed Sci. 32 : 25-34.

AOAC. 1990. Official Methods of Analysis. 15th ed. Association of Official Analytical Chemists. Washigton, DC. p. 788

Kim, G. T. 2003. A Study on the Growth, Photosynthetic Rate and Chlorophyll Content of *Codonopsis lanceolata* by the Growing Sites. Jour. Korean For. Soc. 92(1) : 27-32.

Lee, S. P., S. K. Kim, B. S. Choi, S. C. Lee, and G. W. Kim. 1996. Changes of General Components and Aromatic Constituents in *Codonopsis lanceolata* Grown at The Native and Cultivated Area. Korean J. Plant Res. 9(3) : 230-238.

Kim, H. H. 1993. Studies on the growth·production and characteristics of Japanese and Korean *Codonopsis lanceolata*. M.S Diss., Tokyo Univ. of Agriculture, Tokyo.

Lee, S. P., S. K. Kim, B. S. Choi, S. C. Lee, and G. W. Kim. 1995. Growth and Aromatic Constituents of Wild and Domesticated *Codonopsis lanceolata* Grown at Two Different Regions. J. Korean Soc. Crop Sci. 40(5) : 587-593.

Ko, S. R., K. J. Choi, and K. W. Kim. 1996. Comparison of Proximate Composition, Mineral Nutrient, Amino Acid and Free Sugar Contents of Several Panax Species. Korean J. Ginseng Sci. 20(1) : 36-41.

Lee, S. K. 1984. Chemical compositions of dried wild and cultivated *Codonopsis lanceolata*. J. Korean Agricultural Chemical Society. 27 : 225-229.

Lee, S. R., E. S. Yoon, H. H. Kim, Y. S. Lee, and Y. Motoda. 1992. Effect of components and yield with different temperature in *Codonopsis lanceolata*. J. Oriental Bot. Res. 5(1) : 11-23.

Mortensen, L. M. and R. Moe. 1992. Effects of various day and night temperature treatments on the morphogenesis and growth of some greenhouse and bedding plant species. Acta. Hortic. 327 : 77-86.

Bertram, L. and P. Karlsen. 1994. Patterns in stem elongation rate in chrysanthemum and tomato plants in relation to irradiance and day/night temperature, Sci. Hortic. 58 : 139-150.

Erwin, J. E., R. D. Heins, and M. G. Karlsson. 1989. Thermomor-phogenesis in *Lilium longiflorum*. Amer. J. Bot. 79(1) : 47-52.

Tangeras, H. 1979. Modifying effects of ancymidol and gibberellins on temperature induced elongation in *fuchia* × Hybrida. Acta. Hortic. 92 : 411-417.

Moe, R. 1990. Effect of day and night temperature altemations and plant growth regulators on stem elongation and flowering of the long-day plant *Campanula isophylla* Moretti. Sci. Hortic. 43 : 291-300.

Nilwik, H. J. M. 1981. Growth analysis of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) 2. Interacting effects of irradiance, temperature and plant age in controlled conditions. Ann. Bot. 48 : 137-145.

Kim, I.H., H.H Kim, E.Y. Hong, J.S. Yun, T.Y. J.K. Hwang and C.H. Lee. 2003. Breeding of tetraploid in *Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC. by colchicine treatment. Plant Resources 6(3):188-194.

Tan, G.Y. and G.M. Dunn. 1973. Relationship of stomatal length and frequency and pollen-grain diameter to ploidy level in Bromus inermis Leyss. Crop Sci. 13(3):332-334.

Esen, A., K.S. Rebert and G. Giuseppe. 1978. Seed set, size, and development after 4x × 2x and 4x × 4x crosses in *Citrus*. Euphytica 27(1):238-294.

Park, K.J. 1994. Cold-hardiness tetraploid induced by colchicine treatment in mulberry seedlings (*Morus alba* L. Yongchonppong/Kaeryanppong). Korean J. Seric. Sci. 36(1):1-7 (in Korean).

Eenink A.H. and J.M. Alvarez. 1975. Indirect selection for tetraploidy in lettuce (*Lactuca sativa* L.). Euphytica 24(3): 661-668.

Kwon, S.J., S.K. Roy, K.Y. Cho, Y.J. Moon, S.H. Woo and H.H. Kim. 2015. The effective

approach to induce tetraploid plant of *Prunella vulgaris* for. *albiflora* Nakai. Korean J. Crop Sci. 60(1):107-113.

Park, Y. Y., M. S. Cho, and J. B. Chung. 2007. Effect of salt strength, sucrose concentration and NH_4/NO_3 ratio of medium on the shoot growth of *Wasabia japonica in vitro* culture. J. Plant Biotechnol. 34(3):263-269.

Kwon, S. J., J. H. Park, S. H. Woo and H. H. Kim. 2012. Effect of media components on organogenesis of tetraploid in *Prunella vulgaris* for. *albiflora*. Korean J. Plant Res. (Abstr.) 42.

Hwang, M. J., J. H. Yun, S. J. Kwon, U. D. Shin, and H. H. Kim. 2009. Masspropagation of *Hypericum patulum* by in vitro culture. Kor. J. Hort. Sci. Technol. 21 (suppl. I):161.

Li JP, Liang ZM, Yuan Z. (2007), Triterpenoid saponins and anti-inflammatory activity of. Codonopsis lanceolata Pharmazie., 62:463 – 466.

Yongxu S, Jicheng L. (2008), Structural characterization of a water-soluble polysaccharide from the roots of Codonopsis pilosula and its immunity activity. Int J Biol Macromol., 43:279 – 282

Ryu HS. Effect of Codonopsis lanceolatae Extracts on mouse IL-2, IFN-, IL-10 cytokine production by peritoneal macrophage and the ratio of IFN-, IL-10 cytokine (2009), Kor J Food Nutr., 22:69 – 74

Kim, E., Yang, WS., Kim, JH and JY. Cho. (2014), Lancemaside A from Codonopsis lanceolata modulated the inflammatory response mediated by monocytes and macrophages, Mediators of Inflammation: 405158

Joh, EH., Lee, IA., Han, SJ., Chae, SJ., and DH. Kim (2010), Lancemaside A ameliorates colitis by inhibiting NF-κB activation in TNBS-induced colitis mice, Int. J. of Colorectal Dis., 25(5): 545-551

<뒷면지>

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구보고서입니다.

2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.

3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.