

GOVP1199705530

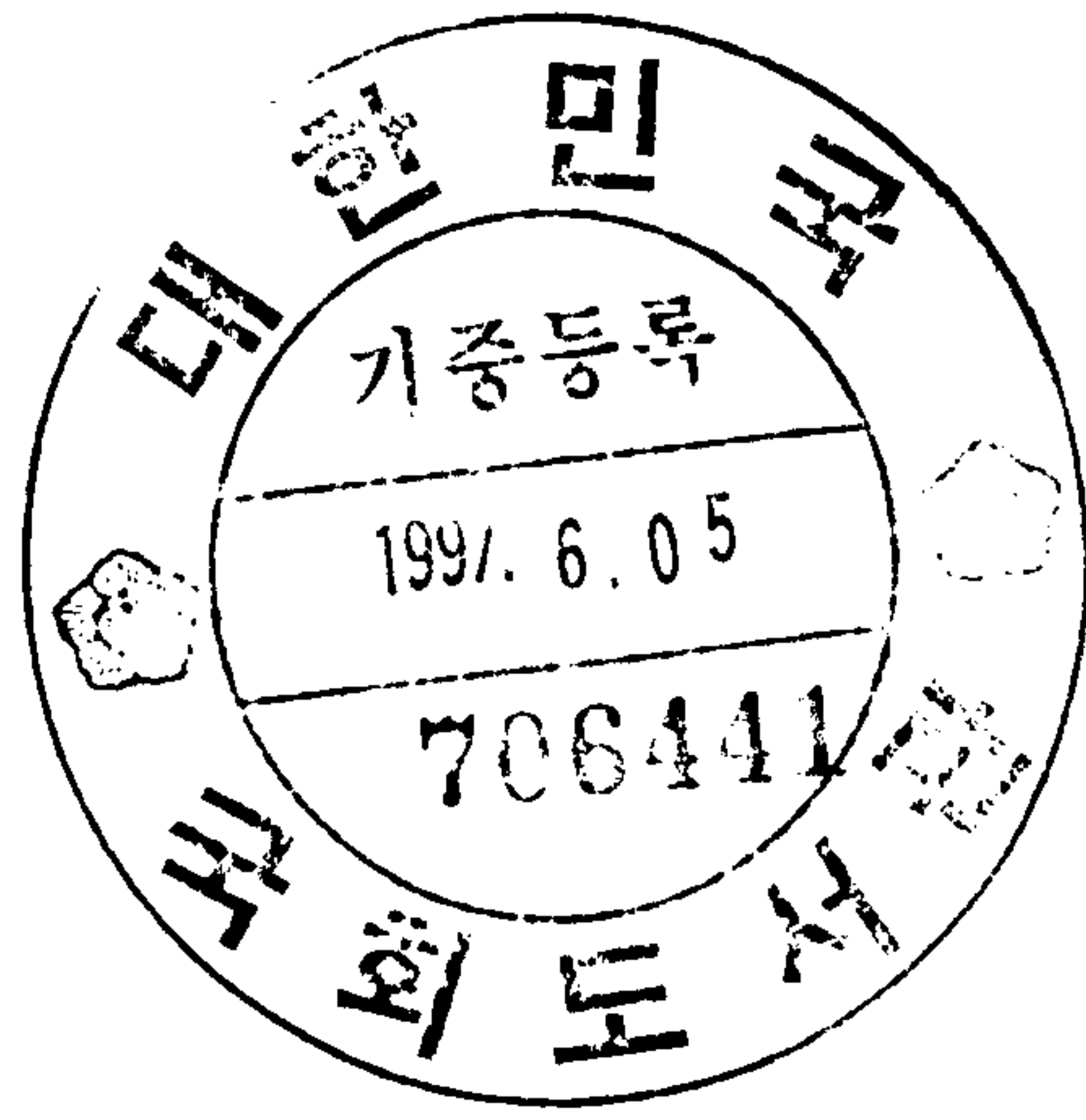
제 2차년도
최종보고서

다년생도라지의 약리작용에 기초한
건강식품 소재의 개발

Development of the material for health food
using medical action of a perennial
Platycodon grandiflorum

연구기관
경상대학교 자연과학대학

농 립 수 산 부



최 종 보 고 서

1996년도 농림수산특정연구사업에 의하여 완료한 다년생 도라지의 약리작용에 기초한 건강식품소재의개발에 관한 연구의 최종보고서를 별첨과 같이 제출합니다

- 첨 부: 1. 최종보고서 8부
2. 최종보고서 디스켓 1매

1997. 1. .

주관 연구기관 : 경 상 대 학 교

총괄연구책임자 : 성 낙 주 (인)

주관연구기관장 : 경상대학교 총장 (직인)

농 립 수 산 부 장 관 귀 하

제 출 문

농림수산부 장관 귀하

본 보고서를 “다년생도라지의 약리작용에 기초한 건강식품 소재의 개발에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

1997. 1.

주관연구기관명 : 경상대학교 자연과학대학

총괄연구책임자 : 성 낙 주

연구 원 : 고 영 희

연구 원 : 전 효 곤

연구 원 : 강 인 수

연구 원 : 정 영 철

연구 원 : 김 양 우

연구 원 : 김 정 균

연구 원 : 강 신 권

연구 원 : 이 수 정

연구 원 : 이 성 호

요 약 문

I. 제 목

다년생도라지의 약리작용에 기초한 건강식품 소재의 개발

II. 연구개발의 목적 및 중요성

지금까지 보고된 도라지에 관한 문헌을 수집하여 정리한 후 2년생 도라지의 약리성분과 생리적 활성을 토대로 22년생 도라지의 특수 성분을 분석하여 이들 물질의 약리작용을 *in vivo* 와 *in vitro* 상태에서 확인 한 다음, 22년생 도라지에 많이 함유되어 있는 성분의 생리활성과 구조해석을 진행하여 건강보조식품 개발 및 산업화에 적용함으로써 고소득 작물로 육성하고, 동시에 국민 보건 향상에 기여한다.

III. 연구개발 내용 및 범위

다년생 도라지의 건강식품 소재화에 요구되는 주요 실험을

1. 4년생 및 다년생 도라지의 성분 분석 및 비교
2. 다년생도라지의 유용물질 검색 및 활성 검사
3. 다년생도라지를 이용한 각종 건강 보조식품의 소재화로 대별하여 진행하였다.

IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

2~4년생과 22년생 도라지의 약리성분에 대한 검색 및 효능이 부분적으로 완료되어 이들 실험 결과를 기초한 4종의 건강보조식품이 개발되었고, 또한 다년생 도라지 재배자 (77농가)를 중심

으로 결성된 “성호 다년생 도라지 영농조합 법인”에 이들 제품생산에 관한 기술을 이전하여 산지가공공장 설립을 1996년 12월에 완료하여 1997년 2월 부터 연간 24억~30억 상당의 제품이 생산될 계획이다.

SUMMARY

Platycodon radix is a dried root of *Platycodon grandiflorum* (*P. grandiflorum*) A. DC, a perennial grown on the hills and fields in Korea and Japan, or cultivated in various districts. The roots of *P. grandiflorum* have been used as an expectorant in the symptoms of cold, cough, asthma and pulmonary tuberculosis and as valuable for the control of pleuritis in oriental medicine. As folk medicine, it is used in cough with sputum, tonsillitis, laryngeal pain, pulmonary pain, pertussis and inflammatory diseases. Recently, *P. grandiflorum* was succeeded in cultivating for a long period above 22 years old and has generally been employed as folk remedy for diseases of adulthood such as hyperlipidemia, hypertension and diabetes. Thus, this study was performed to ultimately develop the materials for health food using 22 years old *P. grandiflorum* by investigating effective medical compounds and examining their medical action *in vitro* and *in vivo*. As the first step, the chemical compositions and effective compounds of 4 years old and 22 years old *P. grandiflorum* were analyzed and compared. The contents of crude saponin, dietary fiber, inulin, inorganic elements showed slight difference between 4 years and 22 years old *P. grandiflorum*. Particularly, the significant difference of inulin oligomers from

G-F₂ to G-F₉ in 4 and 22 years old roots suggested conformation change according cultivation period. To determine contents of inorganic elements of *P.grandiflorum*, the ethanol extracts of *P.grandiflorum* according to cultivation period were analyzed by atomic absorption spectrophotometer. There was not a significant difference in Fe, Al, Ca, K according to cultivation period, while Mg and Ca in water extracts were highly increased according to the elongation of cultivation period.

Extracts of ethanol and methanol isolated from 4 and 22 years old roots were analyzed by HPLC. The results showed two different peaks which represented higher peak area in 22 years old root than that in 4 years old root. To identify above compounds, various instrumental analyses were performed for petrelum, diethyl ether fractionation HPLC fraction, and the major compound was estimated to be steroid. This steroid had the free radical removal activity but did not show cell toxicity.

Ethanol and water extracts of 4 and 22 years old *P. grandiflorum* were tested for their antimicrobial activities against 15 types of strain. The ethanol extracts of 22 years old root inhibited the growth of all test organisms except *Rhizopus javanicus*. Minimal inhibition concentration against 15 types of strain, pH, temperature stability and extraction condition of antimicrobial agent were investigated.

To identify the major antimicrobial compound in the extracts of *P.grandiflorum* , various instrumental analyses were performed for ethylacetate fractionation, silica gel column chromatography and HPLC.

When a antimicrobial compound was analyzed with ¹³CNMR, MS, DEPT, ¹HNMR, ¹H-¹HCOSY spectra and IR spectra, the major antimicrobial compound of *P.grandiflorum* fractionate was thought to be a glyceyl linoleite.

To study the effect of *P.grandiflorum* feeding on serum and liver lipid concentrations, diet-induced hyperlipidemic rats were fed diets containing 5% and 10% *P.grandiflorum* powder for 3 weeks. The *P.grandiflorum* feeding markedly decreased both serum and liver lipid concentrations in hyperlipidemic rats. Especially, 5% *P.grandiflorum* diet significantly decreased the concentrations of total cholesterol and triglycerides in serum and liver as compared with those of the hyperlipidemic control group. Dietary *P.grandiflorum* also induced a reduction in low-density lipoprotein(LDL)-cholesterol as well as an increase in the concentration of high-density lipoprotein(HDL)-cholesterol in serum. Furthermore, the atherogenic index was also low in rats fed *P.grandiflorum* diet. These results indicated that dietary *P.grandiflorum* may have a beneficial effect on preventing hypercholesterolemia and hyperlipidemia.

When methanol extracts of *P.grandiflorum* were treated in

B16-F1 mouse melanoma cell from 0.0031 to 1.0 mg/ml, laminin binding inhibitory activity at the concentration above 0.125 μ g/ml was observed up to 100%.

When inulin oligomer below G-F20 was administered intraperitoneally to the mice at a dose of 60mg/kg, it enhanced the accumulation of the peritoneal exudate cells, macrophage and polymorphonuclear leucocytes, thereby indicating immunopotentiality.

Antiinflammatory action of water extract isolated from *P.grandiflorum*(A), water extract isolated from medicinal herbs(14 types, B), the mixture of A and B, was investigated using Kubo et al method which was injected a heat killed-*Mycobacterium histolyticum*(0.6 mg/rat) in rat, and then determined the edema size until 20 days. Antiinflammatory and antirheumatism activity was only observed in rats fed medicinal herbs diet(40mg/day) or the A and B mixture diet.

This study was designed to observe the effects of the feeding *Platycodon grandiflorum*(6 or 22 years) extract on the improvement of the blood glucose, lipids in the serum and liver of alloxan-induced hyperglycemic rats(S.D. strain(♂), alloxan monohydrate 15mg/kg B.W/day, I.P. injection) for 3weeks. Concentrations of blood glucose were significantly higher in the alloxan administration(I.P.) groups(groups 2, 3 and 4) than in the control group(group 1, basal diet). Blood glucose concentrations were remarkably lower in the group 3(basal + alloxan + 6 years

Platycodon grandiflorum) and 4(basal + alloxan + 22 years *Platycodon grandiflorum*) than in the group 2(basal + alloxan), and particularly, lower in the group 4.

Concentrations of total cholesterol and LDL in serum were significantly lower in the groups 3, 4 than in the group 2, and remarkably, lower in the group 4 than in the group 3. Concentrations of HDL-cholesterol in serum were the highest in the group 1. And groups 3 and 4 were higher than in the group 2. Atherosclerotic index were lower in the group 3, 4 than in the group 2. In the alloxan-induced diabetic groups(groups 2,3,4), the serum free cholesterol, cholesterol ester, triglyceride and phospholipid concentrations were significantly lower in the group 3, 4 than in the group 2. Contents of total cholesterol, triglyceride and phospholipid in liver were remarkably lower in the all experimental groups than in the group 2. The activities of aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase and lactate dehydrogenase in serum were the highest in the group 2, but the other groups were rather lower.

From the above research, the *Platycodon grandiflorum*(6 or 22 years) extract were effective on the improvement of the blood glucose, lipid compositions in serum and liver. And particularly, *Platycodon grandiflorum*(22 years) were the more than in the *Platycodon grandiflorum*(6 years).

Four types of health food were developed using above results; concentration type, hardcapsule type, tablet type and retort pouch type.

CONTENTS

I . Introduction	11
1. Purpose and Scope of R & D	11
2. Results Anticipated	13
3. Plan for Practical Use	15
II . Analysis and Comparison of Major Effective Compounds between 4 and 22 Years <i>P. grandiflorum</i>.	16
1. Introduction	16
2. Materials and Methods	17
3. Results and Discussion	26
III . Screening and Activity Test of Major Effective Compounds from a Perennial <i>P. grandiflorum</i>	48
1. Introduction	48
2. Materials and Methods	49
3. Results and Discussion	62
IV . Development of Health Food using a perennial <i>P.</i> <i>grandiflorum</i>	90
1. Introduction	90
2. Materials and Method	91
3. Results and Discussion	92
V . Summary	98

목 차

제1장 서론	11
제1절 연구개발의 목적과 범위	11
제2절 기대되는 성과	13
제3절 실용화 방안	15
제2장 4년생 및 22년생 도라지의 성분분석 및 비교	16
제1절 서설	16
제2절 재료 및 방법	17
제3절 결과 및 고찰	26
제3장 다년생 도라지의 유용물질 검색	48
제1절 서설	48
제2절 재료 및 방법	49
제3절 결과 및 고찰	62
제4장 건강보조식품의 개발	90
제1절 서설	90
제2절 재료 및 방법	91
제3절 결과 및 고찰	92
제 5 장 결 론	98

제 1 장 서 론

제 1 절 연구개발의 목적과 범위

도라지(길경)는 한방에서 배농, 거담제로 주로 사용되는 생약재로서 도라지가 배합되어 있는 한방 처방수는 동의보감에 278건, 방약합편에 49건에 수록되어 있을 정도로 다양한 약리작용을 지닌 중요한 식물이다. 도라지의 식물화학적 연구가 1940년대부터 일본의 연구자들에 의해 시작되어 약리성분인 terpenoid계 saponin이 발견된 후 1974년부터 국내에서도 서울대 생약연구소의 이은방 박사팀 등이 도라지 약리 물질인 platycodin의 약리작용을 광범위하게 조사하였다.

이 연구에 의하면 도라지는 ① 중추억제작용(진통,해열 및 진정작용) ② 항염증작용 ③ 위궤양 예방및 치료작용 ④ 혈압강하작용 ⑤ 항choline효능성 작용, intestinal propulsion의 억제 및 용혈작용이 있는 것으로 밝혀졌으며, 최근에는 Nakata등이 도라지내의 inulin이 항암효과가 우수하다는 연구결과를 보고 하였고, Hitokoto등은 독소를 생성하는 미생물의 독소생성능과 생육을 억제하는 효능을 발표한 것을 비롯하여 외국에서는 약리성분에 대한 연구가 활발하게 진행중에 있다. 그런데 지금까지 한방, 식용 및 실험에 사용되어온 도라지는 1~3년생의 도라지를 사용할 수 밖에 없었다. 그러나 이성호씨에 의해 재배에 성공한 다년생 도라지(22년생)에 대한 약리효과는 당뇨병, 고혈압, 동맥경화증, 협심증 및 혈액순환 장애등의 성인병 환자 그리고 기관지 질환 환자에게 투여하여 완치시킨 임상결과는 많이 보관하고 있으나 실험을 통한 연구결과는 거의 없고, 단지 본 연구책임자와 진주전문대 식품영양과 정영철 박사팀(본연구의 협동

연구개발자)에 의해 식품부패 및 병원성 미생물에 대한 항균활성이 확인되었고 또한 고지혈증 쥐와 당뇨병 유발 쥐에 도라지 추출물을 투여하였을때 치료효과가 있음이 관찰된 바 있다.

다년생 도라지는 1956년 이성호씨에 의해 재배연구가 시작되어 15년동안 실패를 거듭한 후 1991년에 재배방법에 대한 특허를 취득 하였으며, 현재 국내는 물론 세계에서 유일하게 15년 이상의 다년생 도라지 6만평(60,000x15kg=900톤)과 22년생 이상의 다년생도라지 2만평(20,000평x15kg=300톤)을 서부경남 일대의 4개면 120여 농가에 위탁재배 형식으로 집단화하여 농가소득 증대(평당 순수익 3,500원)에 기여하고 있다.

최근 22년생 도라지는 당뇨병, 고혈압과 동맥경화증 등의 심장순환기계 질환 그리고 기관지 질환 환자를 완치한 많은 임상 결과의 내용이 MBC TV(6시 내고향, 92년 11월 3일), KBS TV(농어촌 지금은, 94년 5월 8일), 주간조선(94년 4월호), 월간신시(93년 12월호) 등을 비롯한 각종 일간지에 보도된 바 있어 그 수요가 급격히 증가하고 있다. 그러나 1995년 부터 매년 2만여 평에 생산되는 22년생 이상의 다년생 도라지가 300여톤 (3,600억, 300톤x12만원/kg)에 달하여 현재 시판되고 있는 형태인 생도라지로서의 판매는 한계가 있어 우선 건강보조식품으로의 개발이 시급한 과제이다. 따라서 본 연구는 국내외적으로 연구가 거의 없는 다년생 도라지의 약리효능을 기초로한 건강보조식품을 개발하여 다년생 도라지의 공급을 안정화시켜 위탁재배농가에 고소득을 지속적으로 보장해 주고 궁극적으로는 부가가치가 높은 우루과이 라운드 대체작물로 발전시키는데 있다.

특히 1995년 1월 다년생도라지 재배자(77농가)를 주축으로 “성호 다년생도라지 영농조합 법인”을 설립하여 다년생도라지의 가공 공장 설립을 추진하고 있어 본 연구의 결과는 건강식품 개발에 매우

중요한 자료로 활용할 수 있다. 따라서 본 연구에서는 4년근과 22년근 도라지의 일반성분을 비롯한 몇몇 약리활성물질의 함량을 비교 분석 하고, 또한 22년근도라지에만 존재하거나 혹은 4년근에 비하여 특히 많이 함유되어 있는 유용물질을 분리하여 이들 물질의 활성 검사를 시도함으로써 궁극적으로는 22년근 도라지를 이용한 건강보조식품 개발을 위한 소재화 기초연구를 수행하였다.

제 2절 기대되는 성과

1. 농가소득 증대 측면

일반적으로 농가에서 재배하는 쌀, 보리, 고구마등의 재배시에 농비를 제외하면 평균 순수익이 평당 1,000원인데 비하여 다년생 도라지를 위탁재배한 경우에는 평당 3,000원(1-3년간), 4년 부터는 4,000원 으로서 3-4배의 순수익이 보장되어 약 110여 가구에 3억 4천만원에서 4억 6천만원의 농가소득이 보장되어 있고, 그리고 재배자 중심으로 영농조합법인이 결성되어 있어 이것을 이용하여 건강보조식품화가 되면 그 소득은 연간 최소 24억 이상으로 증가할 것으로 예상된다.

2. 지방 부존자원 활용측면

가. 다년생 도라지는 한번 심으면 비료, 농약이 필요없이 5년 이상을 재배하는 무공해 생약재이므로 관리와 노동력이 절감되는 장점이 있다. 따라서 농한기를 이용하기 때문에 다른 작물의 재배도 충분히 가능하다(주로2-3월).

나. 토질과 관계없이 도라지는 잘 생육하므로 휴경지 및 개간지 등을 활용할 수 있다.

다. 다년생 도라지가 가공식품화가 되면 공급이 확대되고 가격안정화에도 기여하기 때문에 다년생 도라지의 재배 면적 확대로 인하여 농한지, 휴경지, 개간지등의 활용이 증대될 것으로 예상된다.

3. 고용효과

주원료 생산을 위한 고용 및 가공식품 생산에 활용될 인원이 약 40~50명 이 될 것임.

가공식품 생산에 필요한 인원은 영농조합법인의 조합원 중심 또는 공장소재지 인근 농민을 대상으로 15명이 채용되어 97년 2월 부터 근무할 예정임.

4. 향후전망

다년생 도라지(최고 25년생)는 재배특허자이며 본 연구의 협동 연구자인 이성호씨와 110여가구 재배자만이 소유하고 있는 생약재로서 중국, 일본등에 최소한 향후 15년까지는 지속적인 수출이 가능하다. 따라서 다년생 도라지의 건강보조식품 및 의약화로써의 성공여부는 유용 물질의 약리효과를 구명하는데 있을 것으로 판단되어 지속적인 연구로 궁극적으로 의약품 개발로 부가가치를 높혀 수출을 계획중에 있음.

5. 학술적 효과

가. 1차년도에서 얻어진 년근별 도라지의 inulin의 fructose 중합도 차이는 도라지의 재배기간을 측정할 수 있는 기초 자료로 활용할 수 있다.

나. 동물실험에서 밝혀진 고지혈증 치료 효능, 혈당강하작용, 항균활성 및 암세포접착저해작용 등은 다른 한방제제의 혼용으로 상기

질환의 예방 및 치료제 개발에 이용될 수 있다.

6. 기타

현재 당뇨병, 고혈압, 천식, 폐렴, 관절염등에 탁월한 효과가 임상실험으로 증명되고 있어 국민보건증진은 물론 UR대체 식물로서 발전가능성이 매우 높다.

제 3절 실용화 방안

본 연구에서 얻어진 다년생 도라지의 유용물질 및 약리적 작용을 기초로 개발된 4종의 건강보조식품은 현재 다년생 도라지 재배자를 중심으로 결성된 “성호 다년생 도라지 영농조합 법인”에 이들 생산 기술을 이전하여 산지 가공 공장 설립을 완료하여 97년 2월 부터 생산할 예정이며 또한 향후 과학적 홍보 자료로 활용하고자 한다.

제 2 장 4년생 및 22년생 도라지의 성분분석 및 비교

제 1 절 서 설

도라지(길경, *Platycodon grandiflorum* A. DC)는 도라지과에 속하는 다년생 초로서, 한국, 일본, 중국 등에서 널리 자생하며 식용 및 약용으로서의 소비량 증가로 재배면적이 확대되고 있는 실정이다. 길경이 배합된 한방처방에는 방약합편에 49건, 동의보감에 287건이 수록되어 있을 정도로 유용한 생약재로서 기관지염, 천식, 소염, 배농, 보혈, 양혈 등에 오랫동안 광범위하게 처방되어 왔으나, 현재의 약리적 기초연구는 미흡한 수준이다.

도라지의 약리성분에 대한 연구는 Akiyama가 triterpenoid계인 platycodigenin을 분리한 것을 시초로 platycodigenin I, platycodigenic acid A, B, C 등의 구조가 규명되었으며, 그 외에 betulin과 α -spinasterol의 존재가 보고된 바 있고, 최근에는 도라지의 inulin이 특이하게 항암활성과 면역증강 효과가 있음이 보고되고 있다.

지금까지 도라지에 대한 모든 연구는 2~4년근 도라지만 사용할 수 밖에 없었으나, 본 연구과제의 협동연구자인 이성호씨에 의해 개발된 20년 이상의 다년생 도라지의 유용성분 및 약리적 효능에 대한 연구는 서부 경남 120여 농가, 약 10만평에 집단화 되어 있는 다년생 도라지의 건강보조식품 소재화에 큰 기여를 할 것으로 예상된다. 따라서 본 연구에서는 4년생과 22년생 도라지의 일반성분과 지금까지 보고 되어 있는 주요 성분에 대한 함량을 비교 분석함으로써 건강보조식품 개발에 필요한 기초 자료로 활용할 수 있을 뿐만

아니라 長生 도라지의 년수 측정에 기초 자료로 이용하고자 한다.

제 2절 재료 및 방법

1. 재료

본 실험에서 사용한 4년생 및 22년생 도라지는 수분함량이 15% 이하가 되도록 동결건조한 후 -40°C 의 냉동고에 저장해 두고 분석용 시료로 사용하였다.

2. 실험방법

가. 일반성분

수분은 상압가열건조법, 조지방은 Soxhelt 법으로 정량하였다.

나. 식이섬유

도라지를 세척 및 탈피한 후 세절하여 동결건조한 다음 Prosky-AOAO법에 따라 식이섬유를 추출하였고, 불용성 및 수용성 식이섬유 추출법은 Fig.1과 같다.

다. Saponin

Shibata등의 방법에 따라 시료 5g에 80% 메탄올 50ml을 가하여 70°C 에서 4회 추출하여 농축한 후 물 500ml을 첨가하였다. 여기에 에테르로 다시 4회 추출하여 물층을 분리하고, 부탄올과 물로 불순물을 제거하여 얻어진 조saponin을 TLC와 HPLC를 이용하여 동정 및 정량하였다(Fig.2).

라. 에탄올 추출물

시료 100g에 95% 에탄올 1,000ml를 가한후 homogenizer에서 125rpm으로 교반하면서 24시간 동안 추출하여 여과 (Whatman N0.2)

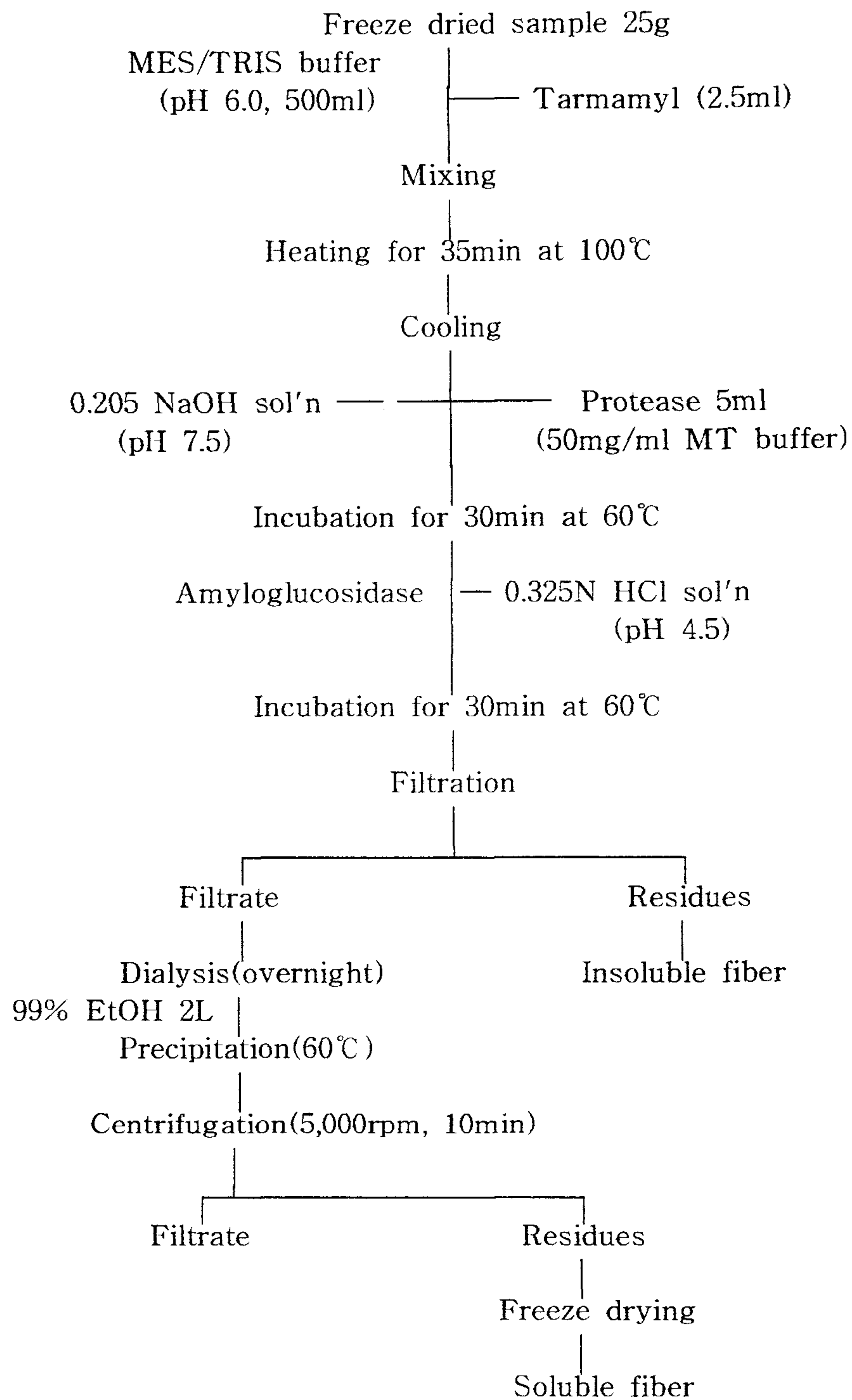


Fig.1. Extraction procedure of insoluble and soluble fiber from *Platycodon grandiflorum*.

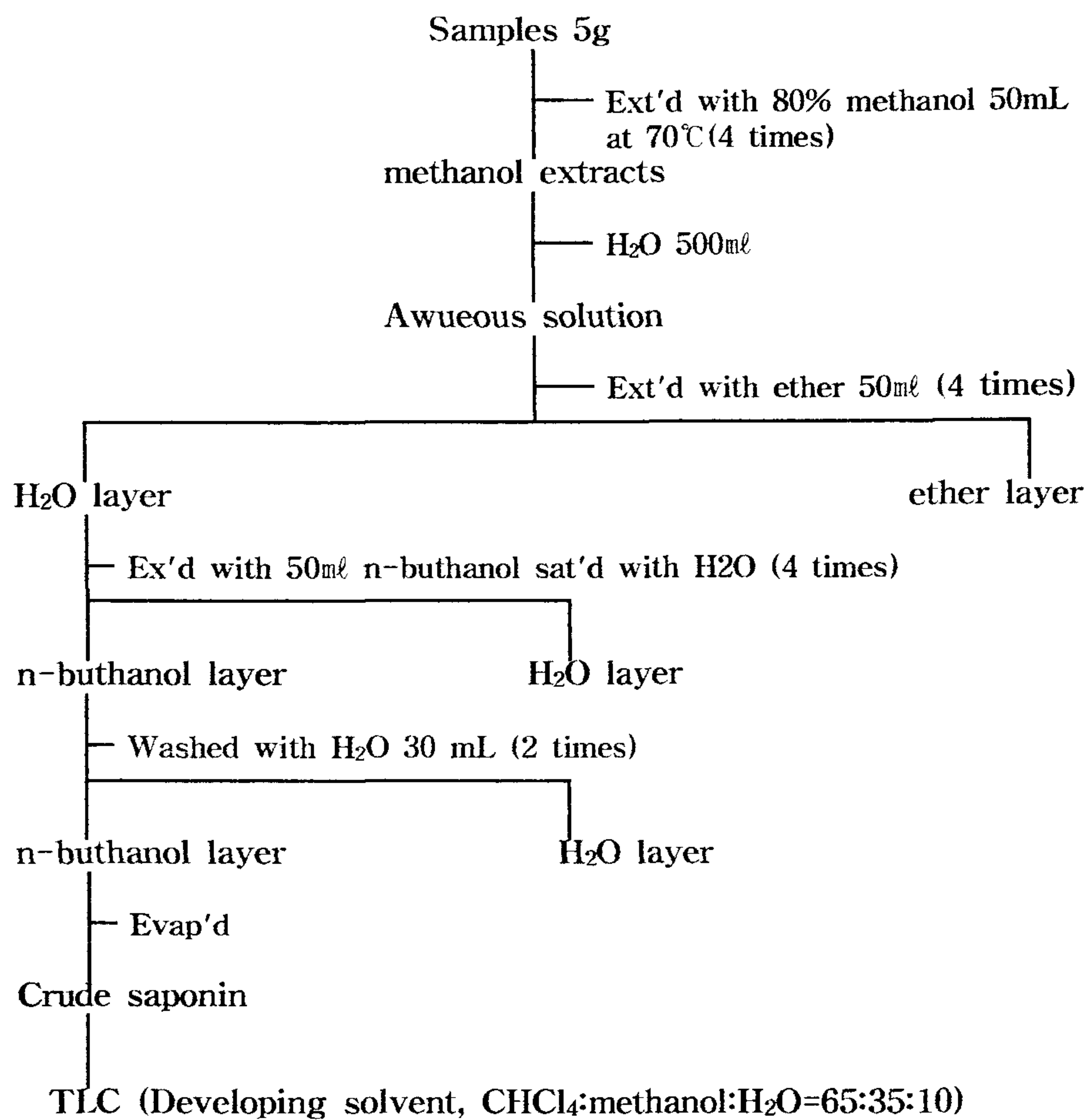


Fig. 2. Extraction procedure of crude saponin from *Platycodon grandiflorum*.

한 후, 잔사에 위와 같은 조작을 2회 반복하여 얻은 에탄올 추출액을 모두 합하여 회전 증발기로 농축하였다.

마. 이눌린

균질화된 도라지 300g을 70% 에탄올(물 v/v) 용액 2.5 l 에 침적하여 3주간 방치한 후 여과하여 여액을 30℃에서 진공증류하여 수층에 물을 가하여 1 l 로 만들었다. 이것을 1-butanol 500ml로 5회 추출하고 물층은 30℃의 진공상태에서 300ml가 될때까지 증류하였으며, 이것을 동결건조 시킨 결과 각각 22g과 21g의 고형분을 얻었다.

상기 고형분 1.5g을 물 20ml에 녹인 후 Charcoal과 Celite를 충전한 칼럼을 통과시킨 후 여과하여 1.2g의 고형성분을 얻었다(Fig.3). 이렇게 하여 얻어진 고형성분을 Table 1과 같은 조건하에서 HPLC(Senshu Pak-NH₂ column)로 분석하였다.

Table 1. HPLC conditions for inulin analysis.

Parameters	Conditions
Instrument	Waters 510 HPLC
Column	Senshu Pak-NH ₂ 8×250mm
Detector	Differential Refractometer R410, RI
Flow rate	2mL/min
Pressure	1000psi

바. 무기물

년근별 도라지(3,6,10,15,20,24년)를 95% 에탄올 및 열수로 각각 추출하여 무기염의 농도를 Atomic Absorption Spectrophotometer(Thermo JarrellAsh AA spectrophotometer 1000/4000)로 측정하였다.

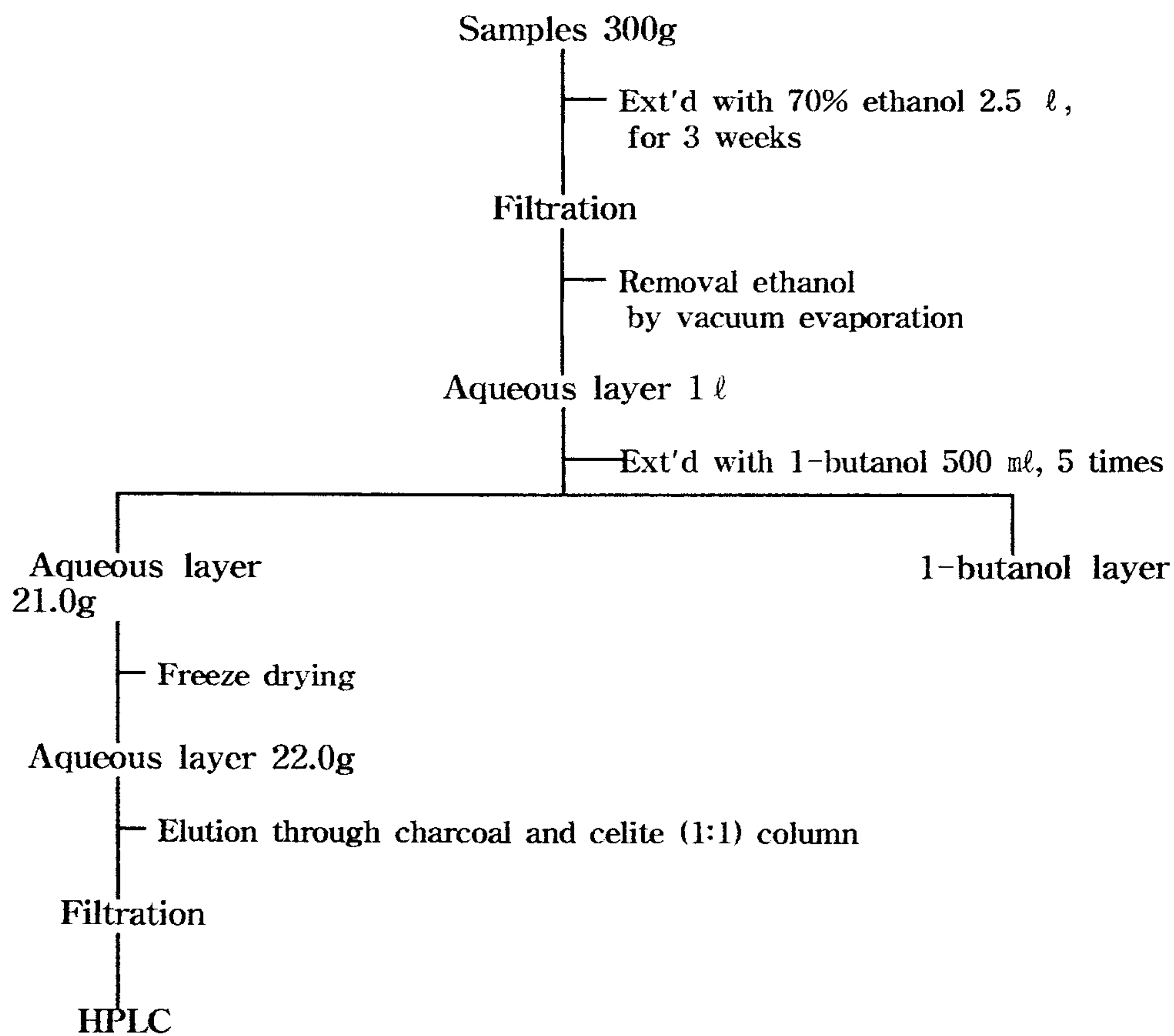


Fig. 3. Procedure for inulin analysis from *P. grandiflorum*

사. 식물 유용물질의 검색

Alkaloid는 Mayer 시약에 의한 백택 또는 백색 침전물을 확인하였고 phenolic compound와 flavonol, cholone 및 lactone은 적가하여 적색 또는 갈색의 정색반응을, aldehyde, sugar, 기타 환원성 물질은 Fehling 시약을 가하여 즉시 가열한 후 적갈색 또는 적색 침전을, 그리고 배당체류 및 당류는 2-% α -naphthol alcohol을 가하여 적자색 반응을 관찰하였으며, tannin 및 phenolic compound는 $FeCl_3$ 수용액을 가하여 자색 생성을, 단백질과 polypeptide는 Ninhydrin 반응을, terpenoid saponin과 steroid saponin은 농축물을 무수초산 1~2ml에 용해시켜 주변에 농황산 1ml을 가하여 혼합한 후 경계면에 생기는 적색 또는 녹색을 관찰하였다. 또한 essential oil은 알코올성 피크린 산의 알코올 포화용액을 가하여 적색 반응을 관찰하였으며, 유기산은 50% 알코올성 $AgNO_3$ 을 가하여 혼탁 또는 침전 정도를 관찰하였다.

아. 도라지 추출물의 HPLC

4년근 및 22년근 도라지 시료 100g에 80% 에탄올 500ml을 가하여 마쇄한 후 여과하였고, 잔사에 상기의 용매를 가하여 2회 추출하여 여과한 여액을 모두 합하여 감압농축하여 80% 에탄올 추출물로 하였고, 나머지 잔사는 30% 메탄올 1 l로 추출하여 30% 메탄올 추출물로 하였다. 추출물의 분석을 위한 고속액체 크로마토그래피의 조건은 TOSho 제 고속액체 크로마토그래피 장치를 사용하였고 column YMC pack ODS-AQ column을, 용매는 15% MeOH을 이용하였고 이때 유속은 1 ml/min이었다.

자. 22년근 도라지의 성분 분석

HPLC 분석에서 4년생 도라지와 성분함량이 확인된 성분의 구조 및 특성을 규명하기 위하여 Fig.4와 같이 처리하여 그 특성을 조사하였다.

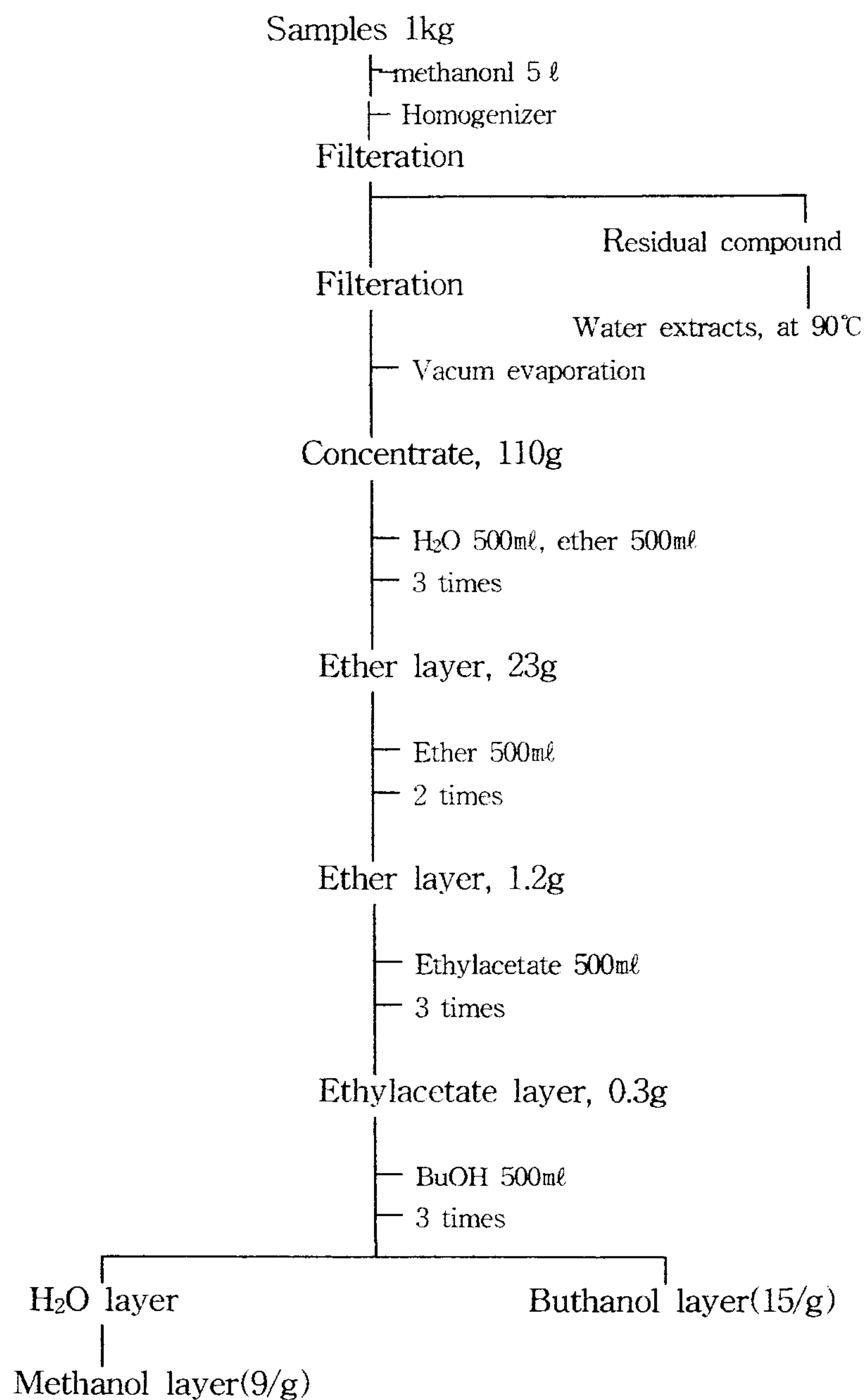


Fig. 4. Fractionation procedure of biologically active compounds from *P. grandiflorum*

차. 석유에테르와 에테르 추출물의 분획

석유에테르 용매로 충전한 Silicagel column(2.5x25cm)에 Silica와 함께 건조한 추출물을 loading 하여 석유에테르와 에테르의 비율을 10:0, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9, 0:10로 한 용매 300ml로 순차적으로 가하여 용출액을 각각 50ml씩 분획하여 254nm에서 최대 높은 흡광도를 보이는 8~21번 획분을 Phenomenex C₁₈-NH₂ 칼럼을 이용하여 3가지 화합물을 순수하게 분리하여 H-NMR, MS 및 IR등으로 구조분석을 행한 결과 14~16번 획분에서 steroid 성분으로 추정되는 물질을 Sephadex LH20 column과 결정화로 분리하여 TLC에서 전개하여 anisaldehyde-H₂SO₄ 용액에서 청색으로 발색되는 성분을 순수하게 분리하였다(Fig.5).

카. BuOH 추출물의 분획

Sephadex LH20 column에 MeOH를 사용하여 분획하였다.

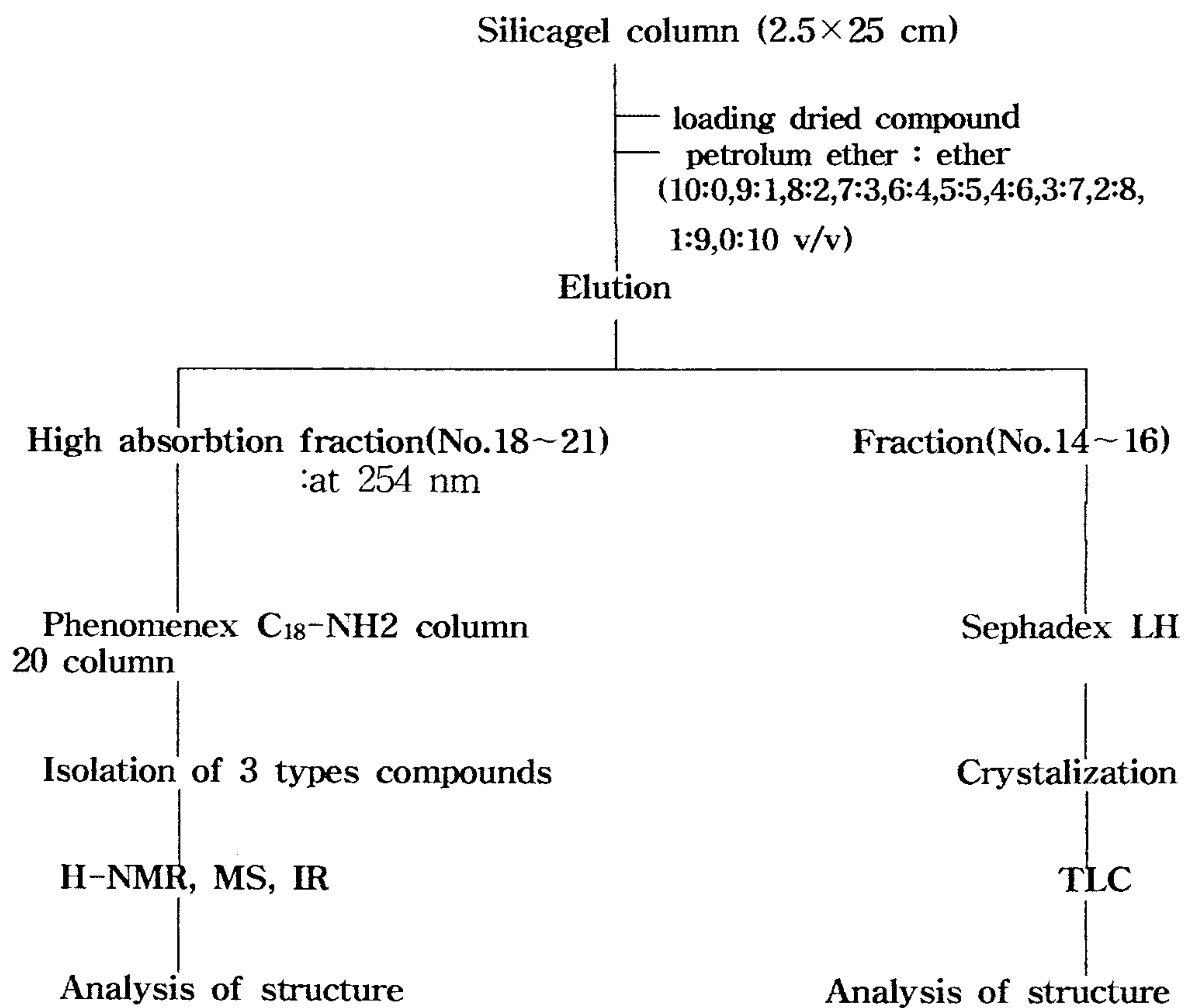


Fig. 5. Flow charts for Isolation of active compound from petroleum ether and diethylether fraction

제 3절 결과 및 고찰

1. 일반성분

4년근 및 22년근 도라지의 일반성분의 조성은 Table 2와 같다. 4년근과 22년근 도라지의 총 식이섬유의 함량은 각각 50.0%, 53.1%로서 섬유소의 총함량은 22년근 도라지에서 다소 높게 정량되었으며, 불용성 섬유질은 22년근에서 약 8.6%나 높은 반면 수용성 섬유질은 4년근에서 5.5%나 높게 정량되었다. 그리고 수분 및 에탄올 추출물의 함량은 년근에 따른 큰 차이를 보이지 않았으며, 도라지의 crude saponin은 3.0%, 3.4%로서 22년근이 4년근 보다 약 0.4% 높았는데(Table.2), 이는 인삼의 사포닌 함량이 5년근까지는 현저히 증가하나 6년근부터는 saponin함량 증가가 미미하다는 것과 비슷한 경향을 보였다.

Table 2. Chemical composition of *platycodon grandiflorum*

Composition\Year	4	22
Moisture	1.9	1.7
Crude lipid	1.0	1.0
Total dietary fiber	50.0	53.1
Insoluble fiber	32.0	40.6
Soluble fiber	18.0	12.5
Crude saponin	3.0	3.4
Ethanol extract	11.6	12.0

Fig.6은 년근별 도라지의 조사포닌을 TLC에서 관찰한 결과 18종의 사포닌이 확인되었으나 재배 년수에 따른 도라지의 사포닌 함량과 전체적 pattern에서는 큰 차이를 발견할 수 없었다.

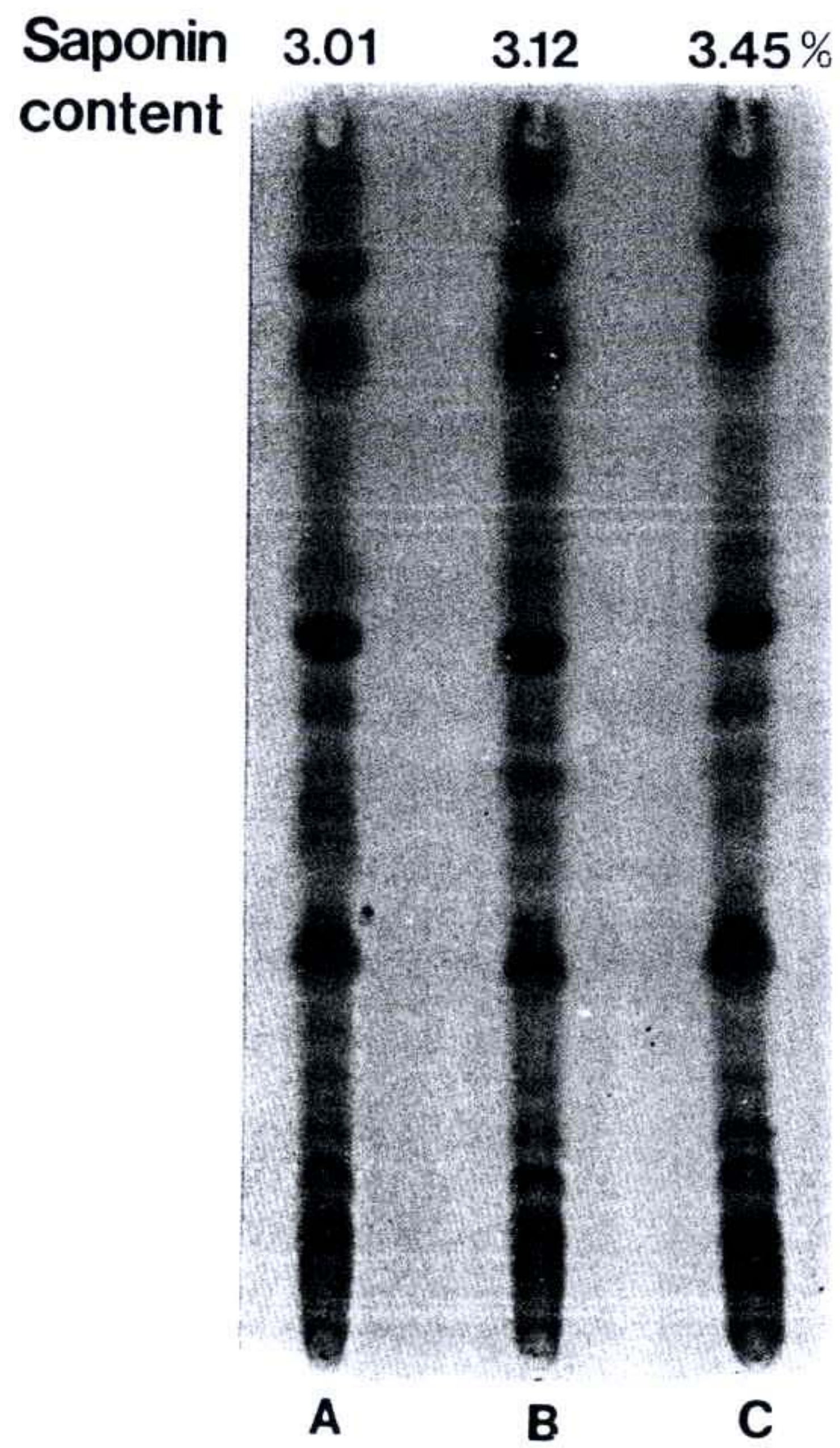


Fig. 6. TLC pattern of crude saponin isolated from *P.grandiflorum*, 4(A), 10(B) and 22 years old(C)

2. 이눌린 함량

도라지의 이눌린은 강력한 항암효과가 있음이 보고되었고, 또한 치커리의 이눌린은 당뇨치료 효과가 우수하다는 연구 보고를 기초로 년근별 도라지의 이눌린 함량을 조사한 결과 4년근은 73mg/g, 22년근은 70mg/g으로 거의 차이가 없었다. 따라서 fructose 중합체인 이눌린의 중합도에 차이가 있을 것으로 추측되어 fructooligosaccharide의 크기를 HPLC로 분석한 결과 몇가지 흥미있는 결과를 얻을 수 있었다.

Fig.7에서 보는 바와 같이 retention time 16.5분을 기준으로 하여 fructooligosaccharide 함유비를 보면 3년생 도라지의 경우는 16.5분 이전에 용출된 성분이 42.3%, 16.5분 이후 용출된 성분이 56.6%로서 전후 용출율이 14.3%에 불과하였으나 22년생 도라지의 경우는 16.5분 이전에 용출된 성분이 67.9%로 매우 높은 반면에 16.5분 이후에 용출된 성분은 27.9%로 매우 낮아 전후 용출율에 40.0%로 대차를 보이고 있다. 또한 물/에탄올로 추출한 후 나머지를 다시 물속에서 환류시켜 얻은 소량의 성분들에서도 상기와 같은 결과를 관찰할 수 있었다.

Fig. 8은 년근별 도라지 이눌린의 fructose 중합도의 pattern을 HPLC로 분석한 결과이다.

Fig.9에서 보는 바와 같이 물 추출물에서 분리된 이눌린의 fructose 중합도를 재배년수에 따라 3, 6, 10, 15, 20, 24년으로 세분하여 HPLC로 분석한 결과, 15년생 이상의 도라지에서는 fructose 중합도가 낮은 oligofructose 함량이 높게 검출되었다.

이 결과에서 2가지 중요한 사실을 유추할 수 있다. 첫째는 4년생 도라지와 22년생 도라지의 유효성분의 차이를 설명할 수 있으며, 또 구체적인 연구가 더 이루어지면 이들이 약리작용에 어떤 구실을 하는지 밝힐 수 있는 근거가 될 수 있으며, 다른 하나는 년근별 도라지들의 성분을 비교 분석하는 자료로서 이용될 수 있을뿐만 아니라 시판 도라지의 품질 평가에도 효과적으로

활용될 수 있으리라 판단된다.

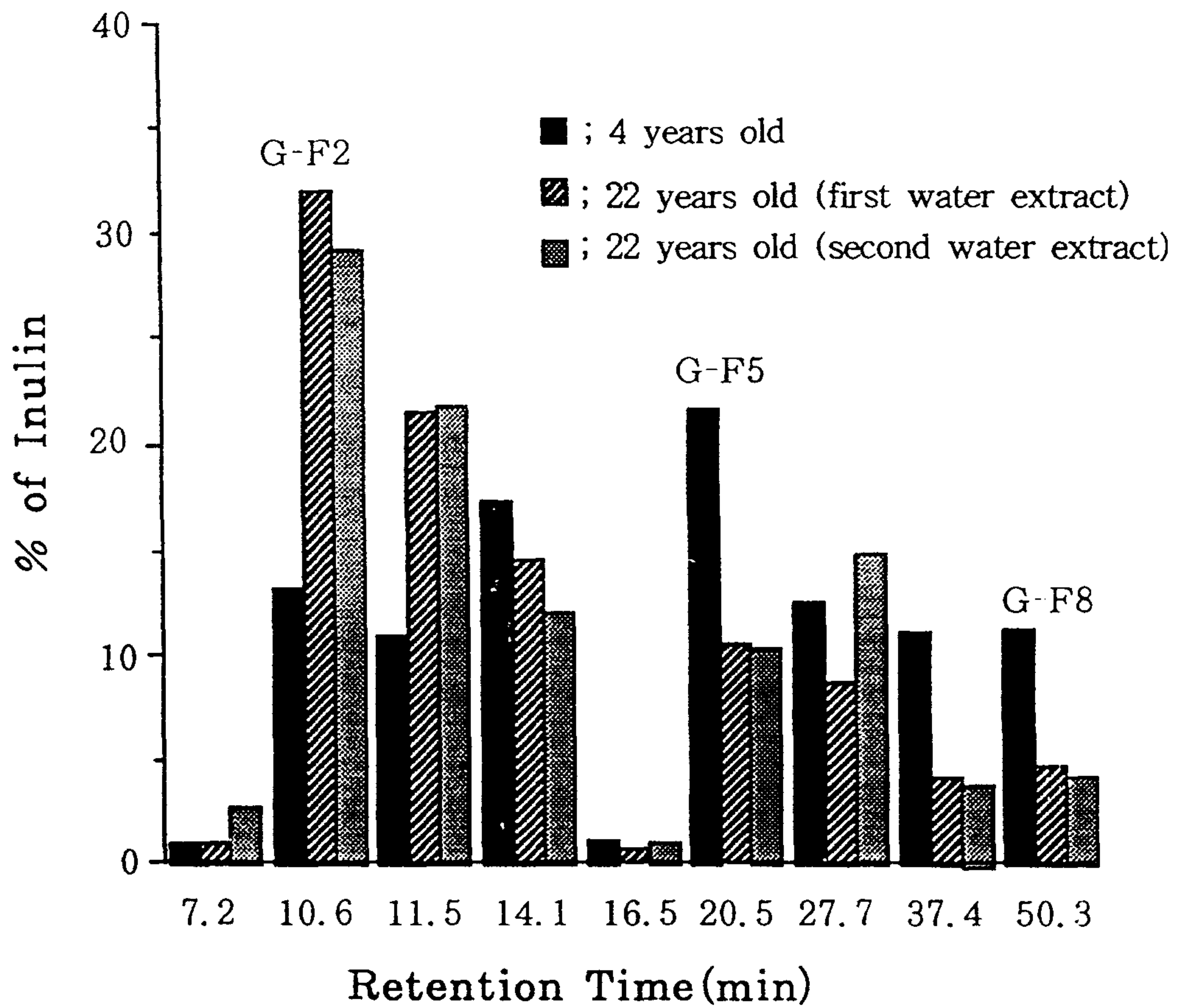


Fig. 7. Fructooligosaccharide content of inulin isolated from *P.grandiflorum*

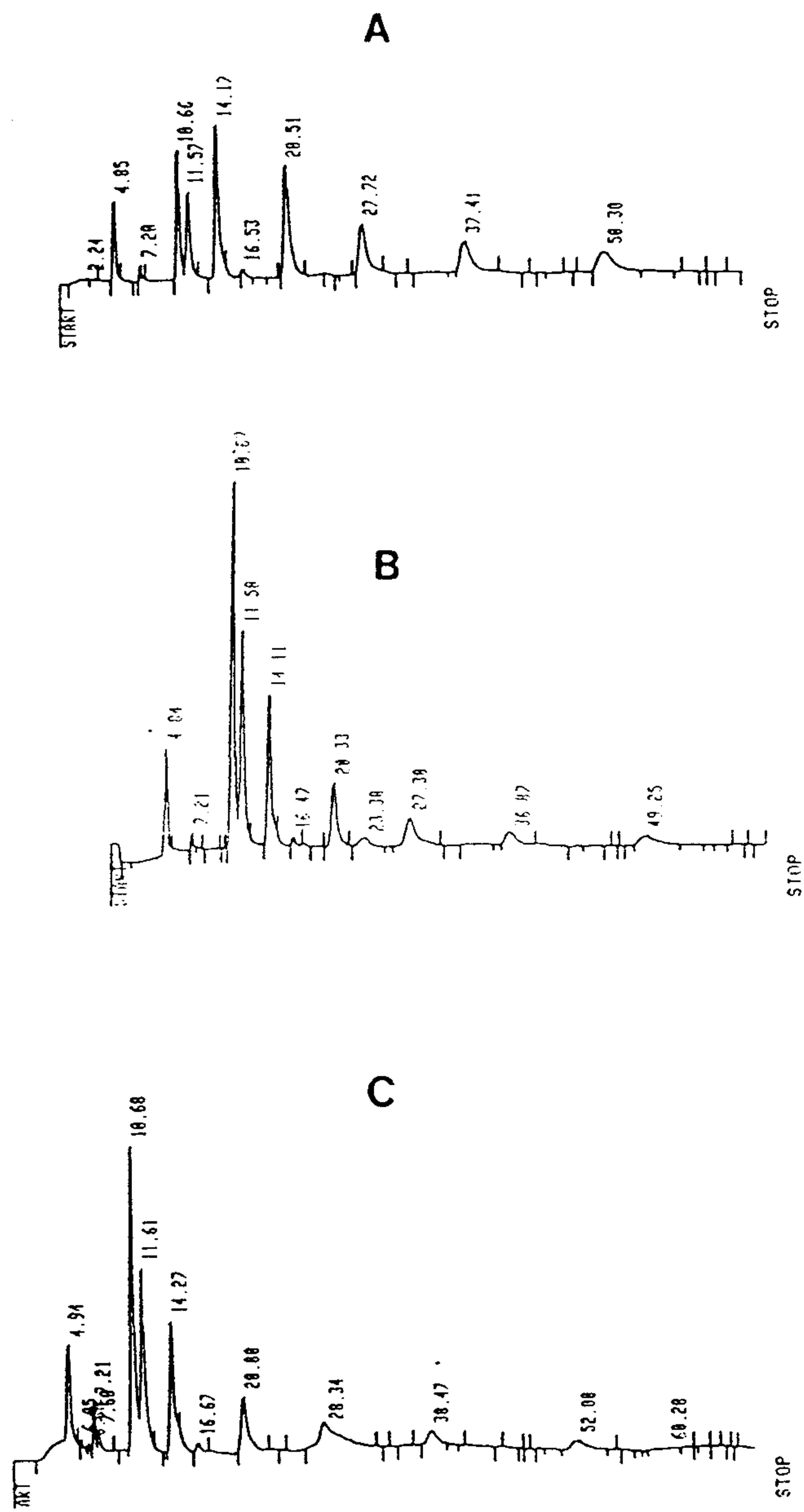


Fig. 8. HPLC pattern of fructooligosaccharide isolated from *P.grandiflorum*, 4(A), 22(B), and 22 years old(C)¹
 * 1, Second water extract

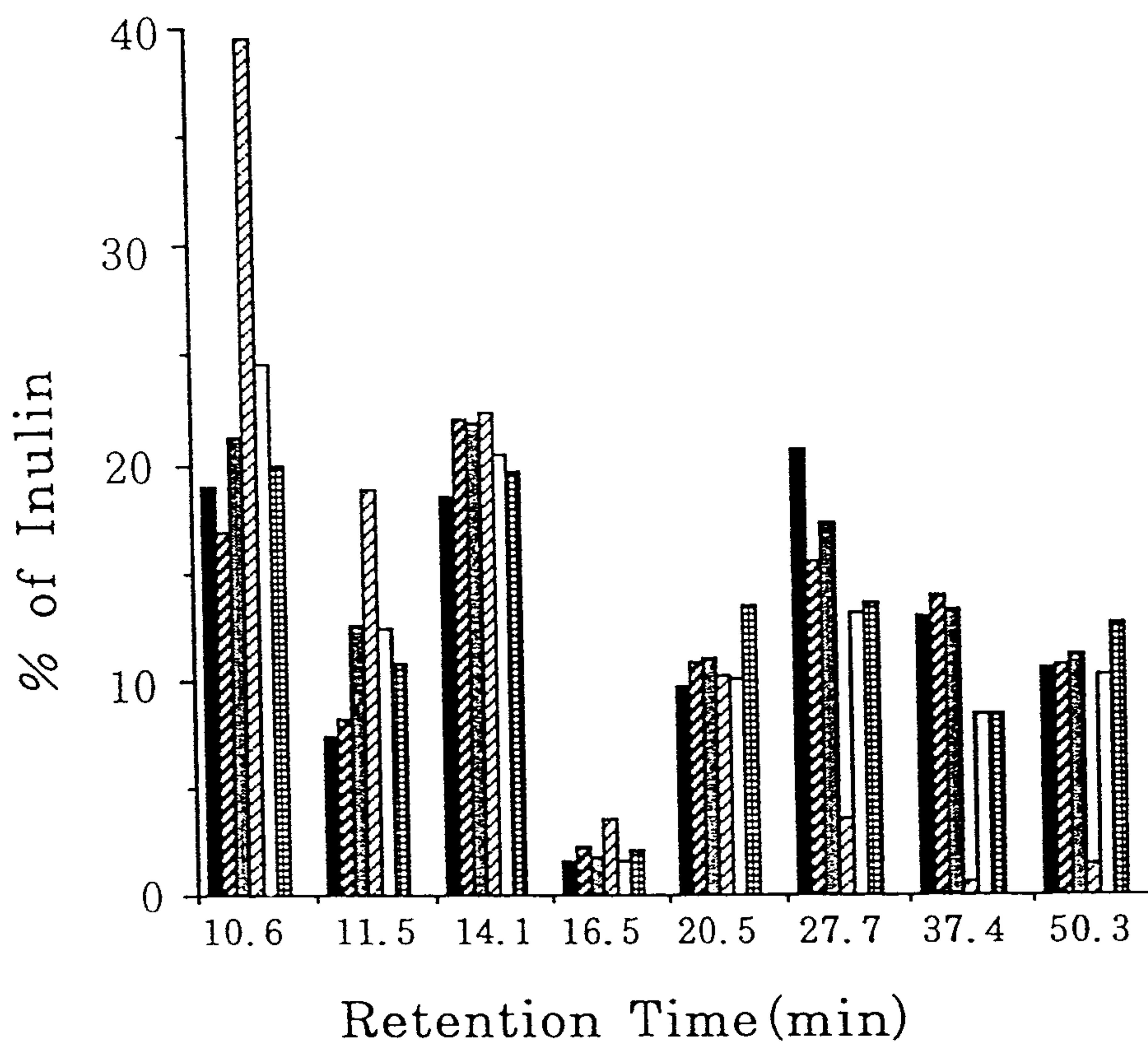


Fig . 9. Fructooligosaccharide content of inulin isolated from *P.grandiflorum* according to cultural years. Symbols represent cultural years ; 3(■), 6(▨), 10(▩), 15(□), 20(□), and 24(▤).

3. 무기물 함량

도라지의 무기염을 atomic absorption spectrophotometer로 분석한 결과의 chromatogram은 Fig.12과 같고, 무기염의 함량은 Fig.10, 11과 같다. Fig.10에서 보는 바와 같이 95% 에탄올 추출물에서 년근별 도라지의 무기염은 Fe, Ca, Al 및 K는 재배년수에 따른 함량의 대차를 찾아볼 수 없었으나 Mg와 Cu는 24년근 도라지에서 월등히 높은 함량을 보여 Mg은 24년 미만의 도라지에 비해 약 2.5 내지 3.1배, Cu는 약 8.2 내지 12.3배나 높게 정량되었다.

열수추출물에서의 년근별 도라지의 무기염 농도는 에탄올 추출물에서의 결과와 상이하게 나타났는데 즉, Ca과 K의 농도가 Fe, Mg, Al에 비하여 높게 검출되었고 특히 Ca의 농도가 재배년수에 따라 증가하여 24년생근에서는 3년근에 비하여 약4.5배 증가된 결과를 보였다(Fig. 11).

상기한 바와 같이 무기물의 함량이 생육기간에 따라 특정 무기물이 상당한 함량차를 보이는 것은 토양의 조성이나 기후에 밀접한 관계가 있을 것으로 생각되나 이와 같은 요인보다는 생육기간이 길어짐에 따라 특정 무기물의 축적이 주된 인자라 사료된다.

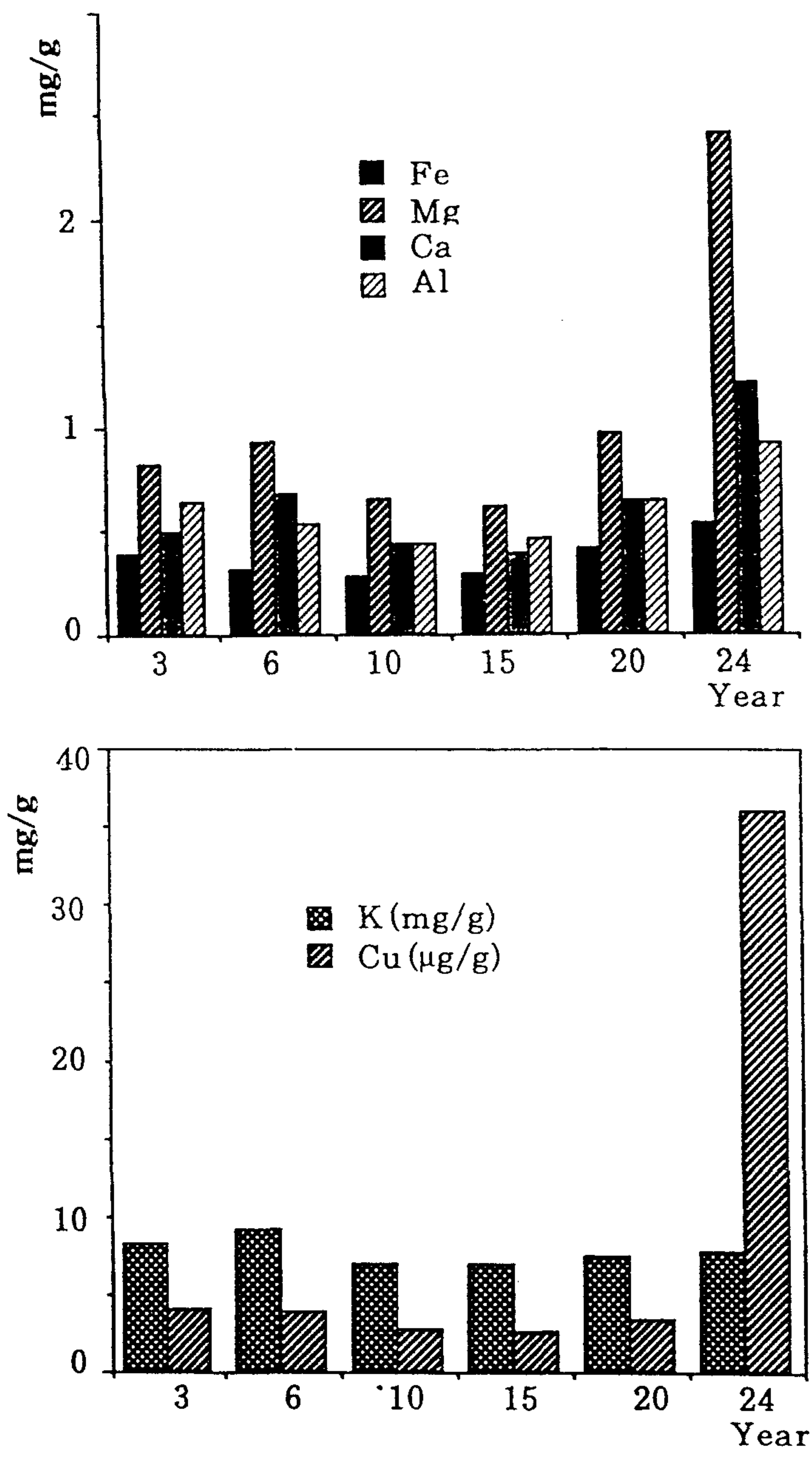


Fig. 10. Inorganic components of ethanol extracts from *P. grandiflorum*

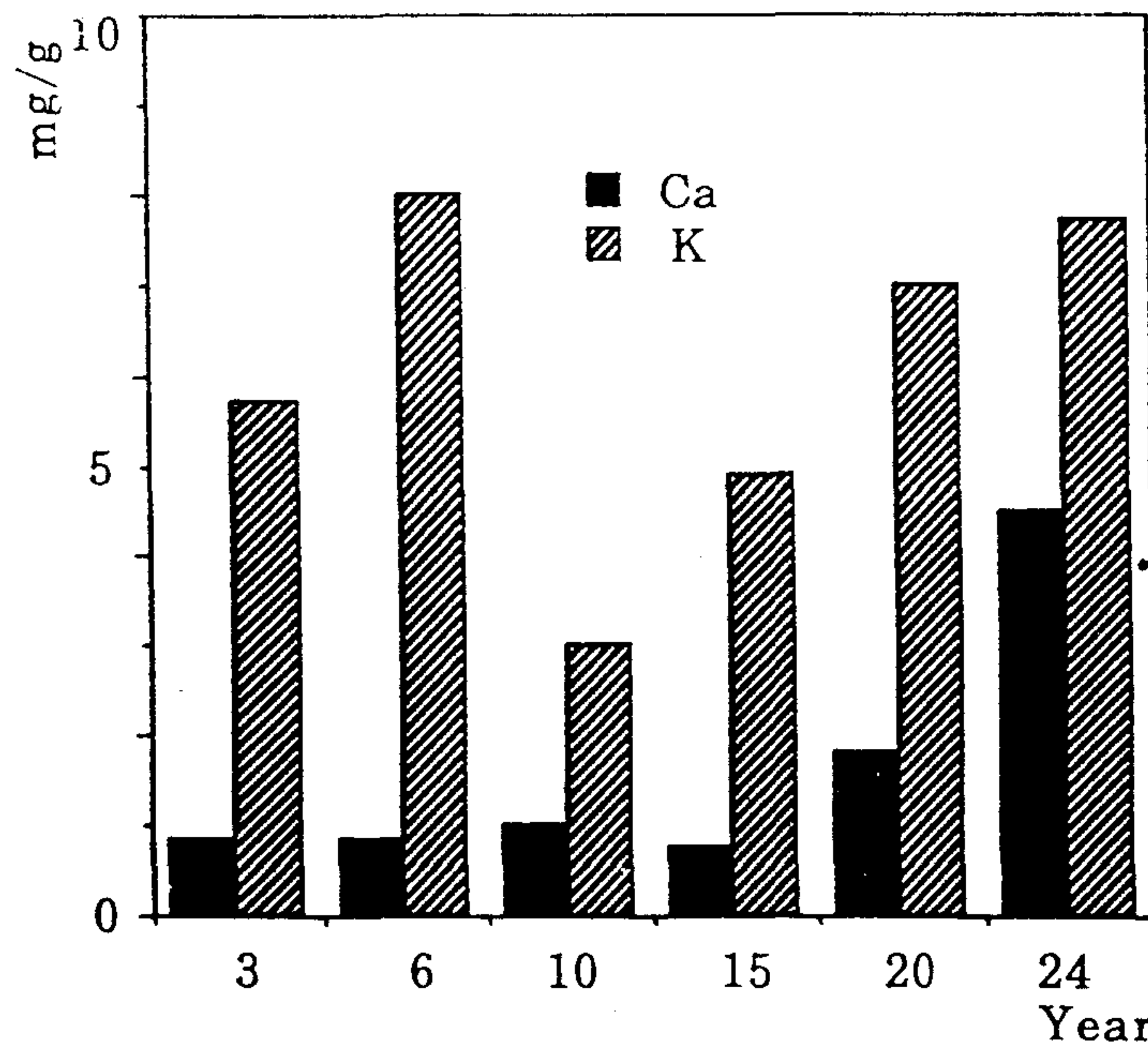
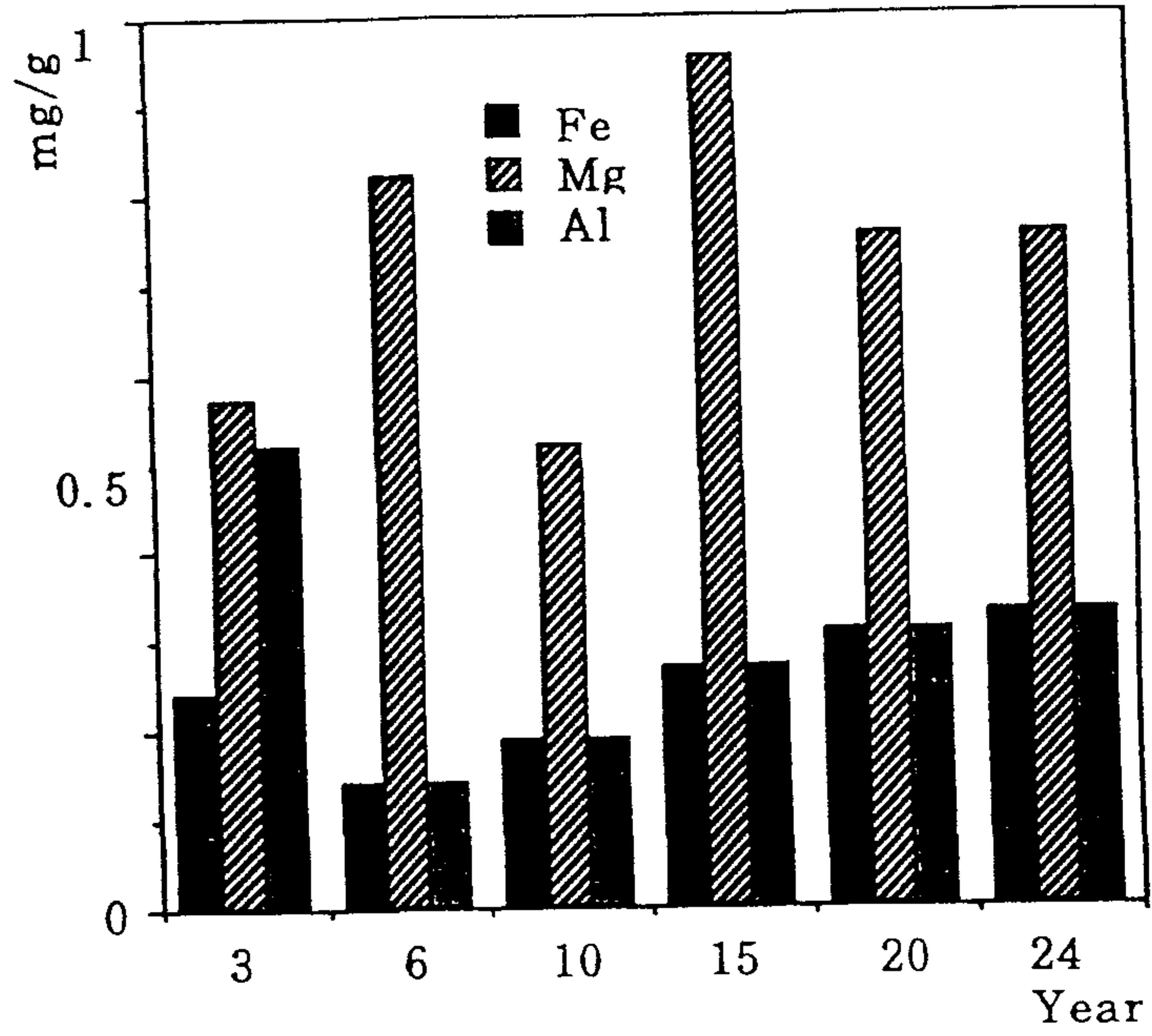


Fig.11. Inorganic components of hot water extracts from *P.grandiflorum*

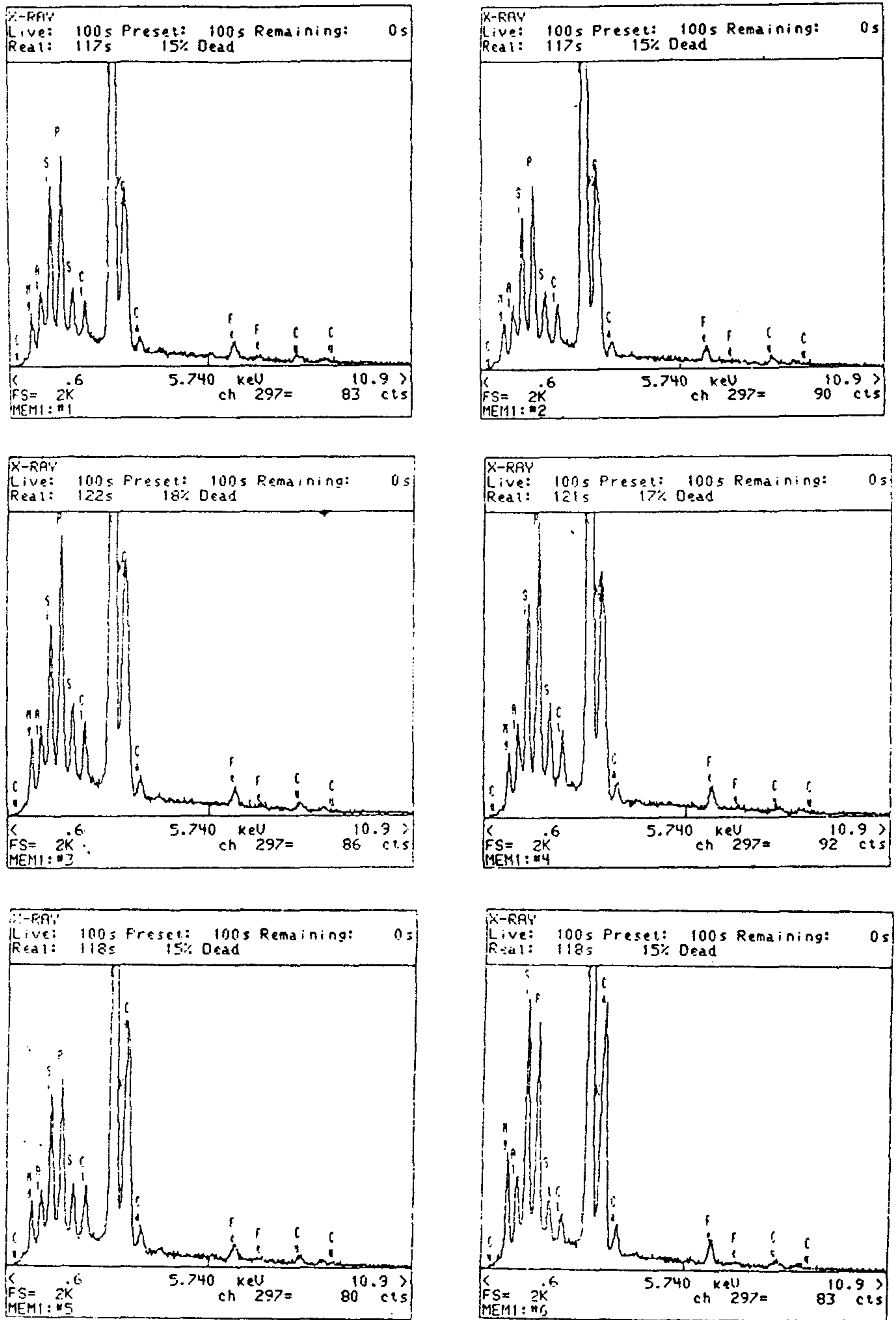


Fig. 12. Atomic absorption chromatogram of *P. grandiflorum* ethanol extracts. MEM 1 : #1(3 years), #2(6 years), #3(10 years), #4(15 years), #5(20 years), #6(24 years)

4. 유용물질 함량

Table 3은 유용물질이 온도에 따라 어떤 영향을 미치는가를 실험한 결과인데 특이한 것은 알칼로이드에서 뚜렷한 차이를 보였고, glycoside와 당류, 탄닌과 페놀 화합물에서 약간의 변화를 감지할 수 있었으나 나머지는 비슷한 경향을 보였다.

에탄올 농도에 따라 어떤 영향을 미치는가를 실험한 결과는 Table 4에서 보는바와 같이 에탄올 농도 55% 및 75%에서는 Aldehyde 와 당류, Glycoside와 당류가 뚜렷한 차이를 나타내었고, 또 Alkaloid는 35%를 제외한 나머지 농도에서는 뚜렷한 차이를 관찰할 수 없었다.

Table 3. Phytochemical screening of ethanol extract from *P. grandiflorum*.

Extraction Temperature (°C)	<i>P. grandiflorum</i> (Years)	Phytochemical compound								
		Alkaloid	Phenolic and favonoid	c. Aldehyde and suger	Glycosid and Suger	Tannin and Phenolic c.	Protein and polypeptide	Terenoid steroid saponin	Essential Oil	Organic acid
100	22	++++	±	-	±	+	+	-	-	++
	2	+	+	-	+	±	+	-	-	++
110	22	++	+	-	±	+	+	±	-	++
	2	±	+	-	-	+	+	-	-	++
120	22	++	+	±	±	+	+	-	-	++
	2	+	+	+	+	±	+	-	-	++

+ : positive, - : negative

Table 4. Phytochemical screening of water extract from *P. grandiflorum*

Ethanol concentration (%)	<i>P. grandiflorum</i> (Years)	Phytochemical compound								
		Alkaloid	Phenolic and favonoid	c. Aldehyde and suger	Glycosid and Suger	Tannin and Phenolic	Protein and c. polypeptide	Terenoid steroid saponin	Essential Oil	Organic acid
35	22	+	±	+	+	±	+++	±	+	+++
	2	++	±	±	+	-	+	-	-	+++
55	22	+++	±	++	++	±	+++	±	+	+++
	2	++	±	±	-	-	±	-	-	+++
75	22	+++	-	++	+++	++	++	±	+	+++
	2	++	±	±	±	-	+	±	-	+++
95	22	+++	-	-	+	++	+	++	±	+
	2	+	±	++	-	±	+	±	-	+

+ : positive, - : negative

5. 4년근 및 22년근 도라지 추출물의 HPLC에 의한 비교분석

가. 80% 에탄올 추출물의 HPLC분석

Fig. 13에 나타낸 결과와 같이 년근별 도라지의 성분 차이가 확인되었다. 즉, 22년근의 경우 11.40의 retention time(RT)을 가지는 peak의 양이 4년근의 11.71보다 약 3배정도 많이 존재하는 것으로 나타났고, retention time 5분과 6분대 peak는 22년근과 4년근에서의 차이는 관찰할 수 없었으나 retention time의 차이가 나는 것으로 보아 유용 성분의 유무와 상관성이 있을 것으로 추정된다. 그리고 RT가 낮은 부위에서 22년근의 함량이 4년근보다 높은 것으로 추정된다.

나. 30% 메탄올 추출물의 HPLC분석

30% 메탄올 추출물을 HPLC로 분석한 결과는 Fig.14과 같다. Fig.14에서 보는바와 같이 RT 6.91분대 부근의 peak를 보면 22년근 메탄올 추출물에서의 peak의 높이가 4년근에 비해 약 3배정도 높았으나, 반면에 5.08분대 부근의 peak는 4년근이 22년근에 비해 2배정도 더 높게 나타났다.

이같은 현상은 도라지의 생육기간이 길어질수록 어떤 특정 성분은 일정한 비율로 존재하나 또다른 성분은 생체내에서 합성되어 축적되기 때문이라 생각되며, 이들 성분들이 도라지 특유의 약리작용과 어떤 관련이 있을 것으로 추정된다.

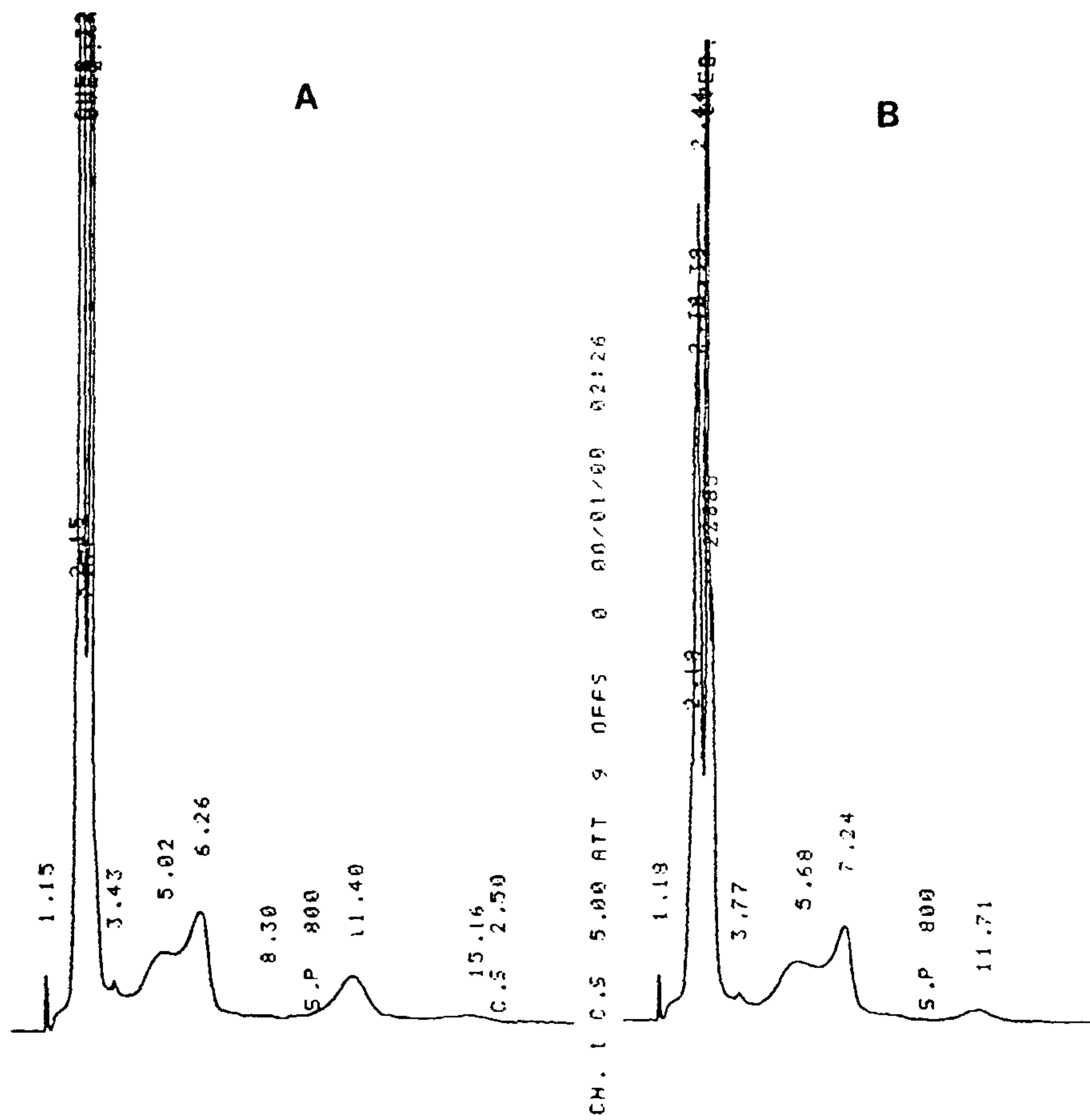


Fig. 13. HPLC profile of 80% ethanol extracts from *P.grandiflorum*, 22(A) and 4years old(B).

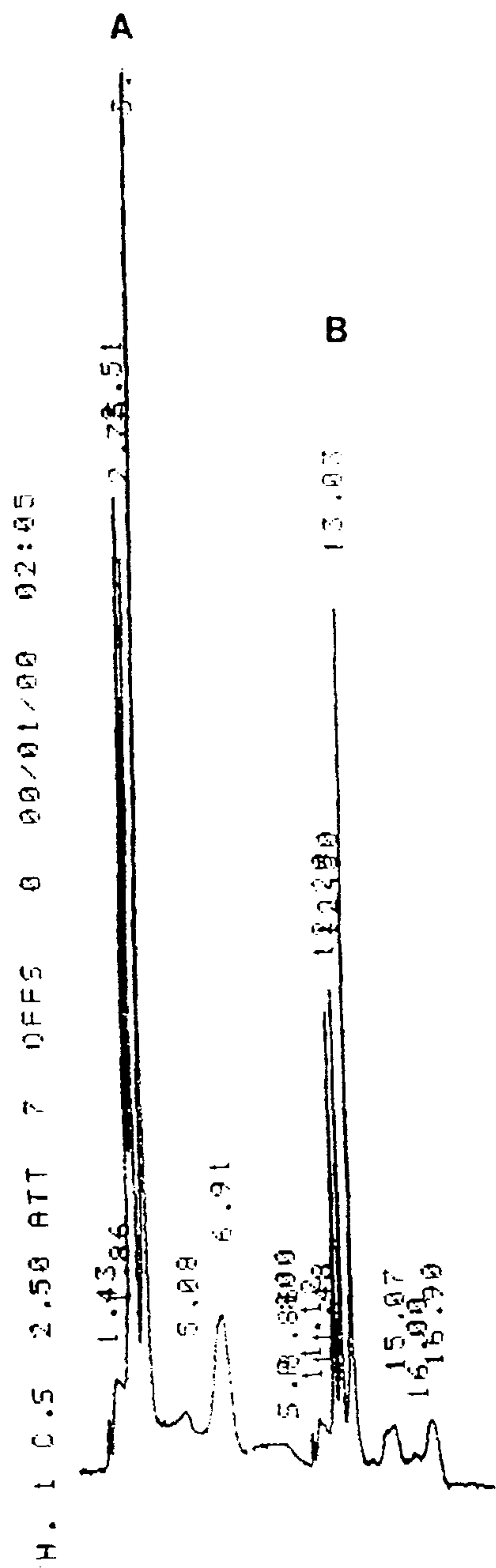


Fig. 14. HPLC profile of 30% methanol extracts from *P grandiflorum*, 22(A) and 4 years old (B).

다. 22년근 도라지의 유용물질의 분리

4년근 및 22년근 도라지의 에탄올 및 메탄올 추출물을 HPLC로 분석한 결과(Fig. 13, 14) peak pattern이 상이할 뿐만 아니라 함량에 뚜렷한 차이를 보이는 peak로부터 유용물질을 분리하여 그 구조 및 특성을 구명코저 하였다. 먼저 유용물질을 Fig.4와 같이 분획하였을때 석유 에테르와 에테르 추출물 중에서 여러 생리활성 효과가 인정되어 이들 추출물을 전술한 방법에 준하여 정제한 후 HPLC로서 정제도를 조사하였다.

그결과 Fig. 15에 나타낸 바와 같이 순수하게 분리된 물질을 분리 및 확인할 수 있었으며, 이 물질을 $^1\text{H-NMR}$ Spectrum을 측정한 결과는 Fig.16과 같다.

$^1\text{H-NMR}$ spectrum에서 6.9ppm 부근에서 방향족 링의 구조에 기인하는 peak가 관찰되었고, 0.9ppm의 메틸기와 1.3ppm의 peak, 2.0ppm의 peak, 2.8ppm의 peak, 5.4ppm의 peak등이 $^1\text{H-homocopy}$ spectrum(Fig. 17)에서 연결되어 있는 것으로 보아 본 화합물은 불포화 방향족 지방산과 ring 구조를 가지고 있는 화합물이 결합되어 있는 것으로 추정되며, $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서 174ppm의 탄소는 카르복시산에서 유래되고, 또한 20.0ppm과 40.0ppm 사이에서 나타난 chemical shift로 부터 메틸렌기에서 유래되는 탄소 peak들로 추정되어 지방산의 존재를 확인할 수 있었고(Fig.18), $^1\text{H-NMR}$ 에서 3.6ppm의 메톡시 peak와 $^{13}\text{C-NMR}$ 에서 56ppm의 methyl carbon으로 부터 방향족링 구조에 O-methoxy기가 결합되어 있는 것으로 추정된다. 또한 에테르 분획에서 결정상의 물질을 분리하여 $^1\text{H-NMR}$ spectrum을 조사한 결과 Fig.19에서 보는바와 같이 steroid성 화합물로 추정되었다.

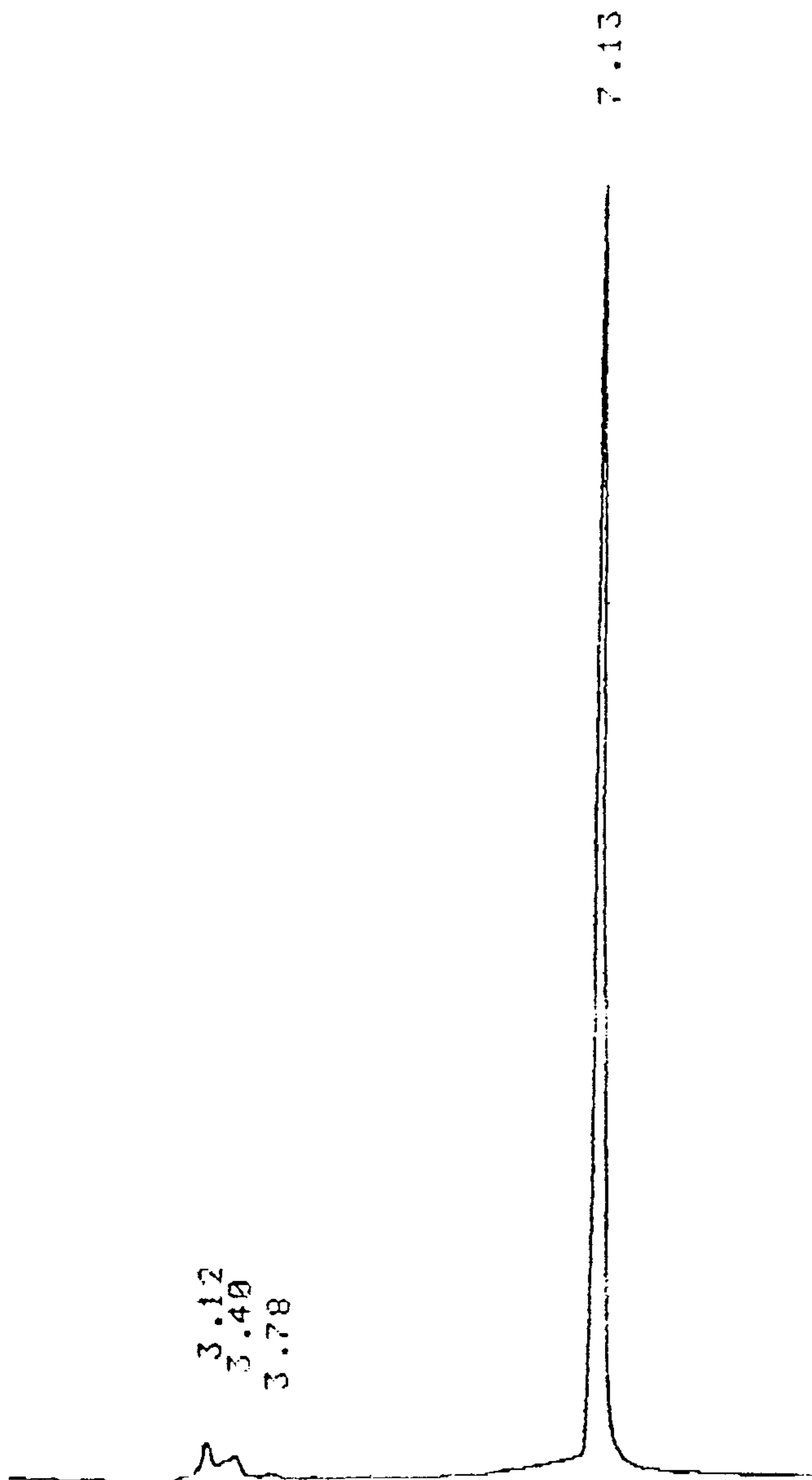


Fig. 15. HPLC profile of petroleum ether and ether extract fractionated from methanol extracts.

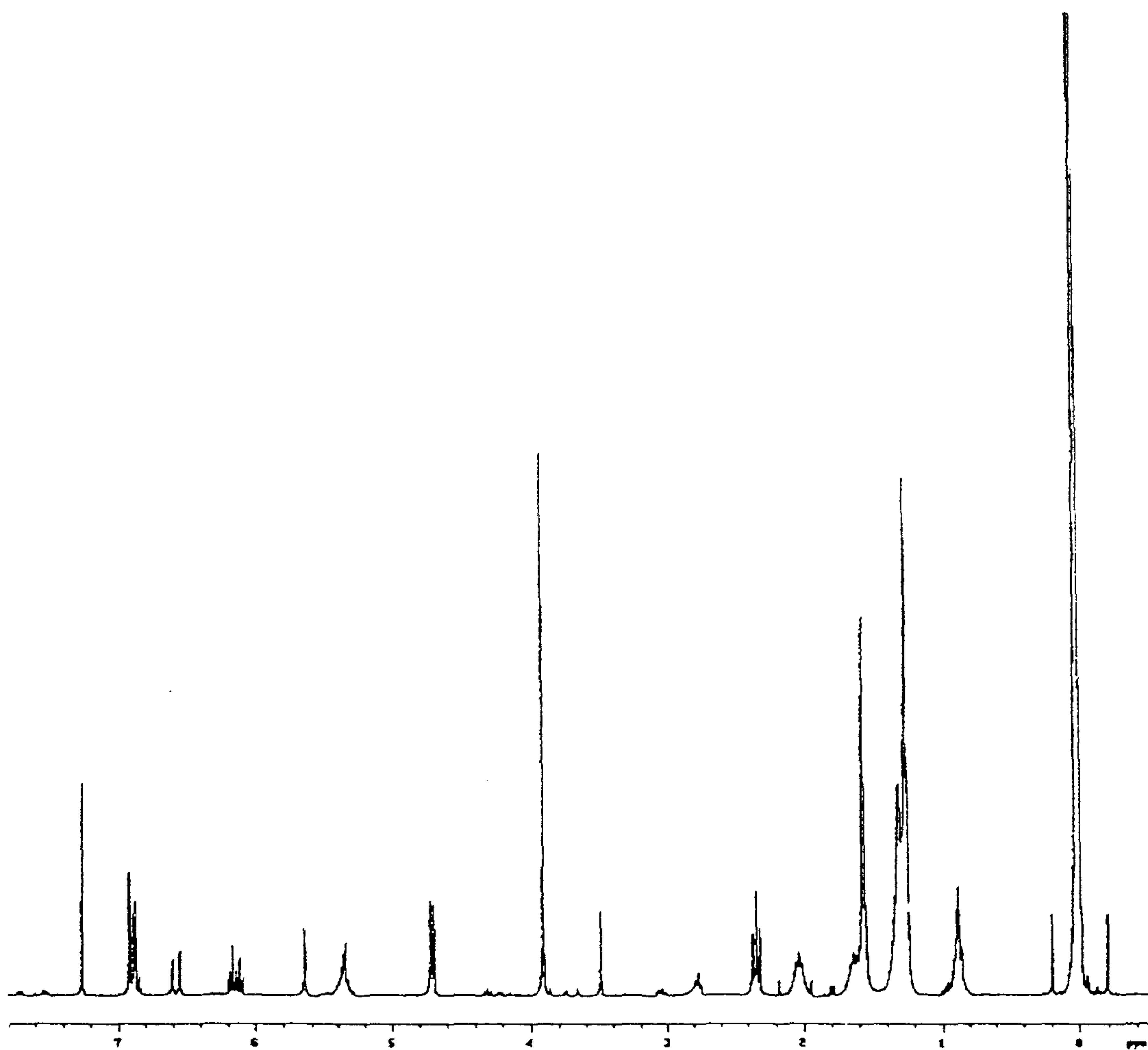


Fig. 16. ^1H -NMR spectrum of *P. grandiflorum*, petroleum ether and ether fractionate.

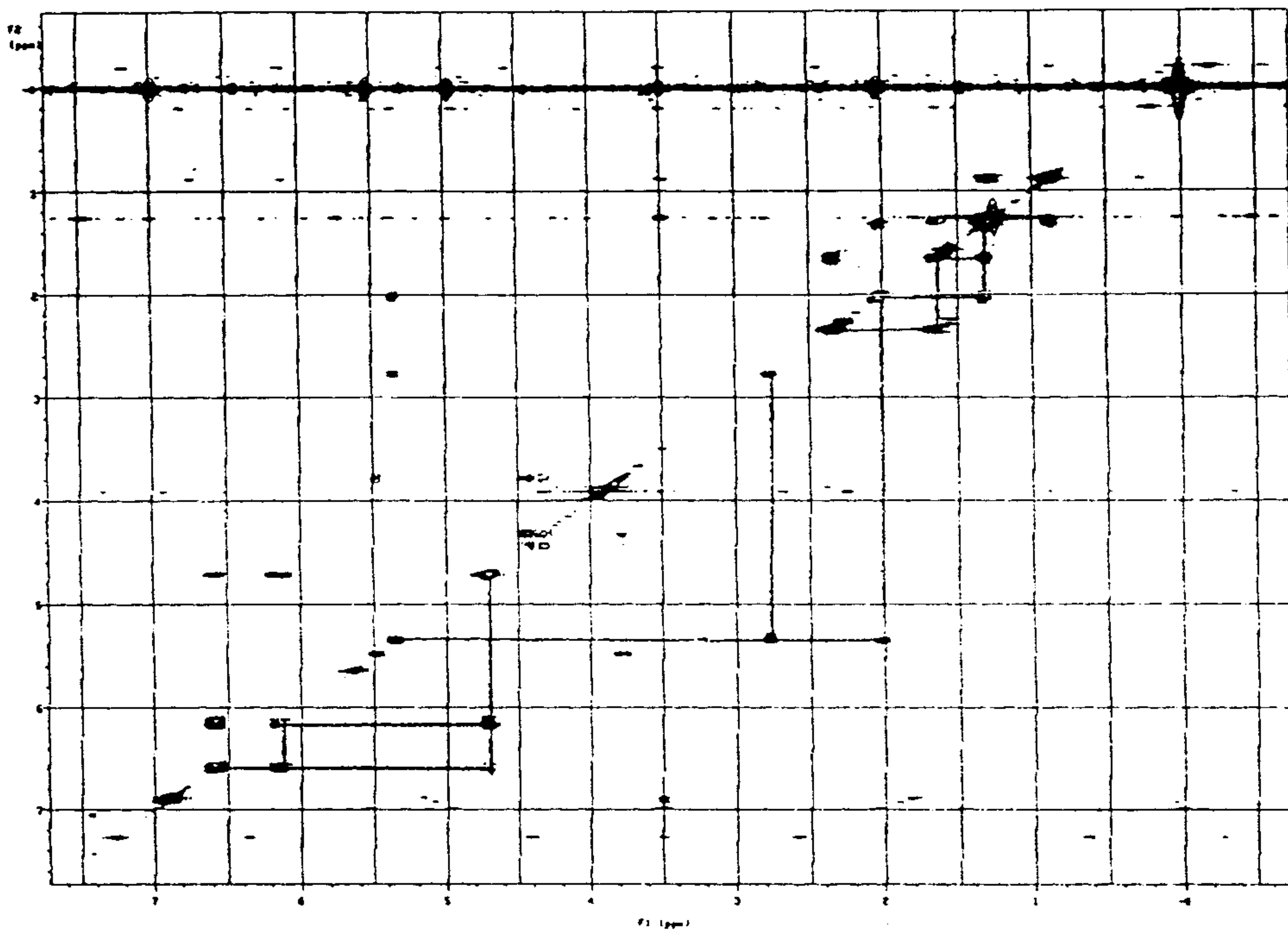


Fig. 17. $^1\text{H},^1\text{H}$ -homocopy spectrum of compound DI.

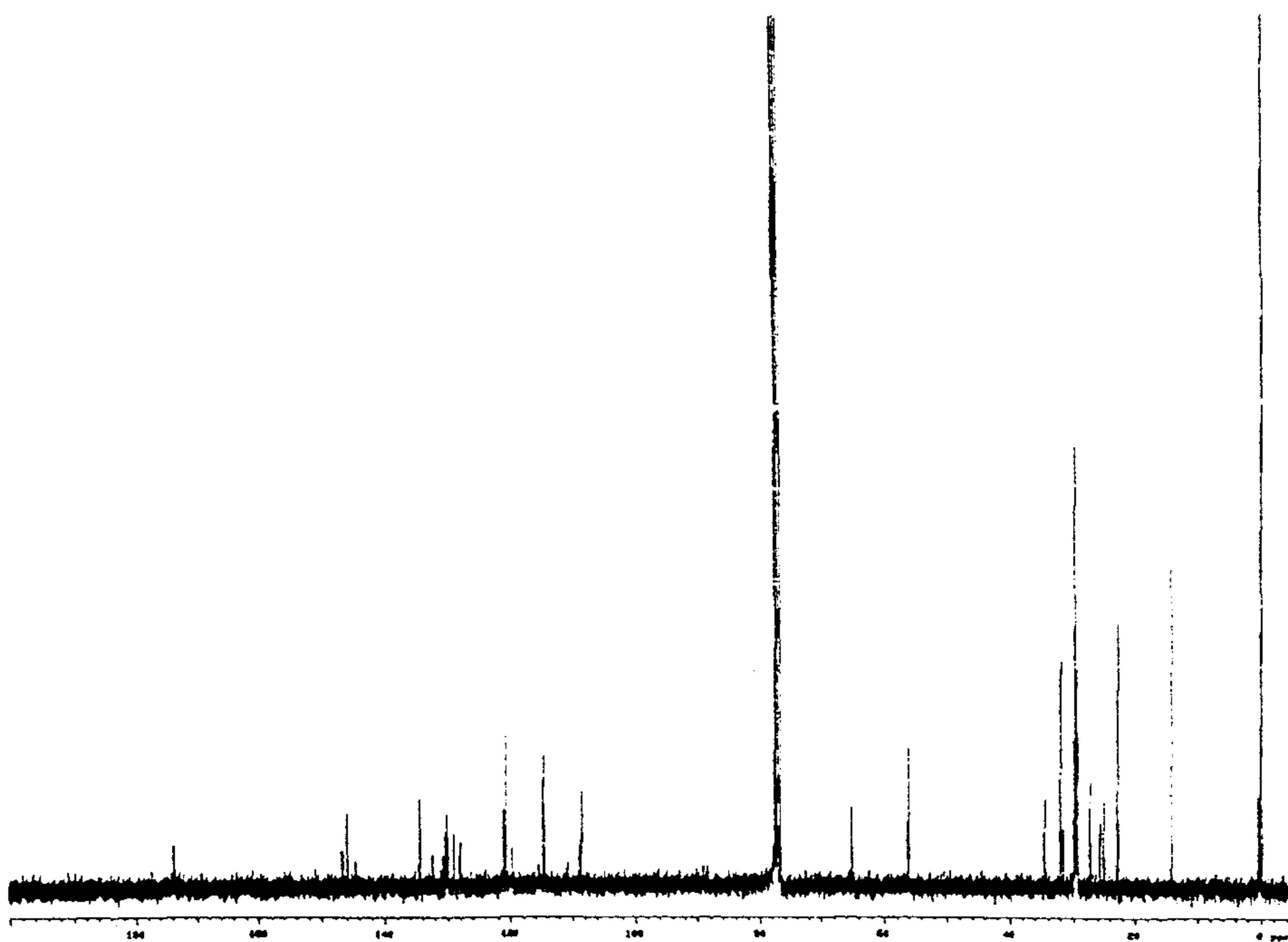


Fig. 18. ^{13}C -NMR spectrum of compound isolated from
P.gradiflourm.

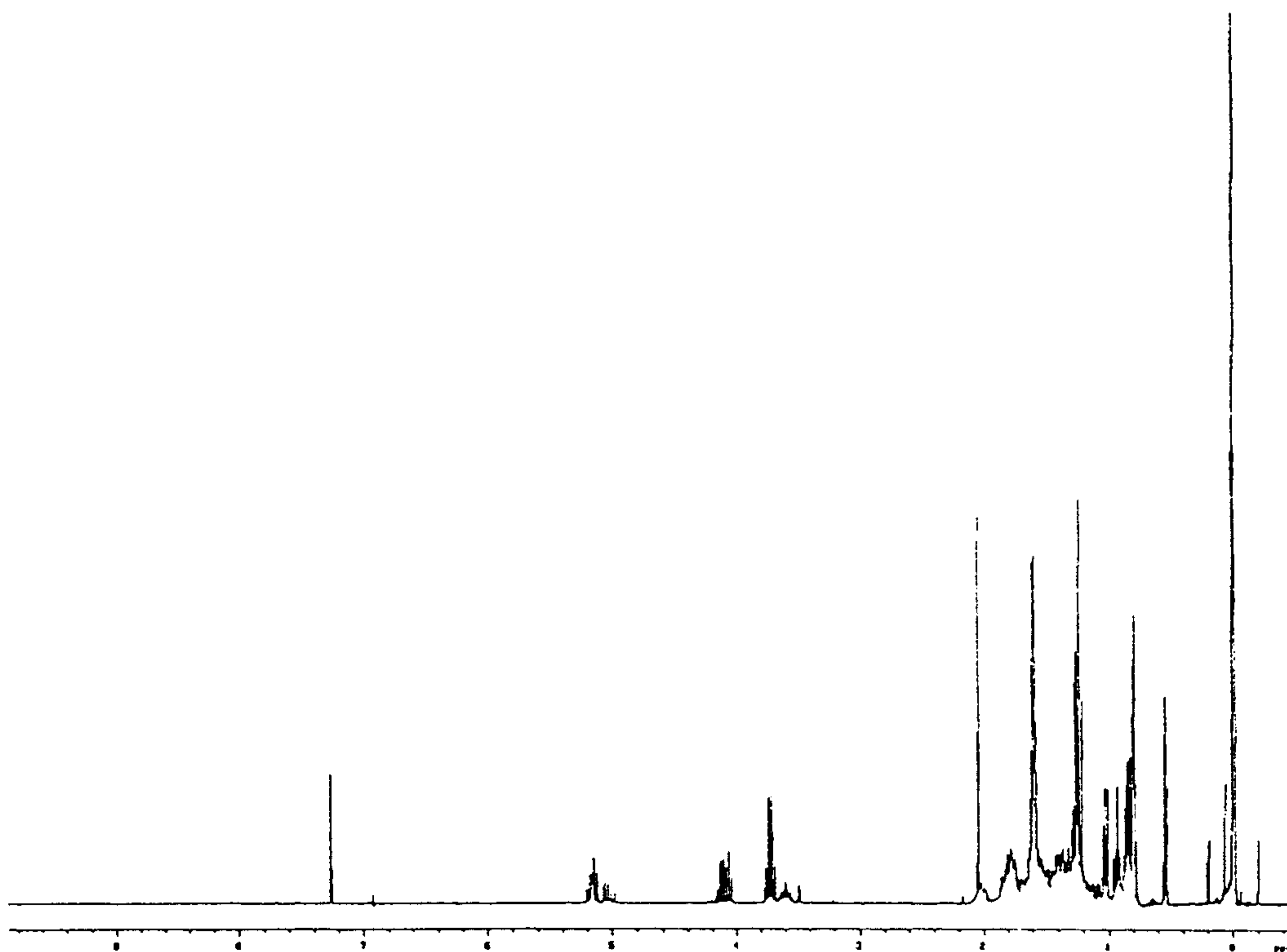


Fig. 19. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of a steroid compound from *P.gradiflorum*.

제 3장 다년생 도라지의 유용물질 검색 및 활성검사

제 1절 서 설

도라지는 만성기관지염, 천식, 기침, 관절염, 고혈압, 폐결핵, 늑막염, 당뇨병 치료제에 처방되는 광범위한 약리적 효능을 지닌 생약재이나 동물실험에 의해 확인된 실험결과는 거의 없고, 도라지의 주 약리물질인 Platycodigenin이 중요한 작용을 하는 것으로 보고되고 있다.

동물실험에 의한 기초 약리작용에 관한 연구는 1970년 초까지는 Igarashi의 거담작용 보고 이외에는 거의 없었으나 1974년 이가 도라지의 주요 약리성분인 platycodin을 마우스와 흰쥐에 투여하여 여러 약리효과를 검증한 결과, 중추신경 억제작용(진정, 진통, 해열효과), 급만성 염증에 대한 강력한 항염증 작용, 항궤양 치료 및 위액 분비 억제작용, 항choline성 작용, 용혈작용, 아나필락시성 속 및 장관추진의 억제작용이 확인되어 도라지는 항궤양 및 혈압강하의 임상응용의 가능성을 제시한 바 있다.

그 후 Hitokoto등은 도라지의 온수, chloroform 또는 에탄올 추출물을 미생물 배지에 첨가하여 *Aspergillus parasiticus*, *A. flavus*, *A.ochraceus* 및 *A. versicolor* 등을 배양하였을때 이들 곰팡이의 독소생성능이 감소됨을 보고하였고, Ishii 등은 도라지로 부터 17종의 새로운 saponin을 분리하여 기존에 규명된 prosapogenin 구조와 비교하였는 바, 8종의 saponin이 *o*-acetyl기를 함유하고 있음을 밝혔다. Kubo 등은 도라지로 부터 70% methanol 추출물, crude platycodi inulin 획분 및 crude platycodi saponin 획분을 마우스에

투여 했을때 식균작용을 촉진한다고 하였다. 또한 Nagao 등의 보고는 도라지의 inulin 성분이 마우스의 복수암에 대해 강력한 항암활성을 나타냄을 확인하였다.

이상의 연구보고에 기초하여 본 연구에서는 22년생 장생도라지의 병원 및 식품부패 미생물에 대한 항균특성과 항균물질의 분리 및 구조결정, 고지혈증 유발쥐에 대한 지질대사 개선효과, 암세포접착 저해활성, 도라지 추출액이 Alloxan 유발 당뇨성 흰쥐의 혈당 및 지질성분에 미치는 영향, 관절염 치료효과를 동물실험으로 확인하였다.

제 2절 재료 및 방법

1. 도라지

본 실험에서 사용된 4년생 및 22년생 도라지는 본 연구의 협동개발연구자인 이성호씨로부터 공급 받았으며, 수분함량이 15% 내외로 건조한 다음 추출시료로 사용하였다.

2. 사용균주

항균력 및 MIC 측정에 사용된 균주는 Gram 양성세균 3주, Gram 음성세균 5주, 효모 2주, 곰팡이 5주로 국립보건원과 한국미생물 보존센터(KCCM)에서 분양 받았으며, 종류는 Table 5와 같다.

3. 배지 및 배양

세균의 seed culture에는 Tryptic Soy Broth(TSB, Difco)를 사용하였으며, disc확산법에 의한 항균력 측정과 96-Well plate에서 MIC 값 측정용 배지는 Muller Hinton Broth(MHB, Difco)을 사용하였고, 생균수 및 증식 곡선의 측정에는 Luria-Bertani(LB) Broth를 각각

사용하였다.

효모와 곰팡이의 seed culture, 항균력 및 균체생산에는 malt extract medium

(Difco)과 Potato Dextrose Agar(PDA, Difco)를 각각 사용하였다. 8종의 세균과 2종의 효모는 TSB와 MEB를 사용하여 각각 37°C와 30°C에서 24시간 전배양한 후 다시 상기 배지에 접종하여 흡광도를 약 0.5로 조절하여 사용하였다. 5종의 곰팡이는 Bos의 방법으로 포자 현탁액을 조제하여 항균력 실험에 사용하였다.

Table 5. List of Microorganisms used

<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 12228
<i>Micrococcus luteus</i>	ATCC 9341
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	ATCC 27519
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
<i>Klebsidla pneumoniae</i>	ATCC 13883
<i>Salmonella typhi</i>	ATCC 6229
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 10490
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10259
<i>Saccharomyces cerevisial</i>	ATCC 2601
<i>Aspergillus flavus</i>	ATCC 9643
<i>Aspergillus niger</i>	ATCC 6273
<i>Rhizopus javanicus</i>	ATCC 22580
<i>Microsporium audouinii</i>	ATCC 9079
<i>Trichophyton mentagophytes</i>	ATCC 18749

4. 항균성 물질의 추출

검색용 항균성 물질의 추출은 건조 시료 100g당 시료 부피에 따라 6~9배 정도의 95% 에탄올을 첨가하여 실온에서 3시간 진탕(250rpm)한 후 여과(Toyo No.5)하여 얻은 액을 1차 추출액으로 하고, 상기 방법에 따라 2, 3차 추출액을 얻어 모두 혼합한 후 rotatory vaccum evaporator로 에탄올을 증발시킨 용액을 동결 건조시켜 고형물 함량을 계산하였다.

물 추출은 각 시료 100g에 증류수를 부피에 따라 3~6배 첨가하여 1시간 가열한 후 추출액을 멸균된 여과지(Toyo No.5)로 여과하는 조작을 3회 반복하여 얻은 총액을 감압농축하여 100ml로 조절하여 사용하였다.

5. 에탄올 추출물의 분획

도라지에 10배의 95% 에탄올을 가하여 실온에서 4시간마다 추출하고 여과하는 조작을 3회 연속 반복하여 합한 액에 헥산으로 지질 부분을 제거한 다음 감압농축 시켜 얻은 에탄올 추출물을 클로로포름, 에칠아세테이트, n-부탄올의 순으로 각각 분액여두에서 3회 반복 추출한 다음 45~50℃에서 rotatory vaccum evaporator에서 감압 농축하여 105℃ 건조기에서 용매를 제거한 후 용매별 고형물량을 산출하였다.

6. 항균활성 측정

항균성 물질의 검색시 항균력 측정은 disc diffusion법으로 행하였다. 세균은 TSB 배지, 효모는 malt extract 배지에 seed culture한 액을 접종하여 6~9시간 배양한 후 원심분리(7000rpm)하여 수거한 균체에 생리식염수로 희석시켜 600nm에서 흡광도가 0.5가 되도록

록 조절한 회석용액 0.1ml을 15ml씩 분주된 배양접시에 유리봉으로 고르게 도말하였다. 이 위에 disc(8ml, Toyo)를 6개씩 얹고 밀착시킨 후 에탄올 추출물(150mg/ml)과 물 추출물 50 μ l를 disc에 천천히 흡수시켜 37°C에서 48시간 배양하였다. 곰팡이는 포자현탁액 0.1 ml을 malt extract agar 배지에 고르게 도말한 후 상기의 방법으로 disc에 에탄올 및 물 추출물을 흡수시킨 후 30°C에서 48시간 배양하여 억제환을 측정하였다.

7. Minimal inhibition concentration(MIC)측정

22년생 도라지의 15종 균주에 대한 MIC는 96-well plate을 사용하였고, 고체배지에서의 MIC 농도 측정은 세균은 MHA배지, 곰팡이와 효모는 malt extract agar배지에 추출물의 농도를 조절한 후 45°C 항온수조에서 10 μ l를 강하게 혼합하여 주입시킨 후 세균은 37°C에서, 효모와 곰팡이는 30°C에서 24시간 각각 배양하였다. 이때 성장이 되지 않은 최소농도를 일차로 MIC값으로 결정하였다.

액체배지에서 MIC 농도 측정도 고체 배지에서의 MIC 측정 방법과 같은 농도의 생약 추출물을 MHB와 malt extract 액체 배지에 세균과 진균류를 각각 첨가하여 상기와 같은 온도와 시간으로 배양하여 생육이 되지 않은 최소농도를 일차로 MIC 값으로 결정하였다. MIC 값이 1.25mg/ml 이하의 것은 농도를 반으로 계속하여 줄여서 최종 MIC 값을 결정하였다.

8. 항균성 물질의 열 및 pH 안정성

22년생 도라지의 열안정성은 40~121°C 범위에서 15분~1시간 동안 열처리 한 후 MIC값, MIC값 보다 높은 농도 및 낮은 농도를 첨가하여 생육정도를 조사하였고, pH 안정성은 pH1~13 범위에서

30℃, 1시간 방치한 후 pH7로 중화시켜 생육억제 정도를 측정하였다.

9. 항균활성물질의 분리 및 구조분석

건조된 도라지 300g을 메탄올/물=7/3의 혼합용액 2ℓ에 넣어 2주 동안 상온에서 추출한 후 여과한 여액을 40℃ 이하에서 감압 농축하여 메탄올을 제거하였다. 이 농축액을 에틸 아세테이트 500ml로 4회 추출하여 농축한 다음 Fig.20과 같이 실리카겔을 이용한 관크로마토그래피로 분리한 후 MS, DEPT, NMR 등을 이용하여 구조분석을 행하였다.

10. 세포독성 시험

사용한 세포주는 인간 뇌암세포인 T98G와 상피암세포인 HT1080이며 배양은 DMEM medium 100μl(10% FBS함유)에 96 well plate의 한 well당 log phase에 있는 세포를 세포수가 5,000 cells/well이 되도록 plating 하여 24시간 배양한 후 여러 농도의 시료를 처리하여 최종 용량이 200μl가 되도록 하였다. 이를 48시간 배양한 후 세포를 고정시키기 위하여 냉 50% trichloroacetic acid 50μl를 가하여 4℃에서 1시간 동안 방치하였다. 고정된 세포는 물로 5회 세척한 후에 0.4% sulforhodamine B(SRB)용액 100μl를 가하여 30분 동안 반응시킨 후, 1% 초산 용액으로 세척하고 풍건한 후 10mM Tris 용액으로 용해시켜 이 plate를 579nm에서 microplate reader를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 대조구로는 vehicle로 사용한 DMSO를 사용하였고 활성물질로 doxorubicin 20mg/ml을 사용하여 비교하였다.

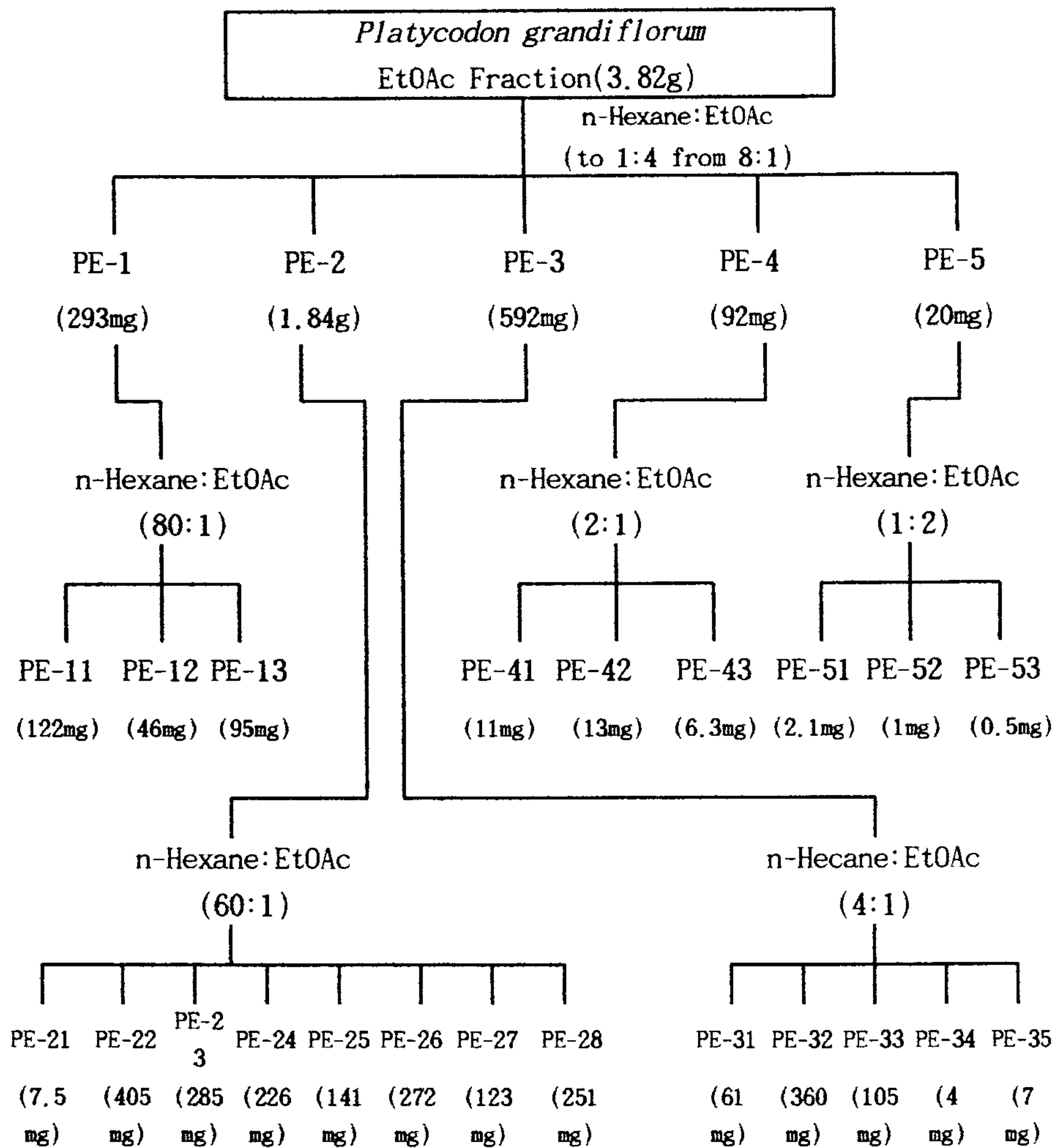


Fig 20. The Extraction and Fractionation of *Platycodon grandiflorum*

11. Free-radical 소거작용

7.5mM DPPH(diphoryl-2-picryl-hydrazyl)을 함유한 에탄올 용액과 시료를 37°C에서 30분간 반응시키고 516nm에서 흡광도를 측정하여 DPPH의 환원에 의한 흡광도 감소를 조사하였다.

12. 고지혈증 흰쥐의 혈청 및 간장의 지질대사 개선효과

가. 실험동물

평균체중이 $60 \pm 5g$ 의 4주령 된 Sprague-Dawley계 숫 흰쥐를 2주간 예비 사육한 후 3주간 실험 사육하였다.

나. 식이의 조제

기초식이, 유지식이 및 실험식은 각각 Table 6과 같다.

다. Aminotransferase 활성 측정

Boehringer Mannheim사의 kit를 사용하여 생화학 자동분석기(Hitachi, 736-20)로 측정하였으며, 효소활성 단위는 혈청 1mg당 Karmen unit로 표시하였다.

라. Lactate dehydrogenase 활성 측정

Boehringer Mannheim 사의 kit를 이용하여 반응시킨 후 340nm에서 NADH 또는 NAD의 흡광도 차이를 측정하여 산출하였다. 효소활성 단위는 $1\mu M$ NADH 또는 NAD의 산화능을 Wroblewski unit로 표시하였다.

마. Cholesterol 농도 측정

혈청 중의 총 및 유리 콜레스테롤, LDL 및 LDL-콜레스테롤, HDL 및 HDL-콜레스테롤은 Boehring Mannheim사의 kit를 사용하여 반응시킨 후 생화학 자동분석기(Hitachi, 736-20)로 분석하였다.

바. 중성지방 및 인지질 농도 측정

혈청 및 간장의 중성 및 인지질의 농도는 각각의 kit시약(Boehringer Mannheim 사)으로 처리한 후 생화학 자동분석기와 분광광도계 4020을 각각 사용하여 분석하였다.

13. 도라지 추출물의 암세포접착 저해 활성

22년생 도라지의 메탄올 추출물을 시료로 사용하여 B16-F1 mouse melanoma 세포주의 세포외 매트릭스의 일종인 laminin에의 접착을 저해하는지의 여부를 정량적으로 측정코저 B16-F1 mouse melanoma

Table 6. Composition of basal, hyperlipidemic, and experimental diets(%).

Ingredient	Group			
	Group 1 (Normal control)	Group 2 (Hyperlipidemic control)	Group 3 (5% P.g.)	Group 4 (10% P.g.)
Basal diet composition				
Sucrose	60.0	50.0	50.0	50.0
Casein	20.0	20.0	20.0	20.0
Cellulose powder	5.0	5.0	5.0	5.0
Mineral mixture ¹	3.5	3.5	3.5	3.5
Vitamin mixture ¹	1.0	1.0	1.0	1.0
DL-methionine	0.3	0.3	0.3	0.3
Choline bitartrate	0.2	0.2	0.2	0.2
Lard	7.0	17.0	17.0	17.0
Corn oil	3.0	3.0	3.0	3.0
Experimental diet composition				
Sucrose	60.0	60.0	60.0	55.0
Casein	20.0	20.0	20.0	20.0
Lipid ²	10.0	10.0	10.0	10.0
Mineral mixture ¹	3.5	3.5	3.5	3.5
Vitamin mixture ¹	1.0	1.0	1.0	1.0
DL-methionine	0.3	0.3	0.3	0.3
Choline bitartrate	0.2	0.2	0.2	0.2
Cellulose powder	5.0	5.0	—	—
P.g. powder ³	—	—	5.0	10.0

¹ AIN-76™ ² 7% lard + 3% corn oil. ³ *Platycodon grandiflorum* (twenty-two years).

cell 세포주를 사용하였고, 세포주의 유지는 Fetal calf serum(FCS, 10%)를 함유한 Minimum essential medium(MEM, Hank's salt 함유)에서 유지시켰다.

Laminin-coated plate는 Laminin 1mg을 PBS(phosphate buffer saline, NaCl 8g, KCl 0.2g, NaHPO₄ 1.44g, KH₂PO₄ 0.24g/ℓ) 2ml에 용해하여 냉장고에 보관하면서 필요시에 laminin의 농도(20μg/ml)를 결정하여 찬 PBS 용액으로 희석하고 이 용액을 96 well microplate의 각

well에 50 μ l씩 분주하여 하루밤 동안 건조시켜 사용하였다.

세포 현탁액의 제조는 T-25 culture flask에 80% confluence를 성장한 B16-F1 세포를 3ml의 2mM EDTA 용액으로 떼어낸 다음 serum-free MEM 5ml를 가하여 800rpm에서 5분 동안 원심분리시켜 얻은 세포를 1% BSA를 함유한 serum-free MEM의 적당한 양에 현탁하여 세포수가 2×10^6 cells/ml이 되게끔 조절 하였으며, 이 현탁액 50 μ l를 사용하였다.

활성의 측정은 Laminin-coated well을 100 μ l의 PBS로 세번 세척한 후 다시 1% BSA 용액(PBS에 용해) 100 μ l를 첨가하였고, BSA를 aspirater로 제거하였다. 이 plate에 0.1% BSA를 함유한 serum free MEM 50 μ l, 시료 및 세포를 첨가하여 5% CO₂ 존재하에서 37 $^{\circ}$ C, 1시간 배양하였다. 배양 후 PBS(37 $^{\circ}$ C)로 두번 세척한 후 0.5% BSA(PBS에 용해) 100 μ l와 PBS 100 μ l로 각각 세척한 다음 부착되어 있는 세포를 2.5% glutaraldehyde 40 μ l로 실온에서 30분 동안 고정화 시켰다.

14. 도라지 추출액이 Alloxan 유발 당뇨병 흰쥐의 혈당 및 지질성분 개선

가. 시료의 추출 및 조제

실험에 사용된 도라지는 6년근과 22년근으로 경남 진양군 명석에서 구입하여 동결건조한 후 도라지 200g을 물로써 1l로 한 후 700ml로 농축시키고 그 잔사에 다시 물 800ml을 넣어 300ml가 될때까지 열수 추출한 후 4 $^{\circ}$ C로 냉장보관하여 두고 본 실험의 시료로 사용하였다.

나. 식이 및 실험군

식이조성 및 실험군은 Table7과 같이, 기본식이에 물만 섭취시킨 1군은 saline(0.9% NaCl, 1.5ml/day)을 복강내(I.P.)주사하였고, 2군은 saline에 용해한 alloxan monohydrate(15mg/kg B.W/day)를 복강주사

하여 당뇨병을 유발시킨 실험군에 물을 급이하고 3군은 물 대신 6년근 도라지 추출액, 4군은 22년근 도라지 추출액을 실험 전 기간동안 자유로이 섭취시켰다.

Table 7. Experimental groups and compositions of basal diet

Ingredient	(%)
Casein	20.0
DL-methionine	0.3
Corn starch	60.0
Cellulose powder	5.0
Mineral mixture*	3.5
Vitamin mixture*	1.0
Choline bitartrate	0.2
Lard	10.0

Group 1) Basal diet + saline(I.P.)** + water
 2) Basal diet + alloxan(I.P.)** + water
 3) Basal diet + alloxan(I.P.)** + *Platycodon grandiflorum*(6 years)
 4) Basal diet + alloxan(I.P.)** + *Platycodon grandiflorum*(22 years)

* AIN-76TM(J.Nutr., 107-10340(1977))
 ** I.P. ; Intraperitoneal injection(alloxan monohydrate 15mg/kg B.W/day)

다. 실험동물의 처리

실험동물은 최적조건(온도 20±1℃, 습도 50±10%, 명암주기 07:00 - 19:00)에서 예비사육한 외관상 건강한 200±10g의 Sprague-Dawley계 숫 흰쥐를 난괴법(Randomized Complete Block

Design)에 의해서 6마리씩 4군으로 나누어 사육상자에 한마리씩 넣어 3주간 실험 사육하였다. 실험사육 3주간의 최종일에는 7시간 절식시킨 후 에테르 마취하에 심장채혈법으로 채혈하였고, 간장은 0.9% 생리식염수로 문맥을 통해 관류 탈혈한 후 여과지로서 물기를 제거하였으며, 혈액은 약 1시간 정도 빙수중에 방치한 후 3,000rpm에서 15분간 원심 분리하여 혈청을 취하여 실험에 사용하였다.

라. 혈당의 정량

혈당 농도는 혈당 측정용 kit시약(GLzyme 'Eiken')으로 측정하였다.

마. 콜레스테롤의 정량

혈청의 총콜레스테롤 농도는 총콜레스테롤 측정용 kit시약(cholestezyme-V 'Eiken'), LDL농도는 LDL측정용 kit시약(β -lipoprotein C-Test wako)으로 측정하였으며, HDL-콜레스테롤 농도는 HDL-콜레스테롤 측정용 kit시약(HDL-C555 'Eiken'), 유리콜레스테롤 농도는 유리콜레스테롤 측정용 kit시약 (Free cholesterol C-Test wako)으로 측정하였고 콜레스테롤 에스테르 농도는 총콜레스테롤 농도에서 유리콜레스테롤 농도를 뺀 값으로 표시하였다. 간장의 총콜레스테롤 함량은 조직 0.5g을 chloroform:methanol혼액(C:M=2:1,v/v)으로 지질을 추출하여 50ml로 정용한 다음 일정량을 취하여 건조시킨 후 상기 방법에 의하여 측정하였다.

바. 중성지질 및 인지질의 정량

혈청의 중성지질 농도는 중성지질 측정용 kit시약(Triglyzyme-V 'Eiken')으로, 인지질 농도는 인지질 측정용 kit시약(PLzyme 'Eiken')으로 측정하였고, 간장의 중성지질 및 인지질 농도는 C:M혼액 지질 추출액 일정량을 취하여 건조시킨 후 중성지질 측정용 kit시약과 인지질 측

정용 kit시약으로 각각 측정하여 산출하였다.

사. 효소의 활성측정

혈청 중 lactate dehydrogenase(LDH, EC 1.1.1.27)활성은 혈청 LDH측정용 kit시약(LDH, Neo D 'Eiken')으로, aminotransferase의 활성 측정은 Reitman과 Frankel의 방법(13)에 준해 조제된 kit시약(혈청 transaminase 측정시약, 'Eiken')을 사용하여 혈청 중 aspartate aminotransferase(AST, EC 2.6.1.1) 및 alanine aminotransferase(ALT, EC 2.6.1.2)활성을 측정하였으며 단위는 혈청 1ml당 Karmen unit(14)로 표시하였다.

아. 통계처리

분석 결과의 통계처리는 실험군당 평균치와 표준오차를 계산하였고 군간의 차이는 $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test(15)로 하였다.

15. 도라지 및 도라지 한방제재가 흰쥐의 류마티스 관절염 치료효능에 미치는 영향

만성염증 및 류마티스 관절염 모델 실험에 사용된 동물은 SD-rat(Splaque-Dawley)로서 rat의 오른쪽 발바닥에 0.6mg/rat의 heat killed-*Mycobacterium histolyticum*을 주사한 후 약 20일 까지 양쪽 발의 부종의 정도를 측정하여 관절염의 저해능을 조사하였다.

실험에 사용된 식이군은 6마리씩 6군, 즉 대조군, prednisolone(4mg/day) 급여군, 1차년도 연구에서 얻어진 14종의 생약재 추출물 급여군(20mg/day, 40mg/day), 4년생 도라지 추출물 급여군(20mg/day), 22년생 도라지 추출물 급여군(20mg/day, 40mg/day), 그리고 생약재 추출물(20mg/day)과 22년생 도라지 추출물(20mg/day)의 혼합 급여군으로 하여 양쪽 발의 부종의 크기를 식이 후 2일, 10일, 12일, 14일, 16일, 18일째 까지

측정하였다.

제 3절 결과 및 고찰

1. 각종 생리활성의 비교

제2장 과제에서 분리된 유용물질에 대한 생리 활성 효과를 80% ethanol 추출과 30% methanol 추출물에서 먼저 암의 발생과 관계가 있는 free radical 소거작용을 중심으로 조사하였다(Table 8).

Table 8. Free radical removal activity of *P. grandiflorum*, 22 and 4 years old

<i>P. grandiflorum</i>	80% EtOH extract	30% MeOH extract
22 years old	+ +	-
4 years old	+	-

+ : low activity ++ : high activity - : not detected

4년근 및 22년근 도라지는 30% methanol 추출물 보다 80% ethanol 추출물에서 free radical 소거작용이 우수하였고, 22년근은 4년근 보다 그 효과가 높게 나타났다.

2. 각 분획별 생리활성의 비교

22년근 도라지를 Fig.4와 분획하여 얻어진 물질들에 대한 생리활성을 free radical 소거작용, 세포독성, 항진균 활성 등으로 측정하였을 때 대부분의 활성은 에테르, 에틸아세테이트 및 석유에테르 추출

물에서 관찰되었다(Table 9).

Table 9. Various biological activities of fractionated *P.grandiflorum* extracts

Fractionate	Free radical removal activity	Cell toxicity (500µg/ml)	Antifungal activity (100µg/ml)
Petroleum ether	+	-	-
Ether	++	-	+
Ethylacetate	++	-	-
Butanol	-	-	+
Methanol	-	-	-
Water	-	-	-

+ : low activity, ++ : high activity, - : not detected

3. 항균활성 물질의 검색

4년근 및 22년근 도라지의 에탄올 및 열수 추출물을 식중독, 병원성 미생물인 Table 5의 그람 양성세균 3주, 그람음성 5주, 진균류 7주에 각각 첨가하여 각종 항균 특성을 조사하였다.

가. 항균성 물질의 검색

95% 에탄올과 물 추출물을 15종의 균주를 대상으로 항균활성을 조사하였을때 4년근과 22년근 모두에서 에탄올 추출물에서 활성이 높게 나타났고, 또한 22년근의 에탄올 추출물은 4년근의 에탄올 추출물 보다 항균활성과 항균 spectrum이 훨씬 우수하였다(data not known).

나. 22년근 도라지 에탄올 추출물의 각 균주에 대한 MIC

22년생 도라지의 에탄올 추출물은 사용된 전 균주 중에서 *S. typhi*에 2.5mg/ml 농도로 가장 현저한 항균활성을 보였다(Table 10). 전반적으로 Gram 음성세균보다는 Gram 양성세균에 항균력이 높았으며 진균류 중에서 *S. cerevisiae*, *A. niger*, *M. audouinii*, *T. mentagophytes*에 10mg/ml 농도로 생육억제 효과를 관찰할 수 있었고, *R. javanicus*는 80mg/ml 이상의 농도에서만 생육이 억제되었다.

Table 10. MIC of *Platycodon grandiflorum* extracts on several microorganisms

Strains	MIC(mg/ml)	
	Broth	Agar
<i>B. subtilis</i>	5.00	2.50
<i>M. luteus</i>	5.00	2.50
<i>S. epidermidis</i>	10.00	5.00
<i>E. coli</i>	10.00	5.00
<i>K. pneumoniae</i>	10.00	5.00
<i>P. aeruginosa</i>	20.00	5.00
<i>S. typhi</i>	2.50	2.50
<i>V. parahaemolyticus</i>	5.00	5.00
<i>C. albicans</i>	20.00	5.00
<i>S. cerevisiae</i>	10.00	5.00
<i>A. flavus</i>	20.00	5.00
<i>A. niger</i>	10.00	5.00
<i>R. javanicus</i>	80.00	80.00
<i>M. audouinii</i>	10.00	5.00
<i>T. mentagophytes</i>	10.00	10.00

다. 추출온도에 따른 항균활성

22년생 도라지는 실온과 80℃ 추출구에서 MIC농도인 5mg/ml

첨가시에는 배양 48시간 후에 균의 증식이 확인되었으나 50℃ 추출구에서는 5mg/ml 첨가시 48시간까지 증식이 억제됨은 물론 2.5mg/ml 첨가시에도 24시간까지 증식억제 효과가 관찰되어 50℃ 추출이 가장 효과적인 것으로 나타났다.

라. 에탄올 추출농도에 따른 항균활성

도라지의 경우에는 에탄올 농도가 높을수록 항균활성 물질이 용이하였다(Table 11). 35% 및 55% 에탄올 추출물은 95% 에탄올 추출물의 *M. luteus*에 대한 MIC 농도인 5mg/ml 첨가구에서 균생육 억제효과가 없었고 10mg/ml 첨가구에서도 증식이 확인되었다.

Table 11. Growth inhibition of *M. luteus* by *Platycodon grandiflorum* extracts extracted with different ethanol conc

Ethanol Conc.(%)	Culture time(hrs)	Concentration(mg/ml)				
		10.0	5.0	2.5	1.25	0
35	24	+	+	+	+	+
	48	+	+	+	+	+
55	24	+	+	+	+	+
	48	+	+	+	+	+
75	24	-	-	+	+	+
	48	-	+	+	+	+
95	24	-	-	+	+	+
	48	-	-	+	+	+

(+) : Growth, (-) : No growth

마. 에탄올 추출물의 분획별 항균활성

22년근 도라지의 에탄올 추출물을 용매극성에 따라 분획하여

항균활성을 조사한 결과는 Table 12와 같다. 가장 높은 항균활성을 나타내는 실험군은 부탄올 분획으로서 에탄올 추출에서 각 실험대상 균주의 MIC 값보다 부탄올 분획에서는 *B. subtilis*와 *M. luteus*에 대해서는 비슷한 농도에서 생육억제 작용이 확인되었으나 다른 균주에 대해서는 2-4배의 감소된 농도에서도 항균활성을 나타냈다. 클로로포름 분획은 부탄올 분획보다 항균효과가 전반적으로 낮았으며 에칠아세테이트와 수층은 항균작용이 20mg/ml 농도까지는 전혀 항균력이 검출되지 않았다.

바. 항균활성 물질의 분리 및 구조분석

Fig.20과 같이 분획한 *Platycodon grandiflorum* 분획물들의 생리활성은 ethyl acetate 분획 가운데 PE-32는 *S.epidermidis*에 대한 항균력은 매우 높은것으로 나타나고 있다. 또한 배당체 성분인 PB분획들은 *P.vulga*와 *S. aureus*에 대한 항균력이 특히 높은것으로 나타났다. 또한 PB-1은 곰팡이인 *S. cerevisiae*에 매우 특이적으로 높은 생리활성을 갖는것으로 나타났다. 따라서 PE-32에 대하여 그 구조를 결정하였다. 한편 다당 성분인 물 분획과 산성분의 다당성분들에 대해서는 항균력이 전혀 없는것으로 나타났기 때문에 항균력이 아닌 다른 생리활성을 검토중에 있다.

추출물 PE-32를 HPLC로 분리하여 여러기기를 사용하여 그의 절대 구조를 규명하였다. 그 결과 glyceryl linoleate임을 확인 할 수 있었다.

이 화합물의 분자량은 m/e가 354(Fig. 21)이고 ¹³CNMR(Fig. 22)을 통하여 carbon수가 21이고 DEPT(Fig. 23)에서는 CH₃가 하나(14.02 ppm), CH₂가 13개, CH carbon이 5개 임을 확인할 수 있었다. 또한 이들 carbon들 가운데 vinyl carbon이 4개이고 (127.85, 128.04, 129.97,

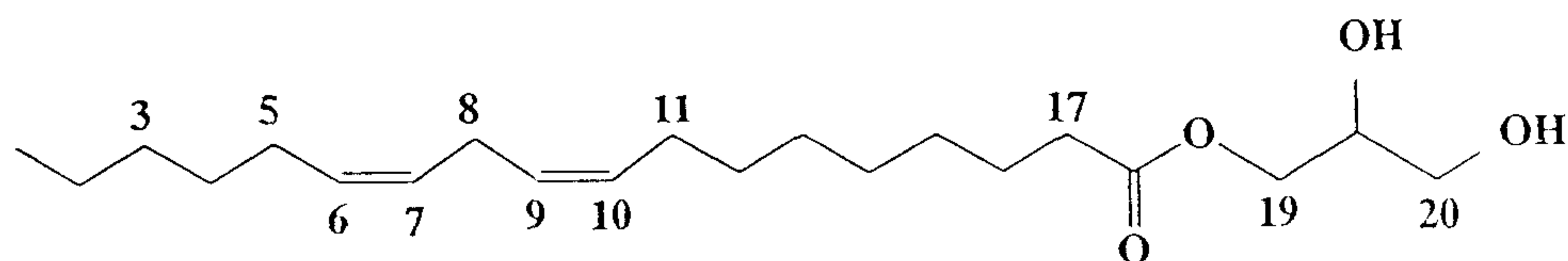


Table 12. Antimicrobial activities of fractionated *Platycodon grandiflorum* ethanol extracts

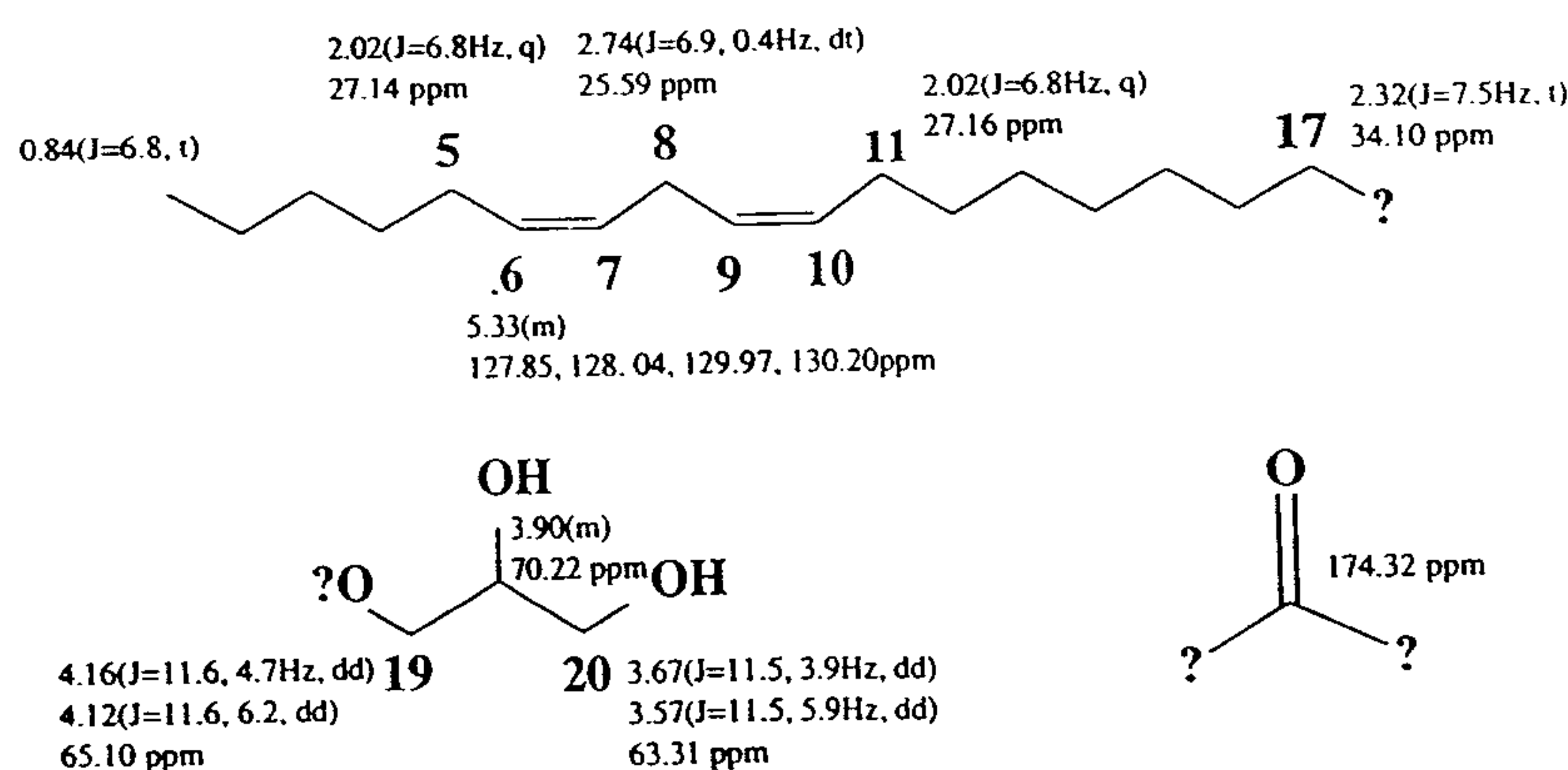
Strains	chloroform fraction(mg/ml)						Butanol fraction(mg/ml)						Ethylacetate frac. (mg/ml)		Water frac. (mg/ml)	
	20	10	5	2.5	1.25	0.62	20	10	5	2.5	1.25	0.62	20	10	20	10
<i>B. subtilis</i>	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>M. luteus</i>	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. epidermidis</i>	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>E. coli</i>	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>K. pneumoniae</i>	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. aeruginosa</i>	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. typhi</i>	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>V. parahaemolyticus</i>	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>C. albicans</i>	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. cerevisiae</i>	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>A. flavus</i>	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>T. mentagophytes</i>	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+

(+) : Growth, (-) : No growth

130.20 ppm), 산소와 결합된 carbon이 3개이었다. 산소와 결합된 3개의 carbon들 가운데 70.22 ppm의 carbon은 CHOH 이고, 63.31ppm 의 carbon은 ester 결합된 것이며, 65.10 ppm의 carbon은 free hydroxy를 갖는 CH₂OH 이었다. 또한 하나의 carbonyl(174.32 ppm)기가 ester 결합을 하고 존재함을 알 수 있었다. Fig. 24의 ¹HNMR에서는 5번과 11번 탄소의 proton들이 2.02 ppm에서 나타나고 있으며, 2개의 vinyl proton들 5.33 ppm에서 multiplet으로 각각 나타나 있다. 또한 carbonyl carbon 옆 탄소의 proton들은 2.33 ppm 에서 triplet을 보여주고 있다. glyceryl group의 proton들 가운데 free OH가 있는 탄소의 proton들은 4.16과 4.12 ppm에서 각각 doublet of doublet으로 나타나 있으며 ester쪽 탄소의 proton들도 3.67 과 3.57 ppm에서 각각 doublet of doublet의 전형적인 glyceryl group의 pattern을 보여주고 있다. 이들의 자세한 것은 H-H COSY(Fig. 26,27)와 C-H COSY(Fig. 28,29)를 통하여 확인 할 수 있었다. 특히 이들을 이용한 부분 구조들을 보면 다음과 같다.

또한 IR spectrum(Fig. 31)에서는 3420cm⁻¹에서 OH, 3011cm⁻¹ 에서 olefine, 2928과 2957cm⁻¹에서 C-H 그리고 1739cm⁻¹에서 carbonyl streching vibration들이 잘 나타나고 있다.

이 화합물은 가수분해시켜 확인 하였는데 그 결과 linoleic acid와 glycerol을 각각 1:1의 비율로 얻었고 이들은 각각 문헌들을 통하여 확인하였다.



MASS SPECTRUM Data File: NO. 26-AUG-96 17:21
Sample: KY5-B
Date: 8/24/96 EI (Pos.) GC 1.4c BP: m/z 262.0000 Int. 520.0444 Lv 2.00
Scan: (45)

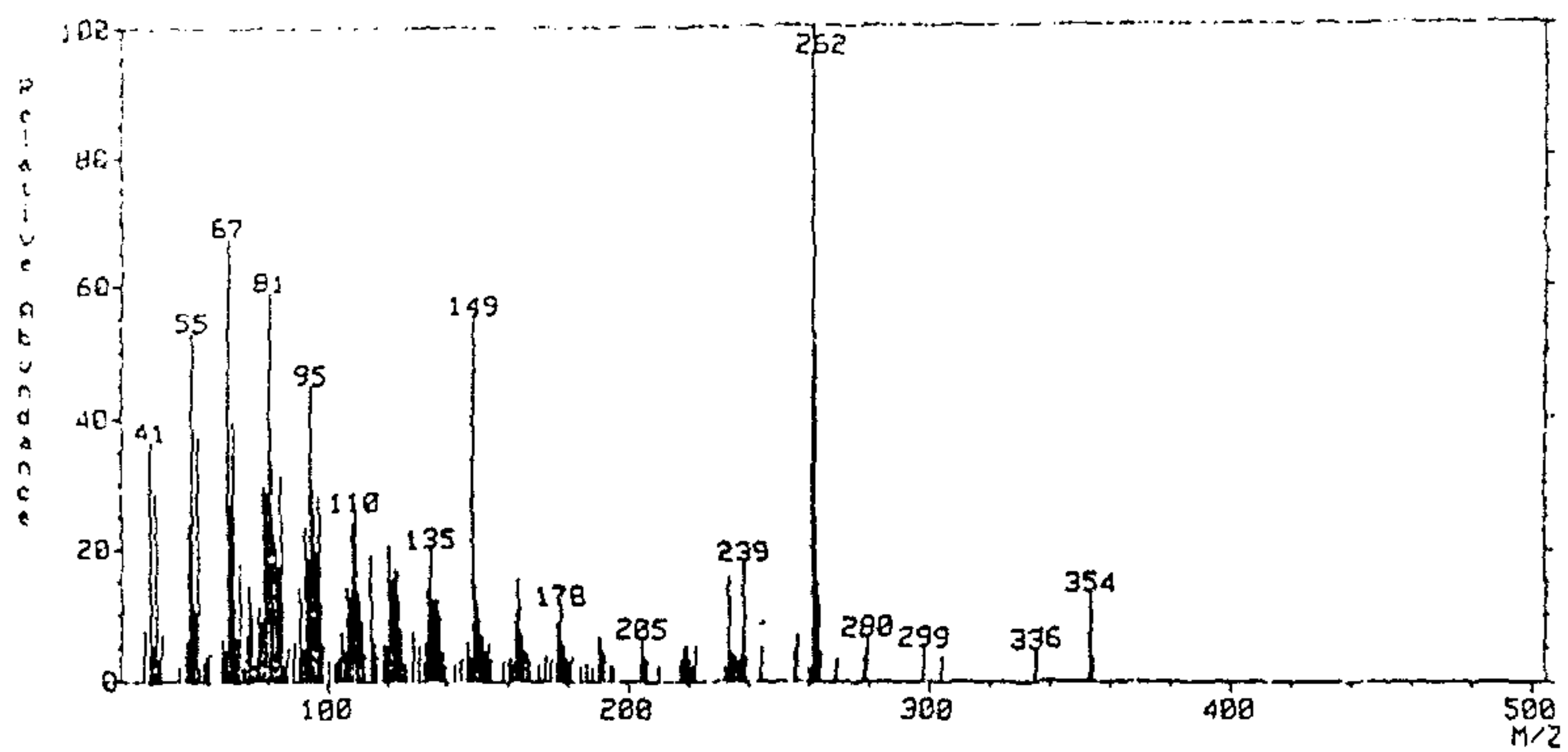


Fig. 21. Ms Spectra of Compound

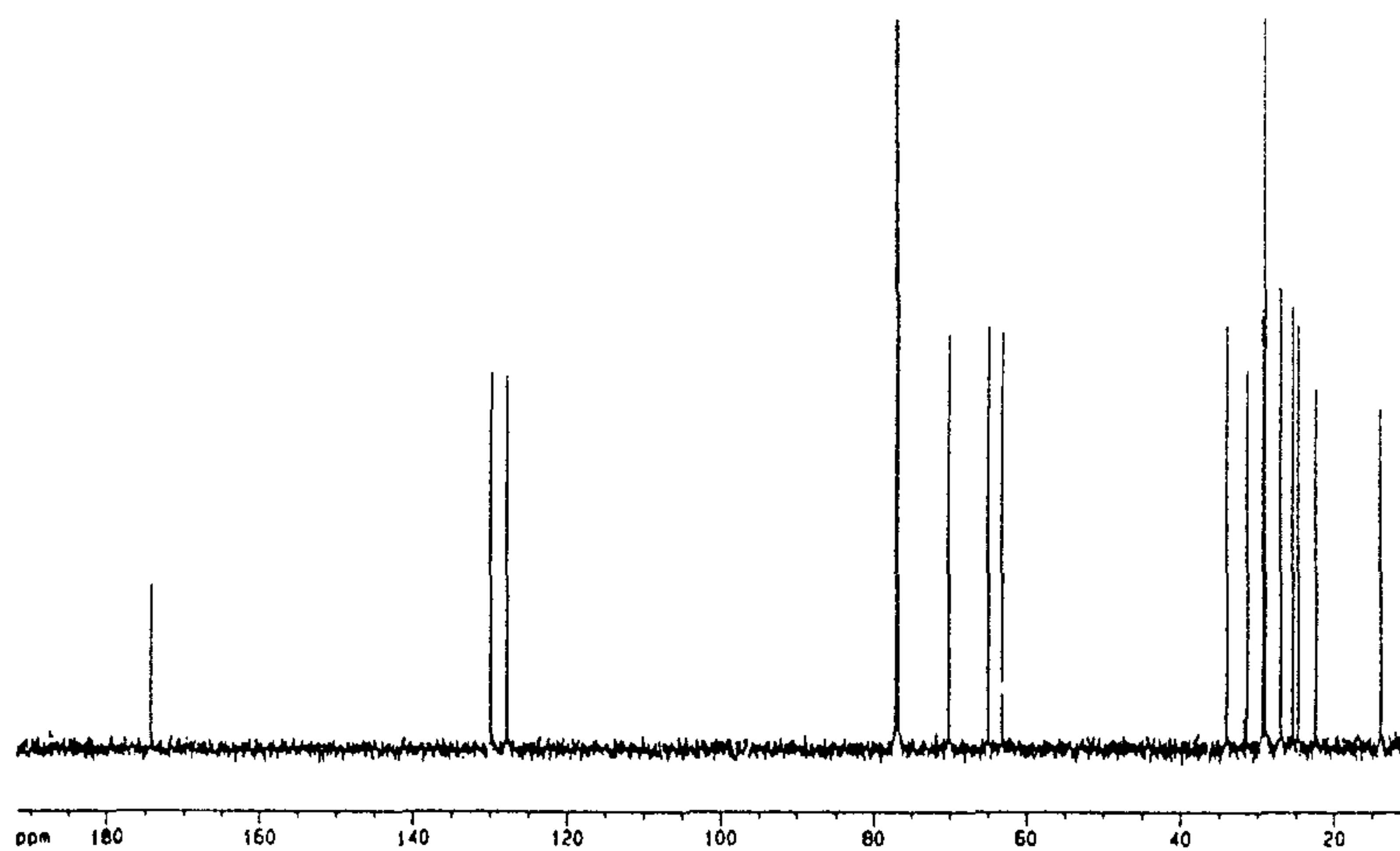


Fig. 22. ¹³C NMR Spectra of Compound

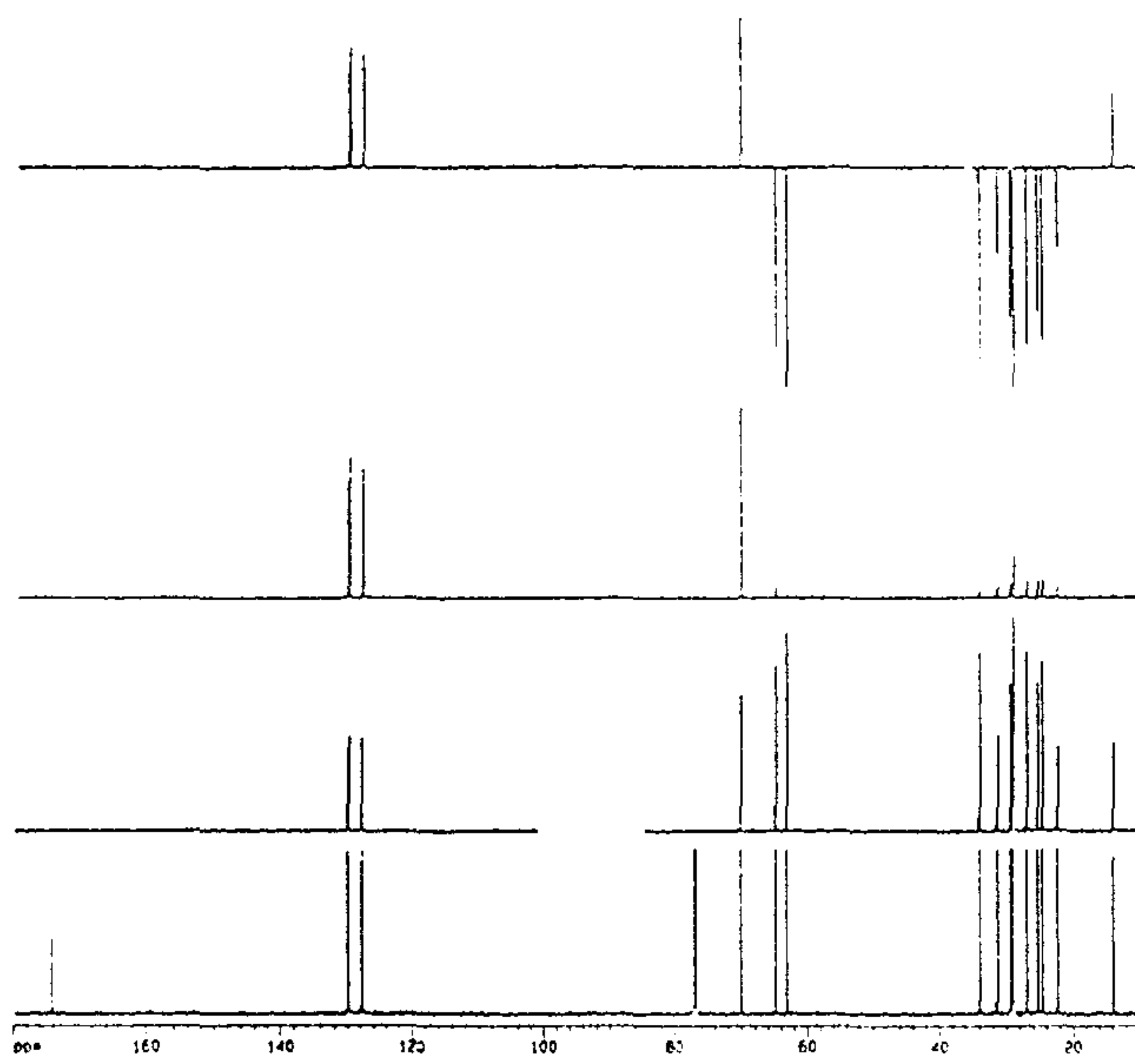


Fig. 23. DEPT Spectra of Compound

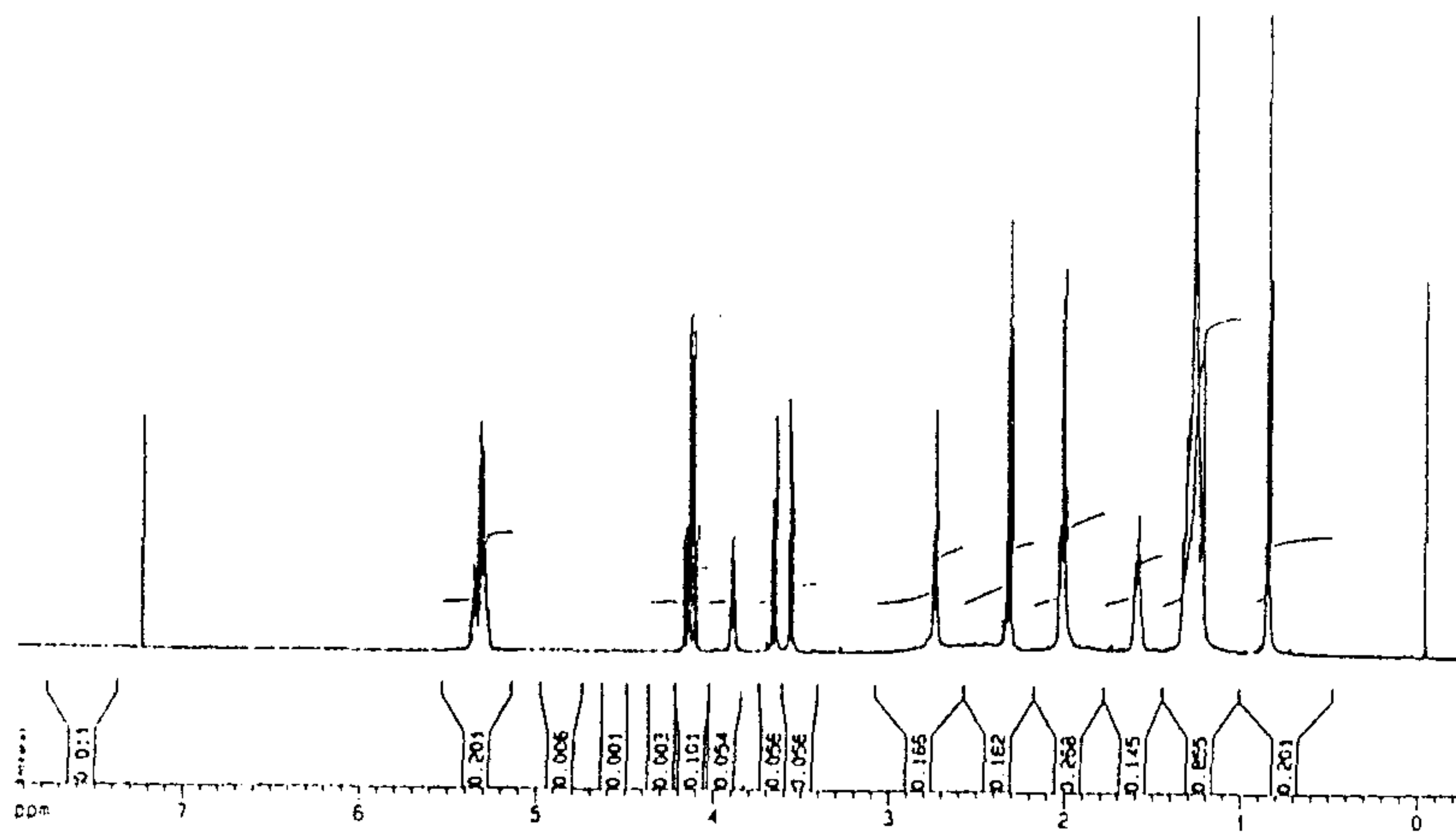


Fig. 24. ¹H NMR Spectra of Compound

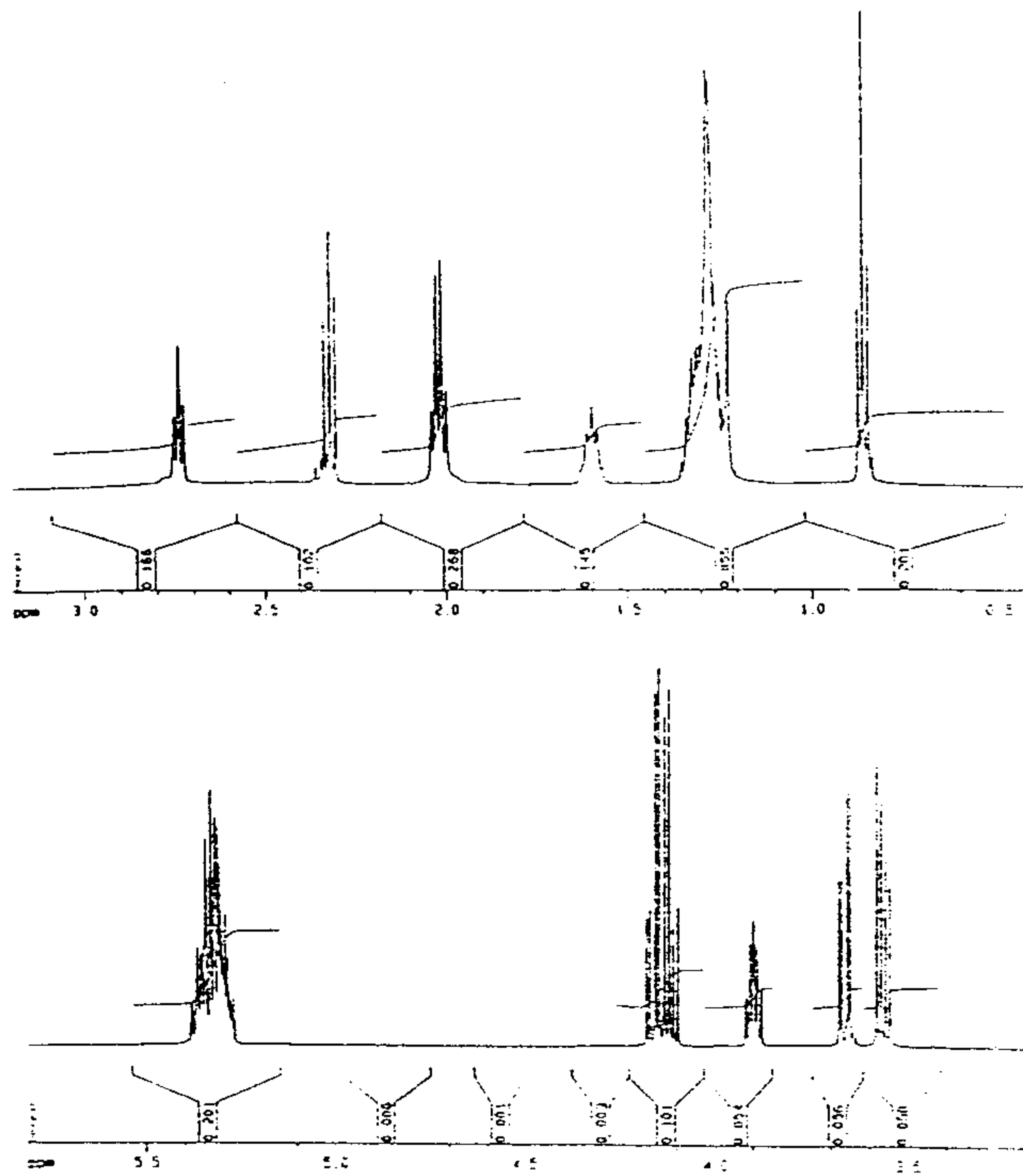


Fig. 25. Expand Spectra of Fig. 23

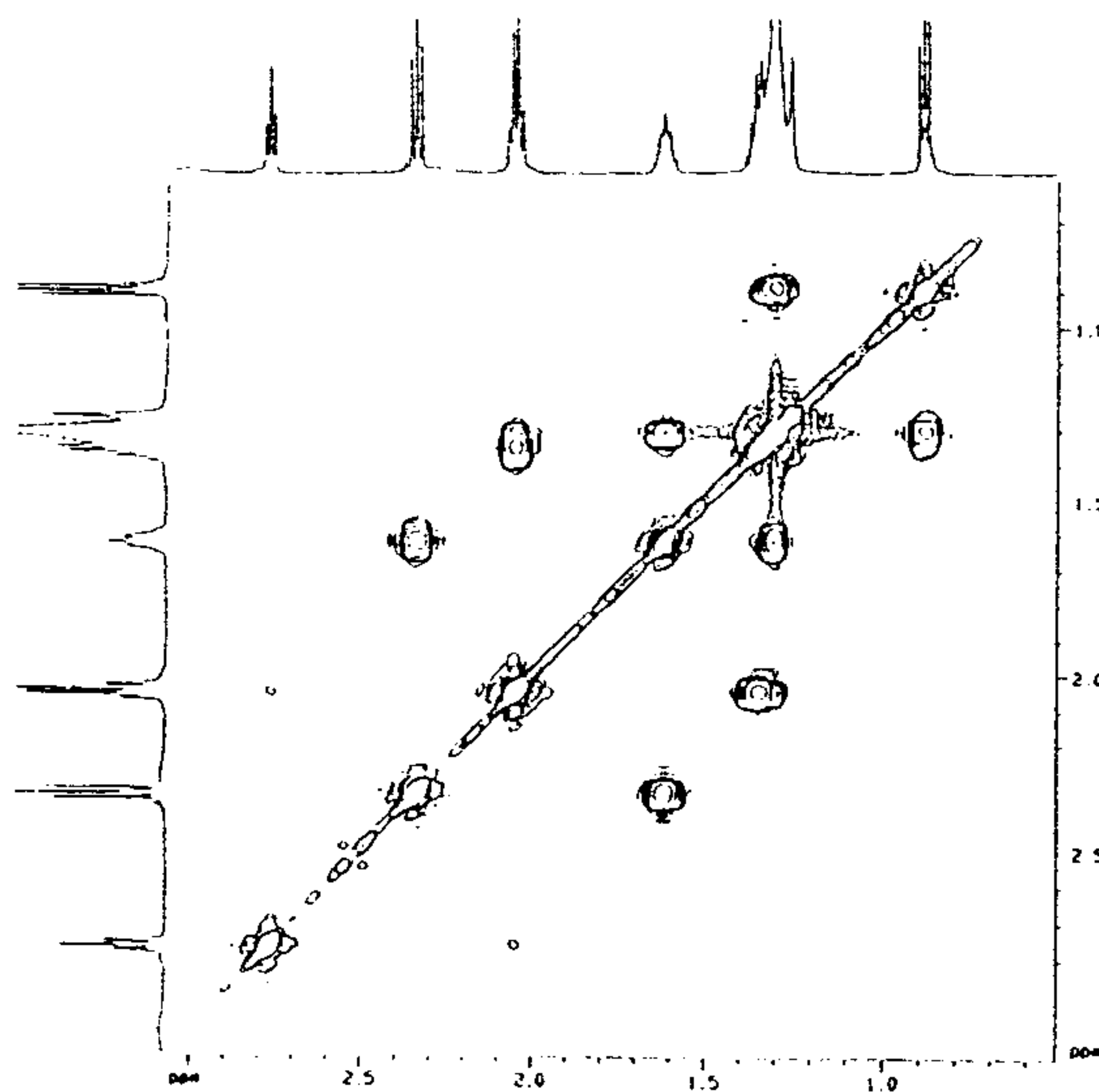


Fig. 26. ^1H - ^1H COSY Spectra of Compound

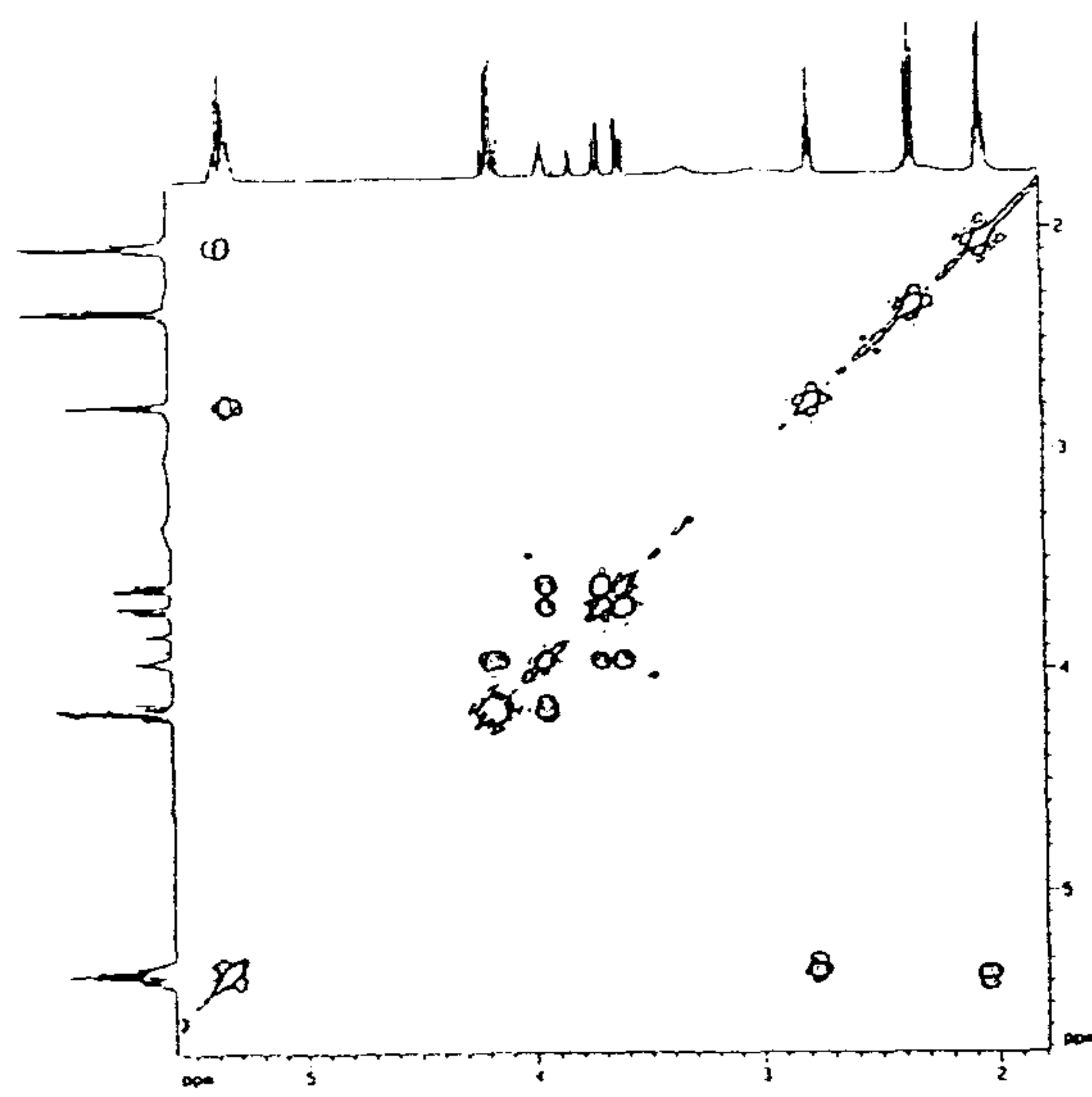


Fig. 27. ^1H - ^1H COSY Spectra of Compound

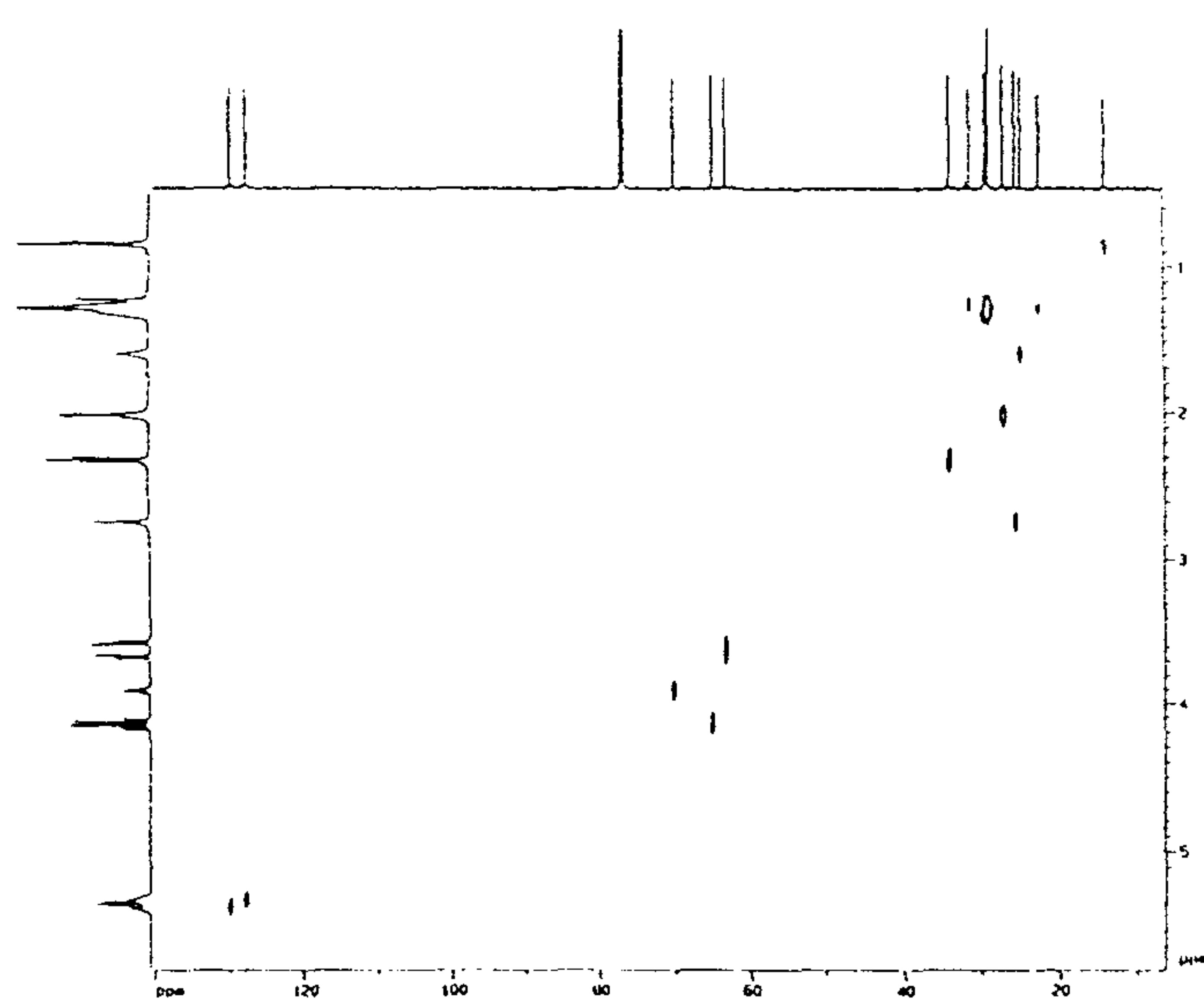


Fig. 28. ^{13}C - ^1H COSY Spectra of Compound

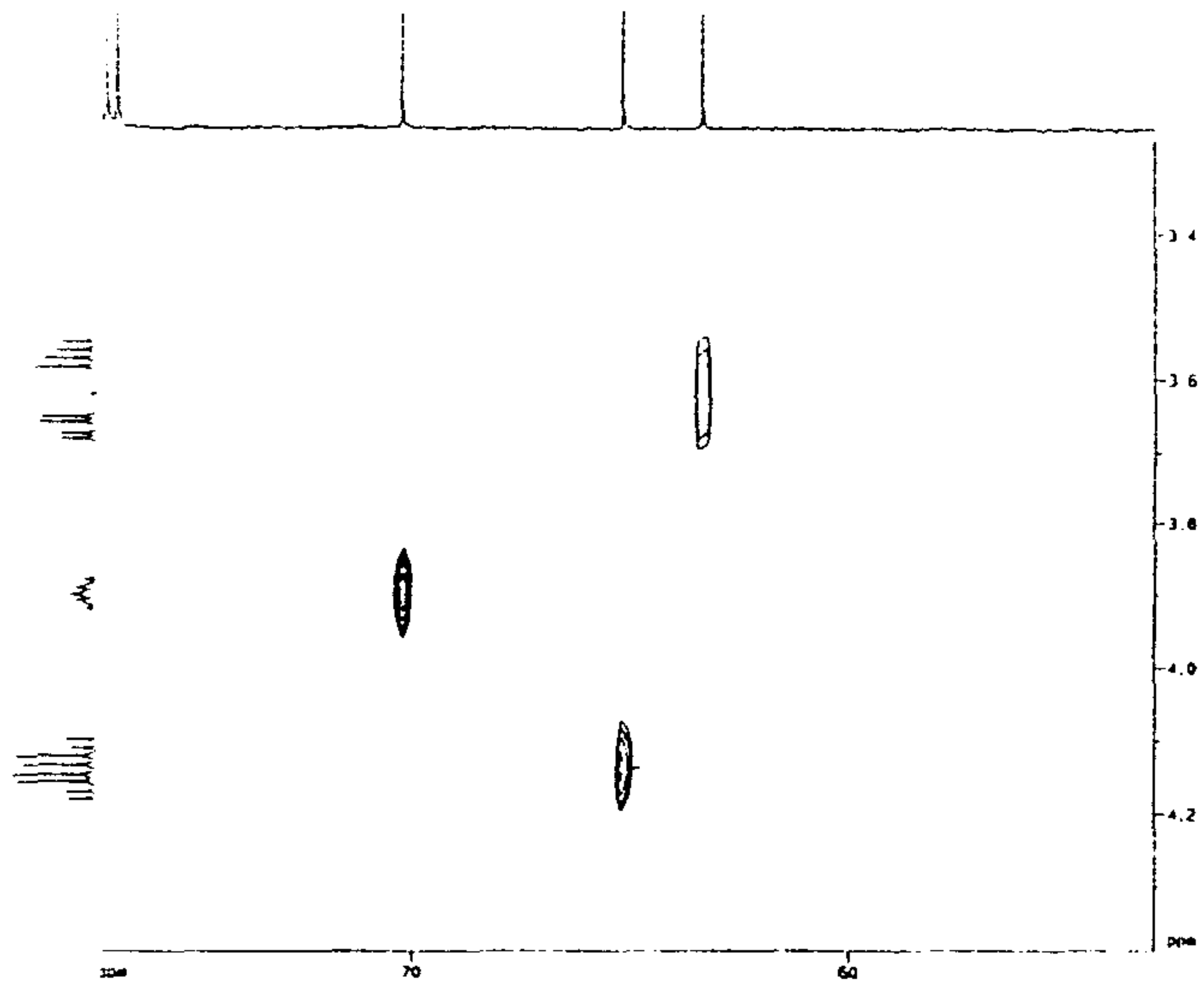


Fig. 29. Expand Spectra of Fig. 27

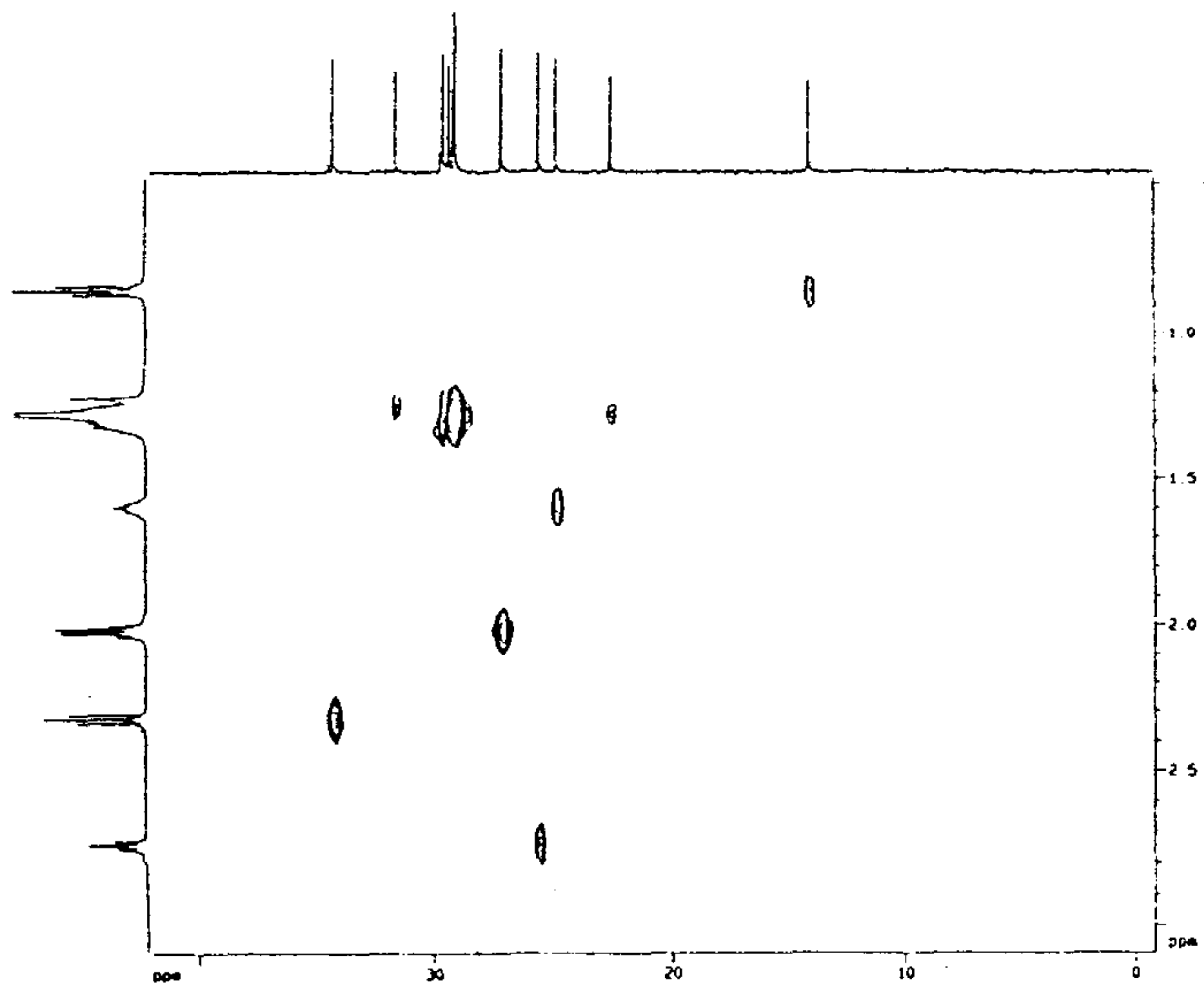


Fig. 30. Expand Spectra of Fig. 27

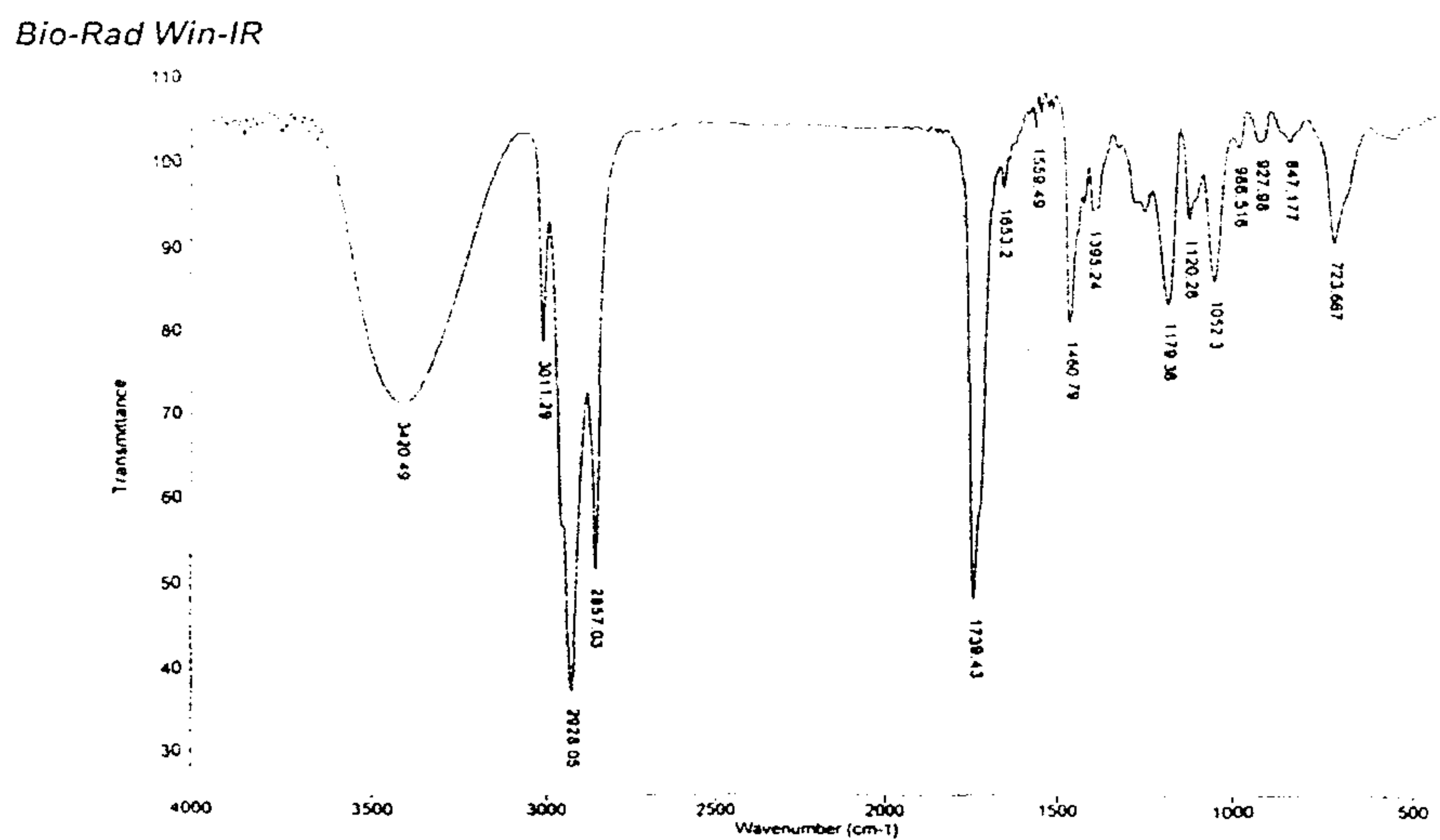


Fig. 31. IR Spectra of Compound

4. 고지혈증 흰쥐의 혈청 및 간장의 지질대사 개선효과

3주간 Table 6의 식이로 실험 사육한 흰쥐의 혈청 및 간장의 지질대사에 미치는 개선 효과는 다음과 같다.

가. 체중 증가량 및 식이효율

3주간 식이 사육한 흰쥐의 체중증가량, 식이섭취량 및 식이효율은 Table 13과 같이 식이 섭취량은 5% 섬유소 분말이 함유된 1군과 2군에 비하여 10% 도라지 분말이 함유된 4군에서 가장 낮게 나타났는데, 이는 도라지의 쓴맛에 기인된 것으로 추정된다. 그러나 체중증가는 5% 도라지 분말 식이군(3군)에서 가장 높게 나타나 10% 도라지 분말 식이군(4군)보다 식이효율이 높은 것으로 생각된다.

Table 13. Body weight gain, food intake, and FER of rats fed experimental diets for 3 weeks

Group	Weight gain (g)	Food intake (g)	FER ¹
1	113 ± 2.4 ^{a,2}	346 ± 5.2 ^c	0.32
2	119 ± 5.5 ^b	352 ± 6.1 ^c	0.34
3	135 ± 2.4 ^c	329 ± 5.2 ^b	0.41
4	124 ± 3.4 ^{b,c}	307 ± 2.3 ^a	0.41

¹ Food efficiency ratio. ² Values are M ± SE (n=6). Values within the same column not sharing a common superscript letter are significantly different at p < 0.05.

나. 혈청중의 GPT, GOT 및 LDH 효소활성

간장손상의 지표가 되는 혈청중의 GPT, GOT 및 LDH 활성은 모든 식이군에서 정상이었으며, 도라지 식이군에서 특히 낮은 수치를 보였다(Table 14).

Table 14. Activities of GPT, GOT and lactate dihydrogenase(LDH) in serum of rats fed experimental diets for 3 weeks

Group	GPT (Karmen unit/ml)	GOT (Karmen unit/ml)	LDH (Wroblewski unit/ml)
1	45.7±2.1 ^{a,1}	90.1±2.5 ^b	1,067±23.7 ^a
2	35.6±8.3 ^b	81.5±3.3 ^{a,b}	1,474±40.6 ^c
3	29.5±5.1 ^a	80.7±1.3 ^{a,b}	1,329±53.3 ^{b,c}
4	24.3±4.1 ^a	76.1±3.0 ^a	1,225±99.5 ^b

¹ Values are M±SE (n=6). Values within the same column not sharing a common superscript letter are significantly different at p<0.05.

다. 혈청 및 간장 중의 지질농도

22년근 도라지 식이가 혈청 및 간장의 지질농도에 미치는 영향은 Table 15와 같다. 총콜레스테롤과 중성지질 농도는 혈청과 간장에서 도라지 식이군(3군, 4군)이 고지혈증 군(2군)에 비하여 현저히 낮게 검출되어 지질성분 개선효과가 있는 것으로 나타났다. 더욱이, 도라지 식이군(4군)은 고지혈증 유발군(2군)에 비하여 혈청중의 LDL-콜레스테롤 농도는 감소된 반면에, HDL-콜레스테롤은 뚜렷하게 증가하였다. 도라지 식이군에서 혈청 인지질 농도는 대조군인 1군과 2군에 비하여 현저히 감소하였으나, 간장 인지질 농도는 비슷한 수치를 보였다.

혈청 포도당 농도는 5% 도라지 식이군에서는 감소하였으나 10% 도라지 식이군에서는 뚜렷한 감소 효과가 없었다. 그리고 도라지 식이군에서의 동맥경화지수는 대조군에 비하여 유의적 감소를 보였으며, 5% 도라지 식이군이 10% 도라지 식이군 보다 지질대사 개선 효과가 전반적으로 효과적인 것으로 판명되었다.

22년생 도라지의 어떤 성분이 지질대사 개선 효과가 있는지는 불명확하지만 지금까지의 연구보고를 기초로 미루어 보아 식이 섬유, 식이단백질, 사포닌 등에 기인되는 것으로 추측된다.

따라서 본 연구에서 도라지 분말은 흰쥐의 혈청 및 간장의 콜레스테롤과 중성지방의 농도를 감소시키는 효능이 우수한 것으로 나타나 동맥경화, 혈액순환 장애증 예방에 유용하게 적용될 수 있는 것으로 사료된다.

Table 15. Effects of dietary *P. grandiflorum* on the serum and liver lipid concentrations in rats fed experimental diets for 3 weeks

Parameter	Group			
	1	2	3	4
Serum lipids				
Total cholesterol (mg/dl)	168±6.0 ^{a,1}	262±6.4 ^c	166±3.8 ^a	188±2.3 ^b
HDL-cholesterol (mg/dl)	52.5±2.3 ^a	62.7±2.5 ^b	65.9±2.6 ^b	77.1±1.8 ^c
LDL-cholesterol (mg/dl)	94.4±2.8 ^b	137±4.3 ^c	74.5±3.0 ^a	95.2±3.1 ^b
Free cholesterol (mg/dl)	31.8±0.9 ^a	45.0±0.6 ^c	37.2±1.5 ^b	44.9±1.7 ^c
Triglycerides (mg/dl)	174±5.3 ^b	270±12.0 ^c	129±5.0 ^a	187±4.4 ^{a,b}
Phospholipids (mg/dl)	160±4.7 ^c	188±3.3 ^d	118±5.4 ^a	139±5.3 ^b
Atherogenic index ²	2.2±0.2 ^b	3.2±0.3 ^c	1.5±0.1 ^a	1.4±0.1 ^a
Blood glucose (mg/dl)	142±3.8 ^a	158±5.5 ^b	141±1.4 ^a	151±5.5 ^{a,b}
Liver lipids				
Total cholesterol (mg/g)	8.0±1.7 ^a	17.8±2.8 ^d	12.4±3.2 ^b	14.2±1.8 ^c
Free cholesterol (mg/g)	4.0±0.6 ^a	4.8±0.4 ^b	5.1±0.4 ^b	6.1±0.5 ^c
Triglycerides (mg/g)	73.5±2.3 ^b	88.1±2.1 ^c	46.0±3.5 ^a	75.0±5.4 ^b
Phospholipids (mg/g)	23.7±3.5 ^{a,b}	25.1±4.1 ^{a,b}	22.4±3.0 ^a	24.2±3.8 ^b

¹ Values are M±SE (n=6). Values within the same row not sharing a common superscript letter are significantly different at p<0.05. ² (Total chol.-HDL-chol.)/HDL-chol.

5. 암세포 접착저해 활성

메탄을 추출물 1mg/ml, 0.5mg/ml, 0.25mg/ml, 0.125mg/ml, 0.062mg/ml, 0.031mg/ml의 농도로 한시간 동안 처리하였을시 암세포의 laminin에의 결합 형태 및 세포형태를 현미경하에서 관찰하여 사진 촬영하였다(Fig. 32). Fig. 32에서 관찰할 수 있듯이 대조구의 경우 vehicle로 사용한 DMSO를 첨가하였을 경우에는 암세포가 laminin에 부착되어 있었고 1 mg/ml의 농도에서는 암세포의 세포막의 파손이 관찰되었으며, 0.5mg/ml의 농도에서는 20~30%의 세포가 세포막 손상을 받았으나 나머지 70

~80%의 세포는 laminin에 부착하지 못하고 구형의 세포형태를 유지하였다. 0.25mg/ml 과 0.125mg/ml의 처리구에서는 100%의 세포가 laminin에 부착하지 못하고 구형의 세포형태를 유지하였다. 0.062mg/ml의 농도에서는 70%정도의 세포가 부착하지 못하였고 0.031mg/ml의 농도에서는 30% 정도의 세포가 부착하지 못하는 것으로 나타났다(Table 16).

Table 16. Laminin binding inhibitory activity of *Platycodon* root MeOH extract

Concentration (mg/ml)	Relative Optical Density at 570nm
Control	1.00
0.031	0.71
0.062	0.22
0.125	0.00
0.250	0.00
0.500	0.00
1.000	0.00

암세포의 extracellular matrix에의 결합은 암세포의 전이에 관여하는 것으로 알려져 있어 도라지 추출물이 동물실험에서 experimental metastasis를 저해하는 것으로 밝혀진다면 세포부착 저해물질을 단리하여 의약품으로의 개발이 가능할 것이고, 도라지를 이용한 암전이를 예방할 수 있는 식품소재로의 개발도 가능할 것이다.

도라지의 메탄올 추출물을 물과 용매를 동량 첨가하여 녹인 후 용매에 대한 추출성을 butanol 과 ethyl acetate를 대상으로 조사하여 본 결과 세포 접착저해활성은 ethyl acetate에 의하여 추출되지 않았으며

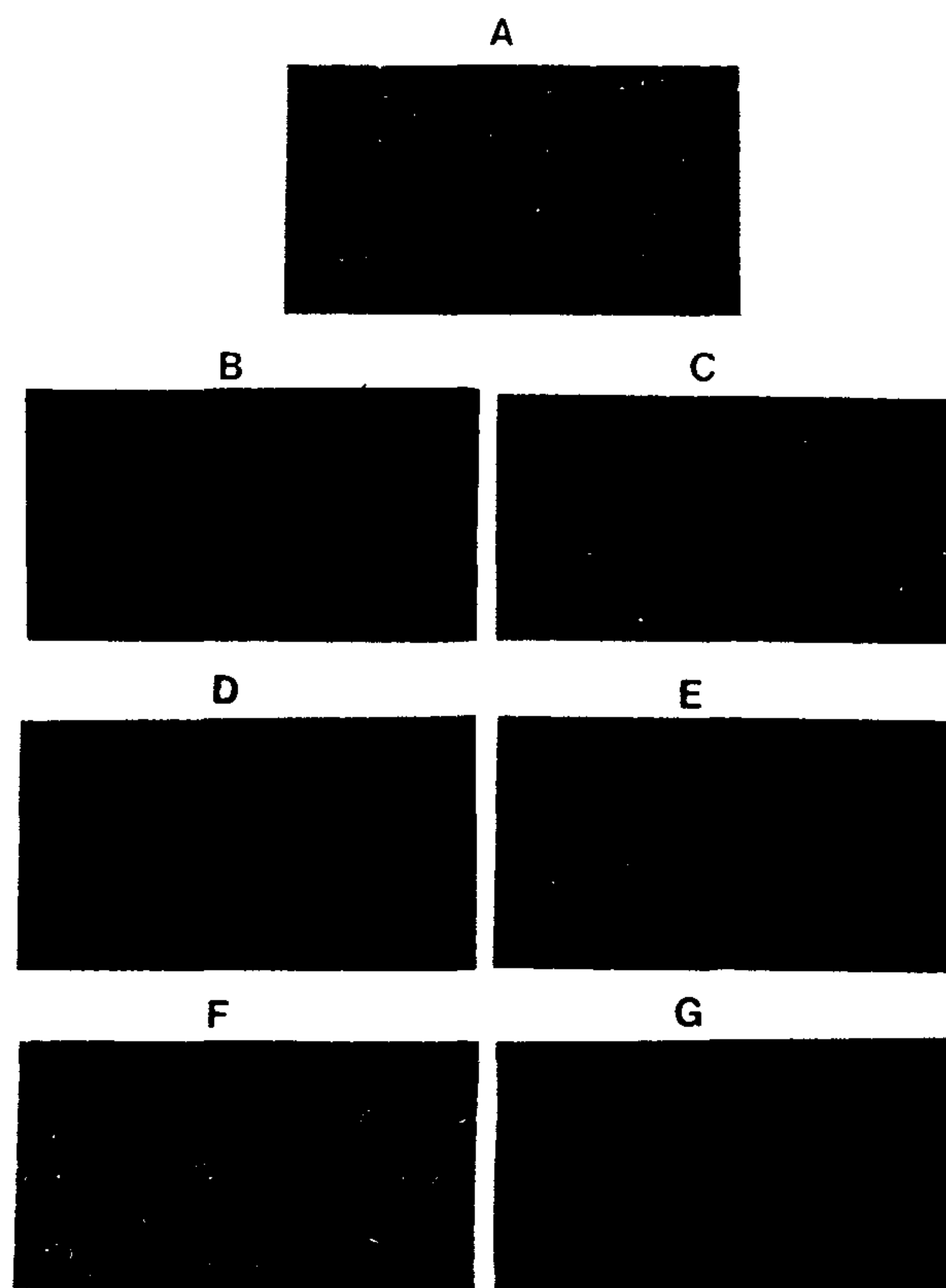


Fig. 32. Microscopic observation on the laminin coated microplate of B16-F1 mouse melanoma cell treated with Platycodon MoOH extract at the different concentrations; A(control), B(0.031mg/ml), C(0.062mg/ml), D(0.125mg/ml), E(0.25 mg/ml), F(0.5mg/ml), G(1.0mg/ml)

butanol층에 30% 정도 추출되는 것으로 보아 도라지 메탄올 추출물의 세포접착저해 활성 물질은 극성이 높은 수용성의 물질로 판단되며 Sephadex G-10에서의 겔여과를 행하였을시 void volume 부근에서 넓은 분포를 나타내며 용출되는 것으로 보아 분자량 1000이상의 복합적인 물질로 구성되어 있는 것으로 판단된다. 본 저해물질의 분리를 여러가지 resin에 의하여 진행하고 있으나 물질의 다양성 및 선택성의 결여 등에 의하여 분리가 어려운 형편이나 세포나 laminin등을 이용한 affinity chromatography에 의하여 분리할 수 있을 것으로 생각된다.

6. 면역증강 작용

도라지 추출물을 Fig. 20과 같이 용매의 극성에 따라 분획하여 면역 증강 기능을 조사하였을때 수층에서 가장 우수한 효과가 인정되어, 이 수층을 다시 silica gel column chromatography를 행하여 분획별로 HPLC로 분석한 결과 fructose의 중합도가 20개 이하의 inulin 분획에서 가장 우수한 면역증강 활성이 검출되었다.

2년근에 비하여 22년근 도라지는 fructose 중합도가 매우 낮은 결과를 1차년도 연구에서 얻었는데, 22년근이 2년근에 비하여 면역증강 활성이 5배 이상 높은 결과는 inulin의 fructose 중합도와 밀접한 상관성이 있는 것으로 추측된다. 그러나 다른 용매 분획에서 면역증강 효과가 거의 검출되지 않았다.

7. 도라지 및 도라지 한방제재가 류마티스 관절염 치료효능에 미치는 영향

SD-rat의 오른쪽 발바닥에 0.6mg의 heat killed - Mycobacterium histolyticum을 주사한 후 약 20일 까지 양쪽 발의 부종 크기를 측정하여 염증의 저해 정도를 대조군, predisolone (4mg/day)급여군, 1차년도 연구에서 얻어진 14종의 생약재 추출물 급여군 (20mg/day), 22년생 도라지 추출물 급여군 (20mg/day, 40mg/day), 그리고 생약재와 22년생 도라지 추출물의 혼합 급여군 (40mg/day) 등 6군(6마리씩/1군)에서 조사하였다.

생약재 추출물 급여군(40mg/day)과 생약재 및 22년생 도라지 추출물 혼합 급여군에서만 부종의 저해능이 관찰 되었다. 그러나 22년생 도라지 추출물의 급여량을 160mg/kg으로 하면 활성이 검출되고, 200mg/kg으로 증가시키면 유의성 있는 활성이 없는 것으로 나타나 일정한 범위의 용량(약 100~200mg/kg인 것으로 추정)에서 border line에 들어가는 활성이 있을 것으로 추정되어 급여량에 따른 부종저하활성을 조사한 결과 150mg/kg 용량에서 활성이 나타났다.

8. 도라지 추출액이 Alloxan 유발 당뇨병 흰쥐의 혈당 및 지질성분에 미치는 영향

가. 혈당농도

혈당농도는 Table 17와 같이, 대조군(1군)에 비하여 실험사육 3주간 alloxan monohydrate(15mg/kg B.W/day)를 복강 주사한 2군, 3군, 4군에서 유의성 있게 높게 나타났으나 alloxan만 투여한 2군(306.8mg/dl)에 비해 6년근 도라지 추출액을 급여한 3군(271.6mg/dl), 22년근 도라지 추출액을 급여한 4군(227.5mg/dl)에서 낮게 나타났는데,

22년근 도라지 추출액 급여군이 6년근 도라지 추출액 급여군보다 혈당 저하효과가 더 큰 것으로 나타났다. 전 등에 의하면 포도당 용액을 흰쥐에 투여하면 혈당이 상승하지만 수용성 식물 섬유소를 동시에 투여하면 현저히 억제된다고 하였으며, 이 등은 강심 배당체, saponin, taralin, tannin의 성분을 함유한 두릅나무 추출물이 alloxan으로 유발된 토끼의 고혈당을 강하시킨다고 보고 한 바 있다. 또한 이는 streptozotocin으로 유발된 당뇨 흰쥐에 쇠뜨기 메탄올 추출물을 투여한 결과, 혈당의 현저한 감소를 관찰했는데, 쇠뜨기의 성분으로는 색소배당체, saponin, Vit. C 및 규산 등으로 알려져 있다. 그리고 Jenkins등에 의하면 구아검과 pectin등의 점액성 섬유를 급여 하였을때 식후 혈당 및 인슐린 농도를 현저하게 감소시키는 효과가 있음을 보고하였고 또한 당뇨병의 치료 효과 실험에 식물섬유를 사용하였을 때 식물섬유는 인슐린 필요량과 뇨당 분비량을 감소시켜 당뇨병 치료에 효과가 있는 것으로 여러 연구자들에 의해 보고되어 있다. 따라서, 본 연구에서 도라지 추출액 급여에 따른 혈당 저하효과는 상기의 연구보고와 유사하며 이는 도라지에 함유된 배당체, saponin 및 식물섬유소 성분이 그 종류에 따라 다소 차이는 있으나 포도당 흡수속도와 관련한 호르몬 반응의 조절인자로서 작용한다고 추정된다.

나. 혈청 총콜레스테롤, LDL 및 HDL-콜레스테롤 농도

혈청 중의 총콜레스테롤, LDL, HDL-콜레스테롤 농도와 그 비율 및 동맥경화지수는 Table 18과 같다. 혈청 중 총콜레스테롤 농도는 기본식이만 급여한 1군에 비해 여타 실험군에서 높게 나타났으나, alloxan만 투여한 2군의 127.4mg/dl보다는 3군, 4군이 유의적으로 낮았

Table 17. Effect of *Platycodon grandiflorum* on blood glucose in serum of alloxan-induced hyperglycemic rats for 3weeks

Group*	blood glucose(mg/dl)
1)	162.4 ± 9.4 ^{a***}
2)	306.8 ± 19.7 ^d
3)	271.6 ± 13.2 ^c
4)	227.5 ± 14.1 ^b

* See the legend of Table 7

** Mean ± S.E.(n=6) Mean in the same column not sharing common superscript letters are significantly different (p<0.05)

으며 특히 22년근 도라지 급여군에서 더욱 낮게 나타났다. LDL농도는 2군이 가장 높게 나타났지만 도라지 추출액을 급여한 3군, 4군이 대조군(1군)의 수준에는 미치지 못하였으나 alloxan 단독 투여군(2군)보다 유의성 있게 낮았다. HDL-콜레스테롤 농도는 대조군의 23.3mg/dl보다 alloxan투여(2군)에 의해 16.7mg/dl로 감소되었으며, 6년근 도라지(3군), 22년근 도라지(4군)추출액을 급여함으로써 다소 증가되었다. 총콜레스테롤에 대한 HDL-콜레스테롤 농도비는 1군이 26.9%로 현저히 높았으나, 2군(13.1%)에 비해 3군(16.5%), 4군(19.8%)이 높은 비율을 나타내었으며, 동맥경화지수는 alloxan의 투여에 의하여 대조군(2.7)에 비해 6.6으로 현저히 증가되던 것이 도라지 추출액 급여로 5.1(3군), 4.0(4군)으로 대조군의 수준에는 미치지 못하였으나 2군에 비해 유의적인 감소를 관찰할 수 있었다. Oakenfull등에 의하면 사포닌 성분은 소장에서 담즙산의 재흡수를 억제하고 분변으로 배설을 증가시킴으로써 혈중콜레스테롤 농도를 저하시킨다고 하였으며, Fisher등은 흰쥐에 있어서 섬유소는 혈중 콜레스테롤 농도를 저하시키고 atherome성 동맥경화의 진행을 지연시킨다고 보고한바 있다. 또한 식물섬유가 모두 비슷한 효과를 나

타내는 것은 아니나 pectin, carrageenan같은 식물섬유는 혈액내 콜레스테롤 농도 저하효과가 있는 것으로 보고 되어 있고, 아라비아검, 한천 및 셀룰로오스등의 혈청 콜레스테롤 농도 저하 효과는 서로 같지 않다고 알려져 있다. 본 실험 결과, alloxan으로 유발된 당뇨병 흰쥐에 있어서 도라지 추출액이 혈청 총콜레스테롤, LDL농도의 저하, HDL-콜레스테롤 농도의 상승 및 동맥경화지수의 저하 등으로 미루어 보아 혈청지질 개선효과가 있다는 것으로 사료되며 6년근보다 22년근 도라지 추출액 급여가 지질개선효과가 더욱 큰 것으로 나타났다.

다. 혈청 유리콜레스테롤 및 콜레스테롤 에스테르 농도

혈청 중의 유리콜레스테롤, 콜레스테롤 에스테르농도 및 총콜레스테롤에 대한 콜레스테롤 에스테르의 비는 Table 19와 같다. 유리콜레스테롤과 콜레스테롤 에스테르 농도는 alloxan만 투여한 2군에 비하여 전 실험군에서 낮은 농도를 나타내었으나, 3군과 4군간의 유의적인 차이는 별로 없었다. 또한 전 실험군간의 콜레스테롤 에스테르 비는 84.3% ~ 85.6%범위였다. Goodman은 콜레스테롤은 소장에서 흡수되는 동안 콜레스테롤 에스테르의 형태로 점막세포로 들어가며 그 중 약 80%가 에스테르화 된다고 하였으며, Grag등은 흰쥐에게 콜레스테롤 에스테르를 급여하였을때 혈중 유리콜레스테롤 및 콜레스테롤 에스테르의 농도가 상승되었다고 보고한 바 있다. 따라서 본 실험결과, 혈청 총콜레스테롤 농도가 가장 높게 나타난 2군에서 유리콜레스테롤 및 콜레스테롤 에스테르의 농도 또한 높게 나타난 반면, 도라지 추출액 급여로 감소됨을 관찰할 수 있었다.

Table 18. Effect of *Platycodon grandiflorum* on total cholesterol, LDL and HDL-cholesterol, ratio of HDL-cholesterol to total cholesterol and atherosclerotic index in serum of alloxan-induced hyperglycemic rats for 3 weeks

Group*	Total Cholesterol (A)	LDL Cholesterol	HDL-Cholesterol (B)	(B)/(A) × 100 (%)	Atherosclerotic index**
1)	86.5 ± 3.3 ^{a***}	140.5 ± 9.6 ^a	23.3 ± 2.2 ^c	26.9 ± 1.3 ^d	2.7
2)	127.4 ± 5.1 ^d	203.8 ± 12.8 ^d	16.7 ± 1.6 ^a	13.1 ± 0.5 ^a	6.6
3)	104.7 ± 4.5 ^c	181.6 ± 13.1 ^c	17.3 ± 1.8 ^{ab}	16.5 ± 0.7 ^b	5.1
4)	95.9 ± 3.9 ^b	163.3 ± 12.7 ^b	19.0 ± 1.5 ^b	19.8 ± 0.6 ^c	4.0

* See the legend of Table 7

** (Total chol.- HDL-chol.)/HDL-chol.

*** Mean ± S.E.(n=6) Mean in the same column not sharing common superscript letters are significantly different (p<0.05)

Table 19. Effect of *Platycodon grandiflorum* on free cholesterol, cholesteryl ester and cholesteryl ester ratio in serum of alloxan-induced hyperglycemic rats for 3 weeks

Group*	(mg/dl)		
	Free cholesterol	Chloesteryl ester	Cholesteryl ester ratio(%)**
1)	12.9 ± 0.5 ^{a***}	73.6 ± 2.5 ^a	85.1
2)	20.0 ± 0.8 ^c	107.4 ± 3.2 ^c	84.3
3)	15.0 ± 0.9 ^b	89.7 ± 3.4 ^{bc}	85.6
4)	14.6 ± 0.7 ^b	81.3 ± 2.9 ^b	84.8

* See the legend of Table 7

** Cholesteryl ester / Total cholesterol × 100

*** Mean ± S.E.(n=6) Mean in the same column not sharing common superscript letters are significantly different (p<0.05)

라. 중성지질 및 인지질농도

Table 20에서 보는 바와 같이 alloxan으로 유발된 당뇨성 흰쥐에 있어서 혈청 중 중성지질 및 인지질 농도는 2군에 비해 전 실험군에서 현저히 낮게 나타났고, 실험군 간에 있어서는 도라지 추출액 급여군(3군, 4군)이 기본식이 급여군인 1군보다는 높았으나 alloxan만 투여한 2군에 비해 유의성있게 낮게 나타났고, 특히 22년근 도라지 추출액 급여군(4군)이 더욱 낮은 경향이였다. Kinnunen등에 의하면 혈청 중성지질의 농도 저하작용은 모세혈관 벽에 존재하는 lipoprotein lipase가 chylomicron과 VLDL의 분해를 촉진시키기 때문이라고 하였으며, Akiba등은 무섬유소 식이보다 쌀겨, alfalfa 및 땅콩 껍질 등의 섬유소를 급여한 흰쥐에 있어 혈청 인지질 농도가 비교적 낮았다고 보고 하였는데 본 실험결과는 도라지 추출액 급여로 인하여 혈청 중성지질 및

인지질의 농도가 저하되는 것으로 나타났다.

Table 20. Effect of *Platycodon grandiflorum* on triglyceride and phospholipid in serum of alloxan-induced hyperglycemic rats for 3 weeks

(mg/ml)

Group*	Triglyceride	Phospholipid
1)	75.3 ± 2.6 ^{a**}	115.2 ± 4.7 ^a
2)	104.6 ± 3.4 ^d	148.9 ± 5.2 ^c
3)	92.5 ± 3.0 ^c	136.5 ± 3.8 ^{bc}
4)	86.1 ± 2.9 ^b	129.4 ± 4.2 ^b

* See the legend of Table 7

** Mean ± S.E.(n=6) Mean in the same column not sharing common superscript letters are significantly different (p<0.05)

마. 간장의 총콜레스테롤, 중성지질 및 인지질 함량

간장중 총콜레스테롤, 중성지질 및 인지질의 함량은 Table 21과 같다. 총콜레스테롤 함량은 기본식이만 급여한 대조군(1군)에 비하여 alloxan을 투여한 전 실험군에서 높게 나타났으나, 도라지 추출액 급여군(3군, 4군)이 2군보다 유의성있게 낮게 나타났으며, 특히 4군이 더욱 낮았다. 중성지질 및 인지질 함량은 2군에 비해 도라지 추출액 급여군이 감소되는 경향을 보였다. Thomas등은 blackgram에서 추출한 식이 섬유소를 급여한 흰쥐의 간조직에서 콜레스테롤 함량이 감소된 것은 간장에서 콜레스테롤이 담즙산으로의 전환속도가 높아졌기 때문이라고 하였으며, Vahouny등은 15%섬유소 식이를 흰쥐에게 6주간 급여한 결

과 중성지질의 농도가 현저히 감소되었다고 보고한 바 있다.

Table 21. Effect of *Platycodon grandiflorum* on total cholesterol, triglyceride and phospholipid in liver of alloxan-induced hyperglycemic rats for 3 weeks

Group*	(mg/g)		
	Total cholesterol	Triglyceride	Phospholipid
1)	5.1 ± 0.2 ^{a***}	28.7 ± 1.4 ^a	12.6 ± 0.7 ^a
2)	8.4 ± 0.3 ^d	41.5 ± 2.2 ^c	20.8 ± 1.0 ^c
3)	7.3 ± 0.3 ^c	35.2 ± 2.1 ^b	18.2 ± 1.1 ^{bc}
4)	6.4 ± 0.2 ^b	32.4 ± 2.2 ^b	17.5 ± 1.2 ^{bc}

* See the legend of Table 7

** Mean ± S.E.(n=6) Mean in the same column not sharing common superscript letters are significantly different (p<0.05)

바. 혈청 중 Aminotransferase(AST, ALT) 및 lactate dehydrogenase(LDH)의 활성

도라지 추출액이 alloxan투여에 의한 혈청 중 AST, ALT 및 lactate dehydrogenase(LDH)의 활성에 미치는 영향을 관찰한 결과는 Table 22 와 같다. alloxan투여군에서의 s-AST활성은 2군 78.8, 3군 70.3, 4군 67.7 Karmen unit/ml로 기본식이만 급여한 1군에 비해서 높게 나타났으나, 도라지 추출액 급여(3군, 4군)로 감소되는 경향을 나타냈으며, 4군에서 더욱 감소하는 것으로 나타났다. 한편 s-ALT활성은 여타 실험군에 비해 대조군(1군)에서 가장 낮게 나타났고, lactate dehydrogenase 활성은 대조군(879.3 wroblewski unit/ml)에 비해 전 실험군에서 높게

나타났으나 2군(1365.3 wroblewski unit/ml)보다는 3군(1083.5 wroblewski unit/ml), 4군(984.1 wroblewski unit/ml)이 감소하는 경향을 나타내었다. 간장 장애의 지표가 되는 AST와 ALT활성의 증가는 지방대사의 저해로 간실질세포의 장애가 발생하여 혈중으로 방출이 항진되어 나타나는 것으로, Nomura등은 수용성 식물섬유가 혈중의 AST 및 ALT활성을 감소시킨다고 보고한 바 있다. 일반적으로 LDH활성은 고중성지방혈증의 발생과 간장에 지방이 축적됨으로써 일어나는 담즙분비 장애에 의해 상승되는데 도라지 추출액의 급여로 인하여 LDH활성이 감소되는 것으로 나타났다.

Table 22. Effect of *P. grandiflorum* on aspartate, alanine aminotransferase (AST, EC 2.6.1.1; ALT, EC 2.6.1.2) and lactate dehydrogenase (EC 1.1.1.27) activities in serum of alloxan-induced hyperglycemic rats for 3 weeks

Group*	AST	ALT	Lactate dehydrogenase
	Karmen unit/ml of serum		Wroblewski unit/ml
1)	61.9 ± 4.8 ^{a**}	27.5 ± 2.5 ^a	879.3 ± 32.4 ^a
2)	78.8 ± 5.1 ^c	31.4 ± 2.7 ^{bc}	1365.3 ± 39.8 ^c
3)	70.3 ± 4.6 ^b	30.1 ± 2.6 ^b	1083.5 ± 40.2 ^{bc}
4)	67.7 ± 4.7 ^b	29.9 ± 2.7 ^b	984.1 ± 34.4 ^b

* See the legend of Table 7

** Mean ± S.E.(n=6) Mean in the same column not sharing common superscript letters are significantly different (p<0.05)

제 4장 건강보조식품의 개발

제 1절 서 설

본 연구에서는 먼저 도라지의 약리성분과 생리활성에 관한 자료 수집을 한 결과 약 300여편의 논문이 보고 되어 있었고, 이것을 다시 성분 및 활성, 그리고 한방제제 별로 구분하여 정리한 결과, 특이한 것은 도라지 추출물이 알콜의 소화관내의 흡수를 지양하여 혈중 알콜농도를 저하시키며(일본공개특허 공보, JP03264534) 또한 도라지의 이눌린 성분은 강력한 항암 효과가 있음이 보고 되었다(일본공개특허 공보, JP0217292, JP60089427).

중국에서 발표된 결과에 의하면 도라지의 사포닌 성분이 만성기관지염을 유발시킨 토끼에 우수한 치료 효과가 있었으며, 소아의 기침과 혈장내의 분비물 촉진 작용에 뚜렷한 생리 활성이 관찰되었다.

현재 중국, 일본, 한국에서 도라지가 함유된 한방제제는 30여종이 시판되고 있는데, 이들 가운데 오약순기산, 통기환, 순기원등은 중풍과 관절염 치료제로, 안심원과 천왕보심단등은 고혈압, 신경성 질환, 뇌질환등에, 자모연조엑스는 기관지염, 폐결핵, 늑막염등에, 만옥단은 고혈압, 동맥경화, 당뇨병 치료에 각각 이용되고 있다. 그 외의 대부분의 도라지 함유 한방제제는 천식, 거담, 배농,진해등과 같이 기관지 관련 질병에 치료제로서 사용되고 있다.

그리고 도라지의 열수 혹은 알콜 추출물은 당뇨병 유발쥐에 현저한 혈당하강 작용과 glycogen 축적 효과가 관찰되어 당뇨병 치료제로서의 이용가능성이 제시되었다.

이상의 자료수집 결과를 기초로 하여 본 보고서에서는 이미 임상 실험 결과에서 확인된 22년생 도라지의 약리성분을 3~4년생 도라지와 비교 분석하고 그리고 생리적 약리효과를 조사하고 있으며,

이것을 기초로 4종의 건강보조식품개발을 완료하였다.

제 2절 재료 및 방법

1. 도라지

본 실험에서 사용된 4년생 및 22년생 도라지는 본 연구의 협동개발연구자인 이성호씨로부터 공급 받았으며, 수분함량이 15% 내외로 건조한 다음 추출시료로 사용하였다.

2. 생약재

두충, 구기자, 시호, 독활, 우물, 백계자, 결명자, 창출, 오미자, 강할, 산약, 인진, 지모, 감초, 박하, 최향, 행인, 오배자, 원지, 황정, 창이자, 우슬, 방풍 등의 생약재를 건재상에서 구입하여 미분말 형태로 제조후 실험에 사용하였다.

3. 각종 생약재의 추출

상기의 각 생약재는 95% ethanol과 물로 각각 추출하였다. 즉 각 생약재에 95% ethanol을 10배 첨가하여 실온에서 진탕하면서 4시간마다 추출, 여과하는 조작을 3회 연속 반복하여 합한 액을 rotary vaccum evaporator로 감압 농축하여 실험재료로 사용하였다. 물추출물의 조제는 각 생약재에 20배의 물을 가하여 100℃에서 2시간 가열하여 여과한 후 95℃ rotary vaccum evaporator에서 감압농축한 다음 고형분을 측정하여 일정한 농도를 실험에 사용하였다.

4. 건강보조식품의 개발

본 연구에서 얻어진 결과와 임상결과를 기초로 22년생 도라지가 주성분이된 당뇨, 고혈압, 고지혈증 및 모든 염증용 한방제제, 기관지, 천식, 폐결핵용 제제 그리고 간질염용 제제등 3종류를 각종 생약재와 혼합하여 열수 추출하여 레토르트 파우치 형태의 시제품을 제조하였다. 또한 22년생 도라지와 한약재를 혼합하여 기관지염 전용 기능성 음료를 개발하였다.

제 3절 결과 및 고찰

1. 4년생 도라지의 약리 효과

2~4년생 도라지에 관한 300여편의 문헌과 특허를 수집하여 그 성분과 약리작용을 조사한 결과에 의하면 당뇨병, 고혈압, 종양, 알콜흡수억제, 폐결핵, 기관지염, 늑막염, 천식, 거담, 진해 등에 효과가 있음이 보고되어 있었으며, 이들 정보는 22년생 도라지의 약효 검정에 중요한 자료가 될 것으로 사료된다.

2. 건강보조식품의 개발 및 진행 정도

가. 용혈물질 제거 방법

2~4년근 도라지의 사포닌은 용혈작용이 있는 것으로 밝혀져 있는데, 용혈성분을 줄이는 방법을 물에 침지시켜 사포닌 함량과 용혈활성을 비교 분석한 결과 실은의 물에 22년근 도라지를 12시간 이상 침지시 용혈활성은 거의 검출되지 않았다. 22년근은 4년근에 비하여 용혈활성이 낮은 것으로 확인하였다.

나. 효소처리 식품

도라지의 발효 중에 장애물질로 작용할 수 있는 항균물질은 대부분 사포닌에 유래되는 것으로 나타나 사포닌에 저항성이 있는 발효 미생물 선정 실험이 진행되고 있으며, 또한 도라지의 이눌린 중의 과당 중합도는 4년근과 22년근에서 뚜렷한 차이가 있음이 밝혀졌으므로 inulase처리에 의한 fructose 중합도에 따른 약리작용 효과를 조사중에 있다.

다. 기능성 음료 개발

도라지는 진해, 거담, 천식 등에 특이적인 생리활성을 나타내고 있어 흡연자, 기관지 환자를 위한 기능성 음료 개발을 전통적으로 사용되어온 다른 생약재 즉, 행인, 목향, 반하, 맥문동, 후박, 회향, 비파, 박하, 영지, 감초의 열수 및 에탄올 추출물등과 혼합하여 개발된 13종의 음료중에 물리,화학적 특성 및 관능검사를 행하였을때 가장 우수한 한 제품을 선정하였다.

라. 엑기스 추출 방법

22년근 도라지의 추출방법을 ethanol과 열수로 한 결과 고형분 함량은 95% ethanol에서 가장 용이하게 추출되었고 이 물질은 pH와 열안정성이 확인되었다. 열수추출시에는 온도가 높을수록 추출수율이 높게 나타났으며, 많은 양의 이눌린이 분리되었다.

마. 각종 건강보조식품의 개발

2~4년생 도라지의 약리효과, 본 연구에서 얻은 22년생 도라

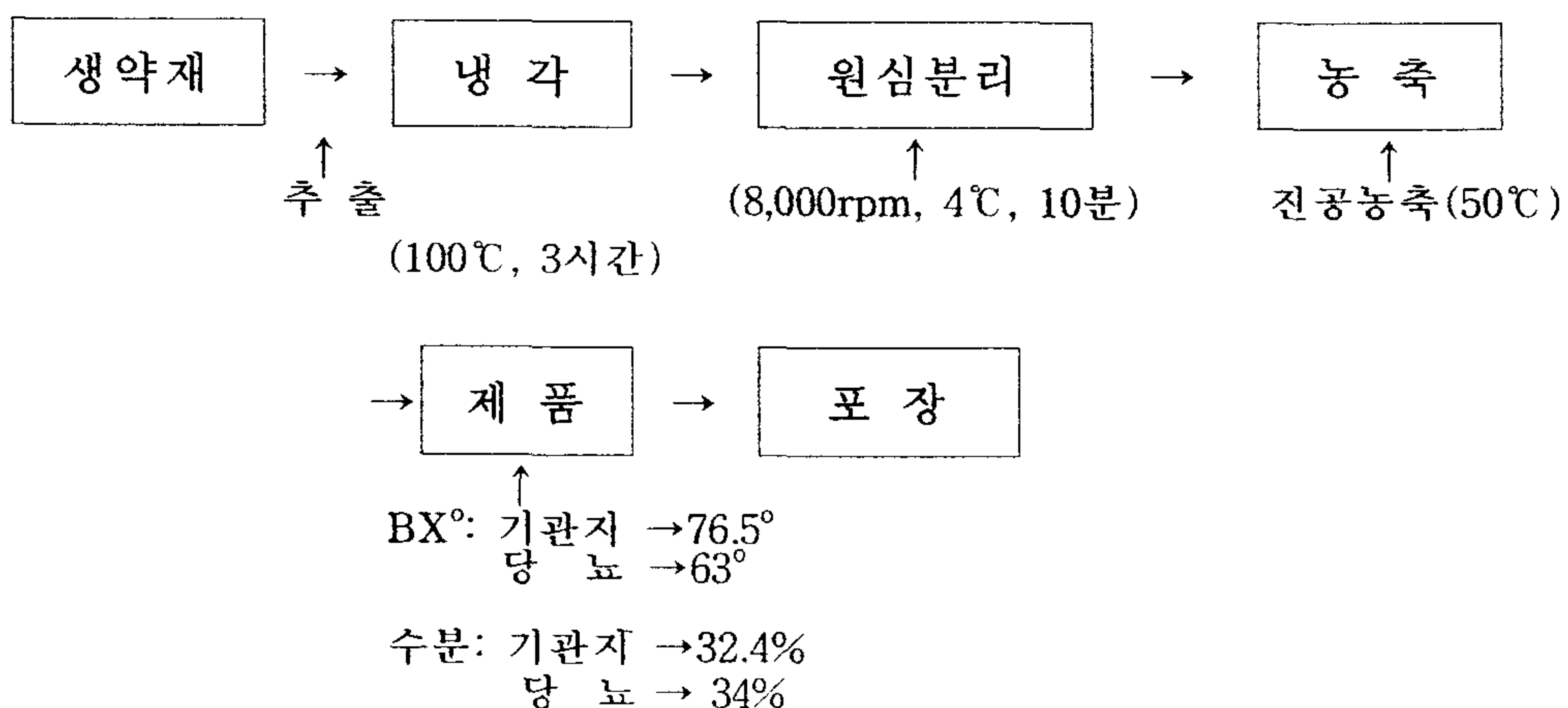
임상실험 결과를 기초로 신경통, 당뇨, 고혈압, 각종 염증용 한방 제재, 기관지, 천식, 결핵용 한방제재 그리고 간질염용 한방제재 등 3종의 건강보조식품을 열수 추출하여 임상실험을 흰쥐를 이용하여 행하였다.

개발된 한방제재의 조성비율은 먼저 고지혈증 및 고혈압용 제재는 22년근 도라지, 두충, 구기자, 시호, 독활, 우슬, 백계자, 결명자, 창출, 오미자, 강활, 산약, 인진, 지모, 감초등으로, 기관지, 천식 및 폐결핵용 제재는 22년근 도라지, 강활, 시호, 맥문동, 결명자, 행인, 목향, 오배자, 원지, 황정, 지모, 창이자, 인진, 감초등으로 구성되어 있고, 그리고 간질염용 제재는 22년근 도라지, 두충, 독활, 시호, 우슬, 강활, 백계자, 결명자, 창출, 오미자, 산약, 구기자, 방풍, 계지, 감초 등을 열수추출하여 레토르트 파우치 또는 캡슐 형태로 시제품을 제조하였다.

바. 시제품 생산방법 및 제품특성

(1) 엑기스 제조

(가) 제조방법 및 공정도



(나) 제품의 품질특성

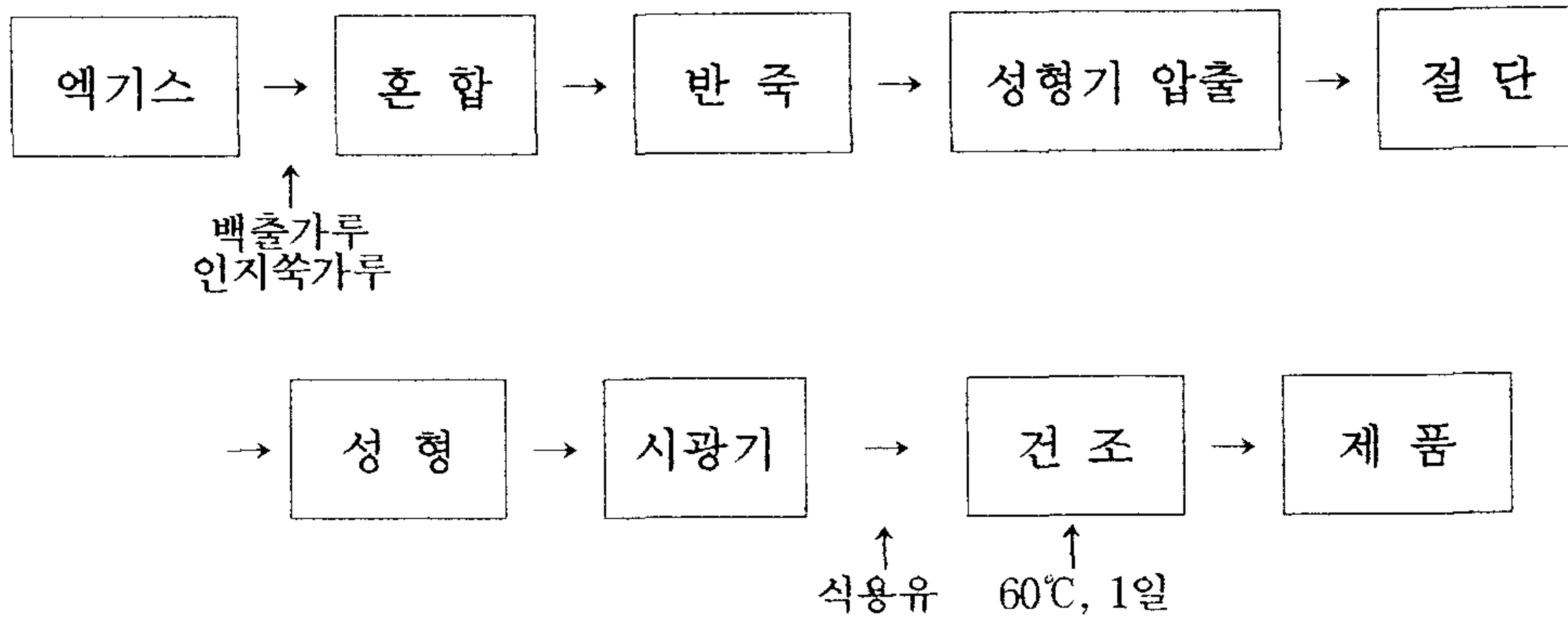
제품명 특 성	기관지 치료제	당뇨병 치료제
1. 외관 및 성상	검붉은색의 강한 점성을 가지며 약간의 단맛이 있음	흙갈색의 약한 점성을 가지며 약간의 신맛이 있음
2. BX(°)	76.5	63
3. 수분(%)	32.4	34
4. pH	4.01	4.45
5. 용해성	열수 : 3분 이내 냉수 : 6분 이내	열수 : 3분 이내 냉수 : 6분 이내
6. 회분(%)	3.2	2.8
7. 대장균	-	-
8. 생균수	1,500/g	1380/g
9. 복용량	56 g/1일, 3회/일	68 g/1일, 3회/일

(2) 환 제조

(가) 배합성분 및 비율

제품명 성 분	기관지 치료제	당뇨병 치료제
Ext.	1890g	2300g
백색분말	1200g	1800g
인지숙분말	1200g	1800g

(나) 제조방법 및 공정도



(다) 제품의 품질특성

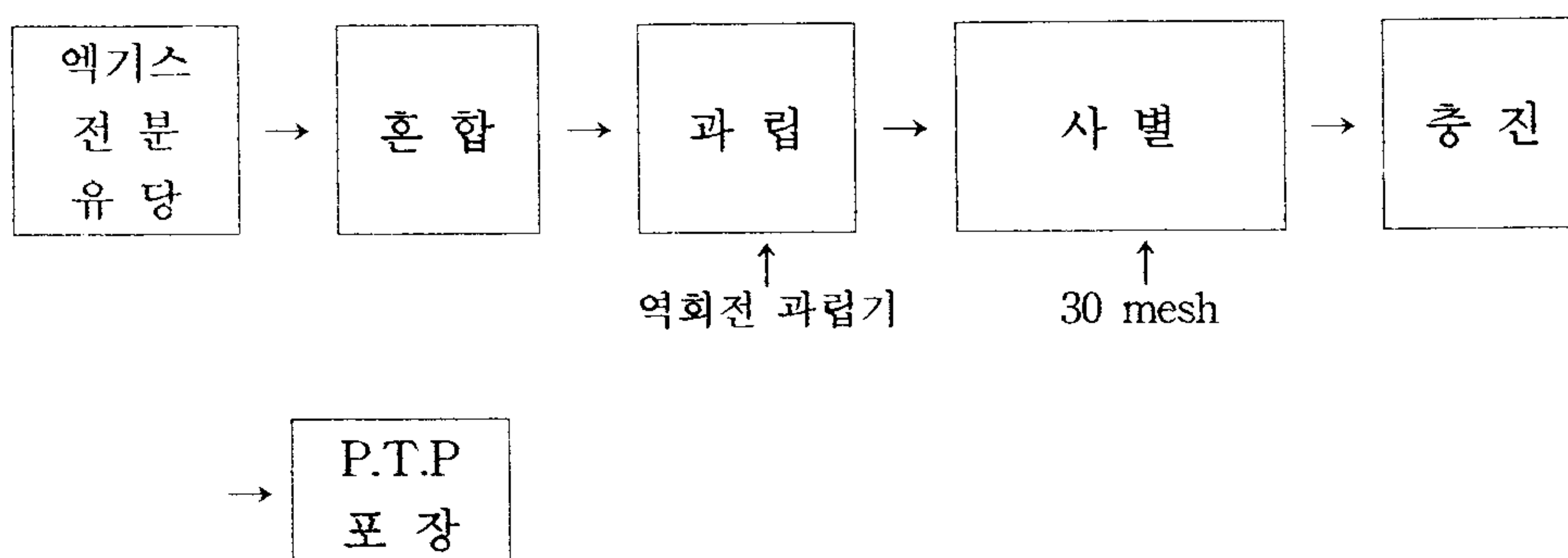
특 성 \ 제품명	기관지 치료제	당뇨병 치료제
1. 외관 및 성상	연한갈색의 색상을 나타냄	진한갈색의 색상을 나타냄
2. 수분(%)	6.8	6.3
3. 분해도	80분	75분
4. 대장균	음성	음성
5. 생균수	3300/g	3200/g
6. 환제규격	중량(10환) : 780mg 크기 : 4.34±0.5mm	중량(10환) : 690mg 크기 : 4.34±0.5mm
7. 복용량	60 환/3회/1일	68환/3회/1일

(3) Hard capsule 제조

(가) 배합성분 및 비율

성분 \ 제품명	기관지 치료제	당뇨병 치료제
Ext.	1300g	1000g
전분	500g	400g
유당	3000g	2000g

(나) 제조방법 및 공정도



(다) 제품의 품질특성

특성 \ 제품명	기관지 치료제	당뇨병 치료제
1. 외관 및 성상	진한 갈색의 과립으로서 색상이 균일하고 고유의 향미가 있음	옅은 갈색의 과립으로서 색상이 균일하고 고유의 향미가 있음
2. 내용량	260mg/개	280mg/개
3. 수분(%)	5.8	5.4
4. 회분(%)	2.3	2.1
5. 분해도	8분	8분
6. 이물	없음	없음
7. 대장균	-	-
8. 생균수	3,200/g	4,300/g
9. 기밀성	기밀일 것	기밀일 것
10. 복용량	5 캡슐/3회/1일	5캡슐/3회/1일

제 5 장 결 론

도라지는 한방 또는 민간요법에서 배농, 거담, 천식 등의 기관지 관련질병에 사용되어온 전통생약재로서 도라지의 주요 약리 성분인 platycodin의 약리효능은 비교적 잘 규명되어있으나, 다른 약리물질에 대한 연구는 미흡한 수준에 있다. 최근 도라지의 inulin 성분이 면역증강과 항암활성이 있다는 보고를 비롯하여 도라지의 추출물이 독소생성 미생물의 생육억제와 혈중 알콜농도의 감소효과가 밝혀져 연구과제의 재료로서 높이 평가받고 있다. 상기의 도라지는 2-4년생의 근을 실험에 사용할 수 밖에 없었으나 최근에 20년 이상의 장생 도라지가 재배에 성공하여 서부경남지역 10만여평에 집단화되어있어 이들 도라지의 약리작용에 기초한 건강보조식품의 소재화는 농가소득은 물론 고혈압, 당뇨병, 기관지 관련질환 등의 치료제로서의 개발가능성이 높다고 할 수 있다. 따라서 본 연구에서는 3분야로 대별하여 실험을 진행하였는데 그 결과는 다음과 같다.

1. 4년생 및 22년생 도라지의 성분분석 및 비교

먼저 4년근 미만의 도라지에 대한 약리성분과 생리활성에 관한 자료를 400여편 수집하여 정리한 결과 특이한 것은 전통적으로 사용되어온 배농, 거담제 뿐만아니라 고혈압, 당뇨병, 항암, 면역 등의 질환에 다양한 약리적 효능이 있음이 확인되었다. 일반 성분중 수분, 조지방, 무기염 등에서는 4년근과 22년근에 있어서 큰 차이가 없었다. 그리고 식이섬유의 총량과 조사포닌양은 22년근에서 3.1%, 0.4%정도 각각 높게 검출되었다. 도라지의 구성당

중 inulin의 총합량은 70~73mg/g으로 거의 변화가 없었으나 inulin의 구성당인 fructose의 중합도에 큰 차이가 인정되었다. 즉 22년근에서는 G-F₂와 G-F₃의 함량이 높고 4년근에서는 G-F₅에서 G-F₈의 함량이 높게 나타나 inulin의 구조에 상당한 차이가 있음이 밝혀졌다. 이 결과는 4년근에 비하여 22년근이 고혈압, 기관지, 당뇨병에 효능이 우수한 임상실험결과와 연관이 있는 것으로 추측된다. 무기염은 4년근 및 22년근 에탄올추출물 모두에서 K과 Cu의 함량이 높게 나타났으나 열수추출물에서는 Ca의 함량이 4년근에 비하여 22년근에서 4.5배 높게 검출되는 결과를 얻었다. 약리활성물질을 검색하기 위하여 80%에탄올과 30%메탄올로 추출하여 HPLC로 분석한 결과 80%에탄올과 30%메탄올 추출물에서 각각 한개와 두개의 peak를 확인하였다. 22년근에만 많이 존재하는 이 peak를 다시 극성도에 따라 용매로 분획하여 생리활성을 조사한 결과 석유에테르와 디에틸에테르 분획물에서 효과가 인정되어 여러기기분석을 통해 구조분석을 하였을때 steroid 물질임이 판명되었다.

2. 다년생 도라지의 유용물질 검색 및 활성검사

80%에탄올과 30%메탄올 추출물은 free-radical 소거작용과 항진균작용이 확인되었고 세포독성이 없는 것으로 밝혀졌다. 4년근 및 22년근이 에탄올 및 열수추출물을 식중독 및 병원성 미생물 등의 15종에 대한 항균활성을 조사하였을때 22년근의 에탄올 추출물은 *R. javanicus*를 제외한 14종의 미생물에 대해 항균작용이 확인되었으며 그리고 4년근에 비하여 광범위하고 우수한 항균 spectrum을 보였다. 22년근의 에탄올 추출물은 세균에 대해서

는 10mg/ml 농도에서 진균류에 대해서는 10~20mg/ml 농도에서 MIC값을 나타내었다. 항균활성물질은 50℃, 95%에탄올 농도에서 가장 용이하게 추출되었다. 22년근의 95%에탄올 추출물을 다시 용매로 분획하였을때 butanol 분획에서 항균활성이 가장 높은 것으로 나타나는데 이것은 사포닌에 기인되는 것으로 추측되고, 다른 용매분획에서 활성이 검출되는 것으로 보아 항균활성물질이 2개 이상인 것으로 사료된다. 22년근 도라지의 항균활성물질들 중에 에틸아세테이트 분획물에서 분리되어 여러기기를 사용하여 구조분석을 한 결과 glyceryl linoleate 임이 규명되었다.

고지혈증 유발 쥐에 22년근 도라지 분말 또는 열수추출물을 3주동안 식이하면 혈청과 간의 지질함량을 현저히 감소시켰다. 특히 22년근 도라지 분말 5%식이군에서는 혈청과 간장중의 총콜레스테롤과 중성지방의 농도가 현저히 감소되었고 이때 동맥경화 지수도 대조군에 비하여 낮게 나타났다. 이런 결과는 고콜레스테롤증과 고지혈증예방에 22년근 도라지의 처방가능성을 제시해 주고있다.

그리고 항암효과의 작용을 관찰하기 위해 22년근 도라지의 메탄올 추출물을 B16-F1 mouse melanoma 세포에 처리하여 laminin의 결합력을 실험한 결과 대조구에 비해 도라지의 메탄올 추출물이 세포접착저해 작용이 높다는 것을 관찰할 수 있었다.

도라지 추출물을 용매의 극성에 따라 분획하여 면역증강 기능을 조사하였을때 수층에서 가장 우수한 효과가 인정되어, 이 수층을 다시 silica gel column chromatography를 행하여 분획별로 HPLC로 분석한 결과 fructose의 중합도가 20개 이하의 inulin 분획에서 가장 우수한 면역증강 활성이 검출되었다.

22년근이 2년근에 비하여 면역증강 활성이 5배 이상 높은 결과는

inulin의 fructose 중합도와 밀접한 상관성이 있는 것으로 추측된다. 그러나 다른 용매 분획에서 면역증강 효과가 거의 검출되지 않았다.

SD-rat의 오른쪽 발바닥에 0.6mg의 heat killed - Mycobacterium histolyticum을 주사한 후 약 20일 까지 양쪽 발의 부종 크기를 측정하여 염증의 저해 정도를 대조군, predisolone (4mg/day)급여군, 1차년도 연구에서 얻어진 14종의 생약재 추출물 급여군 (20mg/day), 22년생 도라지 추출물 급여군 (20mg/day, 40mg/day), 그리고 생약재와 22년생 도라지 추출물의 혼합 급여군 (40mg/day) 등 6군(6마리씩/1군)에서 조사하였다.

생약재 추출물 급여군(40mg/day)과 생약재 및 22년생 도라지 추출물 혼합 급여군에서만 부종의 저해능이 관찰 되었다. 그러나 22년생 도라지 추출물의 급여량을 160mg/kg으로 하면 활성이 검출되고, 200mg/kg으로 증가시키면 유의성 있는 활성이 없는 것으로 나타나 일정한 범위의 용량(약 100~200mg/kg인 것으로 추정)에서 border line에 들어가는 활성이 있을 것으로 추정되어 급여량에 따른 부종저하활성을 조사한 결과 150mg/kg 용량에서 활성이 나타났다.

Alloxan(alloxan monohydrate 15mg/kg B.W/day, I.P.injection)으로 유발된 당뇨병 Sprague-Dawley계 수컷쥐에 있어서 6년군 및 22년군 도라지 추출액의 급여가 혈당 및 혈청, 간장의 지질개선 효과를 규명하기 위해 3주간 실험사육한 결과, 혈당 농도는 대조군(1군, 기본식이)에 비해 alloxan투여군(2군, 3군, 4군)에서 유의적으로 높았으나, 2군(기본식이 + alloxan)에 비해서 3군(기본식이 + alloxan + 6년군 도라지 추출액), 4군(기본식이 + alloxan + 22년군 도라지 추출액)이 낮았으며, 특히 4군이 낮았다.

혈청 총콜레스테롤 및 LDL농도는 1군이 가장 낮았고, 2군에 비해 3군, 4군이 낮았으나, 4군에서 더욱 낮았다. 혈청 HDL-콜레스테롤 농도는 1군이 가장 높았으나 2군에 비해 도라지 추출액 급여군(3군, 4군)에

서 높게 나타났으며 4군이 더 높았다. 동맥경화지수는 2군에 비해 3군, 4군이 낮았다. 혈청 유리콜레스테롤, 콜레스테롤 에스테르, 중성지질 및 인지질의 농도는 2군에 비해 전 실험군에서 유의적으로 낮았다. 간장중 총콜레스테롤, 중성지질 및 인지질의 함량은 2군에 비해 전 실험군에서 유의적으로 낮았다. 혈청 AST, ALT 및 LDH활성은 2군이 가장 높았으며 다른 실험군들은 비교적 낮았다.

이상의 결과에서 도라지 추출액이 혈당, 혈청 및 간장의 지질 개선에 효과가 있는 것으로 나타났으며, 특히 22년근 도라지 추출액이 더욱 높은 것으로 나타났다.

3. 건강보조식품의 개발

1차년도 연구에서 얻어진 생약재 및 22년 도라지 한방제재를 기초로 기관지 천식용과 당뇨병용 건강보조식품을 엑기스형, 레토르트 파우치형, 캡슐형 및 환형 등 4종의 제품생산에 필요한 제조공정과 기준 및 규격에 대하여 실험실 규모에서 완료 되었다.

상기 제품 중 레토르트 파우치형 제품은 각종 생약재(14종)의 최적 추출조건(온도, 시간, 진탕여부, 에탄올 농도)이 완료되었으며 이들 최적조건을 토대로 도라지 추출물과 혼합하여 완제품 생산까지의 제조공정(생약재 및 도라지 → 추출 90~100℃, 3시간 → 냉각 → 여과 → 살균 → 포장)과 기준 및 규격(생균수, 대장균, 고형물, 외관 및 색상, 수분, pH, 회분 등)이 확립되었다.

또한 캡슐형, 엑기스형 및 환형 등의 제품생산에 필요한 생약재 및 22년생 도라지의 추출조건이 확립되었고 현재는 농축, 건조, 성형, 포장 등에 대한 기준 및 규격이 일부 완료되었다.

그리고 기능성 식품은 기관지염에 우수한 활성이 있는 도라지와 5종

의 한약재를 혼합 첨가하여 기관지 질환용 식품을 캔디형으로 개발되어 상기 제품에 대한 제조공정 및 자가 규격기준을 성호다년생도라지 영농조합법인에 기술이전을 진행중에 있다.