

염기서열을 이용한 한약재 형개의 기원 및 유연관계 분석

배갈마 · 김명겸 · 노종훈 · 손 화 · 양덕춘[†]

경희대학교 고려인삼명품화사업단 및 인삼유전자원소재은행

Phylogenetic Analysis of Schizonepeta Spike on the Basis of DNA Sequences

Baigalmaa Jigden, Myung Kyum Kim, Jong Hun Noh, Sun Hua, and Deok Chun Yang[†]

Korea Ginseng Center for Most Valuable Products & Ginseng Genetic Resource Bank,
Kyung Hee University, Yongin 449-701, Korea

ABSTRACT : Schizonepeta spike (Korean name "Hyung-Gae") has been used for oriental medicinal purposes in Korea, China and Japan. In this study, twenty six "Hyung-Gae" samples were collected including nine certified *Schizonepeta tenuifolia* plants, and seventeen commercially marketed "Hyung-Gae" products. Chloroplast *trnL-F* and rDNA *ITS* regions of the "Hyung-Gae" samples were sequenced and used to identify whether the samples were genuine *S. tenuifolia* or not. As the result, the *trnL-F* and *ITS* sequences of all the "Hyung-Gae" samples were shown to be identical and it was proven that commercially available medicinal products "Hyung-Gae" are genuine *S. tenuifolia*. Phylogenetic tree of *S. tenuifolia* using the *trnL-F* sequences was constructed and compared with phylogenetic tree using *ITS* of rDNA region sequences. In these tree, *S. tenuifolia* was affiliated in the family Lamiaceae. It is proven that *trnL-F* and *ITS* phylogenetic trees are useful to study taxonomic position of *S. tenuifolia*.

Key Words : Hyung-Gae (*Schizonepeta tenuifolia*), Phylogenetic Analysis, *trnL-F*, *ITS*.

서 언

한약재 형개(*Schizonepeta* Spike)는 대한약전에 의하면 한국식물명 형개 (*Schizonepeta tenuifolia* Briquet (꿀풀과 Labiatae))의 꽃대를 한약재로 사용하는 것으로 정의되어 있으며, 중국과 일본에서도 동일하게 해표약으로 적용되어 한의약품 원료로 현재 유통되고 있다. 형개는 따뜻한 성질을 가지고 있어서 발한(땀, diaphoresis)을 유발시키고 (Lu *et al.*, 2002), 감기와 발진 (skin eruptions), 알러지 (allergic dermatitis), 천식 (eczema) 및 건선 (psoriasis) 등에 사용된다 (Chang and But, 1986; Guo *et al.*, 1997; Zhu, 1998). 특히 숫처럼 그 을려 사용하는 형개는 혈변 (bloody stool)과 자궁출혈 (metrorrhagia)에 효과가 있다고 보고되어 있다 (Guo *et al.*, 1997; Zhu, 1998).

형개는 자극적인 맛을 가지고 있고 menthone, pulegone을 주요 성분으로 하는 정유를 약 0.5-1.8% 함유하고 있으며 (Yang *et al.*, 2005), 미량의 d-limonene을 함유하고 있다 (Zheng *et al.*, 1997). 형개의 근경에서는 26종류의 정유성분이 분리되었으며, 추출 방법도 개발되었다 (Qiu *et al.*, 2005).

또한 화학적 분석 결과, 형개에서 schizonepetoside, schizonol, schizonodiol과 같은 mono-terpene이 분리 동정되었으며 (Hu *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2006), diosmetin, hesperetin, luteolin과 같은 flavonoid가 분리·동정되었다 (Fung *et al.*, 2002; Hu *et al.*, 2005; Oshima *et al.*, 1989; Yen, 1992; Zhu, 1998).

형개는 중국 북부지방이 원산지이며, 한국에 자생하지 않는 식물로서 형태적으로 향유, 광향등과 유사하며, 종에는 *Schizonepeta tenuifolia*, *Schizonepeta multifida*가 보고되어 있으나, 대한약전에서는 *Schizonepeta tenuifolia* 만 한약재로 사용하도록 되어 있다. 따라서 형태적으로 유사한 향유, 광향등과의 구별과, 같은 속내에 있는 *Schizonepeta multifida*와의 구별이 요구되고 있는 실정이다.

최근 유전자의 염기서열을 이용하여 형태적인 분류방법을 보완하고자 많은 실험들이 진행되고 있는데 DNA 염기서열을 이용하여 식물을 감별할 때, 식물에만 특징적으로 존재하는 기관인 엽록체 DNA와 rDNA를 많이 사용하고 있다. 그 중에서 *trnL-F*, *ITS* 영역을 많이 이용 하고 있어 (Lang *et al.*, 2006), 형개도 *trnL-F* 과 *ITS* 영역 염기서열을 결정하고, 이

[†]Corresponding author: (Phone) +82-31-201-2688 (E-mail) deokchunyang@yahoo.co.kr
Received October 1, 2008/ Revised January 29, 2009 /Accepted February 3, 2009

염기서열들을 이용하여 기원식물을 확인하므로서 시중에서 유통되고 있는 한약재 형개가 *S. tenuifolia* 종(species) 진품이 맞는지 확인할 필요가 있다.

따라서 본 연구를 통해 명확한 형개의 기원식물을 정립하여 엄격한 품질 기준을 마련하여 저가의 위품유입을 막고, 한약재의 오용 및 남용을 방지하여 궁극적으로 한약재의 품질관리 및 국민건강의 안정성 확보를 하고자 형개의 기원에 관한 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

본 연구에 사용된 형개 샘플은 주로 한국과 중국의 시장에서 한약재로 유통되고 있는 것을 사용하였으며, 명확한 기원을 확인하기 위해서는 기존에 재배되고 있는 *S. tenuifolia*을 수집하였다. 기존에 형태학적으로 분류가 이루어져서 기원이 확인된 *S. tenuifolia* 형개식물체 2개는 농촌진흥청 작물과학원과, 경희대 국제캠퍼스 약초농장에서 수집하였으며, 24종은 대학에서 분류학을 하고 있는 실험실에서 한약재를 수집하였고, 또한 시중 한약재시장에서는 형개로 판매되고 있는 한약재를 무작위로 구입하여 총 26개의 형개 샘플을 가지고 본 실험에 사용하였다 (Table 1).

형개 샘플에서 DNA를 분리하기 위해서는 액체질소로 얼린 후 유발에서 마쇄하고 plant DNA isolation kit(Invitek. Spin Plant Kit)를 이용하여 총 DNA를 추출하였다. 확인은 agarose gel 과 UV spectrophotometer를 사용하여 분리된 DNA를 정량하였다. *trnL-F* 염기서열을 결정하기 위해서는 *trnL-F* 영역의 universal primer인 c와 f 프라이머를 이용하여 PCR 증폭을 수행하였다. 프라이머의 염기서열은 c (5'-CGA AAT CGG TAG ACG CTA-3')와 f (5'-ATT TGA ACT GGT GAC ACG AG-3')이었으며, PCR condition은 pre-denaturation 96 °C, 2 min; denaturation 96 °C, 30 sec; annealing 50 °C, 30 sec; extension 72 °C, 90 sec; 36 cycles 이었고 증폭된 PCR 산물을 정제하여 사용하였다.

ITS 염기서열을 결정하기 위해서는, *ITS* 영역의 universal primer인 P1와 4R 프라이머를 이용하여 PCR 증폭을 수행하였다. 프라이머의 염기서열은 P1 (5'-TAC CGA TTG AAT GRT CCG -3')와 4R (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC -3')이었으며, PCR condition은 pre-denaturation 94 °C, 5 min; denaturation 94 °C, 30 sec; annealing 50 °C, 30 sec; extension 72 °C, 90 sec; 36 cycles 이었다. 증폭된 PCR 산물을 정제하여 염기서열을 결정하였다. 얻어진 형개의 염기서열들을 NCBI에서 Blast하였으며, 계통수 (Phylogenetic Tree)를 그리기 위하여 Bioedit 프로그램으로 식물체와 한약재의 염기서열들을 편집한 다음, ClustalX 프로그램으로 염기서열을 정렬하였다. 계통수는 MEGA4 프로그램으로 사용하여 구축하였다.

Table 1. List of "Hyung-Gae" samples used in this study.

	No.	Sample Number	Collected Place	Country
Fresh	1	HG 14	RuralDevelopmentAministrations (Su-Won)	Korea
	2	HG 15	Kyung-Hee University (Su-Won)	Korea
	3	HG 16	Kyung-Hee University (Su-Won)	Korea
Dry	4	HG 17	Kyung-Hee University (Su-Won)	Korea
	5	HG 22	Seoul University (Seoul)	Korea
	6	HG 23	Seoul University (Seoul)	Korea
	7	HG 24	Seoul University (Seoul)	China
	8	HG 25	Seoul University (An-Dong)	Korea
	9	HG 26	Seoul University (Seoul)	Korea
	10	HG 01	local market (Seoul)	Korea
	11	HG 02	Dehu (Seoul)	China
	12	HG 03	local market (Seoul)	China
	13	HG 04	Kyung-Dong market (Seoul)	Korea
	14	HG 05	Kyung-DongYonchan (Seoul)	China
	15	HG 06	Kyung-DongWuson (Seoul)	Korea
	16	HG 07	Kyung-Dong market (Seoul)	China
	17	HG 08	local market (An-Kook)	China
	18	HG 09	local market (An-Kook)	China
	19	HG 10	local market (An-Kook)	China
	20	HG 11	local market (Tong-Hua)	China
	21	HG 12	local market (Il-Lin)	China
	22	HG 13	local market (Yan-Ji)	China
	23	HG 18	local market (An-Dong)	Korea
	24	HG 19	local market (An-Dong)	Korea
	25	HG 20	local market (An-Dong)	China
	26	HG 21	local market (An-Dong)	China

결과 및 고찰

1. 형개(*S. tenuifolia*) 염기서열의 결정 및 Blast

형태적으로 종이 확인된 *S. tenuifolia* 형개 샘플에서 DNA를 분리하고 *trnL-F* 영역과 *ITS* 영역을 PCR 증폭한 후 염기서열을 분석하였다. 형개의 *trnL-F* 영역은 *trnL* 유전자의 intron 크기가 484 bp, *trnL* 유전자의 3'exon의 크기가 50 bp, *trnL* 유전자와 *trnF* exon 사이의 intergenic non-coding 영역이 297 bp 이어서 모두 831 bp 크기를 가지고 있었다(Fig. 1-A).

형개의 *ITS* 영역은 *ITS* 유전자의 *ITS1* exon 크기가 217 bp, *ITS* 유전자의 5.8S exon의 크기가 202 bp, *ITS2* exon의 크기가 205 bp 이어서 모두 800 bp 크기를 가지고 있었다 (Fig. 1-B).

TrnL 유전자 intron의 G+C content는 34.92%, *trnL* 유전자의 3' exon이 44.0%, *trnL* 유전자와 *trnF* exon 사이의 intergenic 영역이 36.03%, 전체 *trnL-F* 영역은 35.86% 이었다(Fig. 2). 형개 (*Schizonepeta tenuifolia*)의 *trnL-F* 염기서열을 NCBI에서 Blast한 결과, 형개의 *trnL-F* 염기서열이 NCBI

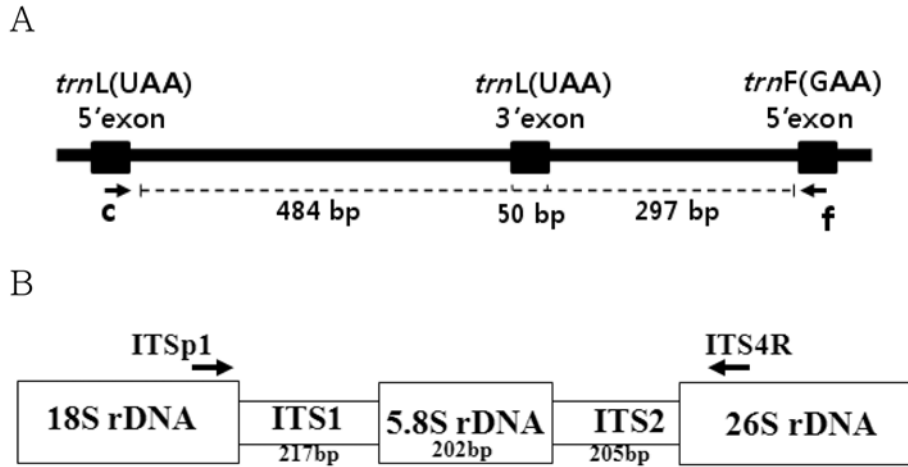


Fig. 1. Schematic diagram for *trnL-F* and *ITS* region of *S. tenuifolia*. The sizes of intron, 3'exon, intergenic region were shown. Positions and directions of two each universal primers for *trnL-F* and *ITS* were also shown.

<i>S. tenuifolia</i> EU186386	TGGAAACTTACTAAGTGATAACTTTCAAATTCAGAGAAACCCCGGAATTAATAAAAAATGGGCAATCCTGA	70
<i>S. multifida</i> DQ667500.1	-----	1
<i>S. tenuifolia</i> EU186386	GCCAAATCCTGTTTTCTCAAAACAAAGGTTCAAAAAACGACAAAAAGGGATAGGTGCAGAGACTCAATGG	140
<i>S. multifida</i> DQ667500.1	-----AATTAAAGGAACACG-GGGGGGATT--ATAA	28
<i>S. tenuifolia</i> EU186386	AAAGCTGTTCTAACGAATGGAGTTGACTGCGCCGGTAGAAGAATCTTTC-CATGGAAAATTTTCGAAAGGAT	209
<i>S. multifida</i> DQ667500.1	AGTTTTCTCCAAGTCCKGTAAATT-----TCAAAATGCTATTCATTTCATATCGGCATTCCCTTGCTTCAT	91
<i>S. tenuifolia</i> EU186386	--GAAGGATAAACCGCATCTATTGAATACTATATCAAATGATTAAT-GTTGGCCGAATCTGTTTTTTTAA	276
<i>S. multifida</i> DQ667500.1	TTGCAAKGTGWATTC-TATATCACATGTGATAAAAGAAAGTCAGTCATTACGCTAAAATAAGTTTGTC	160
<i>S. tenuifolia</i> EU186386	TATGAAAATGAAAAATCAGTGTGAATTTATTTTACGTTGAAGAAAAAGAGAATATTCATCAACTCATT	346
<i>S. multifida</i> DQ667500.1	---AAGAATTAGAAGATAA-GGGAAATTTGGAAAC-CGCTAACGAAAAAGGGGG---GTAGGTTAAATATTT	222
<i>S. tenuifolia</i> EU186386	CACTCCATAGTCCGGTAGATCTTTTTAAAGAACTCATTAATCGGACGAGAAATAAGATAGAGTCCCATCT	416
<i>S. multifida</i> DQ667500.1	TA----GGGGTCAAAATAGACTTTTTGGGGA-----TAGAGGGACTTGAACCCCTCAGAT-----TTTT	276
<i>S. tenuifolia</i> EU186386	ACATGTCATACATCAATACCGGCAACAATGAAATTTATAGTAAGAGGAA--AATCCGTCGACTTTAAAAA	484
<i>S. multifida</i> DQ667500.1	AAAGTCGACGGATT--TTCTTCTACTATAAAATTCATTGTTGCGGATTTGATATGTAGCATGTAGAA-	343
<i>S. tenuifolia</i> EU186386	TCGTGAGGGTTCAAGTCCCTCTATCCCAAAGTCTATTGACCCCTAAAATATTTAACCTACCCCCC	554
<i>S. multifida</i> DQ667500.1	---TGGGACTCTA----TCTTTATCTCGTCCGATTAATGAGTTCCTTTAAAAGATCTA-CCGGACTATGG	405
<i>S. tenuifolia</i> EU186386	TTTTCGTTAGCGGTTCCAAATTCCTTATCCTTCTAATCTTTGACAAAACCTATTTTAGCGTAAATGACT	624
<i>S. multifida</i> DQ667500.1	AGTGAATGAGTTGATGAATATTTCTCTTTTTCTTCAAC-----GTAAAATAAATTCACACTTATTTTT	469
<i>S. tenuifolia</i> EU186386	GACTTTCTTTTATCACATGTGATATAGAATACACATTGCAAAATGAAGCAAGGAATGCCGATATGAATGAA	694
<i>S. multifida</i> DQ667500.1	CATTTTCATATTAATAAACAGATTTCGGGCCAACATTAATCATTGATATAGTAT-TCAATAGATGCGTT	538
<i>S. tenuifolia</i> EU186386	TAGCATTTTGAAATTACAGGACTTGGGA-GAAAGCTTTATAATCCCCCGGTGTCCTTTAATTGACATCG	763
<i>S. multifida</i> DQ667500.1	TATCCTTCATCCTTTCTAAAATTTCCATGGAAGATTCTTCTACCGGCCAGTCAACTCCATTGTGTTAGA	608
<i>S. tenuifolia</i> EU186386	ACTCCAGTCATCTAATAAAAATTAGGGTGGGATGCTACATTGGAATGGTCCGGATAGCTCAGCTGGTAGA	833
<i>S. multifida</i> DQ667500.1	AC----AGCTTCCATTGAGTCTCTGCACCTATCCTTTTTTGTGTTTTTTGA--ACCTTTGTTTTGAGA	671
<i>S. tenuifolia</i> EU186386	GCAGAGGACTGAAAAT	849
<i>S. multifida</i> DQ667500.1	AAACAGGATTTGG---	684

Fig. 2. *trnL-F* alignment of *S. multifida* and *S. tenuifolia* samples. Comparison of *ITS* and *trnL-F* in *Schizonepeta multifida* and *Schizonepeta tenuifolia* individually. In *trnL-F* comparisonom we noticed many sequence differences.

에 등록되어 있지 않음을 확인하였고, 형개 *trnL-F* 염기서열을 NCBI에 등록하였다 (Accession number EU186386).

ITS 유전자 exon의 G+C content는 62.38%, *ITS* 유전자의 exon의 A+T content는 37.62%이었다(Fig. 3). 형개의 *ITS* 염

형개 기원 및 유연관계 분석

<i>S. tenuifolia</i> _EU383034	TCCGGTGAAGTGTTCGGATCGAGGCGACGTGGGCGGTTCCGCCGCCGCGACGTCGTGAGAAAGTCCACTGA	70
<i>S. multifida</i> _DQ667313.1	-----TATCATTTAGAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGT	1
<i>S. tenuifolia</i> _EU383034	ACCTTATCATTTAGAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGT	140
<i>S. multifida</i> _DQ667313.1	----TATCATTTAGAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGT	66
<i>S. tenuifolia</i> _EU383034	CGAAACCTGCAAAGCAGACCGCGAACCTGTGCATAACTAACGACGCGTGGCCCGGCGTGGGGGCGACCCC	210
<i>S. multifida</i> _DQ667313.1	CGAAACCTGCAAAGCAGACCGCGAACCTGTGCATAACTAACGACGCGTGGCCCGGCGTGGGGGCGACCCC	136
<i>S. tenuifolia</i> _EU383034	CGTTCGAGCCACCGTATCCCGCGGGCCCTCCCTCGGGAGGCGTCTGCGGGCTAACGAAACCCCGGCGC	280
<i>S. multifida</i> _DQ667313.1	CGTTCGAGCCACCGTATCCCGCGGGCCCTCCCTCGGGAGGCGTCTGCGGGCTAACGAAACCCCGGCGC	206
<i>S. tenuifolia</i> _EU383034	GGAAATGCGCCAAGGAAAACATAAACGAAAGCGTCCGCCCGGCTCCCGTCCGCGGAGCGTGGGGGGAT	350
<i>S. multifida</i> _DQ667313.1	GGAAATGCGCCAAGGAAAACATAAACGAAAGCGTCCGCCCGGCTCCCGTCCGCGGAGCGTGGGGGGAT	276
<i>S. tenuifolia</i> _EU383034	CGGCCGTCTATCAAATGTCATAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAAGC	420
<i>S. multifida</i> _DQ667313.1	CGGCCGTCTATCAAATGTCATAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAAGC	346
<i>S. tenuifolia</i> _EU383034	TAGCGAAATGCGGATACTTGGTGTGAATTGCAGAAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCG	490
<i>S. multifida</i> _DQ667313.1	TAGCGAAATGCGGATACTTGGTGTGAATTGCAGAAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCG	416
<i>S. tenuifolia</i> _EU383034	CCCGAAGCCACTAGGCCGAGGGCACGCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCCGCCCCCTCCCGTGCAC	560
<i>S. multifida</i> _DQ667313.1	CCCGAAGCCACTAGGCCGAGGGCACGCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCCGCCCCCTCCCGTGCAC	486
<i>S. tenuifolia</i> _EU383034	AGCACGGTCGGGGTGGGGTGGATATTGGCCCCCGTGCATCCCGATGCGCGGCGGCCCAAATGCGATCC	630
<i>S. multifida</i> _DQ667313.1	AGCACGGTCGGGGTGGGGTGGATATTGGCCCCCGTGCATCCCGATGCGCGGCGGCCCAAATGCGATCC	556
<i>S. tenuifolia</i> _EU383034	CTCGGCGACTCGTGTCCGGACAAGTGGTGGTTGAACTTATCAATCTCGGCGCGTCTGCTCCTGTGTCGT	700
<i>S. multifida</i> _DQ667313.1	CTCGGCGACTCGTGTCCGGACAAGTGGTGGTTGAACTTATCAATCTCGGCGCGTCTGCTCCTGTGTCGT	626
<i>S. tenuifolia</i> _EU383034	CCGAACGGGCATCAACGAAACGCCAACGGTGTCCGGTGCCTCACAGCCCGCACCTTCGACCCGCGACCCC	770
<i>S. multifida</i> _DQ667313.1	CCGAACGGGCATCAACGAAACGCCAACGGTGTCCGGTGCCTCACAGCCCGCACCTTCGACCCGCGACCCC	696
<i>S. tenuifolia</i> _EU383034	AGGTCAGGCGGGATTACCCGCTGAGTTTAA-----	800
<i>S. multifida</i> _DQ667313.1	AGGTCAGGCGGGATTACCCGCTGAGTTTAAAGCATATC	733
	*****	719

Fig. 3. ITS alignment of *S. multifida* and *S. tenuifolia* samples. Comparison of ITS and trnL-F in *Schizonepeta multifida* and *Schizonepeta tenuifolia* individually. In ITS comparison we noticed only 7 differences among the above two species where as in trnL-F comparison we noticed many differences.

기서열을 NCBI에서 Blast하였고, 그 결과, 형개의 ITS 염기서열이 NCBI에 등록되어 있지 않음을 확인하였으며, 본 연구에서 얻어진 형개 ITS 염기서열을 trnL-F와 같이 NCBI에 등록하였다 (Accession number EU383034).

2. 계통수 분석

NCBI에서 꿀풀과 (Lamiaceae)로 분류된 19개 종 (species)의 trnL-F 염기서열을 다운받았다. 다운받은 염기서열들을 ClustalX 프로그램을 이용하여 정렬하였고, 정렬된 염기서열의 개수는 outgroup으로 넣은 인삼 (*Panax ginseng*)의 염기서열까지 21개였다. 정렬된 전체 염기서열의 크기는 813 bp이었고, 형개의 경우 정렬에 포함된 염기서열은 685 bp이었다 (Fig. 2). 따라서 본 연구에서 얻어진 형개 trnL-F 염기서열을 분석한 염기서열을 이용하여 NCBI에 보고된 식물들과의 상동성을 조사하였다. 형개의 trnL-F 염기서열은 *Agastache rugosa* trnL-F (EU244612, Identities = 818/849 (96%)), *Agastache urticifolia* trnL-F (AY570452, Identities = 819/851 (96%)), *Lepechinia chamaedryoides* trnL-F (AY570459, Identities =

816/851 (95%)), *Lepechinia lancifolia* trnL-F (DQ667492, Identities = 812/853 (95%))와 유사한 것으로 나타났다. 그러나 같은 속에 존재한 *Schizonepeta multifida*와는 80%로써 오히려 상동성이 매우 떨어지는 것을 확인할 수 있었다 (Table 2).

TrnL-F 염기서열 분석 결과 형개와 가장 가까운 종은 *Schizonepeta multifida*와 *Agastache rugosa*이었고, nucleotide divergence와 염기 차이는 각각 1.4%, 10 bp 그리고 4.4%, 30 bp이었다 (Table 2). 다음으로 형개와 가까운 종들은 모두 NCBI Taxonomy browser에서 꿀풀과 (Lamiaceae)의 속 (genus)들이었다.

반면에 ITS의 경우에는 *Schizonepeta multifida* ITS (DQ667313.1, Identities = 719/726(99%)), *Agastache gana* ITS (AJ421000, Identities = 765/805 (95%)), *Agastache barberi* ITS (AJ421001, Identities = 743/781 (95%)), *Dracocephalum kotschy* ITS (AJ420998, Identities = 741/794 (99%)), *Agastache urticifolia* ITS (DQ667247, Identities = 682/722 (94%))와 유사하였으며, 반면에 *Schizonepeta multifida*와는 총 800개 base 중에서 7개만 서로 달라 상동성이 trnL-F와는 달리 매우

Table 2. Nucleotide divergences of *trnL-F* regions.

Taxa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1. <i>Schizonepeta tenuifolia</i> EU186386	-	0.986	0.956	0.954	0.954	0.941	0.929	0.912	0.905	0.903	0.895	0.894	0.892	0.685
2. <i>Schizonepeta multifida</i> DQ667500	10	-	0.953	0.951	0.951	0.938	0.926	0.908	0.904	0.902	0.89	0.891	0.889	0.681
3. <i>Agastache rugosa</i> EU244612	30	32	-	0.998	0.998	0.967	0.957	0.901	0.929	0.927	0.881	0.914	0.889	0.693
4. <i>Agastache urticifolia</i> AY570452	32	34	1	-	0.997	0.966	0.956	0.899	0.928	0.925	0.88	0.913	0.887	0.692
5. <i>Agastache foeniculum</i> AY506626	32	34	1	2	-	0.966	0.956	0.899	0.928	0.925	0.88	0.913	0.887	0.693
6. <i>Lycopus uniflorus</i> DQ667488	40	42	23	23	23	-	0.951	0.887	0.925	0.922	0.871	0.917	0.873	0.699
7. <i>Cedronella canariensis</i> AY506622	49	51	29	30	30	34	-	0.875	0.936	0.932	0.856	0.924	0.872	0.695
8. <i>Hyssopus seravschanicus</i> AY506623	60	63	68	69	69	77	86	-	0.861	0.859	0.887	0.848	0.877	0.668
9. <i>Mentha spicata</i> AY570461	65	66	49	49	49	51	44	95	-	0.987	0.837	0.94	0.846	0.68
10. <i>Mentha arvensis</i> DQ667514	66	67	50	51	51	53	47	97	9	-	0.835	0.939	0.844	0.684
11. <i>Lallemantia peltata</i> AY506624	72	75	82	82	82	88	99	77	112	113	-	0.822	0.868	0.634
12. <i>Acanthomintha lanceolata</i> DQ667522	73	75	59	60	60	57	52	104	41	42	122	-	0.852	0.673
13. <i>Dracocephalum moldavica</i> AY506625	74	76	76	77	77	87	88	84	105	107	90	101	-	0.654
14. <i>Panax ginseng</i> AF366930	216	219	210	211	210	206	209	227	219	216	251	224	237	-

Table 3. Nucleotide divergences of *ITS* genes.

Taxa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1. <i>Schizonepeta tenuifolia</i> Eu383034	-	0.989	0.941	0.941	0.939	0.937	0.921	0.914	0.907	0.885	0.881	0.864	0.859	0.859	0.854	0.71
2. <i>Schizonepeta multifida</i> DQ667313	5	-	0.939	0.939	0.937	0.935	0.914	0.908	0.905	0.879	0.875	0.854	0.857	0.849	0.85	0.71
3. <i>Bupleurum falcatum</i> AY551290	29	30	-	0.941	0.977	0.937	0.905	0.894	0.887	0.869	0.869	0.856	0.855	0.855	0.852	0.707
4. <i>Agastache foeniculum</i> AY506660	29	30	29	-	0.947	0.975	0.917	0.9	0.894	0.881	0.881	0.862	0.871	0.869	0.858	0.718
5. <i>Glechoma hederacea</i> AY506661	30	31	11	26	-	0.943	0.907	0.894	0.895	0.867	0.867	0.86	0.861	0.863	0.858	0.714
6. <i>Agastache urticifolia</i> DQ667247	31	32	31	12	28	-	0.914	0.896	0.89	0.883	0.883	0.87	0.871	0.871	0.864	0.721
7. <i>Hyssopus seravschanicus</i> AY506657	39	42	47	41	46	42	-	0.941	0.952	0.879	0.881	0.84	0.844	0.84	0.838	0.705
8. <i>Lallemantia peltata</i> AY506658	42	45	52	49	52	51	29	-	0.935	0.881	0.883	0.838	0.836	0.833	0.828	0.703
9. <i>Dracocephalum moldavica</i> AY506659	46	47	56	52	52	54	24	32	-	0.867	0.871	0.822	0.825	0.82	0.82	0.697
10. <i>Nepeta axyodonta</i> AJ420996	57	60	64	59	65	58	60	59	65	-	0.991	0.827	0.831	0.829	0.827	0.706
11. <i>Nepeta laxiflora</i> AJ420995	59	62	64	59	65	58	59	58	63	4	-	0.829	0.833	0.831	0.829	0.704
12. <i>Mentha spicata</i> DQ667244	67	72	71	68	69	64	79	80	88	85	84	-	0.853	0.939	0.929	0.705
13. <i>Lycopus europaeus</i> AY506652	69	70	71	63	68	63	77	81	86	83	82	72	-	0.857	0.847	0.704
14. <i>Acanthomintha lanceolata</i> DQ667333	69	74	71	64	67	63	79	82	88	84	83	30	70	-	0.967	0.72
15. <i>Mentha arvensis</i> DQ667325	72	74	73	70	70	67	80	85	89	85	84	35	75	16	-	0.71
16. <i>Panax ginseng</i> AF274533	143	143	144	139	141	137	145	146	149	145	146	145	146	138	143	-

높은 것으로 나타났다 (Table 3).

계통학적 분석은 Neighbor-Joining method로 수행되었고 인삼 (*Panax ginseng*)을 외군 (outgroup)으로 사용하였는데 이 계통수는 꿀풀과 (Lamiaceae)의 Nepetoideae 아과 (subfamily), Mentheae족 (tribe)에 속하는 여러 속 (genus)들로 구성되었다 (Fig. 4). Bootstrap 분석 결과, 14~100%의 bootstrap value가 나타나 계통수가 전체적으로 안정적이지 않았다. 이 계통수에서 형개 (*S. tenuifolia*)와 말들개 (*S. multifida*)가 속한 group은 *Hyssopus*, *Lallemantia*, *Dracocephalum*속 (genus)이 속한 group과 가장 가까운 sister group (자매군)임을 알 수 있고, 이 때 bootstrap value는 100%를 나타내었다. 또한, *Schizonepeta* 속 (genus)과 *Hyssopus*, *Lallemantia*, *Dracocephalum* 속 (genus)이 속하는 group은 *Agastache* (베초향) 속

(genus)과 가까운 sister group (자매군)이었으며, 이 때 bootstrap value는 47%에 불과하였다.

ITS 계통수의 유용성을 확인하기 위하여 *ITS* 유전자 염기서열을 이용하여 계통수를 그리고, *trnL-F* 계통수와 비교해 보았다. *ITS* 유전자 염기서열의 정렬 결과, 형개와 가장 가까운 종은 같은 *Schizonepeta* 속 (genus) *S. multifida*이었고 다른 속 (genus) 식물로는 *Bupleurum falcatum*, *Agastache foeniculum*, *Glechoma hederacea* 식물들이 가장 형개와 가까웠다. Nucleotide divergence는 각각 1.1%, 5.9%, 5.9%, 6.1%, 염기 차이는 5 bp, 29 bp, 29 bp, 30 bp이었다 (Table 3).

ITS 유전자 염기서열을 이용한 계통수는 *trnL-F* 염기서열을 이용한 계통수와 비슷한 결과를 보이고 있다. 두 계통수에서 *Glechoma* 속과 *Bupleurum* 속은 같은 clade를 형성하였고,

형개 기원 및 유연관계 분석

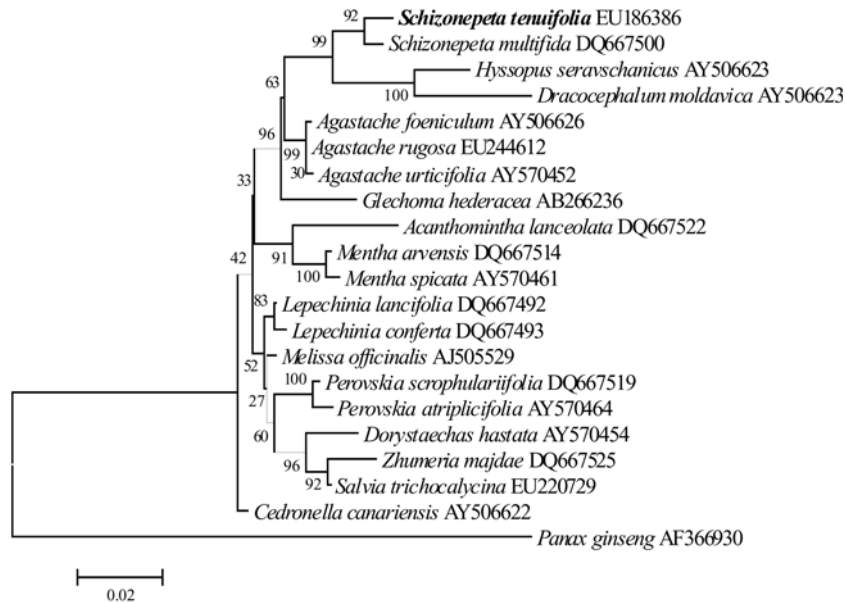


Fig. 4. The neighbor-joining tree of *trnL-F* sequences of species belonging to various lamiaceae family.

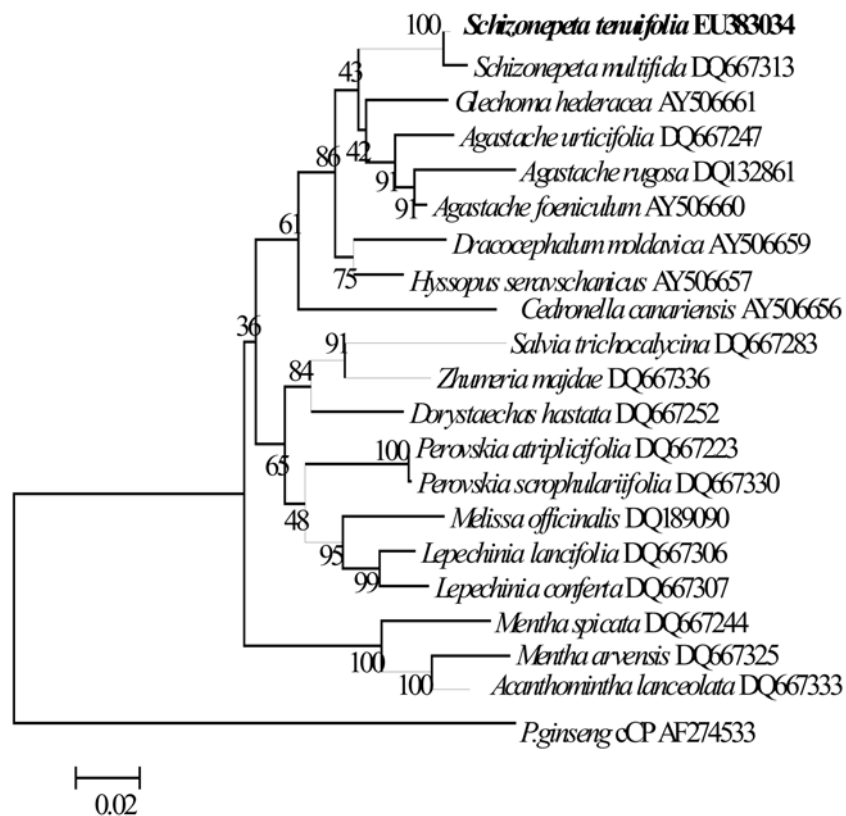


Fig. 5. The neighbor-joining tree of *ITS* sequences of species belonging to various lamiaceae family.

Dracocephalum 속과 *Hyssopus* 속은 같은 clade를 형성했다. 형개는 이 두 clade와 *Agastache* 속 clade와 가장 가까웠다 (Fig. 5). 최근 NCBI taxonomy browser (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=Taxonomy>)에 따르면 형개 (*S. tenuifolia*)는 Asterids 아강 (subclass), Lamiales 목 (order), 꿀풀과 (Lamiaceae)로 분류되고 있다. 본 연구에서 형개의

nlm.nih.gov/sites/entrez?db=Taxonomy)에 따르면 형개 (*S. tenuifolia*)는 Asterids 아강 (subclass), Lamiales 목 (order), 꿀풀과 (Lamiaceae)로 분류되고 있다. 본 연구에서 형개의

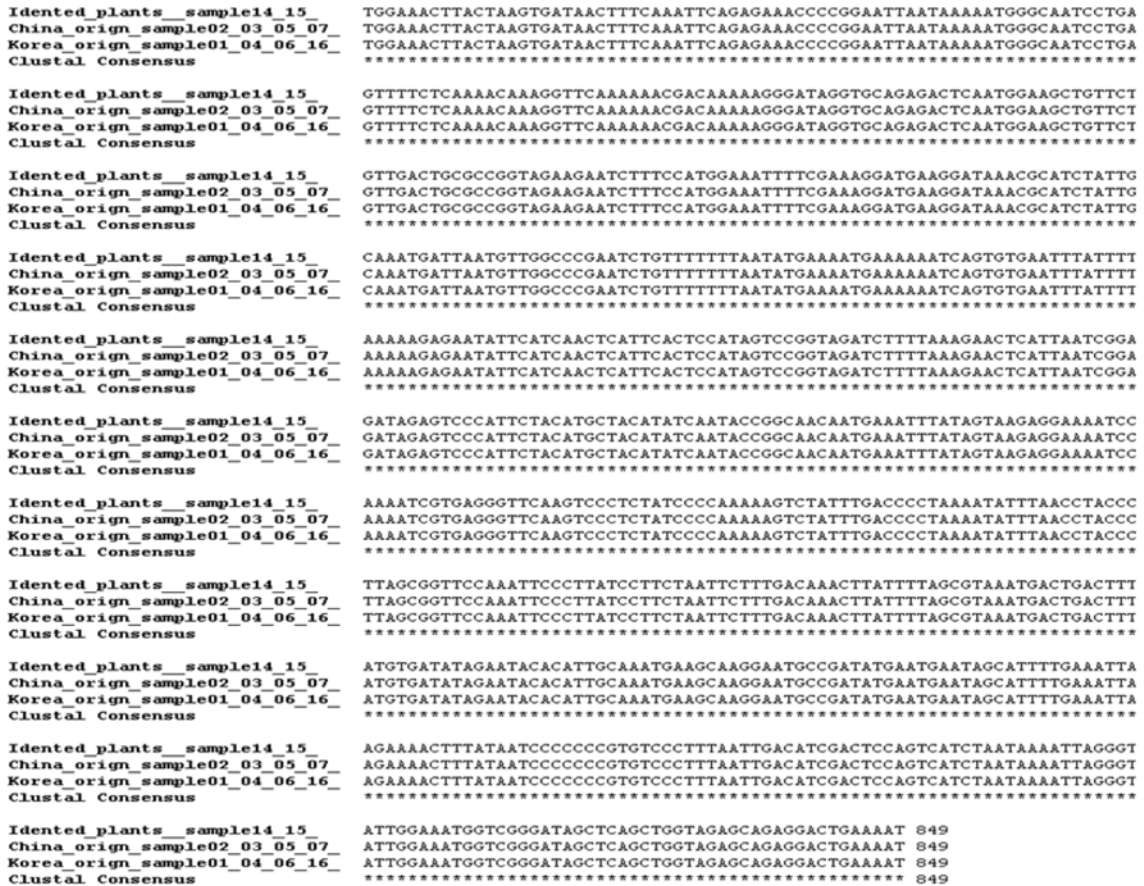


Fig. 6. Alignment of Hyung-Gae plant samples.

trnL-F 계통수와 *ITS* 계통수 결과가 유사한 결론을 도출하였는데 이것은 DNA 염기서열을 근거로 한 NCBI Taxonomy browser의 분류와 일치하고 있었다.

3. 상업용 한약재의 기원확인

시중에서 판매된 한약재 형개의 기원을 확인하기 위하여 형태학적으로 기원이 분명한 형개 (*Schizonepeta tenuifolia*) 2종과, 국내외에서 수집한 중국산 13종 그리고 국내에서 수집한 국내산 11종을 대상으로 총 26종의 형개를 이용하여 *trnL-F* 염기서열을 분석한 결과, Fig. 6에서 보논바와 같이 모두 동일한 염기서열로 나타내어 정확한 기원에 의한 형개의 유통에는 문제가 없는 것으로 보인다 (100% 일치). 그러나 형개는 중국 북부지방이 원산지이며, 한국에 자생하지 않았던 식물로서 형태적으로 향유, 광향등과 유사하며, 종에는 *Schizonepeta tenuifolia*, *Schizonepeta multifida*가 보고되어 있고, 대한약전에서는 *Schizonepeta tenuifolia* 만 한약재로 사용하도록 규정되어 있다. 따라서 현재 판매되고 있는 형개는 확실한 *Schizonepeta tenuifolia* 만이 유통되고 있으나, 형태적으로 유사한 향유, 광향등과의 구별과 같은 속내에 있는 *Schizonepeta*

multifida 와의 구별이 요구되고 있다. 이것은 형개가 의약품과 건강식품의 원료이자 농가의 소득원으로서 단순 식물 이상의 의미를 가지고 있으며, 최근 국민소득 증대와 함께 형개의 수요가 크게 늘어나고 있기 때문이다. 아직 국내에서는 형개의 출하규모가 영세하기 때문에 유통기능의 상당부분을 수집상에 의존할 수밖에 없는데 거래의 기준이 되는 품질기준과 표준규격화가 부족하며, 저가인 수입한약재 또는 위품과 차별적 유통이 어려운 실정이다. 또한 한약재는 기원식물과 서식지가 다양하고 많은 별명을 가지고 있어 약재를 혼돈하여 사용하는 예가 있는데, 약으로 사용하려는 것이 오히려 독이 되는 경우가 있기 때문에 정책당국에서는 확실한 기원에 의한 감별을 더욱 더 명확히 해야 할것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 2007년도 식품의약품안전청 용역연구개발사업의 연구비지원 (07092한약재335)에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

LITERATURE CITED

- Chang HM and But PPH.** (1986). *Jingjie Pharmacology and Applications of Chinese Materia Medica*. World Scientific, Singapore. p. 855-856.
- Fung D, Pharm BS and Lau CBS.** (2002). *Schizonepeta tenuifolia*: Chemistry, pharmacology, and clinical applications. *Journal of Clinic Pharmacology*. 42:30-36.
- Guo JX, Xie PS, Qi P, Wang ZT, Chen DF and Guo JI.** (1997). *Herba Schizonepetae pharmacopoeia of the people*. Chemical Industry Press, Beijing. p. 102-103.
- Hu J, Shi R and Zhang Y.** (2005). Content determination of luteolin and hesperidin in the effective fractions of *Spica schizonepeta* by HPLC. *Journal of Beijing University Traditional Chinese Medicine*. 28:52-54.
- Hu J, Shi RB, Zhang YH, Liu B and Dong Y.** (2006). Study on chemical compositions in the spikes of *Schizonepeta tenuifolia* Briq. *Journal of Beijing University of Traditional Chinese Medicine*. 29:38-40.
- Lang P, Dand F and Kubisiak TL.** (2006). Phylogeny of *Castanea* (Fagaceae) based on chloroplast trnT-L-F sequence data. *Tree Genetics and Genomes*. 2:132-139.
- Lu JF, Zhang L, Feng YL, Ding AW and Du P.** (2002). Impact of lactones of *Schizonepeta tenuifolia* Briq. on plantar sweat gland and hemorrheology of rats. *Journal of China Pharmacy University*. 33:502-504.
- Oshima Y, Takata S and Hikino H.** (1989). Schizonodiol, schizonol, and schizonepetosides D and E, monoterpenoids of *Schizonepeta tenuifolia* spikes. *Planta Medicine*. 55:179-180.
- Qiu Q, Ling J, Ding Y, Chang H, Wang J and Liu T.** (2005). Comparison of supercritical fluid extraction and steam distillation methods for the extraction of essential oils from *Schizonepeta tenuifolia* Briq. *Chinese Journal of Chromatography*. 6:646-650
- Yang F, Zhang RY, Chen JT and Yang CR.** (2002). Monoterpenoids from *Schizonepeta tenuifolia*. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*. 33:9-11.
- Yang J, Zhang L and Bao B.** (2005). A study on preparation technique of herba *Schizonepeta tenuifoliae*. *Journal of Nanjing University Traditional Chinese Medicine*. 21:178-179.
- Yang JP, Bao BH, Zhang L and Ding AW.** (2005). Quantitative analysis of pulegone in Herba *Schizonepetae*. *China Journal of Chinese Mater Medicine*. 30:669-670.
- Yen KY.** (1992). *Schizonepetae herba seu flos*. The illustrated Chinese materia medica-crude and prepared. SMC Publishing, Taiwan. p. 194.
- Zhang YH, Zhou L, Shi RB, Guo YJ and Dong Y.** (2006). Studies on chemical constituents in spikes of *Schizonepeta tenuifolia*. *China Journal of Chinese Mater Medicine*. 31:1249-1253.
- Zheng HZ, Dong ZH and She J.** (1997). *Jingjie, modern study of traditional chinese medicine*. Beijing Xue Yuan Press, Beijing China. 4:3072-3081.
- Zhu YP.** (1998). *Jingjie chinese materia medica-Chemistry, pharmacology, and applications*. Harwood Academic, Amsterdam. p. 60-61.