

최 중
연구보고서

GA0491-0278

국내산 생약재를 이용한 기능성 한방 증류
음료제품개발

Development of Functional Beverage using Steam
Distillates Prepared from Domestic herbal Medicines

연구기관

한국식품연구원

농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “국내산 생약재를 이용한 기능성 한방
중류 음료제품개발” 최종보고서로 제출합니다.

2004년 11월 14일

주관연구기관명: 한국식품연구원

총괄연구책임자: 이창호 선임연구원

참여연구원: 한대석 책임연구원, 성기승 책임기술원,
김영언 선임연구원, 김인호 선임연구원, 오세욱 선임연구원,
정경아 위촉연구원, 송태철 위촉연구원

위탁연구기관명: 청주과학대학교 김치식품과학과

위탁연구책임자: 조교수 유광원

참여연구원: 김진숙 보조연구원, 박효숙 보조연구원

참여기업 : (주) 투윌씨비걸스

대표 김 용 조

요 약 문

I. 제 목

국내산 생약재를 이용한 기능성 한방 증류 음료제품개발

II. 연구개발의 목적 및 중요성

본 연구는 특유의 쓴맛, 신맛, 짠 맛 등으로 인해서 음료 가공 소재로써는 부적합하지만 인체에 유용한 생리 활성을 나타내는 생약재를 건강 기능성 음료로 개발하기 위한 목적으로 생약재로부터 유용한 휘발성 성분을 추출 증류하여 음료 제품에 이용하여 다양한 생리활성 생약재의 식품학적 유용성을 증진시키기 위한 목적으로서 한방 증류 음료를 개발하여 상업화시킴을 목적으로 하고 있다. 먼저, 각종 유용 생약재에 대한 추출 증류 조건을 설정하고 생약재의 휘발성 성분을 분석하였다. 또한 각추출물 및 증류물에 대한 항암활성 면역증진 활성 및 항산화 활성 등을 시험관 시험 및 동물 실험을 통하여 확인하였다. 이를 바탕으로 최적의 생리활성을 나타내는 생약재를 선별하여 이를 조합 면역 및 항암활성이 우수한 건강 기능성 한방음료 제품으로의 개발을 시도하였다. 개발된 제품에 대한 항암활성 및 면역 증진 효능을 동물실험을 통하여 최종적으로 확인하여 개발제품의 우수성을 확인하고자 하였다.

III. 연구개발 내용 및 범위

- 증류액 소재로 선정된 생약재에 대한 항산화효과, 면역증진(면역세포증식능, 마크로파지 및 골수세포증식 등) 및 항암활성 (자연살해세포활성 등) 분석 시험
- 증류액에 대한 휘발성 화합물의 정량, 정성 분석
- 증류액에 대한 생리활성 효능 분석
- 생약재를 이용한 기능성 한방증류음료의 기호성 증진 배합 시험
- 기능성 한방증류에 대한 항산화 효과, 면역증진 및 항암활성 효과 분석
- 기능성 한방증류음료 시제품 제조

IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구결과

국내산 생약재를 이용하여 항암활성, 면역증진 활성 및 항산화 활성 등을 가지는 건강 기능성 한방증류음료를 개발하고자 하였다. 먼저 생약재의 휘발성 성분 분석 결과 대부분 탄화수소와 알콜류, 알데하이드 및 일부 유기산 등이 존재하는 것으로 확인되었다. 각 생약재별 휘발성 성분을 분석한 결과 특히 계피, 천궁, 하수오, 당귀, 백출, 오미자, 인삼 및 인진쑥 등에서 많은 휘발성 물질들이 함유되어 있는 것으로 나타났다. 생약재로부터 70% 알콜 및 열수 추출물 및 생약재 증류물에 대한 항산화 활성을 총 항산화 활성 및 수소이온라디칼 소거 활성을 측정하여 분석한 결과 측정된 모든 생약재에서 항산화 활성이 있는 것으로 나타났으며 생약재 증류물의 경우 증류물 원액에 대한 10 μ g, 100 μ g/mL 농도 수준에서 측정된 결과 총항산화 활성 및 수소이온라디칼 소거활성이 나타나지 않았다.

전통 생약재를 대상으로 한 Colon 26-M3.1 lung carcinoma 종양전이 모델에서의 종양전이 억제활성은 가시오가피의 열수추출물이었으며 (75.6%) 그 다음이 백출 (71.8%), 인삼 (70.5%), 감초 (66.3%)와 당귀 (62.7%)의 열수추출물과 영지 (62.9%), 가시오가피와 진피 (60.9%) 및 인진 (57.8%) 냉수추출물로 종양전이 억제활성이 50% 이상을 보여주었다. 최적의 파쇄 및 교반시간은 100 $^{\circ}$ C, 30분으로 처리했을 때가 가장 높은 수율 (6.5%)과 대조군에 비해 77.5%의 높은 종양전이 억제활성을 보였다. 골수세포 증식활성 물질을 검색한 결과, 냉수추출에서는 동충하초, 두충, 백봉령, 가시오가피, 진피 및 황기 등이, 열수추출에서는 갈근, 감초, 결명자, 구기자, 백출, 생강, 숙지황, 가시오가피 및 진피가 대조군에 비해 1.5배 이상의 높은 활성을 나타내었다. 100 $^{\circ}$ C, 30분의 파쇄로 처리했을 때가 가장 높은 수율 (10.7%)과 대조군에 비해 1.9배의 높은 골수세포 증식활성을 나타내었다. 가시, 가시오가피를 포함하는 5종의 골수세포 증식활성 및 종양전이 억제활성 물질이 함유된 열수추출물로부터 활성성분을 분리하고 이들이 어떤 성분으로 구성되어 있는지를 검토하기 위하여 각 생약재의 열수추출물을 분획한 후 골수세포 증식활성 및 종양전이 억제활성을 분석한 결과 활성을 갖는 생약재, 즉 가시, 가시오가피와 백출 등의 열수추출물의 경우, 골수세포 증식 및 종양전이 억제활성에 관여하는 활성물질이 대부분 당으로 구성되어진 물질을 함유하고 있음을 알 수 있었다. 산업적 대량생산을 기반을 두고 5종의 활성 혼합 생약재

로부터 증류 음료를 제조하기 위하여 혼합생약재를 비율별로 혼합 후 열수추출하여 골수세포 증식활성 및 종양전이 증식활성을 측정할 경우 모든 활성에서 어떠한 생약재 단독의 열수추출물보다 우수한 활성을 보이면서 조제된 5종류의 레시피 시료군 중에서도 가장 활성이 높은 레시피군은 가시오가피 : 백출 : 진피 : 감초 : 인삼 = 30 : 30 : 15 : 15 : 10의 배합비율로 나타났다.

가시오가피를 포함하는 5종의 골수세포 증식활성 및 종양전이 억제활성 물질이 함유된 증류액으로부터 활성성분을 분리하고 이들이 어떤 성분으로 구성되어 있는지를 검토하기 위하여 각 생약재의 개별 증류액을 분획한 결과 활성 생약재의 증류액으로부터 유기용매-가용획분의 분획과정을 통하여 활성성분이 포함된 획분이 분리되었음을 알 수 있었다. 골수세포 증식활성 및 종양전이 억제활성에 관여하는 증류액의 활성성분은 물 등에 가용성인 친수성 물질보다는 극성이 낮은 유기용매에 가용성인 소수성의 저분자류가 주성분일 가능성을 높여주었다.

이와 같은 결과로부터 활성을 갖는 생약재, 즉 가시오가피와 백출 등의 증류액의 경우, 골수세포 증식 및 종양전이 억제활성에 관여하는 활성물질이 열수추출물의 조당 당 획분이 대부분 당으로 구성되어진 물질인 것과 달리, 고분자 물질보다는 페놀류 등의 저분자 물질이 주로 함유되어 있음을 알 수 있었다. 생약재 추출물로부터 개별 증류액을 제조한 후 혼합 증류액을 배합한 후 골수세포 증식활성 또는 종양전이 억제활성 분석 결과 열수추출물의 배합비율과 동일한 백출 : 가시오가피 : 감초 : 진피 : 인삼 = 30 : 30 : 15 : 15 : 10의 배합비율로 나타났다. 혼합생약로부터 제조된 증류액에 대한 골수세포 증식활성 또는 종양전이 억제활성 분석 결과 백출 : 가시오가피 : 감초 : 진피 : 인삼 = 35 : 35 : 10 : 10 : 10의 배합비율이 가장 우수한 것으로 나타났다. SD-D 배합비율이 대한 음료레시피에 의한 활성결과를 살펴보면, 골수세포 증식활성의 경우에는 SD-D Base만이 첨가된 SD-D Base 8%에 물 92%를 첨가한 경우 가장 높은 활성을 나타내었으며 종양전이의 결과에서는, 골수세포 증식활성의 결과와 유사한 양상을 보여주었다. 활성에서 가장 우수한 활성을 유지한 음료레시피는 SD-D Base만을 첨가한 Drink-III와 SD-D Base에 부원료인 감미료와 산미료를 적당히 첨가한 Drink-VII가 실험한 음료레시피 중에서는 가장 우수한 활성을 보여주었다. *In vitro*의 결과를 토대로, 지금까지 우수한 활성을 갖는 증류액 및 음료레시피 등이 생체 내에서도 골수세포 증식활성 및 종양전이를 억제활성을 유지할 수 있

는지를 마우스를 활용한 *Ex vivo* 실험을 실시한 결과 유의적인 활성을 나타내었다. 활성 분석 결과 가장 우수한 것으로 나타난 음료base에 적정 산미료와 감미료 배합비를 알아보기 위하여 관능검사를 실시한 결과 산미료 0.1%, 감미료 10%를 첨가한 경우 기호도가 우수한 것으로 나타났다.

2. 활용에 대한 건의

본 과제를 통하여 생약재를 이용한 한방증류 음료의 항산화효능, 항암활성, 면역증진 효능을 시험관 시험 및 동물 실험을 통하여 체계적으로 확인할 수 있었으며 이 데이터를 바탕으로 하여 항암 및 면역증진 효능이 우수한 한방증류음료 제품을 제조하였으며 제조된 시제품에 대한 동물실험을 완료하였다. 본 연구를 통하여 개발된 제품은 본 연구의 참여기업체인 투원씨비걸스에 기술이전되어 상업화 시킬 예정이다. 또한 본 과제를 통해서 검증된 생약재 증류물에 대한 생리활성은 이미 한국식품영양과학회지(33(4), p626-632, 2004)에 논문으로 투고하여 발표되었으며 생약재 증류물을 이용한 한방증류음료 제조에 관한 특허 출원중에 있다. 앞으로 지속적인 홍보를 통하여 한방증류 음료의 우수성을 널리 알리고 다양한 상업화 루트를 통하여 개발기술이 사회에 환원되어 기여할 수 있도록 하고자 한다.

SUMMARY

I. Title

Development of functional beverage using Steam Distillates Prepared from domestic herbal Medicines

II. Purpose and Significance of the Study

The objectives of this study were to develop functional healthy drink by using domestic herbal medicines which have various physiological activities. Medicinal herbs were not suitable to manufacture commercial drink because of its bitter taste. In this study, we were investigated volatile compounds analysis, physiological activity such as antioxidant activity, anti-cancer effect and immunological activity to develop functional herb drink from herb extract and steam distillate

III. Contents and Scope of the Study

1. Physiological activity analysis of medicinal herb extract and its steam distillates
 - (1) Volatile compounds analysis
 - (2) Antioxidant activity analysis
 - (3) Bone marrow cell proliferation effect
 - (4) Anti-metastasis effect

2. Development of herbal beverage and Physiological activity analysis
 - (1) Identification and investigation of active compounds from herbal medicines distillates
 - (2) Preparation of steam distillate and bone marrow cell proliferation activity and anti-metastasis effect analysis

- (3) Development of recipe by using active beverage base
- (4) Sensory evaluation

IV. Results and Recommendation

The study was investigated to develop functional medicinal herb distilled drink which have various physiological activities such as anticancer effect, immunostimulating effect and antioxidant activity. Aqueous and 70% ethanol extracts of 30 kind herbal medicines at 10 mg/ml showed antioxidant activities of 70%. But antioxidant activity of steam distillates prepared from herbal medicines was not observed at concentration of 10, 10 μ g/ml. Of hot-water extracts prepared from 30 kinds of herbal medicines, *Acanthopanax senticosus* (75.6% inhibition of control), *Atractylodes macrocephale* (71.3%), *Panax ginseng* (70.0%), *Glycyrrhiza uralensis* (66.3%) and *Angelica acutiloba* (63.1%) showed the potent tumor metastasis inhibition of colon 26-M3.1 lung carcinoma at 50 μ g/mouse, whereas the other hot-water extracts had a little activity, except for *Pueraria thunbergiana* (58.6%) and *Citrus leticulata* (54.9%) having the intermediate activity. In addition, we found that *Citrus leticulata* (1.80-fold of control), *A. macrocephale* (1.73-fold), *A. senticosus* and *G. uralensis* (1.64-fold) also enhanced on Peyer's patch cells mediated-hematopoietic response at 100 μ g/mL. In order to increase the drinking convenience as beverage and amounts of the active components, these active herbal medicines were prepared into each steam distillate. Among these steam distillates, *A. macrocephale*, *G. uralensis* and *A. senticosus* showed the potent tumor metastasis inhibition at 50 μ g/mouse (58.7%, 50.3% and 41.9%, respectively), and *A. macrocephale* especially had the higher activity than any other steam distillate at 5 μ g/mouse (49.7%). In treatments of these steam distillates with Peyer's patch cells, *A. macrocephale* and *A. senticosus* significantly increased the bone marrow cell proliferation even at 10 μ g/mL (1.49- and 1.28-fold of control). Although the steam distillate had lower activity than hot-water extract, these

results revealed that herbal medicines, such as *A. macrocephale* and *A. senticosus* showed the potent immunostimulating activities in hot-water extract as well as steam distillate. Therefore, it suggested that the steam distillates from herbal medicines could be utilized to food industry as beverage.

Contents

I. Summary in Korean	3
I. Summary in English	7
Chap. 1. Physiological activity analysis of medicinal herb extract and its steam distillates	16
I. Introduction	16
II. Materials and methods	17
A. Materials	17
B. Methods	18
1. Volatile compounds	18
2. Physiological analysis	20
i) Preparation of extract	20
ii) Preparation of distillates	21
iii) Physiological analysis	22
a) Antioxidant activity	22
1) Total antioxidant activity	22
2) Hydroxy radical scavenging activity	22
b) Bone marrow cell proliferation effect	23
c) Anti-metastasis effect	24
III. Results	25
A. Volatile compounds	25
B. Antioxidant activity	56
C. Anti-metastasis effect	67
1. Analysis of solvent fraction	67
2. Aqueous soluble fraction	68
3. Solvent extraction fraction	69
4. Analysis of steam distillates	69
5. Selection of sample	71

6. Optimization of extraction	72
D. Bone marrow cell proliferation effect	75
1. Analysis of solvent fraction	75
2. Aqueous soluble fraction	78
3. Solvent extraction fraction	78
4. Analysis of steam distillates	78
5. Selection of sample	79
6. Optimization of extraction	83
IV. Discussion	84
V. References	85
Chap. 2. Devepolment of herbal beverage and Physiological activity analysis	89
I. Introduction	89
II. Methods	91
A. Identification and investigation of active compounds	91
1. Hot-water extraction and fractionation	91
2. Preparation from mixed herbal medicines and analysis	91
B. Preparation of steam distillate and activity analysis	92
1. Preparation of steam distillate and fractionation of active materials	92
2. Preparation of beverage base by mixing distillates	93
3. Preparation of beverage base from distillate	94
C. Development of recipe by using active base	94
1. Preparation of base	95
2. Preparation of mixed base	95
D. Chemical analysis	96
1. Components analysis	96
2. Chemical and ezymatic treatment of distillate	96
E. Physiological activity analysis	96
1. Animal experiment and cell culture	97
2. Bone marrow cell proliferation effect	97

3. Bone marrow cell proliferation effect ex vivo	98
4. Anti-metastasis effect	98
III. Results	103
A. Identification and analysis of active component	103
1. Preparation of hot-water extract	103
2. Identification of active component	106
3. Preparation of hot water extract and activity analysis	113
B. Preparation of distillate and activity analysis	117
1. Preparation of distillate	117
2. Identification of active component	121
3. Preparation of mixed distillate	127
4. Preparation of distillate from herbal medicine	132
C. Development of distillate beverage and immunological activity analysis	138
1. Development of beverage recipe and immunological activity analysis in vitro	138
2. immunological activity ex vivo	142
D. Sensory evaluation	152
IV. Discussion	152
V. References	154

목 차

국문요약	3
영문요약	7
제 1 장 생약재 추출물 및 증류물의 생리활성 분석	16
제 1 절 서론	16
제 2 절 재료 및 방법	17
1. 재료	17
2. 방법	18
가. 생약재 증류물의 휘발성 성분 분석	18
나. 생약재 증류물에 대한 생리활성 분석	20
1) 생약재로부터 항암활성 및 면역활성 등의 증강물질 함유 추출물의 조제	20
2) 생약재의 추출로부터 항암활성 및 면역활성 증강물질 함유 증류액의 조제	21
3) 추출물 및 증류액의 생리활성 분석	22
가) 항산화 활성 분석	22
(1) Total antioxidant activity 측정	22
(2) 수소이온 라디칼 소거활성	22
나) Peyer's patch를 통한 골수세포 증식활성	23
다) Colon 26-M3.1 lung carcinoma의 종양전이 모델	24
제 3 절 연구결과	25
가. 생약재 추출 증류물에 대한 휘발성 성분 분석	25
나. 생약재 추출물 및 증류물의 항산화 활성	56
다. 생약재의 추출조건 최적화 및 종양전이억제 활성	67
1) 생약재의 용매추출물로부터 종양전이 억제활성 검색	67
2) 파쇄한 각종 시료의 세포 내 수용성 물질의 종양전이 억제활성 검색	68
3) 파쇄한 각종 시료의 용매추출물로부터 종양전이 억제활성 검색	69
4) 높은 종양전이 억제활성을 보인 생약재 증류액의 활성검색	69
5) 생약재 추출물로부터 종양전이 억제활성 시료의 선정	71
6) 최대활성 시료의 추출조건의 최적화	72

라. 생약재 및 증류액의 Peyer's patch를 매개로 한 골수세포 증식활성 촉진 성분의 검색과 활성물질의 추출화 조건	75
1) 각종 생약재의 용매추출물로부터 골수세포 증식활성 성분의 검색	75
2) 파쇄한 각종 시료의 세포 내 수용성 물질의 골수세포 증식활성 성분의 검색 ...	78
3) 파쇄한 각종 시료의 용매추출물로부터 골수세포 증식활성 성분의 검색	78
4) 높은 골수세포 증식활성을 보인 생약재 증류액의 활성검색	78
5) 골수세포 활성 시료의 선정	79
6) 최대 골수세포 증식활성 시료의 추출조건의 최적화	83
제 4 절 결론	85
제 5 절 참고문헌	89
제 2 장 기능성 한방증류음료의 제조 및 생리활성 분석	89
제 1 절 서론	91
제 2 절 연구방법	91
1. 생약재추출물 활성검색과 활성성분 동정	91
가. 열수추출물의 조제와 활성물질의 분획	91
나. 혼합생약재 열수추출물의 조제와 활성검색	91
2. 증류액 조제 및 활성분석	92
가. 생약재 증류액 조제와 활성물질의 분획	92
나. 생약재 증류액을 혼합한 최고 활성 레시피 제조	93
다. 혼합생약재 증류액의 조제와 활성검색	94
3. 증류액 음료 Base를 활용한 음료레시피 개발	94
가. 증류액 음료 Base 제조	95
나. 혼합 음료레시피 제조	95
4. 일반적 분석방법	96
가. 성분분석	96
나. 증류액의 효소 및 화학적 처리	96
5. 생리활성 검색	96
가. 실험동물과 세포배양	97
나. Peyer's patch를 통한 골수세포 증식활성	97

다. 골수세포 증식활성의 Ex vivo 실험	98
라. Colon 26-M3.1 lung carcinoma의 중앙전이 모델	98
제 3 절 연구결과	103
1. 생약재추출물 활성검색과 활성성분 동정	103
가. 생약재 열수추출물의 조제와 활성검색	106
나. 활성성분의 분리 및 동정	113
다. 혼합생약재로부터 열수추출물의 조제와 활성검색	117
2. 증류액 조제 및 활성성분 분석	117
가. 증류액 조제와 활성검색	121
나. 활성 성분의 분리 및 동정	127
다. 혼합증류액의 조제와 활성검색	132
라. 혼합생약재로부터 증류액의 조제와 활성검색	138
3. 증류 음료개발 및 면역활성 분석	138
가. 음료레시피 개발 및 In vitro 면역활성	142
나. Ex vivo 면역활성	148
4. 생약재 증류 음료 제조를 위한 관능검사	152
제 4 절 결론	152
제 5 절 참고문헌	152

제 1 장 생약재 추출물 및 증류물의 생리활성 분석

제 1 절 서론

식생활의 서구화에 따른 성인병 증가 및 삶의 질 개선을 추구하는 이른바 웰빙 추세에 따라 건강 기능성 식품에 대한 관심이 증가하고 있으며 건강기능식품법의 발효로 기능성 식품에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있다.

최근 식품과 의약품의 경계가 점차 모호해지고 있으며 다양한 건강 기능성 음료가 개발, 유통되고 있는 현실에서 한의학적으로 우수성이 증명되고 식품소재화가 가능한 국내산 생약재를 발굴하고 기존의 기능성 음료 수준을 한 차원 높은 고기능성 건강음료의 개발이 절실히 요구된다. 현재 생약재를 이용한 건강음료의 경우 인삼, 영지, 오미자, 대추, 산수유 등이 이용되고 있으나 생약재 특유의 쓴맛, 신맛, 떫은 맛 인하여 혼합 음료로 제조되기보다 생약재에 과량의 당류를 부형제로 혼합한 전통차 형태로 제조되고 있는 실정이다. 따라서 생리활성 기능이 우수한 다양한 생약재를 음료로 가공하기 위하여 원료자체의 쓴맛, 색깔 등 식품으로써 부적합한 문제를 해결하기 위한 새로운 가공 기술 개발이 절실하다고 할 수 있다. 현재 음료시장은 탄산음료, 과즙음료, 이온음료 등이 주를 이루고 있으며 최근 건강기능성음료에 대한 관심이 높아짐에 따라 영세 업체를 중심으로 생약재를 이용한 건강음료 식품이 나타나고 있으나 효능에 대한 과학적이며 체계적인 연구부족 및 음료식품으로써의 품질이 열악한 실정이다. 현재 세계 기능성 식품 시장 규모는 연간 1천억 달러로 추산되고 있으며 매년 크게 증가하고 있다. 특히 생리활성 효능이 우수한 천연물질을 이용한 기능성 식품에 관한 수요가 높아지고 있는 상황에서 이에 대한 과학적이고 체계적인 연구는 필수적이며 따라서 체계적이고 과학적인 연구를 바탕으로 건강 기능성 음료를 고급화할 경우 일회성으로 그칠 건강 기능성 음료 시장을 더욱 확대하여 국내 음료 시장을 탄산음료 위주에서 건강 기능성 음료로 전환할 수 있을 것이다. 현재까지 전통음료에 관한 국내외 연구는 매우 미진하며 주로 일반적인 식혜, 수정과 등에 한하여 과학적인 접근이 이루어졌을 뿐 생약재를 이용한 전통음료에 대한 체계적 분석은 거의 없는 실

정이다. 최근에 와서 한의학적으로 약재로만 인식되어왔던 생약재를 기능성 식품으로 개발하려는 시도가 이루어지고 있으나 아직은 초기 단계로 정부 지원하에 산학연 공동 연구 등의 체계적인 연구가 필요한 실정이다. 그 동안 생약재를 이용한 전통 식품을 현대화하기 위한 시도로 한국식품연구원에서는 여러 국내산 생약재를 이용한 식품 개발연구 과제를 수행하여 왔으며 생약재를 식품 원료화하기 위한 많은 기초 자료를 충분히 확보하고 있다. 최근에 와서 생약재를 이용한 건강 식품의 개발에 많은 관심이 모아지고 있으며 국내에서의 생약재의 건강식품 소재화에 관한 연구는 도라지의 약리 작용을 이용한 건강 식품 소재화연구(1), 한약재를 첨가한 농가형 유제품 개발 연구(2), 농산물 및 생약재의 혈당강화 효능(3, 4) 및 이를 활용한 혈당 조절용 식품개발 연구(5) 등 일부 연구가 진행되어 왔으며 음료의 경우 일부 인삼, 오미자, 대추 등 식미가 양호한 생약재를 원료로 한 茶類 형태의 음료가 소비되고 있으나 생약재의 약리적 효과를 기대하는 기능성음료로 보기에는 무리가 따른다. 그 외 당귀, 가시오가피, 두충 등 생약재의 다양한 생리활성 효능을 탐색 및 항암 효과와 성인병 억제효과에 대한 연구(6-14)들이 이루어지고 있다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 재료

한방증류음료 제조를 위한 생약재 재료로써 식품공전 상 주원료, 혹은 부원료로 사용이 가능한 총 30여 종의 생약재를 대상으로 하였으며 그 종류는 table 1과 같다.

Table 1. Medicinal herbs for preparation of Steam Distillates Beverage

Korean name	Scientific name
갈근	<i>Pueraria thunbergiana</i> Benth
감초	<i>Glycyrrhiza glabra</i> L.
결명자	<i>Cassia tora</i> L.
계피	<i>Cinnamomum cassia</i> Bl.
구기자	<i>Lycium chinense</i> Mill
녹각	<i>Cervus elaphus</i>
녹용	<i>Cervi cornu</i>
대추	<i>Zizyphus jujube</i> Miller
동충하초	<i>Cordyceps militaris</i>
두충	<i>Eucommia ulmides</i> Olive.
맥문동	<i>Liriope koreana</i> Nakai
복령	<i>Poria cocos</i> Wolf
백작약	<i>Paeonia japonica</i> Miyabe et Takeda var. <i>pilosa</i> Nakai
복분자	<i>Rubus coreanus</i> Miq.
산수유	<i>Cornus officinalis</i> Sieb. et Zucc.
산약	<i>Dioscorea japonica</i> Thunb.
생강	<i>Zingiber officinale</i> Roscoe
숙지황	<i>Rehmannia glutinosa</i> Liboch.
영지	<i>Ganoderma lucidum</i> Karst
가시오가피	<i>Acanthopanax senticosus</i> Sharms.
진피	<i>Fraxinus rhynchophylla</i> Hance.
토사자	<i>Caragana koreana</i> Nakai
천궁	<i>Cnidium officinale</i> Makino
하수오	<i>Polygonum multiflorum</i> Thunb.
황기	<i>Astragalus membranaceus</i> Bunge.
당귀	<i>Angelica gigas</i> Nakai
백출	<i>Atractylodes japonica</i> Koidzumi
오미자	<i>Maximowiczia chinensis</i> Repr.
인삼	<i>Panax ginseng</i> Meyer
인진쑈	<i>Artemisia capillaris</i>

2. 방법

가. 생약재 증류물의 휘발성 성분 분석

한약재 30여종의 휘발성 성분 분석을 위하여 fig. 1과 같은 연속수증기 증류장치인 Likens-Nickerson 장치(J & W Scientific, U.S.A.)를 이용하여 증류하였다.(15) 증류 조건은 추출관 한쪽에는 증류수 300ml와 한약재 30g을 가하여 가열 추출하고 다른

한쪽은 *n*-pentane과 Diethyl ether를 2:1의 비율로 혼합하여 혼합액 50ml를 43°C에서 가열하여 증류물을 제조하였다.

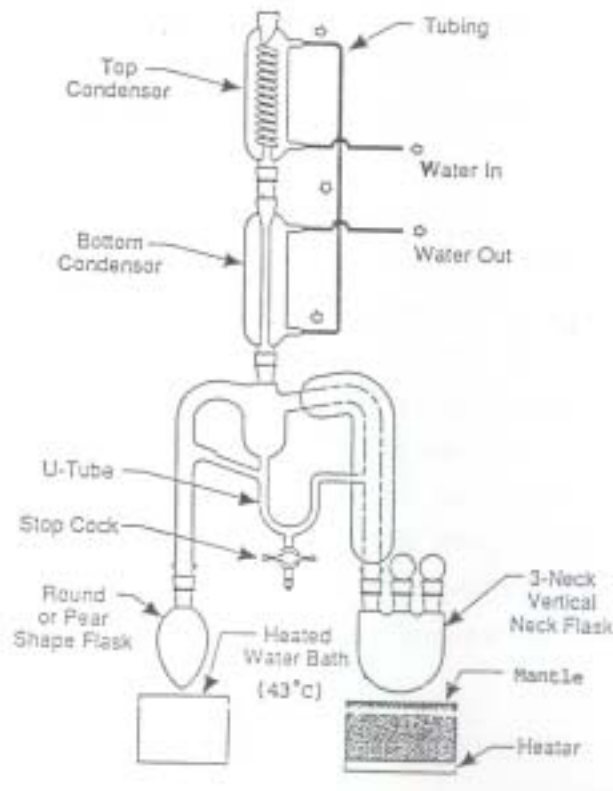


Fig 1. Likens-Nickerson 장치

생약재 증류물에 대한 휘발성 성분은 GC-MSD(Hewlett Packard 5890 series II plus, U.S.A.)를 이용하여 분석하였다. 생약재 30여종에 대한 휘발성 성분 분석조건은 다음과 같다. Capillary column은 CP-Wax(0.32mm x 50mm in length, film thickness 0.25 μ m, J & W, U. S. A.)를 사용하여 휘발성 성분을 분석하였고 이 때 injector port와 detector port의 온도는 각각 230°C, 280°C 였으며 column 온도는 40°C에서 5분

간 유지한 다음 2°C/min 속도로 220°C까지 올리고 220°C에서 30분간 유지하였다. Injector의 압력은 13 psi로 고정하였으며 detector는 FID를 사용하였다. 휘발성 성분의 확인은 GC-MSD system(Mass Selective Detector, Hewlett Packard 5892, USA)을 사용하였고, electron impact는 70eV로 하여 이온화시켰다. Mass spectrum의 scan range는 35 - 350 m/z, mass spectrum은 wiley library로 확인하였다.

나. 생약재 증류물에 대한 생리활성 분석

1) 생약재로부터 항암활성 및 면역활성 등의 증강물질 함유 추출물의 조제

30여종의 생약재를 대상으로 과쇄 및 미과쇄 등의 추출 전처리 방법과 용매 (물, 헥산, 메탄올, 에탄올)에 따른 추출 희분의 조제 후 장관면역조직의 핵심적인 면역기관인 Peyer's patch의 세포를 매개로 하여 골수세포 증식활성을 측정함(16, 17)으로써 소장을 통하여 흡수된 생약재의 활성성분이 전신순환계 면역과 관련된 골수세포의 증식활성 및 Colon 26-M3.1 lung carcinoma의 종양전이 모델을 이용하여 폐로의 암세포의 전이를 억제하는 항암활성을 활성화시키는 추출용매의 조건을 검토하였다(18).(Fig. 2) 아울러 최대 활성을 나타내는 희분을 선정하여 그 희분을 대상으로 골수세포 증식활성 물질 및 종양전이 억제활성 물질의 최적 추출조건 (온도, 시간 등)을 검토하여 항암활성 및 면역활성 증강물질의 최적 추출조건을 확립하였다.

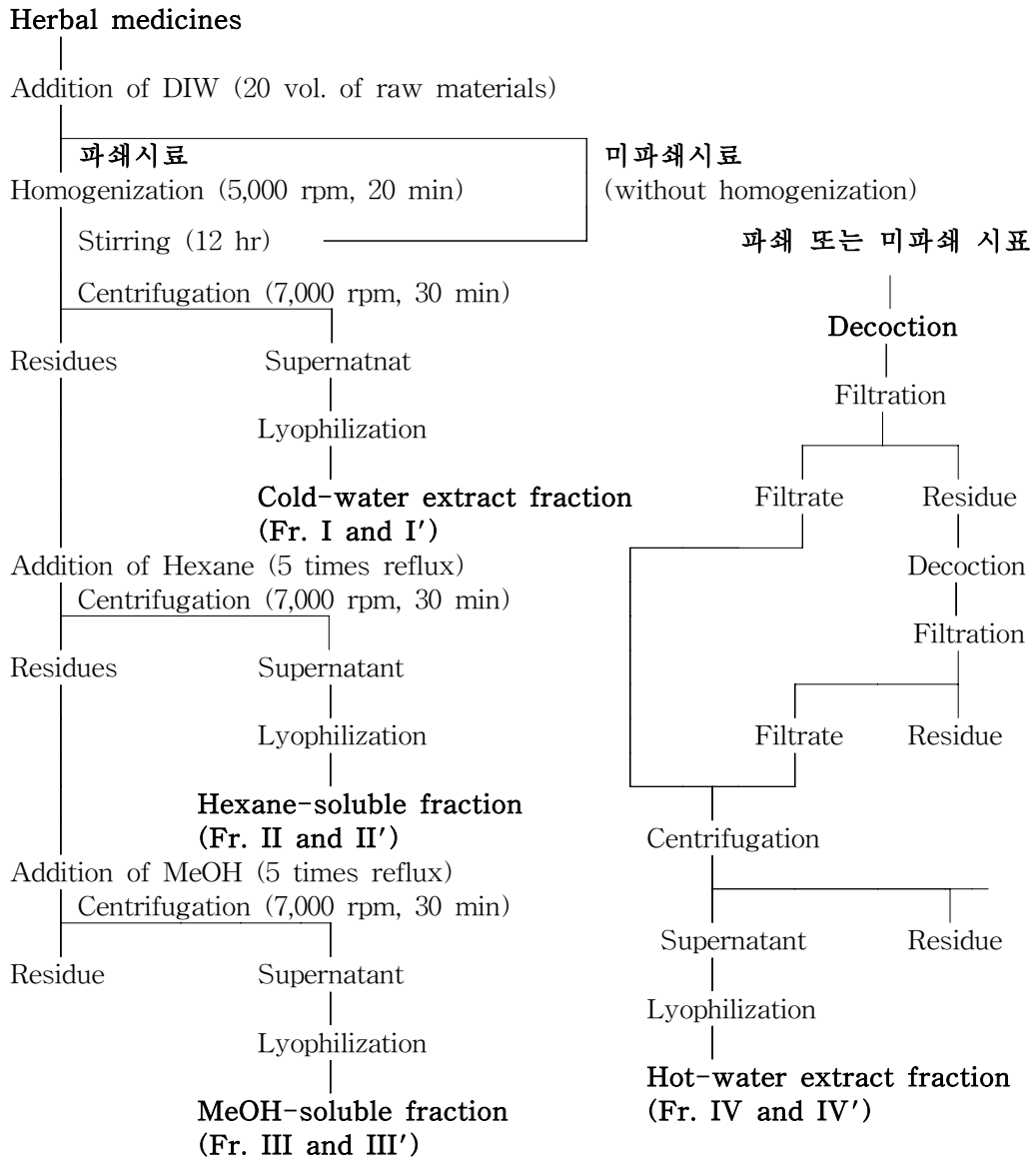


Fig. 2. Preparation of solvent-extract fractions from herbal medicines.

2) 생약재의 추출로부터 항암활성 및 면역활성 증강물질 함유 증류액의 조제

동결건조 후 파쇄한 생약재 100 g에 증류수 2 L를 첨가한 후 물의 양이 첨가량의 반이 될 때까지 decoction하면서 증류액을 감압농축장치를 이용하여 조제하였으

며 남은 찌꺼기는 금속체로 여과액과 잔사를 분리하였다. 다시 잔사에 2 L의 증류수를 첨가한 후 이 과정을 반복하여 얻어진 증류액을 처음 증류액과 혼합하고 원심분리하여 불용성 물질을 완전히 제거한 후 동결건조를 통하여 생약재의 증류액을 조제하였다. 이와 같이 얻어진 파쇄한 생약재 증류액을 Peyer's patch 세포를 매개로 한 골수세포 증식활성 및 Colon 26-M3.1 lung carcinoma를 이용한 종양전이 억제활성의 검색의 시료로 사용하였다.

3) 추출물 및 증류액의 생리활성 분석

가) 항산화 활성 분석

(1) Total antioxidant activity 측정

각 추출물의 총항산화활성은 Mitsuda 등(19)의 방법에 따라 시료 0.5mL을 linoleic acid emulsion 2.5 mL과 0.2M phosphate buffer (pH 7.0) 2mL과 혼합, 37°C에서 24시간 저장 후 0.1mL을 취하여 thiocyanate 법으로 산화정도를 측정하였다. 즉, 시료 용액 0.1mL에 75% ethanol 4.7mL, 30% ammonium thiocyanate 0.1mL과 ferrous chloride 0.1mL을 가하여 3분간 방치한 후 500nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구는 시료가 들어있지 않은 linoleic emulsion에서 수행하였고, positive control은 천연 항산화제인 비타민 E를 사용하였다.

$$\text{Antioxidant activity (\%)} = 1 - \frac{S_{\text{abs}}}{C_{\text{abs}}} \times 100$$

C_{abs} : 대조구의 흡광도

S_{abs} : 시료 첨가구의 흡광도

(2) 수소이온 라디칼 소거활성

각 추출물의 수소이온 라디칼 소거활성은 Brand-Williams 등(20)의 방법에 따라 측정하였다. 즉, 시험관에 6×10^{-5} M의 α, α -diphenyl- β -picrylhydrazyl (DPPH) 용액

2mL을 가한 후 시료 추출물 50 μ L를 첨가하여 암소에서 70분 방치 후 515nm에서 흡광도를 측정하여 다음 식에 따라 수소이온 라디칼 생성 저해활성을 계산하였으며, 대조구로는 시료대신 methanol을 첨가하였고, positive control은 비타민 C와 E를 사용하였다.

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{C_0 - S_t}{C_0} \times 100$$

C_0 : 0 time에서의 대조구의 흡광도

S_t : 안정화된 시간 (70분)에서의 시료 첨가구의 흡광도

나) Peyer's patch를 통한 골수세포 증식활성

골수세포 증식촉진 활성성분의 검색은, 장관면역계를 구성하는 장관 Peyer's patch로부터 얻은 세포를 활성화하여 골수세포 증식인자의 생산을 촉진하는 정도를 측정하였다

Peyer's patch 세포배양 상등액의 조제는 LPS 비의존성인 C3H/He 마우스의 (Daehan-Biolink Co., Korea) 소장을 채취하고 소장벽의 Peyer's patch를 잘라 차가운 RPMI-1640 medium이 (Gibco) 있는 페트리디쉬에 이동시킨다. 금속체를 (mesh #100) patch위에 놓고 주사기 고무마개로 누르면서 patch로부터 세포 방출한 후 이 세포현탁액을 금속체를 (mesh #200) 사용하여 여과하고 상기 medium으로 세 번 세정함. 세포농도를 2×10^6 cells/mL RPMI-1640으로 조정, 200 μ l씩을 96 well plate에 분주하고 37 $^{\circ}$ C에서 5일간 5% CO₂ 배양기에서 배양하여 상등액을 회수하여 이 상등액을 골수세포 증식활성측정용 세포배양 상등액으로 사용하였다.

골수세포의 조제는 동일 mouse의 정강이 뼈로부터 RPMI-1640 medium을 주입하면서 골수세포를 회수하고 상기와 같이 여과, 세정하고 2.5×10^5 cells/mL RPMI-1640으로 조정하였다.

골수세포 증식도의 측정은 Alamar Blue (Alamar Bio-Sciences Inc.) 환원측정법을 사용하는데 조정된 골수세포액 100 μ l씩을 96 well plate에 분주한 후 Peyer's

patch 세포로부터 얻은 세포배양 상등액 및 RPMI-1640 medium 50 μ l와 함께 37°C에서 6일간 배양함. 배양 종료 5시간 전에 Alamar Blue 용액 20 μ l를 첨가하고 Fluoroskan II를 (Labsystems, Austria) 이용하여 형광세기를 excitation 544 nm와 emission 590 nm에서 측정하였으며 시료의 골수세포 증식촉진활성은 대조구와의 차이로부터 골수세포의 증식도를 정량하였다.

(Fig. 3)

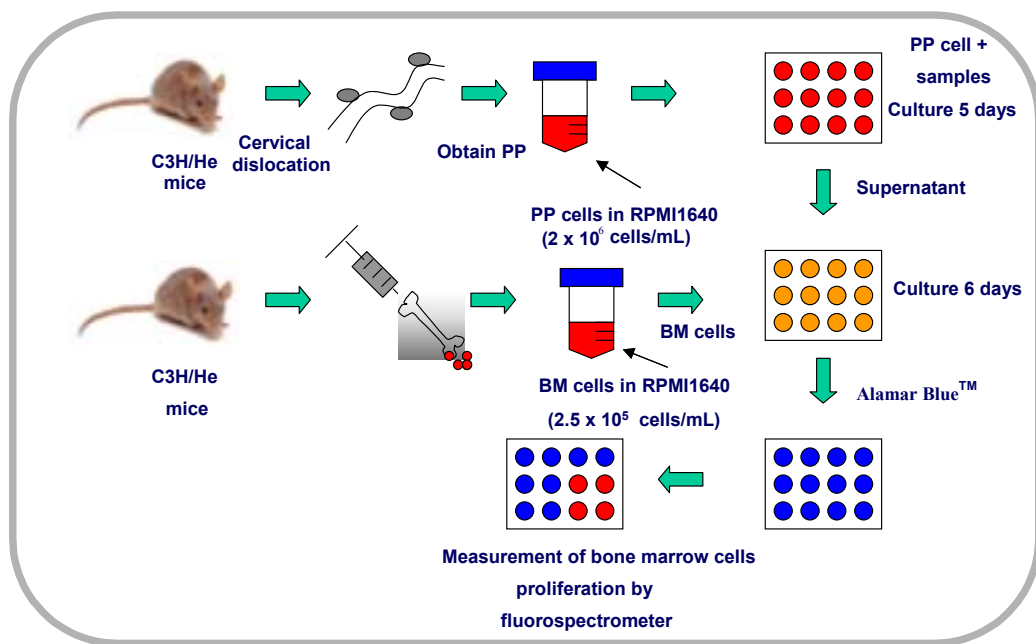


Fig. 3. Assay of bone marrow cell proliferating activity through Peyer's patch.

다) Colon 26-M3.1 lung carcinoma의 종양전이 모델

시료의 항종양 효과는 Colon 26-M3.1 lung carcinoma를 이용하는 실험동물 종양전이 모델을 이용하였다. 실험 동물로 Balb/c 마우스를 사용하였으며, 종양의 접종은 2.7×10^4 의 Colon 26-M3.1 lung carcinoma 세포를 정맥주사 (i.v.) 하고 14일 후에

마우스를 희생시키고 종양의 표적기관인 폐를 적출하여 Bouin's 용액에서 전이된 종양을 고정시킨 후 종양의 군집 수를 측정하였다. 한편, 시료에 의한 항종양 전이 효과는 종양만 접종한 대조군과 비교함으로써 조사하였고 시료 단독의 활성은 종양접종 2일 전 혹은 1일 후에 1회 정맥주사 하였으며, cisplatin은 종양 접종 1일 후에 1회 주사하였다.(Fig. 4)

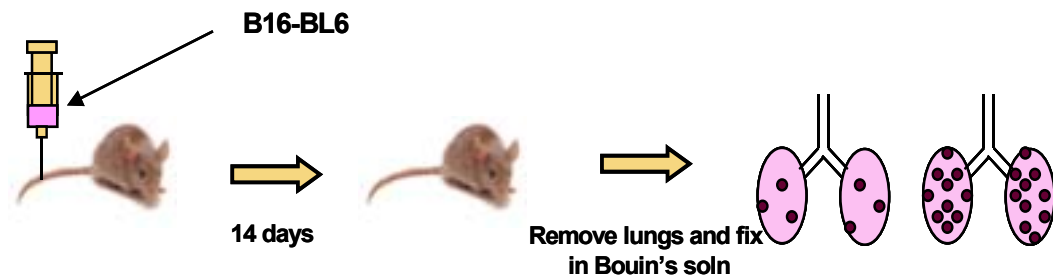


Fig. 4. Assay of anti-metastasis activity using lung carcinoma.

제 3 절 연구결과

가. 생약재 추출 증류물에 대한 휘발성 성분 분석

생약재 30여종에 대한 휘발성 성분 분석은 다음과 같은 조건으로 분석하였다. Capillary column은 CP-Wax(0.32mm x 50mm in length, film thickness 0.25 μ m, J & W, U. S. A.)를 사용하여 휘발성 성분을 분석하였고 이 때 injector port와 detector port의 온도는 각각 230 $^{\circ}$ C, 280 $^{\circ}$ C 였으며 column 온도는 40 $^{\circ}$ C에서 5분간 유지한 다음 2 $^{\circ}$ C/min 속도로 220 $^{\circ}$ C까지 올리고 220 $^{\circ}$ C에서 30분간 유지하였다. Injector의 압력은

13 psi로 고정하였으며 detector는 FID를 사용하였다. 휘발성 성분의 확인은 GC-MSD system(Mass Selective Detector, Hewlett Packard 5892, USA)을 사용하였고, electron impact는 70eV로 하여 이온화시켰다. Mass spectrum의 scan range는 35 - 350 m/z, mass spectrum은 wiley library로 확인하였다. 생약재 30여종 혼합 추출 증류물에 대한 크로마토그램을 분석한 결과 머무름 시간 12분부터 60분 사이에 대부분의 휘발성 성분들이 검출되었다. 혼합 추출 증류물에 대한 휘발성 성분 분석 결과 2-propenal, endo-borneol, camphor, 1,8-cineole, phenol 등이 주요 성분으로 검출되었다. 그외 대부분의 생약재의 주요 휘발성 성분은 휘발성 지방산으로 판명되었다. 각 생약재별 휘발성 성분을 분석한 결과 계피, 천궁, 하수오, 당귀, 백출, 오미자, 인삼 및 인진쑥 등에서 많은 휘발성 물질들이 함유되어 있는 것으로 나타났다. 계피에서 분리 동정된 성분은 총 31가지로 나타났으며 특히 α -pinene, camphene, 1- β -pinene, limonene, α -copaene, α -muurolene 등의 terpene 계 탄화수소 화합물이 대부분을 차지하였으며 특히 α -copaene의 경우 29.66%를 차지하였다. 그 외 2-propenal 및 benzaldehyde 등의 알데하이드 화합물이 검출되었다. 독특한 방향성을 지닌 식용 및 약용식물인 천궁의 경우 모두 35종의 휘발성 성분이 검출되었으며 주요 성분으로는 α -pinene, camphene, sabinene, β -phellandrene, 1,8-cineole, γ -terpinene, β -selinene, β -caryophyllene, α -ylangene, 1,8-cineole, α -copaene 등의 terpene 계 탄화수소 화합물이 주로 검출되어 이(21)등의 결과와 유사하였으며 그 외 알콜류 및 휘발성 유기산 성분이 다수 검출되었다.

하수오의 경우 methane, toluene, 1-propanol, hexanal, cinamic aldehyde, phenol, octadecane 등의 알데하이드 및 알콜류와 camphene, 3-carene, α -ylangene, α -copaene 등의 탄화수소 화합물이 주로 검출되었다. 당귀의 경우 모두 85종의 휘발성 성분이 검출되었으며 camphene, 1,3,3-methyl-4-methylidene-1-cyclohex, 1- β -pinene, myrcene, limonene, 등의 terpene 계 탄화수소류와 2-cyclohexen-1-ol, 1-terpineol, p-cymen-8-ol, 6-octen-1-ol, α -muurolene, hedyacaryol, 10-epi- γ -eudesmol, β -eudesmol, α -eudesmol 등의 알콜류가 주요 휘발성 성분으로 검출되었으며 이러한 결과는 검출조건 및 시료의 처리 조건 등이 상이 하나 주요 성분 등에서 노(22) 및 최(23)의 결과와 유사하였다. 백출의 경우 camphene, β -selinene, isodene, germacrene B, 2,7-dimethoxy-3,6-dimethylnaphthalene 등의 탄화수소 화합물과 특히

sesqui terpenediol, 9,12-octadecadienoic acid, linoleic acid 등의 알콜 및 휘발성 유기산 성분이 특징적으로 많이 검출되었다. 오미자의 경우 α -ylangene, β -elemene, 2,5-furandione, β -himachalene, acoradrene 등의 탄화수소류 및 1,2-benzenedicarboxylic acid, tetradecanoic acid, di-(2-ethylhexyl)ester of adipic acid, spathulenol 등의 알콜류가 다량 검출되었다. 인삼의 경우 bicyclogermacrene, β -elemene, α -humulene 등의 일부 탄화수소 화합물과 spathulenol, β -eudesmol, isospathulenol, hexanedioic acid 등의 알콜류 및 유기산이 검출되었으며 특히 인삼의 주요 휘발성 성분은 대부분 알콜류인 것으로 나타났다. 인진쑥의 경우 α -pipene, camphene, myrcene, para-cymene, 1,8-cineole 등의 terpene계 탄화수소류와, β -thujone, bicyclo(2,2,1) heptan-2-one, 1,7,7-trimet, 1-borneol 등의 케톤류 및 일부 알콜류가 검출되었다.

생약재 등 일부식물류에 존재하는 휘발성 성분들 중 소엽에 다량 존재하는 caryophyllene의 경우 항염증 효능이 있는 것으로 보고되고 있으며(24) perillaldehyde 및 perilla alcohol 도 인체내에서 암을 일으키는 xanthine oxidase의 역가를 떨어뜨리는 효능이 있는 것으로 보고되고 있다.(25) 또한 식물체에 존재하는 항암유 휘발성 성분인 diallyl disulfide 등은 종양 억제 효능이 있는 것으로 알려지고 있으나(26-29) 본 연구에서 시료로 사용한 30여종의 생약재에서는 검출되지 않았다.

Table 2. Identification of volatile componets in *Pueraria thunbergiana* Benth(갈근)

peak No.	R.T.	Component	MW	Quality	raw area ($\times 10^6$)	% of total
1	3.681	ethanol	46	78	86.3	61.55
2	4.542	butanal	86	91	32.7	23.32
3	4.798	chloroform	118	95	8.2	5.85
4	10.181	cyclotrisiloxane	222	83	1.9	1.36
5	12.192	p-xylene	106	91	1.7	1.21
6	20.308	limonene	136	97	3.2	2.28
7	24.157	β -pinene	136	94	2.8	2.00
8	32.040	β -pinene	136	95	3.4	2.43

Table 3. Identification of volatile componets in *Glycyrrhiza glabra* L.(감초)

peak No.	R.T.	Component	MW	Quality	raw area ($\times 10^6$)	% of total
1	3.760	ethanol	46	72	90.5	60.33
2	4.597	hexane	86	90	18.0	12.00
3	4.865	chloroform	118	72	13.4	8.93
4	5.725	butanol	74	72	8.5	5.67
5	12.213	p-xylene	106	91	16.7	11.13
6	20.305	limonene	136	98	2.9	1.93

Table 4. Identification of volatile componets in *Cassia tora* L.(결명자)

peak No.	R.T.	Component	MW	Quality	raw area ($\times 10^6$)	% of total
1	3.748	ethanol	46	72	55.4	52.26
2	4.550	hexane	86	94	7.3	6.89
3	4.806	acetic acid	162	72	2.9	2.74
4	5.713	1-butanol	74	72	6.8	6.42
5	16.073	camphene	136	96	3.2	3.02
6	20.305	dl-limonene	136	96	5.6	5.28
7	20.468	1,8- cineole	154	83	2.7	2.55
8	27.677	copaene	204	95	7.4	6.98

Table 5. Identification of volatile componets in *Cinnamomum cassia* BI.(계피)

peak No.	R.T.	Component	MW	Quality	raw area ($\times 10^7$)	% of total
1	2.053	acetic acid	88	72	12.5	0.85
2	3.751	α -pipene	136	97	81.9	5.55
3	3.972	chloroform	118	91	115.3	7.81
4	4.786	camphene	136	98	46.6	3.16
5	5.646	hexanal	100	93	4.7	0.32
6	5.960	1- β -pinene	136	97	20.8	1.41
7	9.692	limonene	136	99	24.0	1.63
8	10.634	1,8 -cineole	154	98	14.6	0.99
9	14.134	para-cymene	134	95	2.0	0.14
10	19.215	6-methyl-5-hepten-2-one	126	96	3.4	0.23
11	23.831	α -ylangene	204	90	15.1	1.02
12	24.412	2-octenal	126	74	2.5	0.17
13	27.959	α -copaene	204	99	437.9	29.66
14	29.389	sativen	204	99	15.9	1.08
15	29.598	benzaldehyde	106	97	35.7	2.42
16	29.900	sativene	204	98	15.2	1.03
17	31.889	sosativene	204	94	14.5	0.98
18	33.365	bornyl acetate	196	98	2.7	0.18
19	33.621	β -caryophyllene	204	99	12.2	0.83
20	33.935	camphene	136	90	4.4	0.30
21	37.737	α -humulene	204	92	3.4	0.23
22	38.412	benzaldehyde	122	97	5.1	0.35
23	39.423	α -amorphene	204	99	9.9	0.67
24	40.969	borneoll	154	91	15.4	1.04
25	41.655	α -muurolene	204	96	28.0	1.90
26	42.644	benzofuran	132	92	8.3	0.56
27	43.458	β -cadinene	204	99	17.9	1.21
28	44.446	cadina-1,4-diene	204	99	2.5	0.17
29	47.225	cis-cacamenen	202	97	3.4	0.23
30	50.190	trans-cinnamaldehyde	132	96	2.4	0.16
31	57.596	2-propenal	132	97	498.2	33.74

Table 6. Identification of volatile componets in *Lycium chinense* Mill(구기자)

peak No.	R.T.	Component	MW	Quality	raw area ($\times 10^6$)	% of total
1	4.599	acetic acid	60	72	70.8	9.12
2	5.087	acetic acid	60	86	28.0	3.61
3	9.517	2,3-butanediol	90	80	26.5	3.42
4	16.086	camphene	136	91	321.9	41.49
5	17.389	sabinene	136	91	22.0	2.84
6	17.540	β -pinene	136	84	13.2	1.70
7	20.330	β -phellandrene	136	83	49.7	6.41
8	20.470	1,8-cineole	154	97	134.3	17.31
9	26.493	camphor	152	96	6.3	0.81
10	33.632	bornyl acetate	196	80	28.1	3.62
11	43.201	zingiberene	204	78	50.2	6.47
12	44.457	β -sesquiphellandrene	204	70	24.9	3.21

Table 7. Identification of volatile componets in *Cervus elaphus*(녹각)

peak No.	R.T.	Component	MW	Quality	raw area ($\times 10^6$)	% of total
1	3.719	ethanol	46	78	205.1	76.87
2	4.545	isobutyl alcohol	74	90	15.8	5.92
3	5.359	pentanal	86	72	4.4	1.65
4	5.708	1-butanol	74	72	6.1	2.29
5	7.359	isoamyl alcohol	88	80	14.7	5.51
6	9.289	hexanal	100	83	5.2	1.95
7	18.149	6-methyl-5-hepten-2-one	126	93	4.1	1.54
8	20.311	I-limonene	136	98	3.2	1.20
9	24.160	β -pinene	136	95	3.0	1.12
10	32.043	β -3-carene	136	90	5.2	1.95

Table 8. Identification of volatile componets in Cervi cornu(녹용)

peak No.	R.T.	Component	MW	Quality	raw area ($\times 10^6$)	% of total
1	3.724	ethanol	46	78	264.3	95.24
2	5.724	1-butanol	74	72	8.7	3.14
3	20.304	I-limonene	136	98	2.6	0.94
4	24.164	1-methyldodecylamine	199	72	1.9	0.68

Table 9. Identification of volatile componets in *Zizyphus jujube* Miller(대추)

peak No.	R.T.	Component	MW	Quality	raw area ($\times 10^6$)	% of total
1	4.619	acetic acid	60	90	83.9	79.23
2	5.003	acetic acid	60	86	22.0	20.77

Table 10. Identification of volatile componets in *Cordyceps militaris*(동충하초)

peak No.	R.T.	Component	MW	Quality	raw area ($\times 10^6$)	% of total
1	3.736	ethanol	46	78	72.5	42.67
2	4.050	methane	84	97	20.2	11.89
3	4.574	hexane	86	94	10.8	6.36
4	4.829	chloroform	118	96	18.0	10.59
5	5.062	1,4-dideaterio-2-methylbutane	74	72	4.5	2.65
6	5.376	3-methylbutanal	86	83	9.0	5.30
7	5.515	benzene	78	95	14.4	8.48
8	12.213	p-xylene	106	93	2.5	1.47
9	16.084	camphene	136	96	3.2	1.88
10	20.317	I-limonene	136	98	6.5	3.83
11	20.468	1,8-cineole	154	95	2.6	1.53
12	37.769	α -ylangene	204	99	5.7	3.35

Table 11. Identification of volatile componets in *Eucommia ulmides* Olive.(두충)

peak No.	R.T.	Component	MW	Quality	raw area ($\times 10^6$)	% of total
1	3.750	ethanol	46	72	176.4	80.22
2	6.226	pentanal	86	72	5.9	2.68
3	9.284	hexanal	100	94	15.2	6.91
4	16.098	camphene	136	98	6.4	2.91
5	20.330	limonene	136	97	2.6	1.18
6	20.481	1,8-cineole	154	93	5.3	2.41
7	37.782	α -ylangene	204	99	8.1	3.68

Table 12. Identification of volatile componets in *Liriope koreana* Nakai(맥문동)

peak No.	R.T.	Component	MW	Quality	raw area ($\times 10^6$)	% of total
1	4.006	methane	84	97	26.7	52.05
2	8.110	toluene	92	91	3.3	6.43
3	32.923	2-propenal	132	96	13.1	25.54
4	37.783	α -ylangene	204	99	8.2	15.98

Table 13. Identification of volatile componets in *Poria cocos* Wolf(복령)

peak No.	R.T.	Component	MW	Quality	raw area ($\times 10^6$)	% of total
1	3.636	ethanol	46	78	356.8	50.55
2	3.985	methane	84	95	141.7	20.07
3	4.927	isobutylalcohol	74	86	61.9	8.77
4	5.613	1-butanol	74	74	11.9	1.69
5	7.322	isoamylalcohol	88	72	21.2	3.00
6	8.089	toluene	92	91	5.4	0.76
7	9.252	hexanal	100	83	8.1	1.15
8	10.171	n-methy-1,3-dithioisindoline	207	72	2.8	0.40
9	12.182	o-xylene	106	91	2.6	0.37
10	18.798	cyclotetrasiloxane	296	91	3.2	0.45
11	20.321	limonene	136	97	3.4	0.48
12	27.704	borneol	154	72	3.3	0.47
13	30.007	α -3-carene	136	95	16.4	2.32
14	32.913	2-propenal	132	97	40.1	5.68
15	41.622	2,5-cyclohexadiene-1,4-dione	220	87	7.5	1.06
16	42.657	ar-curcumene	202	98	5.1	0.72
17	43.854	phenol	206	94	14.5	2.05

Table 14. Identification of volatile componets in *Paeonia japonica* Miyabe et Takeda var. *pilosa* Nakai(백작약)

peak No.	R.T.	Component	MW	Quality	raw area ($\times 10^6$)	% of total
1	3.762	ethanol	46	72	144.1	14.24
2	4.088	methane	84	91	799.5	79.00
3	4.855	chloroform	118	87	25.8	2.55
4	5.076	formamidinium acetate	104	83	11.3	1.12
5	9.322	piperazine	86	72	8.2	0.81
6	16.122	camphene	136	95	9.0	0.89
7	20.343	limonene	136	96	14.1	1.39

Table 15. Identification of volatile componets in *Rubus coreanus* Miq.(복분자)

peak No.	R.T.	Component	MW	Quality	raw area ($\times 10^6$)	% of total
1	5.353	butanal	86	72	21.5	2.62
2	5.493	benzene	78	90	27.2	3.31
3	5.690	1-butanol	74	72	16.1	1.96
4	6.190	pentanal	86	86	16.8	2.05
5	8.121	toluene	92	87	11.1	1.35
6	9.260	hexanal	100	91	107.5	13.10
7	11.830	ethylbenzene	106	81	3.7	0.45
8	12.202	p-xylene	106	87	5.1	0.62
9	15.341	α -pipene	136	91	33.3	4.06
10	16.085	camphene	136	95	127.6	15.55
11	20.329	β -phellandrene	136	91	21.1	2.57
12	20.480	1,8-cineole	154	98	53.6	6.53
13	27.701	borneol	154	72	5.5	0.67
14	31.308	1-isopropyl-2-methoxy-4-methylbenzene	164	70	6.2	0.76
15	33.642	bornyl acetate	196	96	49.2	5.99
16	37.781	α -ylangene	204	98	177.2	21.59
17	37.991	α -cubebene	204	96	28.6	3.48
18	38.572	berkheyaradulen	204	83	25.3	3.08
19	41.421	trans- β -farnesene	204	94	10.6	1.29
20	42.653	ar-curcumene	202	70	35.6	4.34
21	44.490	δ -cadinene	204	90	19.3	2.35
22	45.095	valencene	204	83	18.7	2.28

Table 16. Identification of volatile componets in *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc.(산수유)

peak No.	R.T.	Component	MW	Quality	raw area ($\times 10^6$)	% of total
1	5.041	acetic acid	60	86	77.2	11.71
2	36.900	β -pinene	136	70	32.9	4.99
3	43.678	phenol	206	80	549.1	83.30

Table 17. Identification of volatile componets in *Dioscorea japonica* Thunb.(산약)

peak No.	R.T.	Component	MW	Quality	raw area ($\times 10^6$)	% of total
1	3.690	ethanol	46	78	163.1	62.49
2	4.016	methane	84	96	22.7	8.70
3	5.679	1-butanol	74	72	10.4	3.98
4	8.109	toluene	92	91	2.6	1.00
5	16.085	camphene	136	98	4.0	1.53
6	17.410	sabinene	136	94	1.9	0.73
7	20.341	sabinene	136	70	3.9	1.49
8	20.492	1,8-cineole	154	95	4.7	1.80
9	22.492	γ -terpinene	136	87	2.9	1.11
10	32.968	trans-cinnamaldemyde	132	93	4.0	1.53
11	37.793	α -ylangene	204	99	14.7	5.63
12	38.002	α -ylangene	204	96	4.1	1.57
13	38.584	berkmeyaradulen	204	91	3.5	1.34
14	40.049	trans-caryophyllene	204	97	7.3	2.80
15	41.432	trans- β -farnesene	204	98	2.8	1.07
16	43.025	β -selinene	204	99	8.4	3.22

Table 18. Identification of volatile componets in *Zingiber officinale* Roscoe(생강)

peak No.	R.T.	Component	MW	Quality	raw area ($\times 10^6$)	% of total
1	3.785	ethanol	46	78	401.0	36.72
2	15.366	Ψ -terpinene	136	91	42.7	3.91
3	16.122	camphene	136	95	124.4	11.39
4	20.354	β -phellandrene	136	80	60.8	5.57
5	20.505	1,8-cineole	154	96	47.2	4.32
6	24.063	α -3-carene	136	87	12.7	1.16
7	27.737	1-borneol	154	83	260.8	23.88
8	37.806	α -ylangene	204	95	27.5	2.52
9	38.015	α -cubebene	204	83	16.1	1.47
10	42.678	ar-curcumene	202	91	50.0	4.58
11	43.236	α -zingiberene	204	74	48.7	4.46

Table 19. Identification of volatile componets in *Rehmannia glutinosa* Liboch.(숙지황)

peak No.	R.T.	Component	MW	Quality	raw area ($\times 10^6$)	% of total
1	3.632	ethanol	46	78	104.5	71.28
2	5.446	acetic acid	60	90	27.3	18.62
3	32.944	2-propenal	132	98	7.9	5.39
4	37.805	α -ylangene	204	99	6.9	4.71

Table 20. Identification of volatile componets in *Ganoderma lucidum* Karst(영지)

peak No.	R.T.	Component	MW	Quality	raw area ($\times 10^6$)	% of total
1	3.731	ethanol	46	83	128.0	53.13
2	4.557	hexane	86	95	11.5	4.77
3	4.824	chloroform	118	96	20.9	8.68
4	5.499	benzene	78	94	5.9	2.45
5	5.685	1-butanol	74	72	9.1	3.78
6	9.277	hexanal	100	90	8.5	3.53
7	20.312	limonene	136	99	7.4	3.07
8	24.160	β -3-carene	136	93	4.9	2.03
9	31.590	deta-3-carene	136	97	18.4	7.64
10	32.055	deta-3-carene	136	97	5.2	2.16
11	36.520	citronellyl propionate	212	91	8.5	3.53
12	37.973	β -pinene	136	96	4.6	1.91
13	43.950	phenol	206	97	8.0	3.32

Table 21. Identification of volatile componets in *Acanthopanax sessiliflorum* Seem.(가시오가피)

peak No.	R.T.	Component	MW	Quality	raw area ($\times 10^6$)	% of total
1	3.684	ethanol	46	78	342.0	66.55
2	4.975	isobutyl alcohol	74	72	61.7	12.01
3	9.253	hexanal	100	72	32.4	6.30
4	16.090	camphene	136	98	5.0	0.97
5	20.334	I-limonene	136	93	3.8	0.74
6	20.485	1,8-cineole	154	95	6.2	1.21
7	31.787	β -3-carene	136	95	9.6	1.87
8	32.950	2-propenal	132	97	8.2	1.60
9	33.659	bornyl acetate	196	97	5.4	1.05
10	37.798	α -ylangene	204	99	11.9	2.32
11	38.031	1,3,6-octatriene	136	87	8.5	1.65
12	41.972	2,6-di-butyl-2,5-cyclohexadiene-1,4-dion	220	97	12.1	2.35
13	43.984	phenol	206	96	7.1	1.38

Table 22. Identification of volatile componets in *Fraxinus rhynchophylla* Hance.(진피)

peak No.	R.T.	Component	MW	Quality	raw area ($\times 10^6$)	% of total
1	3.763	ethanol	46	83	100.3	58.38
2	8.111	toluene	92	91	2.9	1.69
3	16.088	camphene	136	98	4.7	2.74
4	20.332	l-limonene	136	98	5.6	3.26
5	20.483	1,8-cineole	154	96	5.5	3.20
6	24.169	1-methyldodecylamine	199	72	2.6	1.51
7	27.715	borneol	154	78	3.3	1.92
8	32.935	2-propenal	132	97	11.8	6.87
9	33.645	bornyl acetate	196	91	4.3	2.50
10	37.784	α -ylangene	204	99	13.7	7.97
11	37.993	α -copaene	204	98	4.3	2.50
12	38.575	berkheyaradulen	204	91	2.5	1.46
13	40.051	trans-caryophyllene	204	96	5.7	3.32
14	42.667	ar-curcumene	202	97	4.6	2.68

Table 23. Identification of volatile componets in *Caragana koreana* Nakai(토사자)

peak No.	R.T.	Component	MW	Quality	raw area ($\times 10^6$)	% of total
1	4.986	2-butanol	74	86	52.0	26.54
2	5.661	1-butanol	74	86	17.1	8.73
3	7.288	1-butanol	88	80	32.4	16.54
4	8.102	toluene	92	94	4.6	2.35
5	12.207	p-xylene	106	95	2.4	1.23
6	15.334	α -pinene	136	96	6.8	3.47
7	16.090	camphene	136	98	23.0	11.74
8	17.404	sabinene	136	97	2.7	1.38
9	20.334	limonene	136	97	6.7	3.42
10	20.485	1,8-cineole	154	98	10.5	5.36
11	32.938	2-propenal	132	97	7.6	3.88
12	33.647	bornyl acetate	196	98	3.4	1.74
13	37.786	α -ylangene	204	98	8.9	4.54
14	38.577	berkheyaradulen	204	94	4.4	2.25
15	40.054	trans-caryophyllene	204	94	5.5	2.81
16	45.100	valencene 1	204	87	7.9	4.03

Table 24. Identification of volatile componets in *Cnidium officinale* Makino(천궁)

peak No.	R.T.	Component	MW	Quality	raw area ($\times 10^6$)	% of total
1	3.656	ethanol	46	78	107.0	15.82
2	4.469	butanal	72	90	96.2	14.22
3	5.609	1-butanol	74	72	32.3	4.78
4	9.260	hexanal	100	94	13.2	1.95
5	9.562	butanoic acid	88	81	8.7	1.29
6	11.818	ethylbenzene	106	90	2.8	0.41
7	12.201	p-xylene	106	95	4.6	0.68
8	15.341	α -pinene	136	97	21.5	3.18
9	16.097	camphene	136	98	52.0	7.69
10	17.410	sabinene	136	97	28.3	4.18
11	17.562	β -pinene	136	96	6.0	0.89
12	18.341	β -myrcene	136	86	3.1	0.46
13	18.817	cyclotetrasiloxane	296	83	3.4	0.50
14	20.096	para-cymene	134	94	3.1	0.46
15	20.340	β -phellandrene	136	94	16.7	2.47
16	20.492	1,8-cineole	154	98	30.1	4.45
17	21.945	ψ -terpinene	136	97	3.8	0.56
18	22.491	ψ -terpinene	136	97	15.2	2.25
19	24.166	ψ -terpinene	136	95	12.1	1.79
20	31.061	carvacrol methyl ether	164	97	3.9	0.58
21	31.677	ξ -3-carene	136	95	16.5	2.44
22	33.665	bornyl acetate	196	98	17.8	2.63
23	37.804	α -ylangene	204	99	42.9	6.34
24	38.014	α -copaene	204	97	15.0	2.22
25	38.595	berkheyaradulen	204	91	12.0	1.77
26	40.060	β -caryophyllene	204	99	22.1	3.27
27	41.444	trans- β -farnesene	204	98	10.3	1.52
28	41.595	α -humulene	204	98	6.8	1.01
29	41.967	2,6-di-butyl-2,5-cyclohexadiene-1,4-dion	220	95	8.0	1.18
30	42.676	ar-curcumene	202	96	9.1	1.35
31	43.048	β -selinene	204	99	24.1	3.56
32	43.141	α -zingiberene	204	76	6.8	1.01
33	43.223	zingiberene	204	98	7.2	1.06
34	43.978	phenol	206	97	5.1	0.75
35	45.118	aromasendrene	204	70	8.7	1.29

Table 25. Identification of volatile componets in *Polygonum multiflorum* Thunb.(하수오)

peak No.	R.T.	Component	MW	Quality	raw area ($\times 10^6$)	% of total
1	4.843	methane	162	72	49.0	10.90
2	8.122	toluene	92	90	16.5	3.67
3	8.389	1-pentanol	88	78	6.3	1.40
4	9.273	hexanal	100	94	32.0	7.12
5	11.831	ethylbenzene	106	81	4.2	0.93
6	12.203	p-xylene	106	95	4.6	1.02
7	15.342	α -pinene	136	96	4.1	0.91
8	16.075	camphene	136	98	10.0	2.22
9	16.726	benzaldehyde	106	96	5.4	1.20
10	20.318	l-limonene	136	98	7.6	1.69
11	20.481	1,8-cineole	154	95	9.7	2.16
12	27.702	endo-borneol	154	93	8.8	1.96
13	31.771	3-carene	136	96	22.8	5.07
14	32.899	cinnamic aldehyde	132	97	64.9	14.44
15	33.643	bornyl acetate	196	95	6.0	1.33
16	37.445	2,5-cyclohexadiene-1,4-dione	220	99	17.5	3.89
17	37.771	α -ylangene	204	99	10.7	2.38
18	37.992	α -copaene	204	99	12.2	2.71
19	39.259	BHT	220	97	15.0	3.34
20	41.968	2,5-cyclohexadiene-1,4-dione	220	87	8.6	1.91
21	42.433	phenol	206	94	75.7	16.84
22	42.654	ar-curcumene	202	98	12.4	2.76
23	43.201	α -zingiberene	204	99	8.3	1.85
24	43.956	phenol	206	95	15.3	3.40
25	46.573	hexadecane	226	93	3.6	0.80
26	51.006	octadecane	254	92	8.6	1.91
27	51.468	octadecane	254	95	9.8	2.18

Table 26. Identification of volatile componets in *Astragalus membranaceus* Bunge.(황기)

peak No.	R.T.	Component	MW	Quality	raw area ($\times 10^6$)	% of total
1	3.765	ethanol	46	83	114.5	59.11
2	4.567	hexane	86	80	33.8	17.45
3	6.218	pentanal	86	78	3.4	1.76
4	8.136	toluene	92	94	3.6	1.86
5	9.288	hexanal	100	90	16.8	8.67
6	11.846	ethylbenzene	106	94	3.2	1.65
7	12.218	p-xylene	106	95	2.6	1.34
8	20.333	limonene	136	97	3.2	1.65
9	33.658	bornyl acetate	196	90	3.6	1.86
10	37.797	α -ylangene	204	99	9.0	4.65

Table 27. Identification of volatile componets in *Angelica gigas* Nakai(당귀)

peak No.	R.T.	Component	MW	Quality	raw area ($\times 10^6$)	% of total
1	11.083	octane	128	83	38.4	1.26
2	11.316	cyclopentane	122	76	20.6	0.68
3	14.307	cyclohexene	136	96	88.0	2.88
4	14.929	camphene	136	98	154.2	5.05
5	15.996	1,3,3-methyl-4-methylidene-1-cyclohex	136	87	67.7	2.22
6	16.159	sabinene	136	96	10.8	0.35
7	16.286	1- β -pinene	136	97	49.8	1.63
8	17.057	myrcene	136	97	43.8	1.44
9	17.665	α -phellandrene	136	95	4.9	0.16
10	17.955	β -3-carene	136	97	15.1	0.50
11	18.676	benzene	134	95	10.2	0.34
12	18.902	limonene	136	99	105.3	3.45
13	19.376	α -pinene	136	91	3.7	0.12
14	19.885	1,3,7-octatriene	136	95	5.2	0.17
15	20.670	decane	156	96	4.6	0.15
16	21.857	α -terpinolene	136	98	5.6	0.18
17	21.942	cyclopentene	108	80	5.1	0.17
18	22.515	linalool	154	97	33.1	1.08
19	23.250	hexanoic acid	172	78	18.1	0.59
20	23.597	2-cyclohexen-1-ol	154	97	86.5	2.84
21	23.731	α -campholene aldehyde	152	78	18.2	0.60
22	24.487	1-terpineol	154	98	95.9	3.14
23	24.770	1- β -4,4-trimethyl-bicycl(3,2p)hept	152	72	112.4	3.68
24	24.940	hexanoic acid	172	72	26.9	0.88
25	25.937	bicyclo(3,1,0)hexane	122	76	6.6	0.22
26	26.269	terpineol-4	154	94	6.6	0.22
27	26.545	p-cymen-8-ol	150	93	29.9	0.98
28	26.714	p-cymen-8-ol	150	91	58.0	1.90
29	26.884	cis-myrtanol	154	83	4.3	0.14
30	26.955	linalyl propionate	210	91	4.2	0.14
31	28.291	trans-carveol	152	98	31.6	1.04
32	28.708	6-octen-1-ol	156	98	54.3	1.78
33	29.076	cyclopentane	112	90	6.9	0.23
34	29.733	hexanoic acid	186	72	11.2	0.37
35	30.200	myrtanol	154	86	11.4	0.37

Table 27. Continued

peak No.	R.T.	Component	MW	Quality	raw area ($\times 10^6$)	% of total
36	30.546	2,5-dimethyl-3-vinyl-hexa-1,4-diene	136	70	9.2	0.30
37	31.480	β -myrcene	136	70	4.3	0.14
38	31.557	5-ethyl-4,6-dimethyl-2-methoxypyrimidine	166	83	13.5	0.44
39	32.201	phenol	150	87	4.2	0.14
40	32.611	4-vinyl-2-methoxy-phenol	150	90	13.5	0.44
41	33.283	tricyclo[4,4,0,0(3,9)]dec-4-ene	134	70	4.2	0.14
42	33.827	benzoic acid	151	84	5.8	0.19
43	33.961	2-methylpropyl octanoate	200	91	4.6	0.15
44	34.251	acetic acid	280	78	3.8	0.13
45	34.866	1,2,4-metheno-1H-indene	204	96	5.8	0.19
46	34.951	1,2,4-metheno-1H-indene	204	98	4.3	0.14
47	35.630	bicyclo(3.1.1)heptane-2-methanol	196	90	30.2	0.99
48	36.966	Ψ -muurolene	204	95	11.3	0.37
49	37.171	β -caryophyllene	204	98	6.6	0.22
50	37.652	widdrene	204	98	12.4	0.41
51	38.380	α -elemene	204	96	4.4	0.15
52	38.599	trans- β -farnesene	204	94	17.2	0.56
53	39.327	cyclododecane	168	95	5.8	0.19
54	39.532	1-pentadecene	210	89	12.4	0.41
55	39.716	germacrene-D	204	99	3.8	0.12
56	40.345	bicyclogermacrene	204	98	12.4	0.41
57	40.487	α -muurolene	204	99	50.2	1.64
58	40.699	E,E- α -farnesene	204	92	34.5	1.13
59	40.925	phenol	220	98	8.7	0.28
60	41.378	ξ -cadinene	204	99	8.1	0.27
61	41.625	bicyclo(6.1.0)nonane	164	76	36.7	1.20
62	42.021	ξ -guaiene	204	70	3.6	0.12
63	42.474	hedycaryol	222	91	92.4	3.03
64	42.763	germacrens	204	97	5.4	0.18
65	42.912	farnesol	222	91	9.0	0.29
66	43.612	spathulenol	220	93	41.8	1.37
67	43.803	bicyclo(4.1.0)heptane	136	89	5.1	0.17
68	44.361	guaiol	222	95	33.1	1.09
69	45.280	10-epi- Ψ -eudesmol	222	99	261.5	8.57
70	45.563	cis- Ψ -bisabolene	204	91	47.4	1.55
71	45.669	β -maaliene	204	96	57.5	1.89

Table 27. Continued

peak No.	R.T.	Component	MW	Quality	raw area ($\times 10^6$)	% of total
72	45.945	agaruspirol	222	98	11.8	0.39
73	46.157	aristolen	204	89	68.1	2.23
74	46.461	β -eudesmol	222	98	379.9	12.45
75	46.546	α -eudesmol	222	99	192.6	6.31
76	46.701	7-epi-d-selinene	204	95	58.6	1.92
77	46.984	trans- Ψ -bisabolene	204	92	47.4	1.55
78	47.126	1-hexadecanol	242	94	63.1	2.07
79	47.585	aromadendrene	204	83	15.6	0.51
80	49.169	cyclopentadecanone	240	87	41.3	1.35
81	50.710	1-tridecene	182	96	4.2	0.14
82	50.915	9,12-octadecadienoic acid	280	95	7.6	0.25
83	52.895	cyclotetradecane	196	93	6.3	0.21
84	53.467	1,13-tetradecadiene	194	81	3.9	0.13
85	54.139	cyclotetradecane	196	96	17.3	0.57

Table 28. Identification of volatile componets in *Atractylodes japonica*
Koidzumi(백출)

peak No.	R.T.	Component	MW	Quality	raw area ($\times 10^6$)	% of total
1	11.597	isovaleric acid	102	83	81.5	0.83
2	14.128	α -pipene	136	97	6.9	0.07
3	17.486	hexanoic acid	116	86	9.0	0.09
4	20.632	phenol	108	97	3.5	0.04
5	21.954	heptanoic acid	130	83	5.1	0.05
6	23.531	2-cyclohexen-1-ol	154	97	3.9	0.04
7	24.429	1-terpineol	154	96	5.0	0.05
8	26.231	terpinene-4-ol	154	83	3.5	0.03
9	26.507	caprylic acid	144	72	6.2	0.06
10	26.656	p-cymen-8-ol	150	95	15.8	0.16
11	27.193	myrtenol	152	95	5.7	0.06
12	27.440	sabinol	132	80	12.5	0.13
13	27.744	3,5-dimethyl-4-ethylidene-cyclohex-2-ene	150	89	4.9	0.05
14	28.664	4-(2,2,6-trimethylcyclohexyl)-2-butanol	198	91	3.8	0.04
15	29.993	9-decen-1-ol	156	72	7.1	0.07
16	31.781	thymol	150	95	9.6	0.10
17	32.206	carvacrol	150	95	11.2	0.11
18	32.602	4-vinyl-2-methoxy-phenol	150	94	6.3	0.06
19	32.920	2,6-octadienoic acid	182	97	5.4	0.05
20	33.259	camphene	136	70	105.7	1.07
21	33.379	aristolene	204	91	6.7	0.07
22	33.895	β -caryophyllene	204	81	37.0	0.37
23	35.281	α -longipinene	204	90	10.2	0.10
24	35.493	[E]-4-[2',4',4'-trimethylbicyclo(4.1.0)h	204	91	40.7	0.41
25	35.797	berkheyaradulene	204	94	60.8	0.62
26	35.967	β -elemene	204	98	4.7	0.05
27	36.334	cyperene	204	95	10.5	0.11
28	36.646	[1. α ,4. α ,4a. β ,5. α ,8a	204	78	66.4	0.67
29	37.176	β -caryophyllene	204	99	125.0	1.27
30	37.699	ψ -elemene	204	99	18.2	0.18
31	38.597	β -selinene	204	98	71.4	0.72
32	38.972	(4aS,8aR)-3,4,4a,5,6,7,8,8a-octahydro-8a	178	91	22.3	0.23
33	39.353	cyclodecane	154	92	23.8	0.24

Table 28. Continued

peak No.	R.T.	Component	MW	Quality	raw area ($\times 10^6$)	% of total
34	39.459	β -selinene	204	98	25.4	0.26
35	39.601	Ψ -curcumene	204	97	8.2	0.08
36	39.799	1-[2-hydroxy-4-methyl-5-(1-methylethyl)p	192	83	194.7	1.97
37	39.997	β -selinene	204	99	248.1	2.51
38	40.322	aromadendrene	204	90	20.3	0.21
39	40.760	aromadendrene	204	93	22.2	0.23
40	40.937	butyl hydroxy toluene	220	97	58.6	0.59
41	41.199	2,10,10-trimethyl-4-hydroxy-1,11-didehyd	206	72	29.1	0.29
42	41.312	aromadendrene	204	95	17.7	0.18
43	41.411	β -sesquiphellandrene	204	93	46.4	0.47
44	41.736	Ψ -elemene	204	90	22.3	0.23
45	41.969	isolekene	204	92	382.0	3.87
46	42.153	selina-3,7(11)-diene	204	93	47.4	0.48
47	42.309	trans-6,11-dimethyl-3,8-oxomethano-bicycl	202	90	75.3	0.76
48	42.867	germacrene B	204	99	425.0	4.30
49	42.980	α -nerolidol	222	91	200.9	2.03
50	43.093	1H-cyclopropa(a)naphthalene	202	98	111.7	1.13
51	43.334	caryophylla-3,8(13)-dien-5 β -ol	220	90	25.7	0.26
52	43.850	caryophyllene oxide	220	99	233.3	2.36
53	44.005	1-methoxy-2-tert-butyl-6-methylbenzene	178	90	88.6	0.90
54	44.408	valerenol	220	84	59.0	0.60
55	44.585	(4R,4aS,6s)-6-isopropenyl-4,4a-dimethyl	218	78	23.4	0.24
56	44.988	4-isopropyl-trans-bicyclo(4.3.0)-2-nonen	178	78	64.0	0.65
57	45.193	clovene	204	95	130.0	1.32
58	45.667	1a,7b-dihydroazirine (5,6) benzo (1,2-c,3,4	205	72	412.3	4.17
59	45.844	eremophilene	204	93	45.9	0.46
60	46.049	caryophyllenol-II	220	78	18.2	0.18
61	47.031	2,7-dimethoxy-3,6-dimethylnaphthalene	216	83	2966.9	30.03
62	47.201	α -eudesmol	222	74	525.4	5.32
63	47.371	valeranone	222	95	53.4	0.54

Table 28. Continued

peak No.	R.T.	Component	MW	Quality	raw area ($\times 10^6$)	% of total
64	48.127	4,5-dimethyl-11-methyltricyclo(7,2,1	204	83	86.6	0.88
65	49.082	sesquiterpenediol	238	83	271.3	2.75
66	49.668	3,6,9-trimethyl-1,6-epoxymethabicyclo(6,	218	90	15.9	0.16
67	50.588	3-hydroxy-2-(cyclohex-1'eny1)-5-5-dimet	220	90	131.3	1.33
68	50.701	α-(5-methoxy-3,4-dihydro-2H-pyran-	220	90	106.4	1.08
69	51.075	linoleic acid	280	89	21.8	0.22
70	51.450	linoleic acid	280	87	51.3	0.52
71	51.818	trans-6,11-dimethyl-3,8-oxomethano-bicyc	202	90	240.8	2.44
72	52.030	9,12-octadecadienoic acid	280	94	110.3	1.12
73	52.277	9,12-octadecadienoic acid	280	96	178.4	1.81
74	52.553	linoleic acid	280	97	234.6	2.37
75	52.779	(Z)6,(Z)9-pentadecadien-1-ol	224	86	157.6	1.60
76	53.147	hexanoic acid	370	87	193.2	1.96
77	53.423	di(2-ethylhexyl)adipate	370	87	311.7	3.16
78	54.391	octadecanoic acid	284	99	40.3	0.41
79	55.569	4,4-dimethyl-3-methylenebicyclo(3,2,1)oc	202	90	47.7	0.48
80	56.993	hexadecanoic acid	256	99	62.7	0.63
81	59.022	4H-furo(2,3-6)(1)benzopyran-4-on e,2,3-d	230	90	226.0	2.29

Table 29. Identification of volatile componets in *Maximowiczia chinensis*
 Repr.(오미자)

peak No.	R.T.	Component	MW	Quality	raw area ($\times 10^6$)	% of total
1	14.127	α -pinene	136	96	13.5	0.25
2	14.826	camphene	136	97	11.6	0.22
3	16.205	β -pinene	136	94	4.7	0.09
4	16.983	myrcene	136	95	6.8	0.12
5	17.457	hexanoic acid	116	86	17.5	0.32
6	18.213	α -terpinene	136	98	4.7	0.09
7	18.609	benzene	134	91	11.6	0.22
8	18.828	limonene	136	97	5.8	0.11
9	18.969	1,8-cineoie	154	97	3.8	0.07
10	20.341	γ -terpinene	136	97	14.7	0.27
11	21.812	α -terpinolene	136	95	6.3	0.12
12	25.707	borneoll	154	94	12.9	0.24
13	26.230	terpine-4-ol	154	96	33.8	0.63
14	26.648	para-cymen-8-ol	150	91	8.9	0.17
15	26.902	α -terpineol	154	91	31.1	0.58
16	28.655	citronellol	156	98	20.6	0.38
17	28.867	2-isopropyl-5-methy-1-methoxybenzene	164	93	12.6	0.23
18	31.257	bornyl acetate	196	98	35.2	0.65
19	31.462	thymol	150	93	2.3	0.04
20	31.568	2-undecanone	170	76	7.7	0.14
21	31.738	thymol	150	95	11.2	0.21
22	32.162	phenol	150	95	11.8	0.22
23	34.071	camphene	136	94	10.9	0.20
24	34.184	citronellyl acetate	198	91	21.8	0.40
25	35.075	α -ylangene	204	99	56.7	1.05
26	35.266	α -copaene	204	99	15.2	0.28
27	35.662	β -bourbonene	204	98	23.9	0.44
28	35.959	β -elemene	204	99	70.4	1.30
29	36.404	dihydro-cis- α -copaene-8-ol	222	89	3.2	0.06
30	37.132	aromadendrene	204	90	37.8	0.70
31	38.165	sinularene	204	86	13.4	0.25
32	38.999	aromadendrene	204	92	16.8	0.31
33	39.451	di-(2-ethylhexyl)ester of adipic acid	370	80	121.8	2.25
34	36.699	di-(2-ethylhexyl)ester of adipic acid	370	86	85.4	1.58
35	39.798	di-(2-ethylhexyl)ester of adipic acid	370	80	24.1	0.45

Table 29. Continued

peak No.	R.T.	Component	MW	Quality	raw area ($\times 10^6$)	% of total
36	39.939	2,5-furandione	266	84	175.1	3.24
37	40.476	nonadecane	268	91	98.3	1.82
38	40.710	7,9-di-tert-butyl-1-oxaspiro (4,5)deca-6,	276	93	121.6	2.25
39	41.367	1,2-benzenedicarboxylic acid	278	91	87.3	1.61
40	41.473	hexadecanoic acid	256	99	23.7	0.44
41	41.601	Ψ -selinene	204	96	35.8	0.66
42	41.735	germacrene-D	204	95	24.7	0.46
43	41.933	alloaromadendrene	204	83	31.0	0.57
44	42.428	β -selinene	204	99	38.3	0.71
45	42.916	β -himachalene	204	91	237.8	4.40
46	43.594	1,2,2-trimethyl-1-(p-tolyl)- cyclopentane	202	90	150.4	2.78
47	44.174	ξ -cadinene	204	95	112.9	2.09
48	45.150	1,2,4-metheno-1H-indene	204	86	78.5	1.45
49	46.620	acoradrene	204	89	1509.3	27.93
50	47.858	1H-3a,7-methanoazulene	204	89	107.4	1.99
51	48.063	valencene	204	90	156.3	2.89
52	49.088	patchoulene	204	87	92.7	1.71
53	50.325	nerolidol	222	91	120.9	2.24
54	52.927	spathulenol	220	74	425.4	7.87
55	53.181	salvial-4(14)-en-1-one	220	72	466.5	8.63
56	53.499	β -guaiene	204	90	125.1	2.31
57	54.072	valencene	204	89	34.0	0.63
58	54.433	tricyclo[4,2,2,0(1,5)]decan- 2-one	150	76	5.0	0.09
59	55.493	β -selinene	204	95	8.7	0.16
60	56.829	valerenol	220	86	114.0	2.11
61	57.041	tetradecanoic acid	228	95	232.3	4.30

Table 30. Identification of volatile componets in *Panax ginseng* Meyer(인삼)

peak No.	R.T.	Component	MW	Quality	raw area ($\times 10^6$)	% of total
1	14.191	α -pinene	136	96	4.9	0.39
2	16.262	2- β -pinene	136	97	7.6	0.60
3	18.878	β -phellandrene	136	83	2.7	0.22
4	30.968	decane	184	72	7.2	0.57
5	33.025	heneicosane	296	80	3.5	0.28
6	34.107	1,4-dihydro-3,5-dimethoxy- 2-methylnaphth	204	83	3.7	0.30
7	35.521	valencene	204	90	16.0	1.27
8	35.719	benzene	162	81	5.0	0.39
9	35.988	β -elemene	204	95	5.9	0.47
10	36.200	tetradecane	198	96	3.6	0.29
11	37.154	trans-caryophyllene	204	90	8.2	0.66
12	37.713	calarene	204	97	17.0	1.35
13	37.826	calarene	204	74	2.7	0.21
14	38.003	aromadendrene	204	99	2.9	0.23
15	38.406	octadecane	254	70	2.6	0.21
16	38.519	α -neoclovene	204	99	18.3	1.46
17	38.603	α -humulene	204	94	35.6	2.83
18	38.766	(12R,4R,4aR,7bS)- 1a,2,3,4,4a,5,6,7b-octa	204	98	24.2	1.92
19	38.900	aromadendrene	204	99	6.7	0.53
20	39.211	trans- β -farnesene	204	93	11.7	0.93
21	39.318	2,6-di(t-butyl)-4-hydroxy- 4-methy-2,5-c	236	97	11.9	0.95
22	39.473	β -selinene	204	98	4.0	0.32
23	39.947	aromadendrene	204	90	7.2	0.57
24	40.166	tricosane	324	90	10.6	0.84
25	40.371	bicyclogermacrene	204	98	62.0	4.93
26	40.724	β -elemene	204	93	60.7	4.83
27	40.922	phenol	220	98	24.4	1.94
28	41.007	phenol	206	95	22.9	1.82
29	41.389	ξ -cadinene	204	99	4.0	0.32
30	41.948	triacontane	422	90	5.9	0.47
31	42.916	nerolidol	222	91	6.8	0.54
32	43.178	globulol	222	89	6.1	0.49
33	43.326	cis-2-nonadecene	266	90	3.6	0.28
34	43.630	spathulenol	220	94	104.0	8.27
35	43.864	globulol	222	99	18.8	1.49

Table 30. Continued

peak No.	R.T.	Component	MW	Quality	raw area ($\times 10^6$)	% of total
36	44.175	viridiflorol	222	96	12.9	1.02
37	44.585	1H-cyclopro(e)azulen-4-ol	222	89	11.7	0.93
38	45.893	isopathulenol	220	99	21.4	1.70
39	46.359	β -eudesmol	222	95	15.2	1.21
40	46.487	calarens	204	81	18.8	1.49
41	47.971	10-methylnonadecane	282	87	6.3	0.50
42	48.664	phenol	220	97	10.5	0.84
43	48.940	octylphenol isomer	206	72	4.7	0.37
44	49.993	phenol	206	78	5.2	0.41
45	50.227	tetradecanoic acid	228	99	9.0	0.72
46	53.493	hexanedioic acid	370	91	533.4	42.41
47	55.536	7,9-di-tert-butyl-1-oxaspiro(4,5)deca-6,	276	91	7.1	0.57
48	56.978	hexanedioic acid	256	99	58.5	4.65

Table 31. Identification of volatile componets in *Artemisia capillaris*(인진쑈)

peak No.	R.T.	Component	MW	Quality	raw area ($\times 10^6$)	% of total
1	4.819	chloroform	118	91	37.6	0.50
2	5.335	butanal	86	72	2.5	0.03
3	8.123	bicyclo-(2,2,1)-heptadiene-(2,5)	92	91	3.9	0.05
4	9.265	hexanal	100	86	14.0	0.19
5	11.570	1-octene	126	83	25.3	0.34
6	13.227	styrene	104	95	7.0	0.09
7	13.721	spiro(2,4)heptane	108	72	3.8	0.05
8	14.412	trans,cis-2-methyl-1,3-cyclooctadiene	122	70	10.4	0.14
9	14.753	tricyclene	136	96	138.7	1.86
10	15.027	bicyclo(3,1,0)hexane	136	93	6.6	0.09
11	15.367	α -pipene	136	97	81.1	1.09
12	16.202	camphene	136	98	1025.0	13.75
13	16.410	verbenene	134	91	12.0	0.16
14	17.420	sabinene	136	97	4.1	0.05
15	17.574	I-beta-pinene	136	97	50.9	0.68
16	17.826	1-octen-3-ol	128	90	19.7	0.26
17	18.024	1-octen-3-ol	128	90	51.0	0.68
18	18.364	myrcene	136	96	88.7	1.19
19	18.891	3-octanol	130	90	4.8	0.06
20	19.033	α -phellandrene	136	95	5.4	0.07
21	19.714	α -terpinene	136	97	3.7	0.05
22	20.142	para-cymene	134	95	207.7	2.79
23	20.318	para-cymene	134	95	150.7	2.02
24	20.789	1,8-cineole	154	98	3047.7	40.88
25	21.953	Ψ -terpinene	136	97	4.6	0.06
26	22.502	Ψ -terpinene	136	97	12.9	0.17
27	24.214	Ψ -terpinene	136	96	9.7	0.13
28	24.543	β -thujone	152	98	337.6	4.53
29	24.774	1,3-octadiene	110	81	3.6	0.05
30	25.070	β -thujone	152	98	96.2	1.29
31	25.487	filifolone	122	80	36.3	0.49
32	26.190	nopinone	138	94	8.7	0.12
33	26.727	bicyclo(2,2,1)heptan-2-one,1,7,7-trimet	152	98	1542.2	20.68
34	27.254	thujyl alcohol	154	72	17.0	0.23

Table 31. Continued

peak No.	R.T.	Component	MW	Quality	raw area ($\times 10^6$)	% of total
35	27.375	bicyclo(3,1,1)heptan-3-one,2,6,6-trimet	152	83	12.2	0.16
36	27.474	pinocarvone	150	83	24.3	0.33
37	27.770	1-borneol	154	91	180.1	2.42
38	28.099	bicyclo(3,1,1)heptan-3-one,2,6,6-trimet	152	97	67.9	0.91
39	28.275	Ψ -terpinene	136	96	5.0	0.07
40	29.186	bicyclo(3,1,1)hept-2-ene-2-carboxaldehyd	150	98	8.8	0.12
41	29.823	Ψ -terpinene	136	93	3.0	0.04
42	29.922	chrysanthenone	150	91	3.2	0.04
43	30.800	isobornyl acetate	196	80	4.7	0.06
44	31.052	thymyl methyl ether	164	95	2.2	0.03
45	31.590	2-cyclohexen-1-one,2-methyl-5-(1-methyl	150	97	1.2	0.02
46	32.128	piperitone	152	96	6.3	0.08
47	33.653	bornyl acetate	196	98	16.3	0.22
48	36.551	α -selinene	204	83	3.0	0.04
49	36.716	α -cubebene	204	99	5.6	0.08
50	38.000	α -copaene	204	99	12.5	0.17
51	38.630	α -copaene	204	94	5.1	0.07
52	40.052	β -caryophyllene	204	99	21.3	0.29
53	41.589	α -humulene	204	97	1.2	0.02
54	42.774	germacrene-D	204	97	1.3	0.02

나. 생약재 추출물 및 증류물의 항산화 활성

생약재로부터 70% 알콜 및 열수 추출물 및 생약재 증류물에 대한 항산화 활성을 총 항산화 활성 및 수소이온라디칼 소거 활성을 측정하여 분석하였으며 그 결과는 table 32- table 33과 같다. 측정된 모든 생약재에서 항산화 활성이 있는 것으로 나타났으며 대부분 생약재 모두 농도 1% 이상에서 70% 이상의 비교적 높은 항산화 활성을 나타내었다. 부분적으로 물추출물의 경우 70% 알콜추출물과 비교하여 약간 높은 활성을 나타내었으며 이는 항산화 활성을 나타내는 많은 성분중에서 식물체에 많이 함유되어 있는 폴리페놀 화합물이 열수에 잘 용출되기 때문인 것으로 판단할 수 있다. 전체적으로 총항산화 활성의 경우 70% 알콜추출물의 경우 시료농도 1%에서 갈근, 천궁, 복분자의 경우 90% 이상의 활성을 나타내었으며 물추출물의 경우 숙지황, 진피, 천궁의 경우 시료농도 1%에서 높은 활성을 나타내었다. 수소이온라디칼 소거활성의 경우 70% 알콜추출물의 경우 시료농도 1%에서 두충, 복분자, 맥문동, 대추 등이 90% 에 가까운 소거활성을 나타내었으며 물추출물의 경우 동충하초, 구기자, 영지인삼 등이 시료농도 1%에서 높은 활성을 나타내었다. 그러나 생약재 증류물의 경우 증류물원액에 대한 $10\mu\text{g}$, $100\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도 수준에서 측정된 결과 총항산화 활성 및 수소이온라디칼 소거활성이 나타나지 않았다. 증류물에 대한 활성의 감소는 활성에 관여할 것으로 생각되는 다당, 단백질 및 폴리페놀화합물 등의 고분자 물질들이 증류물의 경우 현저히 감소하기 때문인 것으로 판단되었다. ,

Table. 32. Total antioxidant activity of medicinal herbs extract

Korean name	Concentration (%)	70% ethanol		Water	
		Total antioxidant activity(%)	Regression eq.	Total antioxidant activity(%)	Regression eq.
갈근	10	99.3		102.2	
	5	95.1	Y= 15.0Ln(x)+73.8	86.2	Y= 13.5Ln(x)+72.1
	1	88.4	R ² = 0.950	77.6	R ² = 0.944
	0.1	44.3	IC ₅₀ = 2.04	54.0	IC ₅₀ = 1.95
	0.01	-3.1		0.2	
감초	10	93.1		104.0	
	5	94.1	Y= 14.0Ln(x)+70.1	94.1	Y= 16.9Ln(x)+66.7
	1	79.3	R ² = 0.955	81.2	R ² = 0.913
	0.1	46	IC ₅₀ = 2.31	4.2	IC ₅₀ = 3.73
	0.01	-2.0		-0.3	
결명자	10	94.3		92.3	
	5	88.3	Y= 14.9Ln(x)+66.0	84.6	Y= 15.0Ln(x)+55.8
	1	86.0	R ² = 0.894	56.0	R ² = 0.938
	0.1	12.3	IC ₅₀ = 3.49	3	IC ₅₀ = 6.81
	0.01	3.2		-2.1	
계피	10	74.6		84.6	
	5	80.2	Y= 12.5Ln(x)+57.3	77.6	Y= 13.5Ln(x)+49.7
	1	77.0	R ² = 0.882	42.1	R ² = 0.943
	0.1	16.5	IC ₅₀ = 5.60	6.3	IC ₅₀ = 10.21
	0.01	1.3		-2.6	
구기자	10	99.3		100.1	
	5	91.3	Y= 12.1Ln(x)+75.7	98.3	Y= 13.9Ln(x)+69.7
	1	83.5	R ² = 0.956	71.1	R ² = 0.956
	0.1	56.0	IC ₅₀ = 1.19	24.1	IC ₅₀ = 2.43
	0.01	12.5		13.6	
녹각	10	96.3		99.3	
	5	75.2	Y= 14.2Ln(x)+51.5	87.1	Y= 14.8Ln(x)+61.0
	1	34.0	R ² = 0.927	54.2	R ² = 0.985
	0.1	16.2	IC ₅₀ = 8.99	23.0	IC ₅₀ = 4.73
	0.01	-6.3		-2.3	
녹용	10	88.6		94.6	
	5	90.5	Y= 14.7Ln(x)+51.7	69.4	Y= 13.5Ln(x)+54.6
	1	36.1	R ² = 0.880	56.3	R ² = 0.950
	0.1	3.4	IC ₅₀ = 8.88	12.3	IC ₅₀ = 7.10
	0.01	-1.8		0.1	

¹⁾Total antioxidant activity of vitamin E was measured at 0.1mg/mL 96.29 ± 2.13

Table 32. Continued

Korean name	Concentration (%)	70% ethanol		Water	
		Total antioxidant activity(%)	Regression eq.	Total antioxidant activity(%)	Regression eq.
대추	10	103.6		99.6	
	5	89.3	Y= 15.1Ln(x)+67.1	90.2	Y= 15.9Ln(x)+65.5
	1	66.5	R ² = 0.998	78.1	R ² = 0.950
	0.1	33.1	IC ₅₀ = 3.23	13.6	IC ₅₀ = 3.78
	0.01	-3.2		-1.7	
동충하초	10	89.7		96.3	
	5	88.4	Y= 15.0Ln(x)+56.3	87.5	Y= 15.1Ln(x)+51.2
	1	56.1	R ² = 0.895	26.1	R ² = 0.851
	0.1	4.2	IC ₅₀ = 6.59	3.5	IC ₅₀ = 9.24
	0.01	-2.1		-2.6	
두충	10	99.3		94.6	
	5	90.2	Y= 14.2Ln(x)+71.0	73.6	Y= 12.9Ln(x)+50.8
	1	84.2	R ² = 0.938	30.21	R ² = 0.870
	0.1	35.1	IC ₅₀ = 2.26	14.0	IC ₅₀ = 9.42
	0.01	4.0		2.9	
백분동	10	91.2		93.1	
	5	83.2	Y= 14.2Ln(x)+57.1	80.6	Y= 14.2Ln(x)+62.3
	1	53.0	R ² = 0.982	74.3	R ² = 0.971
	0.1	19.1	IC ₅₀ = 6.05	24.1	IC ₅₀ = 4.21
	0.01	-3.2		-3.1	
복령	10	81.3		93.6	
	5	78.9	Y= 13.7Ln(x)+54.6	70.6	Y= 13.0Ln(x)+59.5
	1	69.0	R ² = 0.899	69.4	R ² = 0.955
	0.1	3.3	IC ₅₀ = 7.15	22.1	IC ₅₀ = 4.83
	0.01	-0.6		1.7	
백작약	10	99.6		101.2	
	5	85.3	Y= 12.2Ln(x)+76.5	91.2	Y= 13.2Ln(x)+74.8
	1	83.6	R ² = 0.751	75.0	R ² = 0.863
	0.1	79.0	IC ₅₀ = 1.13	69.0	IC ₅₀ = 1.53
	0.01	-1.2		-2.1	
복분자	10	107.6		112.0	
	5	99.6	Y= 14.4Ln(x)+80.9	94.1	Y= 14.3Ln(x)+78.4
	1	92.3	R ² = 0.952	87.3	R ² = 0.979
	0.1	56.3	IC ₅₀ = 1.16	46.0	IC ₅₀ = 1.37
	0.01	5.9		10.2	

Table 32. Continued

Korean name	Concentration (%)	70% ethanol		Water	
		Total antioxidant activity(%)	Regression eq.	Total antioxidant activity(%)	Regression eq.
산수유	10	89.0		96.3	
	5	86.3	$Y = 12.7\text{Ln}(x) + 59.5$	84.0	$Y = 14.1\text{Ln}(x) + 56.7$
	1	46.2	$R^2 = 0.947$	44.1	$R^2 = 0.944$
	0.1	39.0	$IC_{50} = 4.75$	16.2	$IC_{50} = 6.22$
	0.01	-1.2		0.9	
산약	10	96.2		98.1	
	5	61.1	$Y = 12.7\text{Ln}(x) + 48.8$	51.2	$Y = 13.0\text{Ln}(x) + 46.5$
	1	38.2	$R^2 = 0.875$	43.2	$R^2 = 0.835$
	0.1	9.0	$IC_{50} = 11.0$	2.2	$IC_{50} = 13.1$
	0.01	1.8		-1.3	
생강	10	97.1		99.5	
	5	90.0	$Y = 13.6\text{Ln}(x) + 68.1$	91.2	$Y = 14.8\text{Ln}(x) + 67.5$
	1	73.2	$R^2 = 0.993$	74.2	$R^2 = 0.985$
	0.1	33.3	$IC_{50} = 2.65$	26.3	$IC_{50} = 3.06$
	0.01	6.1		2.0	
숙지황	10	99.8		96.4	
	5	92.6	$Y = 14.8\text{Ln}(x) + 71.7$	90.3	$Y = 13.5\text{Ln}(x) + 73.3$
	1	86.3	$R^2 = 0.963$	89.6	$R^2 = 0.932$
	0.1	34.2	$IC_{50} = 2.31$	46.5	$IC_{50} = 1.77$
	0.01	1.2		3.6	
영지	10	94.6		94.6	
	5	95.3	$Y = 13.3\text{Ln}(x) + 76.4$	93.2	$Y = 11.6\text{Ln}(x) + 78.8$
	1	88.7	$R^2 = 0.854$	88.4	$R^2 = 0.780$
	0.1	65.4	$IC_{50} = 1.38$	77.2	$IC_{50} = 0.83$
	0.01	-2.0		5.9	
가시오가피	10	93.1		92.4	
	5	91.4	$Y = 14.5\text{Ln}(x) + 70.0$	91.2	$Y = 14.0\text{Ln}(x) + 69.1$
	1	90.2	$R^2 = 0.923$	80.1	$R^2 = 0.967$
	0.1	29.4	$IC_{50} = 2.59$	39.4	$IC_{50} = 2.55$
	0.01	0.6		-0.7	
진피	10	109.6		106.3	
	5	100.5	$Y = 16.5\text{Ln}(x) + 76.3$	100.1	$Y = 17.1\text{Ln}(x) + 73.4$
	1	89.4	$R^2 = 0.973$	89.6	$R^2 = 0.958$
	0.1	31.7	$IC_{50} = 2.03$	23.4	$IC_{50} = 2.54$
	0.01	0.8		-3.4	

Table 32. Continued

Korean name	Concentration (%)	70% ethanol		Water	
		Total antioxidant activity(%)	Regression eq.	Total antioxidant activity(%)	Regression eq.
토사자	10	93.0		92.7	
	5	83.2	$Y = 14.5\text{Ln}(x) + 56.2$	89.3	$Y = 14.6\text{Ln}(x) + 64.1$
	1	51.0	$R^2 = 0.972$	72.1	$R^2 = 0.982$
	0.1	13.5	$IC_{50} = 6.51$	25.0	$IC_{50} = 3.81$
	0.01	-3.1		-2.4	
천궁	10	100.3		99.6	
	5	99.7	$Y = 15.4\text{Ln}(x) + 75.4$	89.4	$Y = 14.0\text{Ln}(x) + 48.0$
	1	90.4	$R^2 = 0.950$	88.4	$R^2 = 0.902$
	0.1	43.6	$IC_{50} = 1.92$	46.3	$IC_{50} = 11.6$
	0.01	-3.0		0.8	
하수오	10	94.1		98.4	
	5	59.3	$Y = 12.4\text{Ln}(x) + 52.3$	77.6	$Y = 14.8\text{Ln}(x) + 52.9$
	1	51.0	$R^2 = 0.936$	42.8	$R^2 = 0.917$
	0.1	24.1	$IC_{50} = 8.32$	4.0	$IC_{50} = 8.23$
	0.01	-5.1		-6.1	
황기	10	97.0		94.3	
	5	93.5	$Y = 14.1\text{Ln}(x) + 68.6$	84.0	$Y = 13.3\text{Ln}(x) + 60.5$
	1	78.1	$R^2 = 0.953$	51.1	$R^2 = 0.979$
	0.1	23.0	$IC_{50} = 2.66$	36.9	$IC_{50} = 4.54$
	0.01	9.3		-0.7	
당귀	10	112.6		102.9	
	5	89.6	$Y = 15.2\text{Ln}(x) + 74.3$	97.8	$Y = 14.2\text{Ln}(x) + 78.4$
	1	79.6	$R^2 = 0.978$	90.2	$R^2 = 0.937$
	0.1	44.5	$IC_{50} = 2.01$	56.3	$IC_{50} = 1.35$
	0.01	0.1		2.3	
백출	10	96.3		99.7	
	5	90.5	$Y = 13.9\text{Ln}(x) + 61.6$	83.9	$Y = 14.1\text{Ln}(x) + 61.1$
	1	51.4	$R^2 = 0.967$	54.0	$R^2 = 0.979$
	0.1	24.6	$IC_{50} = 4.34$	24.1	$IC_{50} = 4.57$
	0.01	3.4		1.3	
오미자	10	100.5		98.0	
	5	92.7	$Y = 14.9\text{Ln}(x) + 68.5$	91.3	$Y = 13.9\text{Ln}(x) + 69.4$
	1	76.3	$R^2 = 0.978$	76.2	$R^2 = 0.990$
	0.1	25.1	$IC_{50} = 2.90$	35.8	$IC_{50} = 2.47$
	0.01	3.0		5.0	

Table 32. Continued

Korean name	Concentration (%)	70% ethanol		Water	
		Total antioxidant activity(%)	Regression eq.	Total antioxidant activity(%)	Regression eq.
인삼	10	91.5		94.2	
	5	77.1	$Y = 13.0\text{Ln}(x) + 64.0$	90.1	$Y = 12.4\text{Ln}(x) + 74.6$
	1	80.4	$R^2 = 0.939$	88.6	$R^2 = 0.909$
	0.1	29.7	$IC_{50} = 3.41$	55.4	$IC_{50} = 1.38$
	0.01	2.4		6.7	
인진쑈	10	99.5		94.6	
	5	89.3	$Y = 12.9\text{Ln}(x) + 67.4$	91.3	$Y = 14.6\text{Ln}(x) + 70.3$
	1	64.1	$R^2 = 0.995$	87.6	$R^2 = 0.939$
	0.1	31.5	$IC_{50} = 2.57$	35.6	$IC_{50} = 2.50$
	0.01	10.3		-2.3	

Table. 33. Hydroxy radical scavenging activity of medicinal herbs extract

Korean name	Concentration (%)	70% ethanol		Water	
		Hydroxy radical scavenging activity(%)	Regression eq.	Hydroxy radical scavenging activity(%)	Regression eq.
갈근	10	98.7		92.7	
	5	89.4	Y= 15.0Ln(x)+67.0	88.9	Y= 14.5Ln(x)+56.8
	1	77.3	R ² = 0.977	46.5	R ² = 0.943
	0.1	25.1	IC ₅₀ = 3.21	12.4	IC ₅₀ = 6.25
	0.01	-0.3		0.2	
감초	10	88.5		89.2	
	5	70.1	Y= 13.2Ln(x)+59.2	90.6	Y= 11.3Ln(x)+70.7
	1	78.4	R ² = 0.915	74.1	R ² = 0.941
	0.1	21.5	IC ₅₀ = 4.99	55.6	IC ₅₀ = 1.59
	0.01	-2.1		10.3	
결명자	10	92.4		90.1	
	5	81.9	Y= 13.5Ln(x)+54.9	74.3	Y= 13.9Ln(x)+50.3
	1	43.7	R ² = 0.932	42.1	R ² = 0.942
	0.1	12.6	IC ₅₀ = 6.96	6.3	IC ₅₀ = 9.82
	0.01	3.4		-3.1	
계피	10	92.3		99.1	
	5	76.3	Y= 13.3Ln(x)+55.4	89.4	Y= 15.1Ln(x)+56.1
	1	52.4	R ² = 0.955	36.1	R ² = 0.908
	0.1	12.9	IC ₅₀ = 6.67	12.4	IC ₅₀ = 6.70
	0.01	3.2		-2.1	
구기자	10	99.2		96.3	
	5	90.7	Y= 15.6Ln(x)+67.0	78.1	Y= 14.0Ln(x)+67.4
	1	79.3	R ² = 0.970	88.6	R ² = 0.910
	0.1	22.4	IC ₅₀ = 3.36	34.7	IC ₅₀ = 2.87
	0.01	-3.3		-2.3	
녹각	10	88.6		89.4	
	5	91.4	Y= 14.0Ln(x)+61.8	90.7	Y= 15.4Ln(x)+63.7
	1	66.4	R ² = 0.957	87.4	R ² = 0.858
	0.1	17.4	IC ₅₀ = 4.29	4.7	IC ₅₀ = 4.10
	0.01	3.4		0.4	
녹용	10	91.4		89.7	
	5	69.4	Y= 11.4Ln(x)+61.1	91.7	Y= 14.4Ln(x)+52.3
	1	75.4	R ² = 0.891	27.4	R ² = 0.834
	0.1	21.5	IC ₅₀ = 3.80	3.6	IC ₅₀ = 9.16
	0.01	13.4		0.7	

Hydroxy radical scavenging activity of vitamin C and E was measured at 0.1mg/mL were 95.71 ± 3.11, 94.78 ± 3.09

Table 33. Continued

Korean name	Concentration (%)	70% ethanol		Water	
		Hydroxy radical scavenging activity(%)	Regression eq.	Hydroxy radical scavenging activity(%)	Regression eq.
대추	10	103.4		94.7	
	5	64.7	Y= 11.9Ln(x)+68.0	93.5	Y= 12.2Ln(x)+70.4
	1	88.6	R ² = 0.820	69.7	R ² = 0.992
	0.1	35.7	IC ₅₀ = 2.21	45.3	IC ₅₀ = 1.88
	0.01	11.7		12.1	
동충하초	10	89.3		95.5	
	5	88.4	Y= 14.7Ln(x)+62.6	89.4	Y= 14.9Ln(x)+69.0
	1	79.4	R ² = 0.913	91.4	R ² = 0.908
	0.1	11.4	IC ₅₀ = 4.24	22.2	IC ₅₀ = 2.80
	0.01	0.6		1.7	
두충	10	99.1		94.2	
	5	98.6	Y= 14.8Ln(x)+75.5	88.6	Y= 12.6Ln(x)+71.2
	1	90.6	R ² = 0.948	78.1	R ² = 0.938
	0.1	44.1	IC ₅₀ = 1.79	54.3	IC ₅₀ = 1.87
	0.01	0.6		2.9	
백분동	10	98.4		97.6	
	5	78.2	Y= 12.7Ln(x)+69.7	88.3	Y= 12.4Ln(x)+71.7
	1	88.9	R ² = 0.907	77.5	R ² = 0.978
	0.1	35.5	IC ₅₀ = 2.12	48.8	IC ₅₀ = 1.74
	0.01	9.4		6.1	
복령	10	90.3		88.4	
	5	88.4	Y= 14.3Ln(x)+57.5	90.4	Y= 13.8Ln(x)+55.5
	1	54.1	R ² = 0.946	42.0	R ² = 0.913
	0.1	10.4	IC ₅₀ = 5.89	12.4	IC ₅₀ = 6.73
	0.01	1.8		2.8	
백작약	10	90.1		92.3	
	5	78.6	Y= 12.3Ln(x)+58.2	91.4	Y= 14.0Ln(x)+63.0
	1	52.3	R ² = 0.989	63.8	R ² = 0.990
	0.1	28.9	IC ₅₀ = 5.13	28.1	IC ₅₀ = 3.96
	0.01	4.3		-0.6	
복분자	10	100.4		99.2	
	5	88.6	Y= 15.4Ln(x)+70.4	87.1	Y= 14.7Ln(x)+57.1
	1	94.1	R ² = 0.905	41.3	R ² = 0.923
	0.1	21.8	IC ₅₀ = 2.66	13.7	IC ₅₀ = 6.14
	0.01	0.3		0.8	

Table 33. Continued

Korean name	Concentration (%)	70% ethanol		Water	
		Hydroxy radical scavenging activity(%)	Regression eq.	Hydroxy radical scavenging activity(%)	Regression eq.
산수유	10	88.3		98.1	
	5	81.0	Y= 13.0Ln(x)+49.0	74.9	Y= 11.7Ln(x)+61.4
	1	23.2	R ² = 0.840	54.2	R ² = 0.961
	0.1	12.8	IC ₅₀ = 10.8	34.1	IC ₅₀ = 3.80
	0.01	0.7		10.3	
산약	10	93.2		88.6	
	5	88.3	Y= 11.9Ln(x)+71.7	84.3	Y= 14.3Ln(x)+61.8
	1	74.1	R ² = 0.878	79.3	R ² = 0.916
	0.1	64.3	IC ₅₀ = 1.62	13.4	IC ₅₀ = 4.37
	0.01	2.9		0.7	
생강	10	91.1		93.6	
	5	90.3	Y= 12.7Ln(x)+73.6	88.1	Y= 9.6Ln(x)+73.8
	1	88.4	R ² = 0.866	74.6	R ² = 0.968
	0.1	59.6	IC ₅₀ = 1.55	59.7	IC ₅₀ = 0.83
	0.01	0.7		24.2	
숙지황	10	94.1		91.4	
	5	90.3	Y= 13.9Ln(x)+68.1	90.7	Y= 13.3Ln(x)+68.5
	1	84.3	R ² = 0.921	77.9	R ² = 0.969
	0.1	21.4	IC ₅₀ = 2.72	40.8	IC ₅₀ = 2.49
	0.01	8.7		1.9	
영지	10	97.7		93.1	
	5	90.2	Y= 11.3Ln(x)+76.3	90.7	Y= 9.4Ln(x)+78.9
	1	79.3	R ² = 0.869	88.0	R ² = 0.866
	0.1	70.1	IC ₅₀ = 0.97	70.2	IC ₅₀ = 0.46
	0.01	10.6		24.3	
가시오가피	10	95.7		90.3	
	5	90.5	Y= 15.3Ln(x)+57.2	87.1	Y= 11.1Ln(x)+71.4
	1	46.3	R ² = 0.945	79.6	R ² = 0.937
	0.1	10.7	IC ₅₀ = 6.22	54.9	IC ₅₀ = 1.45
	0.01	-2.7		11.9	
진피	10	100.6		93.3	
	5	93.6	Y= 11.1Ln(x)+82.1	80.4	Y= 12.0Ln(x)+70.5
	1	89.1	R ² = 0.797	83.6	R ² = 0.878
	0.1	82.1	IC ₅₀ = 0.55	57.1	IC ₅₀ = 1.82
	0.01	13.6		2.1	

Table 33. Continued

Korean name	Concentration (%)	70% ethanol		Water	
		Hydroxy radical scavenging activity(%)	Regression eq.	Hydroxy radical scavenging activity(%)	Regression eq.
토사자	10	94.1		88.9	
	5	78.2	$Y = 11.1\text{Ln}(x) + 59.6$	78.3	$Y = 9.8\text{Ln}(x) + 55.5$
	1	36.4	$R^2 = 0.810$	23.6	$R^2 = 0.700$
	0.1	51.4	$IC_{50} = 4.19$	45.7	$IC_{50} = 5.71$
	0.01	4.9		11.6	
천궁	10	93.3		98.4	
	5	87.1	$Y = 8.8\text{Ln}(x) + 74.8$	79.6	$Y = 10.9\text{Ln}(x) + 72.9$
	1	72.2	$R^2 = 0.883$	80.4	$R^2 = 0.895$
	0.1	69.9	$IC_{50} = 0.60$	61.0	$IC_{50} = 1.23$
	0.01	25.1		12.4	
하수오	10	99.2		91.2	
	5	89.4	$Y = 13.0\text{Ln}(x) + 74.8$	89.6	$Y = 14.5\text{Ln}(x) + 54.5$
	1	79.6	$R^2 = 0.850$	41.3	$R^2 = 0.906$
	0.1	69.1	$IC_{50} = 1.48$	6.2	$IC_{50} = 7.33$
	0.01	-2.1		0.7	
황기	10	91.1		89.3	
	5	79.1	$Y = 12.8\text{Ln}(x) + 54.8$	79.4	$Y = 13.9\text{Ln}(x) + 54.7$
	1	41.2	$R^2 = 0.948$	54.9	$R^2 = 0.951$
	0.1	22.0	$IC_{50} = 6.90$	8.1	$IC_{50} = 7.11$
	0.01	1.9		0.4	
당귀	10	99.4		98.3	
	5	95.4	$Y = 12.4\text{Ln}(x) + 76.8$	90.2	$Y = 13.4\text{Ln}(x) + 72.0$
	1	78.1	$R^2 = 0.900$	86.4	$R^2 = 0.955$
	0.1	67.0	$IC_{50} = 1.16$	35.3	$IC_{50} = 1.95$
	0.01	6.7		9.4	
백출	10	94.1		96.1	
	5	88.3	$Y = 10.9\text{Ln}(x) + 72.9$	79.1	$Y = 11.5\text{Ln}(x) + 66.4$
	1	76.3	$R^2 = 0.945$	63.3	$R^2 = 0.945$
	0.1	58.9	$IC_{50} = 1.23$	52.1	$IC_{50} = 2.41$
	0.01	14.2		6.7	
오미자	10	91.4		98.6	
	5	90.2	$Y = 12.3\text{Ln}(x) + 70.0$	90.5	$Y = 11.3\text{Ln}(x) + 78.6$
	1	78.6	$R^2 = 0.970$	87.6	$R^2 = 0.864$
	0.1	44.4	$IC_{50} = 1.96$	69.9	$IC_{50} = 0.80$
	0.01	8.7		12.4	

Table 33. Continued

Korean name	Concentration (%)	70% ethanol		Water	
		Hydroxy radical scavenging activity(%)	Regression eq.	Hydroxy radical scavenging activity(%)	Regression eq.
인삼	10	88.6		95.5	
	5	80.4	$Y = 11.0\text{Ln}(x) + 68.6$	90.1	$Y = 7.2\text{Ln}(x) + 81.4$
	1	78.6	$R^2 = 0.902$	88.3	$R^2 = 0.958$
	0.1	55.5	$IC_{50} = 1.84$	66.4	$IC_{50} = 0.13$
	0.01	7.1		45.2	
인진쑥	10	97.8		99.3	
	5	90.1	$Y = 11.9\text{Ln}(x) + 73.6$	94.1	$Y = 14.5\text{Ln}(x) + 72.9$
	1	74.8	$R^2 = 0.932$	88.6	$R^2 = 0.864$
	0.1	61.0	$IC_{50} = 1.37$	35.6	$IC_{50} = 0.80$
	0.01	8.8		3.4	

다. 생약재의 추출조건 최적화 및 종양전이억제 활성

생약재 및 증류액에 대하여 Colon 26-M3.1 lung carcinoma 모델을 이용한 종양 전이 억제활성을 검색하였으며 추출조건의 최적화하였다.

1) 생약재의 용매추출물로부터 종양전이 억제활성 검색

30여종의 국내산 생약재를 계통 추출하였다. 즉 파쇄 시료의 경우에는 시료를 균질기로 파쇄한 후 냉수를 첨가하여 교반하고 원심분리로 상등액을 분리, 동결 건조하여 파쇄-냉수추출물 (Fr. I)으로 하였으며 미파쇄 시료의 경우에는 파쇄 없이 곧바로 냉수를 첨가한 후 교반, 원심분리하여 미파쇄-냉수추출물 (Fr. I')로 하였다. 각각의 파쇄 및 미파쇄에서 회수한 잔사는 헥산으로 환류추출 (5회)하여 헥산추출물 (Fr. II와 II')로 하였으며 헥산추출에 의해 분리된 잔사는 메탄올로 환류추출 (5회)하여 메탄올추출물 (Fr. III과 III')로 조제하였다. 또한 파쇄 및 미파쇄의 생약재에 물을 넣고 decoction (2회)하는 방법에 의해 열수로 추출하여 파쇄 및 미파쇄의 열수추출물 (Fr. IV와 IV')로 하였다. 이와 같이 조제된 시료를 이용하여 종양전이 억제활성을 검색한 결과, 파쇄 시료의 경우 미파쇄 시료보다 모든 생약재의 추출물에서 월등히 높은 것으로 나타나 이후 파쇄 시료만을 대상으로 활성의 검색을 진행하였다. 파쇄 시료의 결과를 살펴보면, table 34에서 나타낸 바와 같이 냉수추출물 (Fr. I)에서는 당귀, 백출, 영지, 가시오가피, 인삼, 인진쑥과 진피의 시료가, 열수추출 (Fr. IV)에서는 갈근, 감초, 당귀, 백출, 가시오가피와 인삼이 대조군 (종양함유군)에 비해 50 µg/mouse의 농도에서 50% 이상의 높은 억제활성을 나타내었다. 그러나 유기용매 희분인 메탄올추출물 (Fr. III)에서는 계피와 두충을 제외하고는 그다지 높은 활성을 보인 시료는 보이지 않았으며 가장 높은 활성을 보인 계피도 50 µg/mouse의 농도에서 대조군과 비교하여 38.9%의 종양전이 억제활성을 보여, 냉수나 열수로 추출한 시료와 비교할 때 활성에 있어 다소 차이를 보였으며 헥산추출물 (Fr. II)의 경우에는 세포독성이 심하였고 수율도 매우 낮아서 활성검색에 부적당하였다.

Table 34. Anti-metastasis effect of fractions obtained by Scheme 1 from herbal medicines.

Korean name	Scientific name	No of lung metastasis (Inhibition %) ¹⁾		
		Fr. I	Fr. III	Fr. IV
갈근	<i>Puerariae Radix</i>	37.5	10.2	58.1
감초	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	42.4	18.7	66.3
맥문동	<i>Liriopsis Tuber</i>	27.6	31.2	28.9
결명자	<i>Cassiae Semen</i>	31.4	17.5	37.4
계피	<i>Cinnamomi Cortex</i>	40.7	38.9	35.7
구기자	<i>Lycii Fructus</i>	40.1	21.4	20.7
녹각	<i>Cervus nippon</i>	39.5	10.4	33.7
녹용	<i>Cervs nippon</i>	31.4	19.3	40.3
당귀	<i>Angelicae sinensis Radix</i>	57.1	24.8	62.7
대추	<i>Zizyphi Fructus</i>	42.3	9.3	45.8
동충하초	<i>Cordyceps spp.</i>	38.3	9.9	39.6
두충	<i>Eucomiae Cortex</i>	33.4	35.6	21.9
백복령	<i>Hoelen</i>	45.9	27.9	35.5
백작약	<i>Paeoniae Radix alba</i>	32.6	33.3	27.8
백출	<i>Atractylodis Rhizoma alba</i>	53.6	28.7	71.8
백하수오	<i>Polygoni multiflori Radix alba</i>	46.3	20.9	31.6
복분자	<i>Rubi Fructus</i>	40.1	17.8	45.0
산수유	<i>Corni Fructus</i>	38.7	15.9	38.8
산약	<i>Dioscoreae Rhizoma</i>	42.4	27.8	24.7
생강	<i>Chrysanthemum motifolium</i>	40.4	28.5	22.9
숙지황	<i>Rehmaniae Radix Preparata</i>	22.3	19.9	25.6
영지	<i>Ganoderma lucidum</i>	62.9	30.5	48.9
가시오가피	<i>Acanthopanax Cortex</i>	60.9	28.9	75.6
오미자	<i>Schizandrae Fructus</i>	28.6	18.6	22.9
인삼	<i>Ginseng Radix</i>	52.9	30.9	70.5
인진	<i>Artemisiae iwayomogii Herba</i>	57.8	23.3	45.6
일천궁	<i>Cnidium officinale Makino</i>	32.3	22.0	28.0
진피	<i>Aurantii nobilis Pericarpium</i>	60.9	26.9	48.2
토사자	<i>Cuscutae Semen</i>	40.9	26.3	42.3
황기	<i>Astragali Radix</i>	34.6	11.4	40.9

¹⁾2 Balb/c mice per group were administered i.v. with each extract (50 µg/mouse) 2 days before i.v. inoculation of Colon 26-M3.1 lung carcinoma cells. Mice were killed 14 days after tumor inoculation for evaluation.

2) 파쇄한 각종 시료의 세포 내 수용성 물질의 종양전이 억제활성 검색

Table 34에서 보여주는 것처럼 물로 추출한 경우 (Fr. I과 IV)에는 대부분의 획

분이 대조군보다는 유의적으로 높은 억제활성을 갖는 결과를 보였는데 전반적으로는 열수추출물이 냉수추출물보다 유의적으로 대조군보다 높은 억제활성을 갖는 시료의 수가 많았으며 가장 Colon 26-M3.1 lung carcinoma 종양전이 모델에서 종양전이 억제활성이 가장 높은 시료는 가시오가피의 열수추출물이었으며 (75.6%) 그 다음이 백출 (71.8%), 인삼 (70.5%), 감초 (66.3%)와 당귀 (62.7%)의 열수추출물과 영지 (62.9%), 가시오가피와 진피 (60.9%) 및 인진 (57.8%) 냉수추출물로 종양전이 억제활성이 50% 이상을 보여주었다. 한편, 대부분의 시료에서 종양전이 억제활성의 활성성분은 냉수나 열수로 추출하는 것이 적합하며 유기용매에 의한 추출은 바람직하지 못한 것으로 나타났으며 또한 냉수나 열수의 추출조건이 다당이나 단백질 및 고분자류 (Fr. I과 IV)의 추출에 적합한 조건이기 때문에 Colon 26-M3.1 lung carcinoma의 종양전이 모델에서 종양전이 억제활성의 활성을 자극하는 것은 주로 이러한 고분자일 것으로 판단된다.

3) 파쇄한 각종 시료의 용매추출물로부터 종양전이 억제활성 검색

Table 34의 결과는 많은 시료에서 유기용매에 의한 추출물이 오히려 대조군보다 활성이 떨어지는 경향을 나타내었는데 메탄올추출물의 경우에는 30% 이상의 종양전이 억제활성의 결과를 보이는 시료가 계피 (38.9%), 두충 (35.6%), 백작약 (33.3%)과 맥문동 (31.2%) 등 4종류에 국한되어 냉수나 열수추출물의 대부분의 시료가 대조군보다 높은 억제활성을 갖는 것과는 많은 차이를 보이고 있었으며 헥산추출물은 심한 세포독성현상을 보였다. 즉 유기용매의 추출물은 종양전이 억제활성에 관련된 면역세포 등의 활성을 저해하거나 독성으로 작용하는 것으로 생각되었다. 즉 유기용매에 의해서 주로 추출되는 저분자류 (Fr. II와 III)는 오히려 활성을 저해하는 것으로 판단되었다.

4) 높은 종양전이 억제활성을 보인 생약재 증류액의 활성검색

전통 생약재 시료의 1차 활성검색에서 나타난 결과로부터 (Table 34) 50% 이상의 높은 억제활성을 나타내었던 시료 (감초, 당귀, 백출, 영지, 가시오가피, 인삼, 인진, 진피)에 대해 decoction을 실시하면서 감압농축 장치를 이용하여 증류시킨

증류액에 대하여 활성을 검토하였다. 그 결과 Fig. 5에서와 같이 생약재의 추출물 활성검색 시와 유사하게 백출, 감초, 인삼 및 가시오가피의 억제활성이 높게 나타났다. (각각 58.8%, 50.6%, 45.6%와 41.9%). 그러나 생약재의 추출물과는 달리 증류액의 억제활성은 생약재의 추출물과 비교할 때 억제활성이 현저히 저하되는 것을 알 수 있는데 이것은 실험실에서 감압농축 장치에 의해 증류액을 조제하는 방법에 다소 문제가 있는 것으로 생각되었다. 또한 추출물의 경우에는 앞에서 말한 바와 같이 주로 고분자들이 활성에 관여하는 것으로 나타났으나 증류의 경우에는 이러한 성분들이 많이 함유되지 못하는 것도 중요한 원인으로 생각되었다.

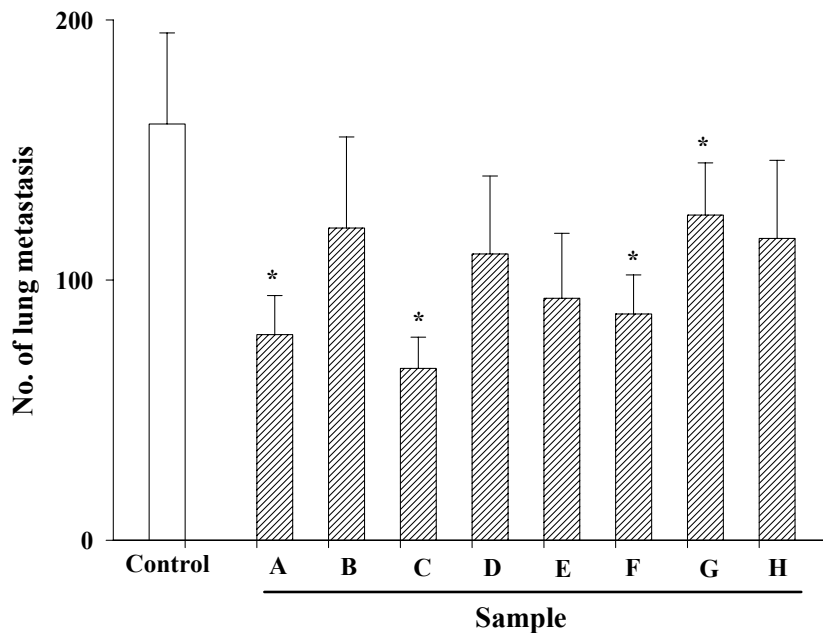


Fig. 5. Anti-metastasis effect of evaporating fractions obtained from herbal medicines. 2 Balb/c mice per group were administered i.v. with each evaporating fraction from herbal medicines (50 µg/mouse) 2 days before i.v. inoculation of Colon 26-M3.1 lung carcinoma cells. Mice were killed 14 days after tumor inoculation for evaluation. Control; tumor beared control. Each value was expressed as the mean±S.D. of quadruplicate assays, and *, $p < 0.05$: Significant difference between the control and sample. A, 감초; B, 당귀; C, 백출; D, 영지; E, 가시오가피; F, 인삼; G, 인진; H, 진피.

5) 생약재 추출물로부터 종양전이 억제활성 시료의 선정

전통 생약재 시료의 1차 활성검색에서 나타난 결과로부터 (Table 34) 높은 활성을 나타내었던 시료 (감초, 당귀, 백출, 영지, 가시오가피, 인삼, 인진, 진피)에 대해 Fig. 6과 Fig. 7에서와 같이 2차로 냉수추출과 열수추출로 나누어 활성을 재검토하였다. 그 결과 1차 활성검색 시와 마찬가지로 가시오가피의 활성이 냉수추출물과 열수추출물 모두에서 높게 나타났으나 열수추출물이 약간 더 높은 종양전이 억제활성을 보였으며, 이와 같은 종양전이 억제활성 검색의 결과에 따라서 수용계 획분 중에서 가장 높은 활성을 보인 가시오가피의 열수추출물을 Colon 26-M3.1 lung carcinoma 종양모델을 이용한 종양전이 억제활성 검색에 있어서의 시료로 선정하였다.

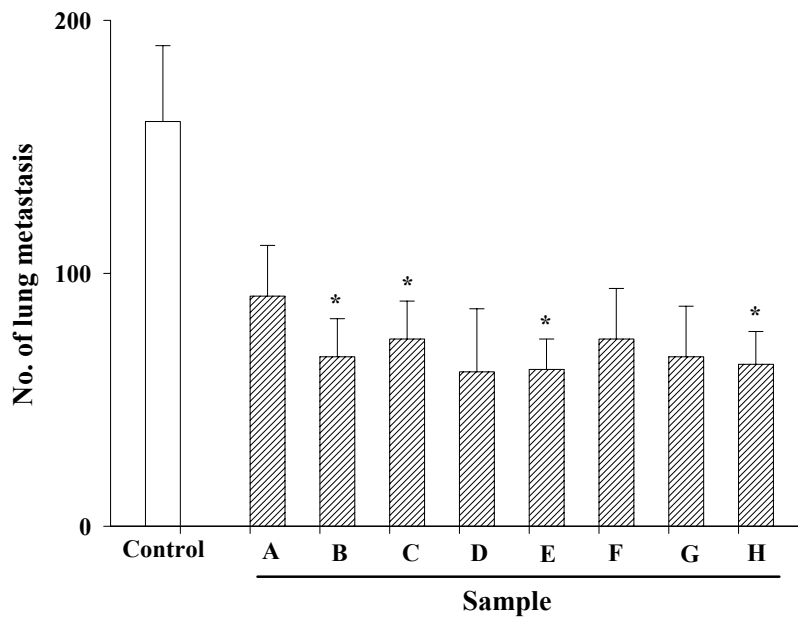


Fig. 6. Anti-metastasis effect of cold-water extracts obtained from herbal medicines. 2 Balb/c mice per group were administered i.v. with each evaporating fraction from herbal medicines (50 µg/mouse) 2 days before i.v. inoculation of Colon 26-M3.1 lung carcinoma cells. Mice were killed 14 days after tumor inoculation for evaluation. Control; tumor beared control. Each value was expressed as the mean±S.D. of quadruplicate assays, and *, p<0.05 : Significant difference between the control and sample. A, 감초; B, 당귀; C, 백출; D, 영지; E, 가시오가피; F, 인삼; G, 인진; H, 진피.

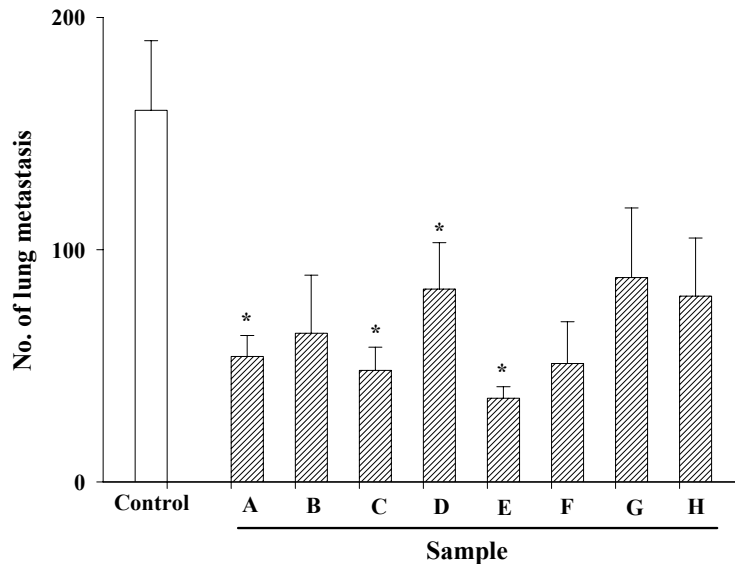


Fig. 7. Anti-metastasis effect of hot-water extracts obtained from herbal medicines. 2 Balb/c mice per group were administered i.v. with each evaporating fraction from herbal medicines (50 µg/mouse) 2 days before i.v. inoculation of Colon 26-M3.1 lung carcinoma cells. Mice were killed 14 days after tumor inoculation for evaluation. Control; tumor beared control. Each value was expressed as the mean±S.D. of quadruplicate assays, and *, $p < 0.05$: Significant difference between the control and sample. A, 감초; B, 당귀; C, 백출; D, 영지; E, 가시오가피; F, 인삼; G, 인진; H, 진피.

6) 최대활성 시료의 추출조건의 최적화

종양전이 억제활성의 시료로 선정된 가시오가피를 대상으로 열수추출물의 조제에 관한 추출조건을 검색하였다. 먼저 homogenizer에 의한 파쇄시간을 10분, 20분, 30분, 1시간으로 조정하여 열수추출물을 회수한 후 수율과 활성을 검토한 결과, 30분의 파쇄로 가시오가피에서 최적의 수율 (6.3%)과 대조군에 비해 78.2%의 종양전이 억제활성을 나타내었으며 1시간의 파쇄의 경우에는 30분의 파쇄와 수율과 활성에서 큰 차이를 보이지 않아 30분의 파쇄로도 충분히 시료의 조직들이 파괴되어 활성물질이 추출되어 나올 수 있는 것으로 생각되었다.(Table 35). 최적의 파쇄시간에 따른 결과를 토대로 30분을 homogenizer로 파쇄한 후 파쇄물을 1시간, 6시간, 12시간, 24시간 교반하여 원심분리로 상등액을 회수한 후 동결

건조하여 열수추출물을 조제했을 때의 수율과 활성을 검토하였다.

Table 35. Effect of homogenizing time during hot-water extracts preparation by Scheme 1 from Acanthopanax Cortex on anti-metastasis and from Aurantii nobilis Pericarpium on bone marrow cell proliferation activity.

	Homogenizing time				
	Control	10 min	20 min	30 min	1 hr
No of lung metastasis (Inhibition %)¹⁾	165±37 ²⁾	89±15 ^{*3)} (4.9%) ⁴⁾	55±18 (5.8%)	36±7 [*] (6.3%)	40±17 (7.7%)
Fluorescence Intensity⁵⁾	550±30 ⁶⁾	750±60 (6.9%)	890±40 [*] (8.6%)	1,030±50 [*] (10.4%)	1,050±40 [*] (10.7%)

¹⁾2 Balb/c mice per group were administered i.v. with each hot-water extract from Acanthopanax Cortex (50 µg/mouse) 2 days before i.v. inoculation of Colon 26-M3.1 lung carcinoma cells. Mice were killed 14 days after tumor inoculation for evaluation. ²⁾Tumor beared control. ³⁾Each value was expressed as the mean±S.D. of quadruplicate assays, and *, p<0.05 : Significant difference between the control and sample. ⁴⁾Values in parenthesis represent hot-water extract yields calculated from the raw materials. ⁵⁾The proliferation of bone marrow cells was measured by a fluorometric method, using the Alamar Blue™ reduction assay (each hot-water extract from Aurantii nobilis Pericarpium; 100 µg/mL). ⁶⁾Only saline without sample.

Table 36 결과에서처럼 교반시간은 1시간을 제외하고는 6시간, 12시간, 24시간은 큰 차이를 보이지 않아 이미 파쇄과정에서 상당량의 활성성분이 수용액상에 용출되어진 것으로 생각되었다. 마지막으로 최적의 파쇄 및 교반시간의 실험을 통하여 활성물질이 충분히 추출되어져 나온 열수추출물을 가장 활성이 높은 열수추출을 통하여 조제하기 위하여 추출 시의 물의 온도를 70, 90, 100 °C 및 121°C의 가압가열 조건으로 달리한 후 수율과 활성을 검토한 결과 Table 37과 같이 100 °C로 처리했을 때가 가장 높은 수율 (6.5%)과 대조군에 비해 77.5%의 높은 종양전이 억제활성을 보였으며 121 °C의 가압가열 조건으로 추출하였을 경우에는 수율은 7.1%로 증가하였으나 활성은 오히려 100 °C 처리조건으로 추출한 경우보다

감소 (70.0%)하는 결과를 얻을 수 있었는데 이것은 활성에 관여하는 활성물질, 즉 다당류 또는 단백질 등의 고분자 화합물이 높은 온도에서 파괴되거나 분해되어 활성이 감소하는 것으로 추정할 수 있었다.

Table 36. Effect of stirring time during hot-water extracts preparation by Scheme 1 from Acanthopanax Cortex on anti-metastasis and from Aurantii nobilis Pericarpium on bone marrow cell proliferation activity.

	Stirring time				
	Control	1 hr	6 hr	12 hr	24 hr
No of lung metastasis (Inhibition %) ¹⁾	158±30 ²⁾	69±20 (4.8%) ³⁾	45±10 ^{*4)} (6.4%)	39±19 (6.8%)	40±10 (6.6%)
Fluorescence Intensity ⁵⁾	520±40 ⁶⁾	700±40 [*] (6.8%)	860±50 [*] (8.7%)	910±120 [*] (9.8%)	950±50 (10.6%)

¹⁾2 Balb/c mice per group were administered i.v. with each hot-water extract from Acanthopanax Cortex (50 µg/mouse) 2 days before i.v. inoculation of Colon 26-M3.1 lung carcinoma cells. Mice were killed 14 days after tumor inoculation for evaluation. ²⁾Tumor beared control. ³⁾Values in parenthesis represent hot-water extract yields calculated from the raw materials. ⁴⁾Each value was expressed as the mean±S.D. of quadruplicate assays, and *, p<0.05 : Significant difference between the control and sample. ⁵⁾The proliferation of bone marrow cells was measured by a fluorometric method, using the Alamar Blue™ reduction assay (each hot-water extract from Aurantii nobilis Pericarpium; 100 µg/mL). ⁶⁾Only saline without sample.

Table 37. Effect of water temperature during hot-water extracts preparation by Scheme 1 from Acanthopanax Cortex on anti-metastasis and from Aurantii nobilis Pericarpium on bone marrow cell proliferation activity.

	Water temperature				
	Control	70℃	90℃	100℃	121℃
No of lung metastasis (Inhibition %) ¹⁾	160±35 ²⁾	71±20 (4.6%) ³⁾	57±10 ^{*4)} (6.1%)	36±5 [*] (6.5%)	48±15 (7.1%)
Fluorescence Intensity ⁵⁾	440±30 ⁶⁾	560±50 (7.5%)	660±50 (9.1%)	820±30 [*] (10.7%)	690±30 [*] (11.6%)

¹⁾2 Balb/c mice per group were administered i.v. with each hot-water extract from *Acanthopanicis* Cortex (50 µg/mouse) 2 days before i.v. inoculation of Colon 26-M3.1 lung carcinoma cells. Mice were killed 14 days after tumor inoculation for evaluation. ²⁾Tumor beared control. ³⁾Values in parenthesis represent hot-water extract yields calculated from the raw materials. ⁴⁾Each value was expressed as the mean±S.D. of quadruplicate assays, and *, p<0.05 : Significant difference between the control and sample. ⁵⁾The proliferation of bone marrow cells was measured by a fluorometric method, using the Alamar Blue™ reduction assay (each hot-water extract from *Aurantii nobilis* Pericarpium; 100 µg/mL). ⁶⁾Only saline without sample.

라. 생약재 및 증류액의 Peyer's patch를 매개로 한 골수세포 증식활성 촉진 성분의 검색과 활성물질의 추출화 조건

1) 각종 생약재의 용매추출물로부터 골수세포 증식활성 성분의 검색

30여종의 전통적인 생약재 및 증류액 시료를 계통추출하였다.. 파쇄시료의 경우에는 시료를 먼저 homogenizer를 이용하여 파쇄한 후 물을 첨가하여 교반하고 원심분리로 상등액을 분리하고 동결건조하여 냉수추출물 (Fr. I)로 하였으며 미파쇄 시료의 경우에는 시료를 파쇄하지 않고 곧바로 물을 첨가한 후 교반, 원심분리하여 냉수추출물 (Fr. I')로 하였다. 각각의 파쇄 및 미파쇄에서 원심분리에서 분리된 잔사는 헥산으로 환류추출 (5회)하여 헥산추출획분 (Fr. II와 II')으로 하였음. 헥산추출에 의해 분리된 잔사는 다시 메탄올로 환류추출 (5회)하고 상등액은 동결건조하여 메탄올추출물 (Fr. III과 III')으로 조제하고 마지막으로 시료를 물을 넣고 decoction (2회 실시)하는 방법에 의해 열수로 추출하여 열수추출획분 (Fr. IV와 IV')으로 하였다. 이와 같이 조제된 시료를 이용하여 골수세포 증식활성 물질을 검색한 결과, Table 38에서 나타낸바와 같이 냉수추출 (Fr. I)에서는 동충하초, 두충, 백봉령, 가시오가피, 진피 및 황기 등이, 열수추출 (Fr. IV)에서는 갈근, 감초, 결명자, 구기자, 백출, 생강, 숙지황, 가시오가피 및 진피가 대조군에 비해 1.5배 이상의 높은 활성을 나타내었다.. 또한 유기용매획분인 메탄올추출 (Fr. III)에서도 감초, 결명자, 대추, 가시오가피, 일천궁 및 토사자가 높은 활성을 보여 중앙전이 활성검색과는 달리 메탄올획분도 많은 시료가 골수세포의 증식활성에 영향을 주는 것으로 생각되었다. 그러나 헥산추출물 (Fr. II)의 경우에는 골

수세포의 증식활성 검색에서도 세포독성이 심하였고 수율도 매우 낮아서 활성검색에 부적당하였다.

Table 38. Bone marrow cell proliferation effect of fractions obtained by Scheme 1 from herbal medicines.

Korean name	Scientific name	Relative activity ¹⁾		
		Fr. I	Fr. III	Fr. IV
갈근	<i>Puerariae Radix</i>	1.37	1.12	1.54
감초	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	1.42	1.52	1.63
거심맥문동	<i>Liriopsis Tuber</i>	1.27	1.23	1.28
결명자	<i>Cassiae Semen</i>	1.31	1.34	1.53
계피	<i>Cinnamomi Cortex</i>	1.40	1.23	1.35
구기자	<i>Lycii Fructus</i>	1.40	1.21	1.54
녹각	<i>Cervus nippon</i>	1.23	1.10	1.33
녹용	<i>Cervs nippon</i>	1.31	1.19	1.40
당귀	<i>Angelicae sinensis Radix</i>	1.31	1.24	1.27
대추	<i>Zizyphi Fructus</i>	1.42	1.34	1.44
동충하초	<i>Cordyceps spp.</i>	1.54	0.99	1.39
두충	<i>Eucomiae Cortex</i>	1.54	1.26	1.44
백복령	<i>Hoelen</i>	1.51	1.27	1.35
백작약	<i>Paeoniae Radix alba</i>	1.32	1.23	1.27
백출	<i>Atractylodis Rhizoma alba</i>	1.36	1.28	1.73
백하수오	<i>Polygoni multiflori Radix alba</i>	1.43	1.29	1.31
복분자	<i>Rubi Fructus</i>	1.40	1.17	1.44
산수유	<i>Corni Fructus</i>	1.38	1.15	1.38
산약	<i>Dioscoreae Rhizoma</i>	1.42	1.27	1.24
생강	<i>Chrysanthemum motifolium</i>	1.40	1.28	1.52
숙지황	<i>Rehmaniae Radix Preparata</i>	1.22	1.19	1.53
영지	<i>Ganoderma lucidum</i>	1.36	1.30	1.38
가시오가피	<i>Acanthopanax Cortex</i>	1.52	1.43	1.63
오미자	<i>Schizandrae Fructus</i>	1.28	1.18	1.22
인삼	<i>Ginseng Radix</i>	1.39	1.30	1.37
인진	<i>Artemisiae iwayomogii Herba</i>	1.27	1.23	1.36
일천궁	<i>Cnidium officinale Makino</i>	1.33	1.34	1.28
진피	<i>Aurantii nobilis Pericarpium</i>	1.71	1.26	1.87
토사자	<i>Cuscutae Semen</i>	1.40	1.41	1.23
황기	<i>Astragali Radix</i>	1.52	1.11	1.40

¹⁾The proliferation of bone marrow cells was measured by a fluorometric method, using the Alamar BlueTM reduction assay, and relative activity = fluorescence intensity of sample / fluorescence intensity of saline (sample 100 µg/mL).

2) 파쇄한 각종 시료의 세포 내 수용성 물질의 골수세포 증식활성 성분의 검색

Table 37에서 보여주는 것처럼 수용성물질 중 가장 활성이 높은 시료는 진피의 열수추출물이었으며 (1.8배) 그 다음이 백출의 열수추출물과 진피의 냉수추출물 (1.7배)과 감초와 가시오가피의 열수추출물순이었다. (1.6배). 용매별 추출에 따른 골수세포 증식활성에 대한 영향은 역시 냉수나 열수추출물이 메탄올추출물보다 높은 활성을 보이며 상당히 많은 시료들이 대조군에 비해 활성을 갖는 것으로 보아 역시 수용성 성분 (고분자 다당이나 단백질 등)들이 종양전이 억제활성 검색의 경우처럼 골수세포의 증식활성에 관련된 것으로 판단할 수 있었다.

3) 파쇄한 각종 시료의 용매추출물로부터 골수세포 증식활성 성분의 검색

메탄올추출물의 경우에도 종양전이 억제활성 검색과는 달리 높은 활성을 갖는 시료가 상당수 검색되었는데 감초, 결명자, 대추, 가시오가피, 일천궁 및 토사자가 높은 활성을 나타내었으며 그 중에서도 감초가 가장 높았고 (1.5배), 가시오가피와 토사자가 그 다음으로 높았다 (1.4배). 그러나 헥산추출물이 세포에 독성현상을 나타내는 것으로 보아 유기용매에 의해서 추출되는 저분자류 (Fr. II와 III)가 냉수나 열수추출물의 고분자류보다는 활성에 크게 영향을 주는 것으로는 생각되지 않았다.

4) 높은 골수세포 증식활성을 보인 생약재 증류액의 활성검색

전통 생약재 시료의 1차 활성검색에서 높은 1.5배 이상의 활성을 나타내었던 갈근, 감초, 결명자, 구기자, 두충, 동충하초, 백봉령, 백출, 생강, 숙지황, 가시오가피, 진피 및 황기 등에 대해 decoction을 실시하면서 감압농축 장치를 이용하여 증류시킨 증류액에 대하여 Fig. 8에서와 활성을 검토하였다. 그 결과 생약재의 추출물 활성검색 시와 유사하게 백출, 가시오가피, 진피, 동충하초 및 생강의 활성이 대조군에 비해 높게 나타났다. (각각 1.6배, 1.4배, 1.4배, 1.3배, 1.3배). 그러나 증류액의 활성이 생약재의 추출물과 비교하여 감소된 현상은 종양전이 억제활성에서와 마찬가지로 증류 과정에서 고분자 물질이 이행되지 못한 때문으로 판단할

수 있다.

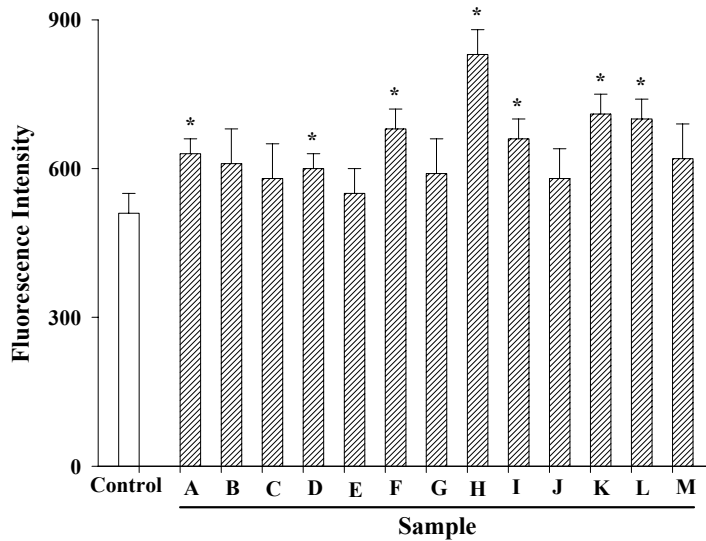


Fig. 8. Bone marrow cell proliferation of evaporating fractions obtained from herbal medicines. The proliferation of bone marrow cells was measured by a fluorometric method, using the Alamar Blue™ reduction assay (sample, 100 µg/mL). Control; only saline without sample. Each value was expressed as the mean±S.D. of quadruplicate assays, and *, $p < 0.05$: Significant difference between the control and sample. A, 감초; B, 갈근; C, 결명자; D, 구기자; E, 두충; F, 동충하초; G, 백복령; H, 백출; I, 생강; J, 숙지황; K, 가시오가피; L, 진피; M, 황기.

5) 골수세포 활성화 시료의 선정

전통 생약재 시료의 1차 활성화검색 시 각각의 용매추출 분획에서 높은 활성을 보인 시료들을 대상으로 용매별 희분에 대해 농도별로 2차 활성화검색을 실시한 결과, Fig. 9, Fig. 10과 Fig. 11에 나타난 것처럼 냉수추출 (Fr. I)에서는 진피와

두충이 가장 높았고, 열수추출 (Fr. IV)에서는 진피와 백출이 그리고 메탄올추출 (Fr. III)에서는 감초가 가장 높은 활성을 가지고 있음이 밝혀졌다. 위의 시료들을 대상으로 최종 활성검색을 실시한 결과 (Fig. 12), 진피와 백출의 열수추출물이 활성을 보였으나 폐자원 이용의 측면과 예전부터 진피가 민간요법에서 이용되어 왔던 점등을 고려해 진피를 활성시료로 선정하였다. 이러한 골수세포 증식 활성 시료 검색의 결과에 따라서 수용계 획분 중에서 가장 높은 활성을 보인 진피의 열수추출물을 활성 검색에 있어서의 시료로 선정하였다.

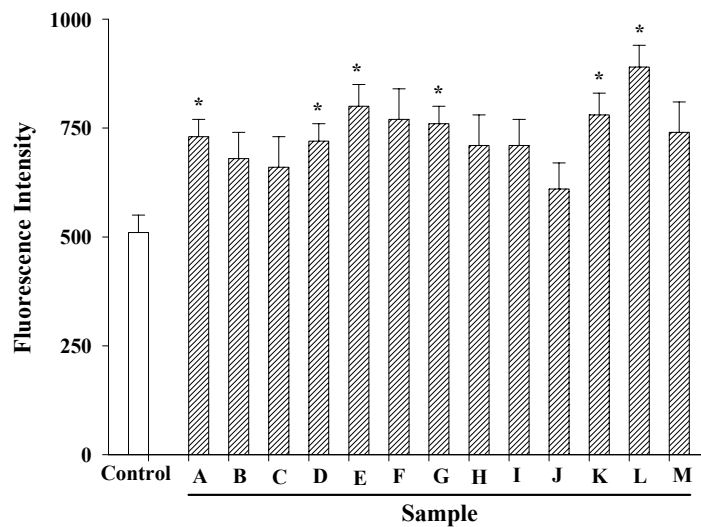


Fig. 9. Bone marrow cell proliferation of cold-water extracts obtained from herbal medicines. The proliferation of bone marrow cells was measured by a fluorometric method, using the Alamar Blue™ reduction assay (sample, 100 µg/mL). Control; only saline without sample. Each value was expressed as the mean±S.D. of quadruplicate assays, and *, $p < 0.05$: Significant difference between the control and sample. A, 감초; B, 갈근; C, 결명자; D, 구기자; E, 두충; F, 동충하초; G, 백복령; H, 백출; I, 생강; J, 숙지황; K, 가시오가피; L, 진피; M, 황기.

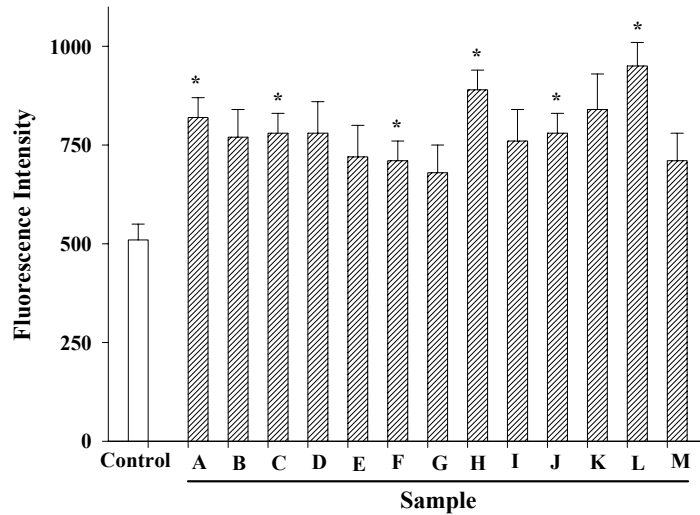


Fig. 10. Bone marrow cell proliferation of hot-water extracts obtained from herbal medicines. The proliferation of bone marrow cells was measured by a fluorometric method, using the Alamar Blue™ reduction assay (sample, 100 µg/mL). Control; only saline without sample. Each value was expressed as the mean±S.D. of quadruplicate assays, and *, $p < 0.05$: Significant difference between the control and sample. A, 감초; B, 갈근; C, 결명자; D, 구기자; E, 두충; F, 동충하초; G, 백복령; H, 백출; I, 생강; J, 숙지황; K, 가시오가피; L, 진피; M, 황기.

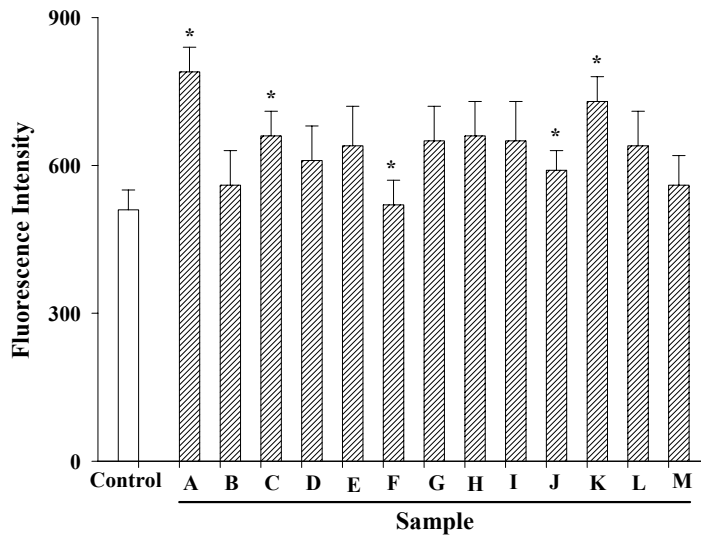


Fig. 11. Bone marrow cell proliferation of MeOH-soluble fractions obtained from herbal medicines. The proliferation of bone marrow cells was measured by a

fluorometric method, using the Alamar Blue™ reduction assay (sample, 100 µg/mL). Control; only saline without sample. Each value was expressed as the mean±S.D. of quadruplicate assays, and *, p<0.05 : Significant difference between the control and sample. A, 감초; B, 갈근; C, 결명자; D, 구기자; E, 두충; F, 동충하초; G, 백복령; H, 백출; I, 생강; J, 숙지황; K, 가시오가피; L, 진피; M, 황기.

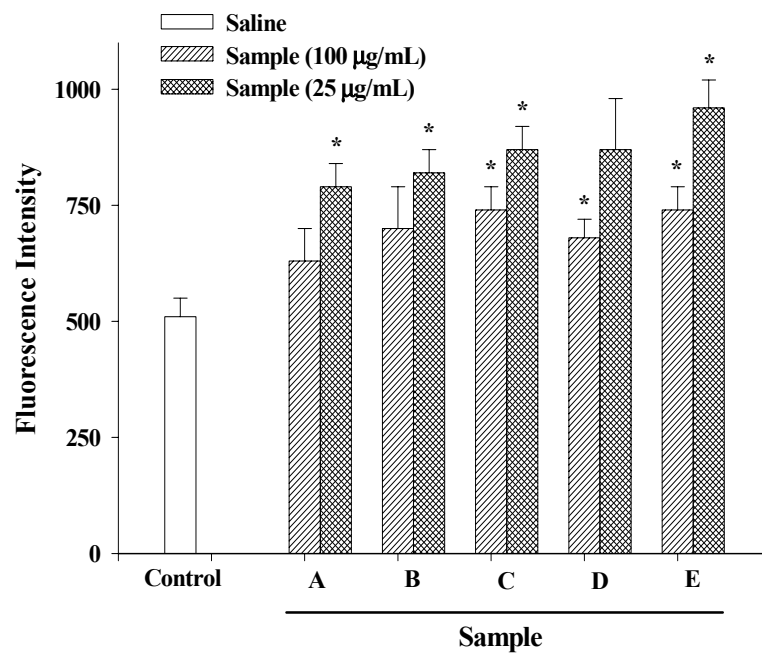


Fig. 12. Bone marrow cell proliferation of solvent extracts obtained from herbal medicines. The proliferation of bone marrow cells was measured by a fluorometric method, using the Alamar Blue™ reduction assay. Control; only saline without sample. Each value was expressed as the mean±S.D. of quadruplicate assays, and *, p<0.05 : Significant difference between the control and sample. A, 감초 (MeOH-soluble fraction); B, 두충 (cold-water extract); C, 백출 (hot-water extract); D, 진피 (cold-water extract); E, 진피 (hot-water extract).

6) 최대 골수세포 증식활성 시료의 추출조건의 최적화

골수세포 증식활성의 시료로 선정된 진피를 대상으로 열수추출물의 조제에 관한 추출조건을 검색하였음. Homogenizer에 의한 파쇄시간을 10분, 20분, 30분, 1시간으로 조정하여 열수추출물을 회수한 후 수율과 활성을 검토한 결과, 30분의 파쇄로 진피에서 최적의 수율 (10.4%)과 대조군에 비해 1.8배의 Peyer's patch 세포를 통한 골수세포 증식활성을 나타내었으며 1시간의 파쇄의 경우에는 30분의 파쇄와 수율과 활성에서 큰 차이를 보이지 않아 30분의 파쇄로도 충분히 시료의 조직들이 파괴되어 활성물질이 추출되어 나올 수 있는 것으로 생각되었다. (Table 35). 최적의 파쇄시간에 따른 결과를 토대로 30분을 homogenizer로 파쇄한 후 파쇄물을 1시간, 6시간, 12시간, 24시간 교반하여 원심분리로 상등액을 얻은 후 동결건조한 후 열수추출물을 조제했을 때의 수율과 활성을 검토하였다. Table 36 결과에서처럼 교반시간은 1시간을 제외하고는 6시간, 12시간, 24시간은 큰 차이를 보이지 않아 이미 파쇄과정에서 상당량의 활성성분이 수용액상에 용출되어진 것으로 생각되었다. 따라서 파쇄과정을 충실히 이행한다면 6시간 정도의 교반으로도 추출조건은 충분히 만족되리라고 생각되었으며, 최적의 파쇄 및 교반시간의 실험을 통하여 활성물질이 충분히 추출되어져 나온 열수추출물을 가장 활성이 높은 열수추출을 통하여 조제하기 위하여 추출 시의 물의 온도를 70, 90, 100 °C 및 121°C의 가압가열 조건으로 달리한 후 수율과 활성을 검토한 결과 Table 37과 같이 100 °C로 처리했을 때가 가장 높은 수율 (10.7%)과 대조군에 비해 1.9배의 높은 Peyer's patch 세포를 매개로한 골수세포 증식활성을 보였으며 121 °C의 가압가열 조건으로 추출하였을 경우에는 중앙전이 억제활성과 마찬가지로 수율은 11.6%로 증가하였으나 활성은 오히려 100 °C 처리조건으로 추출한 경우보다 감소 (1.6배)하는 결과를 얻을 수 있었다.

제 4 절 결론

가. 생약재 추출 증류물에 대한 휘발성 성분 분석

생약재 추출물 및 증류액의 휘발성 성분 분석 결과 대부분 탄화수소와 알콜류, 알데하이드 및 일부 유기산 등이 존재하는 것으로 확인되었다. 각 생약재별 휘발성 성분을 분석한 결과 특히 계피, 천궁, 하수오, 당귀, 백출, 오미자, 인삼 및 인진쑥 등에서 많은 휘발성 물질들이 함유되어 있는 것으로 나타났다.

나. 생약재 추출물 및 증류물의 항산화 활성

생약재로부터 70% 알콜 및 열수 추출물 및 생약재 증류물에 대한 항산화 활성을 총항산화 활성 및 수소이온라디칼 소거 활성을 측정하여 분석한 결과 측정된 모든 생약재에서 항산화 활성이 있는 것으로 나타났으며 생약재 증류물의 경우 증류물원액에 대한 10 μ g, 100 μ g/mL 농도 수준에서 측정된 결과 총항산화 활성 및 수소이온라디칼 소거활성이 나타나지 않았다.

다. 종양전이 억제활성 검색

전통 생약재를 대상으로 한 Colon 26-M3.1 lung carcinoma 종양전이 모델에서의 종양전이 억제활성은 가시오가피의 열수추출물이었으며 (75.6%) 그 다음이 백출 (71.8%), 인삼 (70.5%), 감초 (66.3%)와 당귀 (62.7%)의 열수추출물과 영지 (62.9%), 가시오가피와 진피 (60.9%) 및 인진 (57.8%) 냉수추출물로 종양전이 억제활성이 50% 이상을 보여주었다. 최적의 파쇄 및 교반시간은 100 °C, 30분으로 처리했을 때가 가장 높은 수율 (6.5%)과 대조군에 비해 77.5%의 높은 종양전이 억제활성을 보였다.

라. 골수세포 증식활성 촉진 성분의 검색과 활성물질의 추출화 조건

골수세포 증식활성 물질을 검색한 결과, 냉수추출에서는 동충하초, 두충, 백봉령, 가시오가피, 진피 및 황기 등이, 열수추출에서는 갈근, 감초, 결명자, 구기자, 백출, 생강, 숙지황, 가시오가피 및 진피가 대조군에 비해 1.5배 이상의 높은 활성을 나타내었다. 100 °C, 30분의 파쇄로 처리했을 때가 가장 높은 수율 (10.7%)과 대조군에 비해 1.9배

의 높은 골수세포 증식활성을 나타내었다.

제 5 절 참고문헌

1. 성낙주, 고평희, 전효곤, 강인수, 정영철, 김양우, 김정균, 강신권, 이수정, 이성호, 다년생 도라지의 약리작용에 기초한 건강 식품소재의 개발에 관한 연구, 농림수산부, 농림수산특정연구사업연구보고서, 경상대학교 자연과학대학(1997)
2. 임상동, 김기성, 김희수, 최인욱, 천장아, 박윤경, 한약재 첨가한 농가형 유제품 개발연구, 농림수산부, 농림수산특정연구사업연구보고서(GA0032-0979), 한국식품개발연구원(1998)
3. 김미선, 조여원, 정성현, 포스터 발표 : 고탄수화물식이 섭취 마우스에서 상업과 누에의 혈당강하 효과 검색, 한국영양학회지, vol. 30, pp. 580(1997)
4. 김성훈, 김금수, 이진하, 정을권, 박영식, 박유정, 이현용 : 강원도산 상업과 누에의 혈당강하 활성물질의 특성, 산업미생물학회지, vol. 25, pp. 391(1997)
5. 홍석산, 김혜영, 류미라, 박완수, 권석형, 국산농산물 및 생약재를 활용한 혈당조절용 식품 개발, 연구보고서(E00202F-005), 한국식품개발연구원(2000)
6. Whang, W.K., C, S.B. and Kim, I.H. Physiological activities of mixed extracts of *Acanthopanax senticosi* Radicis cortex and *Eucommiae* cortex. *Kor. J. Pharmacogn.* 27: 65-74 (1996)
7. Hikino, M.H. and Farnsworth, N.R. Economic and medicinal plant research. pp.155-215. Academic press (1985)

8. Hikino, H., Takahashi, M., Otake, K. and Konno, C. Isolation and hypoglycemic activity of Eleutherans A, B, C, D, E, F, and G: glycans of *Eleutherococcus senticosus* roots. *J. Nat. Prod.* 49: 293-297 (1986)
9. Lui, J.H. and Staba, J.E. The ginsenosides of various ginseng plants and selected products. *J. Nat. Prod.* 43: 340-346 (1980)
10. Fujikawa, T., Yamaguchi, A., Morita, I., Takeda, H. and Nishibe, S. Protective effects of *Acanthopanax senticosus* Harms from Hokkaido and its components on gastric ulcer in restrained cold water stressed rats. *Biol. Pharm. Bull.* 19: 1227-1230 (1996)
11. Miyakoshi, M., Shirasuna, K., Hirai, Y., Shingu, K., Isoda, S., Shoji, J., Ida, Y. and Shimizu, T. Triterpenoid saponins of *Acanthopanax nipponicus* leaves. *J. Nat. Prod.* 62: 445-448 (1999)
12. Fang, J. N., Proksch, A. and Wagner, H. Immunologically active polysaccharides of *Acanthopanax senticosus*. *Phytochem.* 24: 2619-2622 (1985)
13. Hu, S.Y. *Eleutherococcus* vs. *Acanthopanax*. *J. Arnold Arboretum.* 61: 107-111 (1980)
14. Wang, J.Z., Mao, X.J. and Shimura, K. Immunomodulatory activity of polysaccharide from *Acanthopanax obovatus* roots. *Planta Med.* 57: 335-336 (1991)
15. Filek G, Bergamini M, Lindner W. 1995. Steam distillation-solvent extraction, a selective sample enrichment technique for the gas chromatographic-electron-capture detection of organochlorine compounds in milk powder and other milk products. *J Chromatogr A* 712: 355-364.
16. Hong T, Matsumoto T, Kiyohara H, Yamada H. 1998. Enhanced production of

- hematopoietic growth factors through T cell activation in Peyer's patches by oral administration of Kampo (Japanese herbal) medicine, "Juzen-Taiho-To". *Phytomedicine* 5: 353-360.
17. Page B, Page M, Noel. C. 1993. A new fluorometric assay for cytotoxicity measurements *in vitro*. *Int J Oncol* 3: 473-476.
 18. Yoon TJ, Yoo YC, Kang TB, Baek YJ, Huh CS, Song SK, Lee KH, Azuma I, Kim JB. 1998. Prophylactic effect of Korean mistletoe (*Viscum album coloratum*) extract on tumor metastasis is mediated by enhancement of NK cell activity. *Int J Immunopharmacol* 20: 163-172.
 19. Mitsuda H, Yasumoto K, Iwami K. Antioxidative action of indole compounds during the autoxidation of linoleic acid. *Eiyo to Shokuryo* 19: 210-214 (1994)
 20. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Barnes G. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol.* 28: 25-30 (1985)
 21. Lee, J.H., Choi, H. S., Chung, M. S. and Lee M.S. Volatile flavor components and free radical scavenging activity of *Cnidium officinale*. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 34: 330-338 (2002)
 22. Noh, B.S., Oh, S. Y., Kim, S. J. Pattern analysis of Volatile components for domestic and imported *Angelica gigas* Nakai using GC based on SAW sensor. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 35: 144-148 (2003)
 23. Choi, S.H., Kim, H. J. Volatile flavor components of *Angelica gigas* Nakai by the storage conditions. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 32: 513-518 (2000)
 24. Martin, S. E., Padilla M. A., Ocete, J. Galvez, J., Anti-inflammatory activity of the essential oil of *Bupleurum frutescens*. *Planta med* 59(6):533-536(1993)

25. Nakanishi, T., M. Nishi, A. Inada, H. Obata, N. Tanabe, S. Abe and M. Wakashiro. Two new potent inhibitor of xanthine oxidase from leaves of *Perilla frutescens* Britton var. *aucta* Kudo. *Chem Pharm Bull*(Tokyo) 38(6): 1772-1774(1990)
26. Block, E.. The Organosulfur chemistry of the genus *Allium*-Implications for the Organic chemistry of sulfur. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 31, 1135(1992)
27. Harold, W. G.. Flavor chemistry of lipid foods. The american oil chemists'society, USA, P 98(1989)
28. Stone, E. J., Hall, R. M., and Kazeniak, S.J. Formation of aldehyde and alcohols in tomato fruit from U-¹⁴C-labelled linolinic and linoleic acids. *J. Food Sci.*, 40, 1138(1975)
29. You, W.C., Blot, W. J., Chang, Y. S., Ershow, A., Yang, Z.T., An, Q., Henderson, B.E., Fraumeni, J.F. Jr. and Wang, T. G. *Allium* vegetables and reduced risk of stomach cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, 81 162(1988)

제 2 장 기능성 한방증류음료의 제조 및 생리활성 분석

제 1 절 서론

식생활의 서구화에 따른 성인병 증가 및 삶의 질 개선을 추구하는 이른바 웰빙 추세에 따라 건강 기능성 식품에 대한 관심이 증가하고 있으며 건강기능식품법의 발효로 기능성 식품에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있다. 또한 식품과 의약품의 경계가 점차 모호해지고 있으며 다양한 건강 기능성 음료가 개발, 유통되고 있는 현실에서 한의학적으로 우수성이 증명되고 식품소재화가 가능한 국내산 생약재를 발굴하고 기존의 기능성 음료 수준을 한 차원 높은 고기능성 건강 음료의 개발이 절실히 요구된다. 현재 생약재를 이용한 건강음료의 경우 인삼, 영지, 오미자, 대추, 산수유 등이 이용되고 있으나 생약재 특유의 쓴맛, 신맛, 떫은 맛 인하여 혼합 음료로 제조되기보다 생약재에 과량의 당류를 부형제로 혼합한 전통차 형태로 제조되고 있는 실정이다. 따라서 생리활성 기능이 우수한 다양한 생약재를 음료로 가공하기 위하여 원료자체의 쓴맛, 색깔 등 식품으로써 부적합한 문제를 해결하기 위한 새로운 가공 기술 개발이 절실하다고 할 수 있다. 현재 음료시장은 탄산음료, 과즙음료, 이온음료 등이 주를 이루고 있으며 최근 건강기능성음료에 대한 관심이 높아짐에 따라 영세 업체를 중심으로 생약재를 이용한 건강음료 식품이 나타나고 있으나 효능에 대한 과학적이며 체계적인 연구부족 및 음료식품으로써의 품질이 열악한 실정이다. 현재 세계 기능성 식품 시장 규모는 연간 1천억 달러로 추산되고 있으며 매년 크게 증가하고 있다. 특히 생리활성 효능이 우수한 천연물질을 이용한 기능성 식품에 관한 수요가 높아지고 있는 상황에서 이에 대한 과학적이고 체계적인 연구는 필수적이며 따라서 체계적이고 과학적인 연구를 바탕으로 건강 기능성 음료를 고급화할 경우 일회성으로 그칠 건강 기능성 음료 시장을 더욱 확대하여 국내 음료 시장을 탄산음료 위주에서 건강 기능성 음료로 전환할 수 있을 것이다. 현재까지 전통음료에 관한 국내외 연구는 매우 미진하며 주로 일반적인 식혜, 수정과 등에 한하여 과학적인 접근이 이루어졌을 뿐 생약재를 이용한 전통음료에 대한 체계적 분석은 거의 없는 실정이다. 최근에 와서 한의학적으로 약재로만 인식되어왔던 생약재를 기능성 식품으로 개발하려는 시도가 이루어

지고 있으나 아직은 초기 단계로 정부 지원하에 산학연 공동 연구 등의 체계적인 연구가 필요한 실정이다. 최근 생약재를 이용한 건강 식품 개발의 붐을 타고 국내에서도 생약재를 이용한 건강식품 소재화 연구가 많이 이루어지고 있는데 특히 도라지의 약리 작용을 이용한 건강 식품 소재화연구(1), 한약재를 첨가한 농가형 유제품 개발 연구(2), 농산물 및 생약재의 혈당강화 효능(3, 4) 및 이를 활용한 혈당 조절용 식품개발 연구(5) 등 일부 연구가 진행되어 왔으며 음료의 경우 일부 인삼, 오미자, 대추 등 식미가 양호한 생약재를 원료로 한 茶類 형태의 음료가 소비되고 있으나 생약재의 약리적 효과를 기대하는 기능성음료로 보기에는 무리가 따른다. 그외 당귀, 가시오가피, 두충 등 생약재의 다양한 생리활성 효능을 탐색 및 항암 효과와 성인병 억제효과에 대한 연구(6-14)들이 일부 이루어지고 있다. 20세기 후반에 들어 현대의약으로 그 치료가 어려운 만성질환이 증가 일로에 있다는 사실과 특히 체질성(constitutional) 질환이나 심인성(psychosomatic) 질환의 급증 및 합성의약품이 심각한 부작용 등으로 인하여 식물체 유래의 약리활성 물질에 대한 많은 관심과 연구가 몰리게 되었다(15). 전통적으로 이러한 천연재료를 이용한 약물은 주로 열수로 추출하여 이용되어 왔는데 이러한 추출물 중에는 alkaloids, flavonoids 및 terpenoids와 같은 저분자 물질과(16) 다당류, 단백질, tannin 등과 같은 고분자 물질이(17) 다양하게 혼재되어 있게 된다. 저분자 물질이 갖는 생물활성과 이에 대한 연구는 비교적 상세히 과학적인 해명이 이루어져 왔지만 대부분이 메탄올 또는 에탄올과 같은 물 이외의 용매를 사용하여 추출되어 왔기에(18) 식품의 형태로 섭취하는 것은 문제가 있었다. 또한 활성의 저분자 물질에 대한 비활성의 다량의 고분자 물질이 포함되어 있을 가능성이 높기에 상대적으로 활성 회분의 양적인 증가로 인해 식품으로의 이용에 제약을 받아 왔다. 그러므로 본 연구에서는 생약의 식품으로서의 이용에 제약을 주는 다양한 요소 등을 극복하기 위한 방법으로 생약재를 대상으로 열수추출물을 조제하여 면역활성을 비교하고 활성이 높은 생약을 수증기 증류물로 조제한 후 활성을 검토하여 이를 식품, 특히 기능성 음료화 하였다.

제 2 절 연구방법

1. 생약재추출물 활성검색과 활성성분 동정

가. 열수추출물의 조제와 활성물질의 분획

1차년도 검색을 통하여 활성이 우수한 것으로 밝혀진 가시오가피, 백출, 진피, 감초 및 인삼 등의 5종의 생약재를 대상으로 각각의 생약재에 증류수를 첨가하고 증류수가 반으로 감소될 때까지 추출한 후 금속체 (No. 50)를 이용하여 상등액과 잔사로 분리하였다. 잔사에는 다시 동량의 증류수를 첨가한 후 2회 반복 추출하고, 7,000 rpm에서 30분간 원심분리를 통해 불용성 침전물을 제거하고 투석을 거친 후 동결건조하여 각 생약재의 열수추출물로 하였다. 각 생약재로부터 개별적인 열수추출물의 조제 후 이에 대한 골수세포 증식활성과 종양전이 억제활성을 측정 한 후, 높은 활성을 나타내는 생약재의 열수추출물에 대한 활성물질의 분획을 실시하였다. 즉, 활성 생약재의 열수추출물을 5 L의 메탄올로 1시간씩 5회에 걸쳐 환류를 거친 후 원심분리하여 메탄올-가용성 획분과 비가용성 획분으로 분리하였다. 메탄올-비가용성 획분은 증류수에 다시 용해시킨 4배의 에탄올을 첨가하고 12시간 교반, 원심분리하여 메탄올-비가용성/에탄올-가용성 획분을 분리하고 침전물은 증류수에 재용해시키고, 투석 후 원심분리, 농축 및 동결건조를 거쳐 조당당 획분으로 조제하였다.

나. 혼합생약재 열수추출물의 조제와 활성검색

1차년도 검색을 통하여 활성이 우수한 것으로 밝혀진 가시오가피, 백출, 진피, 감초 및 인삼 등의 5종의 생약재를 검색 시의 활성도에 따라 적당한 비율로 배합하여 혼합생약재로 조제한 후 (Table 1) 증류수를 첨가하고 증류수가 반으로 감소될 때까지 추출한 후 금속체 (No. 50)를 이용하여 상등액과 잔사로 분리하였다. 잔사에는 다시 동량의 증류수를 첨가한 후 2회 반복 추출하고, 7,000 rpm에서 30분간의 원심분리를 통해 불용성 침전물을 제거하고 투석을 거친 후 동결건조하여 혼합비율에 따른 혼합생약재의 열수추출물로 하였다.

Table 1. 생약재 원료배합을 통한 혼합생약재 조제 시의 각 생약재 혼합 비율*.

생약재	HW-A	HW-B	HW-C	HW-D	HW-E
가시오가피	25	30	30	35	40
백출	25	30	30	35	40
진피	20	17.5	15	10	7.5
감초	20	17.5	15	10	7.5
인삼	10	5	10	10	5

*1차년도 열수추출물 활성검색 시의 활성도에 근거한 비율 : 혼합생약재 100 g을 구성하는 각 생약재 원료의 g을 %로 표시.

각 혼합비율에 따라 조제된 혼합생약재 열수추출물의 조제 후 이에 대한 골수세포 증식활성과 종양전이 억제활성을 측정하여 최고 활성을 나타내는 혼합생약재의 비율을 결정하였다.

2. 증류액 조제 및 활성분석

가. 생약재 증류액 조제와 활성물질의 분획

열수추출물 중 활성이 높았던 백출 등 5종 생약재 각각의 증류액을 조제하기 위하여 추출공정을 연속수증기 증류법에 사용하는 Likens-Nickerson 장치 (J&W Scientific, Folsom, CA, USA)를 이용하였다. 즉, 추출관 한쪽에는 증류수 300 mL과 각각의 생약재 30 g을 가하여 가열 추출하고, 다른 한쪽은 *n*-Pentane과 Diethyl ether를 2:1의 비율로 혼합한 혼합액 50 mL을 43°C에서 가열하여 생약재 각각의 증류액을 조제하였다. 1시간 정도 가열한 후 용매가 든 플라스크를 떼어내고 수분을 제거하기 위하여 Sodium sulfate를 넣고 냉장보관 하였다. 냉장 보관된 용매를 꺼내어 질소가스로 최종부피가 2 mL 되게 농축하고 농축된 생약재 각각의 증류액을 이용하여 골수세포 증

식활성과 종양전이 억제활성을 검토하였다.

각 생약재로부터 개별적으로 증류액을 조제한 후, 이에 대한 골수세포 증식활성과 종양전이 억제활성을 측정하고 높은 활성을 나타내는 생약재의 증류액에 대한 활성물질의 분획을 실시하였다. 즉, 생약재 각각의 증류액을 농축 후 적당량의 DIW에 분산시켜 건조하고, DIW : CHCl₃ (1 : 1)으로 분획, 농축하여 유기용매-가용획분과 DIW-가용획분으로 물질을 분리하였다.

나. 생약재 증류액을 혼합한 최고 활성 레시피 제조

1차년도 검색을 통하여 활성이 우수한 것으로 밝혀진 백출, 가시오가피, 감초, 진피 및 인삼 등의 5종의 생약재로부터 각각의 증류액을 연속수증기 증류법으로 조제하였는데, 즉 추출관 한쪽에는 증류수 300 mL과 각각의 생약재 30 g을 가하여 가열 추출하고, 다른 한쪽은 *n*-Pentane과 Diethyl ether를 2:1의 비율로 혼합하여 혼합액 50 mL을 43°C에서 1시간 정도 가열한 후 용매가 든 플라스크를 떼어내고 수분을 제거하기 위하여 Sodium sulfate를 넣고 냉장보관 하였다. 냉장 보관된 용매를 꺼내어 질소 가스로 최종부피가 2 mL 되게 농축한 후, 개별적으로 조제된 생약재의 증류액을 대상으로 1차년도 검색 시의 활성도에 따라 적당한 비율로 배합하여 다양한 레시피의 개별적으로 조제된 생약재의 혼합증류액 (Table 2)을 조제하였으며 이와 같이 조제된 혼합증류액을 이용하여 골수세포 증식활성과 종양전이 억제활성을 검토하였다.

Table 2. 생약재 증류액 배합을 통한 혼합증류액 조제 시의 각 생약재 증류액 혼합비율*.

생약재	SD-a	SD-b	SD-c	SD-d	SD-e
백출	40	35	30	30	35
가시오가피	25	25	25	30	35
감초	17.5	15	20	15	10
진피	17.5	15	15	15	10
인삼	5	10	10	10	10

*1차년도 증류액 활성검색 시의 활성도에 근거한 비율 : 혼합증류액 100 mL을 구성하는 각 생약재 증류액의 mL를 %로 표시.

다. 혼합생약재 증류액의 조제와 활성검색

1차년도 검색을 통하여 활성이 우수한 것으로 밝혀진 백출, 가시오가피, 감초, 진피 및 인삼 등의 5종의 생약재를 검색 시의 활성도에 따라 적당한 비율로 배합하여 혼합생약재로 한 (Table 3) 후, 각 혼합생약재에 따른 증류액을 조제하기 위하여 추출공정을 연속수증기 증류법에 사용하는 Likens-Nickerson 장치 (J&W Scientific, Folsom, CA, USA)를 이용하였음. 즉, 추출관 한쪽에는 증류수 300 mL과 각각의 혼합생약재 30 g을 가하여 가열 추출하고, 다른 한쪽은 *n*-Pentane과 Diethyl ether를 2:1의 비율로 혼합하여 혼합액 50 mL을 43°C에서 가열하여 증류액을 조제하였음 (각 혼합생약재의 SD 확보). 1시간 정도 가열한 후 용매가 든 플라스크를 떼어내고 수분을 제거하기 위하여 Sodium sulfate를 넣고 냉장보관 하였음. 냉장 보관된 용매를 꺼내어 질소가스로 최종부피가 2 mL 되게 농축하고 농축된 혼합생약재의 증류액을 이용하여 골수세포 증식활성과 종양전이 억제활성을 검토하였다.

Table 3. 생약재 원료배합을 통한 혼합생약재 조제 시의 각 생약재 혼합비율*.

생약재	SD-A	SD-B	SD-C	SD-D	SD-E
백출	40	35	30	35	40
가시오가피	20	25	30	35	40
감초	15	15	15	10	7.5
진피	15	15	15	10	7.5
인삼	10	10	10	10	5

*1차년도 증류액 활성검색 시의 활성도에 근거한 비율 : 혼합생약재 100 g을 구성하는 각 생약재 원료의 g을 %로 표시.

3. 증류액 음료 Base를 활용한 음료레시피 개발

가. 증류액 음료 Base 제조

위에서 언급한 바와 같이 개별적으로 조제된 활성 생약재 증류액의 단순혼합에 의해 조제된 혼합증류액 또는 활성을 갖는 생약재 원료자체를 혼합한 후 이를 대상으로 증류액을 조제한 혼합생약재 증류액 중에서 활성을 유지하면서 산업적으로 적용이 가능한 증류액 조제조건을 선정하고 이들 중 높은 활성을 보이는 레시피를 기본으로 하여 조제된 농축액을 음료 Base로 하였다. 이러한 활성을 갖는 최적조건에서 조제된 증류액만을 음료 Base로 하여 용매인 물과 함께 혼합하여 증류음료로 개발하기 위하여 음료 레시피를 개발하였다.

나. 혼합 음료레시피 제조

최적 조제조건에서 높은 활성을 나타내는 증류액 레시피를 음료 성분의 Base로 하고 이를 음료로 조제하기 위하여 필요한 감미료, 산미료 등의 다양한 음료의 부원료 성분을 첨가한 산업적으로 적용이 가능한 증류음료 레시피를 개발하였다. (Table 4).

Table 4. 최적조건에서 조제된 증류액을 음료 Base로 활용한 음료레시피에서의 각 구성물 혼합비율*.

구성	Drink-I	Drink-II	Drink-III	Drink-IV	Drink-V	Drink-VI	Drink-VII	Drink-VIII
SD-D Base ^{a)}	3.0	5.0	8.0	10.0	3.0	5.0	8.0	10.0
감미료	-	-	-	-	0.5	1.0	2.0	3.0
산미료	-	-	-	-	0.5	1.0	2.0	3.0
수분	97.0	95.0	92.0	90.0	96.0	93.0	88.0	84.0

*증류음료 레시피 100 mL을 구성하는 각 구성물의 mL 또는 g을 %로 표시

^{a)}Table 3에서의 최적의 활성을 나타낸 레시피로서 혼합생약재로부터 최종적으로 5 mL 수준으로 농축된 증류액 Base (백출 : 가시오가피 : 감초 : 진피 : 인삼 = 35 : 35 : 10 : 10 : 10)

4. 일반적 분석방법

가. 성분분석

골수세포 증식활성 또는 종양전이 억제활성을 갖는 열수추출물 또는 증류액의 총당, 산성당 및 단백질 함량은 Phenol-sulfuric acid법, *m*-hydroxydiphenyl법 및 Bio-Rad dye를 이용한 Bradford법으로 분석하며 표준물질은 각각 Galactose, Galacturonic acid와 BSA (bovine serum albumin)를 사용하였으며, 또한 총 Polyphenol 함량의 측정은 Resveratrol을 표준물질로 하여 Folin-ciocalteu reagent를 이용하여 측정하였다.

나. 증류액의 효소 및 화학적 처리

- NaIO₄ (periodate) 산화 : 골수세포 증식활성 및 종양전이 억제활성을 갖는 생약재의 열수추출물 또는 증류액에 25 mM NaIO₄가 함유된 50 mM acetate buffer (pH 4.5)를 첨가하고 암실, 4°C에서 96시간 교반하였음. 잔여 periodate를 제거하기 위해 ethylene glycol을 첨가하고 교반을 행하여 얻은 비투석액에 NaBH₄를 첨가하여 환원시키고 초산으로 중화 후 투석, 동결건조하여 각 획분의 periodate 산화물을 조제하였다.
- NaClO₂ (chlorite) 처리 : 골수세포 증식활성 및 종양전이 억제활성을 갖는 생약재의 열수추출물 또는 증류액을 4% acetic acid에 용해시킨 후 NaClO₂를 첨가하였다. 이 혼합액을 70°C에서 색깔이 변할 때까지 반응시킨 후 3 M NaOH로 중화시키고 투석, 동결건조하여 활성 획분의 chlorite 처리물로 조제하였다.
- Pronase 분해 : 활성 획분에 Actinase E가 포함된 CaCl₂ 함유-50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.9)를 첨가하고 37°C에서 48시간 소화시켰다. 반응은 0.1 N HCl로 중지시키고 투석, 동결건조하여 활성 획분의 단백질 분해물로 조제하였다.

5. 생리활성 검색

가. 실험동물과 세포배양

생후 7주령의 자성 C3H/He 또는 Balb/c 마우스를 사육조에 5마리씩 넣고 정수된 물과 실험동물용 Pellet 사료를 자유공급 하였으며 스트레스를 받지 않도록 주의하여 사육하였다. 종양세포주인 Colon 26-M3.1 lung carcinoma의 배양은 7.5% FBS, 비타민 용액, Sodium pyruvate, 비필수아미노산 및 L-glutamic acid가 함유된 EMEM 배지를 이용하였으며 5% CO₂, 95% 습도 및 37°C의 조건에서 배양하였다.

나. Peyer's patch를 통한 골수세포 증식활성

골수세포 증식촉진 활성성분의 검색은, 장관면역계를 구성하는 장관 Peyer's patch로부터 얻은 세포를 활성화하여 골수세포 증식인자의 생산을 촉진하는 정도를 측정하는 다음과 같은 방법에 따라 행하였다 (Fig. 2).

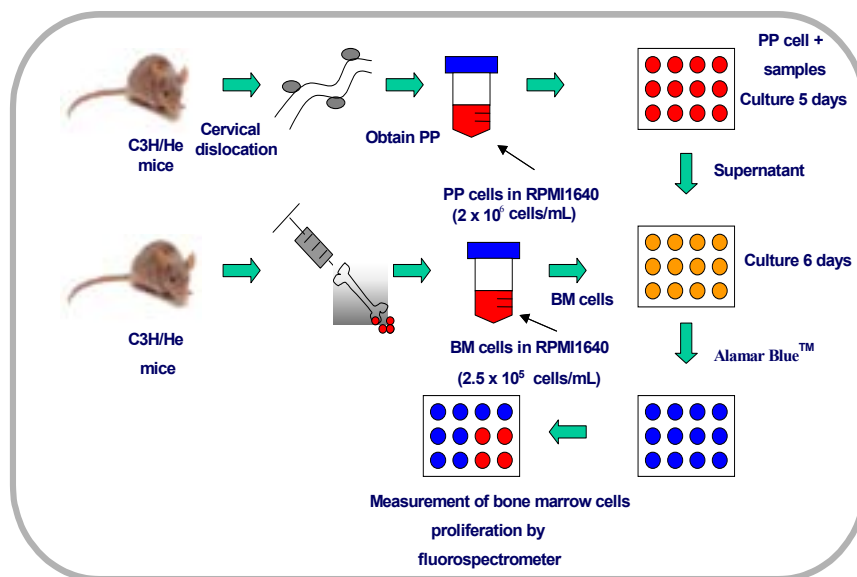


Fig. 2. Assay of bone marrow cell proliferating activity through Peyer's patch.

- Peyer's patch 세포배양 상등액의 조제는 LPS 비의존성인 C3H/He 마우스의 (Daehan-Biolink Co., Korea) 소장을 채취하고 소장벽의 Peyer's patch를 잘라 차가운 RPMI-1640 medium이 (Gibco) 있는 페트리디쉬에 이동시키고 금속체를 (mesh # 100) patch위에 놓고 주사기 고무마개로 누르면서 patch로부터 세포 방출한 후 이 세포현탁액을 금속체를 (mesh # 200) 사용하여 여과하고 상기 medium으로 세 번 세정하였다. 세포농도를 2×10^6 cells/mL RPMI-1640으로 조정, $200 \mu\text{l}$ 씩을 96 well plate에 분주하고 37°C 에서 5일간 5% CO_2 배양기에서 배양하여 상등액을 회수하여 골수세포 증식활성측정용 세포배양액으로 사용하였다.
- 골수세포의 조제는 동일 mouse의 정강이 뼈로부터 RPMI-1640 medium을 주입하면서 골수세포를 회수하고 상기와 같이 여과, 세정하고 2.5×10^5 cells/mL RPMI-1640으로 조정하였다.
- 골수세포 증식도의 측정은 Alamar Blue (Alamar Bio-Sciences Inc.) 환원측정법을 사용하는데 조정된 골수세포액 $100 \mu\text{L}$ 씩을 96 well plate에 분주한 후 Peyer's patch 세포로부터 얻은 세포배양 상등액 및 RPMI-1640 medium $50 \mu\text{L}$ 와 함께 37°C 에서 6일간 배양하였으며 배양 종료 5시간 전에 Alamar Blue 용액 $20 \mu\text{L}$ 를 첨가하고 Fluoroskan II를 (Labsystems, Finland) 이용하여 형광세기를 excitation 544 nm와 emission 590 nm에서 측정하였다. 시료의 골수세포 증식촉진활성은 대조구와의 차이로부터 골수세포의 증식도를 정량하였다.

다. 골수세포 증식활성의 *Ex vivo* 실험

시료의 실험동물의 생체 내 골수세포 증식활성을 확인하기 위하여 활성 증류액을 500, 1,000, 2,000 μL 의 농도로 1주일간 매일 1회 경구투여를 실시한 후 소장으로부터 Peyer's patch를 적출하였으며, 대조군의 경우에는 시료대신에 생리식염수를 투여하였다. 적출한 Peyer's patch로부터 세포를 분리한 후 이를 5일간 배양하고 상등액을 골수세포와 반응시켜 6일간 배양한 후에 Alamar Blue를 첨가함으로써 골수세포 증식도를 대조군과 비교하여 생체 내 동물실험을 진행하였다.

라. Colon 26-M3.1 lung carcinoma의 종양전이 모델

시료의 항종양 효과는 Colon 26-M3.1 lung carcinoma를 이용하는 실험동물 종양전이 모델을 이용하였다. 실험동물로 Balb/c 마우스를 사용하였으며, 종양의 접종은 2.7×10^4 의 Colon 26-M3.1 lung carcinoma 세포를 정맥주사 하였다 (*i.v.*). 14일 후에 마우스를 희생시키고 종양의 표적기관인 폐를 적출하여 Bouin's 용액에서 전이된 종양을 고정시킨 후 종양의 군집 수를 측정하였다. 한편, 적당한 농도의 시료를 정맥주사 한 시료에 의한 항종양 전이 효과는 종양만 접종한 대조군과 비교함으로써 조사하였고 시료는 종양접종 1일 후에 1회 정맥주사 하였다 (Fig. 3).

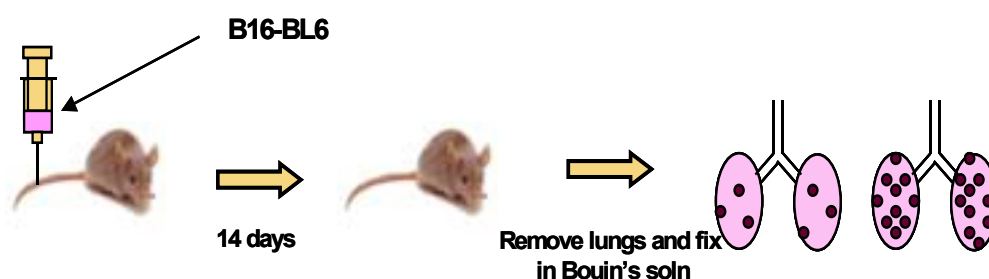


Fig. 3. Assay of anti-metastasis activity using lung carcinoma.

6. 생약재 증류음료의 제조 및 관능검사

면역활성 및 항산화 활성 등의 생리활성이 우수한 증류 음료를 산업화 하기 위하여 감미료 및 산미료 등을 혼합하여 생약재 특유의 고미 등을 개선하고자 하였다. 제품에 대한 객관적이고 정확한 품질 측정을 위하여 관능검사 방법 중 정량적 묘사 분석 (Quantitative descriptive analysis)를 실시하였으며 이 때 사용한 관능검사 표는 table 5와 같다. 실험결과들은 평균치 \pm SD로 나타내었고 student *t*-test를 이용하여 통계 처리한 후 $p < 0.05$ 수준에서 유의성을 검정하였다.

Table 5. 생약재 증류 음료 묘사분석용 관능검사표

생약재 증류음료 묘사분석

날짜 : 2004. . . 이름 :

다음은 생약재 증류 음료의 시료입니다. 먼저 물로 입가심을 하신 후, 각각의 항목에서 왼쪽의 시료부터 오른쪽으로 향미를 특정하여 각 시료번호 밑에 해당 항목의 강도를 써 주십시오. 향 측정에서는 먼저 글래스를 흔든 후 시료의 아로마(향)를 말합니다. 각 시료간에는 물로 코나 입을 린스해 주시기 바랍니다.

				<u>측정 척도</u>				
1	2	3	4	5	6	7	8	9
대단히 약함				보통				대단히 강함

향 (AROMA)

시료번호 _____

단내	()	()	()	()	()	()
한약냄새	()	()	()	()	()	()
탄냄새	()	()	()	()	()	()
향긋한 냄새	()	()	()	()	()	()
플냄새	()	()	()	()	()	()
약품냄새	()	()	()	()	()	()
콩나물데친냄새	()	()	()	()	()	()
종이 타는 냄새	()	()	()	()	()	()
나무 향기내	()	()	()	()	()	()
흙냄새	()	()	()	()	()	()
계피냄새	()	()	()	()	()	()
시큼한 냄새	()	()	()	()	()	()

-다음장에 계속-

1	2	3	4	<u>추정 척도</u> 5	6	7	8	9
대단히 약함				보통				대단히 강함

맛(TASTE)

시료번호 _____

단맛	()	()	()	()	()	()	()	()
쓴맛	()	()	()	()	()	()	()	()
떫은맛	()	()	()	()	()	()	()	()
향기로운 맛	()	()	()	()	()	()	()	()
한약 맛	()	()	()	()	()	()	()	()
썩썩한 맛	()	()	()	()	()	()	()	()
상쾌한 맛	()	()	()	()	()	()	()	()
탄맛	()	()	()	()	()	()	()	()
톡쏘는 맛	()	()	()	()	()	()	()	()
아린 맛	()	()	()	()	()	()	()	()
딴딴한 맛	()	()	()	()	()	()	()	()
시큼한 맛	()	()	()	()	()	()	()	()

-감사합니다-

Table 6. 생약재 증류 음료 기호도 조사용 관능검사 표

생약재 증류 음료의 기호도 조사

날 짜 : 2004. . 이 름 :

다음은 생약재 증류 음료의 시료입니다. 먼저 물로 입가심을 하신 후, 각각의 항목에서 왼쪽의 시료부터 오른쪽으로 향미를 특정하여 각 시료번호 밑에 해당 항목의 강도를 써 주십시오. 향 측정에서는 먼저 글래스를 흔든 후 시료의 아로마(향)를 말합니다. 각 시료간에는 물로 코나 입을 린스해 주시기 바랍니다.

1. 향

매우나쁘다 |-----| 보통이다 |-----| 매우좋다

2. 단맛

매우나쁘다 |-----| 보통이다 |-----| 매우좋다

3. 신맛

매우나쁘다 |-----| 보통이다 |-----| 매우좋다

4. 씹쓸한맛

매우나쁘다 |-----| 보통이다 |-----| 매우좋다

5. 종합적 기호도

매우나쁘다 |-----| 보통이다 |-----| 매우좋다

-감사합니다-

제 3 절 연구결과

1. 생약재추출물 활성검색과 활성성분 동정

가. 생약재 열수추출물의 조제와 활성검색

1차년도에 생약재로부터 열수추출물을 조제한 후 골수세포 증식활성과 종양전이 억제활성의 검색을 통하여 30여종의 국내산 생약재로부터 5종 생약재의 열수추출물이 높은 활성을 보이고 있음을 알 수 있었다. 골수세포 증식활성의 경우에는 진피 (*Citrus leucocarpa*, CL), 백출 (*Atractylodes macrocephala*, AM), 가시가지오가피 (*Acanthopanax senticosus*, AS), 감초 (*Glycyrrhiza uralensis*, GU) 및 갈근 (*Pueraria thunbergiana*, PT)의 순으로 대조군보다 높은 활성을 보였으며, 종양전이가 억제활성의 결과로서는, 가시가지오가피, 백출, 인삼 (*Panax ginseng*, PG), 감초 및 당귀 (*Angelica acutiloba*, AA)의 5종 생약재가 유의적으로 높은 활성을 나타내었다. 이러한 생약재들 중에서도, 특히 가시가지오가피, 백출, 진피, 감초 및 인삼의 경우에는 골수세포 증식활성과 종양전이가 억제활성의 모든 경우에 대조군 및 검색 생약재보다 높은 활성을 나타내었기에 본 2차년도에서는 이러한 5종의 생약재를 대상으로 열수추출물을 조제하여 이들의 활성을 재확인함과 동시에 활성성분을 밝히기 위한 기본 확보로 사용하고자 하였다. 조제방법은 1차년도에서 언급한 바와 같이 5종의 생약재 500 g에 증류수를 20배 (10 L) 첨가하고 증류수가 반으로 감소할 때까지 decoction 방법으로 추출한 후 금속체 (표준체 No. 50)를 이용하여 상등액과 잔사로 분리한 후 잔사는 동일한 방법으로 2회 더 열수추출하여 처음의 상등액과 혼합한다. 다음으로 추출 상등액을 7,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 불용성 침전물을 제거한 후 투석 및 동결건조하여 각 생약재의 열수추출물로 하였다 (수율 : 가시가지오가피 (AS-0), 28.7%; 백출 (AM-0), 33.9%; 진피 (CL-0), 33.3%; 감초 (GU-0), 30.7%; 인삼 (PG-0), 24.5%). 조제된 각 생약재의 열수추출물의 활성을 검토한 결과, Fig. 4에서 보이는 것처럼 Peyer's patch를 통한 골수세포 증식활성의 경우에는 1차년도와 유사하게 진피의 열수추출물 (CL-0)이 가장 높은 활성을 보였으며 (시료농도 100 µg/mL, 대조군의 1.82배 증강), 다음으로 가시가지오가피 (AS-0, 1.73배 증강)와 백출 (AM-0,

1.70배 증강)이 유의적으로 골수세포를 증식시키는 결과를 얻을 수 있었으며, 감초 (GU-0, 1.61배 증강)와 인삼 (PG-0, 1.45배 증강)도 대조군보다 높은 활성을 나타내었다.

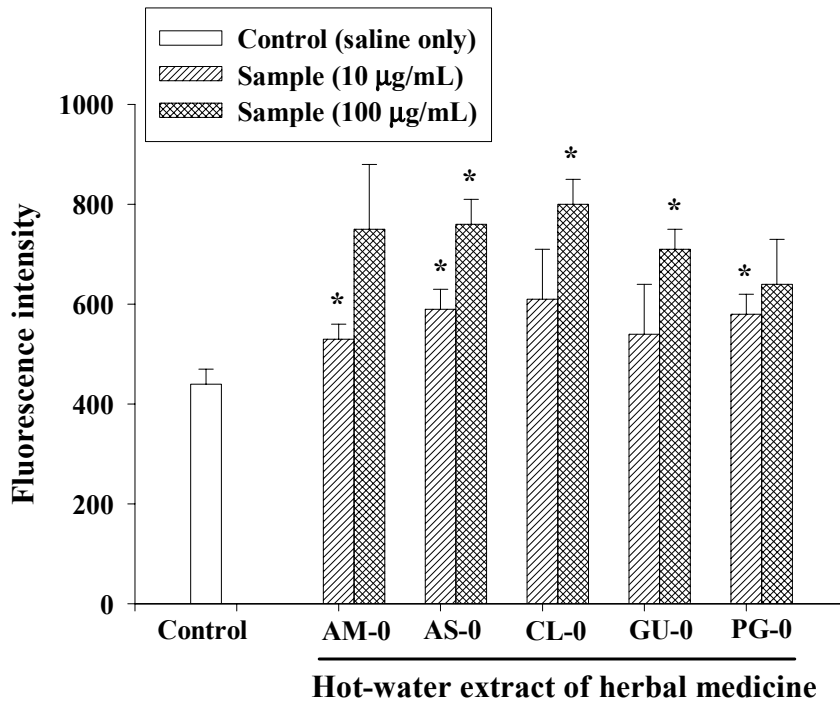


Fig. 4. Bone marrow cell proliferating activity of hot-water extracts from herbal medicines. AM; *A. macrocephale*, AS; *A. senticosus*, CL; *C. leticulata*, GU; *G. uralensis*, PG; *P. ginseng*. Values represent the means \pm S.D (n=4). *p<0.05; significance between the control and hot-water extract of each herbal medicine.

한편, Colon 26-M3.1 lung carcinoma cell line을 이용한 폐로의 종양전이 억제활성 결과에서도 가시가지오가피 (AS-0, 시료농도 50 µg/mouse, 대조군의 71.6% 억제)와 백출 (AM-0, 70.3% 억제)이 여전히 높은 활성을 나타내었으며 감초 (GU-0, 65.8%

억제), 진피 (CL-0, 61.3% 억제) 및 인삼 (PG-0, 60.6% 억제)의 경우에는 가시가시오가피 또는 백출보다는 낮았지만 대조군보다는 현저히 높은 활성을 보여주어 1차년도 의 30여종의 활성검색 시와 동일한 결과를 얻을 수 있었다 (Fig. 5).

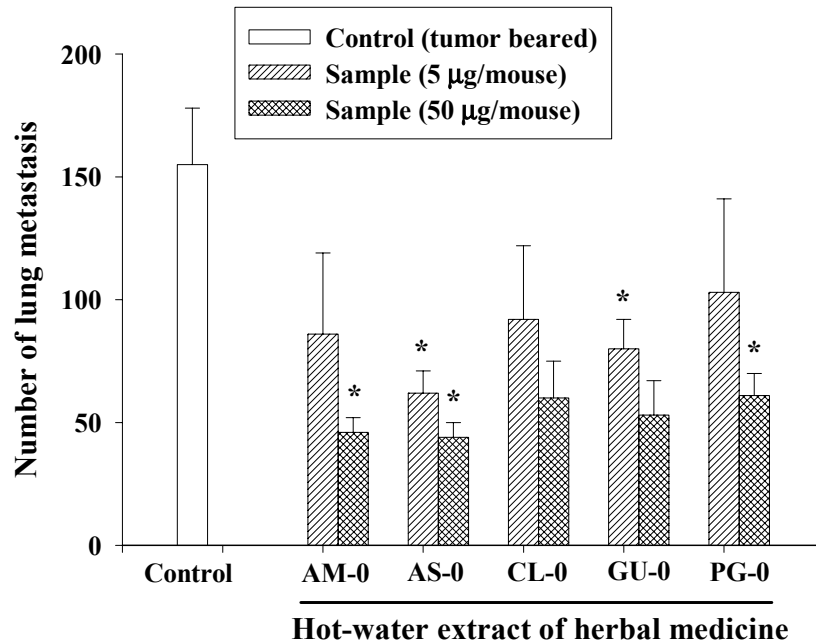


Fig. 5. Tumor metastasis inhibiting activity of hot-water extracts from herbal medicines. AM; *A. macrocephale*, AS; *A. senticosus*, CL; *C. leticulata*, GU; *G. uralensis*, PG; *P. ginseng*. Values represent the means \pm S.D (n=4). *p<0.05; significance between the control and hot-water extract of each herbal medicine.

이러한 결과로부터 생약재 활성검색 결과에 의해 선택된 가시가시오가피, 백출, 진피, 감초 및 인삼의 생약재로부터 추출한 열수추출물은 활성에 관여하는 성분이 다량 함유되어 있음을 재차 확인할 수 있었으며 이러한 활성 생약재의 열수추

출물로부터 분획을 통하여 우수한 활성을 갖는 획분의 활성성분을 분리하고, 활성성분의 구성물질을 동정하는 것이 가능함을 알 수 있었다.

나. 활성성분의 분리 및 동정

가시가시오가피를 포함하는 5종의 골수세포 증식활성 및 종양전이 억제활성 물질이 함유된 열수추출물로부터 활성성분을 분리하고 이들이 어떤 성분으로 구성되어 있는지를 검토하기 위하여 각 생약재의 열수추출물을 다음과 같이 분획하였다. 즉, 각 활성 생약재의 열수추출물을 5 L의 메탄올로 5회에 (1시간씩) 걸쳐 환류하고 원심분리하여 메탄올-가용성 획분 (수율 : AS-1, 4.5%; AM-1, 2.3%; CL-1, 11.3%; GU-1, 3.8%; PG-1, 5.5%)과 비가용성 획분으로 분리하고 비가용성 획분은 증류수에 다시 용해시킨 후 4배의 에탄올을 첨가하여 12시간 동안 교반하였다. 교반 후 일정시간 정치하여 침전물을 가라앉힌 후 이를 원심분리하여 상등액은 에탄올-가용성 획분 (수율 : AS-2, 1.5%; AM-2, 1.1%; CL-2; 2.8%, GU-2, 1.3%; PG-2, 2.2%)으로 하고 침전물은 증류수에 재용해시킨 후 투석, 원심분리, 농축 및 동결건조를 거쳐 각 생약재의 조다당 획분 (수율 : AS-3, 15.5%; AM-3, 8.9%; CL-3, 13.7%; GU-3, 10.5%; PG-3, 7.7%)으로 조제하였다. 이와 같이 분획된 각 생약재의 획분을 이용하여 골수세포 증식활성을 측정한 결과, Table 5에서 보이는 것처럼 대부분 활성 생약재에서 조다당 획분만이 높은 활성을 보이고 있는 반면에, 에탄올-가용성 획분의 경우에는 대조군과 유사하거나 오히려 낮은 활성을 나타내었다. 이러한 조다당 획분 중에서도, 특히 가시가시오가피 (AS-3, 시료농도 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 대조군의 1.91배 증강) 및 백출 (AM-3, 1.84배 증강)의 조다당 획분이 다른 생약재의 획분보다 높은 활성을 보이고 있었으며, 열수추출물에서 가장 높은 활성을 보인 진피의 경우에는 조다당 획분 (CL-3, 1.84배 증강)으로 분획하여도 활성이 거의 증가하지는 않았다 (Table 7).

한편, 종양전이 억제활성에서의 결과를 살펴보면, 골수세포 증식활성과 유사하게 조다당 획분을 제외하고는 다른 용매의 획분에서는 높은 활성을 보이지 않았으며 가시가시오가피의 조다당 획분이 (AS-3, 시료농도 50 $\mu\text{g}/\text{mouse}$, 대조군의 88.4% 억제) 가장 높은 활성을 보여주었다 (Table 8). 또한 다른 4종의 활성 생

약재의 경우에도 열수추출물과 비교하여 조다당 획분에서 증가되는 경향을 나타내었으며 (AM-3, 78.1% 억제; GU-3, 72.9% 억제; CL-3, 69.0% 억제; PG-3, 69.7% 억제) (Table 8), 이는 열수추출물로부터 조다당 획분이 조제되는 분획과정을 통하여 골수세포 증식 및 종양전이 억제활성에 관여하는 물질이 상당부분 조다당 획분에 함유되어진 것으로 추정할 수 있었다.

이러한 결과로부터 활성 생약재의 열수추출물로부터 조다당 획분의 분획과정을 통하여 활성이 증가되고 있음을 알 수 있었으며, 또한 메탄올 및 에탄올-가용성 획분의 경우에는 활성을 나타내지 않는 결과를 통하여 활성 생약재의 골수세포 증식활성 및 종양전이 억제활성에 관여하는 열수추출물의 활성성분은 메탄올 및 에탄올 등의 유기용매에 가용성인 저분자류보다는 물에 용해되어 용출되는 다당 또는 단백질 등의 고분자류가 주성분임을 추정할 수 있었다.

Table 7. Bone marrow cell proliferating activity of subfractions prepared from hot-water extract of herbal medicines (sample; 100 μ g/mL).

Herb	Fraction	Fluorescence intensity (mean \pm S.D)
Control (saline only)	-	440 \pm 30
<i>A. macrocephale</i> (백출)	AM-0	750 \pm 130
	AM-1	630 \pm 100
	AM-2	500 \pm 30*
	AM-3	810 \pm 50*
<i>A. senticosus</i> (가시가지시오가피)	AS-0	760 \pm 50*
	AS-1	490 \pm 80
	AS-2	510 \pm 90
	AS-3	840 \pm 60*
<i>C. leticulata</i> (진피)	CL-0	800 \pm 50*
	CL-1	670 \pm 40*
	CL-2	430 \pm 80
	CL-3	810 \pm 120
<i>G. uralensis</i> (감초)	GU-0	710 \pm 40*
	GU-1	500 \pm 110
	GU-2	490 \pm 30*
	GU-3	750 \pm 50*
<i>P. ginseng</i> (인삼)	PG-0	640 \pm 90
	PG-1	550 \pm 30*
	PG-2	450 \pm 30*
	PG-3	680 \pm 90

AM, AS, CL, GU, PG-0, 1, 2, 3; hot-water extract, MeOH-soluble, EtOH-soluble, and crude polysaccharide fraction from *A. macrocephale*, *A. senticosus*, *C. leticulata*, *G. uralensis*, and *P. ginseng*. Values represent the means \pm S.D (n=4). *p<0.05; significance between the control and subfraction prepared from each herbal medicine.

따라서 이러한 열수추출물로부터 분획된 조다당 획분의 활성성분을 동정하기 위하여 골수세포 증식 및 종양전이 억제활성에서 높은 활성을 나타낸 가시가지오가피와 백출의 조다당 획분을 Pronase 등의 효소 또는 Periodate와 Chlorite 등의 화학적인 처리방법을 이용하여 활성에 관여하는 주요 성분을 밝히고자 하였다. 즉, 이러한 효소 또는 화학적 처리에 의해 활성분체를 수식하여 활성에 미치는 영향을 살펴봄으로써 활성에 관여하는 성분을 동정하고자 하였다.

Table 8. Tumor metastasis inhibiting activity of subfractions prepared from hot-water extract of herbal medicines (50 μ g/mouse).

Herb	Fraction	Number of lung metastasis (mean \pm S.D)
Control (saline only)	-	155 \pm 23
<i>A. macrocephale</i> (백출)	AM-0	46 \pm 6*
	AM-1	128 \pm 33
	AM-2	133 \pm 19*
	AM-3	34 \pm 5*
<i>A. senticosus</i> (가시가지오가피)	AS-0	44 \pm 6*
	AS-1	130 \pm 40
	AS-2	127 \pm 35
	AS-3	18 \pm 3*
<i>C. leticulata</i> (진피)	CL-0	60 \pm 15
	CL-1	104 \pm 15*
	CL-2	118 \pm 16*
	CL-3	48 \pm 15
<i>G. uralensis</i> (감초)	GU-0	53 \pm 14
	GU-1	119 \pm 17*
	GU-2	130 \pm 35
	GU-3	42 \pm 6*
<i>P. ginseng</i> (인삼)	PG-0	61 \pm 9*
	PG-1	116 \pm 17*
	PG-2	124 \pm 17*
	PG-3	47 \pm 15

AM, AS, CL, GU, PG-0, 1, 2, 3; hot-water extract, MeOH-soluble, EtOH-soluble, and crude polysaccharide fraction from *A. macrocephale*, *A. senticosus*, *C. leticulata*, *G. uralensis*, and *P. ginseng*. Values represent the means \pm S.D (n=4). *p<0.05; significance between the control and subfraction prepared from each herbal medicine.

가시가지오가피와 백출의 조다당 획분을 처리한 후, 이들을 각각 Pronase 소화-획분, Periodate 산화-획분 및 Chlorite 처리-획분으로 조제한 후 활성을 살펴본 결과, 먼저 골수세포 증식활성의 경우 가시가지오가피는 Pronase 소화 (시료 농도 100 μ g/mL, 조다당 획분 활성의 44.2% 감소) 및 Periodate 산화-획분에서 (74.4% 감소) 현저히 활성이 감소됨을 알 수 있었으며, 백출의 경우에는 특히 Periodate 산화-획분에서 처리 전의 조다당 획분 활성보다 63.5%가 감소되었다 (Fig. 6).

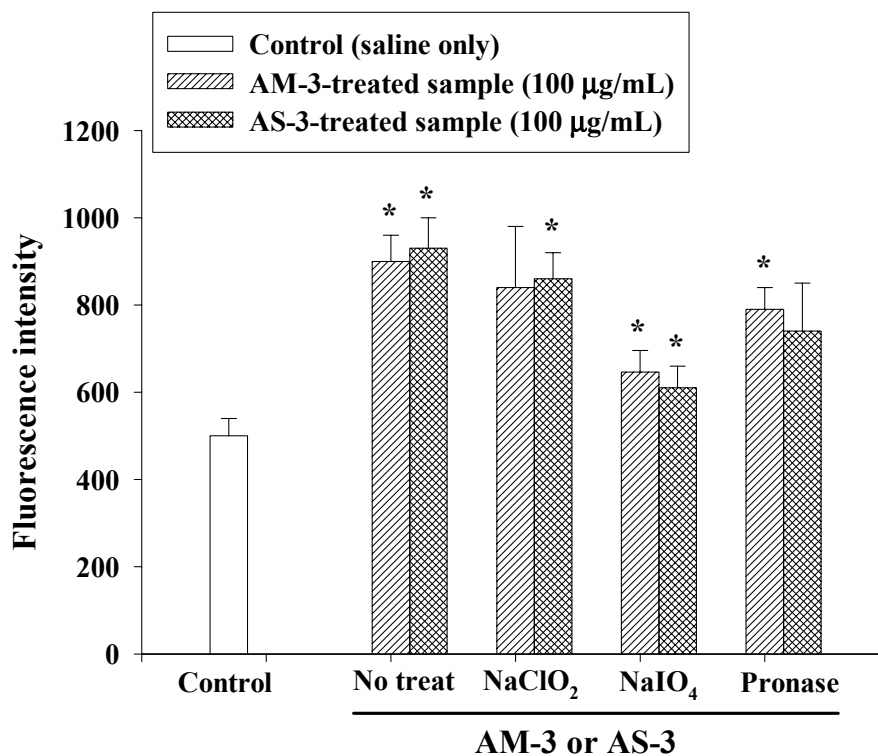


Fig. 6. Effect of chemical and enzymatic treatments of AM-3 and AS-3 on bone marrow cell proliferating activity(100 µg/mL). No treat; AM-3 and AS-3 (crude polysaccharide fraction from *A. macrocephale*, and *A. senticosus*). Values represent the means ± S.D (n=4). *p<0.05; significance between the control and AM-3/AS-3 or the treated sample of AM-3 and AS-3.

한편, 이러한 경향은 종양전이 억제활성의 경우에도 유사하게 입증되었는데, 가시가시오가피와 백출 모두에서 Pronase 또는 Chlorite 처리-획분의 경우, 활성의 감소가 미약한 반면에 Periodate 산화-획분의 활성이 조다당 획분과 비교하여 시료농도 50 µg/mouse에서, 각각 62.2%와 49.6%로 현저히 감소됨을 알 수 있었다 (Fig.7).

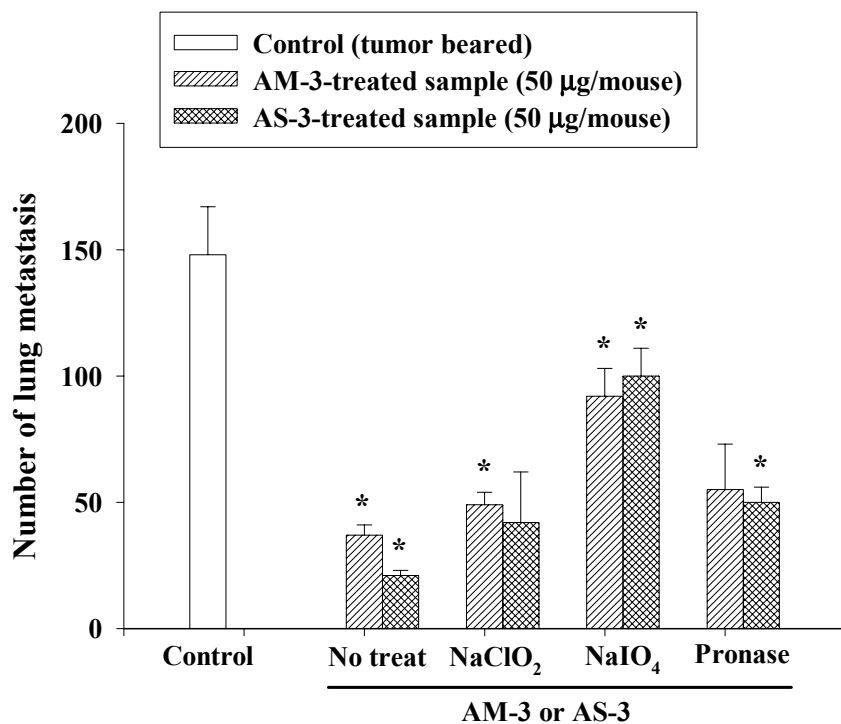


Fig. 7. Effect of chemical and enzymatic treatments of AM-3 and AS-3 on tumor metastasis inhibiting activity (50 µg/mouse). No treat; AM-3 and AS-3 (crude polysaccharide fraction from *A. macrocephale*, and *A. senticosus*). Values represent the means ± S.D (n=4). *p<0.05; significance between the control and AM-3/AS-3 or the treated sample of AM-3 and AS-3.

이와 같은 결과로부터 활성을 갖는 생약재, 즉 가시가지오가피와 백출 등의 열수추출물의 경우, 골수세포 증식 및 종양전이 억제활성에 관여하는 활성물질이 대부분 당으로 구성되어진 물질을 함유하고 있음을 알 수 있는데 이는 Periodate의 주 작용이 당에 작용하여 당의 구조를 붕괴시킬 수 있다는 사실로부터 추정할 수 있다. 한편 단백질도 일부 관여하는 것으로도 생각되어 있는데 특히 가시가지

오가피의 경우에 Pronase 처리로서 활성이 감소하는 결과가 이를 보여주는 것으로 생각할 수 있다. 또한 Tannin 등과 같은 당과 phenol류가 다수 결합된 고분자 물질에 영향을 줄 수 있는 Chlorite 처리에 의해서는 거의 활성에 영향을 받지 않는 결과를 통하여 활성에 이러한 물질이 직접적으로 관여하지는 않는 것으로 나타났다. 따라서 활성 생약재의 열수추출물의 경우에는 무엇보다도 다당류가 중요한 활성물질의 주성분으로 관여하고 있음을 알 수 있으며 일부 단백질이 관여하는 것으로 추정되어졌다.

다. 혼합생약재로부터 열수추출물의 조제와 활성검색

가시가지오가피, 백출, 진피, 감초 및 인삼 등의 생약재로부터 열수를 이용하여 추출한 열수추출물의 경우, 대조군과 비교하여 또는 다른 검색된 생약재와의 활성검색의 결과에서도 높은 골수세포 증식활성 및 종양전이 억제활성을 갖는 것을 알 수 있었다. 또한 이러한 5종의 생약재 열수추출물은 충분히 개별적으로도 활용할 수 있는 우수한 활성을 갖는 생약재임을 밝혔다. 그러나 본 연구과제의 최종목표는 이러한 활성을 갖는 생약재를 이용하여 증류음료로 개발하는 것에 두고 있기 때문에 활성 생약재를 개별적으로 이용하는 방법보다는 여러 생약재를 혼합하여 혼합생약재로서 음료화 하는 것이 훨씬 산업적으로도 번거롭지 않고 적용가능성이 높기 때문에 활성 생약재 원료가 혼합된 경우에도 충분한 활성을 나타내는지를 이미 활성이 확인된 열수추출물을 이용하여 검토하고자 하였다. 또한 생약재 추출물인 경우에는 혼합되어 추출될 경우 다양한 성분의 혼합으로 인하여 상승효과 혹은 감소효과를 동반할 수 있기 때문에 생약재의 증류액을 이용하여 증류음료를 개발하기 위한 기초실험으로서 생약재 원료를 혼합한 혼합생약재를 조제하고 이로부터 열수추출물을 추출하여 개별 추출물과의 활성을 검토하고 최적의 혼합레시피를 구하여 이를 근거로 증류음료의 개발에 이용하고자 하였다.

먼저, 생약재 원료의 다양한 레시피의 원료별 배합비율을 만들기 위해 지금까지 높은 활성을 갖는 것으로 밝혀진 가시가지오가피, 백출, 진피, 감초 및 인삼의 5종의 원료를 골수세포 증식활성 또는 종양전이 억제활성의 활성도에 근거하여 계산함으로써 배합비를 작성하였다 (Table 1). 즉, 일반적으로 모든 활성에서 우

수한 결과를 보여주었던 가시가지오가피와 백출을 주 구성분으로 하고 여기에 나머지 진피, 감초 및 인삼의 배합비율을 적당히 조절하여 어느 생약재의 개별 추출물보다 우수한 활성을 나타낼 수 최적의 혼합레시피를 찾고자 하였다. 개별 생약재의 원료를 Table 1과 같이 배합하여 5종류의 레시피에 해당하는 시료군을 조제한 후 이를 개별적으로 생약재로부터 열수추출물을 조제하였던 방법과 동일하게 처리하여 각 레시피 시료군으로부터 열수추출물을 제조한 후 골수세포 증식활성과 종양전이 억제활성을 측정하였다.

골수세포 증식활성 및 종양전이 증식활성의 모든 활성에서 어떠한 생약재 단독의 열수추출물보다 우수한 활성을 보이면서 조제된 5종류의 레시피 시료군 중에서도 가장 활성이 높은 레시피군은 HW-C로서 가시가지오가피 : 백출 : 진피 : 감초 : 인삼 = 30 : 30 : 15 : 15 : 10의 배합비율이었다 (Fig. 8과 9). 이와 같은 생약재의 비율로 혼합된 HW-C의 경우, 골수세포 증식활성에서는 개별 생약재 열수추출물에서 가장 높은 활성을 보인 진피가 (CL-0) 1.83배 증강되었던 것에 비하여 2.04배의 증강된 활성을 (시료농도 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 보였으며, 시료농도 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 낮은 농도에서도 1.61배의 증강된 높은 활성을 나타내었다 (Fig. 8). 종양전이 억제활성의 경우에서도 71.7%의 억제활성을 보였던 가시가지오가피의 열수추출물 (AS-0) 보다 증강된 84.1% 억제의 활성을 (시료농도 50 $\mu\text{g}/\text{mouse}$) 보였으며, 10배의 낮은 시료농도인 5 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ 에서도 64.8% 억제의 종양전이 억제활성을 나타냄으로서 단독 생약재의 열수추출물보다 혼합생약재로서 제조되는 것이 활성에서 유리함을 알 수 있었다 (Fig. 9). HW-C의 레시피를 기준으로 이러한 비율보다 가시가지오가피와 백출의 비율이 감소하는 HW-A (1.78배 증강, 70.3% 억제)의 경우에는 HW-C에 비하여 활성이 현저히 저하되면서 진피의 열수추출물이나 가시가지오가피의 열수추출물에 비하여도 낮은 활성을 나타내었으며, 또한 진피와 감초가 증가하는 HW-B의 경우에는 (1.91배 증강, 77.2% 억제) 단독 생약재 추출물보다는 높았으나 HW-C에 비하여 활성이 감소함을 알 수 있었다 (Fig. 8과 9). 한편, 주성분인 가시가지오가피와 백출의 비율이 증가한 HW-D (2.0배 증강, 85.5% 억제) 또는 HW-E (2.11배 증강, 84.8% 억제)의 경우에는 HW-C와 거의 유사한 활성을 나타냄으로써 주성분의 첨가율을 상승시키는 것으로 활성에 큰 영향을 미치지 않는 듯하였다 (Fig. 8과 9).

이러한 결과로부터 5종의 활성 생약재로부터 개별적인 생약재의 열수추출물의 활성도를 근거로 하여 적당한 비율로 혼합하여 조제한 혼합생약재 열수추출물의 경우, 역시 단독으로 높은 활성을 보였던 가시가지오가피와 백출의 양이 일정 비율 (약 30%) 함유되어져 있어야만 우수한 활성을 나타내는 것으로 보인 반면, 과량으로 첨가된 경우 (35% 이상)에는 활성증가에 뚜렷한 영향을 주지 못하는 것으로 추정할 수 있다. 또한 상대적으로 활성이 약한 진피와 감초가 가시가지오가피 및 백출보다 상대적으로 많이 첨가되면 활성의 저하를 초래하는 것으로 보인다. 한편, 어느 레시피의 군에서도 개별 생약재의 열수추출물보다 현저히 높은 활성을 갖는 것을 보여주지는 않았는데 이는 혼합생약재의 다양한 성분에 기인하는 것으로 보이며 또한 단독의 경우보다 혼합되어 있을 경우 추출과정에서 여러 복합적인 반응이 발생함으로써 5종의 활성 생약재가 혼합되었기 때문에 4-5배정도의 활성의 증가를 가져올 것이라는 산술적인 활성의 증가를 가져오지는 않는 것으로 추정된다. 또한 5종의 생약재 원료로부터 유래되는 많은 활성성분이 포함되어 있을 지라도 열수추출의 조건이 단독처리와 동일함으로써 용해도 등의 물리화학적 한계로 인하여 활성성분으로 파악된 다당류 등의 고분자 물질의 추출에 제약을 가져왔을 것으로 예상할 수 있다. 이와 같이 밝혀지지 않은 많은 원인에도 불구하고 생약재를 단독으로 처리한 열수추출물보다는 일정비율로 5종의 활성 생약재를 혼합한 경우가 활성의 증가를 가져올 수 있다는 것을 알 수 있었기 때문에 증류액을 이용한 음료로의 개발의 경우에도 이러한 방법을 검토하여 보다 산업적으로 적용가능한 증류음료의 조제에 이용될 수 있으리라 생각한다.

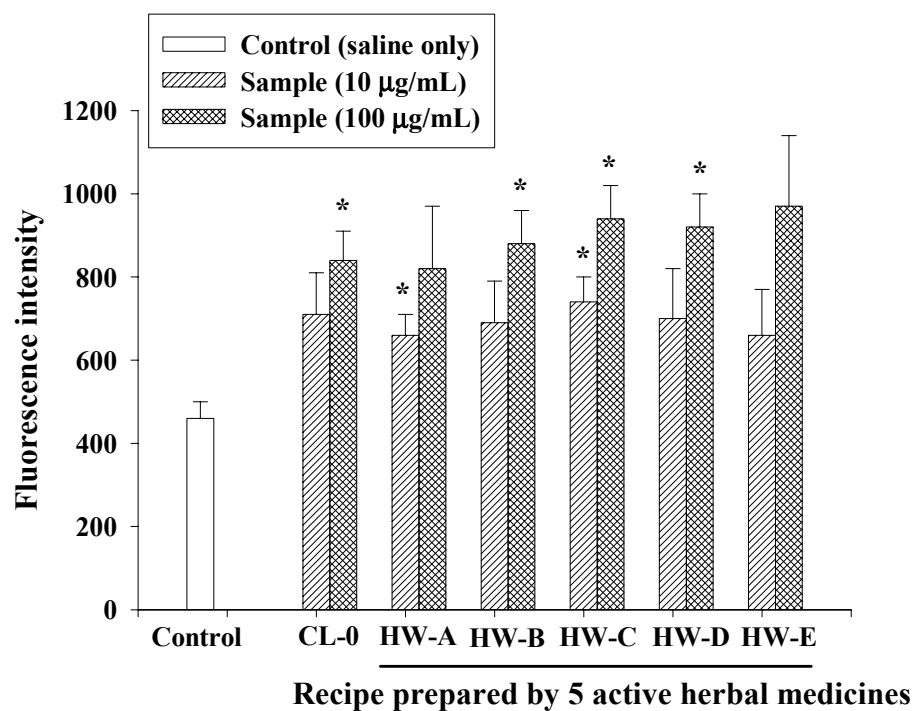


Fig. 8. Bone marrow cell proliferating activity of recipes prepared by 5 active herbal medicines. CL-0; hot-water extract from *C. leticulata*, HW-A, B, C, D and E; recipes prepared by Table 1. Values represent the means \pm S.D (n=4). *p<0.05; significance between the control and recipe prepared by 5 active herbal medicines.

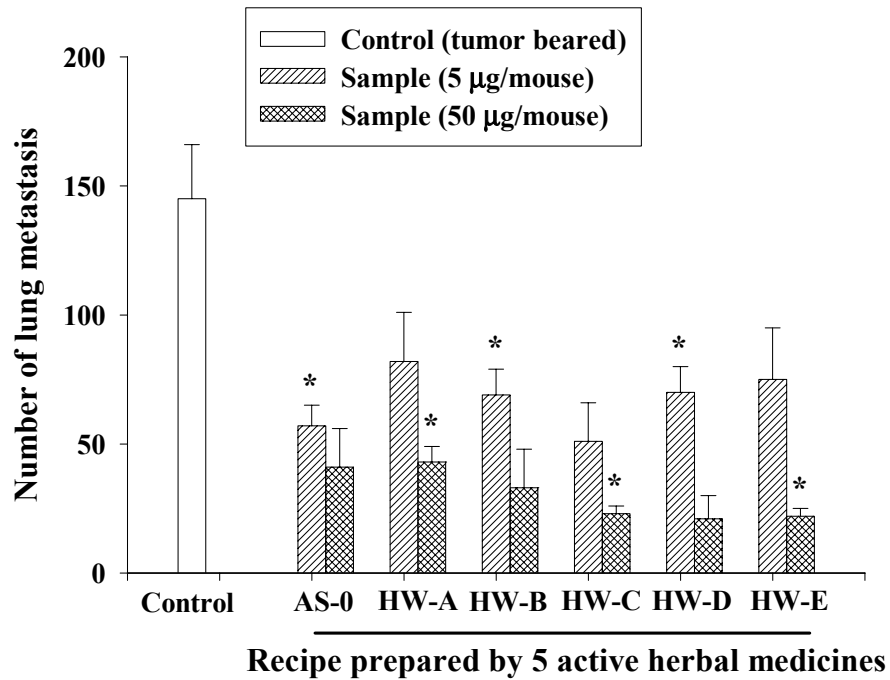


Fig. 9. Tumor metastasis inhibiting activity of recipes prepared by 5 active herbal medicines. CL-0; hot-water extract from *C. leticulata*, HW-A, B, C, D and E; recipes prepared by Table 1. Values represent the means \pm S.D (n=4). *p<0.05; significance between the control and recipe prepared by 5 active herbal medicines.

2. 증류액 조제 및 활성성분 분석

가. 증류액 조제와 활성검색

1차년도 30여종의 생약재로부터 조제된 열수추출물 및 증류액의 골수세포 증식 활성과 종양전이 억제활성의 검색결과 및 2차년도 상기의 실험으로부터 골수세포 증식활성 및 종양전이 억제활성이 우수함이 다시 입증된 가시가지오가피, 백출, 진피, 감초 및 인삼으로부터 개별 증류액을 조제하기 위하여 이러한

생약의 추출공정을 연속수증기 증류법에 사용하는 Likens-Nickerson 장치를 이용하여 5종 생약재의 개별 증류액을 조제하였다. 추출관 한쪽에는 증류수 300 mL과 5종의 생약재를 개별적으로 30 g씩 첨가하여 가열추출하고, 다른 한쪽에는 *n*-Pentane과 Diethyl ether를 2 : 1의 비율로 혼합한 혼합액 50 mL을 43°C에서 1시간 정도 가열한 후, 수분을 제거하기 위하여 Sodium sulfate를 넣고 냉장보관을 하였다. 최종적으로 증류액의 경우에는 감압농축기 등의 농축방법 및 동결건조 등의 건조를 사용하는 경우에 증류성분의 손실이 우려되어 냉장보관된 증류액을 질소가스를 이용하여 2 mL의 최종부피가 되도록 농축함으로써 생약재 각각의 증류액으로 조제하였다. 이와 같이 조제된 5종 생약재의 개별 증류액을 대상으로 증류음료로 활용하기 위하여 이들의 활성을 재확인함과 동시에 활성성분을 밝히기 위한 기본획분으로 사용하고자 하였다. 조제된 각 생약재 증류액의 활성을 검토한 결과, Fig. 10에서 보이는 것처럼 Peyer's patch를 통한 골수세포 증식활성의 경우에는 1차년도와 유사하게 열수추출물과는 현저한 활성의 감소를 보이지만, 5종의 생약재 중에서는 백출의 증류액 (AM-SD)이 가장 높은 활성을 보였으며 (시료농도 100 µL/mL, 대조군의 1.49배 증강), 다음으로 진피 (CL-SD, 1.37배 증강)와 가시가지시오가피 (AS-SD, 1.32배 증강)가 유의적으로 골수세포를 증식시키는 결과를 얻을 수 있었으며, 감초 (GU-SD, 1.22배 증강)와 인삼 (PG-SD, 1.2배 증강)은 대조군보다 약간 높은 활성을 나타내었다.

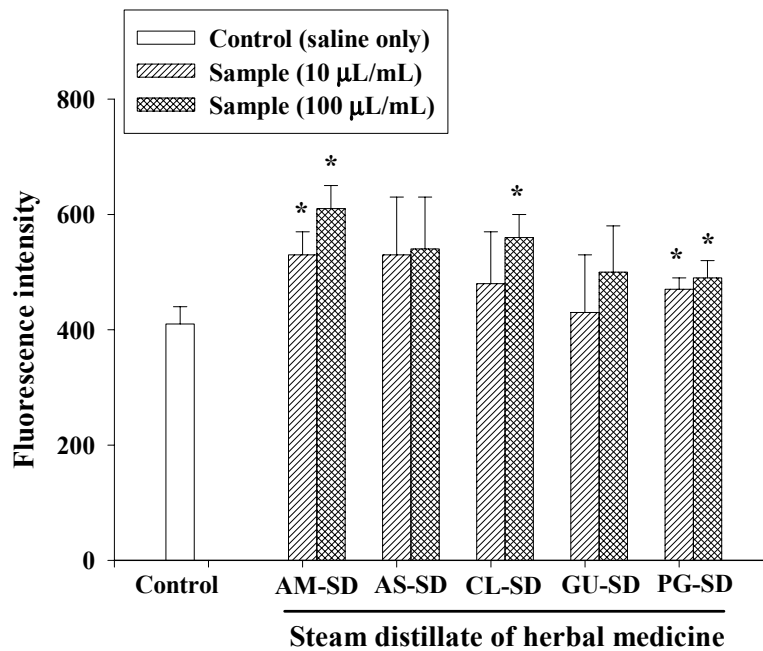


Fig. 10. Bone marrow cell proliferating activity of steam distillates from herbal medicines. AM-, AS-, CL-, GU-, and PG-SD; steam distillate from *A. macrocephale*, *A. senticosus*, *C. leticulata*, *G. uralensis*, and *P. ginseng*. Values represent the means \pm S.D (n=4). *p<0.05; significance between the control and steam distillate of each herbal medicine.

한편, Colon 26-M3.1 lung carcinoma cell line을 이용한 폐로의 종양전이 억제 활성 결과에서도, 백출 (AM-SD, 시료농도 100 µL/mouse, 대조군의 50.3% 억제) 과 가시가지오가피 (AS-SD, 45.5% 억제)가 열수추출물과 비교하면 낮은 활성을 나타내지만 5종의 생약재 중에서는 골수세포 증식활성과 함께 여전히 높은 활성을 나타내었으며 감초 (GU-SD, 37.8% 억제), 진피 (CL-SD, 32.9% 억제) 및 인삼 (PG-SD, 25.2% 억제)의 경우에도 대조군보다는 높은 활성을 보여주어 1차년도의 30여종의 활성검색 및 열수추출물의 활성결과와 동일한 결과를 얻을 수 있었다 (Fig. 11).

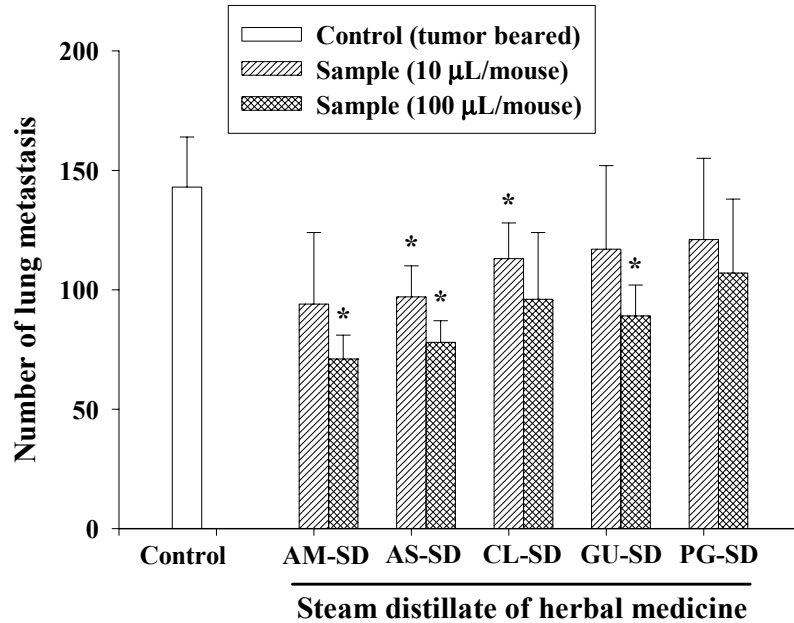


Fig. 11. Tumor metastasis inhibiting activity of steam distillates from herbal medicines. AM-, AS-, CL-, GU-, and PG-SD; steam distillate from *A. macrocephale*, *A. senticosus*, *C. leticulata*, *G. uralensis*, and *P. ginseng*. Values represent the means \pm S.D (n=4). *p<0.05; significance between the control and steam distillate of each herbal medicine.

지금까지의 결과로부터 열수추출물의 경우와는 달리, 증류액의 경우에는 활성이 현저히 감소됨을 보여주었는데, 이는 다음과 같은 몇 가지의 원인에 근거하는 것으로 사료된다. 첫째로 열수추출물의 경우에는 동결건조를 통하여 얻어진 시료를 중량으로 정확히 측정하여 활성검색을 실시하였으나 증류액의 경우, 1차년도에는 이를 완전히 건조시켜 건조물로 이용하였으나 이 과정에서 많은 손실과 함께 건조물의 상태가 완전하지 못하는 등의 건조 및 농축 등의 어려움으로 인하여 2차년도에는 이를 완전히 건조시키지 않고 일정한 생약재 원료의 양으로부터 일

정한 증류액의 농축부피를 조제하여 이러한 농축액을 시료로서 사용하여 활성검색을 실시함으로써 열수추출물과의 활성결과에서의 비교가 절대적이지 못하다는 것이다. 즉, 증류액의 경우 단지 농축액의 상태로만 조제되었기에 수율의 측정이 어렵고, 건조물 상태로 활성을 측정하는 열수추출물과는 동일 중량의 비교가 불가능하기 때문에 단지 활성결과만을 통해 어느 획분의 활성이 높을 것이라는 비교는 어렵다는 점이다. 둘째로 열수추출물과 증류액과의 활성의 차이는 활성성분이 다른 것임을 나타내어주는 결과로서 열수추출물이 대부분 다당 및 단백질 등의 고분자가 주성분인 것에 비해 증류액의 경우에는 저분자 물질이 주성분일 가능성이 많아 이러한 함유 성분의 차이가 이와 같이 활성에 영향을 미치는 것이라고 추정할 수 있을 것이다.

한편, 이러한 결과로부터 생약재 증류액의 활성검색 결과에 의해 선택된 가시가지오가피, 백출, 진피, 감초 및 인삼의 생약재로부터 조제된 증류액은 활성에 관여하는 성분이 열수추출물과는 다른 활성성분이 다량 함유되어 있음을 재차 확인할 수 있었으며 이러한 활성 생약재 증류액으로부터 분획을 통하여 우수한 활성을 갖는 획분의 활성성분을 분리하고, 활성성분의 구성물질을 동정하여 열수추출물과의 차이점을 알아보고 이를 증류음료로 활용할 수 있는지의 가능성을 타진하고자 하였다.

나. 활성 성분의 분리 및 동정

가시가지오가피를 포함하는 5종의 골수세포 증식활성 및 종양전이 억제활성 물질이 함유된 증류액으로부터 활성성분을 분리하고 이들이 어떤 성분으로 구성되어 있는지를 검토하기 위하여 각 생약재의 개별 증류액을 다음과 같이 분획하였다. 즉, 각 활성 생약재의 증류액을 농축 후 적당량의 DIW에 분산시켜 건조하고 DIW : CHCl₃ (1 : 1) 혼합용액으로 분획하고 농축하여 유기용매-가용획분 (AM-, AS-, CL-, GU-와 PG-SD-1) 및 DIW-가용획분 (AM-, AS-, CL-, GU-와 PG-SD-3)으로 분획하여 조제하였다. 이와 같이 분획된 각 생약재의 획분을 이용하여 골수세포 증식활성을 측정된 결과, Table 9에서 보이는 것처럼 대부분 활성 생약재에서 유기용매-가용획분이 분획 전의 증류액 획분 정도의 활성을 보

이고 있는 반면에, DIW-가용획분의 경우에는 대조군에 비해 약간 높거나 유사한 정도의 낮은 활성을 나타내었다. 이러한 유기용매-가용획분 중에서도, 특히 백출 (AM-SD-1, 시료농도 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 대조군의 1.44배 증강), 진피 (CL-SD-1, 1.39 배 증강) 및 가시가지시오가피 (AS-SD-1, 1.34배 증강)의 유기용매-가용획분이 다른 생약재의 획분보다 높은 활성을 보이고 있어, 분획 전 증류액 획분에서와 유사한 생약재에 따른 골수세포 증식활성을 나타내었다 (Table 9).

Table 9. Bone marrow cell proliferating activity of subfractions prepared from steam distillates of herbal medicines (sample; 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$).

Herb	Fraction	Fluorescence intensity (mean \pm S.D)
Control (saline only)	-	410 \pm 30
<i>A. macrocephale</i> (백출)	AM-SD	610 \pm 40*
	AM-SD-1	590 \pm 30*
	AM-SD-3	430 \pm 80
<i>A. senticosus</i> (가시가지시오가피)	AS-SD	540 \pm 90
	AS-SD-1	550 \pm 30*
	AS-SD-3	400 \pm 90
<i>C. leticulata</i> (진피)	CL-SD	560 \pm 40*
	CL-SD-1	570 \pm 110
	CL-SD-3	470 \pm 30*
<i>G. uralensis</i> (감초)	GU-SD	500 \pm 80
	GU-SD-1	480 \pm 30*
	GU-SD-3	410 \pm 20*
<i>P. ginseng</i> (인삼)	PG-SD	490 \pm 30*
	PG-SD-1	490 \pm 100
	PG-SD-3	440 \pm 80

AM-, AS-, CL-, GU-, PG-SD와 SD-1 및 3; steam distillate, organic solvent-soluble, and DIW-soluble fraction from *A. macrocephale*, *A. senticosus*, *C. leticulata*, *G. uralensis*, and *P. ginseng*. Values represent the means \pm S.D (n=4). *p<0.05; significance between the control and subfraction prepared from each herbal medicine.

한편, 종양전이 억제활성에서의 결과를 살펴보면, 골수세포 증식활성과 유사하게 유기용매-가용획분이 DIW-가용획분보다 높은 활성을 나타내고 있었으며 분획 전의 증류액과는 다르게 가시가지오가피의 유기용매-가용획분 (AS-SD-1, 시료농도 100 μ L/mouse, 대조군의 48.3% 억제) 가장 높은 활성으로 분획 전의 증류액보다 약간 증가된 활성을 보여주었다 (Table 10).

Table 10. Tumor metastasis inhibiting activity of subfractions prepared from steam distillates of herbal medicines (100 μ L/mouse).

Herb	Fraction	Number of lung metastasis (mean \pm S.D)
Control (saline only)	-	143 \pm 21
<i>A. macrocephale</i> (백출)	AM-SD	71 \pm 10*
	AM-SD-1	77 \pm 31
	AM-SD-3	105 \pm 40
<i>A. senticosus</i> (가시가지오가피)	AS-SD	78 \pm 9*
	AS-SD-1	74 \pm 10*
	AS-SD-3	110 \pm 38
<i>C. leticulata</i> (진피)	CL-SD	96 \pm 28
	CL-SD-1	108 \pm 16*
	CL-SD-3	116 \pm 17*
<i>G. uralensis</i> (감초)	GU-SD	89 \pm 13*
	GU-SD-1	99 \pm 14*
	GU-SD-3	108 \pm 38
<i>P. ginseng</i> (인삼)	PG-SD	107 \pm 31
	PG-SD-1	111 \pm 15*
	PG-SD-3	119 \pm 16*

AM-, AS-, CL-, GU-, PG-SD와 SD-1 및 3; steam distillate, organic solvent-soluble, and DIW-soluble fraction from *A. macrocephale*, *A. senticosus*, *C. leticulata*, *G. uralensis*, and *P. ginseng*. Values represent the

means \pm S.D (n=4). *p<0.05; significance between the control and subfraction prepared from each herbal medicine.

한편, 다른 4종의 활성 생약재의 경우에는 분획 전의 증류액과 비교하여 유기용매-가용획분에서 DIW-가용획분 또는 대조군보다는 높지만 감소하는 경향을 나타내었는데 (AM-SD-1, 46.2% 억제; GU-SD-1, 30.9% 억제; CL-SD-1, 24.5% 억제; PG-SD-1, 22.4% 억제), 이는 백출 및 감초의 DIW-가용획분의 활성이 (AM-SD-3; 26.6% 억제, GU-SD-3; 24.5% 억제) 가시가지오가피의 DIW-가용획분 (AS-SD-3, 23.1% 억제) 보다 약간 증가된 활성을 보이는 것으로 보아 증류액으로부터 유기용매-가용획분과 DIW-가용획분으로 조제되는 분획과정을 통하여 골수세포 증식 및 종양전이 억제활성에 관여하는 물질 일부가 DIW-가용획분으로 분리되어 활성을 감소시키는 것으로 추정할 수 있었다 (Table 10).

이러한 결과로부터 활성 생약재의 증류액으로부터 유기용매-가용획분의 분획과정을 통하여 활성성분이 포함된 획분이 분리되었음을 알 수 있었으며, 또한 DIW-가용획분의 경우에는 활성이 분획 전의 증류액에 비하여 현저히 저하되면서 대조군과 유사한 활성을 나타내는 결과를 통하여 활성 생약재의 골수세포 증식활성 및 종양전이 억제활성에 관여하는 증류액의 활성성분은 물 등에 가용성인 친수성 물질보다는 극성이 낮은 유기용매에 가용성인 소수성의 저분자류가 주성분일 가능성을 높여주었다. 또한 Resveratrol을 표준물질로 하여 Folin-ciocalteu reagent를 이용하여 폴리페놀 등의 함량을 측정된 결과, 생약재 증류액으로부터 분획된 유기용매-가용성 획분의 경우 모든 획분에서 폴리페놀이 20-30% 정도 함유되어 있는 것으로 나타났다.

한편, 이와 같이 증류액으로부터 분획된 유기용매-가용획분의 활성성분이 열수추출물과 어떤 차이를 가지고 있는지를 밝히기 위하여 열수추출물의 조다당 획분에서 처리하였던 방법과 유사하게 골수세포 증식 및 종양전이 억제활성에서 높은 활성을 나타낸 가시가지오가피와 백출의 유기용매-가용획분을 (AS- 및 AM-SD-1) 이용하여 Pronase 등의 효소 또는 Periodate와 Chlorite 등의 화학적인 처리를 실시하였다. 즉, 이러한 효소 또는 화학적 처리에 의해 활성분체를 수식하여 활성에 미치는 영향을 살펴봄으로써 활성에 관여하는 성분을 동정하고자

하였다.

가시가지오가피와 백출의 유기용매-가용획분을 조제한 후, 이들을 각각 Pronase 소화-획분, Periodate 산화-획분 및 Chlorite 처리-획분으로 조제한 후 활성을 살펴 본 결과, 먼저 골수세포 증식활성의 경우 가시가지오가피는 Pronase 소화에서는 거의 활성에 변화가 없었으며 (시료농도 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 유기용매-가용획분 활성의 9.5% 감소), Periodate 산화-획분과 (23.5% 감소) Chlorite 처리-획분에서는 (29.4%) 약간 활성이 감소됨을 알 수 있었으며, 백출의 경우에는 Chlorite 처리-획분을 (23.8% 감소) 제외하고는 거의 모든 획분에서 활성에 큰 변화를 보이지 않았다 (Fig. 12).

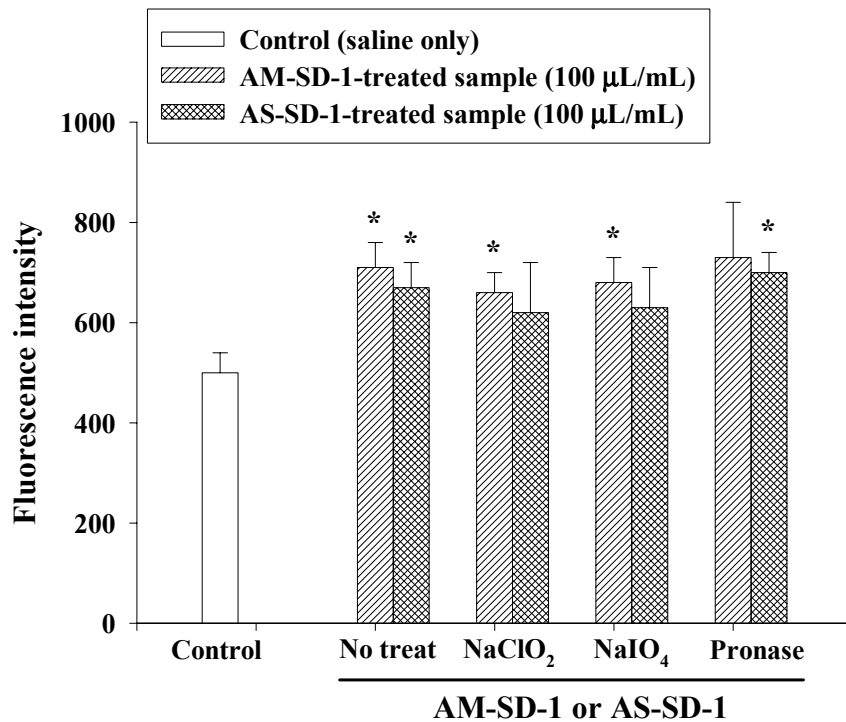


Fig. 12. Effect of chemical and enzymatic treatments of AM- and AS-SD-1 on bone marrow cell proliferating activity (100 $\mu\text{L}/\text{mL}$). No treat; AM- and AS-SD-1 (organic solvent-soluble fraction from *A. macrocephale*, and *A.*

senticosus). Values represent the means \pm S.D (n=4). *p<0.05; significance between the control and AM-SD-1/AS-SD-1 or the treated sample of AM- and AS-SD-1.

한편, 이러한 경향은 종양전이 억제활성의 경우에도 유사하게 입증되었는데, 가시가지오가피와 백출 모두에서 Pronase 소화와 Periodate 산화-획분의 경우, 활성의 감소가 거의 보이지 않는 반면에 Chlorite 처리-획분의 활성이 유기용매-가용 획분과 비교하여 시료농도 100 μ L/mouse에서, 각각 31.3%와 24.5%로 감소됨을 알 수 있었다 (Fig. 13).

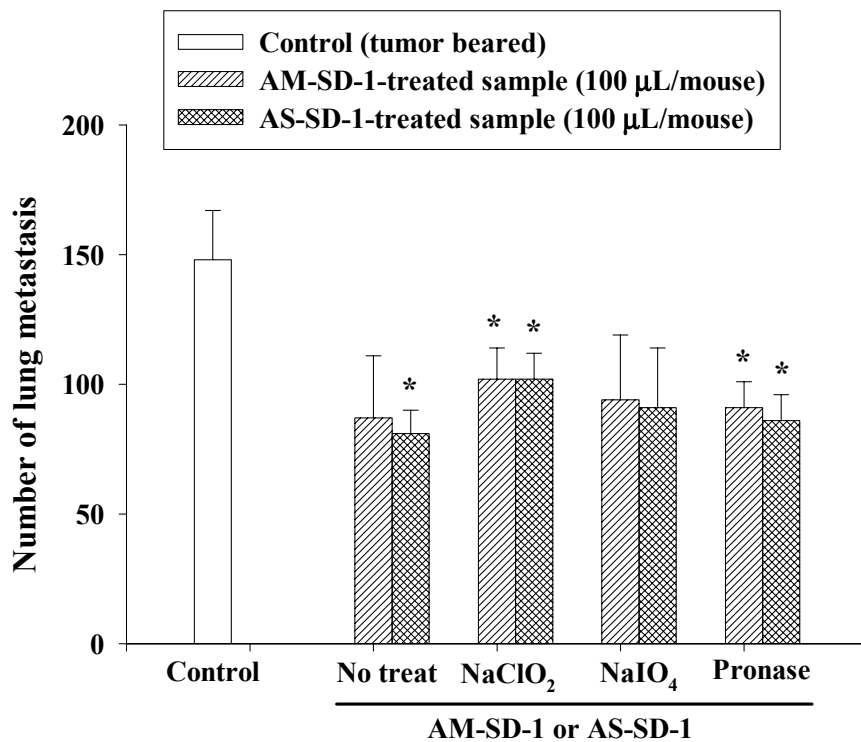


Fig. 13. Effect of chemical and enzymatic treatments of AM- and AS-SD-1 on tumor metastasis inhibiting activity (100 μ L/mL). No treat; AM- and AS-SD-1 (organic solvent-soluble

fraction from *A. macrocephale*, and *A. senticosus*). Values represent the means \pm S.D (n=4). *p<0.05; significance between the control and AM-SD-1/AS-SD-1 or the treated sample of AM- and AS-SD-1.

이와 같은 결과로부터 활성을 갖는 생약재, 즉 가시가지오가피와 백출 등의 증류액의 경우, 골수세포 증식 및 종양전이 억제활성에 관여하는 활성물질이 열수 추출물의 조다당 획분이 대부분 당으로 구성되어진 물질인 것과 달리, 고분자 물질보다는 페놀류 등의 저분자 물질이 주로 함유되어 있음을 알 수 있는데 이는 Chlorite의 주 작용이 당과 페놀류가 결합되어진 tannin 등의 페놀 등에 작용하여 페놀구조의 변형을 초래한다는 사실로부터 추정할 수 있다. 그러나 Chlorite 처리의 경우에도 현저히 활성에 영향을 주지는 못하였기에 정확한 활성성분을 밝히기 위해서는 보다 많은 양의 증류액을 이용하여 활성성분의 분리 및 정제를 거치고 구조분석을 통하여 밝혀져야 하지만 본 연구과제에서의 지금까지 결과로부터 이러한 추정은 어느 정도 가능하리라고 생각한다. 한편 당도 일부 관여하는 것으로도 생각되어 있는데 특히 가시가지오가피의 경우에 Periodate 산화로서 활성이 약간 감소하는 결과가 이를 보여주는 것으로 생각할 수 있다. 또한 단백질 등의 아미노산 결합을 분해하는 Pronase 소화에 의해서는 거의 활성에 영향을 받지 않는 결과를 통하여 활성에 이러한 물질이 직접적으로 관여하지는 않는 것으로 나타났다. 따라서 활성 생약재의 증류액의 경우에는 무엇보다도 페놀화합물 등의 저분자 물질이 중요한 활성물질의 주성분으로 관여하고 있음을 알 수 있으며 일부 당성분이 관여하는 것으로 추정되어졌다.

다. 혼합증류액의 조제와 활성검색

가시가지오가피, 백출, 진피, 감초 및 인삼 등의 생약재로부터 연속수증기 증류법에 사용되는 Likens-Nickerson 장치를 이용하여 추출, 증류한 증류액의 경우, 대조군과 비교하여 또는 다른 검색된 생약재와의 활성검색의 결과에서도 높은 골수세포 증식활성 및 종양전이 억제활성을 갖는 것을 알 수 있었다. 또한 이러한

5종의 생약재 증류액은 충분히 개별적으로도 활용할 수 있는 우수한 활성을 갖는 생약재임을 밝혔다. 그러나 본 연구과제의 최종목표는 이러한 활성을 갖는 생약재를 이용하여 증류음료로 개발하는 것에 두고 있기 때문에 활성 생약재의 증류액을 개별적으로 이용하는 방법보다는 여러 생약재의 증류액을 혼합하여 혼합생약재로서 음료화 하는 것이 훨씬 적용가능성이 높기 때문에 활성 생약재로부터 추출, 증류한 개별 생약재의 증류액을 혼합된 경우에도 충분한 활성을 나타내는 지를 이미 활성이 확인된 증류액의 형태, 즉 개별 증류액을 혼합한 후 농축시킨 형태를 이용하여 검토하고자 하였다. 또한 생약재 증류액인 경우에는 원료로부터 유래되는 쓴맛, 매운 맛 및 떫은 맛 등과 색깔, 이취 등으로 인하여 개별적으로 사용하는 경우에는 음료로 할 경우 감미료 등의 기타 성분을 다량으로 첨가하여야 되는 문제점이 지금까지 지적되어 왔으므로 5가지 활성 생약재로부터 조제한 증류액을 적당한 비율로 혼합하여 이러한 맛, 색깔 및 이취 등을 조절함으로써 기타 성분의 첨가량을 감소시켜 이들이 나타내는 활성을 유지할 수 있는 장점도 가지고 있다고 하겠다. 한편, 개별적으로 조제한 생약재의 증류액을 활성을 고려하여 적당한 비율로 혼합함으로써 상승효과 혹은 감소효과를 동반할 수 있기 때문에 생약재의 증류액을 이용하여 증류음료를 개발하기 위한 기초실험으로서 생약재 원료로부터 추출, 증류한 생약재의 증류액을 혼합한 혼합증류액을 조제하고 개별 증류액과의 활성을 검토하고 최적의 혼합증류액의 비율을 구하여 이를 근거로 증류음료의 개발에 이용하고자 하였다.

생약재 증류액이 혼합되는 다양한 레시피의 배합비율을 만들기 위해 지금까지 높은 활성을 갖는 것으로 밝혀진 가시가지오가피, 백출, 진피, 감초 및 인삼의 5종의 증류액을 골수세포 증식활성 또는 종양전이 억제활성의 활성도에 근거하여 계산함으로써 배합비를 작성하였다 (Table 2). 즉, 일반적으로 모든 활성에서 우수한 결과를 보여주었던 가시가지오가피와 백출의 증류액을 주 구성분으로 하고 여기에 나머지 진피, 감초 및 인삼 증류액의 배합비율을 적당히 조절하여 어느 생약재의 개별 증류액보다 우수한 활성을 나타낼 수 최적의 혼합증류액의 레시피를 찾고자 하였다. 개별 생약재의 증류액을 Table 2와 같이 배합하여 5종류의 레시피에 해당하는 시료군을 조제한 후 골수세포 증식 및 종양전이 억제활성을 측정하였다.

골수세포 증식활성 및 종양전이 증식활성의 모든 활성에서 어떠한 생약재 단독의 증류액보다 우수한 활성을 보이면서 조제된 5종류의 레시피 시료군 중에서도 가장 활성이 높은 레시피군은 SD-d로서 열수추출물의 배합비율과 동일한 백출 : 가시가지오가피 : 감초 : 진피 : 인삼 = 30 : 30 : 15 : 15 : 10의 배합비율이었다 (Fig. 14와 15). 이와 같은 생약재 증류액의 비율로 혼합된 SD-d의 경우, 골수세포 증식활성에서는 개별 생약재 증류액에서 가장 높은 활성을 보인 백출이 (AM-SD) 1.48배 증강되었던 것에 비하여 1.67배의 증강된 활성을 (시료농도 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$) 보였으며, 시료농도 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 의 낮은 농도에서도 1.41배의 증강된 높은 활성을 나타내었다 (Fig. 14). 종양전이 억제활성의 경우에서도 50.3%의 억제활성을 보였던 백출의 증류액 (AM-SD) 보다 증강된 66.2%의 억제활성을 (시료농도 100 $\mu\text{L}/\text{mouse}$) 보였으며, 10배의 낮은 시료농도인 10 $\mu\text{L}/\text{mouse}$ 에서도 48.3% 억제의 종양전이 억제활성을 나타냄으로서 단독 생약재의 증류액보다 혼합증류액으로서 제조되는 것이 활성에서 유리함을 알 수 있었다 (Fig. 15). SD-d의 레시피를 기준으로 이러한 비율보다 모든 활성이 우수하였던 백출 증류액의 비율을 증가시키면서 백출보다 약간 활성이 떨어지는 가시가지오가피를 감소시키는 SD-a (1.41배 증강, 42.8% 억제), SD-b (1.54배 증강, 50.3% 억제)와 SD-c의 (1.61배 증강, 66.2% 억제) 경우에는 오히려 가시가지오가피의 감소량과 함께 SD-d에 비하여 활성이 저하되는 경향을 나타내 가시가지오가피와 백출의 적절한 비율이 활성에 중요하게 관여하고 있음을 나타내었고, 활성이 낮은 감초, 진피와 인삼의 모든 레시피의 경우에 큰 차이를 보이지 않았다. 또한 가시가지오가피와 백출 증류액이 증가하는 SD-e의 경우에는 (1.63배 증강, 67.6% 억제), SD-d와 거의 유사한 활성을 나타냄으로써 주성분의 첨가율을 상승시키는 것으로 활성에 큰 영향을 미치지 못하는 듯하였다 (Fig. 14와 15).

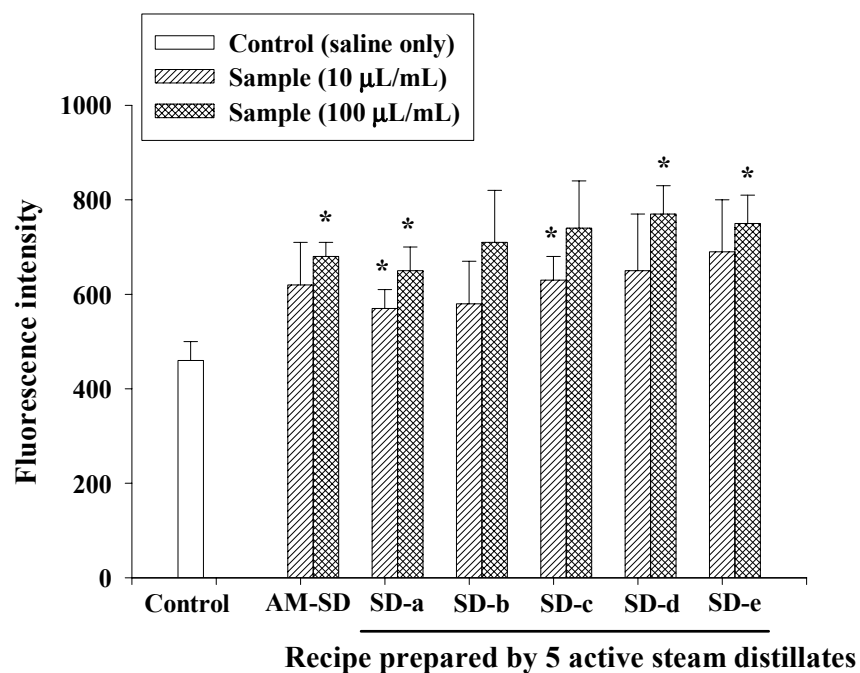


Fig. 14. Bone marrow cell proliferating activity of recipes prepared by 5 active steam distillates. AM-SD; steam distillates from *A. macrocephale*, SD-a, b, c, d, and e; recipes prepared by Table 2. Values represent the means \pm S.D (n=4). *p<0.05; significance between the control and recipe prepared by 5 active steam distillates.

이러한 결과로부터 5종의 활성 생약재로부터 개별적인 생약재 증류액의 활성도를 근거로 하여 적당한 비율로 혼합하여 조제한 혼합증류액의 경우, 역시 단독으로 높은 활성을 보였던 가시가지오가피와 백출의 양이 일정 비율 (약 30%) 함유되어 있어야만 우수한 활성을 나타내는 것으로 보인 반면, 상대적으로 약간 높은 활성을 갖는 백출의 증류액 비율을 높이고 가시가지오가피 증류액의 비율을 감소시키는 경우에도 활성을 저하시키는 요인이 되는 것을 나타내어 2종 생약재 증류액의 상대적인 비율이 활성에 관여하는 것으로 생각되어진다. 또한, 과량으로 첨가된 경우 (35% 이상)에는 활성증가에 뚜렷한 영향을 주지 못하는 것으로 추정할 수 있었으며, 상대적으로 활성이 약한 진피, 감초와 인삼의 증류액의 첨가비율은 그다지 활성에 영향을 주지 않는 것으로 보인다. 한편, 열수추출물과는 달리 개별 생약재 증류액에 비해 최적 혼합증류액 레시피의 경우에는 (SD-d), 우수한 활성을 나타내었는데 이러한 원인은 혼합증류액인 경우에는 이미 추출, 증류 시에 활성성분이 충분히 함유되어 있었던 증류액의 단순혼합이라는 점에서, 혼합원료를 열수추출물로 조제하는 경우에 발생하는 혼합생약재의 추출과정에서 발생하는 여러 복합적인 반응이나 용해도 등의 물리화학적인 한계로 인하여 파생되는 활성성분 추출의 제약 등과 같은 문제점이 일어나지 않기 때문인 것으로 추정된다. 이와 같은 결과로부터 생약재를 단독으로 처리한 증류액보다는 일정비율로 5종의 활성 생약재 증류액을 혼합한 경우가 활성 증가를 가져올 수 있다는 것을 알 수 있었기 때문에 증류액을 이용한 음료개발의 경우에도 이러한 방법을 검토하여 보다 산업적으로 적용할 수 있는 증류음료의 조제가 가능하리라 생각된다.

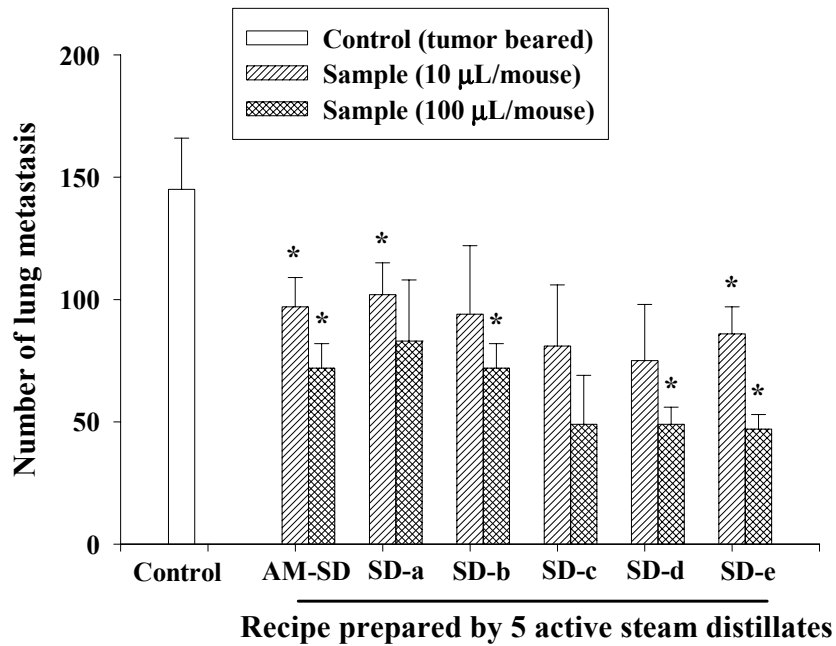


Fig. 15. Tumor metastasis inhibiting activity of recipes prepared by 5 active steam distillates. AM-SD; steam distillates from *A. macrocephale*, SD-a, b, c, d, and e; recipes prepared by Table 2. Values represent the means \pm S.D (n=4). *p<0.05; significance between the control and recipe prepared by 5 active steam distillates.

라. 혼합생약재로부터 증류액의 조제와 활성검색

가시가지오가피, 백출, 진피, 감초 및 인삼 등의 생약재로부터 연속 수증기 증류법에 사용되는 Likens-Nickerson 장치를 이용하여 추출, 증류한 증류액의 경우, 대조군과 비교하여 또는 다른 검색된 생약재와의 활성검색의 결과에서도 높은 골수세포 증식활성 및 종양전이 억제활성을 갖는 것을 알 수 있었다. 또한 이러한 5종의 생약재 증류액을 적당한 비율로 혼합하여 혼합증류액으로 조제하여도 개별

생약재 증류액보다도 우수한 활성을 갖는 사실도 확인하여 이러한 방법을 사용하여 증류음료로 충분히 활용할 수 있는 가능성을 보였다. 그러나 본 연구과제의 최종목표는 이러한 활성을 갖는 생약재를 이용하여 산업적으로 가장 적용가능한 방법을 통하여 증류음료로 개발하는 것에 두고 있기 때문에 활성 생약재 증류액을 개별적으로 사용하거나 또는 개별 증류액을 조제한 후 혼합하는 방법보다는 처음부터 활성을 갖는 여러 생약재를 혼합하여 혼합생약재로 조제한 후 이를 추출, 증류하여 이러한 증류액이 다른 방법으로 조제된 증류액보다 우수한 활성을 유지할 수만 있다면 이러한 혼합생약재의 증류액을 음료화 하는 것이 훨씬 산업적으로도 번거롭지 않고 적용가능성이 높기 때문에 활성 생약재 원료가 혼합된 경우에도 조제된 증류액이 충분한 활성을 나타내는지를 검토하고자 하였다. 또한 혼합생약재 증류액인 경우에는 혼합되어 추출, 증류될 경우 다양한 성분의 혼합으로 인하여 상승효과 혹은 감소효과를 동반할 수 있기 때문에 생약재의 증류액을 이용하여 증류음료를 개발하기 위한 기초실험으로서 생약재 원료를 혼합한 혼합생약재를 조제하고 이로부터 증류액을 조제하여 개별 증류액과의 활성을 검토하고 최적의 혼합레시피를 구하여 이를 근거로 증류음료의 개발에 이용하고자 하였다.

먼저, 생약재 원료의 다양한 레시피의 원료별 배합비율을 만들기 위해 지금까지 높은 활성을 갖는 것으로 밝혀진 가시가지오가피, 백출, 진피, 감초 및 인삼의 5종의 원료를 골수세포 증식활성 또는 종양전이 억제활성의 활성도에 근거하여 계산함으로써 배합비를 작성하였다 (Table 3). 즉, 일반적으로 모든 활성에서 우수한 결과를 보여주었던 가시가지오가피와 백출을 주 구성분으로 하고 여기에 나머지 진피, 감초 및 인삼의 배합비율을 적당히 조절하여 어느 생약재의 개별 증류액보다 우수한 활성을 나타낼 수 최적의 혼합레시피를 찾고자 하였다. 개별 생약재의 원료를 Table 3과 같이 배합하여 5종류의 레시피에 해당하는 시료군을 조제한 후 이를 개별적으로 생약재로부터 증류액을 조제하였던 방법과 동일하게 처리하여 각 레시피 시료군으로부터 증류액을 제조한 후 골수세포 증식활성과 종양전이 억제활성을 측정하였다.

골수세포 증식활성 및 종양전이 증식활성의 모든 활성에서 어떠한 생약재 단독의 증류액보다 우수한 활성을 보이면서 조제된 5종류의 레시피 시료군 중에서도

뚜렷한 차이를 보이지는 않지만 그중에서도 가장 활성이 높은 레피시균은 SD-D로서 백출 : 가시가시오가피 : 감초 : 진피 : 인삼 : 인삼 = 35 : 35 : 10 : 10 : 10의 배합비율이었다 (Fig. 16과 17). 이와 같은 생약재의 비율로 혼합된 SD-D의 경우, 골수세포 증식활성에서는 개별 생약재 증류액에서 가장 높은 활성을 보인 백출이 (AM-SD) 1.44배 증강되었던 것에 비하여 혼합증류액의 최적 레시피이었던 SD-d의 활성보다는 (1.67배 증강) 약간 감소된 1.56배의 증강활성을 (시료농도 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$) 보였으며, 시료농도 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 의 낮은 농도에서도 1.37배의 증강된 높은 활성을 나타내었다 (Fig. 16).

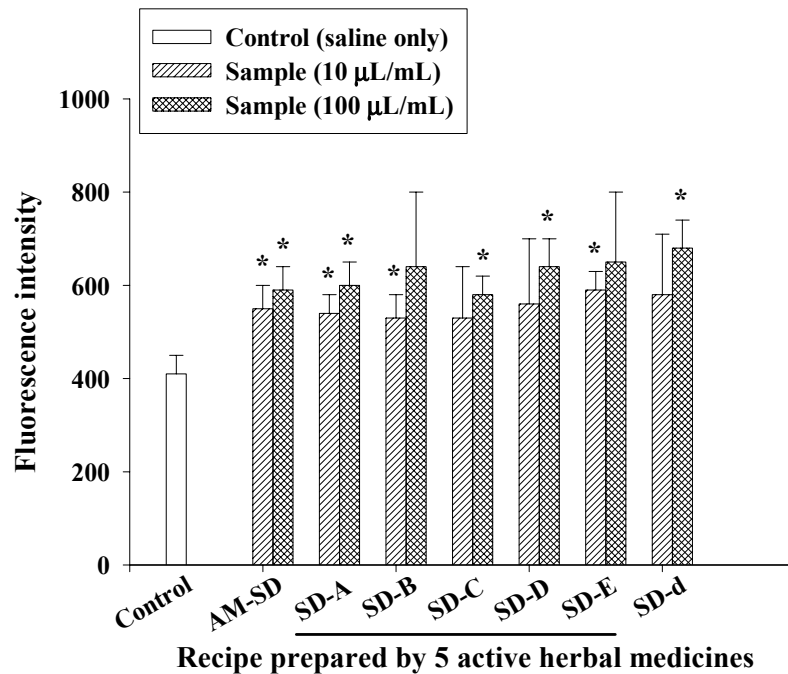


Fig. 16. Bone marrow cell proliferating activity of recipes prepared by 5 active herbal medicines. AM-SD; steam distillates from *A. macrocephale*, SD-A, B, C, D, and E; recipes prepared by Table 3, SD-d; recipes prepared by Table 2. Values represent the means \pm S.D (n=4). *p<0.05; significance between the control and recipe prepared by 5 active herbal medicines.

종양전이 억제활성의 경우에서도 SD-D의 레시피가 51.1%의 억제활성을 보였던 백출의 증류액 (AM-SD) 보다 증강된 55.6%의 억제활성을 (시료농도 100 μ L/mouse) 보였으며, 10배의 낮은 시료농도인 10 μ L/mouse에서도 41.4% 억제의 종양전이 억제활성을 나타냄으로서 혼합증류액의 최적 레시피보다는 낮지만 단독 생약재의 증류액보다 혼합생약재로서 제조되는 것이 활성에서 유리함을 알 수 있었다 (Fig. 17). SD-D의 레시피를 기준으로 이러한 비율보다 모든 활성이 우수하였던 백출 증류액의 비율을 증가시키면서 백출보다 약간 활성이 떨어지는 가시가시오가피를 감소시키는 SD-A (1.46배 증강, 48.9% 억제)와 SD-B (1.56배 증강, 50.4% 억제)의 경우에는 혼합증류액의 레시피 개발실험에서와 유사하게 오히려 가시가시오가피의 감소량과 함께 SD-D에 비하여 약간 활성이 저하되는 경향을 나타내어 가시가시오가피와 백출의 적절한 비율이 활성에 중요하게 관여하고 있음을 나타내었으나 혼합증류액과 비교하면 큰 차이는 보이지 않았다 (Fig. 16과 17).

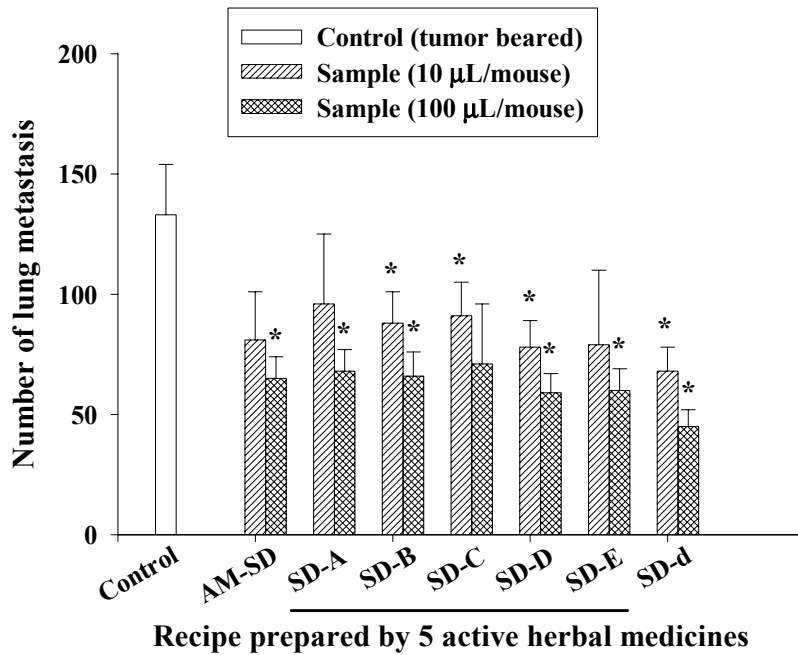


Fig. 17. Tumor metastasis inhibiting activity of recipes prepared by 5 active herbal medicines. AM-SD; steam distillates from *A. macrocephale*, SD-A, B, C, D, and E; recipes prepared by Table 3, SD-d; recipes prepared by Table 2. Values represent the means \pm S.D (n=4). *p<0.05; significance between the control and recipe prepared by 5 active herbal medicines.

한편, 가시가지오가피와 백출 증류액의 첨가비율을 동시에 저하시키면서 활성이 낮은 감초와 진피 증류액을 증가시킨 SD-C의 경우에는 (1.41배 증강, 46.6% 억제) SD-A의 경우보다 오히려 약간 낮은 활성을 보임으로써 활성이 높은 생약재 증류액의 첨가비율이 활성과 밀접한 관계를 나타내고 있음을 알 수 있었으며, 가시가지오가피와 백출 증류액이 증가하는 SD-E의 경우에는 (1.59배 증강, 54.9% 억제), 혼합증류액의 레시피 개발에서와 동일하게 SD-D와 거의 유사한 활성을 나타냄으로써 무한정으로 주성분의 첨가율을 상승시키는 것이 활성을 증가

시키지는 않는 것으로 생각되었다 (Fig. 16과 17).

이러한 결과로부터 5종의 활성 생약재로부터 개별적인 생약재 증류액의 활성도를 근거로 하여 적당한 비율로 혼합하여 조제한 혼합생약재 증류액의 경우, 역시 단독으로 높은 활성을 보였던 가시가지오가피와 백출의 양이 일정 비율 (약 35%) 함유되어져 있어야만 우수한 활성을 나타내는 것으로 보인 반면, 상대적으로 약간 높은 활성을 갖는 백출의 증류액 비율을 높이고 가시가지오가피 증류액의 비율을 감소시키는 경우에는 차이가 크지는 않지만 활성을 약간 저하시키는 요인이 되는 것을 나타내어 2종 생약재 증류액의 상대적인 비율이 활성에 관여하는 것으로 생각되어진다. 또한, 과량으로 첨가된 경우 (40% 이상)에는 활성증가에 뚜렷한 영향을 주지 못하는 것으로 추정할 수 있었으며, 상대적으로 활성이 약한 진피, 감초와 인삼의 증류액의 첨가비율은 그다지 활성에 영향을 주지 않는 것으로 보인다. 한편, 혼합증류액의 최적 레시피 결정실험에서와는 달리 개별 생약재 원료를 혼합한 혼합생약재로부터 조제된 증류액의 경우에는 열수추출물의 경우와 유사하게 개별 생약재의 증류액과 비교하여 활성이 월등하게 높지 않았는데, 이는 혼합생약재의 다양한 성분에 기인하는 것으로 보이며 또한 단독의 경우보다 혼합되어 있을 경우 추출, 농축되는 과정에서 여러 복합적인 반응이 발생함으로써 5종의 활성 생약재가 혼합되었기 때문에 4-5배정도의 활성의 증가를 가져올 것이라는 산술적인 활성의 증가를 가져오지는 않는 것으로 추정된다. 또한 5종의 생약재 원료로부터 유래되는 많은 활성성분이 포함되어 있을 지라도 추출 및 증류의 조건이 단독처리와 동일함으로써 용해도 등의 물리화학적인 한계로 인하여 활성성분으로 파악된 페놀류 등의 저분자 물질의 추출에 제약을 가져왔을 것으로 예상할 수 있다. 이와 같이 밝혀지지 않은 많은 원인에도 불구하고 생약재를 단독으로 처리한 개별 증류액보다는, 5종의 활성을 갖는 생약재를 적당한 비율로 혼합하여 증류액을 조제하는 것이 다음과 같은 장점으로 보다 산업적으로 유용할 것이라고 생각된다. 첫째, 생약재로부터 개별적으로 조제된 증류액보다는 혼합생약재의 증류액이 활성의 증가를 가져올 수 있다는 것이고, 둘째로는 활성은 생약재로부터 개별 증류액을 조제한 후 이를 단순혼합하는 혼합증류액에 비해 다소 감소하였으나 큰 차이를 보이지 않았고, 산업적으로 적용할 경우에는 이와 같은 복잡한 방법과는 달리 원료를 적당한 비율로 혼합한 후 한번에 추출, 증류

하는 방법이 훨씬 간편하고 적용가능성이 높기 때문에 증류액을 이용한 음료로의 개발의 경우에도 이러한 방법을 보다 적극적으로 검토하여 산업적으로 적용할 수 있는 다양한 가공공정을 모색하는 것이 증류음료를 사업화하는데 절대적으로 필요하다고 생각한다.

3. 증류 음료개발 및 면역활성 분석

가. 음료레시피 개발 및 *In vitro* 면역활성

본 연구과제는 지금까지 한방에서 이용되는 30여종의 생약재를 대상으로 증류액을 조제한 후 이들의 면역활성 (골수세포 증식활성) 또는 항암활성 (종양전이 억제활성)을 검색하여 가시가지오가피, 백출, 감초, 진피와 인삼이 다른 생약재 또는 대조군보다 우수한 활성을 갖고 있는 것을 밝히고, 이러한 활성 생약재를 대상으로 산업적으로 적용가능성이 높은 증류액 제조조건을 검토하였다. 검토된 결과로부터, 높은 활성을 유지하면서 산업적인 적용에 있어 제약을 극복할 수 있는 증류액 조제조건은, 개별적인 생약재 증류액을 단독으로 이용하거나 개별 생약재 증류액을 조제한 후 혼합증류액으로 단순혼합하는 방법보다는 활성이 있는 생약재 원료를 적당한 비율로 혼합한 후 이를 증류액으로 조제하는 것이 가장 바람직한 것으로 확인되었다. 또한 이런 최적의 증류액 조제조건을 만족시켜 줄 활성 생약재 원료의 배합비율은 Table 3의 SD-D의 배합비율이 가장 높은 활성을 나타내고 있음을 알 수 있었다. 따라서 이와 같이 산업적으로 적용할 수 있는 증류액 조제조건하에서, 생약재 원료의 배합은 SD-D의 레시피를 기준으로 혼합하고 연속수증기 증류법에서 사용하는 Likens-Nickerson 장치를 이용하여 증류액을 조제한 후 5 mL로 농축한 시료를 음료 Base (SD-D Base)로하고 증류음료로 개발하기 위한 음료개발 실험을 진행하였다.

먼저, 단순하게 SD-D Base에 용매인 물을 적당한 비율로 첨가하여 조제한 음료레시피와 SD-D Base에 감미료, 산미료 등의 음료 첨가제를 혼합한 레시피를 결정한 후 (Table 4), 이들의 면역활성을 *In vitro*에서 검토하였으며, 주관기관인 한국식품개발연구원에서는 이러한 레시피에 따른 관능검사를 실시하여 생약재로

부터 유래될 수 있는 쓴맛, 매운 맛, 떫은 맛 등의 이미 또는 이취를 제거할 수 있는 최적의 음료레시피를 선정하는 실험을 진행하여, 기능성 음료로서 활성과 관능에 있어서의 최적의 음료레시피를 결정하고자 하였다.

이러한 음료레시피에 의한 활성결과를 살펴보면, 골수세포 증식활성의 경우에는 SD-D Base만이 첨가된 SD-D Base 8%에 물 92%를 첨가한 Drink-III의 음료레시피에서 (시료농도 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 대조군의 1.35배 증강), SD-D Base 첨가량 대비 가장 우수한 활성을 나타내었고, SD-D Base의 첨가량이 Drink-III의 레시피보다 적은 경우에는 활성이 감소되어 Drink-I의 경우에는 (1.08배 증강) 대조군과 유사한 정도의 결과를 보였으며, SD-D Base 10% 이상의 음료레시피에서는 (Drink-IV, 1.33배 증강) 활성에 큰 차이를 보이지 않았다 (Table 11). 한편, SD-D Base의 생약재의 증류액에 생약재의 이미와 이취를 완화시키기 위해 부원료인 감미료와 산미료를 첨가한 레시피에서는 활성에 있어 큰 차이를 보이지는 않았으나 전반적으로 SD-D Base만의 레시피와 비교하여 약간 낮은 활성을 보였으나, 생약재의 관능을 향상시킨다는 측면에서 보면, 부원료가 혼합되어도 활성에 크게 영향을 받지 않는 것으로 추정되며 Drink-V를 (0.96배 활성) 제외하고는 레시피간 활성의 유의적인 차이는 보이지 않았다 (Table 11).

Table 11. Bone marrow cell proliferating activity of steam distillates from the drinking recipes prepared by Table 4.

Steam distillate ^{a)}	Concentration ($\mu\text{L}/\text{mL}$)	Fluorescence intensity (mean \pm S.D)
Control (saline only)	-	520 \pm 50
Drink-I	10	570 \pm 100
	100	560 \pm 50*
Drink-II	10	600 \pm 60*
	100	640 \pm 120
Drink-III	10	680 \pm 100
	100	700 \pm 60*
Drink-IV	10	630 \pm 110
	100	690 \pm 130
Drink-V	10	590 \pm 50*
	100	500 \pm 90*
Drink-VI	10	620 \pm 60*
	100	650 \pm 60*
Drink-VII	10	600 \pm 50*
	100	660 \pm 50*
Drink-VIII	10	640 \pm 130
	100	680 \pm 60*

^{a)}Each steam distillate was prepared from the drinking recipe prepared by Table 4. Values represent the means \pm S.D (n=4). *p<0.05; significance between the control and steam distillate from each recipe prepared by Table 4.

다음으로 종양전이 억제활성의 결과에서는, 골수세포 증식활성의 결과와 유사한 양상을 보여주었는데, 먼저 SD-D Base만을 물과 함께 첨가한 음료레시피에서는 SD-D Base 첨가량이 3%인 Drink I (시료농도 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 22.6% 억제)을 제외하고, 5%, 8%, 10%인 Drink II (대조군의 36.1% 억제), III과 (38.7% 억제) IV는 (40.0% 억제) 모두 유사한 활성으로 대조군보다 우수함을 보여주었다 (Table 12).

Table 12. Tumor metastasis inhibiting activity of steam distillates from the drinking recipes prepared by Table 4.

Steam distillate ^{a)}	Concentration (μL/mL)	Number of lung metastasis (mean ± S.D)
Control (saline only)	-	155 ± 22
Drink-I	10	123 ± 31
	100	120 ± 15*
Drink-II	10	113 ± 16*
	100	99 ± 27
Drink-III	10	108 ± 15*
	100	95 ± 13*
Drink-IV	10	111 ± 29
	100	93 ± 12*
Drink-V	10	121 ± 29
	100	124 ± 17*
Drink-VI	10	120 ± 16*
	100	106 ± 14*
Drink-VII	10	115 ± 16*
	100	101 ± 29
Drink-VIII	10	109 ± 29
	100	103 ± 13*

^{a)}Each steam distillate was prepared from the drinking recipe prepared by Table 4. Values represent the means ± S.D (n=4). *p<0.05; significance between the control and steam distillate from each recipe prepared by Table 4.

또한 생약재 증류액의 단점을 보완하기 위한 감미료, 산미료 등의 부원료를 첨가한 레시피의 경우에도 이러한 양상은 유사하게 나타나 Drink V를 (20.0% 억제) 제외한 나머지 레시피가 (Drink VI, 31.6% 억제; Drink VII, 34.8% 억제; Drink VIII, 33.5% 억제) 유사한 활성을 보여주었고, 골수세포 증식활성의 경우와 유사하게, 부원료의 첨가량이 많지 않기 때문인지 SD-D Base만을 첨가한 레시피와도 유의적으로 활성에 큰 차이를 보이지 않았다 (Table 12).

활성 생약재 5종 원료를 SD-D 레시피에 의해 적절하게 혼합된 혼합생약재로 조제하고 이로부터 추출, 증류된 SD-D 증류액을 음료 Base로 하여 음료레시피를 개발하고자 한 본 실험에서의 지금까지의 결과를 토대로 활성에서 가장 우수한 활성을 유지한 음료레시피는 SD-D Base만을 첨가한 Drink-III와 SD-D Base에 부원료인 감미료와 산미료를 적당히 첨가한 Drink-VII가 실험한 음료레시피 중에서는 가장 우수한 활성을 보여주었다.

이러한 결과로부터 생약재 증류액의 활성이 SD-S Base만을 첨가한 레시피에서만 유지되는 것이 아니고 이러한 생약재의 쓴맛, 매운 맛, 떫은 맛 등의 이미지와 이취를 완화시키고 다양한 관능을 보완하기 위해 감미료, 산미료 등의 부원료를 첨가하여도 생약재 증류액 단독 정도의 활성을 보이는 것은 증류음료로의 개발에도 중요한 장점을 줄 수 있다고 생각하기 때문에 향후 증류음료의 개발에 청신호라고 할 수 있다. 또한 모든 레시피에 있어서 용매인 물의 과량 첨가에 의해 활성이 지금까지의 결과들과는 저하되는 양상을 보이고 있으나 대조군과 비교하여 여전히 활성을 유지하고 있어 기능성 음료로서의 개발 가능성은 높은 것으로 보여, 이러한 증류액 음료들을 대상으로 마우스를 대상으로 한 *Ex vivo* 실험을 진행하였다.

나. *Ex vivo* 면역활성

생약재로부터 면역활성 및 항암활성을 갖는 증류액을 조제하고 이를 검색한 후 가시가지시오가피, 백출, 감초, 진피와 인삼 등 5종의 생약재 증류액이 활성을 갖고 있음을 확인하고 이들을 이용하여 증류음료로 개발하기 위한 다양한 증류액 제조의 최적조건을 검토하였다. 개별적인 활성 생약재의 증류액을 조제한 후 이를 적절한 비율로 혼합한 혼합증류액을 다양한 레시피로 조제하거나, 또는 활성 생약재 원료자체를 적절한 비율로 혼합한 각종 레시피에 따른 혼합생약재로부터 증류액을 조제하였다. 이러한 모든 조건에서 제조된 증류액은 무엇보다도 대조군보다 높은 활성을 갖고 있어야만 기능성 증류음료로서의 역할을 수행하는 것이기 때문에 관능적인 면도 중요하지만 활성이 유지될 수 있는 조건을 찾는 것 또한 본 연구과제의 중요한 수행사업 중 하나이었다. 또한 이러한 조건에서 활성이 높고 산

업적으로도 적용할 수 있는 조건이 혼합생약재 레시피 SD-D로부터 증류액을 조제하는 것이 가장 적절한 방법인 것을 밝히고 이러한 증류액을 음료 Base로 활용하여 생약재 단독의 음료 또는 기타 감미료, 산미료 등의 부원료가 첨가된 음료레시피를 결정하고 이들을 대상으로 관능검사 및 활성검색을 진행하였다. 결론적으로 SD-D Base만을 첨가한 Drink-III의 레시피 또는 SD-D Base에 감미료와 산미료를 적절히 첨가한 Drink-VII 레시피 등이 다른 음료 레시피 또는 대조군보다 *In vitro*에서 높은 활성을 보였고, 특히 Drink-VII의 경우에는, 생약재 단독의 Drink-III의 레시피를 음료로 개발할 경우 생약재로부터 유래되는 쓴맛, 매운맛, 떫은맛 등의 이미와 이취 발생이 예상되는데 이러한 단점을 극복할 수 있는 방법으로서도 중요하기 때문에 부원료의 첨가로 관능을 증진시킬 수 있고 그럼에도 불구하고 활성은 유사하게 높은 결과를 보여줌으로써 산업적으로 개발 가능성이 높은 음료 레시피로 생각되어진다.

이러한 *In vitro*의 결과를 토대로, 지금까지 우수한 활성을 갖는 증류액 및 음료레시피 등이 생체 내에서도 골수세포 증식활성 및 증양진이 억제활성을 유지할 수 있는지를 마우스를 활용한 *Ex vivo* 실험을 통하여 밝히고자 한다. 단지 *In vitro*에서만 유용한 활성을 나타내고 이를 음료로 개발하여 생체에 응용할 경우 생체 내에서의 복잡한 대사경로를 거치는 동안에 활성이 없어진다면 이는 기능성 음료로서의 의의를 상실하는 것이기 때문에, *In vitro*에서 유용한 활성을 나타낸 SD-D Base 단독으로 조제된 음료 레시피 Drink-III과 부원료가 첨가된 Drink-VII를 10 mL 용량으로 조제한 후 다음과 같은 방법으로 *Ex vivo* 실험을 진행하였다. 또한, 1차년도에 검색된 30여종의 생약재를 모두 적당한 비율로 혼합한 혼합생약재로부터 추출, 증류하여, Drink-VII의 음료레시피로 조제하여 (Total-SD) 활성이 우수한 5종의 생약재만을 혼합한 음료레시피와 비교함으로써 산업적으로 적용가능한 다양한 접근을 시도하였다.

골수세포 증식활성의 *Ex vivo* 실험은 3가지의 레시피군 (Drink-III, VII 및 Total-SD)과 대조군 (Saline 투여군)을 사용하였으며, 각 군마다 2마리의 마우스를 이용하여 1주일간 매일 1회씩, 고정적인 시간에 각 시료를 500, 1,000과 2,000 μ L의 3가지 농도로 구분하여 경구투여하였다. 1주일 후에 농도별로 경구투여된 각 군의 마우스로부터 Peyer's patch를 회수하여 세포를 조제하고 5일간 배양하

였다. 5일 후에 상등액을 회수하고 이를 골수세포와 함께 6일간 배양한 후 Alamar Blue액을 첨가하고 형광도 측정기를 이용하여 골수세포의 증식도를 비교하였다. Fig. 18의 결과에서 보이는 것처럼, 증류액을 활용한 3가지 모든 레시피에서 농도가 증가하면서, 활성이 그다지 높지는 않지만 대조군보다 유의적으로 서서히 증가하는 양상을 보여주고 있으며 2,000 $\mu\text{L}/\text{day}$ 에서 가장 높은 활성을 나타내고 있었다.

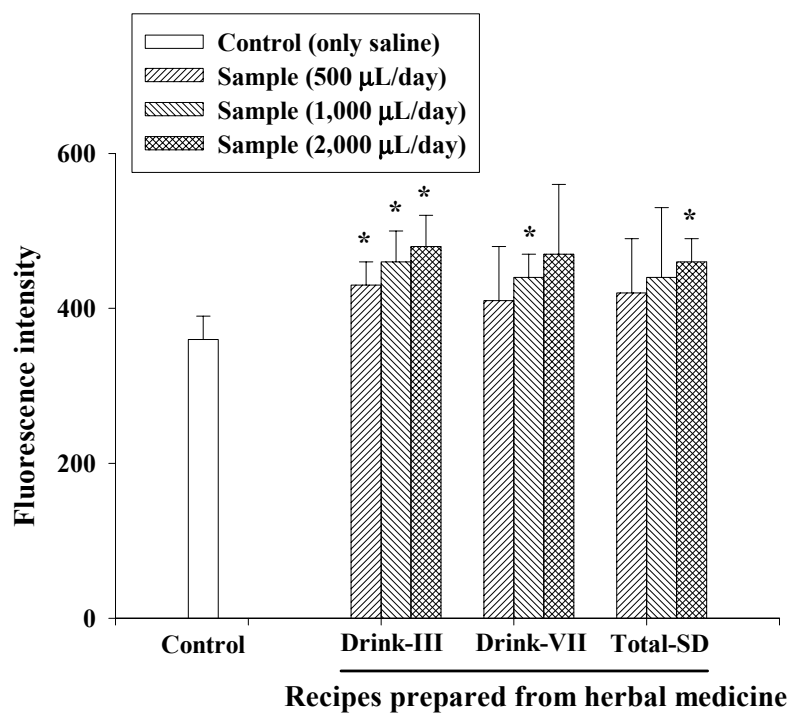


Fig. 18. *Ex vivo* bone marrow cell proliferating activity of recipes prepared by Table 4, and 30 herbal medicines. Drink-III and Drink-VII; recipes prepared by Table 4, Total-SD; recipe prepared by a type of Drink-VII from 30 herbal medicines. Values represent the means \pm S.D (n=4). *p<0.05; significance between the control and recipe prepared by Table 4, and 30 herbal medicines.

특히 Drink-III의 레시피가 다른 레시피와 비교하여 유의적으로 활성화에 큰 차이를 보이지는 않지만 모든 투여량에서 가장 우수한 활성을 나타내었으며, Drink-VII와 30여종 전체 생약재를 혼합하여 추출, 증류한 증류액의 음료레시피군인 Total-SD는 활성화에 있어 큰 차이를 보이지 않음으로써 5종의 선정된 생약재로부터 조제된 Drink-VII만으로도 기능성 증류음료를 충분히 개발할 수 있을 것으로 생각된다 (Fig. 18). 또한 이러한 결과로부터 최적조건에서 조제된 증류액을 음료 Base로 이용하여 기능성 음료로서 개발할 수 있는 근거를 확인할 수 있었는데, 특히 생체 내 동물실험을 통하여 골수세포 증식활성을 발현할 수 있다는 것은 이러한 증류음료가 음용되어 소장내에 도달하면 점막면역기관인 Peyer's patch를 자극할 수 있고 이를 통하여 순환계 면역기관이 활성화되어 골수세포가 증식되어진 것을 의미하기 때문에 음용된 증류음료에 충분히 Peyer's patch를 자극할 수 있는 활성성분이 함유되어 있음을 나타낸다. 즉, 증류음료가 음용되어 1차적으로 소장면역기관이 활성화되고 이로 인해 다양한 면역계가 자극될 수 있는 기능성 음료로서의 개발가능성이 높음을 시사하고 있다고 하겠다.

한편, 종양전이 억제활성의 *Ex vivo* 실험을 진행하였는데, 지금까지 *In vitro*에서의 종양전이 억제활성은 마우스에 시료를 정맥주사함으로써 실시하였는데, 그 이유는 정맥주사를 실시하여도 일반적으로 2주간의 경과를 거친 후에 시료의 활성을 측정할 정도로 검색에 시간이 많이 소요됨으로써, 시료의 종류가 많은 검색과정에서의 이러한 시간적인 제약을 해결하기 위해 활성화의 결과까지 많은 시간이 소요되는 경구투여 방법보다는 정맥주사 방법을 사용하였으며, 시료의 활성화여부가 경구투여보다는 정맥주사의 경우 쉽고 빠르게 검출될 수 있기 때문이었다. 그러나 증류음료로 개발하는 경우, 음용과정을 통하여 경구투여 되어 활성을 나타내어야 되기 때문에 증류음료로 개발하기 위한 최적의 음료 레시피인 Drink-III과 Drink-VII의 생약재 증류액 활용군과 전체 생약재로부터 증류되어 Drink-VII의 레시피에 따라 조제된 Total-SD 레시피의 3종류의 음료 레시피와 대조군으로서 Saline를 대상으로 경구투여에 따른 *Ex vivo* 활성을 검토하였다. 즉, 각각의 군에 따라 Balb/c 마우스를 2마리씩 배정하고 동물실험 시작과 함께 Colon 26-M 3.1 lung carcinoma 세포를 각각의 마우스에 정맥주사 한 후 1일, 5일 및 10일 후

에 대조군으로서 Saline과 3종류의 음료 레시피 시료를 각각 500, 1,000, 2,000 μL 의 농도로 3회 경구투여한 후, 종양접종 14일째에 마우스를 희생시키고 종양의 표적기관인 폐를 적출하여 Bouin's 용액에서 전이된 종양을 고정시킨 후 종양의 군집 수를 측정하였다. 시료에 대한 *Ex vivo*에서의 종양전이 억제효과는 Saline만 접종한 대조군과 비교함으로써 조사되었다. Fig. 19의 결과에서 제시한 것처럼, 경구투여의 경우 전체적으로 모든 군에서 정맥주사의 경우보다 낮은 활성을 보였으나, 음료 레시피간의 동일 농도에서 유의적인 차이를 보이지는 않았으며, 농도별로는 저농도보다는 역시 2,000 μL 의 고농도에서 큰 차이는 아니지만 활성에 있어서의 유의적인 차이를 보여 농도의존적인 경향을 나타내었다. 이러한 결과로부터, 검색과정을 통하여 최적 음료 레시피로 선정된 Drink-III 또는 Drink-VI는 활성에 있어 큰 차이를 보이지 않았기 때문에 증류음료로의 개발과정에 감미료 또는 산미료 등을 적절히 배합하여 생약재 특유의 이미, 이취를 감소시키는 것이 가능한 것으로 보이며, 전체 생약재를 사용하지 않고 활성 생약재 5종만을 사용하여도 충분한 활성이 나타남을 확인할 수 있었다 (Fig. 19). 물론, 정맥주사의 경우보다 낮은 활성을 나타내고 있는 것은 앞으로 해결해야 할 과제로서 경구투여의 양 또는 활성 발현에 필요한 시간 등의 부수적인 검토가 필요할 것으로 사료된다.

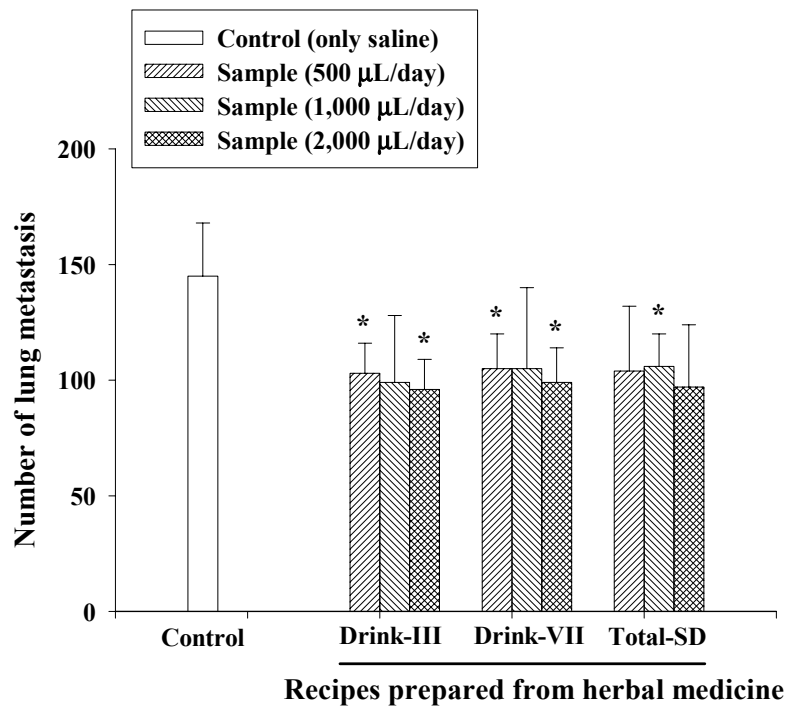


Fig. 19. *Ex vivo* tumor metastasis inhibiting activity of recipes prepared by Table 4, and 30 herbal medicines. Drink-III and Drink-VII; recipes prepared by Table 4, Total-SD; recipe prepared by a type of Drink-VII from 30 herbal medicines. Values represent the means \pm S.D (n=4). *p<0.05; significance between the control and recipe prepared by Table 4, and 30 herbal medicines.

그러나 낮은 활성에도 불구하고, 골수세포 증식활성의 경우와 마찬가지로 음료 레시피를 활용하여 증류음료로 개발하는 경우에도 종양전이의 억제 등의 항암활성을 나타낼 수 있는 기능성 음료로서의 가능성을 충분히 제시하고 있는 결과로서 앞으로 다양한 음료개발의 토대를 마련한 것이라고 할 수 있다.

향후 증류음료로 개발되기 위해서는 보다 많은 가공공정의 개발이 필요하며,

지금까지 개발된 기술을 업체에 이전하고, 음료개발의 최종목표를 달성하기 위해 지속적인 협력과 공동연구를 진행할 예정이다.

4. 생약재 증류 음료 제조를 위한 관능검사

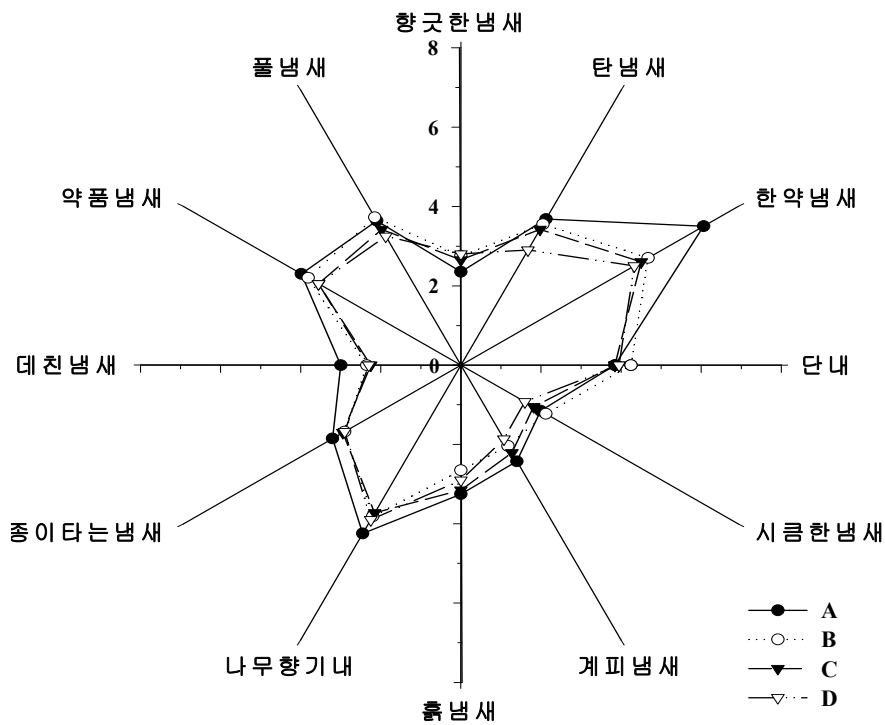


Fig. 20. 생약재 증류음료의 묘사분석-향

A: 음료 base

B: 구연산 0.02%+고과당 5%

C: 구연산 0.08%+고과당 8%

D: 구연산 0.1%+고과당 10%

가시가지오가피를 포함하는 5종의 골수세포 증식활성 및 종양전이 억제활성 물질이 함유된 열수추출물로부터 제조된 증류음료 base를 이용하여 음료를 제조하기 위하여 적정 감미료 및 산미료 배합 비율을 알아보기 위하여 관능검사를 실시하였다. 우선 생약재 증류음료의 향에 관련된 묘사분석 결과는 Fig. 20에 나타내었다. 본 실험에서의 음료 base는 여러 가지 생약재를 증류하여 혼합한 것으로, 음료의 향과 맛을 표현하기에 애매하였으므로 인삼음료의 향과 맛을 기준으로 삼아 관능검사를 실시하였다. 우선 처리구 A를 살펴보면, 한약냄새가 7.00으로 다른 처리구의 5.00~5.40보다 주목할만하게 높았으며, 콩나물을 데친 듯한 비릿한 냄새와 종이타는 냄새등의 항목에서도 약간 높은 값을 나타내었다. B~D는 처리구간에 뚜렷한 경향은 나타나지 않았으나, 구연산과 고과당의 비율이 높아질수록 한약냄새와 탄냄새의 점수가 낮았다.

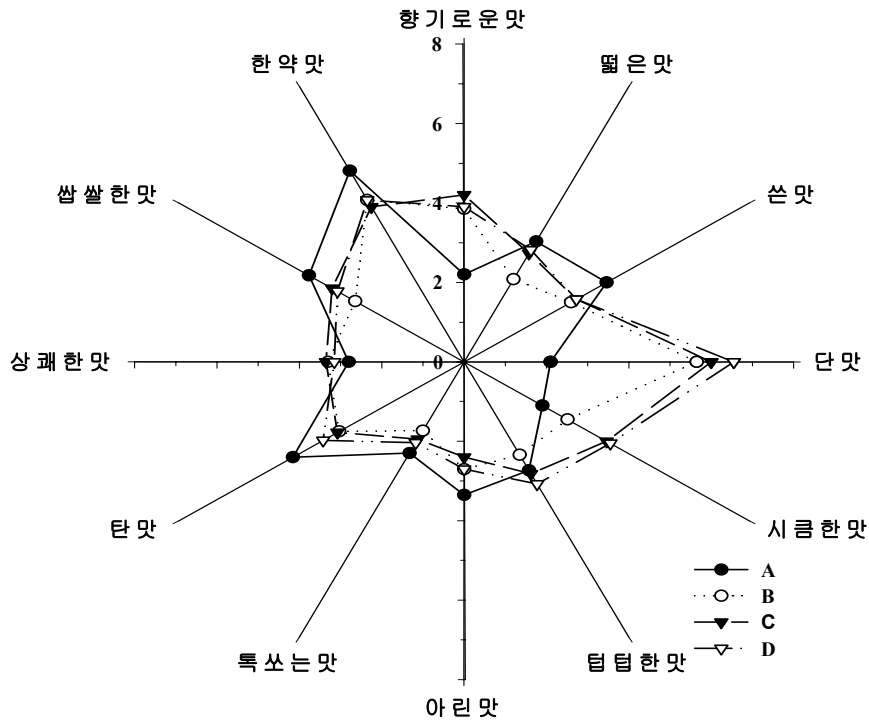


Fig. 21. 생약재 증류음료의 묘사분석-맛

- A: 음료 base
- B: 구연산 0.02%+고과당 5%
- C: 구연산 0.08%+고과당 8%
- D: 구연산 0.1%+고과당 10%

생약재 증류음료의 맛에 관한 묘사분석의 결과는 Fig. 21에 나타내었다. 처리구 A는 쓴맛, 아린맛, 탄맛, 씹는맛, 한약맛 등이 처리구 B~D보다 높은 값을 나타낸 반면, 향기로운맛, 단맛, 시큼한맛에서는 낮은 값을 나타내었다. 이는 구연산과 고과당의 첨가가 음료 base의 씹는 한약맛을 완화시켜 전체적으로 상쾌한 맛을 증가시키는 것

으로 보인다. 처리구 B는 떫은맛, 단맛, 시큼한맛, 텁텁한맛 등이 처리구 C~D보다 낮은 값을 보여 구연산과 고과당의 첨가 농도와 일치하는 경향을 보였으나, 처리구 C와 D사이에서는 주목할 만한 차이점이 나타나지 않았다.

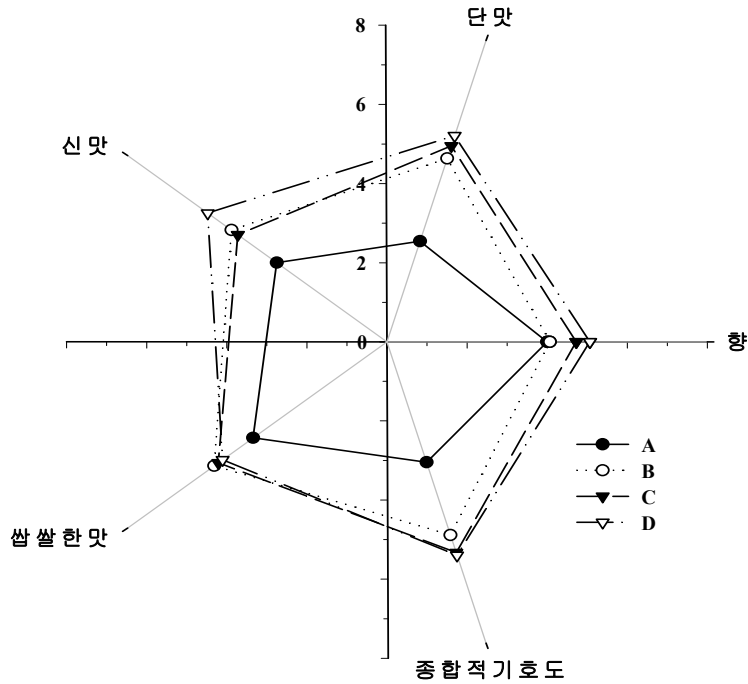


Fig. 22 생약재 증류음료의 기호도 조사

- A: 음료 base
- B: 구연산 0.02%+고과당 5%
- C: 구연산 0.08%+고과당 8%
- D: 구연산 0.1%+고과당 10%

생약재 증류음료의 관능적 기호도 결과는 Fig. 22에 나타내었다. 처리구 A는 모든 항목에서 처리구 B~D보다 낮은 값을 나타내어 구연산과 고과당의 첨가가 음료맛의 기

호도 향상에 효과적임을 알 수 있다. 처리구 B는 향, 단맛, 종합적 기호도 항목에서 처리구 C~D보다 낮은 값을 보였으나 그 정도는 미미하였다. 처리구 C와 D의 경우 신맛의 기호도에서는 처리구 D가 다소 높은 값을 나타내었으나, 전체적인 기호도에서는 큰 차이가 없었다. 이상의 결과를 종합해 볼 때, 음료 base인 처리구 A(3.20)는 한약재의 맛과 향이 너무 강하여 맛의 보정이 필수적으로 요구되며, 본 실험에서 사용한 구연산과 고과당의 첨가는 이러한 단점을 보완하는데 효과적이었다. 또한 산과 당의 첨가량이 높을수록 음료의 기호도가 향상되었다(B=5.13, C=5.60, D=5.67).

제 4 절 결론

가시가지오가피를 포함하는 5종의 골수세포 증식활성 및 종양전이 억제활성 물질이 함유된 열수추출물로부터 활성성분을 분리하고 이들이 어떤 성분으로 구성되어 있는지를 검토하기 위하여 각 생약재의 열수추출물을 분획한 후 골수세포 증식활성 및 종양전이 억제활성을 분석한 결과 활성을 갖는 생약재, 즉 가시가지오가피와 백출 등의 열수추출물의 경우, 골수세포 증식 및 종양전이가 억제활성에 관여하는 활성물질이 대부분 당으로 구성되어진 물질을 함유하고 있음을 알 수 있었다. 산업적 대량 생산을 기반을 두고 5종의 활성 혼합 생약재로부터 증류 음료를 제조하기 위하여 혼합생약재를 비율별로 혼합 후 열수추출하여 골수세포 증식활성 및 종양전이가 증식활성을 측정할 경우 모든 활성에서 어떠한 생약재 단독의 열수추출물보다 우수한 활성을 보이면서 조제된 5종류의 레시피 시료군 중에서도 가장 활성이 높은 레시피군은 가시가지오가피 : 백출 : 진피 : 감초 : 인삼 = 30 : 30 : 15 : 15 : 10의 배합비율로 나타났다.

가시가지오가피를 포함하는 5종의 골수세포 증식활성 및 종양전이 억제활성 물질이 함유된 증류액으로부터 활성성분을 분리하고 이들이 어떤 성분으로 구성되어 있는지를 검토하기 위하여 각 생약재의 개별 증류액을 분획한 결과 활성 생약재의 증류액으로부터 유기용매-가용획분의 분획과정을 통하여 활성성분이 포함된 획분이 분리되었음을 알 수 있었다. 골수세포 증식활성 및 종양전이가 억제활성에 관여하는 증류액의 활성성분은 물 등에 가용성인 친수성 물질보다는 극성이 낮은 유기용매에 가용성인 소수성의 저분자류가 주성분일 가능성을 높여주었다.

이와 같은 결과로부터 활성을 갖는 생약재, 즉 가시가지오가피와 백출 등의 증류액의 경우, 골수세포 증식 및 종양전이 억제활성에 관여하는 활성물질이 열수추출물의 조다당 획득이 대부분 당으로 구성되어진 물질인 것과 달리, 고분자 물질보다는 페놀류 등의 저분자 물질이 주로 함유되어 있음을 알 수 있었다. 생약재 추출물로부터 개별 증류액을 제조한 후 혼합 증류액을 배합한 후 골수세포 증식활성 또는 종양전이 억제활성 분석 결과 열수추출물의 배합비율과 동일한 백출 : 가시가지오가피 : 감초 : 진피 : 인삼 = 30 : 30 : 15 : 15 : 10의 배합비율로 나타났다. 혼합생약로부터 제조된 증류액에 대한 골수세포 증식활성 또는 종양전이 억제활성 분석 결과 백출 : 가시가지오가피 : 감초 : 진피 : 인삼 = 35 : 35 : 10 : 10 : 10의 배합비율이 가장 우수한 것으로 나타났다. SD-D 배합비율이 대한 음료레시피에 의한 활성결과를 살펴보면, 골수세포 증식활성의 경우에는 SD-D Base만이 첨가된 SD-D Base 8%에 물 92%를 첨가한 경우 가장 높은 활성을 나타내었으며 종양전이 억제활성의 결과에서는, 골수세포 증식활성의 결과와 유사한 양상을 보여주었다. 활성에서 가장 우수한 활성을 유지한 음료레시피는 SD-D Base만을 첨가한 Drink-III와 SD-D Base에 부원료인 감미료와 산미료를 적당히 첨가한 Drink-VII가 실험한 음료레시피 중에서는 가장 우수한 활성을 보여주었다. *In vitro*의 결과를 토대로, 지금까지 우수한 활성을 갖는 증류액 및 음료레시피 등이 생체 내에서도 골수세포 증식활성 및 종양전이 억제활성을 유지할 수 있는지를 마우스를 활용한 *Ex vivo* 실험을 실시한 결과 유의적인 활성을 나타내었다. 활성 분석 결과 가장 우수한 것으로 나타난 음료base에 적정 산미료와 감미료 배합비를 알아보기 위하여 관능검사를 실시한 결과 산미료 0.1%, 감미료 10%를 첨가한 경우 기호도가 우수한 것으로 나타났다.

제 5 절 참고문헌

1. 성낙주, 고평희, 전효곤, 강인수, 정영철, 김양우, 김정균, 강신권, 이수정, 이성호, 다년생 도라지의 약리작용에 기초한 건강 식품소재의 개발에 관한 연구, 농림수산부, 농림수산특정연구사업연구보고서, 경상대학교 자연과학대학(1997)
2. 임상동, 김기성, 김희수, 최인욱, 천장아, 박윤경, 한약재 첨가한 농가형 유제품 개발연구, 농림수산부, 농림수산특정연구사업연구보고서(GA0032-0979), 한국식품개발연구원(1998)
3. 김미선, 조여원, 정성현, 포스터 발표 : 고탄수화물식이 섭취 마우스에서 상업과 누에의 혈당강하 효과 검색, 한국영양학회지, vol. 30, pp. 580(1997)
4. 김성훈, 김금수, 이진하, 정을권, 박영식, 박유정, 이현용 : 강원도산 상업과 누에의 혈당강하 활성물질의 특성, 산업미생물학회지, vol. 25, pp. 391(1997)
5. 홍석산, 김혜영, 류미라, 박완수, 권석형, 국산농산물 및 생약재를 활용한 혈당조절용 식품 개발, 연구보고서(E00202F-005), 한국식품개발연구원(2000)
6. Whang, W.K., C, S.B. and Kim, I.H. Physiological activities of mixed extracts of *Acanthopanax senticosi* Radicis cortex and *Eucommiae* cortex. Kor. J. Pharmacogn. 27: 65-74 (1996)
7. Hikino, M.H. and Farnsworth, N.R. Economic and medicinal plant research. pp.155-215. Academic press (1985)
8. Hikino, H., Takahashi, M., Otake, K. and Konno, C. Isolation and hypoglycemic activity of Eleutherans A, B, C, D, E, F, and G: glycans of *Eleutherococcus*

- senticosus* roots. J. Nat. Prod. 49: 293-297 (1986)
9. Lui, J.H. and Staba, J.E. The ginsenosides of various ginseng plants and selected products. J. Nat. Prod. 43: 340-346 (1980)
10. Fujikawa, T., Yamaguchi, A., Morita, I., Takeda, H. and Nishibe, S. Protective effects of *Acanthopanax senticosus* Harms from Hokkaido and its components on gastric ulcer in restrained cold water stressed rats. Biol. Pharm. Bull. 19: 1227-1230 (1996)
11. Miyakoshi, M., Shirasuna, K., Hirai, Y., Shingu, K., Isoda, S., Shoji, J., Ida, Y. and Shimizu, T. Triterpenoid saponins of *Acanthopanax nipponicus* leaves. J. Nat. Prod. 62: 445-448 (1999)
12. Fang, J. N., Proksch, A. and Wagner, H. Immunologically active polysaccharides of *Acanthopanax senticosus*. Phytochem. 24: 2619-2622 (1985)
13. Hu, S.Y. Eleutherococcus vs. Acanthopanax. J. Arnold Arboretum. 61: 107-111 (1980)
14. Wang, J.Z., Mao, X.J. and Shimura, K. Immunomodulatory activity of polysaccharide from *Acanthopanax obovatus* roots. Planta Med. 57: 335-336 (1991)
15. Yamada H. 1992. Chemical and pharmacological studies on efficacy of Japanese and Chinese herbal medicines. *Kitasato Arch Exp Med* 65: 1-22.
16. Son EJ, Kim JH, Kim HA, Baek SH, Kho YH, Kim MR, Lee CH. 2003. A caspase inducing inhibitor isolated from *Caesalpinia sappan*. *Korean J Food Sci Technol* 35: 680-683.
17. Hwang JH, Lee KH, Yu KW. 2003. Characterization of the immunologically active components of *Glycyrrhiza uralensis* prepared as herbal *kimchi*.

Nutraceuticals & Food 8: 29-35.

18. Kang MH, Choi CS, Kim ZS, Chung HK, Min KS, Park CG, Park HW. 2002. Antioxidative activities of ethanol extract prepared from leaves, seed, branch and areial part of *Crotalaria sessiflora* L. *Korean J Food Sci Technol* 34: 1098-1102.
15. Filek G, Bergamini M, Lindner W. 1995. Steam distillation-solvent extraction, a selective sample enrichment technique for the gas chromatographic-electron-capture detection of organochlorine compounds in milk powder and other milk products. *J Chromatogr A* 712: 355-364.
16. Hong T, Matsumoto T, Kiyohara H, Yamada H. 1998. Enhanced production of hematopoietic growth factors through T cell activation in Peyer's patches by oral administration of Kampo (Japanese herbal) medicine, "Juzen-Taiho-To". *Phytomedicine* 5: 353-360.
17. Page B, Page M, Noel. C. 1993. A new fluorometric assay for cytotoxicity measurements *in vitro*. *Int J Oncol* 3: 473-476.
18. Yoon TJ, Yoo YC, Kang TB, Baek YJ, Huh CS, Song SK, Lee KH, Azuma I, Kim JB. 1998. Prophylactic effect of Korean mistletoe (*Viscum album coloratum*) extract on tumor metastasis is mediated by enhancement of NK cell activity. *Int J Immunopharmacol* 20: 163-172.
19. Mitsuda H, Yasumoto K, Iwami K. Antioxidative action of indole compounds during the autoxidation of linoleic acid. *Eiyo to Shokuryo* 19: 210-214 (1994)
20. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Barnes G. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol.* 28: 25-30 (1985)
21. Lee, J.H., Choi, H. S., Chung, M. S. and Lee M.S. Volatile flavor components and free radical scavenging activity of *Cnidium officinale*. *Kor. J. Food Sci.*

Technol. 34: 330-338 (2002)

22. Noh, B.S., Oh, S. Y., Kim, S. J. Pattern analysis of Volatile components for domestic and imported *Angelica gigas* Nakai using GC based on SAW sensor. Kor. J. Food Sci. Technol. 35: 144-148 (2003)
23. Choi, S.H., Kim, H. J. Volatile flavor components of *Angelica gigas* Nakai by the storage conditions. Kor. J. Food Sci. Technol. 32: 513-518 (2000)
24. Martin, S. E., Padilla M. A., Ocete, J. Galvez, J., Anti-inflammatory activity of the essential oil of *Bupleurum frutescens*. *Planta med* 59(6):533-536(1993)
25. Nakanishi, T., M. Nishi, A. Inada, H. Obata, N. Tanabe, S. Abe and M. Wakashiro. Two new potent inhibitor of xanthine oxidase from leaves of *Perilla frutescens* Britton var. *aucta* Kudo. *Chem Pharm Bull(Tokyo)* 38(6): 1772-1774(1990)
26. Block, E.. The Organosulfur chemistry of the genus *Allium*-Implications for the Organic chemistry of sulfur. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 31, 1135(1992)
27. Harold, W. G.. Flavor chemistry of lipid foods. The american oil chemists'society, USA, P 98(1989)
28. Stone, E. J., Hall, R. M., and Kazeniak, S.J. Formation of aldehyde and alcohols in tomato fruit from U-¹⁴C-labelled linolinic and linoleic acids. *J. Food Sci.*, 40, 1138(1975)
29. You, W.C., Blot, W. J., Chang, Y. S., Ershow, A., Yang, Z.T., An, Q., Henderson, B.E., Fraumeni, J.F. Jr. and Wang, T. G. *Allium* vegetables and reduced risk of stomach cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, 81 162(1989)