

최 종
연구보고서

GOVP1200708745

산초나무와 초피나무로부터 신기능성 물질 탐색
및 활용방안 연구

Development of new functional substances from *Zanthoxylum schinifolium*
and *Zanthoxylum piperitum* and their applications

주 관 연 구 기 관

대 구 가 톨 릭 대 학 교

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “산초나무와 초피나무로부터 신기능성 물질 탐색 및 활용방안 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2006 년 7 월 14 일

주관연구기관명 : 대구가톨릭대학교

총괄연구책임자 : 우 미 희

세부연구책임자 : 조 성 희

연 구 원 : 이 순 재

협동연구기관명 : 경북대학교

협동연구책임자 : 김 영 호

연 구 원 : 이 인 구

연 구 원 : 전 도 연

요 약 문

I. 제 목

산초나무와 초피나무로부터 신기능성 물질 탐색 및 활용방안 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발의 목적

본 연구는 산초나무와 초피나무로부터 생리활성 성분을 분리하고 생리적 효능을 구체적이고 과학적으로 규명함과 동시에 기능성제품의 개발을 통하여 우리나라 산초나무와 초피나무의 우수성과 그 기능성을 밝힘으로서 소비자로 하여금 기능성 제품의 이용도를 높일 뿐만 아니라 산초나무와 초피나무의 대량 재배로 농가 소득 향상에 기여함을 그 목적으로 하고 있다. 특히 우리나라 산초나무와 초피나무는 중국, 일본 등지의 산초나무와 초피나무보다 그 향기가 매우 강하여 국외 품종들에 비해 상당히 우수하므로 우리나라의 것을 선호하여 매년 일본 등의 동남아에 수출이 늘어나고 있어서 현재 경상북도의 권장 소득 (농)작물로 지정되어 많은 농가에서 재배되고 있다.

이와 관련하여 한방 약용식물으로써 이용될 뿐만 아니라 민간요법, 그리고 식용으로 이용하는 산초나무와 초피나무 등으로부터 생체 생리활성 성분을 분리하여 이들 성분

의 생리적 역할 및 작용기작을 분자·세포생물학의 첨단기술로써 규명하여 산초나무 및 초피나무 유래의 유효생리활성 물질 사용의 과학화를 목표로 한다. 또한 이들 물질의 인체 infectious disease와 암에 대한 예방과 치료 효능을 검토하는 본 연구 과제 수행으로 국내 대학에 있어서의 생체면역기구 및 그 방어 기작에 대한 분자생물학적 및 세포생물학적 연구기반을 확립하여 이 분야에 있어서의 기술축적 및 향상을 기하고자 한다.

2. 연구개발의 필요성

최근 급격한 경제성장, 식생활의 서구화 및 노인인구의 증가로 암, 동맥경화, 고혈압, 심장질환, 뇌질환 및 당뇨 등 각종 성인병이 크게 증가하고 있다. 이러한 만성적인 퇴행성 질병을 치료하기 위하여 합성의약품이 널리 사용되고 있으나 독성 및 안전성이 문제시되면서 식이의 섭취나 조절을 통해 이들 질병을 효과적으로 예방·치료할 수 있는 대체의학으로서 건강 기능성식품에 대한 관심이 학계·산업계뿐만 아니라 일반 국민도 삶의 질 향상 차원에서 크게 고조되고 있다.

이러한 추세에 따라 식품산업에서는 특정한 영양소나 성분을 가감한 다양한 기능성 건강보조제품들이 생산, 판매되고 있고 또 허위 혹은 과대광고로 소비자들을 혼란케 하고 있으므로 이들 제품의 안전성과 규격화, 품질의 고급화 및 다양화가 필요하다. 또한 식품의 기능성 성분의 생리적 효능에 대한 과학적인 규명이 필요하며 나아가 이들 결과를 토대로 각 질병의 예방 및 치료목적에 부합할 수 있도록 안전성이 검증된 고품질의 기능성건강보조식품의 개발이 필요한 시점이다.

이러한 사회적 요구와 시대적 요청에 의하여 우리나라도 지난해 (2002년 8월 26일) “건강 기능식품에 관한 법률”이 제정됨으로서 건강기능성식품의 안전성 확보 및 품질향상이 확보될 것으로 믿는다. 아울러 천연자원으로부터 생리활성 물질을 이용한 식품산업이 크게 활성화 될 것으로 전망하고 있다. 특히 이 법률 시행을 위해 연구된 내용을 지난해 건강기능식품 학술 심포지움에서 기능성 평가를 위해 제안된 평가방법에는 “개별인정 형 건강기능성 식품”의 허가를 위해서는 인체 시험 대신에 동물실험

을 필수 항목으로 설정하는 등 많은 기준이 정립되고 있다. 이러한 사회적 요구와 이법률안의 제정을 계기로 아직 개발되지 않은 수많은 천연자원부터 신기능 물질을 발굴하여 과학적인 효능규명과 제품화 개발을 위한 연구가 국가적인 차원에서 활성화되고 있는 실정이므로 본 연구는 필수적이라고 생각된다.

따라서 본 연구에서는 산초나무와 초피나무의 잎, 열매, 줄기 및 뿌리의 생리활성분획으로부터 생리활성성분을 분리·동정하여 이들 물질의 생리활성을 세포·분자 생물학 수준에서 뿐만 아니라 동물 생체에까지 그 효능을 검정하여 그 활성을 비교 연구하고 안전성과 독성을 검정하며 나아가 기능성제품화를 위한 방안을 구축하고자 한다. 아울러 국내에 유통되는 중국산 초피나무는 값은 저렴하지만 향기가 거의 없어 이용도가 아주 낮으므로 한국산 초피나무의 우수성을 소비자에게 인식시키기 위하여 한국산과 중국산 초피나무를 함께 비교 연구하고자 한다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 산초나무와 초피나무로부터 생리활성성분을 분리하고 생리적 효능을 구체적이고 과학적으로 규명함과 동시에 기능성제품의 개발을 통하여 우리나라 산초나무와 초피나무의 우수성과 그 기능성을 밝힘으로서 소비자로 하여금 기능성 제품의 이용도를 높일 뿐만 아니라 산초나무와 초피나무의 대량 재배로 농가 소득 향상에 기여함을 그 목적으로 하고 있다. 특히 우리나라 산초나무와 초피나무는 중국, 일본 등의 산초나무와 초피나무보다 그 향기가 매우 강하여 국외 품종들에 비해 상당히 우수하므로 우리나라의 것을 선호하여 매년 일본 등의 동남아에 수출이 늘어나고 있어서 현재 경상북도의 권장 소득(농)작물로 지정되어 많은 농가에서 재배되고 있다.

이와 관련하여 한방 약용식물으로써 이용될 뿐만 아니라 민간요법, 그리고 식용으로 이용하는 산초나무와 초피나무 등으로부터 생체 생리활성성분을 분리하여 이들 성분의 생리적 역할 및 작용기작을 분자, 세포생물학의 첨단기술로써 규명하여 산초나무

및 초피나무 유래의 유효생리활성 물질 사용의 과학화를 목표로 한다. 또한 이들 물질의 인체 infectious disease와 암에 대한 예방과 치료효능을 검토하는 본 연구 과제 수행으로 국내 대학에 있어서의 생체면역기구 및 그 방어 기작에 대한 분자생물학적 및 세포생물학적 연구기반을 확립하여 이 분야에 있어서의 기술축적 및 향상을 기하는 것이다.

▶ 세부과제 1 : 동물실험을 통한 생리활성 물질의 효능 및 작용기작 규명

구 분	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위	연구개발 결과
1차년도 (2003)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 산초나무와 초피나무 추출물의 생리활성 검색 (In vitro) 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 잎, 열매, 줄기 및 뿌리 추출물의 항산화, 항염증 항혈전 및 free radical 소거 작용 활성 검정 <ul style="list-style-type: none"> - 항산화 : 흰 쥐 간 microsome에서 지질과산화 억제 작용 및 DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 측정 - 항혈전 : Activated partial thromboplastin times (APTT) & Thrombin times(TT) 측정 - 항염증 : 쥐 다형핵백혈구 5-Lipoxygenase 저해효과 ○ 선별된 우수 생리활성 분획물의 항산화, 항혈전, 항염증 및 free radical 소거 작용 검정 <ul style="list-style-type: none"> - 흰쥐 간 microsome에서 지질과산화 억제작용 및 DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) - Activated partial thromboplastin times 및 Thrombin times(TT) - 쥐 다형핵백혈구 5-Lipoxygenase 저해효과 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 생리 활성 물질 검색 및 확인 ○ 국내산의 효능우수성 확인 ○ 산초나무와 초피나무의 활성비교 확인
2차년도 (2004)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 동물 실험을 통한 우수 생리활성물질의 효능 규명 (In vivo) 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 동물실험을 통한 우수 생리활성 물질의 항산화, 항염증 및 항혈전 효능 규명 <ul style="list-style-type: none"> - 항산화 : 적혈구-Superoxide dismutase, Glutathione peroxidase, TBARS 간조직-Superoxide dismutase, Glutathione peroxidase, Catalase, Paraoxonase, Arylesterase, TBARS - 항염증 : 쥐 다형핵백혈구 5-Lipoxygenase 및 Leukotriene B₄ 측정 - 항혈전 : 적혈구 및 혈장 - Activated partial thromboplastin times & Thrombin time - 항노화 : 간조직 - Lipofuscin, Carbonyl value 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 우수 생리활성물질의 생체내에서의 효능 기작 규명 ○ 논문발표
3차년도 (2005)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 우수 생리활성물질의 성인병 예방 효능 및 생체 무독성 규명 과 기능성 건강보조 식품개발을 위한 방안 모색 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 우수 생리활성물질의 성인병 예방 효과, 해독작용 및 생체 무독성 규명 <ul style="list-style-type: none"> - Oxidative stress 완화 및 free radical scavenging 작용: 간조직 Mixed function oxidase system 측정 간조직 Free radicals (Superoxide radical, H₂O₂) 측정 혈장 - Paraoxonase, Arylesterase - 혈중 지질개선 : Total-lipid, TG T-cholesterol, HDL-cholesterol LDL-cholesterol, AI - 생체 해독 작용 : Glutathione S-transferase GSH & GSSG, GSH/GSSG - 생체 무독성 검증 : 혈중 - GOT, GPT, T-TBARS, HDL-TBARS, LDL-TBARS - 유효량 및 안전성 판정을 위한 animal-to-human extrapolation - 기능성 건강식품의 개발을 위한 방안 모색 다이어트 보조제, 면역조절제, 성인병 예방보조식품, 기능성 조미액, 향신료 - 허용량, 사용 기준치 설정 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 기능성 물질의 해독작용 및 무독성 입증 ○ 유효량 및 허용량 판정 ○ 기능성 건강보조 식품 개발 방안 모색 ○ 논문발표 ○ 특허 출원

▶ 세부과제 2 : 산초나무와 초피나무로부터 생리활성 물질의 분리 및 구조 결정 및 안정화 기술개발

구 분	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위	연구개발결과
1차년도 (2003)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 산초나무와 초피나무의 부위별 생리활성 분획의 확인 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 산초나무와 초피나무의 잎, 열매, 줄기 및 뿌리로부터 추출물의 제조 <ul style="list-style-type: none"> - 산초나무와 초피나무의 잎, 열매, 줄기 및 뿌리 구입 - 산초나무와 초피나무의 잎, 열매, 줄기 및 뿌리의 대량추출 ○ 산초나무와 초피나무의 잎, 열매, 줄기 및 뿌리로부터 생리활성분획의 확인 <ul style="list-style-type: none"> - 잎, 열매, 줄기 및 뿌리 추출물에 대한 용매분획에 의하여 methylene chloride, ethyl acetate, <i>n</i>-butanol 및 water 분획의 제조 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 추출물의 제조 ○ 생리활성분획의 확인 ○ 국내산의 우수성 확인 ○ 산초나무와 초피나무의 생리활성 성분 비교 확인
2차년도 (2004)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 우수생리활성분획으로부터 활성물질의 분리·정제 및 구조결정 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 우수생리활성분획으로부터 활성물질의 분리 <ul style="list-style-type: none"> - 잎, 열매, 줄기 추출물의 용매분획에 대한 open column chromatography 실시 - HPLC를 통한 화합물의 분리 ○ 생리활성물질의 구조 결정 <ul style="list-style-type: none"> - 물리·화학적 방법 이용 (m.p., [α]_D, 유도체 합성 등) - 분광학적 방법 이용 (UV, IR, 1D 및 2D NMR, Mass Spectrometry 등) ○ 생리활성 물질의 작용기전 연구를 위한 물질제조(액, 가루, 추출물) 공급 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 생리활성물질의 분리·정제 ○ 생리활성물질의 구조 결정 ○ 논문 발표
3차년도 (2005)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 분리·동정된 우수생리활성물질을 대량생산 및 안정화 기술 개발 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 생리활성물질의 구조 결정 <ul style="list-style-type: none"> - 물리·화학적 방법 이용 (m.p., [α]_D, 유도체 합성 등) - 분광학적 방법 이용 (UV, IR, 1D 및 2D NMR, Mass Spectrometry 등) ○ 우수 생리활성 물질의 대량 생산 (생리활성 오일, 파우더, 추출물) ○ 원료 물질의 안정화 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 우수 생리활성물질의 구조 결정 ○ 우수 생리활성물질의 대량생산 ○ 신물질 특허 ○ 논문 발표

▶ 세부과제 3 : 산초나무와 초피나무로부터 신 기능성 생리활성물질의 탐색과 안정성연구 및 제품 개발

구 분	연구개발목표	연구개발 내용 및 범위	연구개발 결과
1차년도 (2003)	○ 산초나무와 초피나무의 추출물로부터 항미생물성, 돌연변이 유발성, 암세포독성물질 및 면역조절 관련 유효성분의 검색	○ 산초와 초피의 생리활성물질 관련 자료수집 ○ 항미생물성 유효성분 탐색 - 항세균, 항진균 활성 ○ 돌연변이 유발성 유효 성분 탐색 - Ames test에 의한 돌연변이 유발성 검정 ○ 암세포독성 성분의 탐색 - 암세포의 증식억제 활성 검정 - 암세포의 자살유도 성분 검정 ○ 선천성 면역능 증강 성분의 탐색	○ 산초와 초피 유래의 면역 관련 신기능성 생리활성물질 확인 ○ 국내산의 우수성 확보 ○ 산초나무와 초피나무의 차이점 확인 ○ 논문발표
2차년도 (2004)	○ 분리, 동정된 생리활성물질의 신기능 관련 유효성분의 검색과 작용기전 규명	○ 유효분획 또는 정제물질을 이용한 항 미생물활성 효능 검정 - 항식중독세균 활성 검정 - 항치아우식균 활성 검정 - 항진균 활성 검정 - 항병원성 미생물 활성 검정 ○ 유효분획 또는 정제물질을 이용한 암세포독성 효능 검정 - 암세포의 세포주기조절 활성 검정 - 암세포의 자살유도 활성 검정 ○ 유효분획 또는 정제물질을 이용한 천연 면역능 조절 효능 검정 ○ 신기능성 성분의 실용화를 위한 가능성 검토	○ 유효 성분의 분자, 세포생물학적 작용기전 규명 ○ 특허출원 ○ 논문발표
3차년도 (2005)	○ 우수 생리활성물질의 안정성 검정 및 제품개발	○ 우수 생리활성 물질의 안정성 - 온도 안정성 ○ <i>Ex vivo</i> 와 <i>in vivo</i> 실험계를 이용한 효능 물질의 독성 검사 - 정상세포 및 mouse 생체에 대한 독성 ○ 제품화관련 유효물질의 확보 및 제품 spec 작성 - 제품유형의 결정 ○ 기능성 시제품 제조관련 산업계와의 활용 방안 연구 및 시제품 제조	○ 신규 효능물질의 특허출원 ○ 시제품의 유효량, 유효기간 설정 ○ 논문발표

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

제 1절 연구개발 결과

세부과제 1: 동물실험을 통한 생리활성 물질의 효능 및 작용기작 규명

1. 산초나무와 초피나무 추출물의 항산화, 항혈전, 항당뇨 생리활성 검색 (*in vitro*)

가. 산초와 초피나무 추출물의 부위별 DPPH radical 소거능과 간 microsome 지질과산화 억제능은 잎 > 줄기 ≥ 뿌리의 순으로 활성이 높았으며 종자와 과피에서는 낮았다. DPPH radical 소거능은 ethyl acetate 층이 가장 높은 활성을 나타내었으며 0.125~5 mg/mL 까지 농도 의존적으로 증가하였고 지질과산화 억제능은 methanol, methylene chloride 층도 ethyl acetate 층과 유사하게 높았고 0.05~0.25 mg/mL 까지 농도 의존적으로 증가하였다. 이 활성은 항산화의 표준물질이 되는 α -tocopherol보다도 높았다.

나. Activated partial thromboplastin times (APTT)으로 측정한 산초 부위별 항혈전 활성은 잎 > 줄기 > 뿌리 순으로 높게 나타났다. 각 부위별 모두 *n*-butanol 층에서 높은 반응고 시간을 나타내었고 종자의 butanol 추출물의 활성은 잎의 활성만큼 높았으며, 농도별로는 0.1~0.5 mg/mL에서 높게 유지되었으나 1 mg/mL 이상이 되면서 감소되었다. 초피의 경우 항혈전 활성은 잎, 줄기, 뿌리 추출물 1 mg/mL에서는 산초와 유사하였으나 낮은 농도에서 오히려 감소하는 경향이었고, 종자와 과피에서 활성이 산초보다 높았다.

다. Soybean lipoxygenase 활성으로 측정한 항염증 활성은 산초와 초피에서 모두 잎에서 높게 나타났으며 용매분획별로는 ethyl acetate와 butanol 분획에서 높았다.

라. 산초 잎의 *n*-butanol 층의 22 가지 분획물에 대하여 α -glucosidase 활성 저해를 이용한 항당뇨 효능을 조사한 결과 7종이 활성을 보였으나 이들은 항산화능이 낮은 분획이어서 항산화 활성을 가진 물질과는 다른 것으로 판단되었다.

2. 동물실험을 통한 산초 잎 추출물의 효능 및 안전성 규명 (*in vivo*)

가. Sprague-Dawley 종 흰쥐를 이용하여, 산초 잎의 추출물 (ethanol) 및 2차 용매 분획 (*n*-butanol과 methylene chloride 층)을 고지방식이에 0.1~2.0 % 첨가하여 *in vivo*에서 항산화, 항염증 및 항혈전 및 고지혈 예방 효능을 조사하였고 생체 해독 기능의 활성화 및 무독증을 검증하여 유효 안전량을 산출하였다.

나. 산초 잎의 2차 용매분획 투여로 간조직의 항산화관련 효소 중 glutathione peroxidase(GSH-Px), paraxonase가 유의적으로 증가하였고 catalase도 증가경향이었고 지질과산화물과 리포푸신 및 카보닐 값이 감소하였다. 간조직 과산화물은 에탄올 추출물 0.2 % 첨가군에서부터 유의적으로 감소하였고 1 %에서 2 %로 증가한 경우 더 이상의 감소는 없었다.

다. 적혈구에서는 GSH-Px와 superoxide dismutase가 산초 추출물에 의하여 증가하였고 과산화물은 감소하였으며 혈장의 APTT와 thrombin time도 시료의 활성물질 투여로 증가하여 항혈전 효능을 보여주었다.

라. 식이 내에 산초 잎의 에탄올 추출물 함량이 증가함에 따라 혈청 중성지방과 총 콜레스테롤이 감소하는 경향이었으며 HDL-콜레스테롤은 추출물 함량이 0.2 % 수준에서 유의적으로 증가하여 동맥경화지수는 0.5~1.0 % 섭취군에서 가장 좋았다.

마. 혈청 GOT와 GPT는 산초에탄올 추출물 식이에 0.1~2.0 %까지 첨가하여도 증가하지 않았으며 GPT는 0.5 % 첨가군에서는 유의적으로 감소하였다. 혈청 과산화물도 역시 0.5 % 수준에서 가장 낮았다.

바. 고지방 대조군에서 변화되었던 간조직 glutathione S-transferase 활성 및 GSH/GSSG 비율이 2차 용매 분획물의 첨가로 정상화 되어 체내 해독기전이 회복되었다.

사. 유효 안전량을 성인 사람에게 적용하여 산정한 결과 methylene chloride 및 *n*-butanol 분획물일 경우 0.4~0.5 g정도이며 에탄올 추출물인 경우 1~2 g으로 산정되었다.

3. 산초 및 초피 성분의 어류가공품 보존제로서의 활용

가. 산초 잎의 에탄올 추출물과 초피 정유를 푼치 1 kg당 0.125~2.000 ppm 함유하도록 분사하여 수분함량이 30~40 %가 될 때까지 숙성 건조하여 과메기를 제조한 후 진공 포장하였으며 이는 동물실험에서 조사한 최대 무독성량의 8000 분의 1로 안전이 보장되는 양이었다.

나. 산초 추출물과 초피 정유를 처리한 과메기는 개봉 후 1일에서 7일까지 과산화 및 TBA 값이 현저히 감소했으며 이는 농도에 비례하였다. 산가도 변화 폭은 적어도 감소하였다.

다. 산초 및 초피 처리한 과메기의 관능검사 결과에서는 큰 차이가 없었으나 어류의 부패지수로 사용하는 dimethylamine과 trimethylamine의 생성이 무처리군에 비하여 저장기간 중에 0.25 ppm 이상에서 뚜렷이 감소하였다.

세부과제 2 : 산초나무와 초피나무로부터 생리활성 물질의 분리 및 구조 결정

1. 산초나무와 초피나무의 뿌리와 줄기는 경상북도 팔공산에서 채취하여 세절 건조 후 시료로 사용하였으며, 산초나무와 초피나무의 잎과 열매는 경북 경산시 자인면 소재 동아임장에서 구입하여, 잎은 동결 건조 후 가루로 하여, 그리고 열매는 자연 건조 후 과피와 종자로 분리하여 가루로 하여 시료로 사용하였다. 산초나무와 초피나무의 과피와 줄기 그리고 뿌리는 100 % methanol로 추출하여 농축한 메탄올 엑기스를 각각 methylene chloride, ethyl acetate, *n*-butyl alcohol 및 수층으로 분획한 후 메탄올 엑기스와 methylene chloride, ethyl acetate, *n*-butyl alcohol 및 수층 분획에 대하여 제 1 세부과제와 제 3 세부과제에서 여러 종류의 활성을 측정하였다. 산초나무와 초피나무의 잎은 80 % methanol로 추출하여 농축한 메탄올 엑기스를 각각 methylene chloride, ethyl acetate, *n*-butyl alcohol 및 수층으로 분획한 후 메탄올 엑기스와 각 분획에 대하여 활성을 측정하였다. 산초나무와 초피나무의 종자는 100 % methanol로 추출하여 농축한 메탄올 엑기스를 각각 hexane, methylene chloride, ethyl acetate, *n*-butyl alcohol 및 수층으로 분획한 후 메탄올 엑기스와 각 분획에 대하여 활성을 측정하였다.

2. 산초나무와 초피나무의 잎에 대한 항균성 실험을 위하여 앞에서와 같이 추출하여 분획한 방법 외에 100 % methanol과 95 % ethanol을 추출용매로 하고 각각 상온과 60 °C에서 환류냉각 추출하여 추출액을 농축한 후 농축 엑기스에 대하여 항균활성 비교실험을 행하였다. 또한 초피 과피와 초피 종자의 가루에 대해서도 hexane, methylene chloride, ethyl acetate와 methanol을 추출용매로 하여, 과피는 25 °C에서, 종자는 30 °C에서 추출하여 농축한 후 농축 엑기스에 대하여 항균활성 실험 및 기타 활성실험을 비교하였다.

3. 중국산 초피 과피와 한국산 초피 과피의 비교 실험을 위하여 별도로 대구시 약령사에서 중국산 초피 과피와 한국산 초피 과피를 구입하여 가루로 한 후 100 % methanol로 추출하여 농축한 메탄올 엑기스를 각각 methylene chloride, ethyl

acetate, *n*-butyl alcohol 및 수층으로 분획한 후 메탄올 엑기스와 methylene chloride, ethyl acetate, *n*-butyl alcohol 및 수층 분획에 대하여 제 1 세부과제와 제 3 세부과제에서 여러 종류의 활성을 측정하였다. 산초는 국내에 중국산이 유통되지 않으므로 비교 실험을 수행하지 않았다.

4. 산초 잎 시료는 2004년 6월에 채취하여 동결 건조 후 가루로 만들어 80 % methanol로 추출하여 메탄올 엑기스를 각각 methylene chloride, *n*-butyl alcohol 및 수층으로 분획한 후 methylene chloride와 *n*-butanol 분획에 대하여 제 1 세부과제의 동물실험 재료로, 제 3 세부과제의 세포독성 실험 재료로 제공하였다.

5. 산초 과피 및 초피 과피, 종자에 대한 항균성 실험을 위하여 초피 과피, 종자를 hexane, methylene chloride, ethyl acetate와 methanol을 추출용매로 하여, 과피는 25 °C에서, 종자는 30 °C에서 추출 및 농축하고, 산초 과피 및 초피 과피, 종자를 수증기 증류하여 (수증기증류장치 Fig. 16) 각 분획에 대하여 제 3 세부과제의 항균활성 측정 시료로 제공하였다.

6. 초피 과피 methylene chloride 층에 대한 항균활성을 진일보 측정하기 위하여 산초 과피, 초피 과피의 methylene chloride 층을 선택하여 preparative TLC 분획 실험을 하여 CS-MC-A~F 및 SE-MC-A~F의 각 7개 분획으로 나누었으며 각 분획에 대해 제 3 세부과제에서 항균활성을 측정하였다.

7. 1차년도(2003년) 연구결과, 산초나무 추출물의 부위별 지질과산화 억제활성, APTT 활성 및 DPPH radical 소거 활성 비교에서는 잎 > 줄기 ≥ 뿌리의 순으로 활성이 높게 나타났고, 산초 잎 ethyl acetate 분획과 산초 잎 *n*-butanol 분획에서 강한 항산화력을 나타내었으며 산초 잎 methylene chloride 분획이 유방암 세포주 중 MDA438균주에 강한 세포독성을 나타내었다. 이 실험결과에 의하여 산초 잎 각 분획에서 항산화활성이 가장 좋은 *n*-butanol 분획에 대하여 flash column chromatography를 실시하여 SL-Bu-A~W의 23개의 분획으로 나누었고, 유방암 세포주 중 MDA438 균주에 강한 세포독성을 나타낸 methylene chloride 분획을 flash column chromatography를

실시하여 SL-MC-A~W의 23개의 분획으로 나누었으며 SL-Bu-A~W 각 분획에 대하여 항산화 활성과 항당뇨 활성을, SL-MC-A~W 각 분획에 대하여 세포독성을 측정하였다.

8. 항산화활성이 큰 *n*-butanol 층에 대하여 flash column chromatography를 실시하여 얻은 SL-Bu-A~W 23개 분획 중 항산화활성이 높은 SL-Bu-O, -U 그리고 SL-Bu-C 분획을 선택하여 SiO₂ column chromatography, RP C-18 column chromatography, Sephadex LH-20 column chromatography를 반복 실시하여 화합물 1~5를 분리하였다. 세포독성이 큰 methylene chloride 층을 flash column chromatography를 실시하여 얻은 SL-MC-A~W 23개의 분획 중 세포독성이 큰 SL-MC-O, -R 그리고 SL-Bu-S 분획을 선택하여 SiO₂ column chromatography, RP C-18 column chromatography, Sephadex LH-20 column chromatography를 반복 실시하고 또 recrystallization 등의 방법으로 화합물 6~15를 분리하였다. UV, IR, ¹H-NMR과 ¹³C-NMR (1D 및 2D), mass spectrum 등의 분광학적 방법으로 분리한 물질의 구조를 구명하였다. 구명한 구조중 4, 12, 13은 신물질이며 나머지 물질은 기지물질이다.

9. 분리한 화합물은 4-[(1*E*)-3-hydroxy-1-propenyl]-2,6-dimethoxyphenol 1-*O*-β-D-glucopyranoside (syringin, 1), 2-propyl alcohol β-D-glucopyranoside (2), (6*S*,7*E*,9*S*)-6,9-dihydroxy-4,7-megastigmadien-3-one 9-*O*-β-D-glucopyranoside (vomifoliol 9-*O*-β-D-glucopyranoside, 3), (3*R*,6*E*)-3,7-dimethyl-3,8-dihydroxy-oct-1,6-dien 8-*O*-β-D-glucopyranoside (4), (3*R*,6*E*)-3,7-dimethyl-3,8-dihydroxy-oct-1,6-dien 3-*O*-β-D-glucopyranoside (cnidioside C, 5), 20(29)-lupen-3-ol (lupeol, 6), 20(29)-lupen-3-one (lupeone, 7), bergapten (8), β-sitosterol (9), 7-[(3,7-Dimethyl-2,6-octa-dienyl)oxy]-coumarin (auraptene, 10), 6,7-Dimethoxy-2H-naphthalen-1-one (11), 4-[4-(3-Hydroxy-propenyl)-phenoxy]-2-methyl-but-2-en-1-ol (12), 4-[4-(3-Hydroxy-propyl)-phenoxy]-2-methyl-but-2-en-1-ol (13), 2-(2-Methoxy-non-1-enyl)-benzoic acid (14), 8-Hydroxy-7-methoxy-chromen-2-one (15) 임을 확인하였다.

세부과제 3: 산초나무와 초피나무로부터 신 기능성 생리활성물질의 탐색과 안정성연구

1. 김치 숙성에 대한 산초와 초피의 영향

가. 산초, 초피 유래의 생리활성물질의 신기능 탐색을 먼저 한국인의 식생활에서 중요한 위치에 있는 김치 숙성에 대하여 조사하였다. 초피 잎의 경우 항균력에 기인하여 일반세균의 생육이 억제됨을 확인할 수 있었다. 또한 초피 잎은 유산균의 생육을 증가시키는 것으로 나타나며, 이것은 초피 잎을 첨가한 김치가 좀 더 새콤하다는 관능검사 결과와도 일치한다. 산초 잎은 초피와는 달리 일반 세균 및 대장균의 생육에 대한 영향이 그리 강하지 않았으나 유산균의 증식에는 positive 효과를 보였다. 관능검사 결과에서도 대조군보다 순한 맛으로 평가되었다. 이것은 아마 김치 숙성시의 microflora에 영향을 미치는 것으로 사료되었다.

나. 김치 발효 초기에 우세하게 증식하여 새콤한 맛을 낸다고 알려져 있는 *Leuconostoc mesenteriodes*와 김치 발효 후기에 왕성하게 증식하며 시큼한 맛을 내는 산패균으로 알려진 *Lactobacillus plantarum*에 대한 초피 잎과 산초 잎의 methanol 추출물과 ethanol 추출물의 영향을 조사한 결과, 초피 잎의 methanol, ethanol 추출물을 첨가했을 때 *Leuconostoc mesenteriodes*와 *Lactobacillus plantarum*의 생육이 대조군보다 빨랐으며, 산초 잎의 methanol 추출물과 ethanol 추출물이 첨가되었을 때도 생육이 대조군보다 빨랐으나 0.2% 산초 잎을 직접 첨가했을 때에는 *Lactobacillus plantarum*의 증식이 느렸다.

2. 산초와 초피 유래 항균활성 성분에 관한 연구

가. 산초와 초피의 잎, 줄기, 뿌리, 종자와 과피 부분을 methanol 층, hexane 층, methylene chloride 층, ethyl acetate 층, *n*-butanol 층과 수층으로 6 단계별로 분획하여 *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus pumilus*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* 및 *E. coli* O-157를 대상으로 항균력을 조사하였다. 산초의 모든 부위별 분획들과 초피 잎, 줄기, 뿌리, 과피에서는 항균 관련성 물질

이 확인되지 않은 반면, 초피 종자 추출물의 경우 *B. pumilus*에 대해서는 *n*-butanol 분획을 제외한 모든 분획에서 약하지만 항균활성이 나타났고, *S. aureus*에 대해서는 ethyl acetate와 *n*-butanol 분획에서, *P. vulgaris*의 경우는 ethyl acetate 분획에서만 활성이 나타났다. *A. hydrophila*에 대해서는 미약하기는 하나 methanol, methylene chloride, ethyl acetate 분획에서 활성이 나타났으며, *E. coli* O-157에 대해서는 methylene chloride 분획에서만 항균활성을 확인할 수 있었다.

나. *S. mutans*, *A. hydrophila*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *E. coli* O-157, *Bacillus pumilus*에 대해 초피 종자와 과피에서 분리한 정유 성분의 항균 활성을 조사한 결과, 각 미생물에 따라 차이는 있으나 조사된 그람 음성세균과 양성세균 모두에 대해 항균활성을 나타내었다.

다. *S. mutans*, *A. hydrophila*, *C. joostei*, *B. pumilus*, *P. vulgaris*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli* O-157에 대하여 초피 종자 정유 성분의 미생물 생육에 대한 최소 저해 농도(Minimum Inhibitory Concentration)를 측정하였으며, 그 범위는 0.1~0.48 mg/mL으로 결정되었다. 산초와 초피의 경우 특히 과피를 이용하고 종자는 버리는데, 종자의 정유성분에서의 항균물질의 확인은 버리는 종자로부터 항균 관련 물질을 확보하여 자원 활용의 효율을 높이는 것이 된다.

라. 초피 종자와 과피의 정유성분의 항균 활성 정도를 항생제인 ampicillin과 비교해 보기 위해 0.1 및 0.5 mg/mL 농도의 ampicillin을 *S. mutans*에 대하여 항균활성을 조사하였으며, 3 mg/disc 농도의 초피 종자 정유 성분의 항균활성은 3 µg/mL ampicillin의 항균력과 비교되는 높은 활성을 보였다.

마. *H. pyroli*에 대한 항균물질을 조사한 결과 초피의 methylene chloride 분획과 메탄올 분획, 과피 정유 성분에서 항균력을 확인하였고, 과피 정유성분이 *H. pyroli*에 대하여 가장 강한 항균활성을 보였다.

바. 항균활성이 가장 강하게 확인된 초피 종자와 과피의 정유성분을 GC-MS로 분

석한 결과 sabinene, 2- β -pinene, γ -terpinene, terpinolene, linalool, citronellal, isopulegol, L-citronellol, cuminic aldehyde, phellandral, citronellyl acetate, α -humulene, α -morphene과 naphthalene 성분들이 초피 종자와 과피 두 정유 성분에서 공통적으로 검출되었으며, 초피 종자 정유성분에서는 γ -terpinene (42.2 %), citronellal (14.4 %)과 geranyl acetate (10.7 %)가 주성분들이었고 초피 과피 정유성분에서는 γ -terpinene (19.1 %), citronellal (12.2 %), lavandulyl acetate (11.1 %), 1- β -pinene (7.5 %), citronellyl acetate (5.0 %)이 주성분들이었다.

사. 가장 강한 향균력을 보이는 초피 과피 정유 성분으로부터 순수 물질을 분리 동정하고자, Thin Layer Chromatography (TLC)로 분획하여 각 spot을 분리하고 정제하여 향균성을 다시 조사한 결과, 한 가지 정제물에서 강하게 나타나는 것이 아니라 여러 정제 분획물에서 나타났으며, 그 향균력이 분리 정제 전의 초피과피 정유 성분보다 활성이 낮았다. 이는 향균에 관여할 것으로 추정되는 후보 물질이 단일성분이 아닌 여러 성분이 복합적으로 관여할 것으로 추정된다.

3. 분리, 동정된 생리활성 물질의 신기능 관련 유효성분의 검색과 작용기전 규명

가. 산초 추출물의 암세포 독성을 human leukemia T 세포 유래인 Jurkat E6.1 세포주를 대상으로 산초의 뿌리, 줄기, 잎, 종자, 과피를 methanol, methylene chloride, ethyl acetate, *n*-butanol, 수층으로 각각 분획한 추출물로 처리하였다. 각각의 추출물의 세포독성을 비교하였을 때, 각 부위의 methylene chloride 분획이 높은 세포독성을 나타내었고, 잎 > 줄기 > 종자 > 뿌리 > 과피의 순서로 세포독성이 높게 나타났다.

나. 인체유방암 세포주 estrogen receptor (+) MDA361과 estrogen receptor (-) MDA438 세포주에 산초잎의 methylene chloride 추출물 (SL-14)을 처리한 결과, 세포독성이 MDA361보다 MDA438에서 더 강하게 나타났다. 그러나 초피의 methylene chloride 추출물은 MDA438이나 MDA361 세포주에 세포독성을 전혀 나타내지 못하였다.

다. 암세포에 대한 세포독성을 나타낸 SL-14의 유효성분을 찾아내기 위해서 SL-14를 GC-MS를 사용하여 SL-14에 포함된 성분들을 조사하였다. SL-14에 대한 GC-MS 분석결과 9,19-cyclolanost-24-en-3-ol (15.10 %), 2- α -methyl-17, β hop-21-ene (15.10 %), 15-methyl-2,3-dihydro-1H Benzazepin (11.95 %), phytol (10.38 %), lupeol (9.92 %), 12-methylbenzofuran (8.23 %), 9,12-octadecadienoic acid (5.96 %), *cis,cis,cis*-9,12,15-octadecatrienoic acid-methylester (5.49 %), 9,12,15-octadecatrienoic acid-methylester (3.59 %), 15-methyl-4-(1-methylethylidene)-2-(4'-nitrophenyl) (3.36 %) 등이 주성분으로 확인되었다.

라. 산초 잎의 methylene chloride 추출물 (SL-14)의 세포 독성 기전을 Jurkat 세포주를 이용하여 조사한 결과, mitochondrial cytochrome c release와 이어지는 caspase 9의 활성화, caspase-3의 활성화에 따른 PARP의 분해를 Western blot analysis로 확인할 수 있었으며, apoptosis 특유의 현상인 DNA fragmentation도 관찰되었다. 이와 같은 apoptosis는 anti-apoptotic 유전자 Bcl-xL이 발현되는 Jurkat J/Bcl-xL 세포주에서는 억제되어 mitochondria-dependent apoptosis 기전으로 규명되었다.

마. 한편 산초 잎의 ethyl acetate 분획인 SL-15와 *n*-butanol 분획인 SL-16 분획은 오히려 유방암 세포주뿐만 아니라 혈액암 세포주의 세포증식을 향상시켰다. 이를 제 1세부 과제 연구 결과와 연계하여 조사한 결과, 항산화 물질이 함유된 분획으로 항산화 관련 물질의 영향으로 오히려 세포 증식이 좋은 것으로 추정되었다.

바. 산초 잎의 methylene chloride 분획 속에 존재하는 세포자살 유도물질을 정제하기 위해 silica gel column으로 분획하고 그 결과 auraptene을 확보하였다. 정제된 auraptene의 Jurkat T 세포에 대한 IC₅₀ 값은 16.5 μ g/mL였다. Auraptene (10~20 μ g/mL)처리에 의한 Jurkat T 세포의 세포자살유도 기전은 ER stress에 의해 매개되는 caspase-12 및 caspase-8의 활성화가 초기에 유도되었으며, 활성화된 caspase-8의 뒤이은 하류 신호로서 Bid 분해, mitochondria cytochrome c-의존적 또는 mitochondria cytochrome c-비의존적인 caspase cascade의 활성화, PARP 분해와 apoptotic DNA

fragmentation으로 확인되었다. 이 과정은 auraptene의 농도에 의존적으로 나타남을 확인하였다.

4. 우수 생리활성물질의 안정성 검정 및 제품 개발

가. 초피 종자와 과피 성분의 안정성을 검정하기 위하여 *Salmonella typhimurium* TA 100, 1538 균주를 이용하여 돌연변이 유발성에 대한 시료의 영향을 조사하였다. 그 결과, control에 비하여 시료를 처리 후 발생하는 revertants 수가 88~99 % 감소되어 돌연변이 유발을 크게 억제하는 효과가 있음을 확인하였다.

나. 초피 종자와 과피 정유 성분에 대한 열 안정성과 시간에 따른 유효성분의 활성을 조사하였다. 초피 종자와 과피 정유 성분 공히 90 °C 열 처리로 약 46 %와 38 %씩 항균활성이 감소하였으나 그 이하 온도에서는 비교적 안정하였고 치약으로 개발한 제품의 항균력도 연구 수행 기간 중 유지되어 항균관련 성분은 안정함을 확인하였다.

다. 치아우식균 *S. mutans*에 대한 항균 활성이 가장 높은 초피 과피 정유 성분을 기능성 치약으로 개발, 활용하고자, 치약 제품 생산 업체에 의뢰하여 초피 과피 정유 성분을 포함한 시제품 치약을 제조하여 항균활성을 조사한 결과 시중 제품보다 항균 활성이 높았다.

라. 항균력이 가장 강하게 확인되는 초피 과피의 정유 성분을 기능성 치약과 항균 크림 및 화장품 보존제로의 활용하고자 신사임당 화장품회사에 의뢰하여 가능성을 조사한 결과 여드름 원인균과 여성 질염 원인균에 탁월한 효과가 있음을 확인하였다.

마. 생물 농약으로의 활용가능성을 조사한 결과 식물 유해 진균에 대한 효과는 약한 것으로 확인되었다.

제 2절 활용에 대한 건의

1. 본 연구과제 수행으로 획득한 산초 및 초피 추출물의 항산화, 항염증, 항혈전 기능과 지질개선효능을 이용하여 성인용 예방 기능성건강보조식품 및 가공 어육류 품질보존제로 활용 가능성과 다음과 같다.

가. 산초 잎의 80 % 에탄올 추출물은 제조에 있어서 경제적이면서 항산화, 항염증, 항혈전 효과를 보인 2차 용매 (methylene chloride와 *n*-butanol) 분획 성분을 25~35 % 함유하고 그 자체로 지질개선효과를 가지고 있으며 1일 사람이 1~2 g 섭취하여도 독성이 예상되지 않으므로 다기능건강식품 원료로 활용이 현실적이다.

나. 산초 잎의 2차 용매 (methylene chloride와 *n*-butanol) 분획 성분은 제조에 있어 다소 비용이 들어도 에탄올 추출물에 비하여 적은 양 (1일 0.4~0.5 g)으로 효능을 가질 수 있으며 항염증과 항혈전, 항당뇨를 분리하는 질환 특이성 건강보조식품으로 개별적으로 특성화하여 활용할 수 있다.

다. 산초 잎 에탄올 추출물은 매우 소량 (*in vivo* 무독성 용량의 1/1000 이하)으로도 과메기 품질 보존 효과를 보였으므로 산초와 초피의 잎 외의 뿌리, 줄기 등 각종 부위별로 나타난 대표적인 활성, 항산화 활성은 가공 어육류 품질보존제로 안전하게 활용 가능하다.

2. 본 과제 수행으로 획득한 산초 및 초피 추출물의 다양한 항균활성 및 암세포독성을 이용한 활용 가능성은 다음과 같다.

가. 산초 초피 유래의 항균물질을 *S. mutans*, *A. hydrophila*, *C. joostei*, *B. pumilus*, *P. vulgaris*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli* O-157 균주를 대상으로 항균력을 조사한 결과 Gram-음성균과 양성균에 상관없이 항균력을 발휘함을 알았다. 이와 같은 broad spectrum 항균력을 이용하여 새로운 항생제로 개발하면 약제 내성

병원 미생물에 대한 탁월한 항생제가 될 것이다.

나. 식중독균에 대한 항균력을 이용하여 식품포장에서 가장 많이 사용되는 plastic wrap 제조 시 첨가하여 plastic wrap에 의한 식품보존기간의 연장뿐만 아니라 포장재에 함유되어 있는 항균물질에 의한 유해 미생물 생육억제를 통한 식품안전성 확보 등에도 활용할 수 있다.

다. 산초와 초피의 경우 특히 과피를 이용하고 종자는 버리는데, 본 연구결과에서 확인된 초피종자 정유성분의 항균활성으로 초피종자로부터 항균관련 물질을 확보하여 산업적으로 응용한다면 자원 활용의 효율을 높이게 될 것이다.

라. 치아 우식균 *S. mutans*에 대한 항균 활성을 이용하여 대중시판을 위한 신기능성 치약 제조, 판매에도 활용할 수 있지만 최근 들어 급격히 증가하는 면역관련 질환을 앓고 있는 많은 환자 즉 장기이식 등으로 면역억제제 투여 환자나 화학요법 등으로 면역능이 약화된 암 환자의 경우, 구강 위생과 관련한 각종 2차 감염이 심각한 후유증으로 남는데 이들 환자들의 구강위생을 돕는 신기능성의 치약제조에도 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

마. 항균력이 가장 강하게 확인되는 초피 과피의 정유 성분을 기능성 치약과 항균 크림 및 화장품 보존제로의 활용방안을 제품 생산 관련 업체와 연계하여 조사 중에 있으며 이의 제품화를 위한 독성 검사 및 안전성 검사가 FDA 수준까지 검정만 된다면 그 활용 가능성은 실로 매우 광범위할 것이다.

바. 산초잎 유래의 암세포 독성 물질은 유방암 세포 중 estrogen negative 세포에 세포독성을 발휘함으로써 유방암 치료에 있어서 선택적 치료제 개발이 가능하며 추출물 로써의 작용과 단일 성분으로서의 작용범위에 대한 연구결과에 따라 유방암 뿐만 아니라 각종 암세포의 생육억제 및 독성 물질로 새로운 주목을 받을 것이다.

SUMMARY

(영문 요약문)

I. TITLE

Development of new functional substances from *Zanthoxylum schinifolium* and *Zanthoxylum piperitum* and their applications

II. OBJECTIVE AND NECESSITY

As rapid industrialization progress and increased western-style foods consumption of our country have recently realized, several degenerative diseases such as cancer, diabetes atherosclerosis and cardiovascular diseases, and aging have significantly been increased. Additionally, since synthetic food additives and chemical drugs are currently suspected to be toxic, needs of consumer on more safe and effective natural food additives and medicinal plants have been increased.

Z. schinifolium is a prickly shrub, distributed in China, Korea, Japan and Taiwan. Its ripe pericarp is one of the sources of Pericarpium Zanthoxyli in China. *Z. piperitum* D.C. has been used as a natural spice traditionally in the Far East countries including Korea.

This research was performed with the object of providing basic data, firstly for the preparation of biologically active fractions and subsequent activity-guided isolation of new functional compounds from leaves, roots, stems, seeds and pericarp of *Z. schinifolium* and *Z. piperitum*, secondly for the identification of

biological activity of fractions and compounds including their mechanism study in the molecular biology level. Bioactivity was focused on DPPH radical scavenging effect, lipid peroxidation inhibition, APTT activity, preservative, antimicrobial action, and MTT cytotoxicity etc. Our research results could be used as a natural preservative for improving quality of fish and meat products, a new functional toothpaste, a plastic wrap possessing antimicrobial activity or functional soap with antimicrobial activity etc.

III. CONTENTS AND SCOPE OF THE STUDY

This project consists of three subjects to prepare and/or isolate bio-active fractions and/or new functional components, to evaluate the physiological functions of active components, and to find the bioactive substances possessing antimicrobial activity or antitumor activity from *Z. schinifolium* and *Z. piperitum*.

The first one is to prepare the bio-active fractions and to find components possessing new functional activity by activity-guided isolation from various parts of *Z. schinifolium* and *Z. piperitum*. Structures of isolated compounds were identified by physical and spectroscopic data of UV, IR, Mass, and 1D- and 2D-NMR etc.

The second one is to evaluate the physiological functions of active components from *Z. schinifolium* and *Z. piperitum* in order to utilize them for the production of functional foods for prevention of aging and chronic diseases such as arteriosclerosis, diabetes and cancer.

In the third subject, we have tried to find the bioactive substances possessing antimicrobial activity or antitumor activity to enhance the practical uses of *Z. schinifolium* and *Z. piperitum* DC. We have evaluated the stability of the bioactive

substances and underlying mechanisms, which are important factors in estimating their industrial applications. In addition, to estimate the possibility of industrial applications, we have made the prototypes for toothpaste, pro-environmental pesticide, and skin cream possessing antimicrobial activity, in collaboration with the companies.

Major contents and scopes of this projects are summarized as follows.

1. Functionality and safety of the extracts and isolated compounds from various parts of *Z. schinifolium* and *Z. piperitum*
 - a. *In vitro* and *in vivo* antioxidative activity
 - b. *In vitro* and *in vivo* anti-thrombotic activity
 - c. *In vitro* and *in vivo* anti-inflammatory activity
 - d. *In vitro* anti-diabetic acitivity
 - e. *In vivo* effect on reduction of oxidative stress
 - f. *In vivo* effect on body lipid status
 - g. *In vivo* effect on liver toxicity and detoxification pathway
 - h. Quality improvement of Kwamaegi treated with components obtained from *Z. schinifolium* and *Z. schinifolium*
2. Preparation of bio-active fractions and subsequent isolation of compounds possessing a new functional activity, and identification of compounds by physical and spectral data
 - a. Process of extraction and fractionation from various parts of *Z. schinifolium*
 - b. Process of extraction and fractionation from various parts of *Z. piperitum*
 - c. Fractionations of leaves of *Z. schinifolium* and *Z. piperitum*
 - d. Extractions of pericarp and seeds of *Z. piperitum* using different solvents

- e. Sample preparation of *Z. schinifolium* and *Z. piperitum* for the measurement of anti-microbial activity about food poisoning and *Aeromonas hydrophila*, *Chryseobacterium joostei*, and *Bacillus pumilus*
 - f. Sample preparation to apply as preservatives in Kwamaegi products from *Z. schinifolium* leaves and *Z. piperitum* pericarp
 - g. Sample preparation for animal tests and separation of new functional components
 - h. Separation, purification and structure identification of new functional components from significant bio-active fractions
3. Anti-microbial activity and antitumor activity of the bio-active substances isolated from various parts of *Z. schinifolium* and *Z. piperitum* DC.
- a. Anti-microbial effect on the fermentation of Kimchi
 - b. Effect of *Z. schinifolium* and *Z. piperitum* DC on the growth of Lactic acid bacteria
 - c. Screening of the anti-microbial substances
 - d. Characterization of antibiotic-spectrums
 - e. Analysis of the anti-microbial components by GC-MS
 - f. Determination of the MIC
 - g. Application of the anti-microbial substances to production of the prototypes for toothpaste, pro-environmental pesticide, and skin cream possessing antimicrobial activity, in collaboration with the companies.
 - h. Screening of antitumor substances
 - i. Purification and characterization of antitumor substances
 - j. Analysis of the antitumor substances
 - k. Identification of auraptene as an apoptogenic antitumor substance
 - l. Molecular mechanism underlying antitumor activity of auraptene
 - m. Effect of auraptene on normal T cells

IV. RESULTS AND APPLICATIONS

Results

1st Sub-project: Functionality and safety of the extracts and isolated compounds from various parts of *Z. schinifolium* and *Z. piperitum*

1. Physiological activities of the extracts from *Z. schinifolium* and *Z. piperitum*

a. Antioxidant activities measured by microsome lipid oxidation and DPPH radical scavenging activity were high in the order of leaf > stem > root of the two plants extracted with methanol, methylene chloride and ethyl acetate and the activities were dose dependent at the concentrations from 0.125 to 5 mg/mL. When the initial ethanol extract of *Z. schinifolium* leaves and the methylene chloride and *n*-butanol fractions by second extraction were fed rats on high fat diets at the levels of 0.25 to 2 %. Hepatic levels of lipid peroxide, lipofuscin and carbonyl values were decreased while activities of glutathione peroxidase (GSH-Px) and paraxoanase activities were increased. Activities of the GSH-Px and superoxide dismutase were also increased in red blood cells.

b. Anti-thrombotic activity measured *in vitro* by activated partial thromboplastin times were highest in *n*-butanol fractions obtained from leaves of the two plants. This was confirmed *in vivo* with *n*-butanol fraction of *Z. schinifolium* leaves at the level of 0.5 % in diet.

c. Anti-inflammatory activities measured *in vitro* by measuring soybean lipoxygenase activity were high in ethyl acetate and *n*-butanol fractions of the two plants. This was confirmed *in vivo* by 5'-lipoxygenase activities and

leukotriene B4 contents of polynuclear white blood cells of rats fed methylene chloride and *n*-butanol fractions of *Z. schinifolium* leaves.

d. Anti-diabetic activities measured *in vitro* by inhibition of α -glucosidase were shown in 22 subfractions of *n*-butanol extracts of *Z. schinifolium* leaves which had no antioxidant activities.

e. Improvement of body lipid status were shown in rats fed the ethanol extract of *Z. schinifolium* leaves at the level of 0.5~1.0 % via reducing serum total cholesterol and triglyceride and increasing HDL-cholesterol, resulting in lowering atherogenic indice.

f. Serum GOT and GPT levels were not increased in rats fed the ethanol extract of *Z. schinifolium* leaves up to 2.0 % in diet, while glutathione S-transferase activity and GSH/GSSG ratio, the detoxification indice were normalized in the extract fed rats, suggesting that the extract was safe at the level used in the present feeding study.

2. Quality improvement of *Coloabis saira kwamaegi* by adding the components obtained from *Z. schinifolium* and *Z. piperitum*

a. Peroxide, TBA and acid values were decreased as well as diemethyamine and trimethylamine contents of kwamaegi prepared with the ethanol extract of *Z. schinifolium* leaves or the essential oil obtained from pericarp of *Z. piperitum* at the level of 0.125~2 ppm during storage up to 7 days at 4 °C

b. Sensory evaluation of the kwamaegi exhibited a slightly higher preference with 0.25~0.5 ppm treated with the two types of test materials.

2nd Sub-project: Separation and structure identification of bio-active substances from *Z. schinifolium* and *Z. piperitum*

1. We used cut and dried roots and stems of *Z. schinifolium* and *Z. piperitum* collected at Palgong Mt. in Gyeongsang-bukdo in 2003. We used freeze-dried leaves and dried fruits of *Z. schinifolium* and *Z. piperitum* bought at Dong-A Plant in Gyeongsang-bukdo.

The roots, stems, leaves, pericarp and seeds of *Z. schinifolium* and *Z. piperitum* were each extracted with methanol, methanol, 80 % methanol, methanol and methanol, and subsequently fractionated into four parts respectively; methylene chloride, ethyl acetate, *n*-butyl alcohol and water fractions. These extracts were examined to determine diverse activity.

2. For anti-microbial experiment, we refluxed leaves of *Z. schinifolium* and *Z. piperitum* with 100 % and 95 % methanol at room temperature and 60 °C, respectively. And the pericarp of *Z. piperitum* and powdered seeds of *Z. piperitum* were extracted with hexane, methylene chloride, ethyl acetate and methanol at 25 °C and 30 °C respectively.

3. For comparative study of pericarp of Chinese and Korean *Z. piperitum*, we bought Chinese and Korean *Z. piperitum* at Herb market (Yang-nyung-si) in Daegu. The powdered pericarp of *Z. piperitum* were extracted with methanol, and subsequently fractionated into four parts; methylene chloride, ethyl acetate, *n*-butyl alcohol and water fractions. These extracts were used to determine diverse activity. The *Z. schinifolium* was not studied comparatively because of its unavailability.

4. Freeze-dried and powdered leaves of *Z. schinifolium* collected in June 2004,

were extracted with 80 % methanol, and subsequently fractionated into four parts; methylene chloride, ethyl acetate, *n*-butyl alcohol and water fractions. The methylene chloride and *n*-butyl alcohol fractions were offered to 1st and 3rd sub-projects to do animal and cytotoxicity tests etc.

5. For anti-microbial test, we extracted pericarp and seeds of *Z. piperitum* with hexane, methylene chloride, ethyl acetate and methanol at 25 °C (pericarp) and 30 °C (seeds) and concentrated. The pericarp of *Z. schinifolium* and pericarp and seeds of *Z. piperitum* were also steam-distilled.

6. From the flash column chromatography of *n*-butanol fraction of *Z. schinifolium* leaves, 23 fractions (SL-MC-A to SL-MC-W) were obtained. SL-Bu-O, -U and -C having strong DPPH radical scavenging activity were subjected to SiO₂, RP C-18 and Sephadex LH-20 column chromatographies to give compounds 1~5. From the flash column chromatography of methylene chloride fraction with cytotoxicity, 23 fractions, from SL-MC-A to SL-MC-W, were given.

By the activity-guided isolation of SL-MC-O, -R and -S, we isolated compounds 6~15. Their structures were identified by physical and spectroscopic data such as UV, IR, ¹H-NMR and ¹³C-NMR (1D and 2D) and mass spectrum.

7. Compounds 1~14 were identified as 4-[(1*E*)-3-hydroxy-1-propenyl]-2,6-dimethoxyphenol 1-*O*-β-D-glucopyranoside (syringin, 1), 2-propyl alcohol β-D-glucopyranoside (2), (6*S*,7*E*,9*S*)-6,9-dihydroxy-4,7-megastigmadien-3-one-9-*O*-β-D-glucopyranoside (vomifoliol 9-*O*-β-D-glucopyranoside, 3), (3*R*,6*E*)-3,7-dimethyl-3,8-dihydroxy-oct-1,6-dien-8-*O*-β-D-glucopyranoside (4), (3*R*,6*E*)-3,7-dimethyl-3,8-dihydroxyoct-1,6-dien-3-*O*-β-D-glucopyranoside (cnidioside C, 5), 20(29)-lupen-3-ol (lupeol, 6), 20(29)-lupen-3-one (lupeone, 7), bergapten (8), β-sitosterol (9), 7-[(3,7-Dimethyl-2,6-octadienyl)oxy]-coumarin (Auraptene, 10), 6,7-

Dimethoxy-2H-naphthalen-1-one (11), 4-[4-(3-Hydroxy-propenyl)-phenoxy]-2-methyl-but-2-en-1-ol (12), 4-[4-(3-Hydroxy-propyl)-phenoxy]-2-methyl-but-2-en-1-ol(13), 2-(2-Methoxy-non-1-enyl)-benzoic acid (14), respectively.

3rd Sub-project: Screening of novel bioactive substances from the *Z. schinifolium* and *Z. piperitum* DC, determination of the stability of the bio-active substances, and industrial applications

1. Effect of *Z. schinifolium* and *Z. piperitum* DC on the fermentation of Kimchi

a. We intended to find the advantages of adding the bioactive compounds from *Z. schinifolium* and *Z. piperitum* DC for the fermentation of Kimchi that holds an important position in Korean diet. The growth of most bacteria as well as *E. coli* was inhibited by adding the leaves of *Z. schinifolium*. The leaves of *Z. piperitum* DC enhanced the growth of lactic acid bacteria, and this result was consistent with the sensory test, in that the Kimchi containing the leaves of *Z. piperitum* was more sour than the control. The leaves of *Z. schinifolium*, however, possessed no effect on the growth of most bacteria, but they enhanced the growth of lactic acid bacteria.

b. Effect of the methanol or ethanol extracts from leaves of *Z. schinifolium* and *Z. piperitum* DC on the growth of *Leuconostoc mesenteriodes* and *Lactobacillus plantarum* was investigated. In the presence of the methanol or ethanol extracts from leaves of *Z. piperitum* DC, the growth of *L. mesenteriodes* and *L. plantarum* were enhanced than the control. Although the addition of the methanol or ethanol extracts from leaves of *Z. schinifolium* also enhanced the growth of the lactic acid bacteria, the addition of leaves powder (0.2 %) reduced the growth of *Lactobacillus plantarum*.

2. Characterization of antibiotic substances as chemical ingredients of *Z. schinifolium* and *Z. piperitum*

a. To isolate anti-microbial ingredients in *Z. schinifolium* and *Z. piperitum* DC, the leaves, stems, roots, seeds, or pericarp were extracted with methanol, methylene chloride, ethyl acetate and *n*-butanol. The anti-microbial activity of individual extracts were tested against several pathogenic microorganisms, including *A. hydrophila*, *B. pumilus*, *P. vulgaris*, *S. aureus*, *S. epidermis*, and *E. coli* O-157. All the extracts from *Z. schinifolium* did not show antimicrobial activity, whereas the solvent extracts of the pericarps of *Z. piperitum* DC showed anti-microbial activities. In particular, the methylene chloride extract of the pericarps of *Z. piperitum* DC exhibited an inhibitory activity against *E. coli* O-157.

b. Anti-microbial activities of the essential oil of *Z. schinifolium* and *Z. piperitum* DC were investigated against human pathogenic bacteria-*Proteus vulgaris*, *S. aureus*, *S. epidermis*, *E. coli* O-157 and *H. pylori*. The essential oil from the pericarps of *Z. piperitum* DC were more bacteriocidal than those of the seeds, and the minimum inhibitory concentrations (MIC) appeared to be from 125 µg/ml to 3 mg/ml. The anti-microbial activities of seeds and pericarp of *Z. schinifolium* were weaker than those of *Z. piperitum* DC. This result confirmed that the essential oils from the pericarps of *Z. piperitum* DC had the most potent antibacterial activity against human infectious disease bacteria.

c. Chemical components of the essential oil from seeds and pericarp of *Z. piperitum* DC, which appeared to possess the strong anti-bacterial activity, were analyzed by GC-MS. The compositions and quantities of main constituents in the two samples were different. The most abundant compounds in the seeds were γ -terpinene (19.1 %), citronellal (12.2 %), lavandulyl acetate (11.1 %), 1- β -pines

(7.5 %) and citronellyl acetate (5.0 %), corresponding to almost 67.3 % of all the volatile compounds. On the contrary, γ -terpine (42.2 %), geranyl acetone (14.4 %) and citronellal (10.7 %) were detected as the main constituents in the pericarp.

d. The essential oil from the pericarp, which appeared to possess more potent anti-microbial activity than those of seeds, were fractionated by Thin Layer Chromatography (TLC), and the components in the individual spots were eluted, and assessed for anti-microbial activity. Several spots on TLC exhibited anti-microbial activity, indicating that the anti-microbial activity of the essential oil was not due to a single component, but due to the combined action of several anti-microbial components.

e. The essential oil from the pericarp of *Z. piperitum* DC, which showed the strong anti-bacterial activity against *S. mutans*, have been examined whether they can be applicable to development of a functional toothpaste possessing antiplaque activity. We have had a toothpaste company make the prototypes of the toothpaste containing the essential oil, and have compared the antibacterial effect of the prototypes with those of three different toothpaste on the market. The anti-microbial activity of the prototype appeared to be stronger than any other toothpaste tested.

f. The essential oil from the pericarp of *Z. piperitum* DC also showed a potent suppressive effect on the growth of *Candida albicans*.

g. The mutagenic activity from *Z. piperitum* DC was investigated. The essential oil from the seeds and the pericarp of *Z. piperitum* DC suppressed the mutagenic activity against *S. typhimurium* mutant strains, *S. typhimurium* TA 100 and *S. typhimurium* TA 1538, at the levels of 88 % to 99 %.

3. Screening of biological active components from *Z. schinifolium* and *Z. piperitum* DC and test for their physiological activity

a. To examine antitumor activity of *Z. schinifolium* or *Z. piperitum* DC, the leaves, stems, roots, seeds, or pericarp of individual plants were extracted with methanol, methylene chloride, ethyl acetate, and *n*-butanol. The individual extracts were tested against human acute leukemia Jurkat T cells in order to investigate the antitumor activity. Among these solvent extracts, the methylene chloride extract from the leaves of *Z. schinifolium* possessed the strongest cytotoxicity toward Jurkat T cells, and the methylene chloride extracts from the stems and seeds of *Z. schinifolium* appeared to be the next leading samples and showed similar cytotoxicity. The methylene chloride extracts from the roots and pericarps exhibited barely detectable levels of cytotoxicity toward Jurkat T cells.

b. The antitumor activity of the methylene chloride extract of the leaves of *Z. schinifolium* was also tested against human breast cancer cell line MDA361 (estrogen receptor positive) and MDA438 (estrogen receptor negative). The methylene chloride extract showed more potent cytotoxicity in MDA438 than in MDA361.

c. Antitumor activity of the methylene chloride extract from the leaves of *Z. schinifolium* appeared to be associated with the apoptogenic activity mediated by mitochondrial cytochrome c release and subsequent activation of caspase cascade including caspase-9 and caspase-3, leading to PARP degradation. The induced apoptosis was negatively regulated by anti-apoptotic protein Bcl-xL.

d. The major components of the methylene chloride extract from the leaves of *Z. schinifolium* were 9,19-cyclolanost-24-en-3-ol (17.8 %), 2- α -methyl-17, β -hop-21-ene (17.8 %), 15-methyl-2,3-dihydro-1H benzazepin (14.0 %), phytol (12.2 %), lupeol

(11.7 %), 12-methyl-benzofuran (10.0 %), 9,12-octadecadienoic acid (6.7 %), 9,12,15-octadeca-trienoic acid-methylester (4.2 %), 15-methyl-4-(1-methylethylidene)-2-(4-nitrophenyl) (4.0 %), hexadecanoic acid (2.3 %), vitamine E (2.2 %), β -amyrin (1.1 %), auraptene (1.0 %).

e. To purify apoptogenic ingredient of the methylene chloride extract from the leaves of *Z. schinifolium*, the methylene chloride extract was further fractionated by silica gel column chromatography. An apoptogenic component isolated from the methylene chloride extract turned out to be auraptene, and its IC₅₀ value against Jurkat T cells was 16.5 μ g/mL.

f. Apoptosis induced by auraptene (10~20 μ g/mL) appeared to be provoked by ER-stress-mediated activation of caspase-12 and caspase-8, Bid cleavage, and then excuted by mitochondria cytochrome c-dependent or mitochondria-independent caspase cascade, and PARP degradation, which led to apoptotic DNA fragmentation in a dose-dependent fashion.

g. Auraptene-mediated apoptosis was completely inhibited by overexpression of anti-apoptotic protein Bcl-xL, pan-caspase inhibitor z-VAD-fmk, or caspase-8 inhibitor z-IETD-fmk. On the contrary, the apoptosis was not inhibited by concomitant treatment with the calpain inhibitor (E64d), the JNK inhibitor (SP600125), and the mitochondrial permeability transition pore inhibitor (cyclosporin A, CsA) or by alone. In the presence of caspase-8 inhibitor (z-IETC-fmk), all of the auraptene-induced apoptotic events except caspase-12 activation were abrogated suggesting that caspase-12 activation was upstream of caspase-8 activation.

h. A human peripheral T cells and activated T cells were less sensitive to the cytotoxic activity of auraptene than was human Jurkat T cells. These results

demonstrate that auraptene from the leaves of *Z. schinifolium* can be applicable as antitumor agent.

i. When the effect of the individual extracts from *Z. schinifolium* and *Z. piperitum* DC on human Jurkat T cells, the ethyl acetate extract (SL-15) from the leaves of *Z. schinifolium* and *n*-butanol extract (SL-16) from the leaves of *Z. schinifolium* promoted the cell viability measured by MTT assay. Since both SL-15 and SL-16 appeared to possess potent antioxidant activities, the stimulatory effect of SL-15 and SL-16 on the cell viability was attributable to their antioxidant activities.

Applications

1. The ethanol extract of *Z. schinifolium* leaves can be utilized as a component of multifunctional foods for preventing peroxidation, inflammation and thrombosis in the body at the level of 1~2 g per day while its secondary methylene chloride or *n*-butanol fraction for a function-specific food component at the level of 0.4~0.5 g per day.

2. The ethanol extract of *Z. schinifolium* leaves and the essential oil obtained from pericarp of *Z. piperitum* can be utilized as a natural preservative for improving quality of fish and meat products and other parts of the two plant are expected to be.

3. In collaboration with a toothpaste company, we were able to make a prototype of the functional toothpaste using the essential oil from pericarp of *Z. piperitum* DC, which appeared to have the strongest antibacterial activity against *S. mutans*. When the antibacterial activity of the prototypes was compared with those of three commercially available toothpaste, the antibacterial activity of our prototype

exhibited the strongest activity. One of the commercially available toothpaste was known to contain anti-microbial extracts of green tea. These results indicate that the essential oils from seeds of *Z. piperitum* DC can be utilized for manufacturing a new functional toothpaste, which is adequate for oral hygiene of immunocompromized patients such as transplant patients or cancer patients.

4. Antibacterial substances of the essential oil from *Z. piperitum* DC appeared to possess wide-range antibiotic activities from gram-negative bacteria to gram-positive bacteria. These antibacterial substances can be used as pro-environmental biological pesticides which can prevent the growth of phytopathogenic bacteria in the growing fruits and vegetables.

5. The essential oil from seeds and pericarp of *Z. piperitum* DC can also be utilized in the field of bio-industry to manufacture a plastic wrap possessing anti-microbial activity, or functional soap with anti-microbial activity.

6. The methylene chloride extract of the leaves of *Z. schinifolium* DC, and the auraptene appeared to have a strong potential to be applicable as antitumor agent.

CONTENTS

(영 문 목 차)

Chapter 1: Project overview: Purpose, Introduction, and Contents	54
Chapter 2: Technical problems and status in Domestic and Overseas	61
Chapter 3: Contents and results of research	63
Section 1 : 1st sub-project	63
Title: Evaluation of physiologically active substances from <i>Z. schinifolium</i> and <i>Z. piperitum</i> via animal experiment	
1. Chronic disease preventive functions of substances from <i>Z. schinifolium</i> and <i>Z. piperitum</i> and their safety	63
a. Background	63
b. Materials and methods	63
1) <i>In vitro</i> and <i>in vivo</i> measurements of antioxidative activities of extracts from <i>Z. schinifolium</i> and <i>Z. piperitum</i>	63
2) <i>In vitro</i> and <i>in vivo</i> measurements of anti-thrombosis, anti-inflammatory and antidiabetic activities	64
3) Animal feeding experiments (<i>in vivo</i>)	64
a) Animal and diets	64
(1) First animal feeding study	64
(2) Second animal feeding study	65
b) Preparation of samples	66
c) Assay of antioxidative enzymes activities	66

d) Oxidative stress relaxation and free radical scavenging activities	---	67
e) Body lipid status	-----	67
f) Measurements of detoxification and safety indices	-----	67
4) Statistics analysis	-----	67
c. Results	-----	67
1) Effect of physiology activity of extract from <i>Z. schinifolium</i> and <i>Z. piperitum</i> (<i>in vitro</i>)	-----	67
a) Antioxidative activity	-----	67
b) Activated partial thromboplastin times (APTT)	-----	71
c) Anti-inflammatory activity	-----	74
d) Antidiabetic activities	-----	75
2) Physiologically activities of extracts from <i>Z. schinifolium</i> and <i>Z. piperitum</i> via animal experiment	-----	78
a) Antioxidative activity	-----	78
(1) Hepatic and red blood cell superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities	-----	78
(2) Hepatic catalase activities	-----	80
(3) Hepatic microsomal paraoxonase and arylesterase activities	-----	81
(4) Hepatic and red blood cell TBARS values	-----	82
(5) Hepatic lipofuscin fluorescence	-----	83
(6) Hepatic mitochondria and microsomal carbonyl values	-----	84
b) Activated partial thromboplastin times	-----	85
c) Anti-inflammatory activity	-----	86
d) Oxidative stress relaxation and free radical scavenging activities	---	88
(1) Hepatic cytochrome P ₄₅₀ activities	-----	88
(2) Hepatic superoxide radical contents	-----	88
(3) Hepatic hydrogen peroxide contents	-----	89
(4) Plasma paraoxonase and arylesterase activities	-----	90
e) Improvement of lipid status in the second animal feeding study	---	91

(1) Serum lipid concentrations	-----	91
(2) Serum and liver lipid peroxide concentrations measured as TBARS	-----	92
f) Effects of various levels of <i>Z. schinifolium</i> leaf ethanol extract	----	93
(1) Serum GOT and GPT levels	-----	93
(2) Hepatic glutathione S-transferase activities	-----	94
2. Utilization of <i>Z. schinifolium</i> and <i>Z. piperitum</i> as preservatives for Kwamaegi preparation	-----	96
a. Background	-----	96
b. Materials and methods	-----	96
1) Treatment of <i>Z. schinifolium</i> extracts and <i>Z. piperitum</i> essential oil in Kwamaegi preparation	-----	96
2) Determination of POV and TBA (thio-barbituric acid) value	-----	97
3) Determination of amines and sensory evaluation	-----	97
4) Statistics analysis	-----	97
c. Results	-----	97
1) Appearance of Kwamaegi treated with ethanol extract of <i>Z. schinifolium</i> and <i>Z. piperitum</i> essential oil	-----	97
2) Changes in acid values, POV, TBA values	-----	101
3) Amines and sensory evaluations	-----	101
3. Estimation of functional safety level of extract of <i>Z. schinifolium</i>	-----	104
1) Estimation from animal experiment	-----	104
2) Safety of active substances in Kwamaegi preparation	-----	106
Section 2 : 2nd sub-project	-----	106

Title: Separation and structure identification of bio-active components from *Z.*

schinifolium and *Z. piperitum*

1. Background	106
2. Materials and methods	108
a. Materials	108
b. Instruments	108
c. Reagents	109
3. Results	109
a. Process of extraction and fractionation from various parts of <i>Z. schinifolium</i>	109
1) Roots of <i>Z. schinifolium</i>	109
2) Stems of <i>Z. schinifolium</i>	109
3) Leaves of <i>Z. schinifolium</i>	110
4) Seeds of <i>Z. schinifolium</i>	110
5) Pericarp of <i>Z. schinifolium</i>	111
b. Process of extraction and fractionation from various parts of <i>Z. piperitum</i>	114
1) Roots of <i>Z. piperitum</i>	114
2) Stems of <i>Z. piperitum</i>	115
3) Leaves of <i>Z. piperitum</i>	115
4) Seeds of <i>Z. piperitum</i>	116
5) Perocarp of <i>Z. piperitum</i>	116
c. Comparitive study of Korean and Chinese <i>Z. piperitum</i> pericarp	119
1) Process of extraction and fractionation of Chinese <i>Z. piperitum</i> pericarp	119
2) Process of extraction and fractionation of Korean <i>Z. piperitum</i> pericarp	120
d. Fractionations of leaves of <i>Z. schinifolium</i> and <i>Z. piperitum</i> using different solvents	122

e. Extractions of pericarp and seeds of <i>Z. piperitum</i> using different solvents	-----	123
f. Sample preparation of <i>Z. schinifolium</i> and <i>Z. piperitum</i> for measurement of anti-microbial activity about <i>Streptococcus mutans</i> , food poisoning, <i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Chryseobacterium joostei</i> and <i>Bacillus pumilus</i>	-----	125
1) Preparative TLC fractionation of methylene chloride fraction of <i>Z. schinifolium</i> and <i>Z. piperitum</i> pericarp	-----	125
a) Methylene chloride fraction of <i>Z. schinifolium</i> pericarp	-----	125
b) Methylene chloride fraction of <i>Z. piperitum</i> pericarp	-----	125
2) Extraction and vapor distillation of pericarp and seeds of <i>Z. schinifolium</i> and <i>Z. piperitum</i>	-----	126
a) Vapor distillation of <i>Z. schinifolium</i> pericarp	-----	126
b) Vapor distillation of <i>Z. piperitum</i> pericarp	-----	127
c) Vapor distillation of <i>Z. piperitum</i> seeds	-----	127
g. Sample preparation to apply as preservatives in Kwamaegi products from <i>Z. schinifolium</i> leaves and <i>Z. piperitum</i> pericarp	-----	129
1) Manufacture of 80 % ethanol extract of <i>Z. schinifolium</i> leaves	-----	129
2) Manufacture of essential oil of <i>Z. piperitum</i> pericarp	-----	129
h. Sample preparation for animal tests and separation of new functional components	-----	130
1) Extraction and fractionation of <i>Z. schinifolium</i> leaves	-----	130
2) Flash column chromatography	-----	130
a) Flash column chromatography of <i>n</i> -buOH fraction	-----	130
b) Flash column chromatography of methylene chloride fraction	-----	132
i. Separation, purification and structure identification of new functional components from significant bio-active fractions	-----	133
1) Background	-----	133
2) Separation of bio-active compounds from <i>n</i> -buOH fraction	-----	133
3) Separation of bio-active compounds from methylene chloride fraction	-----	135

4) Structures of isolated compounds	-----	138
5) Physical and spectroscopic data of compounds	-----	143
6) Structure identification of compounds	-----	150
Section 3 : 3rd sub-project	-----	163
Title: Screening of novel bioactive substances from <i>Z. schinifolium</i> and <i>Z. piperitum</i> DC, determination of the stability of the bioactive substances, and industrial applications		
1. Effect of <i>Z. schinifolium</i> and <i>Z. piperitum</i> DC on the fermentation of Kimchi	-----	163
a. Background	-----	163
b. Materials and methods	-----	164
c. Results	-----	166
1) Effect of <i>Z. schinifolium</i> and <i>Z. piperitum</i> DC on the microflora during the Kimchi fermentation	-----	166
2) Effect of <i>Z. schinifolium</i> and <i>Z. piperitum</i> DC on Lactic acid bacteria	-----	168
2. Characterization and application of the antibiotic substances of <i>Z. schinifolium</i> and <i>Z. piperitum</i> DC	-----	171
a. Background	-----	171
b. Materials and methods	-----	174
c. Results	-----	177
1) Screening and characterization of the antibiotic substances from <i>Z. schinifolium</i> and <i>Z. piperitum</i> DC	-----	178
2) Application of the antibiotic substances of <i>Z. piperitum</i> DC to development of toothpaste against <i>Streptococcus mutans</i>	-----	196

3) Application of antibiotic substances of <i>Z. piperitum</i> DC to production of cosmetics preservatives -----	199
4) Characterization of the mutagenic activity from <i>Z. piperitum</i> DC ---	201
3. Screening of apoptogenic anti-tumor substnaces and underlying mechanisms -----	202
a. Background -----	202
b. Materials and methods -----	203
c. Results -----	206
1) Fractionation of antitumor components in the leaves of <i>Z. schinifolium</i> -----	207
2) Screening of cytotoxic active substances -----	207
3) Apoptogenic activity of the methylene chloride extract (SL-14) of <i>Z. schinifolium</i> -----	208
4) Chemical compositions of the methylene chloride extract (SL-14) of <i>Z. schinifolium</i> -----	211
5) Purification and identification of the methylene chloride extract (SL-14) of <i>Z. schinifolium</i> -----	211
4. Functional studies of the apoptogenic activity of auraptene, a cytotoxic component of <i>Z. schinifolium</i> -----	215
a. Background -----	215
b. Materials and methods -----	218
c. Results -----	221
1) Identification of the auraptene isolated from the <i>Z. schinifolium</i> as apoptogenic component -----	221
2) Involvement of mitochondrial cytochrome c-mediated activation of caspase cascade in the auraptene-induced apoptosis -----	225
3) Effect of the antagonistic anti-Fas antibody on the auraptene-induced apoptosis	

-----	229
4) Effect of the pan-caspase inhibitor or caspase-8 inhibitor on the auraptene- induced apoptosis -----	230
5) Cytotoxic effect of the auraptene on human peripheral T cells -----	234
 Chapter 4: Achievements to the project targets and contributions to the related fields -----	236
Chapter 5: Applications and utilizations of researched results -----	238
Chapter 6: Scientific and technological information from abroad -----	245
Chapter 7: References -----	248

목 차

제 출 문	-----	1
요 약 문	-----	2
SUMMARY	-----	22
CONTENTS	-----	37
목 차	-----	45
제 1 장 연구개발과제의 개요	-----	54
제 2 장 국내외 기술개발 현황	-----	61
제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과	-----	63
1절. 동물실험을 통한 생리활성물질의 효능 및 작용기작 규명 (제 1 세부과제)	-----	63
1. 산초 및 초피나무 추출물의 만성질환 예방 생리활성 및 안전성 조사	-----	63
가. 연구배경	-----	63
나. 연구방법	-----	63
1) 산초 및 초피나무 추출물의 <i>in vitro</i> 및 <i>in vivo</i> 항산화작용 측정	-----	63

2) <i>In vitro</i> 및 <i>in vivo</i> 항혈전, 항염증 및 항당뇨 활성 측정	64
3) 동물실험 사육 및 식이 실험 (<i>in vivo</i>)	64
가) 동물 사육 및 식이	64
(1) 1차 동물실험	64
(2) 2차 동물실험	65
나) 분석시료의 준비	66
다) 항산화 효소 활성 측정	66
라) Oxidative stress 완화 및 free radical scavenging 작용	67
마) 지질대사 개선 효과 측정	67
바) 해독 및 안전성 지표측정	67
4) 통계처리	67
다. 연구결과	67
1) 산초나무와 초피나무 추출물의 <i>in vitro</i> 생리활성 검색	67
가) 항산화 활성	67
나) 항혈전 활성 : Activated partial thromboplastin times (APTT)	71
다) 항염증 활성	74
라) 항당뇨 활성	75
2) 동물실험에서의 산초 잎 추출물의 효능 및 안전성 규명 (<i>in vivo</i>)	78
가) 항산화 활성	78
(1) 간조직과 적혈구의 SOD 및 GSH-px 활성	78
(2) 간조직의 Catalase 활성	80
(3) 간조직의 PON 활성 및 arylesterase 활성	81
(4) 간조직과 적혈구 과산화지질 함량	82
(5) 간조직의 Lipofuscin	83
(6) 간조직의 카보닐가	84
나) 항혈전 효능 : 혈장 APTT 및 Thrombin times (TT)	85
다) 항염증 효능 : 다형핵성 백혈구 5'-lipoxygenase 활성 및 leukotriene B4	86
라) Oxidative stress 완화 및 free radical scavenging 작용	88

(1) 간조직 Cytochrome P ₄₅₀ 함량 측정	88
(2) 간조직 Superoxide radical 함량 측정	88
(3) 간조직 Hydrogen peroxide (H ₂ O ₂) 함량 측정	89
(4) 혈장 Paraoxonase 및 arylesterase 활성 측정	90
마) 지질대사 개선 효과 측정 : 2차 동물실험	91
(1) 혈청 지질 수준	91
(2) 혈청과 간조직의 과산화지질 수준	92
바) 산초 잎 추출물의 해독 및 안전성 지표측정	93
(1) 혈청 GOT와 GPT 활성	93
(2) 간조직 glutathione S-transferase 활성 및 글루타치온 함량	94
2. 산초 및 초피 성분의 어류가공품 보존제로서의 활용	96
가. 연구배경	96
나. 연구방법	96
1) 산초 추출물 및 초피정유 처리 과메기 제조	96
2) 산화 억제 효과 측정	97
3) 아민류 생성 및 관능검사	97
4) 통계처리	97
다. 연구결과	97
1) 과메기 제조 후 외관 보존	97
2) 과메기의 산화억제 효과	101
3) 과메기의 아민 생성 및 관능검사	101
3. 산초추출물의 안전 유효 허용양 산정	104
가. 동물실험결과에서 산정	104
나. 과메기제품에 함유된 유효물질의 안전도	106
제 2절. 산초나무와 초피나무로부터 생리활성 물질의 분리 및 구조 결정 (제 2 세부과제)	106

1. 연구배경	106
2. 재료 및 방법	108
가. 재료	108
나. 기기	108
다. 시약	109
3. 결과 및 고찰	109
가. 산초시료의 부위별 추출 및 분획과정	109
1) 산초 뿌리	109
2) 산초 줄기	109
3) 산초 잎	110
4) 산초 종자	110
5) 산초 과피	111
나. 초피시료의 부위별 추출 및 분획과정	114
1) 초피 뿌리	114
2) 초피 줄기	115
3) 초피 잎	115
4) 초피 종자	116
5) 초피 과피	116
다. 중국산 초피 과피와 한국산 초피 과피의 비교실험	119
1) 중국산 초피 과피의 추출 및 분획과정	119
2) 한국산 초피 과피의 추출 및 분획과정	120
라. 산초 잎과 초피 잎의 용매별 추출실험	122
마. 초피 과피와 초피 종자의 용매별 추출실험	123
바. 산초, 초피 유래의 치아우식균 (<i>S. mutans</i>), 식중독 및 장내 병원성 미생물 (<i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Chryseobacterium joostei</i> , <i>Bacillus pumilus</i>)에 대한 항균 활성 측정을 위한 시료 조제	125
1) 산초 과피 및 초피 과피 methylene chloride 층의 preparative TLC 분획실험	

-----	125
가) 산초 과피 methylene chloride 층 -----	125
나) 초피 과피 methylene chloride 층 -----	125
2) 산초 과피와 초피 과피 및 종자의 용매별 추출실험과 수증기증류실험 -	126
가) 산초 과피 수증기증류 -----	126
나) 초피 과피 수증기증류 -----	127
다) 초피 종자 수증기증류 -----	127
사. 과메기 가공 시 보존제로의 활용을 위한 산초 잎과 초피 과피의 시료조제	129
1) 산초 잎 80 % ethanol extract 조제 -----	129
2) 초피 과피 정유 성분 조제 -----	129
아. 동물실험 및 활성물질 분리를 위한 시료 조제 -----	130
1) 산초 잎의 추출 및 분획 활성 실험 -----	130
2) Flash column chromatography 분획실험 -----	130
가) <i>n</i> -BuOH 분획의 flash column chromatography 실험 -----	130
나) Methylene chloride 분획의 flash column chromatography 실험 ---	132
자. 우수 생리활성 분획으로부터 활성 물질의 분리·정제 및 구조결정 -----	133
1) 실험 배경 -----	133
2) <i>n</i> -butanol 분획으로부터 활성물질 분리 -----	133
3) Methylene chloride 분획으로부터 활성물질 분리 -----	135
4) 분리된 물질의 구조 -----	138
5) 분리한 물질의 물리화학적 및 분광학적 data -----	143
6) 분리한 물질의 구조 결정 -----	150
제 3절. 산초나무와 초피나무로부터 신 기능성 생리활성물질의 탐색과 안정성연구 및 제품 개발(제 3 세부과제) -----	163
1. 김치 숙성에 대한 산초와 초피의 영향 -----	163
가. 연구배경 -----	163
나. 연구방법 -----	164

1) 산초 잎과 초피 잎 가루 준비 -----	164
2) 산초 잎과 초피 잎 가루 첨가 김치 제조 -----	165
3) 일반세균수 측정 -----	165
4) 유산균수 측정 -----	165
5) 대장균수 측정 -----	165
6) 공시균주 -----	165
7) 관능검사 -----	165
다. 연구결과 -----	166
1) 김치발효시간에 따른 일반세균, 유산균, 대장균 수의 변화 -----	166
2) 초피 추출물과 산초추출물의 유산균(<i>L. mesenteriodes</i> , <i>L. plantarum</i>) 생육에 대한 영향 조사 결과 -----	168
2. 산초와 초피 유래 항균활성 성분에 관한 연구 -----	171
가. 연구배경 -----	171
나. 연구방법 -----	174
1) 각 부위별 추출물 준비 -----	174
2) 공시균주 및 배지 -----	175
3) 초피 추출물의 Disc 확산법에 의한 항균활성 검정 -----	175
4) 활성 성분의 분석 -----	176
5) 액체 배양법을 이용하여 <i>S. mutans</i> 의 병원성 미생물에 대한 초피 종자와 과 피 정유 성분의 최소 저해농도 (Minimum Inhibitory Concentration) 측정 -----	176
6) 열안정성 측정 -----	176
7) 시제품의 Disc 확산법에 의한 <i>S. mutans</i> 에 대한 항균활성 검정 -----	176
8) 시제품에 대한 관능검사 -----	177
9) <i>Salmonella typhimurium</i> TA 100, 1538 균주에 대한 초피 종자와 과피 정유 성분의 세포 독성 측정 -----	177
10) 돌연변이 유발성 측정 -----	177
다. 연구결과 -----	177

1) 산초와 초피로부터 항균물질의 탐색과 동정 -----	178
2) 초피의 항균력을 이용한 신기능성 항균 치약으로의 실용화 방안 -----	196
3) 항균 크림 및 화장품 보존료로의 실용화 방안 -----	199
4) 초피나무 유래의 항균활성 물질의 돌연변이 유발성 조사를 통한 안정성 측정 -----	201

3. 산초나무 유래의 Mitochondria-dependant Apoptosis 유도 물질의 탐색과 그 작용 기전 연구 -----	202
가. 연구배경 -----	202
나. 연구방법 -----	203
1) 산초의 획득 -----	203
2) 시약 및 기기 -----	204
3) 실험에 이용한 세포주 및 세포배양 -----	204
4) 유효물질 추출 및 분획 -----	204
5) MTT assay를 통한 viability 조사 -----	204
6) Apoptosis 에 의한 DNA fragmentation 추출 -----	205
7) Flow cytometry 분석 -----	205
8) Cell lysate 조제 -----	206
9) Western blot analysis -----	206
10) 활성 성분 분석 -----	206
다. 실험결과 -----	206
1) 산초나무로 부터 세포독성 분획의 탐색 -----	207
2) 산초 잎 유래의 암세포독성물질의 탐색 -----	207
3) 산초 잎 유래의 암세포독성물질의 작용 기전 -----	208
4) 산초 잎의 methylene chloride 분획 활성 성분의 분석 -----	211
5) 산초 잎의 methylene chloride 분획 중에서 암세포독성물질 탐색 -----	213
4. 산초 (<i>Z. schinifolium</i>)의 세포독성 성분인 auraptene의 인체 백혈병 세포주 Jurkat T 세포에 대한 세포자살 유도 활성 및 그 분자기전 : ER stress-매개 caspase-12	

및 caspase-8 활성화	215
가. 연구배경	215
나. 재료 및 방법	218
1) 시약, 항체 및 배지	218
2) <i>Z. schinifolium</i> 로부터 세포독성성분의 분리	218
3) Cytotoxicity assay	219
4) Apoptotic DNA fragmentation 분석	219
5) Flow cytometry 분석	220
6) DAPI 염색 방법	220
7) Cell lysate 조제	220
8) Western blot analysis	220
9) 미토콘드리아 cytochrome c의 세포질로의 방출 조사	221
다. 실험결과	221
1) 산초 (<i>Z. schinifolium</i>) 잎에 함유된 세포자살 유도물질로서의 auraptene의 확인	221
2) Auraptene에 의해 유도되는 세포자살에 있어서 미토콘드리아 cytochrome c 방출 및 이에 의한 caspase 연쇄반응의 활성화	225
3) Auraptene에 의한 세포자살에 있어서 Fas-사망신호를 차단하는 anti-Fas 항체의 영향	229
4) Auraptene에 의한 세포자살에 미치는 pan-caspase inhibitor, z-VAD-fmk 또는 caspase-8 inhibitor, z-IETD-fmk의 영향	230
5) Cytotoxic effect of auraptene on human peripheral T cells	234
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	236
1절. 세부과제별 평가착안점에 입각한 목표달성도	236
2절. 관련분야에의 기여도	237
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	238
1절. 활용 계획	238

2절. 본 연구과제 수행으로 발표된 또는 발표예정인 논문 및 특허권	-----	241
3절. 추가연구의 필요성	-----	244
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	-----	245
1절. 해외과학기술정보	-----	245
제 7 장 참고문헌	-----	248

제 1 장 연구개발과제의 개요

최근 급격한 경제성장, 식생활의 서구화 및 노인인구의 증가로 암, 동맥경화, 고혈압, 심장질환, 뇌질환 및 당뇨 등 각종 성인병이 크게 증가하고 있다. 이러한 만성적인 퇴행성 질병을 치료하기 위하여 합성의약품이 널리 사용되고 있으나 독성 및 안전성이 문제시되면서 식이의 섭취나 조절을 통해 이들 질병을 효과적으로 예방·치료할 수 있는 대체의학으로서 건강 기능성식품에 대한 관심이 학계·산업계뿐만 아니라 일반 국민도 삶의 질 향상 차원에서 크게 고조되고 있다.

이러한 추세에 따라 식품산업에서는 특정한 영양소나 성분을 가감한 다양한 기능성 건강보조제품들이 생산, 판매되고 있고 또 허위 혹은 과대광고로 소비자들을 혼란케 하고 있으므로 이들 제품의 안전성과 규격화, 품질의 고급화 및 다양화가 필요하다. 또한 식품의 기능성 성분의 생리적 효능에 대한 과학적인 규명이 필요하며 나아가 이들 결과를 토대로 각 질병의 예방 및 치료목적에 부합할 수 있도록 안전성이 검증된 고품질의 기능성건강보조식품의 개발이 필요한 시점이다.

이러한 사회적 요구와 시대적 요청에 의하여 우리나라도 지난해 (2002년 8월 26일) “건강 기능식품에 관한 법률”이 제정됨으로서 건강기능성식품의 안전성 확보 및 품질향상이 확보될 것으로 믿는다. 아울러 천연자원으로부터 생리활성 물질을 이용한 식품산업이 크게 활성화 될 것으로 전망하고 있다. 특히 이 법률 시행을 위해 연구된 내용을 지난해 건강기능식품 학술심포지움에서 기능성 평가를 위해 제안된 평가방법에는 “개별 인정형 건강기능성 식품”의 허가를 위해서는 인체 시험 대신에 동물실험을 필수 항목으로 설정하는 등 많은 기준이 정립되고 있다. 이러한 사회적 요구와 이 법률안의 제정을 계기로 아직 개발되지 않은 수많은 천연자원부터 신기능 물질을 발굴하여 과학적인 효능규명과 제품화 개발을 위한 연구가 국가적인 차원에서 활성화되고 있는 실정이므로 본 연구는 필수적이라고 생각된다.

한편 산초나무(*Zanthoxylum schinifolium*)는 초피나무와 비슷하지만 잎자루 밑부분에 가시가 1개 달리고 열매가 녹색을 띤 갈색이며 꽃잎이 있는 것이 다르다. 산

초나무의 종자에는 정유함량이 높아 예로부터 종자에서 기름을 짜서 위장병이나 기관지 천식에 사용해 왔을 뿐 아니라 외부 종기의 치료에 쓰였다. 또한 최근에는 산초나무 종자에서 추출한 정유물질이 국부마취 및 진통작용이 있고, 항균작용에서는 대장균, 적리균, 구균류, 디프테리아균, 황색포도상구균, 피부사상균 등에 억제작용이 있는 것으로 보고되고 있다. 특히 지방은 체내에서 필수아미노산의 공급원이 되고 지용성 비타민인 A, D, E, K 등의 운반체의 구실을 하고 있어 건강보조식품으로서 인체에서 역할이 크다. 일명 중국 후추(Chinese pepper)인 산초나무는 초피나무와는 향기가 다르며, 중국에서는 향신료로 초피나무가 아닌 산초나무를 사용하고 있다. 우리나라에서는 예로부터 민간에서 산초나무 열매로 난대기름을 짜서 식용으로 혹은 머릿기름으로 사용해 왔기 때문에 유명하다. 초피나무는 가시가 마주 나고 산초나무는 가시가 어긋남으로서 구별이 가능하다.

초피나무(*Zanthoxylum piperitum*)는 운향과(Rutaceae)에 속하며, 키 3 m, 지름 15 cm까지 자라는 낙엽떨기나무이며, 조피, 재피, 지피, 천초, 남초, 진초, 산초, 파초, 축초 등 이름이 많다. 초피나무(*Zanthoxylum piperitum*)의 근연식물에는 황초피나무(*Z. coreanum*), 개산초나무(*Z. planispinum*), 산초나무(*Z. schinifolium*)가 있으며, 산초(山椒, *Zanthoxyli Fructus*)는 초피나무 또는 그 밖의 동속근연식물의 과피로, 과피에서 떨어진 씨를 될 수 있는 대로 제거한 것이다. 한방 약재로써 초피의 약리 작용으로는 양기를 돕고, 소화를 도우며, 탈항 방지, 지사 효과, 항염증제로 이용되어 왔다. 일본인들은 초피나무를 산초나무로 부르기 시작하면서 초피나무를 산초나무와 혼동하여 부르고 있으므로 이 두 가지 나무를 동시에 연구하여 그 차이점을 비교·분석할 필요가 있다고 본다.

초피나무는 전국의 해발 1,000 m 아래의 산야에 자생하거나 재배하고 있고 특히 경상남북도를 비롯한 남부지역에 더욱 많다. 6월에 황록색 꽃이 피어 가을에 지름 4 mm 정도의 둥근 열매가 갈색으로 익는다. 열매가 다 익으면 껍질이 터져 새까만 씨앗이 밖으로 튀어 나온다. 대개 열매 껍질을 향신료와 약으로 쓰고, 씨앗이나 어린 잎, 나무줄기도 여러 용도로 쓴다. 열매껍질, 가루나 잎은 우리나라에서는 추어탕이나 매운탕에 향신료로서 넣어 먹거나 어독해독제로서 이용된다. 또 김치를 시지 않게 하

기 위해 넣는다. 줄기로는 물고기를 잡는 데에 써 왔을 뿐이다. 최근에 와서는 초피가 요즈음 후추와 겨자를 능가하는 세계 제일의 천연 향신료로서 우수한 식품이자 또 에이즈 균까지 죽일 수 있다고 말할 정도로 훌륭한 약재로서도 세계적으로 각광을 받고 있다.

초피열매는 한방에서 해독, 구충, 진통, 건위약으로 많이 쓰며 초피나무 열매 껍질을 베개 속에 넣고 자면 두통이나 불면증에 신기할 정도로 효과가 있다. 또 여름철에 초피 잎이 붙은 연한 가지를 잘라 그늘에서 말렸다가 가루 내어 계란 흰자와 밀가루를 섞어서 화장크림처럼 만들어 동상, 타박상, 요통, 근육통, 종기 등에 바르면 효과가 신통하며, 초피 잎도 상처 부위에 바르면 곧잘 치유가 된다고 민간요법으로 알려져 있다. 특히 초피나무는 균을 죽이는 힘이 대단히 강하여 미국의 어느 의학자는 초피나무가 에이즈 균을 죽일 수 있다는 주장을 펴기도 했을 정도로 항균력이 아주 탁월하다고 한다.

산초열매는 그 기름을 장기간 복용하면 해소가 떨어지며, 산초열매의 매운맛 성분은 살균작용과 구충작용을 하며, 염증이 있는 눈병을 진정시키는데 뛰어난 효과가 있으며, 추어탕, 두부구이 등 각종 음식의 향신료로 사용되며, 산초술은 소화불량과 위염에 유효하다. 또 산초열매는 익기 전에 따서 식용으로 하고, 다 익은 종자에서 기름을 짠다. 한방에서는 열매껍질을 야초(野椒)라는 약재로 쓰는데, 복부냉증을 제거하고 구토와 설사를 그치게 하며, 회충, 간디스토마, 치통, 지루성 피부염에 효과가 있다. 현재 시중에서 산초기름 1리터에 이십 만원 내지 삼십 만원에 거래되고 있으나 생산량 부족으로 수요에 못 미치는 실정이다.

이렇듯 산초나무와 초피나무의 기능성과 이용도가 증가됨에 따라 경상북도에서는 정책적으로 초피나무를 권장 소득 작물로 지정함으로써, 현재 영천, 청도, 경산, 포항 등 여러 곳에서 많이 재배하고 있고 재배 농가에서는 매년 소득이 증가되고 있다. 이와 같이 산초나무와 초피나무는 항염증, 항노화, 항탈모, 항산화, 혈액순환 개선 및 항균작용 등의 효능이 민간으로부터 혹은 여러 연구에서 알려져 왔으나 체계적이고 과학적인 기전연구와 안전성 검정은 미비하여 초피가 가지고

있는 우수성과 여러 가지 장점에 비해 그 활용도가 못 미치고 있는 실정이므로 그 활용도를 높이는 차원에서 본 연구는 필수적이라고 생각된다.

따라서 본 연구에서는 산초나무와 초피나무의 잎, 열매, 줄기 및 뿌리의 생리활성 분획으로부터 생리활성성분을 분리·동정하여 이들 물질의 생리활성을 세포·분자 생물학 수준에서 뿐만 아니라 동물 생체에까지 그 효능을 검정하여 그 활성을 비교 연구하고 안전성과 독성을 검정하며 나아가 기능성제품화를 위한 방안을 구축하고자 한다. 아울러 국내에 유통되는 중국산 초피나무는 값은 저렴하지만 향기가 거의 없어 이용도가 아주 낮으므로 한국산 초피나무의 우수성을 소비자에게 인식시키기 위하여 한국산과 중국산 초피나무를 함께 비교 연구하고자 한다. 본 연구의 필요성을 구체적으로 서술하면 다음과 같다.

1. 기술적 측면

부위별 소재의 연구 측면에서 볼 때 : 국내에 유통되는 중국산 초피는 향기가 거의 없으므로 한국산 및 중국산을 비교 연구하여 국내산의 우수성을 밝히고자 한다. 잎, 열매, 줄기 및 뿌리의 부위별 생리활성성분과 그 효능의 차이점에 대한 체계적인 연구가 필요하다. 즉 초피나무의 잎과 과피에 대한 성분연구는 다소 이루어져 있으나 줄기와 뿌리에 대한 연구는 미흡하므로 부위별 차이점을 규명하기 위한 연구가 필요하다. 또한 산초나무의 잎과 열매는 초피나무와는 향기가 다르며, 한국과 일본에서는 초피나무를, 중국에서는 산초나무를 향신료로 쓰고 있고, 일본에서는 초피나무와 산초나무를 혼동하여 부르고 있으므로 동시에 두 가지 식물에 대해 연구하여 그 차이점을 비교함으로써 이들의 사용과 활용화에 문제점이 없도록 해야 한다.

독성 및 안전성 측면에서 볼 때 : 산초, 초피는 주로 향신료로 사용되는데 이는 단순히 매운 맛만 가지고 있는 것이 아니라 상쾌하고 시원한, 초피만의 독특한 매운 맛을 내기 때문이기도 하고 특히 생선독의 완화 및 생선 비린내 제거 효과가 있어 어류를 많이 섭취하는 한국과 일본에서 많이 이용되고 있다. 그러나 그 안전성과 위해성이 규명되지 않아 이에 대한 과학적인 연구가 필요한 실정이다. 더구나 기능성식품

개발 시 가장 중요하게 고려해야 할 식품 안전성과 관련하여 분자 생물학적 및 세포 생물학적 연구가 절실히 요구되는 바이다.

활성물질 분리·동정 및 신소재 발굴 측면에서 볼 때 : 아울러 산초나무와 초피나무로부터 현재까지 알려지지 않은 면역조절물질 성분의 검색 및 이의 작용 규명은 산초나무와 초피나무 유래의 신기능성 식품 개발 및 활용 방안 확대를 위하여 필요하다.

생리활성 물질의 효능 및 기전적인 연구 : 최근 신규 생리활성물질 및 기능성식품 개발과 관련하여 초피속(*Zanthoxylum species*)에 속하는 식물에 대한 연구 결과, 이들의 열매, 과피, 잎, 뿌리 등에서 항산화, 항균성, 항 혈전성, NO 생성 및 항 경련성 등 그 유용성이 다양하게 보고되어 왔으나 그 활성물질과 효능간의 체계적인 연구가 미흡한 실정이다.

그러므로 본 연구에서 산초나무와 초피나무가 갖고 있는 특유의 생리활성 물질에 적합한 활용을 위한 기술적인 연구를 위하여 생리활성물질과 효능에 대한 체계적인 연구가 절실하다. 또한 이들 활성물질의 생체 내에서의 약리작용 및 그 작용 기전에 대해서는 연구가 거의 진행되지 않고 있다.

제품개발 측면 : 특히 최근 들어 국내외적으로 향신료의 이용이 증가하고 있는데 현재는 주로 과피의 가루형태로만 이용되고 있으므로 겨자조미액을 능가하는 기능성 산초조미액과 초피조미액을 비롯한 여러 가지 형태의 향신료를 개발할 필요성이 있다. 본 연구과제의 결과를 토대로 기능성 생리활성물질의 분리기술을 확립할 뿐만 아니라 건강보조식품과 기능성제품의 개발을 모색함으로써 산업활성화에 기여함을 목표로 한다.

2. 경제·산업적 측면

산초나무와 초피나무로부터 생리활성물질의 분리와 더불어 이에 대한 생리활성실험에 관한 연구가 다소 이루어지고 있으나 아직까지 기호 면이나 가공 면에서 품질을

향상시킨 이렇다 할 기능성식품이 개발되지 못한 실정이다. 더구나 산초나무에 대한 연구는 미비하다. 그러므로 이들을 이용한 제품개발과 이용도를 증가시키기 위해서는 소비자와 산업체에 홍보할 수 있는 과학적인 효능 규명과 이용방안제시가 필요하다.

초피나무는 우리나라 전국에 자생 혹은 재배되고 있으며 남부지역에 더 많이 자생되거나 재배하고 있다. 특히 경상북도의 권장 소득 작물로 지정되면서, 영천, 청도 경산, 포항, 영덕 등의 경북 지방에서 다량 재배하고 있으며, 최근에는 초피생산을 주로 하는 우수영농인의 농장에서 단기 소득 작목으로 대량 재배하고 있다. 최근 들어서 그 기능성이 차츰 알려지고 우리나라 국산의 품질 우수성이 알려지면서 그 수요가 점차 증대되어 현재 열매와 잎을 일본 등지에 수출하고 있다. 국내산 과피가 향기가 강하고, 가격이 고가이나, 중국산 과피는 그 가격이 국산의 1/5 정도이지만 향기가 없어서 선호도가 거의 없다. 따라서 이번 기회에 국내산의 우수성을 과학적으로 밝혀 국내산 소비 증대와 수출증가를 통한 외화획득을 목적으로 체계적인 연구가 요구되는 바이다.

최근 국내뿐만 아니라 국외에서도 식품 및 생약추출물을 이용한 기능성 건강보조식품의 판매가 급성장하고 있다. 따라서 향기가 강한 한국산 초피나무로부터 건강보조식품, 향균성 생활용품, 향균성 세제, 겨자 조미액을 능가하는 기능성 산초조미액과 초피조미액(향신료) 등의 고부가가치 기능성제품의 개발을 위한 연구가 절실히 요구되고 있다.

산초나무와 초피나무로부터의 항암 및 천연 면역조절의 신 기능탐색 연구는 최근 급격히 증가하는 인류 최대의 난치 질병인 암의 치료 및 예방뿐만 아니라 장기 이식 시 사용되는 면역억제제로의 활용과 같이 그 이용범위를 확대할 수 있어 이에 대한 연구가 매우 절실하다. 최종 목표인 농가 소득 증대를 위해 현재는 거의 일본에만 열매와 잎을 수출하고 있지만 앞으로 동남아뿐만 아니라 전 세계적으로 향신료, 향균물질로서 건강보조식품으로써 수출하기 위해서는 본 연구가 절실히 필요하다.

우리나라에서 유지 생산량은 약 4만 톤으로 수요량의 8.6 % 정도이며, 대부분의 유지를 수입에 의존하고 있어 산초나무와 초피나무를 이용한 새로운 유지자원의 개발은 수입대체효과도 클 것이므로 경제·산업적 측면에서도 본 연구의 필요성이 있다. 현재 시중에서 산초기름 1리터에 이십 만원 내지 삼십 만원에 거래되고 있으므로 농가소득 증대를 위해 본 연구의 필요성이 절실하다.

3. 사회·문화적 측면

21세기는 생활수준의 향상과 의학의 발달로 수명이 연장되면서 고령화 시대가 이미 시작되었고, 이에 동반하여 각종 성인병이 급격히 증가하고 있다.

건강장수에 관심이 깊어지면서 천연물 유래 건강식품에 대한 소비자의 기호성의 증대와 더불어 합성첨가물을 사용한 식품을 꺼리는 경향이 두드러지면서 보다 안전한 기능성 천연식품 및 제품의 개발이 필요하다.

국내산 천연식품을 이용하여 여러 가지 성인병들의 예방과 치료에 효과가 있을 뿐 아니라, 최근 들어 서구의 식생활 문화의 유입에 따른 소아 비만 등과 같은 성인병 예방의 효과도 기대되므로 산초나무와 초피나무에서 보고된 식이 억제물질을 이용한 천연 건강보조식품의 개발이 필요하다.

식품첨가물로서 합성화학물질보다는 천연물질을 선호하는 경향이 높다. 산초나무와 초피나무 유래의 향신료, 방부제, 보존제, 항산화성 물질 등의 활용은 산초나무와 초피나무의 오랜 식용역사를 고려해볼 때 그 안정성이 인정되어 이의 활용이 매우 유용할 것으로 사료된다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

산초나무 초피나무의 주 용도는 향신료이며, 열매나 잎을 일본에 수출하고 있다. 건강에 아주 좋다고 최근 다시 알려지기 시작한 것은 초피나무나 산초나무의 열매에서 짜낸 기름인데 이것을 이용해 나물을 무치기도 하고 약처럼 먹는 경우도 있고 머릿기름으로도 사용해 왔다. 현재 경상북도 권장 소득 작물로서 지정되어 있지만, 이에 대한 체계적인 연구가 미흡할 뿐만 아니라 가공제품은 전무한 실정이므로 초피나무와 산초나무로부터 생리활성물질과 효능을 검정하고, 나아가서 건강보조식품 및 기능성 가공식품 개발을 위한 체계적인 연구가 필요한 시점이다.

국외 산초나무 연구동향으로는 대부분이 중국에서 기초적인 연구가 이루어졌으며, Cheng 등[32]은 새로운 amide 성분인 *cis*-fagaramide를 보고하였으며, Tsai 등[34, 35]은 뿌리껍질로부터 coumarin과 peroxyterpenyl coumarin을 분리하였으며, Chang [36] 등은 껍질로부터 terpenyl coumarin을 확인하였다. Chen 등[37]은 껍질로부터 6종의 새로운 coumarin을 분리하여 *in vitro*에서 혈소판응집작용을 확인하였으며, Jiang 등[70]은 뿌리로부터 schinifolin과 5'-acetoxyschinifolin을 분리하였으나 이와 관련한 제품 개발연구는 미미한 실정이다.

국내 산초나무 연구동향으로는 이 등[35]이 산초로부터 휘발성 정유 성분을 분석하였으며, 조 등[40]은 줄기의 coumarin 성분인 lacinartin 성분이 monoamine oxidase (MAO)를 억제한다고 보고하였다. 문 등[41]은 산초에 대한 지질과산화와 간 손상의 저해활성을 조사하였으나 활성성분에 대한 연구는 행해지지 않았다. 또한 문 등[41]은 산초나무의 항산화활성을 보고하였으며, 김 등[43]은 nitrite-scavenging activity에 대하여 연구하였으나 활성성분과 효능의 체계적인 연구는 이루어지지 않았을 뿐만 아니라 국내에서 산초나무의 산업화는 시도되지 못하고 있는 실정이다.

국외 초피나무 연구동향으로는 대부분이 일본에서 기초적인 연구가 행해졌으며, Kojima 등은 초피나무의 잎으로부터 휘발성 정유 성분을 분리·확인하였다. Moro-

zumi 등은 초피나무로부터 항균활성을 보고하였으며, Tanaka 등은 초피나무의 항알러지활성을 보고하였다. Aritomi 등은 잎으로부터 5종의 flavonoid를 분리하였으며, Abe 등은 초피나무의 줄기껍질로부터 5종의 새로운 lignan 성분을, 초피나무의 뿌리로부터 새로운 phenyl propanoid 화합물을 분리하였다. 미국의 Epple 등은 초피나무의 열매가 쥐의 식이섭취를 저해한다고 보고하였다. 이와 같이 초피나무에 대한 연구는 활발히 이루어졌으나 아직까지 체계화되지 못하고 있으며 기능성 제품 개발 연구는 거의 시도되지 않았다. 2000년에는 Izuta 등이 초피나무의 모발 백발 저해 활성을 보고한 이후에 일본에서는 화장품 특히 초피나무를 첨가한 모발 제품의 개발을 시도하고 있다.

국내 초피나무 연구동향으로 심 등은 초피나무의 cineol, α -terpineol, linalool 및 piperitone 성분이 개미를 쫓는 활성을 갖는다고 보고하였으며, 서 등은 초피나무의 과피로부터 정유성분에 대한 항균활성을 나타내는 분석에 대해 GC/MS로 분석한 결과 geranyl acetate, citronellol, geraniol과 cumin aldehyde임을 보고하였다. 김 등은 100종의 식물에 대해 항산화활성과 radical scavenging activity에 대해 검색한 결과 그 중 초피나무는 강한 항산화활성을 나타낸다고 보고하였다. 또 김 등은 초피나무의 줄기껍질로부터 어독성물질인 L-asarinin을 분리하여 보고하였으며, 이 성질이 초피나무의 줄기가 고기 잡는데 이용된 것으로 여겨진다. 허 등은 잎으로부터 5종의 flavonoid와 1종의 aromatic acid를 분리하였다. 이와 같이 국내에서도 초피나무에 대한 기초적인 연구는 행해져 왔으나 활성물질과 연계된 체계적인 효능 및 그 기전연구는 미흡한 실정이며, 초피나무를 이용한 제품개발은 전무한 실정이다.

이와 같은 국내외 현황에 비추어 볼 때, 초피나무와 산초나무 유래의 유효성분을 효과적으로 이용하기 위하여, 본 연구를 통한 유효성분과 그 활성 및 기전연구를 토대로 하여 기능성 식품 보조제(다이어트 보조, 성인병 예방, 면역 조절제), 기능성 조미액(소스, 조미액), 기능성 식품(잎, 미숙 열매의 염장식품), 천연 식품 첨가제(천연 방부제, 천연 보조제, 천연 항산화제), 그리고 기능성 화장품 및 세제류(항균크림, 항균액체비누, 항균 주방용 세제, 항균 film-주방용 랩) 등의 제품에 활용할 수 있는 산업화 방안 모색이 절실히 요구된다.

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

1절. 동물실험을 통한 생리활성 물질의 효능 및 작용기작 규명 (제 1 세부과제)

1. 산초와 초피나무 추출물질의 만성질환 예방 생리활성 및 안전성 조사

가. 연구배경

산초나무 (*Zanthoxylum schinifolium*)와 초피나무 (*Zanthoxylum piperitum* DC.)는 모두 운향과 (Rutaceae)에 속하는 방향성 식물자원으로 산초의 경우는 감기, 설사, 황달, 편두염 및 중풍 예방에, 초피의 경우는 해독, 구충, 진통 및 건위제와 같은 약재로 사용해 왔을 뿐 아니라 향미성분으로 식품에도 빈번히 사용되어 왔다. 최근 과학적인 연구에 의하여 이들 식물에 quercetin, phenol 류, flavone 유도체 및 tocopherol과 같은 항산화 물질[1]과 신미성분인 sanshool-I,II를 비롯한 각종 정미성분[2] 및 alkaloid 성분[3] 등이 함유되었음이 밝혀졌다. 현대에 만연하는 암, 당뇨 및 심혈관계 질환 및 노화는 체내에서 과도한 산화가 주원인으로 알려져 있어 이를 방지하는 항산화 생리물질의 역할이 매우 강조되고 있다. 따라서 산초와 초피나무에 함유되어 있는 성분들의 효과가 기대되고 있으나 이에 대한 연구는 적다.

본 연구에서는 산초나무와 초피나무의 만성질환 예방과 관련된 항산화, 항염증, 항당뇨 및 항혈전 작용을 체계적으로 조사하고자, 제 2 세부과제에서 제공되는 부위별, 추출단계별 여러 종류의 추출물들을 사용하여 *in vitro* 효능 검색과 *in vivo* 동물 실험을 수행하였다. 동물실험 수행 시에는 이들 추출물의 기능식품 성분으로 활용 시의 안전성을 확보하기 위하여 독성지표 및 해독지표 등을 조사하였다.

나. 연구방법

1) 산초 및 초피나무 추출물의 *in vitro*와 *in vivo* 항산화 작용 측정

산초와 초피나무의 여러 부위 (잎, 줄기, 뿌리)를 상법에 따라 여러 용매로 단계적으로 추출하여 제조된 시험물질들을 (제 2 세부과제 ‘산초 및 초피나무 부위별 추출 및

분획과정' 참조) *in vitro* 표준반응계에 첨가하거나 실험동물에게 투여한 후 (*in vivo*) 혈청 및 조직 내의 항산화능은 다음의 세 가지 방법에 의거하여 조사하였다. 첫째, 흰쥐 간 microsome 분획을 Slater의 방법[4]으로 분리 조제한 후 지질 과산화물 Ohkawa 등의 방법[5]으로 둘째, DPPH radical 소거활성은 Tagashira와 Ohtake의 방법[6]에 따라 측정하였다. 그리고 셋째, lipofuscin의 측정은 Fletcher의 방법[7]에 따라 fluorescence (%)로, carbonyl value는 간조직의 microsome중의 산화된 단백질의 함량을 Levine 등[8]의 방법 따라 측정하였다.

2) *In vitro*와 *in vivo* 항혈전능, 항염증, 항당뇨 활성 측정

1)항에 서술한 *in vitro*와 *in vivo* 조건에서 얻은 시료들에서 항혈전능은 Thompson 등의 방법[9]에 따라 activated partial thromboplastin time (APTT)로, 항염증 효능은 Koshihara 등의 방법[10]에 따라 Soybean lipoxygenase activity (SLO)로, 항당뇨 효능은 α -glucosidase 활성 저해를 Kim 등[11]에 따라 측정하였다.

3) 동물실험 사육 및 식이 실험 (*in vivo*)

가) 동물 사육 및 식이

동물 사육을 통한 *in vivo* 실험은 1차와 2차년도 두 차례 수행하였다. 1차 동물실험에서는 *in vitro* 검색에 의하여 활성이 높았던 산초 잎의 *n*-butanol 분획과 methylene chloride 분획을 섭취시켰고, 2차 동물실험에는 식품첨가 및 보전제로의 활용에 실현성이 높은 에탄올 추출물을 사용하였다.

(1) 1차 동물실험

체중 100 g내외의 Sprague-Dawley종 수컷 흰쥐를 대조군인 정상식이군 (지방 10%)과 비교군인 고지방식이군 (지방 20%)으로 나누어 기본 식이조성은 AIN-93에 준하였다. 산초 잎의 *n*-butanol 추출물(B)과 methylene chloride 추출물 (MC)의 투여는 정상 식이군에는 0.5 % 수준 하나로, 고지방식이군에서는 0.25, 0.5, 0.75 %, 3단계의 수준으로 섭취시켰으며 총 10군의 실험군의 특성이 Table 1에 나타나 있다. 각 군당 10마리씩 사육하였고 생리활성 물질은 4주간 경구 투여하여 사육하였다.

(2) 2차 동물실험

1차 실험과 같은 동물에게 기본 고지방식이 (대조군)에 산초 잎의 70 % 에탄올 추출물을 식이의 첨가하여 3주간 사육하였다. 첨가하는 에탄올 추출물의 양은 1차 동물 실험에서 사용하였던 B와 MC 용매분획의 유효량에서 산출된 양을 증감하여 5수준으로, 즉 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0 %로 하였으며 총 6군의 실험군의 특성은 Table 2와 같다.

Table 1. Experimental groups and diets in the first animal feeding study

Groups ¹⁾	High fat diet ¹⁾	ZS(산초) Fractions ²⁾		Content ³⁾
		<i>n</i> -Butanol(B)	Methylene chloride(MC)	%
C	—	—	—	0.00
CB	—	+	—	0.50
CMC	—	—	+	0.50
HF	+	—	—	0.00
HBL	+	+	—	0.25
HBM	+	+	—	0.50
HBH	+	+	—	0.75
HMCL	+	—	+	0.25
HMCM	+	—	+	0.50
HMCH	+	—	+	0.75

¹⁾Groups: Control group (C), 0.50 % *n*-Butanol (B) fraction administered to control group (CB), 0.50 % Methylene chloride (MC) fraction administered to control group (CMC) group, the high fat diet (HF), the high fat diet and 0.25 % B fraction administered group (HBL), the high fat diet and 0.50 % B fraction administered group (HBM), the high fat diet and 0.75 % B fraction administered group (HBH), the high fat diet and 0.25 % MC fraction administered group (HMCL), the high fat diet and 0.50 % MC fraction administered group (HMCM) and the high fat diet and 0.75 % MC fraction administered group (HMCH)

²⁾Fractions : The high biological activities fractions of *Z. schinifolium*

³⁾Content : Administered percentage of the fraction

Table 2. Experimental groups and diets in the second animal feeding study

Groups ¹⁾	High fat diet	ZS(산초) ethanol extract in diet (%)
HC	+	0
HE1	+	0.1
HE2	+	0.2
HE5	+	0.5
HE10	+	1.0
HE20	+	2.0

¹⁾Groups: Control group (HC), high-fat diet without and HE groups with 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 and 2.0 % with ethanol extract of *Z. schinifolium* leaves

나) 분석시료의 준비

실험종료 후 실험동물을 가벼운 ether 마취 하에서 복부 대동맥으로부터 혈액을 채취하고 간조직의 일부는 급속 냉동하여 차후 분석을 위하여 deep freezer에 보관하고 일부는 세포분획을 분리하였다. 세포 마쇄액을 4 °C에서 단계적 원심분리법에 따라 미토콘드리아 분획, 미토콘드리아 제거 상층액 (PMS, post-mitochondrial supernatant) 및 원형질액 (cytosol)으로 분리하였다. PMS는 과산화지질 정량에 사용하였고, cytosol 시료는 glutathione peroxidase, superoxide dismutase 등의 활성 측정에 사용하였다.

다) 항산화 효소 활성 측정

SOD 활성은 알칼리 상태에서 pyrogallol의 자동산화에 의한 발색을 이용한 Marklund와 Marklund의 방법[12]에 따라 측정하였고, GSH-px 활성은 Lawrence와 Burk의 방법[13]에 따라 측정하였다. Catalase의 활성은 240 nm에서 5분간 H₂O₂의 흡광도 변화를 이용하여 H₂O₂의 몰흡광계수로 H₂O₂의 농도를 구하는 Aebi등[14]의 방법으로 측정하였다. Paraoxonase 활성은 Mackness의 방법[15]에 따라, arylesterase 활성은 La Du의 방법[16]에 따라 각각 405 nm와 270 nm에서 분광학적으로 측정하였다. 각 효소활성 산출에 필요한 단백질 함량은 bovine serum albumin을 표준품으로 사용

하여 Lowry 법[17]으로 정량하였다.

라) Oxidative stress 완화 및 free radical scavenging 작용

Oxidative stress 완화 작용 관찰을 위해 Mixed function oxidase system 중에서 Cytochrome P₄₅₀의 함량 측정은 Omura와 Sato의 방법[18]으로 측정하였다. Free radical scavenging 작용의 일환으로 Superoxide radical 함량 측정은 Azzi 등의 방법 [19]에 따라, H₂O₂ 함량은 Gay 등의 방법[20]에 따라 측정하였다. 혈장 Paraoxonase 활성 및 arylesterase 활성 측정법은 ‘다’의 ‘3)’과 같다.

마) 지질대사 개선 효과 측정

혈청 총콜레스테롤, HDL-콜레스테롤과 중성지방 (TG)은 효소 kit(신양화학, 서울)를 사용하여 정량하였다. 간조직은 Folch법[21]으로 지질을 추출한 후, triton X-100로 처리한 후[22] 효소 kit(신양화학, 서울)를 사용하여 분광학적으로 정량하였다.

바) 해독 및 안전성 지표측정

혈청 glutamate oxaloacetate transaminase (GOT) 및 glutamate pyruvate transaminase (GPT) 활성은 분석 kit (Sigma)를 사용하여 측정하였다. 간조직 glutathione S-transferase 활성은 Habig 등의 방법[23]에 따라 측정하였으며, 간조직 중의 glutathione 함량의 측정은 Bernt와 Bergmeyer의 방법[24]에 따라 분광학적으로 측정하였다.

4) 통계처리

모든 실험결과에 대한 통계처리는 각 실험 군별로 표준차이가 있는가를 검증하기 위해 분산분석을 수행하였으며 분산분석 (ANOVA 검증)결과 유의성이 발견된 경우 군간의 유의도는 Tukey's HSD test[25]에 의해 분석하였다.

다. 연구결과

1) 산초나무와 초피나무 추출물의 *in vitro* 생리활성 검색

가) 항산화 활성

산초나무와 초피나무의 뿌리, 줄기 및 잎의 부위별 및 분획별 추출물을 이용하여 흰쥐 간 microsome의 지질과산화 억제 활성을 1.00 mg/mL농도에서 1차 screening 한 결과는 Table 3과 같다. 산초와 초피의 부위별 활성은 잎, 줄기, 뿌리에서 모두 유사하게 나타났고 methanol 층, methylene chloride 층 및 ethyl acetate 층에서 높은 활성을 나타내었다. 산초의 용매 분획 물질들의 농도를 0.05~1.00 mg/mL까지 변화시켜 억제활성을 비교한 결과 0.050~0.250 mg/mL까지 농도 의존적으로 지질과산화 억제활성이 증가하였으며 (Fig. 1) 초피에서의 결과도 유사하였다.

Table 3. Effects of root, stem and leaf extracts and fractions of *Z. schinifolium* and *Z. piperitum* on the inhibition of hepatic microsomal lipid peroxidation (%) at the concentration of 1.0 mg/mL.

Extracts and fractions	Parts	Root	Stem	Leaf
	Lipid peroxidation inhibition (%)			
<i>Zanthoxylum schinifolium</i> (산초)				
Methanol extract		91.7±4.8 ^a	95.5±3.0 ^a	86.6±1.3 ^c
Methylene chloride fraction		94.3±0.6 ^a	93.3±1.1 ^a	93.3±3.4 ^b
Ethyl acetate fraction		96.5±4.0 ^a	94.9±0.5 ^a	101.2±0.8 ^a
<i>n</i> -Butanol fraction		15.4±1.8 ^c	16.3±4.1 ^c	92.4±0.1 ^b
H ₂ O fraction		4.6±2.8 ^d	13.0±1.5 ^c	35.4±3.0 ^d
Precipitate in water		27.1±4.4 ^b	35.7±0.3 ^b	85.1±2.3 ^c
<i>Zanthoxylum piperitum</i> (초피)				
Methanol extract		96.3±1.1 ^a	95.3±0.5 ^a	100.3±0.4 ^a
Methylene chloride fraction		94.5±2.1 ^a	88.3±0.2 ^c	92.5±0.3 ^b
Ethyl acetate fraction		96.1±2.5 ^a	97.5±0.0 ^b	96.9±0.6 ^a
<i>n</i> -Butanol fraction		25.5±1.7 ^b	10.0±0.3 ^d	89.1±0.9 ^c
H ₂ O fraction		-1.8±0.1 ^c	-0.2±1.4 ^e	28.0±6.0 ^d
Reference: α -Tocopherol		95.4±3.2		

All values are mean±SE (n=3).

Values within a column with different superscripts are significantly different at $p < 0.05$ by Tukey's test.

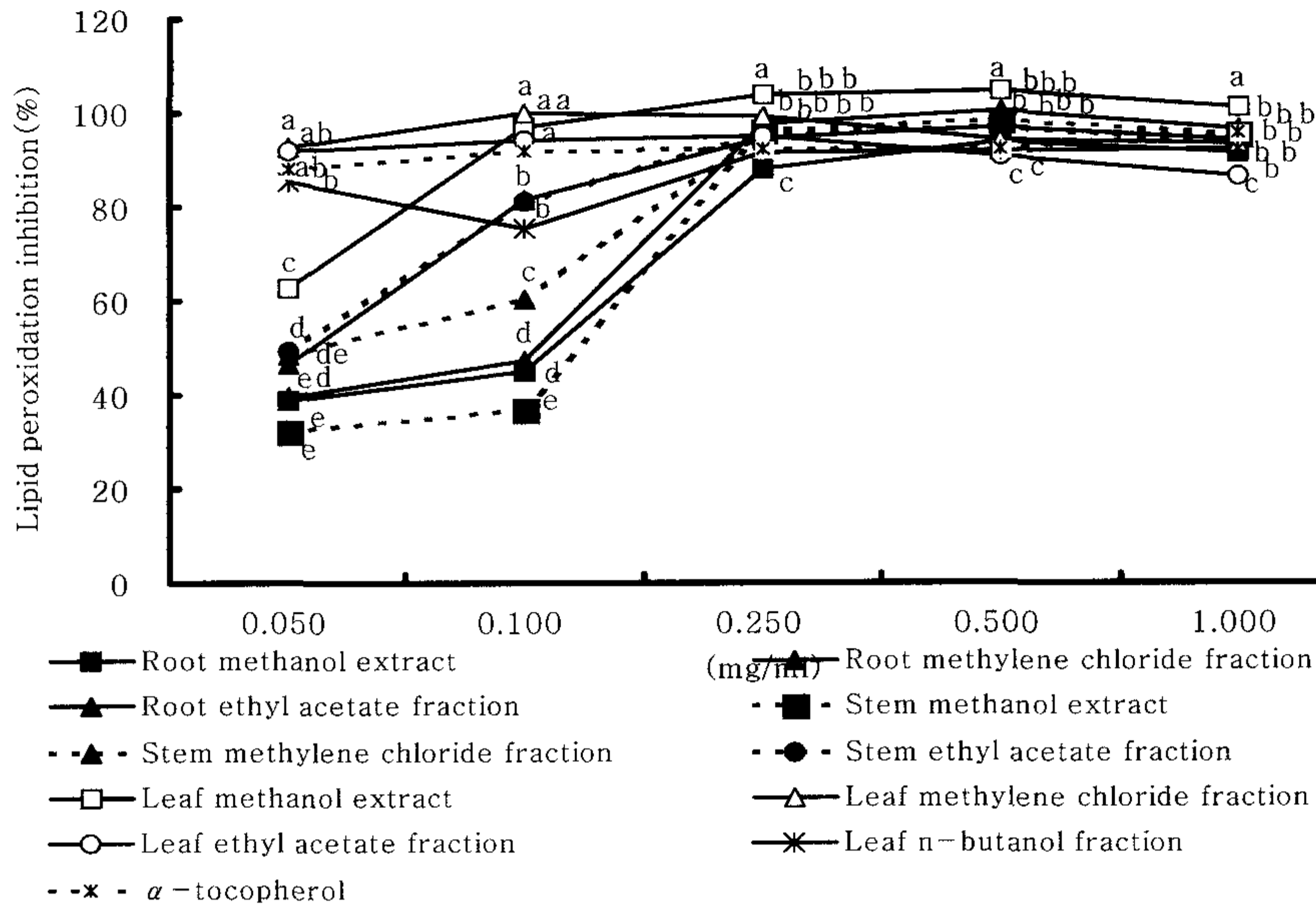


Fig. 1. Inhibition of hepatic microsomal lipid peroxidation (%) of the extracts and fractions on the concentration in the range of 0.05~1.00 mg/mL.

Different alphabets at the same concentrations indicate significant difference at $p < 0.05$ by Tukey's test.

산초나무와 초피나무 부위별 추출 용매 분획별 항산화활성을 DPPH radical 소거능으로 조사한 결과가 Table 4에 나타나 있다. 시료 1.00 mg/mL 농도에서 산초와 초피 모두 부위별로는 앞에서의 활성이 가장 높아 간의 microsome 지질과산화 억제능과 유사하였으나 용매분획별로는 ethyl acetate 층과 n-butanol 층이 높아 다소의 차이가 있었고 초피에서는 methylene chloride 층과 초기 methanol 추출물에서도 상당한 활성을 나타내었다. 이 활성은 표준물질인 α -tocopherol에 비하여 3~4 배 높았다. 또한 용매 분획물들을 농도별로 조사한 결과 산초에서는 0.125~5.000 mg/mL에서 농도 의존적으로 증가하였고 초피나무에서는 0.12~2.50 mg/mL에서 농도 의존적으로 증가하였다 (Fig. 2). 이 결과는 산초 추출물이 사염화탄소를 투여한 마우스 간조직의 지질과산화 정도를 절반 이상 감소시켰다는 문 등[1, 26]의 결과와 유사하다고 보겠다. 본 연구에서의 산초 용매추출물에서의 이 물질들의 함량과 타 물질과의 관련성이 주목된다. 한편 초피의 oleoresin이 보여준 항산화 성분의 초피 추출물들 내의 함유 여부도 관심사다.

Table 4. Effects of root, stem and leaf extracts and fractions of *Z. schinifolium* and *Z. piperitum* on the DPPH radical scavenging activity (%) at the concentration of 1.00 mg/mL.

Parts	Root	Stem	Leaf
	DPPH radical scavenging activity (%)		
<i>Zanthoxylum schinifolium</i> (산초)			
Methanol extract	11.3±1.2 ^b	14.3±1.7 ^c	46.9±0.5 ^b
Methylene chloride fraction	13.5±1.5 ^b	13.8±2.2 ^c	15.9±1.4 ^d
Ethyl acetate fraction	32.6±2.2 ^a	37.4±2.9 ^a	87.8±1.2 ^a
<i>n</i> -Butanol fraction	14.7±2.2 ^b	25.1±2.7 ^b	81.9±4.5 ^a
H ₂ O fraction	2.6±1.6 ^c	4.7±1.0 ^d	30.8±2.7 ^c
Precipitate in water	-36.4±2.2 ^d	-29.2±4.9 ^e	54.4±6.7 ^b
<i>Zanthoxylum piperitum</i> (초피)			
Methanol extract	29.3±5.1 ^b	28.5±4.2 ^b	78.6±4.4 ^{bc}
Methylene chloride fraction	25.8±3.4 ^b	18.3±2.9 ^c	68.8±5.4 ^c
Ethyl acetate fraction	39.6±2.8 ^a	42.2±7.4 ^a	84.5±2.3 ^{ab}
<i>n</i> -Butanol fraction	22.2±4.8 ^b	23.1±6.9 ^{bc}	85.3±2.0 ^a
H ₂ O fraction	11.7±2.8 ^c	10.4±2.1 ^d	44.4±4.5 ^d
Reference: α-Tocopherol	24.9±2.5		

All values are mean±SE(n=3).

Values within a column with different superscripts are significantly different at $p < 0.05$ by Tukey's test.

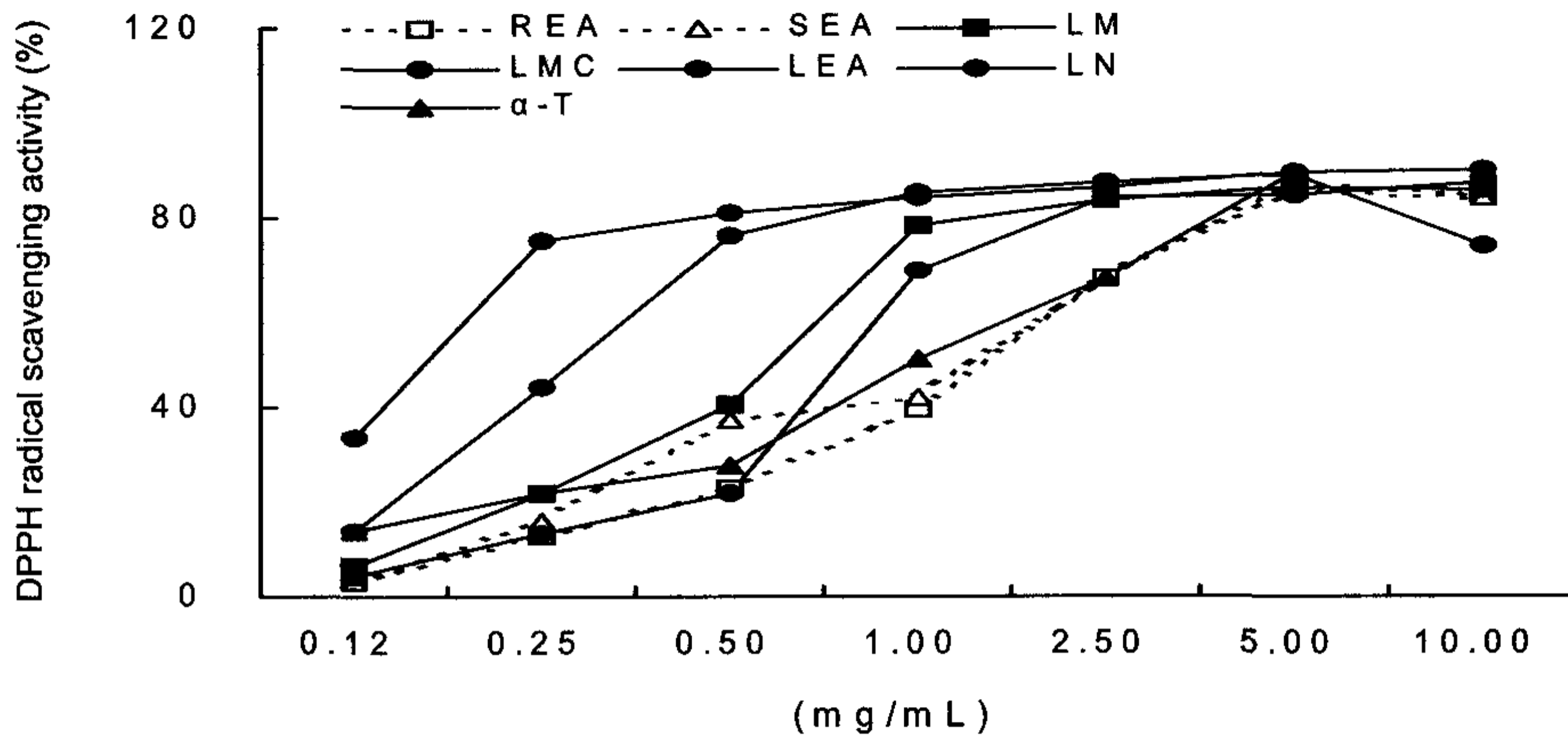


Fig. 2. Inhibition effects of *Z. piperitum* fractionated on the concentration of 0.12~5.00 mg/mL in the DPPH radical scavenging activity.

REA: Ethyl acetate fraction of root. SEA: Ethyl acetate fraction of stem.
 LM: Methanol extract of leaf. LMC: Methylene chloride fraction of leaf.
 LEA: Ethyl acetate fraction of leaf. LN: *n*-Butanol fraction of leaf.
 α-T: α-Tocopherol, the standard substance of antioxidant.

나) 항혈전 활성: Activated partial thromboplastin times (APTT)

산초나무와 초피나무의 항응고제로서의 가능성을 알아보기 위하여 1.00 mg/mL 농도에서 APTT를 측정된 결과는 Table 5과 같다. 산초나무의 뿌리, 줄기 및 잎의 항응고 활성을 관찰한 결과 잎의 경우에는 *n*-butanol 층 > methylene chloride 층 > 수층 > methanol 층의 순으로 APTT 활성이 높았으며, 이는 뿌리 및 줄기에서도 같은 경향으로 확인되었다. 부위별 APTT 활성을 비교했을 때 잎 > 줄기 > 뿌리의 순으로 응고 시간이 지연되었다. 산초나무 추출물의 항응고 활성은 *n*-butanol 층에서 높은 활성을 나타내었으며 그 중에서도 잎의 *n*-butanol 층의 활성이 가장 높았다 (Table 5).

Table 5. Effects of root, stem and leaf extracts and fractions of *Z. schinifolium* and *Z. piperitum* on the activated partial thromboplastin times (%) at the concentration of 1.0 mg/mL.

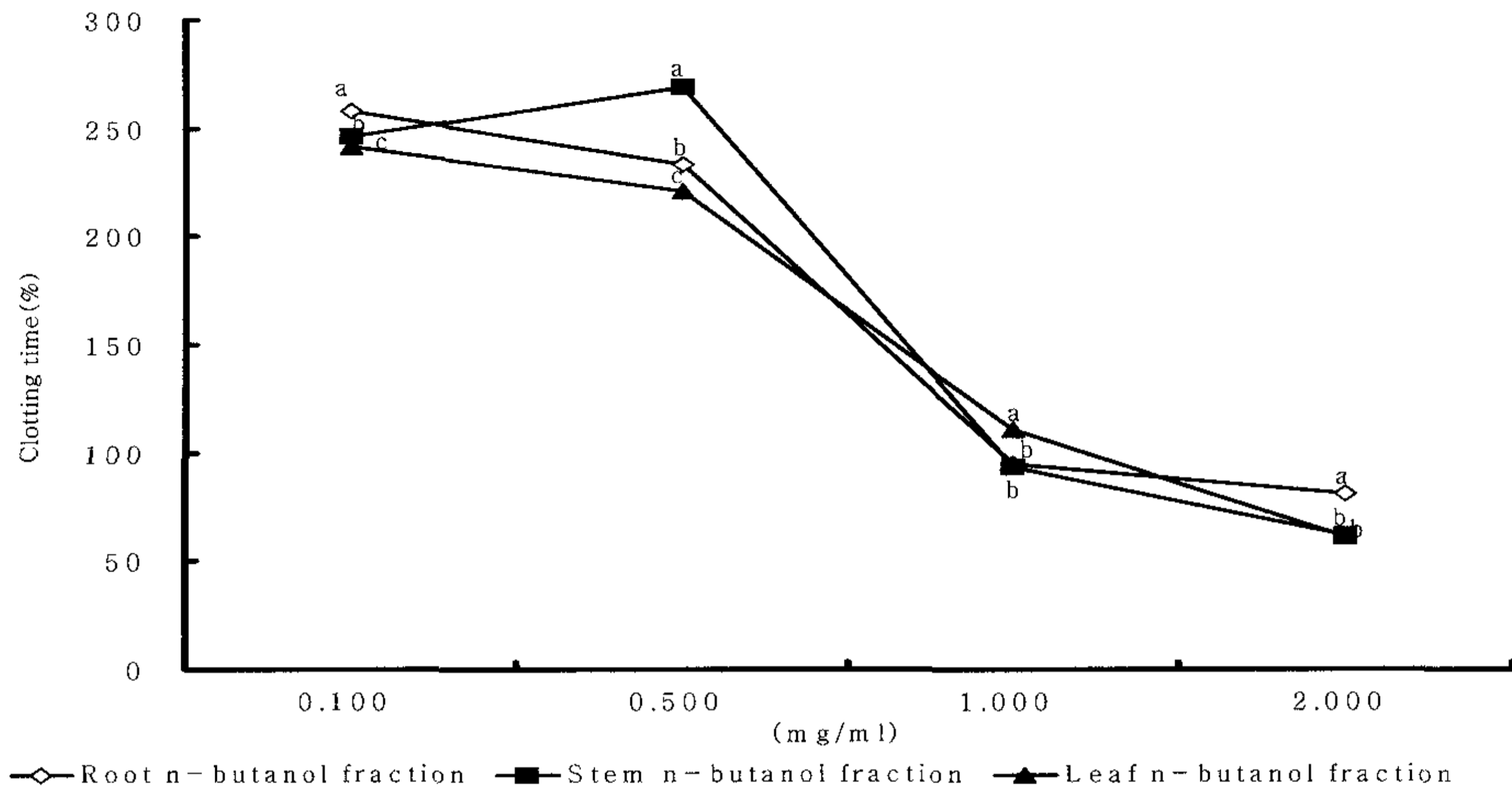
Parts	Root	Stem	Leaf
	Activated partial thromboplastin times (%)		
<i>Zanthoxylum schinifolium</i> (산초)			
Methanol extract	66.7±4.5 ^b	69.9±0.1 ^b	96.5±0.5 ^b
Methylene chloride fraction	77.4±6.3 ^{ab}	88.6±6.1 ^a	110.2±0.6 ^a
Ethyl acetate fraction	56.5±1.9 ^c	61.5±4.7 ^c	87.3±1.8 ^c
<i>n</i> -Butanol fraction	92.1±7.3 ^a	93.3±6.5 ^a	111.1±0.3 ^a
H ₂ O fraction	88.6±6.2 ^a	69.3±3.2 ^b	103.9±0.0 ^a
Precipitate in water	50.5±2.8 ^c	73.5±7.5 ^{ab}	74.9±0.4 ^d
<i>Zanthoxylum piperitum</i> (초피)			
Methanol extract	80.0±2.9 ^c	80.8±3.8 ^b	90.2±9.0 ^{bc}
Methylene chloride fraction	86.7±0.6 ^b	80.3±0.3 ^b	19.8±5.4 ^d
Ethyl acetate fraction	80.1±2.0 ^c	91.8±9.3 ^{ab}	70.8±8.0 ^d
<i>n</i> -Butanol fraction	94.6±1.9 ^a	100.8±9.4 ^a	128.0±10.1 ^a
H ₂ O fraction	84.9±3.0 ^{bc}	84.1±4.2 ^b	96.5±4.4 ^{bc}

All values are mean±SE(n=3).

Values within a column with different superscripts are significantly different at $p < 0.05$ by Tukey's test.

산초와 초피시료에서 효과가 가장 좋았던 *n*-butanol 분획물을 농도를 변화시켜 APTT를 측정된 결과 산초의 경우는 낮은 농도(0.1~0.5 mg/mL)에서 높은 활성을 보인 반면 (Fig. 3A) 초피에서는 0.05 mg/mL에서 0.25 mg/mL로 증가할 때는 농도별로 증가하여 최고치에 이르러 그 이상의 변화는 없었다 (Fig. 3B).

A



B

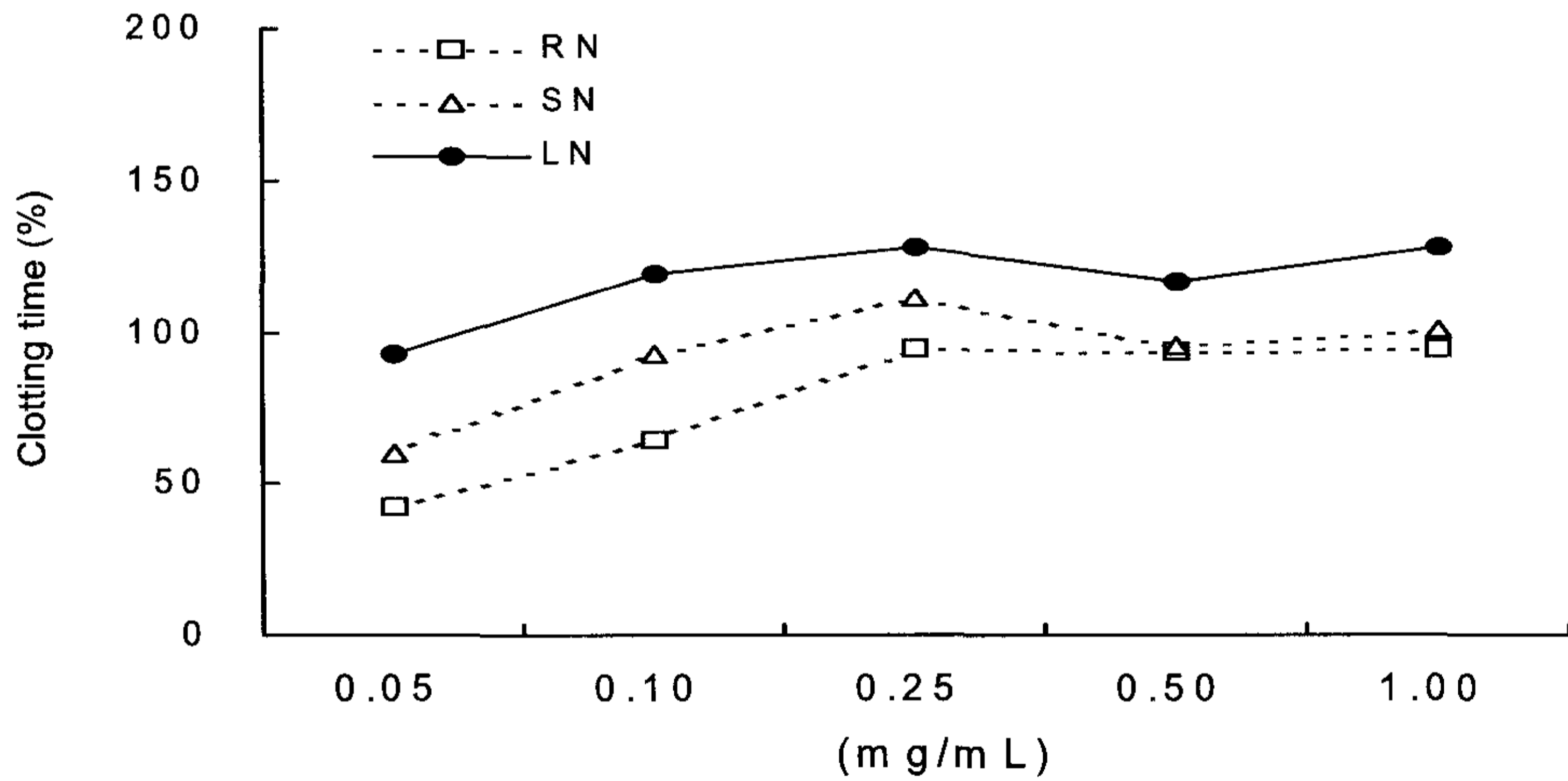


Fig. 3. Inhibition effects on the activated partial thromboplastin times of *Z. schinifolium* (A) and *Z. piperitum* (B) fractionated by *n*-butanol at the concentration of 0.10~2.00 mg/mL
 B; RN, SN and LN are *n*-butanol fraction of root, stem and leaf of *Z. piperitum*

다) 항염증 활성

산초나무와 초피나무 성분들의 항염증 물질로서의 가능성을 알아보고자 1.00 mg/mL 농도에서 soybean lipoxygenase activity (SLO)로 활성을 측정한 결과는 Table 6와 같다. 전반적으로 산초가 초피보다 활성이 높고 초피 모두 앞에서 활성이 높았으며 용매분획별로는 ethyl acetate층 및 *n*-butanol 층에서 활성이 높았다. 활성이 높은 초피나무 잎과 뿌리의 용매 분획물을 농도를 변화시켜 조사해 본 결과 0.12~5.00 mg/mL 농도까지 농도 의존적으로 증가함을 볼 수 있었고 (Fig. 4) 산초의 경우에도 유사하였다.

Table 6. Inhibition effects of *Z. schinifolium* and *Z. piperitum* fractionated on the soybean lipoxygenase activity at the concentration of 1.00 mg/mL

Parts	Root	Stem	Leaf
	Soybean lipoxygenase activity (%)		
<i>Zanthoxylum schinifolium</i> (산초)			
Methanol extract	23.4±2.8 ^c	26.2±2.1 ^{ab}	37.6±2.7 ^c
Methylene chloride fraction	12.8±5.3 ^d	16.9±5.1 ^c	29.4±3.8 ^c
Ethyl acetate fraction	43.3±3.6 ^a	31.3±2.8 ^a	66.3±2.4 ^a
<i>n</i> -Butanol fraction	31.5±2.8 ^b	30.8±4.3 ^a	58.5±1.4 ^b
H ₂ O fraction	14.1±4.4 ^d	14.0±5.2 ^c	38.4±3.9 ^c
<i>Zanthoxylum piperitum</i> (초피)			
Methanol extract	6.0±2.4 ^c	15.3±5.7 ^N	27.3±5.0 ^c
Methylene chloride fraction	5.7±2.3 ^c	10.8±4.7	28.5±5.0 ^c
Ethyl acetate fraction	50.6±2.4 ^a	17.9±5.5	60.2±3.3 ^a
<i>n</i> -Butanol fraction	21.4±5.4 ^b	16.2±5.6	51.9±3.7 ^b
H ₂ O fraction	1.3±6.4 ^c	11.2±5.4	34.7±4.6 ^c

All values are mean±SE(n=3).

Values within a column with different superscripts are significantly different at $p < 0.05$ by Tukey's test.

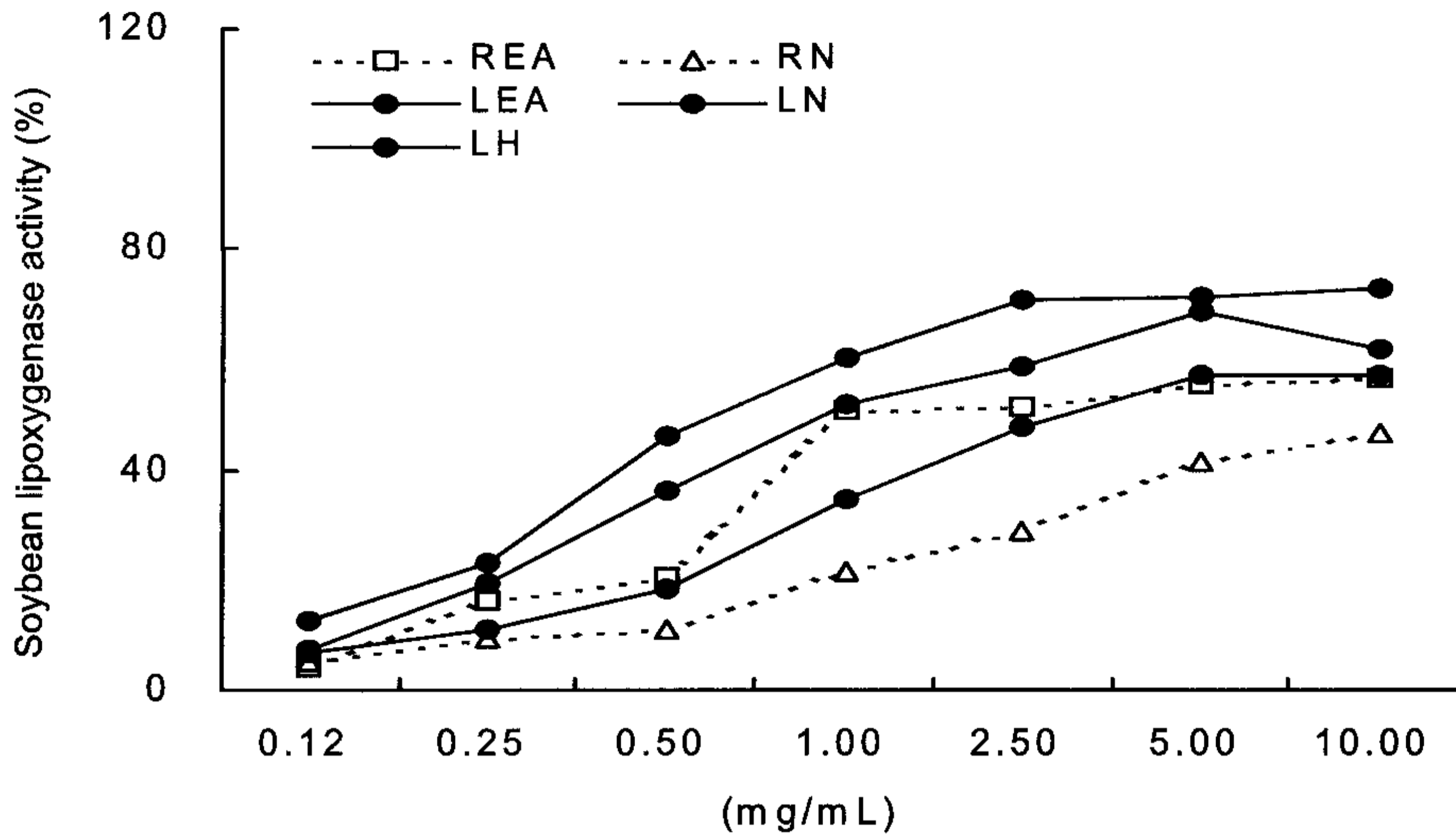


Fig. 4. Inhibition effects of *Z. piperitum* fractionated on the soybean lipoxygenase activity at the concentrations of 0.12~5.00 mg/mL

REA: Ethyl acetate fraction of root.

RN: *n*-Butanol fraction of root.

LEA: Ethyl acetate fraction of leaf.

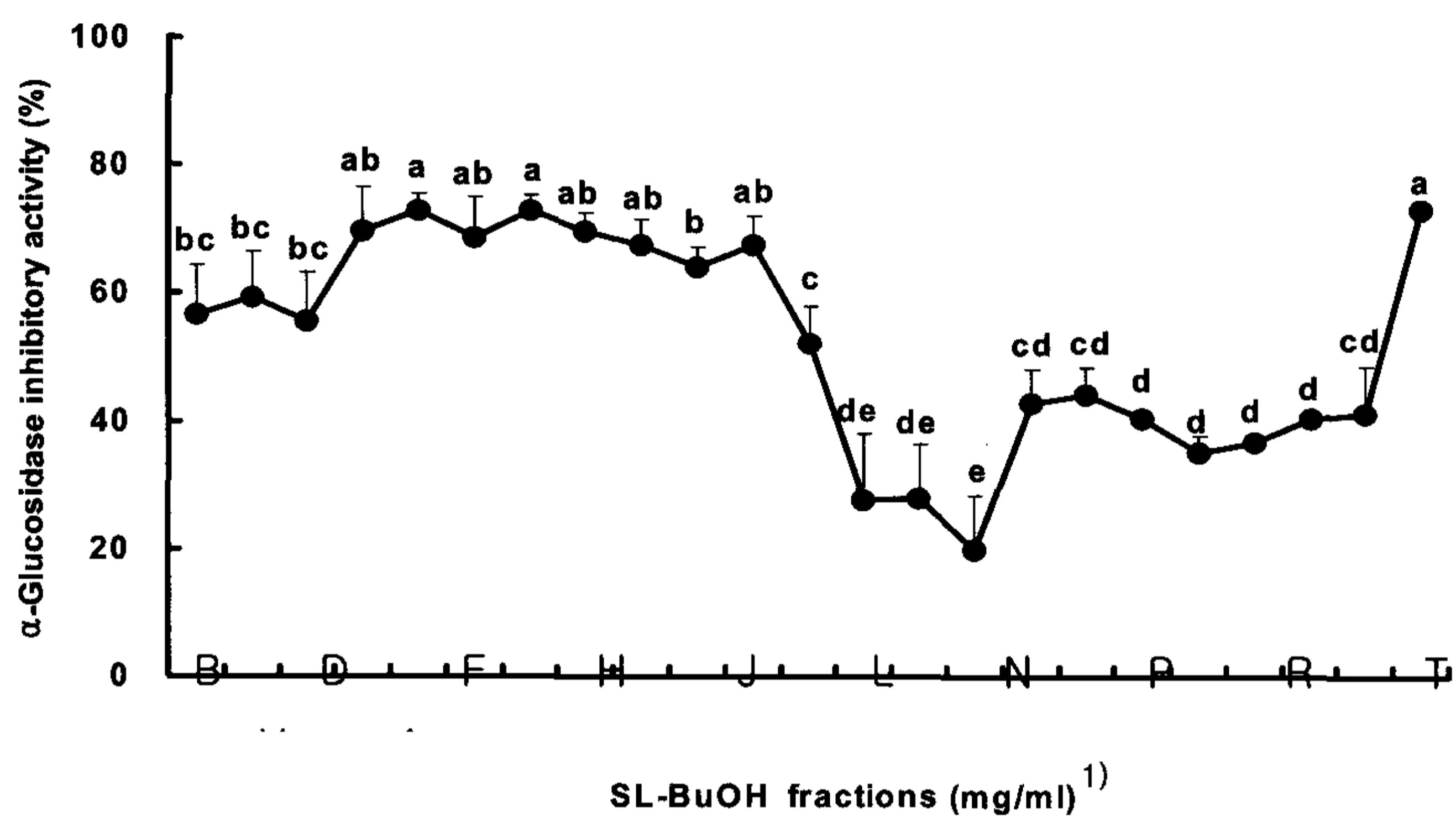
LN: *n*-Butanol fraction of leaf.

LH: H₂O fraction of leaf.

라) 항당뇨 활성

항당뇨 효능은 산초 잎의 *n*-butanol 층의 22 가지 분획물에 대하여 α -glucosidase 저해정도를 조사함으로써 수행하였다. Fig. 5A에서 보는 바와 같이 분획별 저해 활성은 W 분획물에서 B 분획물로 갈수록 활성이 높아짐을 관찰할 수 있었으며, 비교적 높은 활성 나타낸 E 분획물에서 L 분획물의 총 8 가지 분획물을 항당뇨 치료제로 잘 알려진 acarbose의 활성과 비교한 결과 K 분획물을 제외한 7 가지의 분획물이 acarbose의 수준을 나타내었다. 이는 같은 분획물에 대하여 DPPH radical 소거능은 낮아 (Fig 5B) 항당뇨 효능 물질과 항산화 작용물질이 서로 다름을 알 수 있었다.

A



B

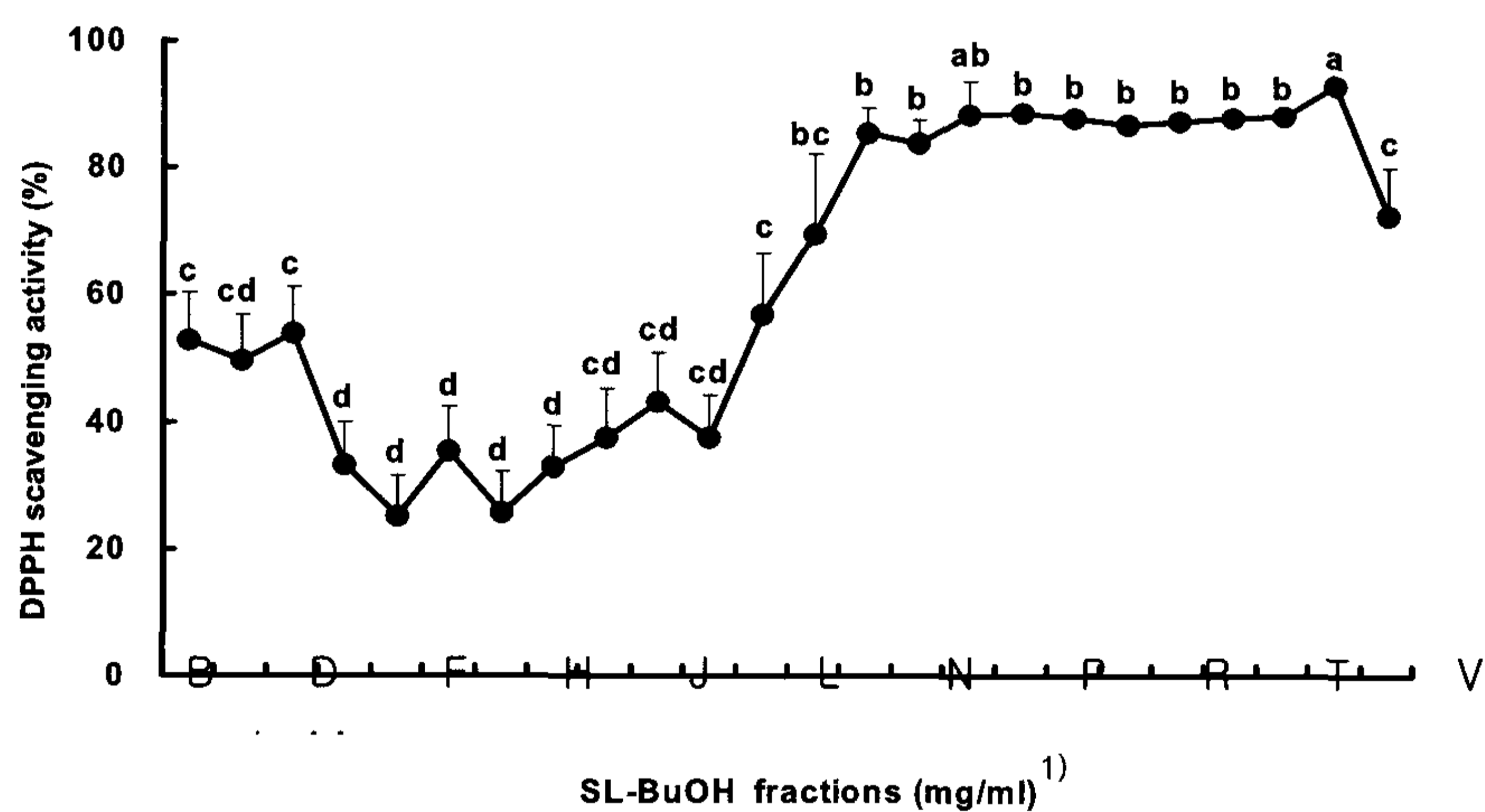


Fig. 5. Effects of 22 pools of *n*-butanol fraction of *Z. schinifolium* on the α -glucosidase inhibitory activity (A) and the DPPH scavenging activity (B) at the concentration of 1.00 mg/mL *in vitro*. L-AA and α -Toco : L-ascorbic acid and α -tocopherol as an antioxidant standard.

All values are mean \pm SE (n=3) and those with different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Tukey's test.

이 분획물들 중에서 활성이 큰 분획들에 대하여 RP C18, SiO₂ open, Sephadix LH-20 column chromatography를 반복 실시하여 (제 2 세부과제 참조) 얻은 9가지 물질에 대하여 항당뇨 활성을 DPPH 소거능과 함께 재조사하였다. 그 결과는 Table 7 와 8에 나타난 바와 같이 항당뇨 활성은 1, 2, 5 화합물에서 높았으며, DPPH 소거능은 분리물질 간에 유사하였으나 8번 화합물에서 대체로 높고 9번 화합물에서 낮았다.

Table 7. Effects of 9 isolated compounds obtained from the extracts of *Z. schinifolium* leaves on the α -glucosidase inhibitory activity *in vitro* (%)

concentration compound*	0.5mg/mL		1.0 mg/mL	
	average	deviation	average	deviation
1	50.3	2.0	71.3	0.2
2	58.2	3.7	78.2	1.3
3	47.2	2.0	68.6	0.2
4	46.1	3.3	67.4	1.6
5	58.2	3.7	78.2	1.3
6	42.8	4.8	59.6	2.8
7	32.1	10.6	49.5	8.5
8	20.0	10.6	38.6	9.3
9	39.2	4.9	56.7	2.9

- * 1. 4-[(1*E*)-3-hydroxy-1-propenyl]-2,6-dimethoxy-phenol 1-*O*- β -D-glucopyranoside (syringin)
 2. 2-propyl alcohol β -D-glucopyranoside
 3. (6*S*,7*E*,9*S*)-6,9-dihydroxy-4,7-megastigmadien-3-one 9-*O*- β -d-glucopyranoside (vomifoliol-9-*O*- β -D-glucopyranoside)
 4. (3*R*,6*E*)-3,7-dimethyl-3,8-dihydroxy-oct-1,6-dien 8-*O* - β -D-glucopyranoside
 5. (3*R*,6*E*)-3,7-dimethyl-3,8-dihydroxy-oct-1,6-dien 3-*O*- β -D-glucopyranoside (cnidioside C)
 6. 20(29)-lupen-3-ol (lupeol)
 7. 20 (29)-lupen-3-one (lupeone)
 8. bergapten
 9 β -sitosterol

Table 8. Effects of 9 isolated compounds obtained from the extracts of *Z. schinifolium* leaves on the DPPH scavenging activity *in vitro* (%)

concentration compound*	0.25 mg/mL		0.5 mg/mL		1.0 mg/mL	
	average	deviation	average	deviation	average	deviation
1	23.2	2.9	63.5	3.3	65.2	1.0
2	22.3	0.7	61.1	0.4	64.8	1.0
3	25.3	0.5	64.0	3.4	65.6	1.0
4	22.7	0.0	62.5	1.2	65.7	1.0
5	30.7	2.5	71.5	0.7	75.3	0.7
6	31.1	0.2	55.9	1.2	65.5	1.8
7	30.2	1.9	58.0	1.9	66.3	1.4
8	46.7	0.7	71.9	0.0	81.4	1.2
9	17.4	0.3	42.7	2.5	53.6	0.2

* Same as described in Table 5.

2) 동물실험에서의 산초 잎 추출물의 효능 및 안전성 규명 (*in vivo*)

가) 항산화 활성

(1) 간조직과 적혈구의 SOD와 Catalase 활성

생체 내 항산화 방어기구 중 효소적 방어계의 하나로써 superoxide radical을 환원시켜 H₂O₂로 환원시킴으로써 산소 독으로부터 생체를 보호하는 SOD 활성 및 selenium을 함유하는 항산화 효소로써 체내에서 H₂O₂를 H₂O로 무독화시킴으로써 과산화적 손상을 방지하는 GSH-px 활성 변동을 간조직에서 측정한 결과는 Table 9와 같다. SOD의 경우에는 정상군에 비해 정상군에 생리활성 물질을 투여한 군 (CB군 및 CMC군)들은 유의적인 차이가 없었고, 고지방식이군에서는 유의적으로 감소되었다. 고지방식이군에 비해 생리활성 물질의 투여군들에서는 효소의 활성이 다소 증가하였으나, 유의적 (p<0.05)인 수준은 아니었다. GSH-px의 경우에는 정상군에 비해 정상군에 생리활성 물질을 투여한 군 (CB군 및 CMC군)들은 유의적인 차이가 없었고, 고지

방식이군에서는 유의적으로 감소되었다. 고지방식이군에 비해 생리활성 물질을 투여한 군들은 고지방식이군에 비해 HBL군, HBM군 및 HMCL군에서는 활성이 다소 증가하였으며 HBH군, HMCM군 및 HMCH군은 유의적으로 증가하여 정상군 수준이었다.

Table 9. Effects of *n*-butanol and methylene chloride fractions of *Z. schinifolium* leaves administration on the hepatic superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-px) activities in the high fat diet fed rats.

Groups	SOD (unit/mg protein/min)	GSH-px (nmol NADPH/min/mg protein)
C	4.11±0.57 ^{1)a2)}	151±15.72 ^a
CB	3.81±0.13 ^a	141±17.38 ^a
CMC	3.90±0.22 ^a	146±10.41 ^a
HF	2.81±0.20 ^b	101±10.62 ^c
HBL	2.92±0.31 ^b	111± 8.52 ^{bc}
HBM	2.97±0.21 ^b	119±15.61 ^{bc}
HBH	3.08±0.18 ^b	121±11.92 ^{ab}
HMCL	2.82±0.13 ^b	121±17.59 ^{bc}
HMCM	3.00±0.22 ^b	121±11.54 ^{ab}
HMCH	3.15±0.20 ^b	131±20.48 ^a

Experimental conditions are same as Table 1.

¹⁾All values are mean±SE (n=10).

²⁾Values within a column with different superscripts are significantly different at p<0.05 by Tukey's test.

적혈구의 SOD 활성 및 GSH-px 활성을 적혈구에서 측정된 결과는 Table 10과 같다. SOD의 경우 정상군에 비해 정상군에 생리활성 물질을 투여한 군 (CB군 및 CMC군)들은 유의적인 차이가 없었고, 고지방식이군에서는 유의적으로 감소되었으며, 고지방식이군에 생리활성 물질의 투여함으로써 유의적 (p<0.05)로 증가하는 경향을 나타내었다. GSH-px의 경우 간조직과 유사한 경향을 나타내었으며, 특히 고지방식이에 생리활성 물질을 투여한 군 중 산초 잎 methylene chloride 층 0.75 %를 투여한

HMCH군에서 아주 우수한 효소 활성도를 나타내었다.

(2) 간조직의 Catalase 활성

간조직 중의 catalase 활성을 관찰한 결과는 Fig. 6과 같다. 정상군에 비해 정상군에 생리활성 물질은 투여한 군 (CB군 및 CMC군)들은 유의적인 차이가 없었고, 고지방식이군에서는 유의적으로 감소되었다. 고지방식이군에 비해 생리활성 물질을 투여한 군인 HBL군, HBM군 및 HMCL군에서는 유의적인 차이가 없었으나, HBH군, HMCM군 및 HMCH군은 다소 증가하는 경향을 나타내었으며, 이는 앞에서 관찰한 SOD 및 GSH-px의 활성과 관련 있는 것으로 사료된다.

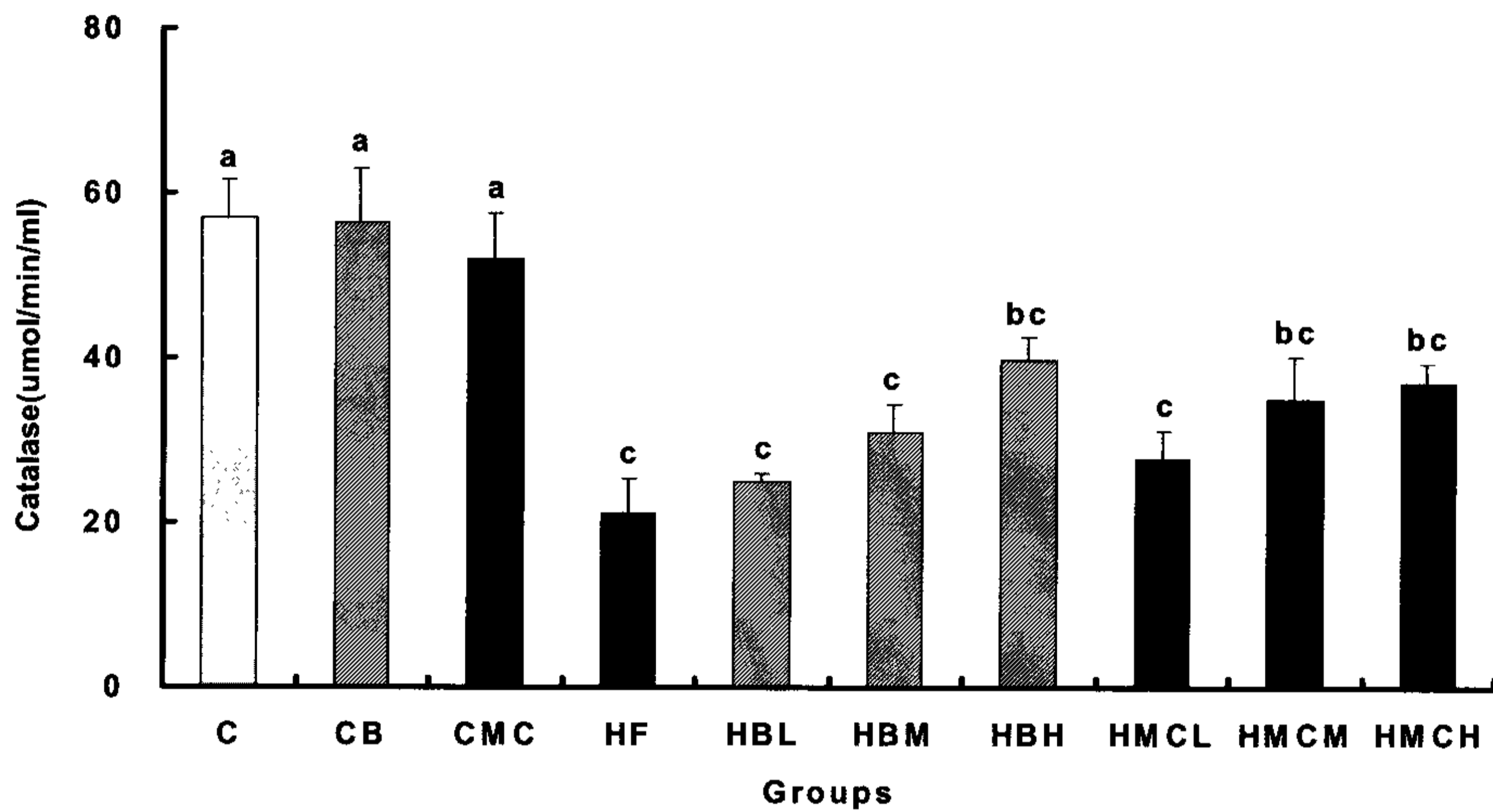


Fig. 6. Effects of *n*-butanol and methylene chloride fractions of *Z. schinifolium* administration on the hepatic catalase activities in the high fat diet fed rats.

All values are mean ± SE (n=10).

Bars with different letters are significantly different at p<0.05 by Tukey's test.

Table 10. Effects of *n*-butanol and methylene chloride fractions of *Z. schinifolium* leaves administration on the red blood cell superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-px) activities in the high fat diet fed rats.

Groups	SOD (unit/mg protein/min)	GSH-px (nmol NADPH/min/mg protein)
C	4.11±0.57 ^{1)a2)}	155±15.72 ^a
CB	3.81±0.13 ^a	151±17.18 ^a
CMC	3.90±0.22 ^a	153±10.41 ^a
HF	2.81±0.20 ^b	121±10.82 ^c
HBL	2.92±0.31 ^b	128±16.52 ^{bc}
HBM	2.97±0.21 ^b	131±15.61 ^{bc}
HBH	3.08±0.18 ^b	139±11.92 ^{ab}
HMCL	2.82±0.13 ^b	129±17.29 ^{bc}
HMCM	3.00±0.22 ^b	141±11.34 ^{ab}
HMCH	3.15±0.20 ^b	147±19.48 ^a

Experimental conditions are same as Table 1.

¹⁾All values are mean±SE (*n*=10).

²⁾Values within a column with different superscripts are significantly different at *p*<0.05 by Tukey's test.

(3) 간조직의 PON 활성도 및 arylesterase 활성

HDL 및 LDL의 산화를 억제하는 효소로서 HDL-결합효소인 paraoxonase (PON) 및 PON과 동일한 세포에서 파생되어져 나오는 것으로 알려진 arylesterase의 활성을 간 조직의 microsome 분획에서 관찰한 결과는 Table 11과 같다. PON의 활성은 정상군에 비해 정상군에 생리활성 물질을 투여한 군 (CB군 및 CMC군)들은 유의적인 차이가 없었고, 고지방식이군에서는 유의적으로 감소되었다. 고지방식이군에 비해 생리활성 물질의 투여군들에서 다소 증가되었으며, 특히 HBH군 및 HMCH군에서 유의적 (*p*<0.05)으로 높은 활성을 나타내어 정상군 수준이었다. Arylesterase 활성은 정상군에 비해 정상군에 생리활성 물질을 투여한 군들은 PON에서와 같이 유의적인 차이가 없었으며, 고지방식이군에서는 유의적으로 감소되었다. 고지방식이군에 비해 생리활성 물질의 투여군들에서는 다소 증가되었으나, 유의적인 수준은 아니었다.

Table 11. Effects of *n*-butanol and methylene chloride fractions of *Z. schinifolium* leaves administration on the hepatic microsomal paraoxonase (PON) and arylesterase activities in the high fat diet fed rats.

Groups	Paraoxonase	Arylesterase
	(umol/min/mg protein)	
C	68.6±7.9 ^{1)a2)}	7.5±0.1 ^a
CB	65.6±9.6 ^a	7.0±0.2 ^a
CMC	67.6±8.3 ^a	6.8±0.1 ^a
HF	25.6±3.6 ^c	2.9±0.6 ^b
HBL	30.6±4.5 ^c	3.5±0.6 ^b
HBM	45.6±3.6 ^{bc}	3.9±0.5 ^b
HBH	58.6±4.6 ^{ab}	3.1±0.3 ^b
HMCL	35.6±2.6 ^c	3.9±0.3 ^b
HMCM	43.6±5.2 ^{bc}	4.0±0.6 ^b
HMCH	60.6±9.0 ^{ab}	4.4±0.9 ^b

Experimental conditions are same as Table 1.

¹⁾All values are mean±SE (n=10).

²⁾Values within a column with different superscripts are significantly different at p<0.05 by Tukey's test.

(4) 간조직과 적혈구의 과산화지질 함량

조직의 산화적 손상의 지표가 되는 간조직과 적혈구의 지질과산화물 축적을 TBARS 로 측정된 결과는 Fig. 7과 같다. 정상군에 비해 정상군에 생리활성 물질을 투여한 군 (CB군 및 CMC군)들은 유의적인 차이가 없었고, 고지방식이군에서는 유의적으로 증가됨을 관찰할 수 있었다. 반면, 고지방식이군에 비해 생리활성 물질을 투여한 군들에서는 모두 유의적으로 감소하였으며, 특히 산초 잎 *n*-butanol 및 methylene chloride 층을 각각 0.75 % 공급한 HBH군 및 HMCM군들에서는 정상군 수준까지 감소되어 투여 물질의 우수한 활성을 관찰할 수 있었다.

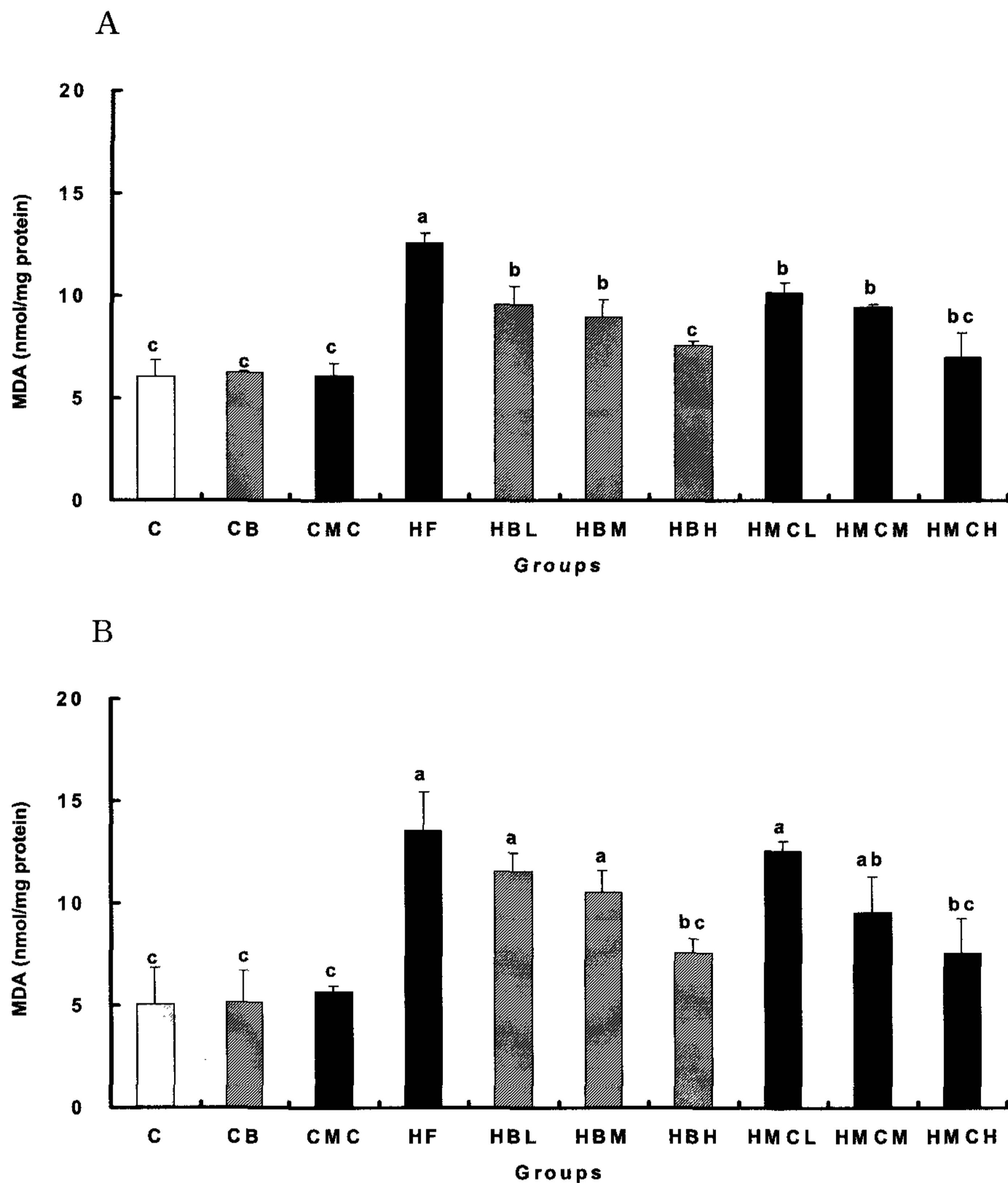


Fig. 7. Effects of *n*-butanol and methylene chloride fractions of *Z. schinifolium* leaves administration on the hepatic (A) and red blood cell (B) TBARS values in the high fat diet fed rats.

All values are mean±SE ($n=10$) and those with different letters are significantly different at $p<0.05$ by Tukey's test.

(5) Lipofuscin 함량

생체 노화의 중요한 지표로 사용되고 있는 리포푸신의 변화 정도를 관찰하기 위해

정상군의 흡광도 100 %로 나타내고 이를 기준으로 하여 실험군들의 상대적 흡광도를 관찰한 결과는 Fig. 8과 같다. 정상군에 비해 정상군에 생리활성 물질을 투여한 군 (CB군 및 CMC군)들은 유사한 수준을 나타내었으며, 고지방식이군에서는 유의적으로 증가되었다. 고지방식이군에 생리활성 물질을 투여한 군들을 고지방식이군과 비교한 결과 상대적으로 낮은 흡광도를 나타내었으며, 특히 HBH군 및 HMCH군에서는 정상군의 수준으로 유의적으로 감소하였다. 이는 앞에서 관찰한 TBARS 함량과 상관관계가 있을 것으로 사료된다.

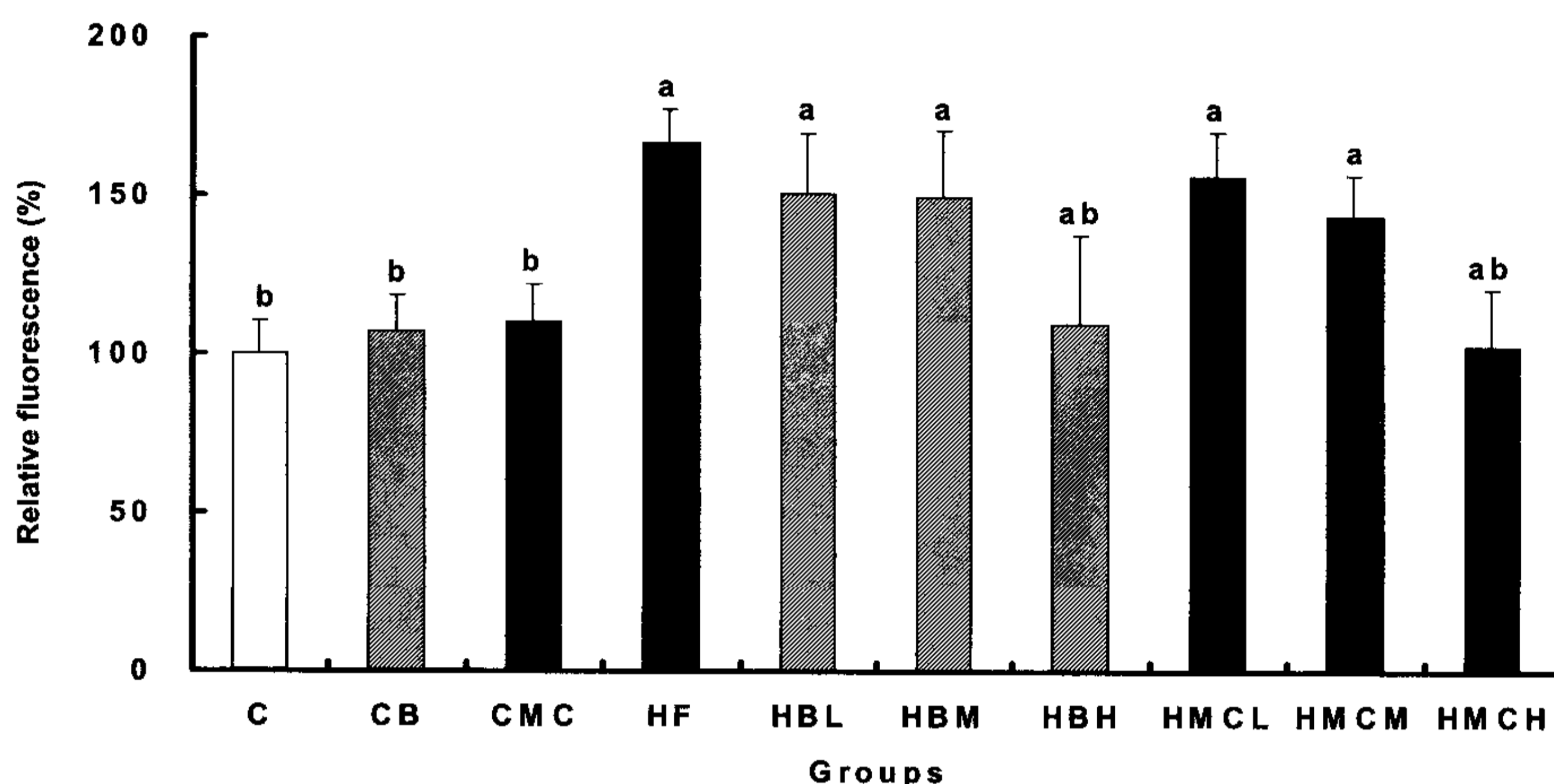


Fig. 8. Effects of *n*-butanol and methylene chloride fractions of *Z. schinifolium* leaves administration on the hepatic lipofuscin fluorescence(%) in the high fat diet fed rats.

All values are mean±SE (n=10). Bars with different letters are significantly different at p<0.05 by Tukey's test.

(6) 카보닐가

단백질의 산화정도의 지표가 되는 carbonyl의 수준을 간 조직의 mitochondria 및 microsome 분획에서 관찰한 결과는 Fig. 9와 같다. Mitochondria 분획의 경우에는 정상군에 비해 정상군에 생리활성 물질을 투여한 군 (CB군 및 CMC군)들은 유의적인 차이가 없었으나, 고지방식이군에서는 유의적으로 증가되었다. 고지방식이군에 생리활성 물질을 투여한 중 HBL군 및 HMCL군은 고지방식이 군에 비해 carbonyl의 수준이 다소 감소하였으며, HBM군, HBH군, HMCM군 및 HMCH군의 경우에는 정상군 수준

까지 유의적으로 감소되어 산초 잎 추출물의 단백질 산화억제 효과를 관찰할 수 있었다. Microsome 분획에서는 정상군에 비해 고지방식이군들에서 유의적으로 증가되었으나 각 식이군 간의 추출물 투여에 의한 유의적인 ($p < 0.05$) 차이는 없었다.

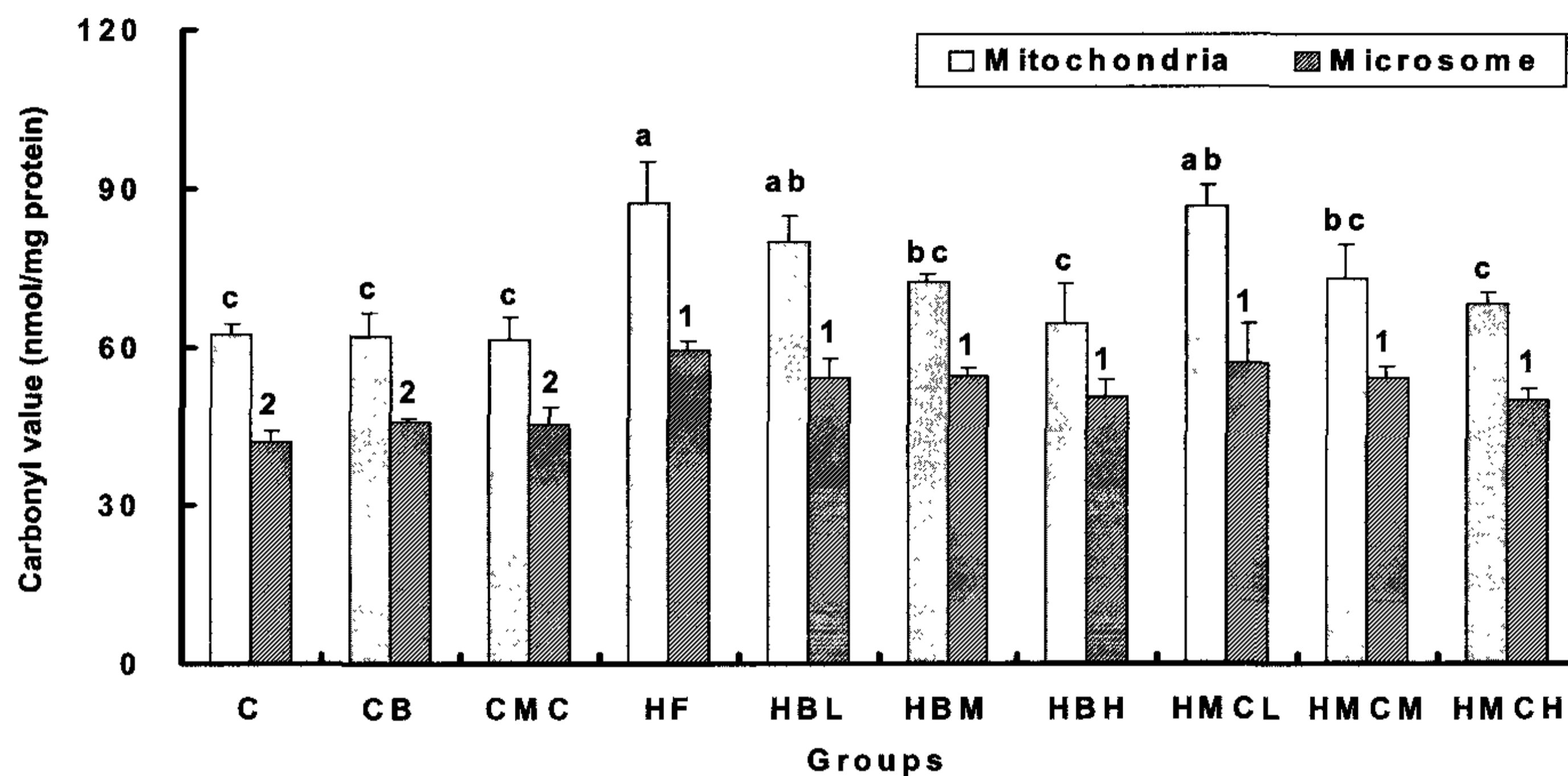


Fig. 9. Effects of *n*-butanol and methylene chloride fractions of *Z. schinifolium* leaves administration on the hepatic mitochondria and microsomal carbonyl values in the high fat diet fed rats.

All values are mean±SE ($n=10$) and those with different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Tukey's test.

나) 항혈전 효능 : 혈장 APTT과 Thrombin times (TT)

혈액응고의 지표 물질인 APTT (A)과 항혈전 지표인 TT (B)를 혈장에서 관찰한 결과는 Fig. 10과 같다. 정상군에 비해 정상군에 생리활성 물질은 투여한 군 (CB군 및 CMC군)들은 유의적인 차이가 없었고, 고지방식이군에서는 응고 시간이 유의적으로 감소되었다. 고지방식이 군들간의 비교에서는 HBM군 및 HMCM군들에서 약간의 증가를 보이는 등 전반적으로 응고 시간의 변화가 잘 나타나지 않았으나 정상군 수준까지 유의적으로 증가하여 산초 잎 methylene chloride 총 0.50 % 및 0.75 % 공급 시 항혈전 효과를 관찰할 수 있었다.

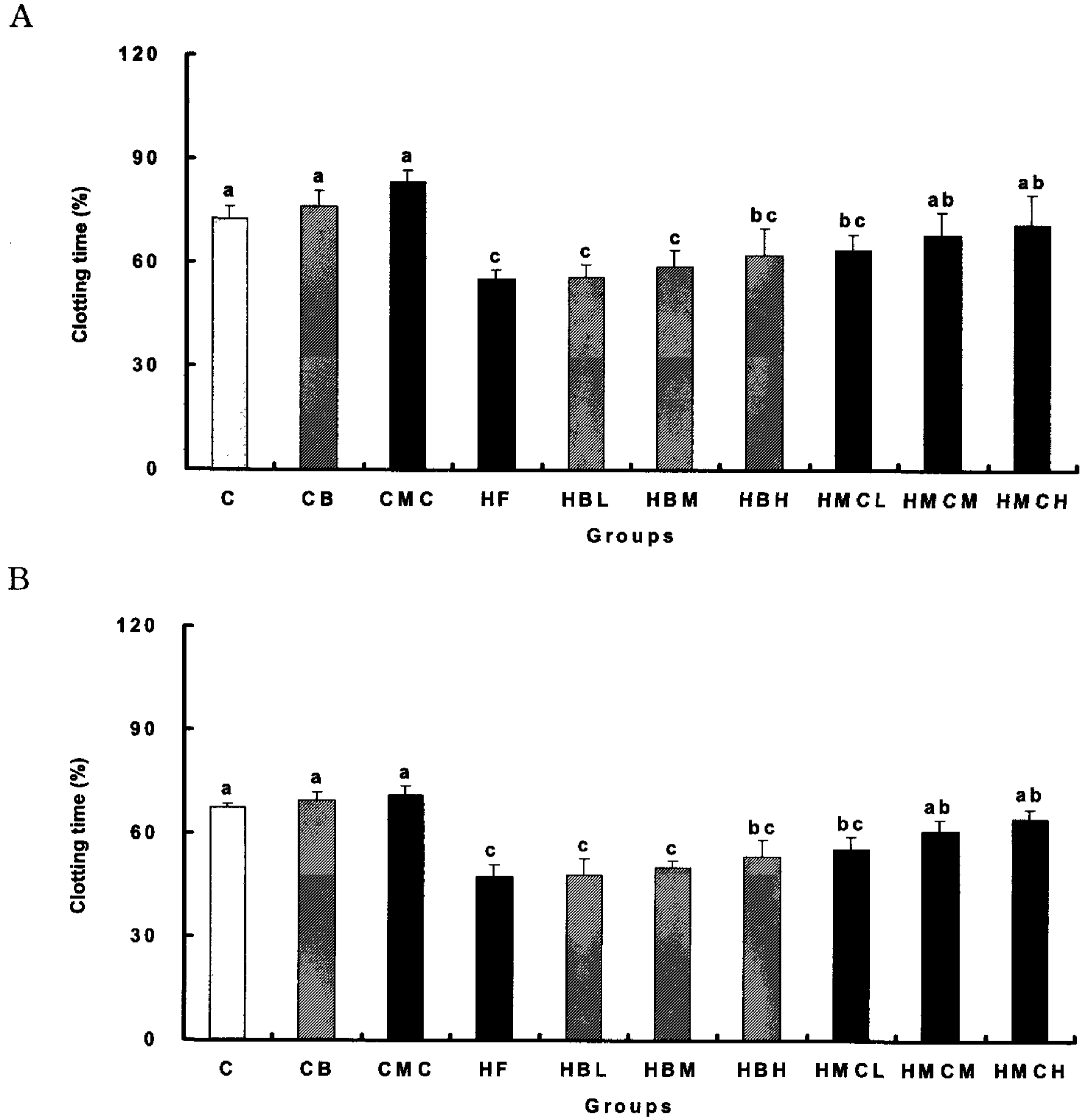


Fig. 10. Effects of *n*-butanol and methylene chloride fractions of *Z. schinifolium* leaves administration on the red blood cell and plasma activated partial thromboplastin times (A) and thrombin times (B) in the high fat diet fed rats. All values are mean±SE ($n=10$). Bars with different letters are significantly different at $p<0.05$ by Tukey's test.

다) 항염증 효능 : 다형핵성 백혈구 5'-lipoxygenase 활성과 leukotriene B4
 체내 염증관련 지표인 백혈구의 5'-lipoxygenase 활성 (A)과 leukotriene B4 (B)를
 측정한 결과는 Fig. 11과 같다. 정상군에 비해 정상군에 생리활성 물질은 투여한 군
 (CB군 및 CMC군)들은 유의적인 차이가 없었고, 고지방식이군에서는 정상군에 비하

여 모두 유의적으로 증가되어 염증에 민감성이 높아짐을 보여 주었다. 이러한 증가는 산초 잎의 *n*-butanol 분획물 투여로 더 잘 회복되어 0.50 % 수준에서 정상수준이 된 반면 methylene chloride 층은 0.75 % 수준에서 회복됨을 보였다.

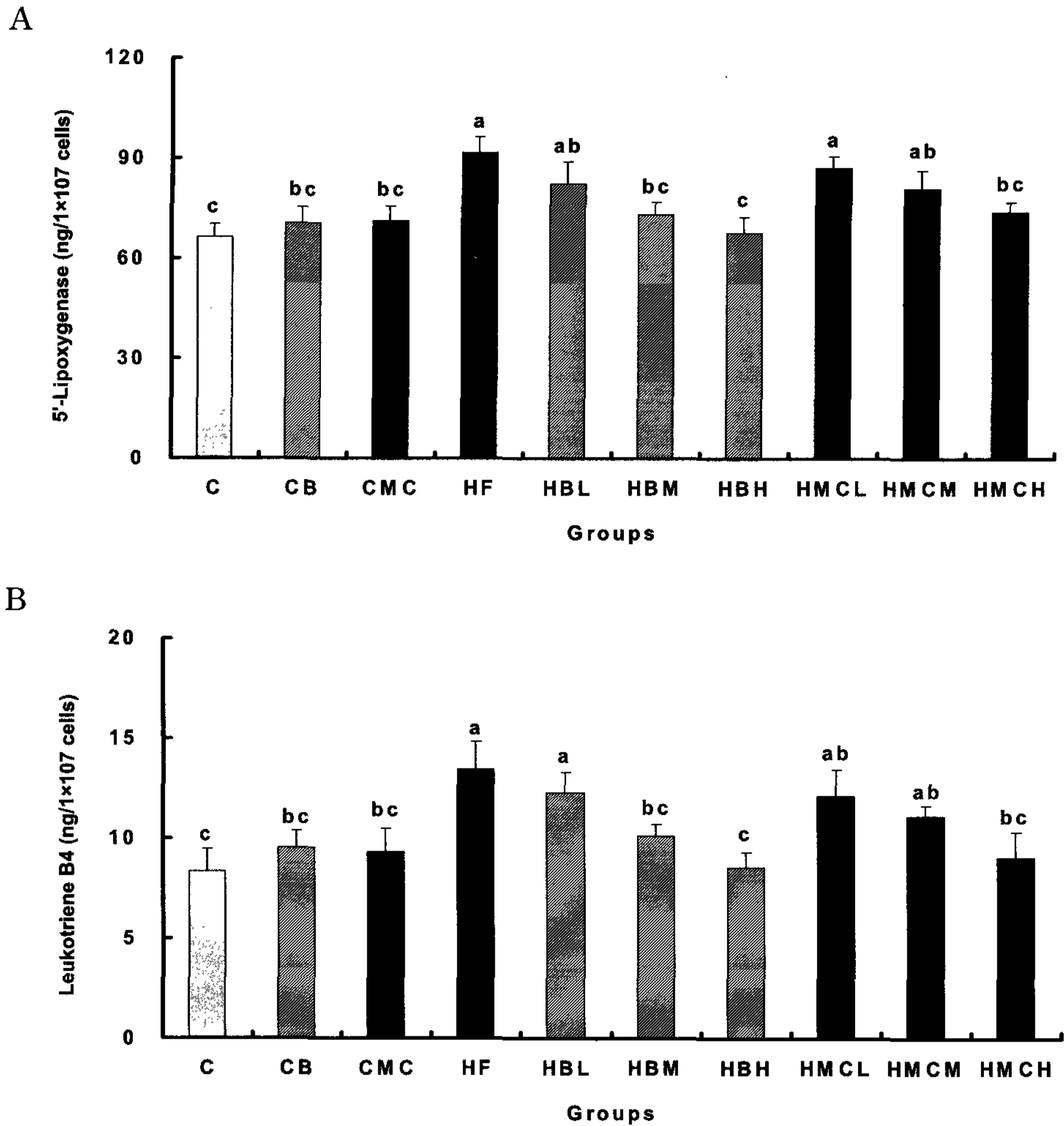


Fig. 11. Effects of *n*-butanol and methylene chloride fractions of *Z. schinifolium* leaves administration on the polynuclear white blood cell 5'-lipoxygenase (A) and leukotriene B4 (B) in the high fat diet fed rats.

All values are mean±SE ($n=10$). Bars with different letters are significantly different at $p<0.05$ by Tukey's test.

라) Oxidative stress 완화 및 free radical scavenging 작용

(1) 간조직 Cytochrome P₄₅₀ 함량 측정

산초 추출물의 oxidative stress 완화 작용을 알아보기 위해 mixed function oxidase (MFO) 계의 가장 주된 역할을 담당하는 cytochrome P₄₅₀ 함량을 관찰한 결과는 Fig. 12와 같다. 정상군에 비해 정상군에 생리활성 물질을 투여한 군인 CB군 및 CMC군은 유의적인 차이가 없었고, 고지방식이군에서는 활성이 유의적으로 증가되었다. 고지방식이 군들 간의 비교에서는 산초 잎 methylene chloride 및 *n*-butanol 추출물의 투여 시 HMCL군을 제외한 모든 군들에서 고지방식이 군에 비해 유의적으로 감소하여 정상군 수준을 나타내었다. 따라서, 산초 잎 methylene chloride 및 *n*-butanol 추출물은 고지방식이 흰쥐 간조직에서 free radical 생성계를 약화시켜 산화적 스트레스로부터 신체를 보호하는 효과가 있다고 사료된다.

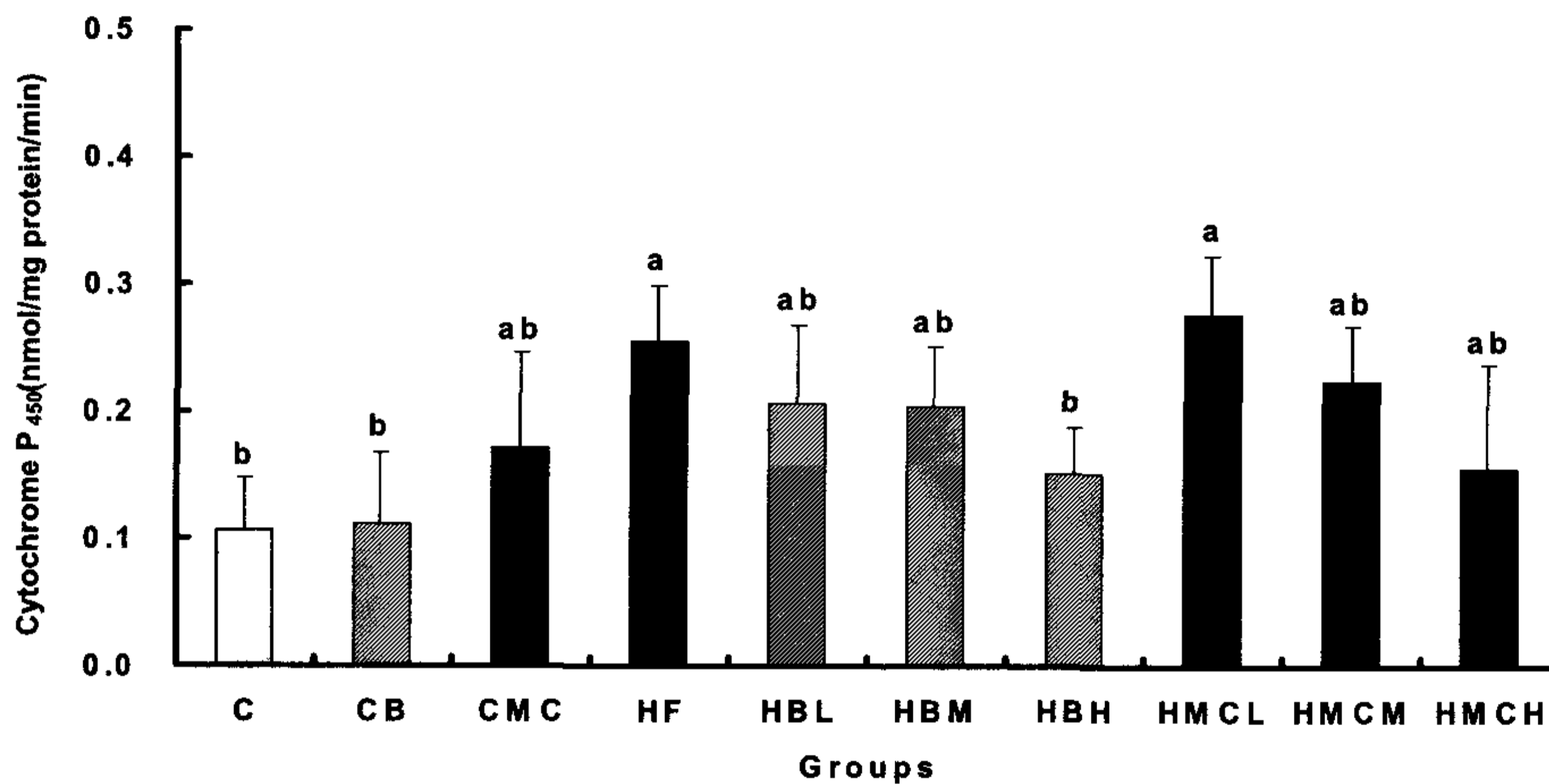


Fig. 12. Effects of *n*-butanol and methylene chloride fractions of *Z. schinifolium* leaves administration on the hepatic cytochrome P₄₅₀ activities in the high fat diet fed rats.

All values are mean±SE (n=10). Bars with different letters are significantly different at p<0.05 by Tukey's test.

(2) 간조직 superoxide radical 함량 측정

노화나 성인병의 원인 물질 중의 하나인 superoxide radical 함량을 관찰한 결과는

Fig. 13과 같다. 정상군에 비해 정상군에 생리활성 물질을 투여한 군인 CB군 및 CMC군은 유의적인 차이가 없었고, 고지방식이군에서는 활성이 유의적으로 증가되었다. 고지방식이 군들간의 비교에서는 산초 잎 methylene chloride 및 *n*-butanol 추출물의 투여시 농도 의존적으로 감소하였으며, 특히 HBH군 및 HMCH군의 경우 정상군 수준을 나타내었다.

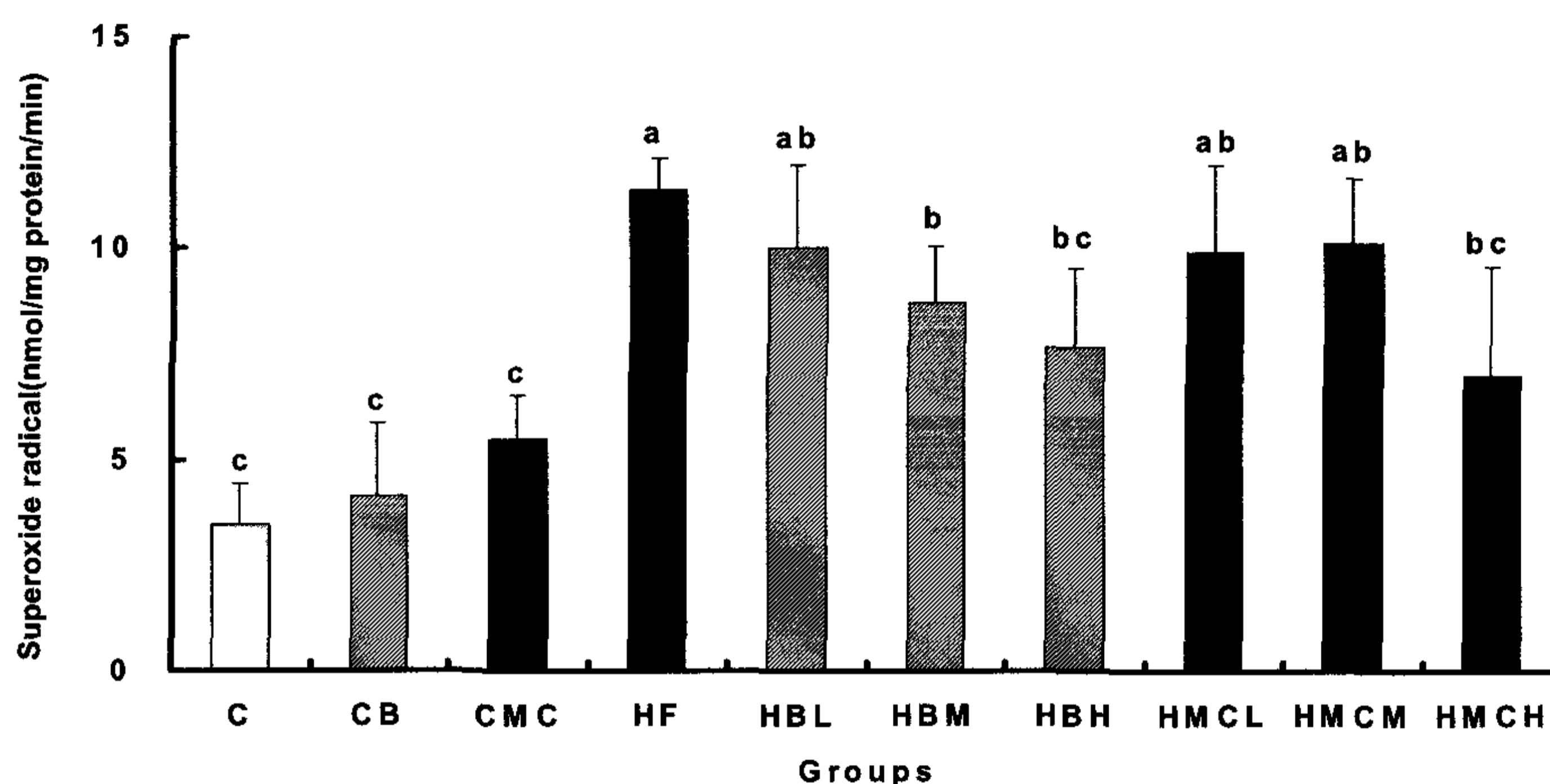


Fig. 13. Effects of *n*-butanol and methylene chloride fractions of *Z. schinifolium* leaves administration on the hepatic superoxide radical contents in the high fat diet fed rats.

All values are mean±SE (*n*=10). Bars with different letters are significantly different at *p*<0.05 by Tukey's test. Experimental conditions are same as Table 1.

(3) 간조직 hydrogen peroxide (H₂O₂) 함량 측정

Hydrogen peroxide (H₂O₂) 함량을 측정한 결과는 Fig. 14와 같다. 정상군에 비해 정상군에 생리활성 물질을 투여한 군인 CB군 및 CMC군은 유의적인 차이가 없었고, 고지방식이군에서는 활성이 유의적으로 증가되었다. 고지방식이 군들간의 비교에서는 산초 잎 methylene chloride 및 *n*-butanol 추출물의 투여시 모든 군들에서 고지방식이군에 비해 감소하여 정상군 수준을 나타내었다.

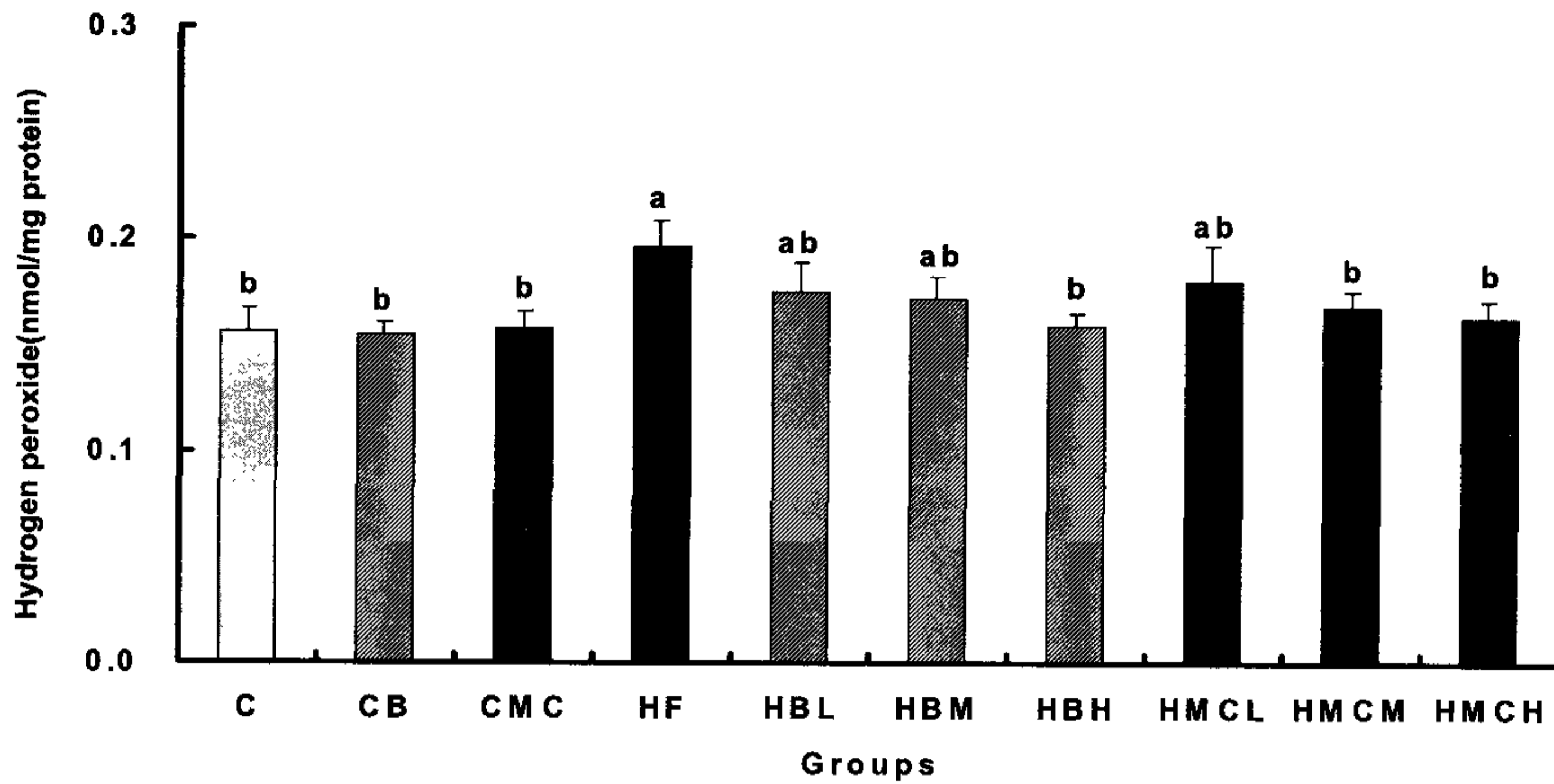


Fig. 14. Effects of *n*-butanol and methylene chloride fractions of *Z. schinifolium* leaves administration on the hepatic hydrogen peroxide (H₂O₂) contents in the high fat diet fed rats.

All values are mean±SE (n=10). Bars with different letters are significantly different at p<0.05 by Tukey's test.

(4) 혈장 Paraoxonase 및 arylesterase 활성 측정

혈장 paraoxonase (PON) 및 arylesterase의 활성을 관찰한 결과는 Table 12과 같다. PON의 활성은 정상군에 비해 정상군에 생리활성 물질을 투여한 군 (CB군 및 CMC군)들은 유의적인 차이가 없었고, 고지방식이군에서는 유의적으로 감소되었다. 고지방식이군에 비해 생리활성 물질의 투여군들에서 다소 증가되었으며, 특히 HBM군, HBH군, HMC M군 및 HMCH군에서 유의적 (p<0.05)으로 활성을 증가하여 정상군 수준을 나타내었다. Arylesterase 활성은 모든 실험군에서 유의적인 차이가 없었다.

Table 12. Effects of *n*-butanol and methylene chloride fractions of *Z. schinifolium* leaves administration on the plasma paraoxonase (PON) and arylesterase activities in the high fat diet fed rats.

Groups	Paraoxonase	Arylesterase
	(umol/min/mg protein)	
C	123.48±12.22 ^{1)a2)}	16.75±3.29 ^{NS3)}
CB	108.08±21.28 ^{ab}	17.30±4.58
CMC	121.86±14.94 ^a	15.72±5.29
HF	64.08±05.48 ^c	11.41±6.74
HBL	73.08±13.10 ^{bc}	10.15±3.74
HBM	92.08±16.48 ^{ab}	11.31±3.45
HBH	105.48±20.28 ^{ab}	9.99±3.87
HMCL	86.08±07.68 ^b	11.31±4.87
HMCM	94.48±19.36 ^{ab}	14.60±5.74
HMCH	99.08±16.20 ^{ab}	15.60±2.61

Experimental conditions are same as Table 1.

¹⁾All values are mean±SE (n=10).

²⁾Values within a column with different superscripts are significantly different at p<0.05 by Tukey's test.

³⁾Not significant difference

마) 지질대사 개선 효과 측정: 2차 동물실험

(1) 혈청 지질 수준

고지방식 대조군 (HC)에 산초 잎의 70 % 에탄올 추출물을 식이의 5 수준으로, 즉 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0 %로 첨가하여 사육한 후의 혈청 총 콜레스테롤, HDL-콜레스테롤과 중성지방(TG)을 측정한 결과는 Table 13와 같다. 산초의 에탄올추출물이 첨가된 군들(HE)의 TG와 총콜레스테롤이 감소되었으며 첨가량이 증가함에 따라 감소폭은 늘어나 대체로 0.5 % 첨가군(HE5)에서부터는 유의적인 감소가 있었다. 반면 HDL-콜레스테롤은 추출물 첨가로 증가되었으며 0.2 % 첨가군(HE2)에서부터 유의적으로 증가되어 동맥경화지수(Atherogenic index)를 산출하였을 때 0.2 % 수준부터 유의적인

감소를 보여 산초 잎 추출물의 혈청지질수준의 개선 효과가 매우 높은 것으로 보인다.

Table 13. Effects of various levels of *Z. schinifolium* leaves ethanol extract in high fat diet on serum lipid concentrations in the second animal feeding study

Groups ¹⁾	Triglycdride	TChol	HDL-Chol	Atherogenic index
	<i>mg/100mL</i>			
HC	64.7±4.5	64.3±2.8	27.2±1.0	1.11±0.16
HE1	56.0±5.3	55.8±4.6	30.8±1.1	0.93±0.18
HE2	59.7±4.6	57.5±5.0	36.2±1.8	0.69±0.17
HE5	52.6±4.1	50.4±3.4	32.7±1.6	0.62±0.15
HE10	49.5±4.2	49.3±4.4	32.5±1.2	0.62±0.14
HE20	48.3±4.2	47.1±3.7	34.1±2.1	0.83±0.13

¹⁾Groups: Control group (HC), high-fat diet without and HE groups with 0.1, 0.2, 0.5,1.0 and 2.0 % with ethanol extract of *Z. schinifolium* leaves.

(2) 혈청과 간조직의 과산화지질 수준

혈청 지질의 과산화정도를 총 지질과산화물과 HDL의 과산화물 함량으로 측정하고 간조직의 과산화물을 측정하여 산초 잎 에탄올 추출물의 영향을 조사하였다. Table 14에 나타난 바와 같이 혈청 총 지질과산화물과 간조직의 지질과산화물은 산초 잎 추출물 섭취로 감소하였고 혈청에서는 추출물 0.5 % 수준에서 간조직에서는 1.05 수준에서 감소가 최대로 되었다. 반면 HDL의 과산화지질은 산초 잎 추출물 섭취군 전체에서 대조군에 비하여 낮은 경향이었으나 유의성은 없었다. 이로 보아 혈청지질 과산화는 HDL 보다 LDL과 VLDL에서 감소가 주요인으로 사료되어 동맥경화 예방에 좋은 신호로 보였다.

Table 14. Effects of various levels of *Z. schinifolium* leaves ethanol extract in high fat diet on serum and liver lipid peroxide concentrations measured as TBARS in the second animal feeding study.

Groups ¹⁾	Serum TBARS		Liver TBARS
	Total	HDL	
	<i>MDA nmol/100mL</i>		<i>MDA nmol/mg protein</i>
HC	13.4±1.0	5.8±1.1	5.47±0.18 ^a
HE1	11.7±0.7	5.4±1.1	5.00±0.21 ^{ab}
HE2	11.6±0.5	5.1±1.2	4.72±0.22 ^b
HE5	9.2±1.0	5.4±1.2	4.44±0.28 ^{bc}
HE10	9.5±0.7	5.2±1.2	4.22±0.18 ^c
HE20	9.5±0.7	5.3±1.1	4.37±0.15 ^{bc}

¹⁾Groups: Control group (HC), high-fat diet without and HE groups with 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 and 2.0% with ethanol extract of *Z. schinifolium* leaves.

바) 산초 잎 추출물의 해독 및 안전성 지표측정

(1) 혈청 GOT와 GPT 활성

산초 잎 추출물 섭취 함량에 따른 간 손상 지표로서 혈청 GOT와 GPT 활성을 조사한 것이 Table 15에 나타나 있다.

Table 15. Effects of various levels of *Z. schinifolium* leaves ethanol extract in high fat diet on serum GOT and GPT levels in the second animal feeding study

Groups ¹⁾	GOT	GPT
	<i>Karmen unit/mL</i>	
HC	17.99±2.92 ^{NS}	16.93±5.11 ^{NS}
HE1	16.81±4.57	17.11±3.41
HE2	16.90±4.24	16.05±4.00
HE5	21.07±4.33	14.32±3.58
HE10	18.56±5.12	15.92±5.30
HE20	20.00±4.38	17.00±4.43

¹⁾Groups: Control group (HC), high-fat diet without and HE groups with 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 and 2.0% with ethanol extract of *Zanthoxylyum schinifolium* leaf.

(2) 간조직 glutathione S-transferase 활성과 글루타치온 함량

독성물질의 대사산물 중에서 친전자성 물질에 환원형 glutathione을 포함시켜 glutathione thioester 형성 반응을 촉매하는 Glutathione S-transferase를 간조직에서 관찰한 결과는 Fig. 15와 같다. 정상식이(C)에 산초 잎의 생리활성 물질을 투여한 군인 CB군 및 CMC군은 유의적인 차이가 없었다. 고지방식이(HF)은 정상군(C)에 비하여 유의적으로 감소하였다. 고지방식이에 생리활성 물질을 투여한 HB군들 및 HMC군들에서는 생리활성 물질의 농도가 증가함에 따라 활성이 증가하였으며, 특히 HBH군, HMCM군 및 HMCH군의 경우 정상군 수준을 나타내었다.

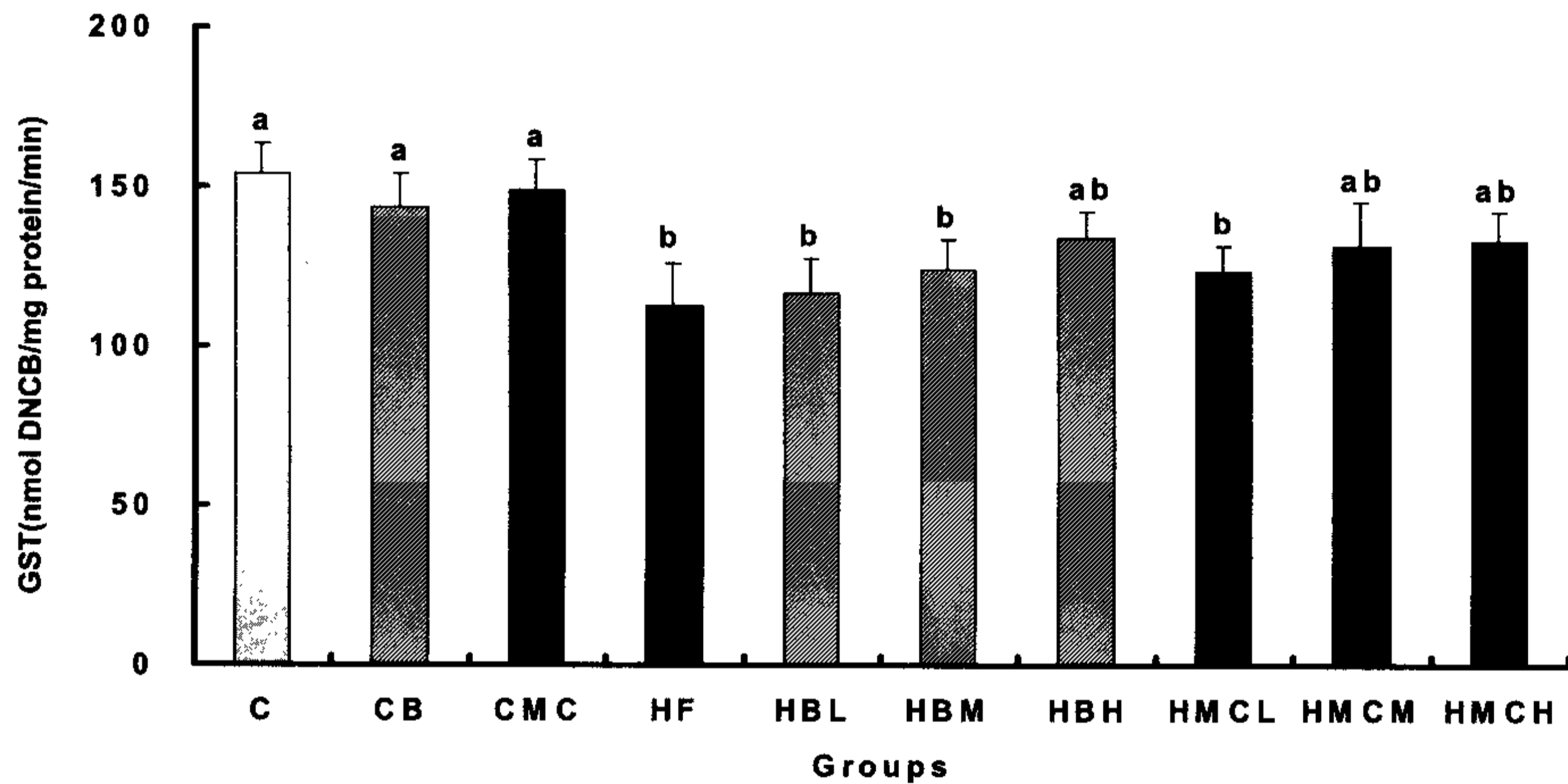


Fig. 15. Effects of *n*-butanol and methylene chloride fractions of *Z. schinifolium* leaves administration on the hepatic glutathione S-transferase activities in the high fat diet fed rats. All values are mean±SE ($n=10$).

Bars with different letters are significantly different at $p<0.05$ by Tukey's test.

Experimental conditions are same as Table 1.

간조직의 glutathione (GSH) 함량 및 GSH의 산화형인 glutathione disulfide (GSSG)의 함량을 측정하고 그 비율을 계산한 결과는 Table 16과 같다. 정상군에 비해 정상군에 생리활성 물질을 투여한 군인 CB군 및 CMC군은 유의적인 차이가 없었고, 고지방식이군에서는 활성이 유의적으로 감소되었다. 고지방식이 군들간의 비교에

서는 산초 잎 methylene chloride 및 n-butanol 추출물의 투여시 농도 의존적으로 증가하는 경향을 나타내었으며, 특히 HBM군, HBH군 및 HMCH군들은 정상군 수준을 나타내었다. 반면 GSSG 함량은 정상식이군에 비하여 고지방식이군에서는 유의적으로 증가되었으나 산초 잎 methylene chloride 및 n-butanol 추출물의 투여시 농도 의존적으로 감소하는 경향을 나타내었다. GSH/GSSG ratio는 정상군에서는 생리활성 물질을 투여로 변화가 없었으나 고지방식이 군들간의 비교에서는 산초 잎 methylene chloride 층 및 n-butanol 추출물의 투여시 농도 의존적으로 증가하였으며, 특히 HBM군, HBH군, HMCM군 및 HMCH군들은 정상군 수준으로 높아지는 것을 관찰할 수 있었다. 따라서 고지방식이에서 산초 잎 추출물의 산화적 손상에 대한 방어 효과를 기대할 수 있었다.

Table 16. Effects of *n*-butanol and methylene chloride fractions of *Z. schinifolium* leaves administration on the hepatic glutathione contents in the high fat diet fed rats.

Groups	GSH	GSSG	GSH/GSSG ratio
	(mol/g wet tissue)		
C	5.11±0.79 ^{1)a2)}	1.64±0.07 ^b	3.11±0.37 ^a
CB	4.94±0.21 ^a	1.66±0.17 ^b	3.01±0.36 ^a
CMC	4.27±0.42 ^a	1.68±0.06 ^b	2.64±0.34 ^a
HF	2.88±0.52 ^b	2.38±0.14 ^a	1.21±0.21 ^c
HBL	3.47±0.18 ^b	2.27±0.04 ^a	1.53±0.08 ^{bc}
HBM	4.01±0.38 ^{ab}	2.02±0.17 ^{ab}	2.00±0.27 ^{ab}
HBH	4.15±0.72 ^{ab}	1.69±0.06 ^b	2.45±0.39 ^{ab}
HMCL	3.28±0.22 ^b	2.16±0.06 ^a	1.52±0.09 ^c
HMCM	3.38±0.13 ^b	1.85±0.15 ^{ab}	1.84±0.18 ^{bc}
HMCH	4.10±0.38 ^{ab}	1.61±0.08 ^b	2.54±0.21 ^a

Experimental conditions are same as Table 1.

¹⁾All values are mean±SE (*n*=10).

²⁾Values within a column with different superscripts are significantly different at *p*<0.05 by Tukey's test.

2. 산초 및 초피 성분의 어류가공품 보존제로서의 활용

가. 연구배경

산초와 초피나무의 여러 부위의 추출물에서 가장 잘 나타난 활성이 항산화능이며 실제로 산초와 초피는 이미 향신료로 사용되고 항균력[27]이 보고되고 있어 식품가공시의 보존제로서 매우 적합하다고 판단되었다. BHT (butylated hydroxytoluene) 및 BHA (butylated hydroxyanisole) 등과 같은 합성 항산화제가 경제성이 뛰어나기 때문에 식품에 널리 사용되어 왔으나 이들의 인체에 대한 독성과 발암성이 보고[28]된 이후로 사용이 점점 기피되고 있는 실정이다. 따라서 천연 항산화제의 활용이 적극 요구되고 있다. 따라서 본 연구에서는 산초와 초피에서 건강 기능성분을 활용하는 방안과 아울러 현실적으로 신속한 활용이 가능한 식품보존제로서의 가능성을 타진해 보고자 하였다. 이에 본 연구에서는 산패되기 쉬운 수산가공품으로 과메기 제조시의 보존제로서의 사용을 조사하였다.

과메기는 콩치의 반건조식품으로 포항을 중심으로 경북일대에서 자연건조시켜 생산해 온 전통 향토식품이다. 등푸른 생선인 콩치는 docosahexaenoic acid와 같은 고도 불포화지방산이 많아 만성질환 예방에 중요한 역할을 할 수 있는 반면 산패하기 쉬워 보관 중의 품질 유지가 문제로 떠오르고 있다. 따라서 본 연구에서는 과메기 제조 중에 산초와 초피 성분의 처리가 과메기 보관 중의 품질 보존에 미치는 영향을 조사함으로써 이들의 성분의 어유 및 육류 가공품에서 품질 보존제로서의 활용가능성을 타진해 보고자 하였다.

나. 연구방법

1) 산초 잎 추출물 및 초피 과피 정유 처리 과메기 제조

과메기 제조용 콩치는 길이가 20 ± 2 cm의 신선한 것을 구입하여, 길이로 2 등분 한 후 깨끗한 바닷물로 1~2 회 세척하고, $-5 \sim 10$ °C에서 3시간 동안 자연 탈수시켰다. 산초 잎 에탄올 추출물은 1 % 에탄올 수용액에 62.5, 125, 250, 500 ppm의 농도로, 초피 과피 정유는 20 % 에탄올에 125, 250, 500, 1000 ppm의 농도로 용해시켜, 콩치 1 kg당 2 mL씩 분사하였다. 시료가 처리된 과메기를 $45 \sim 52$ °C에서 32~36 시간 숙성시키고 $-4 \sim 10$ °C에서 4~6 일 동안 자연 건조시켜 하여 (수분함량이 약 35 %) 진공

포장하였다.

2) 산화억제 효과 측정

제조한 과메기를 4 °C에서 냉장 보관하면서 1, 3, 7 일 경과 시 산가, POV(peroxide value), TBA(thio-barbituric acid)값을 각각 표준법[29]에 의하여 측정하였다.

3) 아민류 생성 및 관능 검사

산화억제 효과 조사할 때와 같은 조건의 과메기 시료에서 TMO 및 DMO를 표준법 [29]에 의하여 측정하였고 관능검사는 어류가공품에서 측정하는 항목인 외관, 맛, 향취, 냄새, 질감과 뒷맛 그리고 종합적인 평가를 7명의 패널리스트를 대상으로 실시하여 조사하였다.

4) 통계처리

모든 실험결과에 대한 통계처리는 각 실험 군별로 표준차이가 있는가를 검증하기 위해 분산분석을 수행하였으며 분산분석 (ANOVA 검증)결과 유의성이 발견된 경우 군간의 유의도는 Tukey's HSD test[25]에 의해 분석하였다.

다. 연구결과

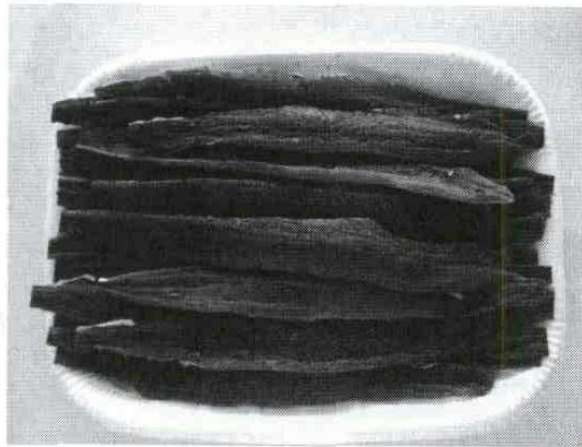
1) 과메기 제조 후 외관 보존

산초 잎 에탄올 추출물과 초피 과피 정유를 과메기 제조 시에 분무하여 품질 보존 효과를 조사하고자 하였다. 산초 잎 추출물을 1 % 에탄올에 용해하여 62.5, 125, 250, 500 mg/L의 네 종류의 농도를 제조하여 각각 과메기 1 kg당 2 mL를 분무하였으므로 과메기 1 kg 당 함유된 산초 잎 추출물의 양은 0.125, 0.25, 0.50, 1.0 ppm에 해당하였다. 초피 과피 정유의 경우는 산초 잎 추출물에 비하여 두 배의 양을 사용하였으므로 과메기 kg당 함량은 0.25, 0.50, 1.0, 2.0 ppm에 해당하였다. 이러한 조건에서 제조된 제품들의 진공 포장된 상태와 개봉한 상태가 Fig. 16에 나타나 있다. 진공포장지가 투명명한 상태가 아니라서 포장상태에서는 내용물의 변화를 볼 수 없었고 개봉하였을 때 도 시험물질을 처리한 제품들은 무처리군이나 서로 외관상의 차이를 볼 수 없었다.

A. 진공 포장 상태

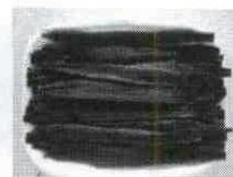
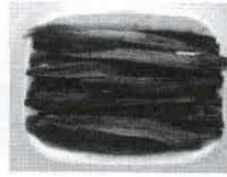
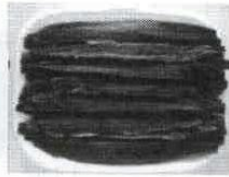
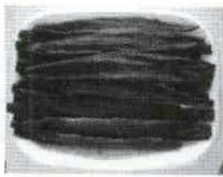


B-1. 개봉된 상태 ; 무처리군



B-2. 개봉된 상태 ; 산초 잎 추출물(ZS)

(1) ZS 0.125 ppm (2) ZS 0.25 ppm (3) ZS 0.5 ppm (4) ZS 1.0 ppm



B-3. 개봉된 상태 ; 초피 과피 정유(ZP)

(1) ZP 0.25 ppm (2) ZP 0.5 ppm (3) ZP 1.0 ppm (4) ZP 2.0 ppm

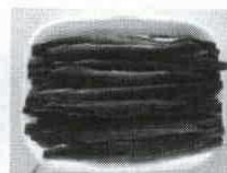
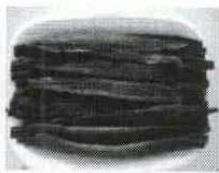


Fig. 16. Appearance of Kwamaegi treated with ethanol extract of *Z. schinifolium* leaves and essential oil of *Z. piperitum* pericarp at the various levels in vacuum packed and open states.

2) 과메기의 산화억제 효과

각각의 처리방법으로 제조한 과메기의 진공포장을 개봉한 후 4 °C에서 냉장 보관 하면서 1, 3, 7 일 경과한 후 산가, 과산화가(POV; peroxide value), TBA(thio-barbituric acid)값을 측정한 결과 Table 17와 18에 나타나 있다. 산초 잎 추출물을 처리한 경우 Table 17에서 보는 바와 같이 농도가 증가함에 따라 산가, POV, TBA값이 유의적으로 감소함을 볼 수 있었으며 대체로 0.25 ppm부터 유의적인 감소가 있었다. 그러나 보관기간이 길어지면 이러한 억제효과는 더 낮은 농도 0.125 ppm에서도 유의적으로 나타났다.

Table 17. Changes in acid values, POV, TBA values of Kwamaegi treated with ethanol extract of *Z. schinifolium* leaves at the various levels during storage at 4 °C.

Extract content (ppm)	Days after opening and storing at 4 °C		
	1 day	3 days	7 days
<i>Acid value</i>	1 g		
0	2.77±0.03 ^a	3.47±0.06 ^a	4.19±0.01 ^a
0E	2.74±0.02 ^a	3.37±0.06 ^a	3.82±0.05 ^b
0.125	2.71±0.06 ^{ab}	3.03±0.06 ^b	3.72±0.03 ^c
0.25	2.47±0.13 ^{bc}	2.95±0.03 ^b	3.61±0.02 ^d
0.50	2.41±0.06 ^c	2.77±0.05 ^c	3.41±0.03 ^e
1.00	2.10±0.02 ^d	2.47±0.05 ^d	3.18±0.03 ^f
<i>POV</i>	meq/Kg		
0	11.65±1.18 ^a	12.32±1.07 ^a	13.16±0.32 ^a
0E	10.24±0.43 ^a	10.36±0.21 ^b	12.12±0.08 ^b
0.125	9.96±1.41 ^a	10.12±0.46 ^b	11.38±0.84 ^{bc}
0.25	9.15±1.63 ^{ab}	9.59±0.52 ^{bc}	10.18±0.41 ^{cd}
0.50	7.06±0.50 ^b	8.77±0.22 ^{cd}	9.16±0.81 ^d
1.00	5.65±0.41 ^c	7.88±0.66 ^d	8.12±1.32 ^d

Extract content (ppm)	Days after opening and storing at 4 °C		
	1 day	3 days	7 days
<i>TBA value</i>	1 g		
0	116.3±19.1 ^a	122.4±7.4 ^a	206.7±14.4 ^a
0E	104.7±5.9 ^a	117.9±7.0 ^b	189.7±17.4 ^{ab}
0.125	99.8±10.9 ^a	112.6±1.4 ^b	175.5±10.5 ^b
0.25	73.6±6.0 ^b	102.8±9.1 ^b	167.6±17.3 ^{bc}
0.50	52.2±5.5 ^c	83.9±5.2 ^c	143.2±4.9 ^c
1.00	39.1±2.8 ^d	66.1±18.0 ^c	100.5±10.0 ^c

All values are mean±SD (n=3).

Values within a column with different superscripts are significantly different at $p < 0.05$ by Tukey's test.

초피 과피 정유를 처리한 경우도 산초 잎 추출물과 같이 함량이 증가함에 따라 산가, POV, TBA값이 감소함을 볼 수 있었으며 산초 잎보다는 조금 높은 0.50 ppm부터 모든 산패 지표의 감소가 확실하였다 (Table 18). 보관기간이 길어지면 억제효과가 더 낮은 농도 0.25 ppm에서도 유의적으로 나타난 것은 산초의 경우와 유사하여 산초와 초피 모두 항산화작용이 지속적임을 알 수 있었다.

Table 18. Changes in acid values, POV, TBA values of Kwamaegi treated with and essential oil of *Z. piperitum* pericarp at the various levels during storage at 4 °C.

Content (ppm)	Days after opening and storing at 4 °C		
	1 day	3 days	7 days
<i>Acid value</i>	1 g		
0	3.17±0.07 ^a	3.27±0.04 ^a	3.68±0.03 ^a
0E	3.12±0.05 ^{ab}	3.24±0.05 ^a	3.64±0.03 ^{ab}
0.25	3.03±0.02 ^b	3.06±0.06 ^b	3.58±0.04 ^{bc}
0.50	2.85±0.01 ^c	2.93±0.01 ^c	3.52±0.01 ^c
1.00	2.68±0.02 ^d	2.78±0.03 ^d	3.37±0.01 ^d
2.00	2.57±0.03 ^d	2.77±0.03 ^d	3.22±0.01 ^e

Content (ppm)	Days after opening and storing at 4 °C		
	1 day	3 days	7 days
<i>POV</i>	meq/Kg		
0	11.67±1.01 ^a	13.289±1.506 ^a	16.100±1.623 ^a
0E	11.59±1.14 ^{ab}	11.740±2.231 ^{ab}	13.352±2.880 ^{ab}
0.25	9.82±0.41 ^{ab}	11.749±0.912 ^{ab}	12.238±0.438 ^b
0.50	8.91±1.10 ^{bc}	10.147±0.140 ^{bc}	11.975±0.740 ^b
1.00	8.66±0.39 ^c	8.791±0.946 ^{cd}	8.818±0.589 ^c
2.00	7.47±0.30 ^d	8.067±0.721 ^d	8.193±0.778 ^c
<i>TBA value</i>	1 g		
0	93.4±11.2 ^a	117.1±4.9 ^a	118.3±10.2 ^a
0E	85.31±5.2 ^a	86.2±4.0 ^b	101.5±3.4 ^{ab}
0.25	76.0±3.2 ^a	84.3±3.1 ^b	94.9±3.7 ^b
0.50	74.4±4.1 ^a	76.9±4.2 ^b	88.0±8.3 ^{bc}
1.00	59.1±2.5 ^b	59.9±0.06 ^c	69.1±10.5 ^c
2.00	58.3±6.3 ^b	60.9±3.0 ^c	75.4±6.3 ^c

All values are mean±SD (n=3).

Values within a column with different superscripts are significantly different at $p < 0.05$ by Tukey's test.

3) 과메기의 아민 생성 및 관능검사

생선의 보관 중에 생성되는 dimethylamine (DMA)와 trimethylamine (TMO) 등의 아민들은 부패에 따른 악취성분으로 알려져 있어 부패도를 평가하는 기준으로 사용된다. 반면 이들 생성전물질인 trimethylamine oxide (TMAO)는 부패에 따라 감소한다. 산초와 초피성분으로 처리한 과메기의 진공포장을 개봉한 후 4 °C에서 냉장 보관하면서 1, 3, 7 일 경과한 후 DMA, TMA 및 TMAO를 측정된 결과 Table 19와 20에 나타나 있다. 산초 및 초피성분을 처리한 경우 Table 19에서 보는 바와 같이 개봉 1일 후부터 0.25 ppm 만 함유되어도 DMA의 생성이 적었고 TMA 생성에 대한 효과는 3일 이후부터 나타났고 반면 TMAO값은 높게 유지되었다.

Table 19. Changes in dimethylamine (DMA), trimethylamine (TMA) and trimethylamine oxide (TMAO) contents of Kwamaegi treated with ethanol extract of *Z. schinifolium* leaves at the various levels during storage at 4 °C.

Extract content (ppm)	Days after opening and storing at 4 °C		
	1 day	3 days	7 days
<i>DMA</i>	mg/100g		
0	2.05±0.38 ^a	4.12±0.19 ^a	5.32±0.38 ^a
0E	1.66±0.20 ^a	3.56±0.12 ^b	4.70±0.15 ^{ab}
0.125	1.40±0.04 ^a	3.43±0.45 ^{bc}	4.52±0.21 ^{ab}
0.25	1.25±0.02 ^b	2.67±0.25 ^{cd}	4.58±0.21 ^a
0.50	1.17±0.07 ^{bc}	2.40±0.18 ^d	3.88±0.22 ^c
1.00	1.13±0.05 ^c	2.12±0.35 ^d	3.65±0.25 ^c
<i>TMA</i>			
0	2.88±0.82 ^{NS}	5.69±0.12 ^a	6.13±0.18 ^a
0E	2.43±0.52	5.22±0.53 ^b	6.13±0.25 ^a
0.125	2.64±0.81	5.22±0.05 ^b	5.58±0.55 ^{ab}
0.25	2.40±1.00	4.22±0.28 ^{cd}	5.08±0.28 ^{bc}
0.50	2.02±0.29	3.77±0.12 ^d	4.70±0.30 ^{bc}
1.00	2.16±0.36	3.53±0.56 ^d	4.52±0.21 ^c
<i>TMAO</i>			
0	16.96±0.95 ^{NS}	11.82±0.50 ^a	4.92±0.47 ^a
0E	17.15±1.03	12.36±1.05 ^a	6.25±0.60 ^b
0.125	16.90±0.88	13.47±1.44 ^{ab}	6.54±0.60 ^b
0.25	17.64±0.87	15.02±0.28 ^b	7.60±0.35 ^c
0.50	17.73±0.99	15.30±1.06 ^b	8.70±0.41 ^d
1.00	17.71±0.63	15.43±0.78 ^b	9.03±0.21 ^d

All values are mean±SD (n=3).

Values within a column with different superscripts are significantly different at $p < 0.05$ by Tukey's test.

초피 과피 처리 경우 (Table 20)에서도 산초 잎 처리와 같은 경향임을 보여주고 있어 두 물질이 모두 과메기 품질 보호에 매우 큰 효과가 있음을 알 수 있었다.

Table 20. Changes in dimethylamine (DMA), trimethylamine (TMA) and trimethylamine oxide (TMAO) contents of Kwamaegi treated with essential oil of *Z. piperitum* pericarp at the various levels during storage at 4 °C.

Extract content (ppm)	Days after opening and storing at 4 °C (mg/100g)		
	1 day	3 days	7 days
<i>DMA</i>			
0	2.05±0.38 ^a	4.12±0.19 ^a	5.32±0.38 ^a
0E	1.42±0.03 ^a	3.34±0.15 ^b	4.16±0.20 ^b
0.25	1.23±0.03 ^b	3.27±0.12 ^b	3.67±0.22 ^{bc}
0.50	1.20±0.02 ^b	3.14±0.25 ^{bc}	3.68±0.11 ^c
1.00	1.16±0.06 ^{bc}	2.52±0.37 ^{cd}	3.07±0.22 ^d
2.00	1.09±0.05 ^c	1.77±0.24 ^d	3.02±0.29 ^d
<i>TMA</i>			
0	2.87±0.82 ^{NS}	5.69±0.12 ^a	6.13±0.18 ^a
0E	2.90±1.03	5.09±0.21 ^b	5.97±0.16 ^a
0.25	2.59±0.69	5.53±0.25 ^{ab}	5.65±0.42 ^{ab}
0.50	2.46±0.64	4.64±0.72 ^{bc}	4.96±0.11 ^b
1.00	2.52±0.62	4.06±0.48 ^c	4.05±0.22 ^{bc}
2.00	2.16±0.76	3.45±0.67 ^c	4.57±0.17 ^c
<i>TMAO</i>			
0	16.96±0.95 ^{NS}	11.82±0.50 ^a	4.92±0.47 ^a
0E	16.67±1.48	12.43±0.43 ^{ab}	6.25±0.60 ^b
0.25	16.05±0.81	12.77±0.09 ^b	7.14±0.20 ^c
0.50	17.71±0.76	14.31±0.56 ^c	9.15±0.26 ^d
1.00	16.87±0.47	15.12±0.84 ^c	8.87±0.15 ^d
2.00	16.80±1.51	15.36±0.59 ^c	9.13±0.35 ^d

All values are mean±SD (n=3).

Values within a column with different superscripts are significantly different at $p < 0.05$ by Tukey's test.

어류에 대한 관능검사 기본항목에 따라 실시한 관능검사 결과는 Table 21과 같다. 서로 간에 통계적인 유의성은 없었으나 종합적인 평가를 보면 산초나 초피 처리군에서 무처리군(0)에 비하여 점수가 전반적으로 높은 경향이었으며 산초 처리군에서는

좀 더 낮은 농도 0.125~0.25 ppm에서 초피 처리군에서도 처리한 시료 중에서는 0.5 0~1.00 ppm에서 가장 좋고 2 ppm에서도 거부감 없이 무처리군에 비하여 전반적으로 좋은 평가를 받았다.

Table 21. Sensory evaluation scores of Kwamaegi treated with ethanol extract of *Z. schinifolium* leaves and essential oil of *Z. piperitum* pericarp at the various levels.

Characteristics	<i>Z. schinifolium</i> extract				
	0	0.125ppm	0.25 ppm	0.50 ppm	1.00 ppm
Appearance	3.29	3.14	3.00	3.29	3.43
Taste	3.43	3.86	3.71	3.86	3.29
Flavor	2.86	3.43	3.29	3.29	3.29
Odor	2.86	3.29	3.29	3.14	3.29
Texture	3.71	3.57	3.86	3.71	3.43
Aftertaste	3.29	3.71	3.29	3.43	3.14
Overall	3.17	3.57	3.71	3.71	3.29

	<i>Z. piperitum</i> essential oil			
	0.25ppm	0.50 ppm	1.00 ppm	2.00 ppm
Appearance	3.43	3.43	3.50	3.71
Taste	4.00	4.29	4.39	3.86
Flavor	3.29	3.57	3.67	3.57
Odor	3.33	3.86	3.67	3.71
Texture	3.86	4.43	4.50	4.00
Aftertaste	3.57	4.14	4.00	3.86
Overall	3.57	4.00	4.17	3.86

All values are mean of seven panels' evaluations.

3. 산초추출물의 안전 유효 허용량의 산정

가. 동물실험 결과에서 산정

1차 동물실험에서 사용한 산초 잎 추출물의 methylene chloride (MC), *n*-butanol (Bu) 분획 농축물 및 2차 동물실험에서 사용한 에탄올 추출물량과 동물들의 1일 식이

섭취량으로부터 산정한 산초 기능성물질의 섭취량 (mg/250g rat/day)은 Table 22에 나타난 바와 같다. 1차 동물실험에서 동물에서 투여한 세 수준 (L, M, H)의 MC 또는 Bu양으로부터 산정한 쥐 한 마리의 MC 또는 Bu양은 각각 50, 100, 150 mg이었다. 2차 실험에서는 에탄올 추출물을 섭취하게 하여 섭취한 추출물의 양은 6 수준으로 쥐 한 마리당 1일 10에서 400 mg이었다. 이 에탄올 추출물에 함유된 MC와 Bu 성분을 추출과정의 효율을 감안하여 산정한 결과가 괄호 안에 있는 숫자로서 에탄올 추출물에는 두 분획성분 합하여 45 %에 해당함을 알 수 있었다. 1차 실험에서는 MC와 Bu가 단독으로 투여되었으나 2차 실험에서는 두 분획이 추출물 내에 같이 들어 있으므로 에탄올 추출물 100 mg 섭취군(2차 실험의 E5군)은 1차 실험의 물질을 총 45 mg 섭취한 것이 되므로 L군에 해당하며 같은 이유로 2차 실험의 E10군(총 90 mg 섭취) 1차 실험에 M군에 해당한다.

Table 22. Estimated intakes of functional materials extracted from *Z. schinifolium* leaves by rat in the animal feeding studies and extrapolation to human on the basis of energy consumption

Functional material	Estimated intakes (mg) by 250g rat/day					
<i>1st study</i>	L ¹⁾		M ¹⁾		H ¹⁾	
MC or Bu	50		100		150	
<i>2nd study</i>	E1	E2	E5	E10	E20	
EtOH ext	20	40	100	200	400	
(MC) ²⁾	(4)	(8)	(20)	(40)	(80)	
(Bu) ²⁾	(5)	(10)	(25)	(50)	(100)	
<i>Extrapolation to Human from 2nd study</i>	Estimated intakes (mg) by human consuming 2000 Kcal ³⁾					
EtOH ext	438	875	2187	4375	8749	
(MC)	(87)	(175)	(437)	(875)	(1750)	
(Bu) ²⁾	(109)	(219)	(547)	(1094)	(2187)	

¹⁾ L, M, H are the levels in Table 2 in the first animal study

²⁾ Calculated values of each material in the EtOH extract on the basis of the extraction and fractionation yield

³⁾ Calculated on the basis of 91.44 kcal consumption by a 250 g rat per a day

1차 동물실험에서 생리활성효과가 M군에서부터 주로 보이기 시작했으며 2차 실험에서는 E5 수준부터 유의적인 효과를 보였는데 이는 단독투여에 비하여 두 물질의 복합투여에 의한 상승효과가 있었을 것으로 추측되나 기타 함유된 물질들의 작용도 생각할 수 있다. 그럼에도 GOT, GPT 등의 결과에서는 E20 수준까지 독성을 보이지 않아 동물에서의 유효적정량은 에탄올 추출물로 250 g 흰쥐 당 100 mg 수준이 적정하다고 판단된다. 이를 사람에게 적용할 경우 에너지 섭취량을 기초로 하였다. 작은 동물들은 체중에 비하여 에너지 섭취량이 높으므로 사람에게 적용할 때 체중에 비례하여 산정하기보다 에너지 섭취를 기준으로 산정하는 것이 보편적이다. 흰쥐의 1일 에너지 섭취는 1일 먹이섭취량에서 산정한 결과 91.44 kcal였으며 사람에게 적용 시 성인 섭취량 2000 kcal 기준으로 하여 사람에게 안전한 유효량은 2187 mg, 즉 2 g 정도로 산정되었다.

나. 과메기 제품에 함유된 유효물질의 안전도

과메기의 보존을 위하여 처리한 산초 잎이나 초피 과피 정유 성분은 0.25~1.00 ppm에 보존효과와 관능성도 좋았다. 과메기 1회 섭취량을 100 g이라고 할 때 산초 잎 및 초피 과피 정유 성분은 0.025~0.1 mg을 섭취하게 되는 것이므로 본 실험에서 활성을 측정하기 위하여 사용한 양에 비하여 매우 적으므로 생리활성 효과를 기대하기는 어렵다. 그러나 본 실험에서 조사된 독성검사에서 최대 8749 mg까지 독성을 발견하지 못하였으므로 과메기에 함유된 산초 및 초피성분은 양적으로 안전성은 확실히 보장되는 양이라 할 수 있다.

제 2절. 산초나무와 초피나무로부터 생리활성 물질의 분리 및 구조 결정 (제 2 세부과제)

1. 연구배경

산초나무(*Zanthoxylum schinifolium* S. et Z.)는 운향과(芸香科 Rutaceae)에 속하는 높이 3 m 정도의 낙엽관목으로서 줄기와 가지에는 가시가 서로 어긋난다. 잎은 어긋

나고 자루가 있는 길이 8~20 cm의 홀수 우상복엽이며, 13~23개의 소엽은 넓은 피침형 또는 난형이고 길이는 1.5~5 cm이며, 폭은 6~15 cm로서 끝이 뾰족하고 가장자리에 잔 톱니가 있다. 꽃은 8~9월에 피고 연한 녹색으로 지름 3 mm 정도이며 다수가 가지 끝에 산방화서를 이룬다. 작은 꽃자루에 마디가 있고, 꽃받침조각과 꽃잎은 각각 5 개이고 수꽃에 5 개의 수술이 있으며, 암꽃에 암술머리가 3 개인 1개의 암술이 있다. 열매는 길이 4 mm의 삭과로서 3 개로 갈라지며 흑색 종자가 있다[30].

봄에 새 잎을 국에 넣어 먹기도 하며, 씨를 뺀 민물고기국의 향미료로 쓴다. 특히 추어탕에 넣어 먹으며, 열매는 초피나무의 열매와 같이 약으로 쓰기도 한다. 초피나무 열매를 산초라고 하며, 산초나무 열매는 분디 또는 분지라고 한다. 잎의 독특한 향기와, 가을에 까맣게 익는 열매를 보기 위해 정원이나 공원에 심기도 한다. 이 나무는 반 그늘진 곳에서 잘 자라고 추위에도 잘 견디나 뿌리는 깊게 내리지 않는다. 산초나무와 비슷한 초피나무는 가지에 달리는 가시가 마주나고, 잎 가장자리의 톱니수가 3~5 개 정도로 적고 꽃잎이 없으며, 또한 열매가 붉은빛이 도는 갈색으로 익는 점에서 산초나무와 다르다. 초피나무 열매를 산초라고 알려져 있어 초피나무를 산초나무로 혼동하는 경우도 있다.

열매는 익기 전에 따서 식용으로 하고, 다 익은 종자에서 기름을 짠다. 한방에서는 열매껍질을 야초(野椒)라는 약재로 쓰는데, 복부냉증을 제거하고 구토와 설사를 그치게 하며, 회충·간디스토마·치통·지루성피부염에 효과가 있다. 한국·일본·중국 등지에 분포한다. 가시가 없는 것을 민산초(var. *inermis*), 가시의 길이가 짧고 잎이 달걀 모양 또는 달걀 모양의 타원형인 것을 전주산초(var. *subinermis*), 잎이 좁고 작은 것을 좁산초(var. *microphyllum*)라고 한다[31].

산초나무(*Zanthoxylum schinifolium*)에 관한 성분연구로는 alkaloids, furans, benzenoids, chlorophylls, triterpenoids, diterpenoids, sesquiterpenoids, steroids[32] flavonoids[33], coumarins[34], limonene, geranyl acetate, β -phellandrene, phellandral, myrcene, linalool, carproic acid, carprylic acid[35], terpenyl coumarins, anisocoumarin H, scopoletin, lignans[36], aurapten, collinin, epoxyaurapten, hydrangetin, umbelliferone, acetoxycolinin, norchelerythrine, dictamnine, skimmianine, β -amiryrin, friedelin[37], bergapten, umbelliferone, schinifoline[38] 등이 보고되었다.

산초나무(*Zanthoxylum schinifolium*)의 활성에 관한 연구로는 향당뇨[39],

monoamine oxidase (MAO) 억제활성[40], 지질과산화 억제활성[37], 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl (DPPH) radical 소거 활성[41], 살충활성[42], 아질산염소거활성[43], inhibit hepatitis B virus (HBV) DNA replication 저해활성[35, 44], 항혈전[45] 등의 활성이 보고되어 있다.

최근 급격한 경제성장, 생활의 서구화 및 노인인구의 증가로 암, 동맥경화, 고혈압, 심장질환, 뇌질환 및 당뇨 등 각종 성인병이 크게 증가하고 있다. 이러한 만성적인 퇴행성 질병을 치료하기 위하여 합성의약품이 많이 사용되고 있으나 독성 안정성이 문제시되므로 각 질병의 예방 및 치료목적에 부합할 수 있도록 안전성이 검증된 고품질의 의약품 개발이 필요하다. 산초나무는 항혈전, 항산화 등의 활성이 연구 보고되어 있으며, 한방약재로도 쓰이며 각종 음식의 향신료로 사용된다. 산초의 이러한 특성에 기초하여 아직 개발되지 않은 신기능성 물질을 발굴하여 과학적인 효능규명을 위하여 더욱 세부적인 연구가 필요하다.

2. 재료 및 방법

가. 재료

산초나무와 초피나무의 뿌리와 줄기는 2003년 5~6월 경상북도 팔공산에서 채취하여 세절 건조 후 시료로 사용하였으며, 산초나무와 초피나무의 잎과 열매는 2004년 7월 경북 경산시 용성면 동아임장에서 구입하여, 잎은 동결 건조 후 가루로 하여, 그리고 열매는 자연 건조 후 과피와 종자로 분리하여 가루로 하여 시료로 사용하였다.

나. 기기

Melting point는 Yanaco micro melting point apparatus를 사용하여 측정하였으며 온도 보정은 하지 않았다. 선광도 측정은 JASCO DIP-370 digital polarimeter를 사용하였고, IR은 FT-IR JASCO-300E를 사용하여 KBr disk법으로 측정하였다. NMR은 Bruker 250 MHz (DMX 250) spectrometer로 측정하였으며, 내부표준물질로는 TMS (tetramethylsilane)를 사용하였다. Mass는 Quattro II spectrometer로 측정하였고 UV는 UV-160A spectrometer로 측정하였다.

다. 시약

실험에 사용한 column chromatography용 silica gel은 Kieselgel 60 (Merck Art. 7734, 9385, 7729)을, column chromatography용 RP C18은 LiChroprep RP-18 (Merck의 Art. 13900)을 사용하였다. TLC, HPTLC, PTLC (preparative thin layer chromatography) plate는 각각 Merck의 precoated Kieselgel 60 F₂₅₄ (No. 5715, 5628, 13895)를 사용하였고 RP TLC plate는 Merck의 RP-18 F_{254s} (No. 15685)를 사용하였다. Sephadex는 LH-20 (No. 17-0090-01)을 사용하였고, 용매는 특급 및 1급 시약을 사용하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 산초시료의 부위별 추출 및 분획과정

1) 산초 뿌리

산초 뿌리의 계통분획과정은 Scheme 1에 나타낸 바와 같이 산초 뿌리 3 kg을 80 °C에서 100 % methanol (18 L × 3회, 1회에 10 시간씩 추출)로 추출하여 그 추출액을 rotary vacuum evaporator로 농축하여 메탄올 농축액(SR-1) 243.7 g을 얻었다. 활성측정용으로 메탄올 농축액 14.6 g을 남기고 나머지 229.1 g을 물 1000 mL에 녹여서 (전부 녹지 않아도 녹지 않는 부분을 작은 덩어리로 만들고 계속 분획하였다) methylene chloride (600 mL × 3 회)로 추출한 후 methylene chloride 층을 농축하여 methylene chloride 분획(SR-2) 56.5 g을 얻었다. 수층은 ethyl acetate (600 mL × 3 회)로 추출하고 추출액을 농축하여 ethyl acetate 분획(SR-3) 3.0 g을 얻었다. 이어서 수층을 *n*-butanol (600 mL × 8 회)로 추출하여, *n*-butanol 층을 농축하여 *n*-butanol 분획(SR-4) 53.6 g을 얻었으며, 나머지 수층에는 침전이 있었으므로 침전을 여과하여 자연 건조시켜 수층 침전(SR-6) 2.3 g을 얻었으며, 수층은 농축하여 수층분획(SR-5) 59.0 g을 얻었다.

2) 산초 줄기

산초 줄기의 계통분획과정은 Scheme 2에 나타낸 바와 같이 산초 줄기 3 kg을 80

℃에서 100 % methanol (18 L × 3 회, 1 회에 10 시간씩 추출)로 추출하여 그 추출액을 rotary vacuum evaporator로 농축하여 메탄올 농축액(SS-7) 199.2 g을 얻었다. 활성측정용으로 메탄올 농축액 16.7 g을 남기고 나머지 182.5 g을 물 1000 mL에 녹여서(전부 녹지 않아도 녹지 않는 부분을 작은 덩어리로 만들고 계속 분획하였다) methylene chloride (600 mL × 3 회)로 추출한 후, methylene chloride 층을 농축하여 methylene chloride 분획(SS-8) 53.7 g을 얻었다. 이어서 수층을 ethyl acetate (600 mL × 3 회)로 추출하고 추출액을 농축하여 ethyl acetate 분획(SS-9) 10.6 g을 얻었다. 수층을 다시 *n*-butanol (600 mL × 8 회)로 추출하여 *n*-butanol 층을 농축하여 *n*-butanol 분획(SS-10) 29.6 g을 얻었다. 수층에는 침전이 있었으므로 침전을 여과하여 자연 건조시켜 수층 침전(SS-12) 2.3 g을 얻었으며, 수층은 농축하여 수층분획(SS-11) 59.0 g을 얻었다.

3) 산초 잎

산초 잎의 계통분획과정은 Scheme 3에 나타낸 바와 같이 산초 잎 3 kg을 상온에서 80 % methanol (15 L × 3 회, 1 회에 72 시간씩 추출)로 추출하여 그 추출액을 rotary vacuum evaporator로 농축하여 메탄올 농축액(SL-13) 648.6 g을 얻었다. 활성측정용으로 51.1 g을 남기고 나머지 농축액 중에서 199.2 g을 취하여 물 1000 mL에 녹여서(전부 녹지 않아도 녹지 않는 부분을 작은 덩어리로 만들고 계속 분획하였다) methylene chloride (600 mL × 3 회)로 추출하여, methylene chloride 층을 농축하여 methylene chloride 분획(SL-14) 21.7 g을 얻었다. 이어서 수층을 ethyl acetate (600 mL × 5 회)로 추출하고 추출액을 농축하여 ethyl acetate 분획(SL-15) 2.3 g을 얻었다. 수층은 *n*-butanol (600 mL × 7 회)로 추출하여 *n*-butanol 층을 농축하여 *n*-butanol 분획(SL-16) 37.6 g을 얻었다. 나머지 수층에는 침전이 있었으므로 침전을 여과하여 자연 건조시켜 수층 침전(SL-18) 0.8 g을 얻었고 수층은 농축하여 수층분획(SL-17) 143.0 g을 얻었다.

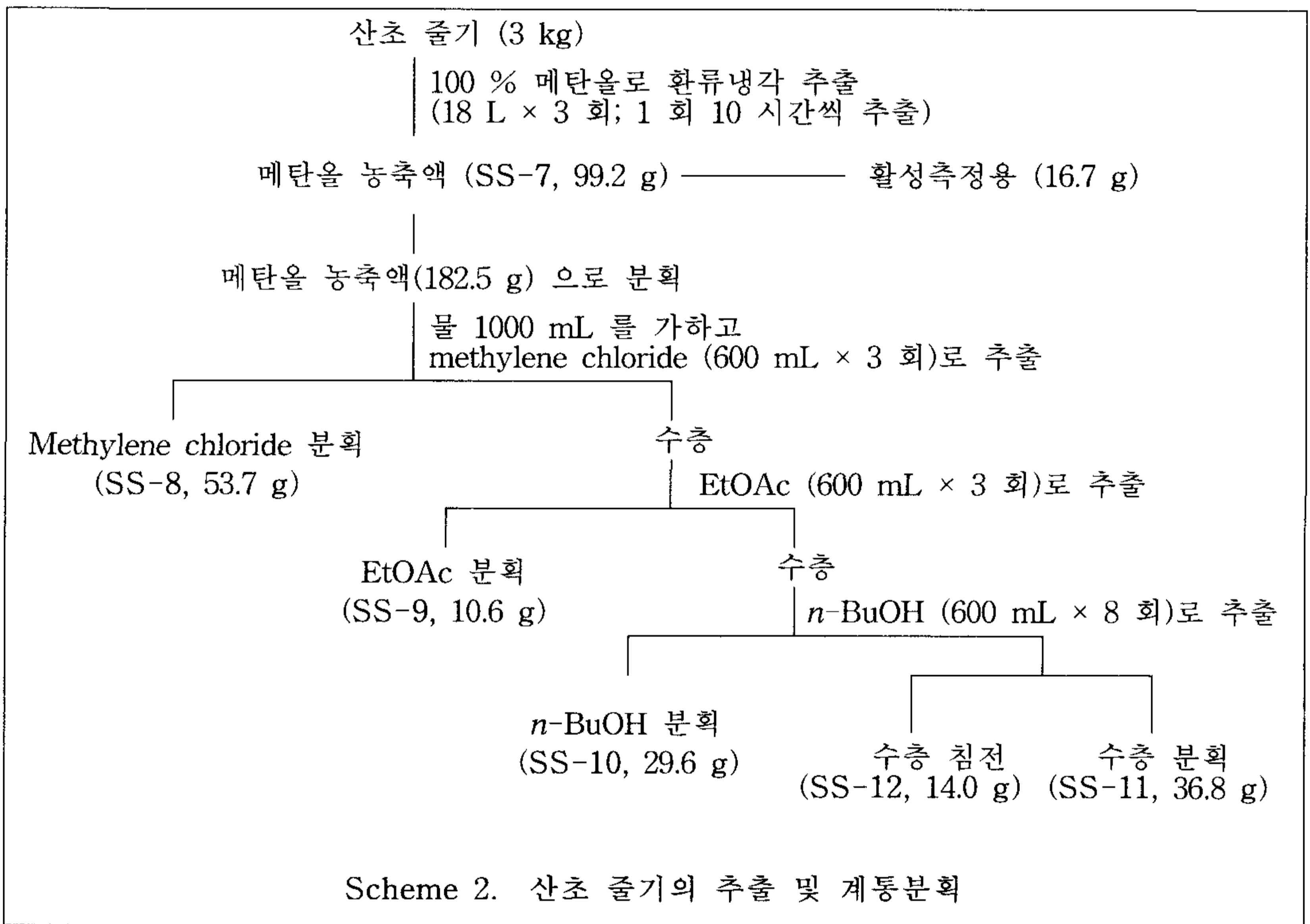
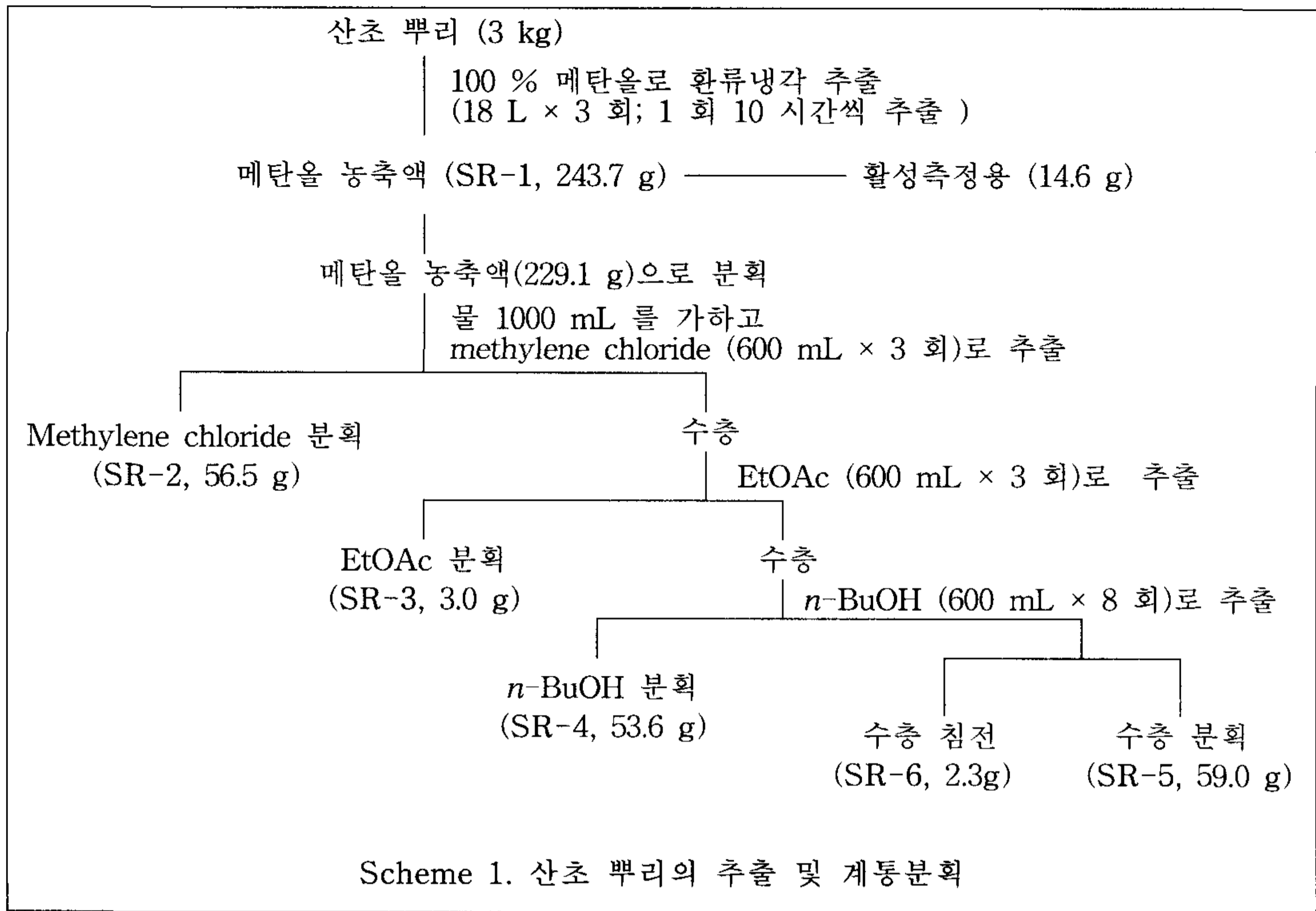
4) 산초 종자

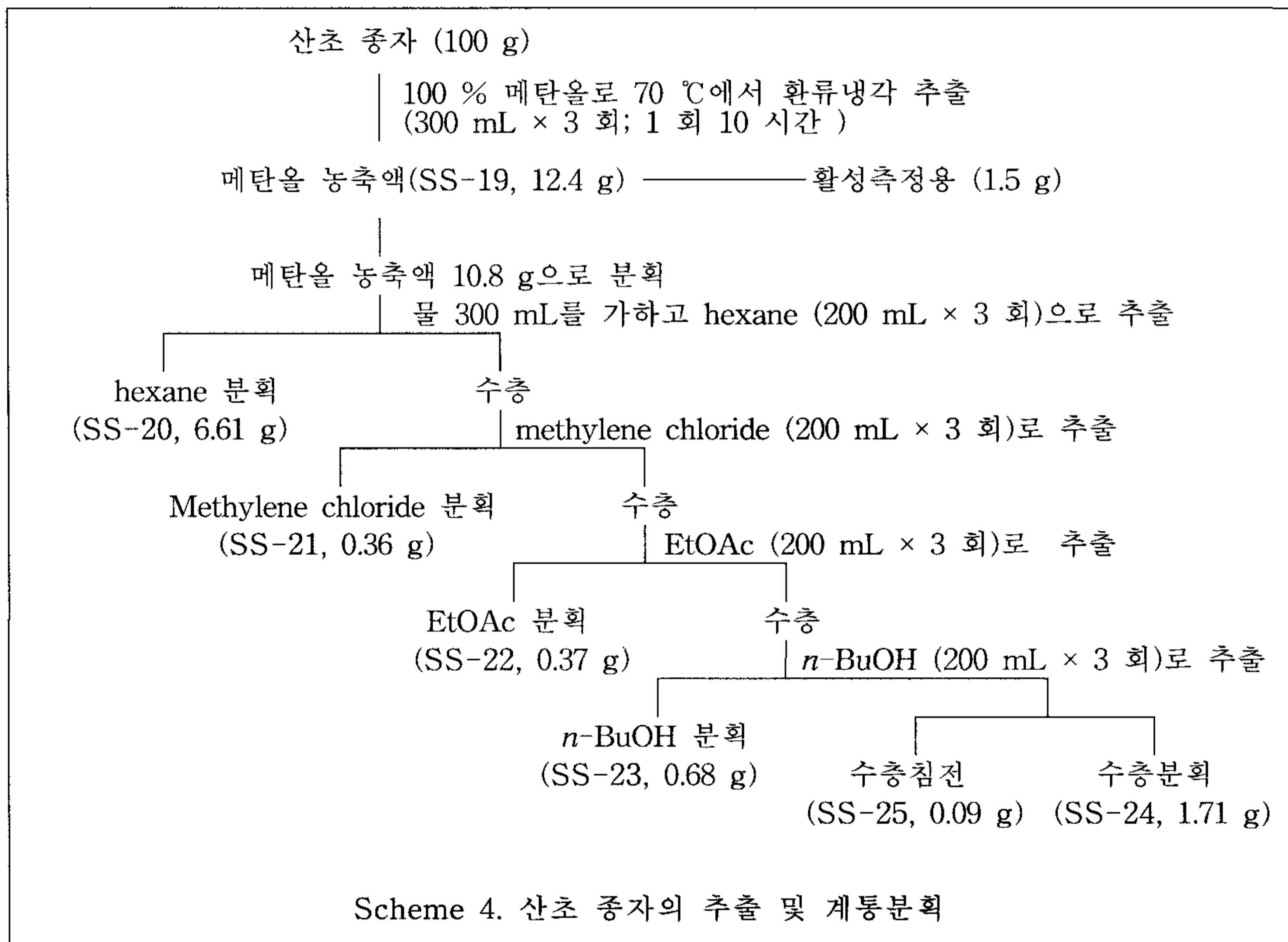
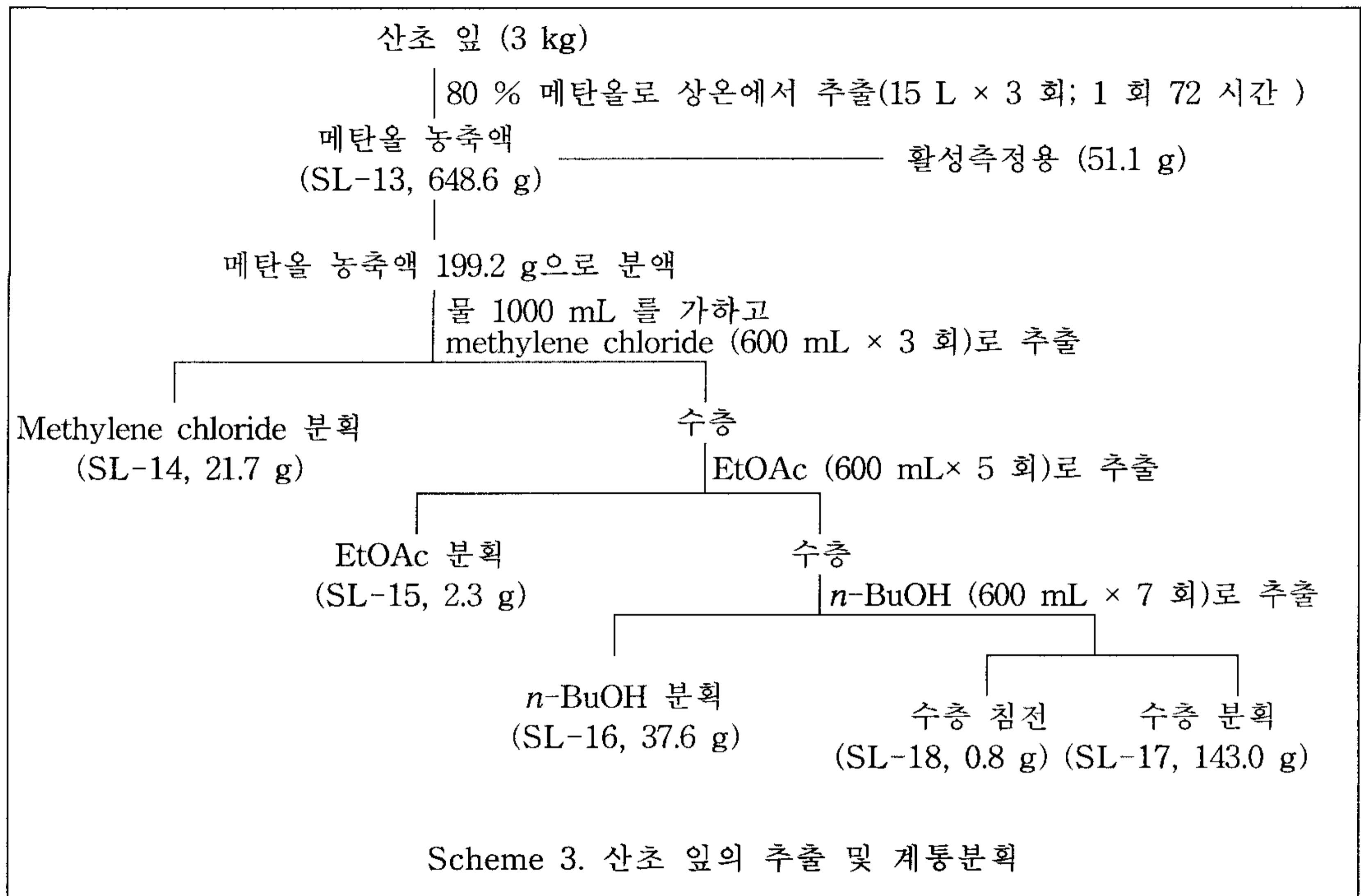
산초 종자의 계통분획과정은 Scheme 4에 나타낸 바와 같이 산초 종자 100 g을 70℃에서 100 % methanol (300 mL × 3 회, 1 회에 10 시간씩 추출)로 추출하여 그 추

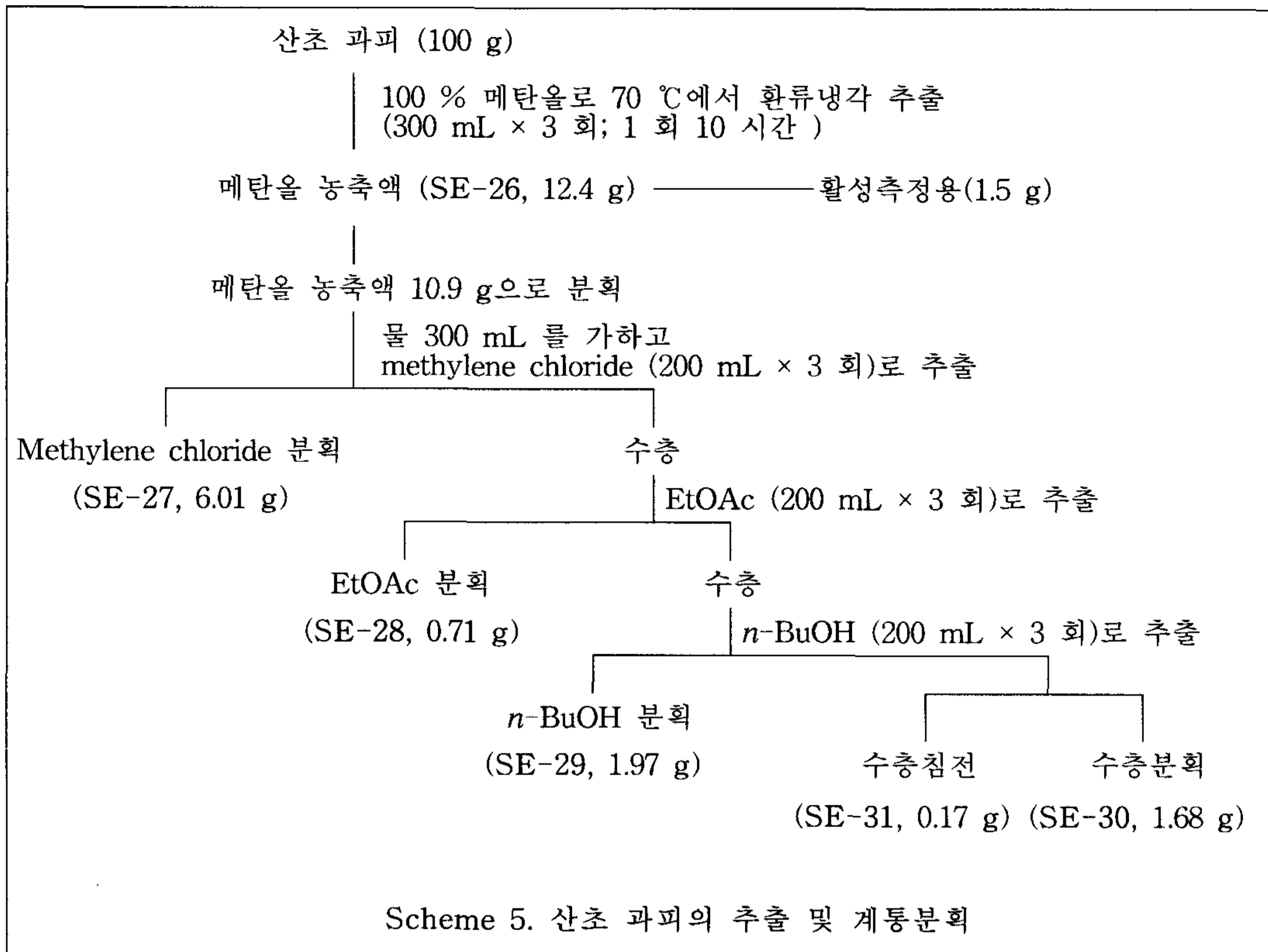
출액을 rotary vacuum evaporator로 농축하여 메탄올 농축액(SS-19) 12.4 g을 얻었다. 활성층정용으로 메탄올 농축액 1.5 g을 남기고 나머지 10.8 g을 물 300 mL에 녹여서(녹지 않는 부분을 hexane에 녹여 수층에 넣고 계속 분획하였다) hexane (200 mL × 3 회)으로 추출하고 hexane 층을 농축하여 hexane 분획(SS-20) 6.61 g을 얻었다. 이어서 수층을 methylene chloride (200 mL × 3 회)로 추출하였으며, methylene chloride 층을 농축하여 methylene chloride 분획(SS-21) 0.36 g을 얻었다. 이어서 수층을 ethyl acetate (200 mL × 3 회)로 추출하고 추출액을 농축하여 ethyl acetate 분획(SS-22) 0.37 g을 얻었다. 수층은 *n*-butanol (200 mL × 3 회)로 추출하여 *n*-butanol 층을 농축하여 *n*-butanol 분획(SS-23) 0.68 g을 얻었다. 수층에는 침전이 있었으므로 침전을 여과하여 자연 건조시켜 수층 침전(SS-25) 0.09 g을 얻었고 수층은 농축하여 수층 분획(SS-24) 1.71 g을 얻었다.

5) 산초 과피

산초 과피의 계통분획과정은 Scheme 5에 나타낸 바와 같이 산초 과피 100 g을 70 °C에서 100 % methanol (300 mL × 3 회, 1 회에 10 시간씩 추출)로 추출하여 그 추출액을 rotary vacuum evaporator로 농축하여 메탄올 농축액 12.4 g(SE-26)을 얻었다. 활성층정용으로 1.5 g을 남기고 나머지 10.9 g을 물 300 mL에 녹여서(녹지 않는 부분을 methylene chloride로 씻어서 수층에 넣고 추출하였다) methylene chloride (200 mL × 3 회)로 추출하였으며, methylene chloride 층을 농축하여 methylene chloride 분획(SE-27) 6.01 g을 얻었다. 수층을 ethyl acetate (200 mL × 3 회)로 추출하고 추출액을 농축하여 ethyl acetate 분획(SE-28) 0.71 g을 얻었다. 이어서 수층을 *n*-butanol (200 mL × 3 회)로 추출하여 *n*-butanol 층을 농축하여 *n*-butanol 분획(SE-29) 1.97 g을 얻었다. 수층에는 침전이 있었으므로 침전을 여과하여 자연 건조시켜 수층 침전(SE-31) 0.17 g을 얻었고 수층은 농축하여 수층분획(SE-30) 1.68 g을 얻었다.







나. 초피시료의 부위별 추출 및 분획과정

1) 초피 뿌리

초피 뿌리의 계통분획과정은 Scheme 6에 나타난 바와 같이 초피 뿌리 3 kg을 80 °C에서 100 % methanol (18 L × 3 회, 1 회 10 시간씩 추출)로 추출하여 그 추출액을 rotary vacuum evaporator로 농축하여 methanol 농축액(CR-1) 138.5 g을 얻었다. 활성측정용으로 methanol 농축액 27.0 g을 남기고 나머지 111.5 g을 물 1000 mL에 녹여서(녹지 않는 부분을 10 % methanol 용액 20 mL에 녹여 수층에 넣고 분획하였다) methylene chloride (600 mL × 3 회)로 추출한 후 methylene chloride 층을 농축하여 methylene chloride 분획(CR-2) 37.4 g을 얻었다. 이어서 수층을 ethyl acetate (600 mL × 7 회)로 추출하고 추출액을 농축하여 ethyl acetate분획(CR-3) 6.5 g을 얻었다. 수층은 다시 *n*-butanol (600 mL × 8 회)로 추출하여 *n*-butanol 층을 농축하여

n-butanol 분획(CR-4) 38.9 g을 얻었으며, 수층은 농축하여 수층 분획(CR-5) 31.8 g을 얻었다.

2) 초피 줄기

초피 줄기의 계통분획과정은 Scheme 7에 나타낸 바와 같이 초피 줄기 3 kg을 80 °C에서 100 % methanol (18 L × 3 회, 1 회 10 시간씩 추출)로 추출하여 그 추출액을 rotary vacuum evaporator로 농축하여 methanol 농축액 (CS-6) 174.4 g을 얻었다. 활성측정용으로 methanol 농축액 34.8 g을 남기고 나머지 139.6 g을 물 1000 mL에 녹여서(녹지 않는 부분을 100 % methanol 용액 20 mL에 녹여 수층에 넣고 분획하였다) methylene chloride (600 mL × 3 회)로 추출한 후, methylene chloride 층을 농축하여 methylene chloride 분획(CS-7) 39.2 g을 얻었다. 이어서 수층을 ethyl acetate (600 mL × 5 회)로 추출하고 추출액을 농축하여 ethyl acetate 분획(CS-8) 4.1 g을 얻었다. 수층은 다시 *n*-butanol (600 mL × 7 회)로 추출하여 *n*-butanol 층을 농축하여 *n*-butanol 분획(CS-9) 35.3 g을 얻었으며, 수층은 농축하여 수층 분획(CS-10) 51.3 g을 얻었다.

3) 초피 잎

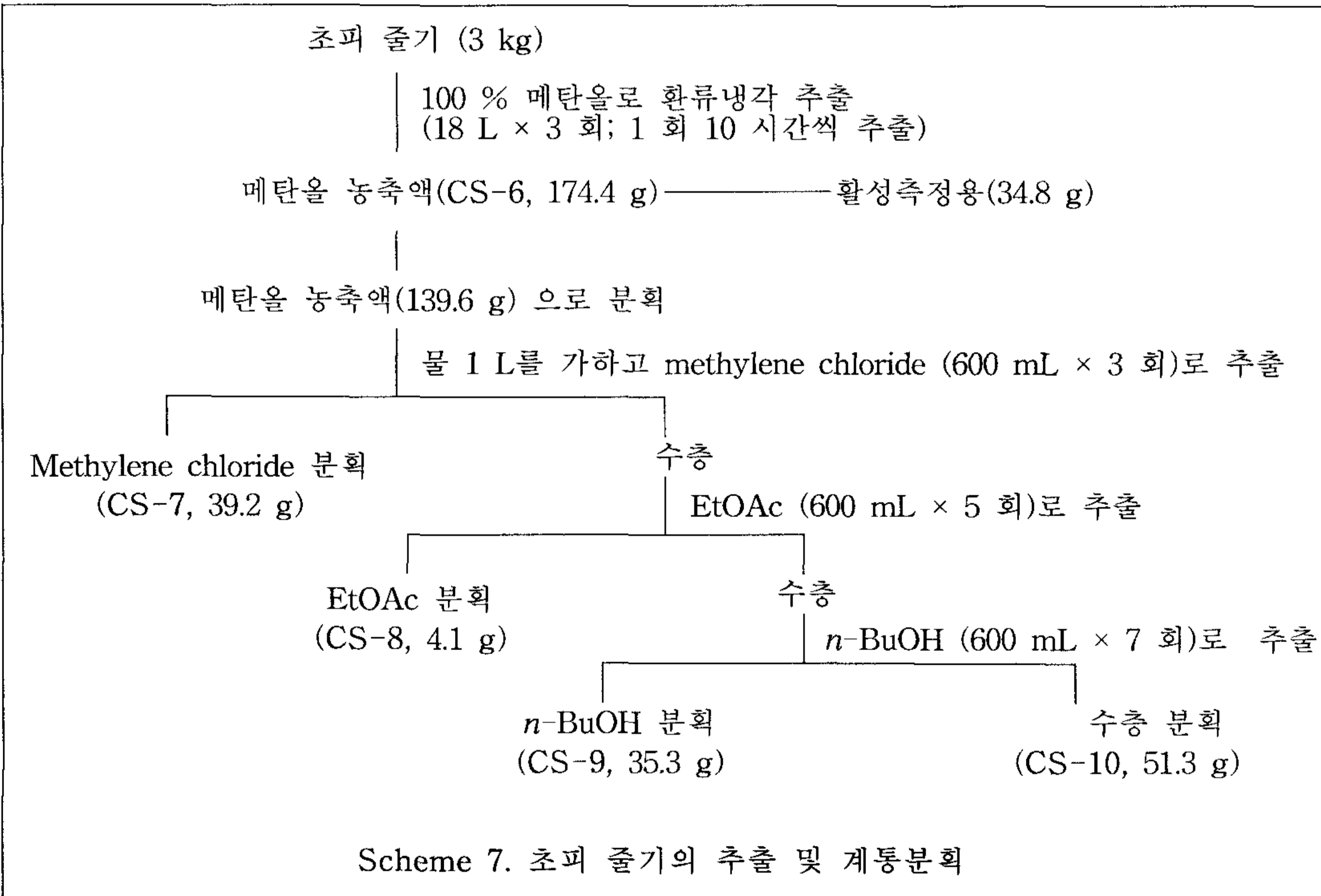
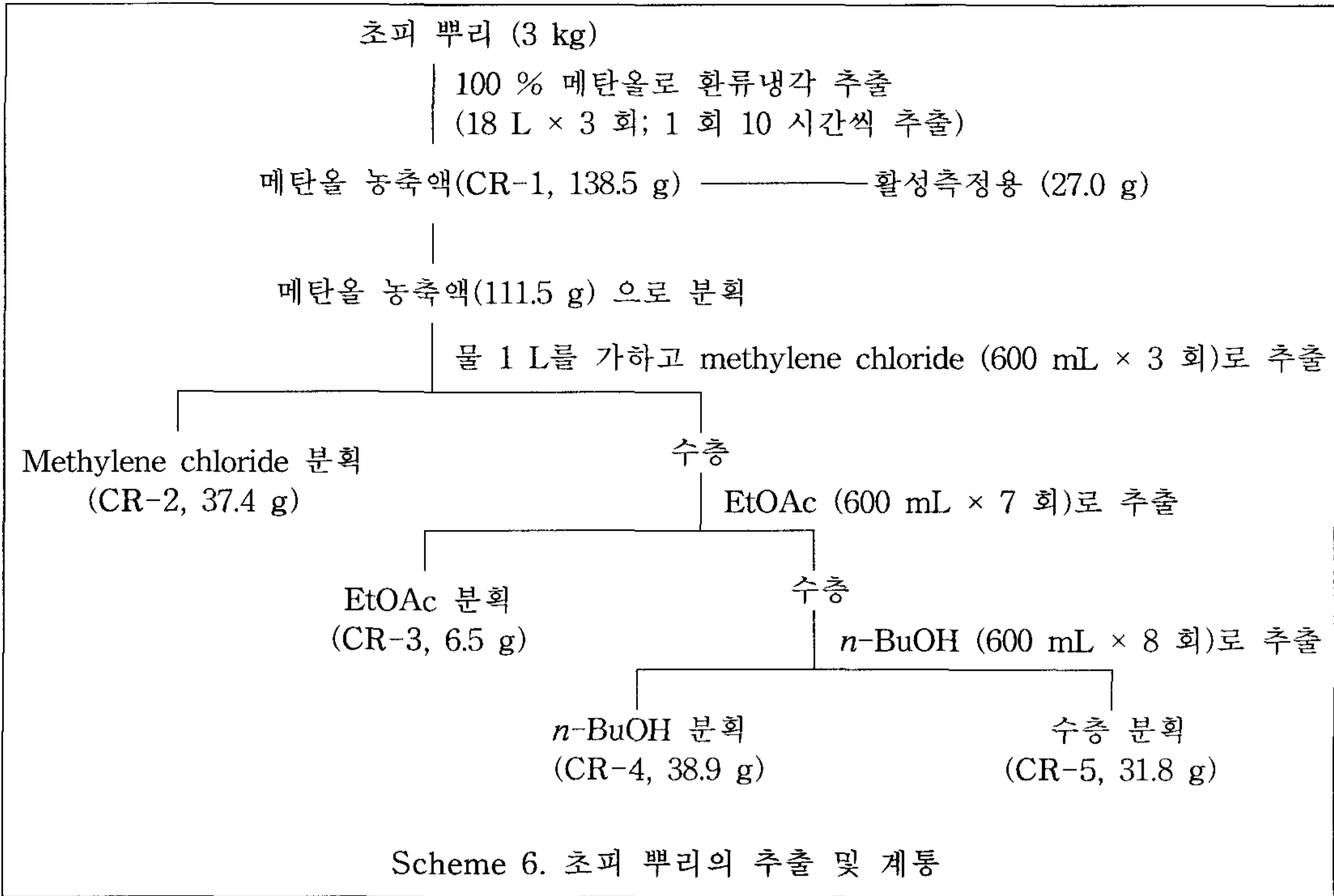
초피 잎의 계통분획과정은 Scheme 8에 나타낸 바와 같이 초피 잎 3 kg을 상온에서 80 % methanol (15 L × 3 회, 1 회 72 시간씩 추출)로 추출하여 그 추출액을 rotary vacuum evaporator로 농축하여 methanol 농축액(CL-11) 668.7 g을 얻었다. 활성측정용으로 methanol 농축액 51.1 g을 남기고 나머지 농축액 중에서 198.5 g을 취하여 물 1000 mL에 녹여서(전부 녹지 않아도 녹지 않는 부분을 작은 덩어리로 만들고 계속 분획하였다) methylene chloride (600 mL × 3 회)로 추출한 후, methylene chloride 층을 농축하여 methylene chloride 분획(CL-12) 18.4 g을 얻었다. 이어서 수층을 ethyl acetate (600 mL × 5 회)로 추출하고 추출액을 농축하여 ethyl acetate 분획(CL-13) 17.2 g을 얻었다. 수층을 다시 *n*-butanol (600 mL × 7 회)로 추출하여 *n*-butanol 층을 농축하여 *n*-butanol 분획(CL-14) 36.1 g을 얻었다. 나머지 수층에는 침전이 있었으므로 침전을 여과하여 자연 건조시켜 수층 침전(CL-16) 3.2 g을 얻었으며, 수층은 농축하여 수층분획(CL-15) 122.6 g을 얻었다.

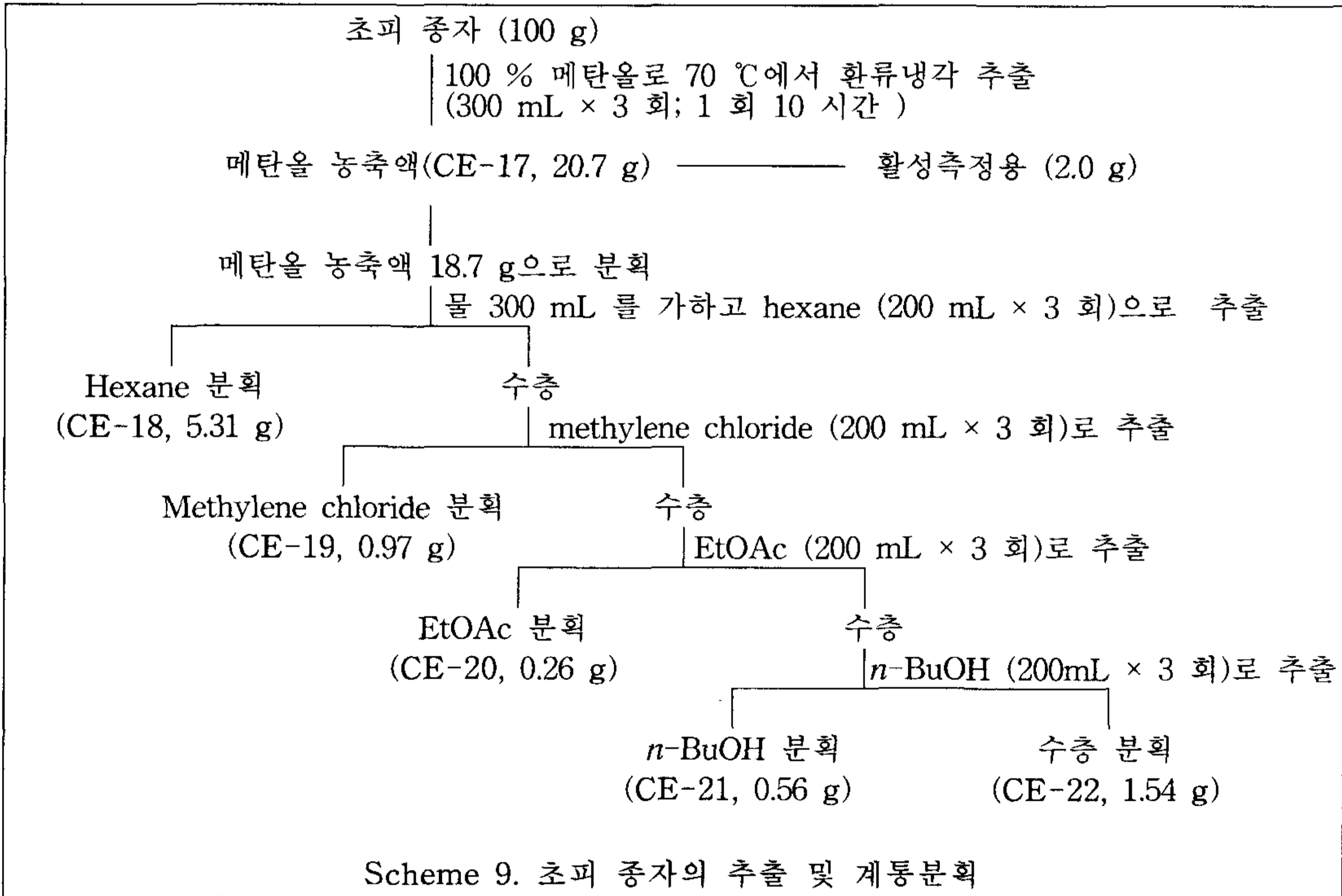
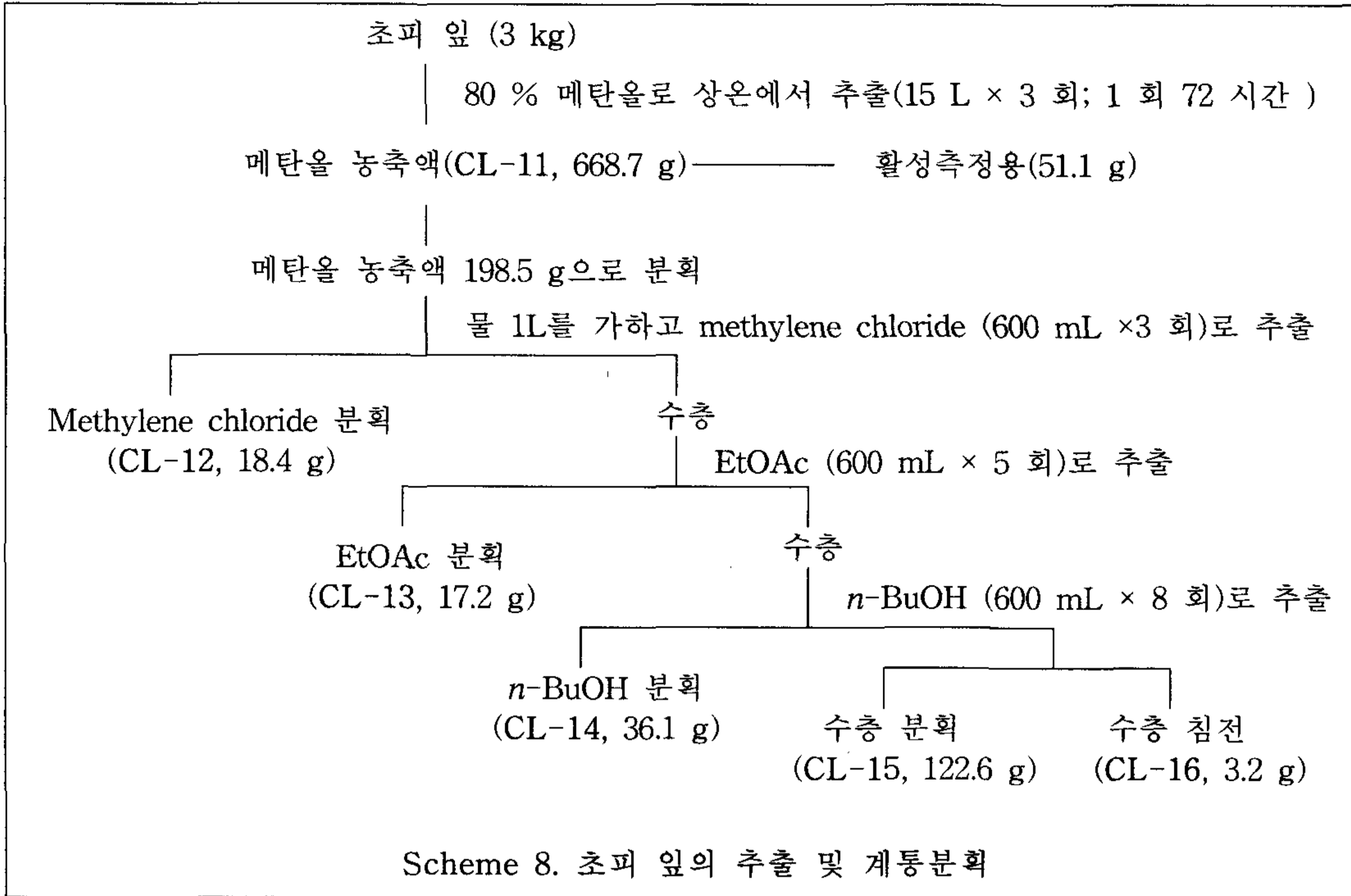
4) 초피 종자

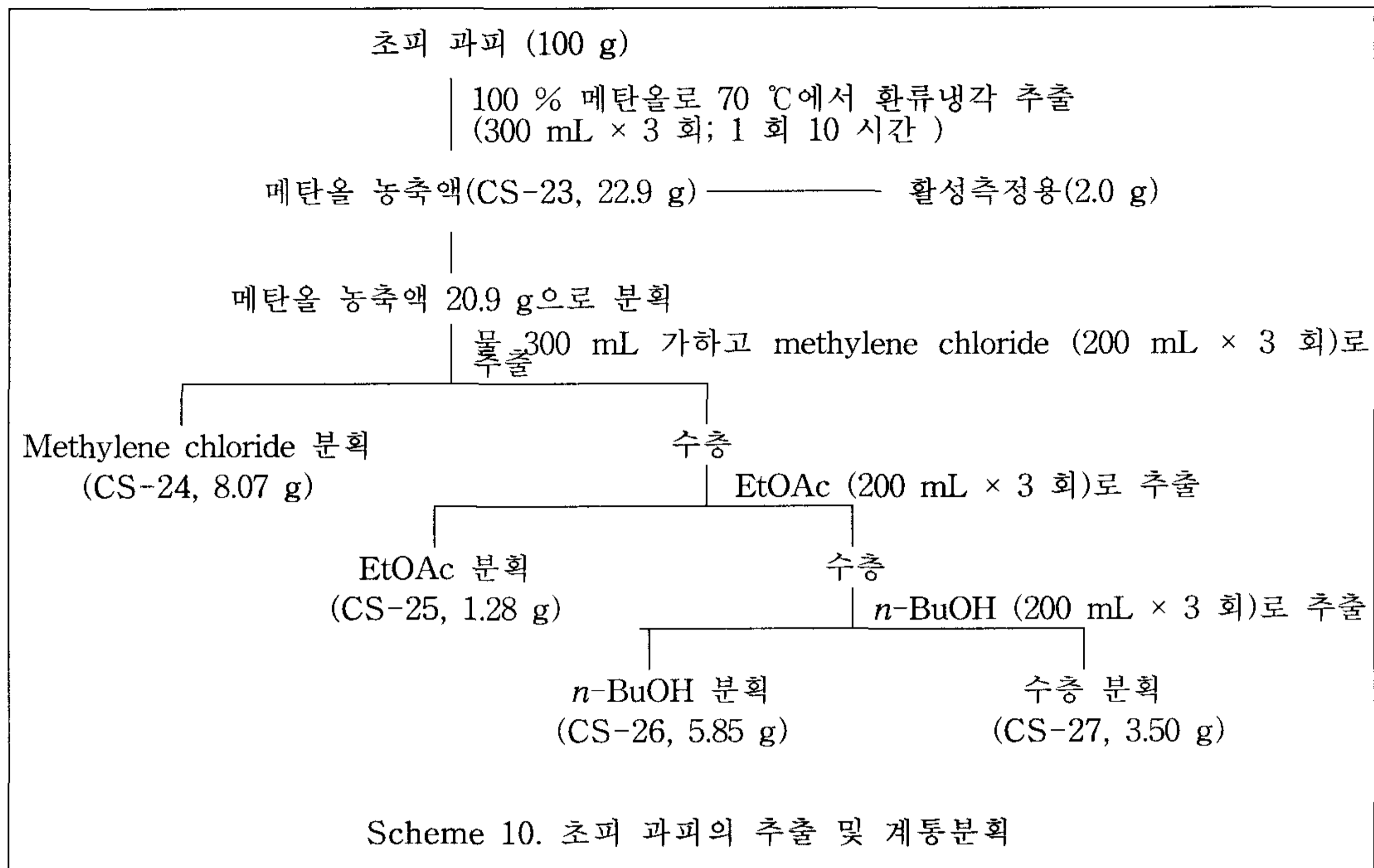
초피 종자의 계통분획과정은 Scheme 9에 나타낸 바와 같이 초피 종자 100 g을 70 °C에서 100 % methanol (300 mL × 3 회, 1회 10 시간씩 추출)로 추출하여 그 추출액을 rotary vacuum evaporator로 농축하여 methanol 농축액(CE-17) 20.7 g을 얻었다. 활성측정용으로 2.0 g을 남기고 나머지 18.7 g을 물 300 mL에 녹여서(녹지 않는 부분을 hexane에 녹여 수층에 넣고 계속 분획하였다) hexane (200 mL × 3 회)으로 추출하고 hexane 층을 농축하여 hexane 분획(CE-18) 5.31 g을 얻었다. 이어서 수층을 methylene chloride(200 mL × 3 회)로 추출하였으며, methylene chloride 층을 농축하여 methylene chloride 분획(CE-19) 0.97 g을 얻었다. 수층은 ethyl acetate(200 mL × 3 회)로 추출하고 추출액을 농축하여 ethyl acetate 분획(CE-20) 0.26 g을 얻었다. 다시 수층은 *n*-butanol (200 mL × 3 회)로 추출하고, *n*-butanol 층을 농축하여 *n*-butanol 분획(CE-21) 0.56 g을 얻었으며, 수층은 농축하여 수층 분획(CE-22) 1.54 g을 얻었다.

5) 초피 과피

초피 과피의 계통분획과정은 Scheme 10에 나타낸 바와 같이 초피 과피 100 g을 70 °C에서 100 % methanol (300 mL × 3 회, 1 회 10 시간씩 추출)로 추출하여 그 추출액을 rotary vacuum evaporator로 농축하여 methanol 농축액(CS-23) 22.9 g을 얻었다. 활성측정용으로 2.0 g을 남기고 나머지 methanol 농축액 20.9 g을 물 300 mL에 녹여서(녹지 않는 부분을 methylene chloride로 씻어서 수층에 넣고 추출하였다) methylene chloride (200 mL × 3 회)로 추출한 후, methylene chloride 층을 농축하여 methylene chloride 분획(CS-24) 8.07 g을 얻었다. 이어서 수층을 ethyl acetate (200 mL × 3 회)로 추출하고 추출액을 농축하여 ethyl acetate 분획(CS-25) 1.28 g을 얻었다. 다시 수층을 *n*-butanol (200 mL × 3 회)로 추출하고 *n*-butanol 층을 농축하여 *n*-butanol 분획(CS-26) 5.85 g을 얻었으며, 수층은 농축하여 수층 분획(CS-27) 3.50 g을 얻었다.







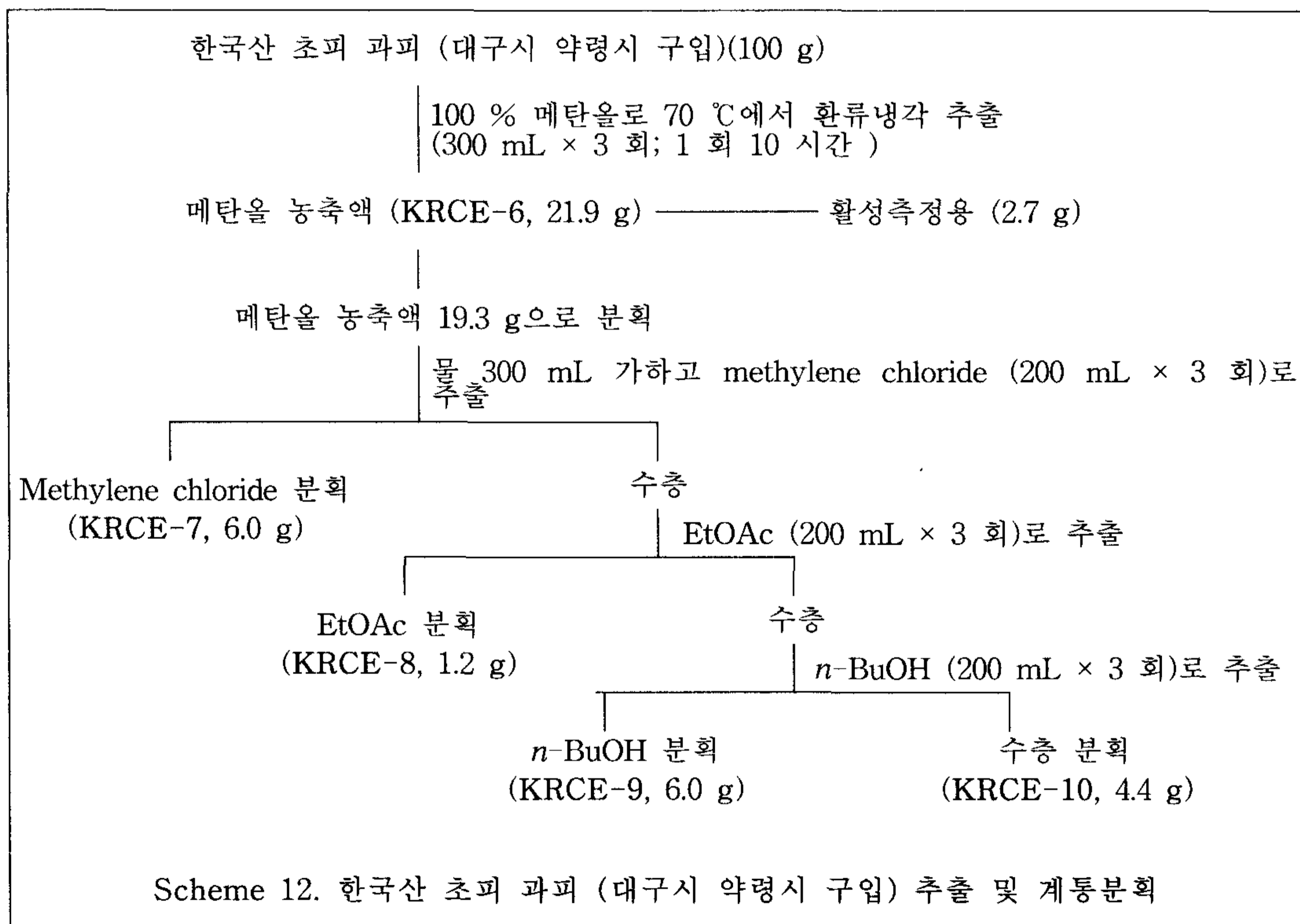
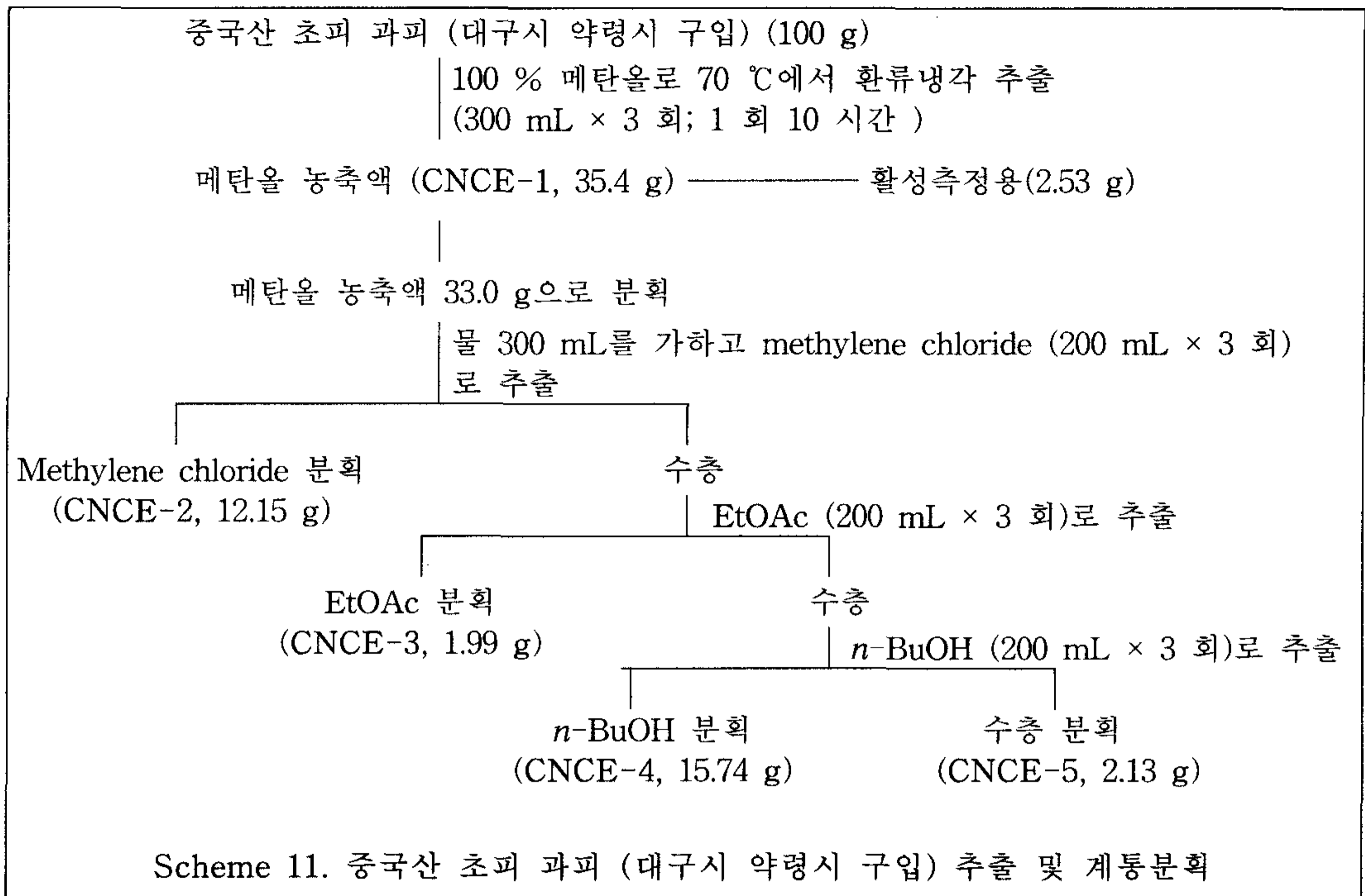
다. 중국산 초피 과피와 한국산 초피 과피의 비교실험

1) 중국산 초피 과피의 추출 및 분획과정

대구시 약령시에서 구입한 중국산 초피 과피의 계통분획과정은 Scheme 11에 나타난 바와 같이 초피 과피 100 g을 70 °C에서 100 % methanol (300 mL × 3 회, 1 회 10 시간씩 추출)로 추출하여 그 추출액을 rotary vacuum evaporator로 농축하여 methanol 농축액(CNCE-1) 35.4 g을 얻었다. 활성측정용으로 methanol 농축액 2.53 g을 남기고 나머지 33.0 g을 물 300 mL에 녹여서(녹지 않는 부분을 methylene chloride로 씻어서 수층에 넣고 추출하였다) methylene chloride (200 mL × 3 회 추출)로 추출한 후, methylene chloride 층을 농축하여 methylene chloride 분획(CNCE-2) 12.15 g을 얻었다. 이어서 수층을 ethyl acetate (200 mL × 3 회 추출)로 추출하고 추출액을 농축하여 ethyl acetate 분획(CNCE-3) 1.99 g을 얻었다. 다시 수층은 *n*-butanol (200 mL × 3 회 추출)로 추출하고 *n*-butanol 층을 농축하여 *n*-butanol 분획(CNCE-4) 15.74 g을 얻고 수층은 농축하여 수층 분획(CNCE-5) 2.13 g을 얻었다.

2) 한국산 초피 과피의 추출 및 분획과정

대구시 약령시에서 구입한 한국산 초피 과피의 계통분획과정은 Scheme 12에 나타난 바와 같이 초피 과피 100 g을 70 °C에서 100 % methanol (300 mL × 3 회, 1 회 10 시간씩 추출)로 추출하여 그 추출액을 rotary vacuum evaporator로 농축하여 methanol 농축액(KRCE-6) 21.9 g을 얻었다. 활성측정용으로 methanol 농축액 2.7 g을 남기고 나머지 19.3 g을 물 300 mL에 녹여서(녹지 않는 부분을 methylene chloride로 씻어서 수층에 넣고 추출하였다) methylene chloride (200 mL × 3 회)로 추출한 후, methylene chloride 층을 농축하여 methylene chloride 분획(KRCE-7) 6.0 g을 얻었다. 이어서 수층을 ethyl acetate (200 mL × 3 회)로 추출하고 추출액을 농축하여 ethyl acetate 분획(KRCE-8) 1.2 g을 얻었다. 다시 수층은 *n*-butanol (200 mL × 3 회)로 추출하고 *n*-butanol 층을 농축하여 *n*-butanol 분획(KRCE-9) 6.0 g을 얻고 수층은 농축하여 수층 분획(KRCE-10) 4.4 g을 얻었다.



라. 산초 잎과 초피 잎의 용매별 추출실험

김 등[46]은 초피 5 g에 용매 300 mL를 가하고 진탕시켜 얻은 액을 두 겹의 가제로 여과한 후 Toyo No. SA로 재차 여과하고 여액을 40 °C에서 강압증발한 후 항균활성 실험을 한 결과 핵산, 에테르, 에탄올, 물 추출물은 모두 *B. cereus*에 대하여 모두 항균활성을 나타내었으며, 특히 에탄올, 에테르추출물이 보다 큰 항균활성을 나타내었다고 보고하였다. 또한 김 등[47]은 산초 잎과 초피 잎을 각각 물, 96 % 주정으로 상온에서 추출하여 항균활성을 측정한 결과 항균성 검색에 사용된 대부분의 세균에서는 초피와 민초피의 물과 에탄올추출물 모두에서 종자를 제외한 잎과 과피에서 항균활성이 나타났으나 효모와 젖산균에서는 보이지 않았으며, 에탄올 추출물이 물 추출물보다 더 강한 활성을 보였으며, 과피보다는 잎에서 항균활성이 더 강하게 나타났다고 보고하였다. 이와 같은 실험 결과를 참고로 하여 Scheme 3과 Scheme 8의 추출 및 분획 방법 외에 산초 잎과 초피 잎을 가루를 내어 표 1과 표 2에서와 같이 각각 5 g씩 취하여 100 % methanol과 95 % ethanol을 추출용매로 하고 상온과 60 °C에서 환류냉각 추출하여 추출액을 농축한 후 항균활성 비교실험을 하였다.

Table 23. 산초 잎의 용매별 추출실험

시료명	시료량 (산초잎)	추출조건	농축액량
SL-rM	5 g	100 % methanol (50 mL x 3 회)로 상온 추출 ; 48 시간/회	1.1110 g
SL-rE	5 g	95 % ethanol (50 mL x 3 회)로 상온 추출 ; 48 시간/회	1.1054 g
SL-60M	5 g	100 % methanol (50 mL x 3 회)로 60 °C 환류냉각 추출 ; 3 시간/회	1.1909 g
SL-60E	5 g	95 % ethanol (50 mL x 3 회)로 60 °C 환류냉각 추출 ; 3 시간/회	1.0803 g

Table 24. 초피 잎의 용매별 추출실험

시료명	시료량 (초피잎)	추출조건	농축액량
CL-rM	5 g	100 % methanol (50 mL x 3 회)로 상온 추출 ; 48 시간/회	1.3628 g
CL-rE	5 g	95 % ethanol (50 mL x 3 회)로 상온 추출 ; 48 시간/회	1.0674 g
CL-60M	5 g	100 % methanol (50 mL x 3 회)로 60 °C 환류냉각 추출 ; 3 시간/회	1.2431 g
CL-60E	5 g	95 % ethanol (50 mL x 3 회)로 60 °C 환류냉각 추출 ; 3 시간/회	1.1199 g

마. 초피 과피와 초피 종자의 용매별 추출실험

허 등[48]은 초피로부터 oleoresin을 추출할 때에는 과피의 경우에는 과피 입자의 크기를 355~250 μm 로 분쇄하고 거기에 10 배에 달하는 용매 (methanol)를 첨가하여 25 °C의 온도에서 10분간, 그리고 종자의 경우에는 입자의 크기를 355~250 μm 로 분쇄하여 8배에 달하는 용매(methylene chloride)를 첨가하여 30 °C에서 10 분간 추출하는 것이 가장 향기 성분의 수율이 높다고 보고하였다. 초피 과피와 초피 종자를 가루로 한 후 표 3과 표 4에 나타낸 바와 같이 hexane, methylene chloride, ethyl acetate와 methanol을 추출용매로 하여, 과피는 25 °C에서 종자는 30 °C에서 추출하여 농축한 후 항균활성 및 기타 활성실험을 비교하였다.

Table 25. 초피 과피의 용매별 추출실험

시료명	시료량 (초피과피)	추출조건	농축액량
CS-e	10 g	25 °C에서 methanol (100 mL x 3 회) 으로 추출 ; 10 분/회	2.3958 g
CS-f	10 g	25 °C에서 ethyl acetate (100 mL x 3 회) 로 추출 ; 10 분/회	1.1195 g
CS-g	10 g	25 °C에서 hexane (100 mL x 3 회) 로 추출 ; 10 분/회	1.0733 g
CS-h	10 g	25 °C에서 methylene chloride (100 mL x 3 회)로 추출 ; 10 분/회	0.9027 g

Table 26. 초피 종자의 용매별 추출실험

시료명	시료량 (초피종자)	추출조건	농축액량
CE-a	10 g	30 °C에서 methanol (100 mL x 3 회) 으로 추출 ; 10 분/회	1.0770 g
CE-b	10 g	30 °C에서 ethyl acetate(100 mL x 3 회) 로 추출 ; 10 분/회	2.3790 g
CE-c	10 g	30 °C에서 hexane (100 mL x 3 회) 로 추출 ; 10 분/회	2.0735 g
CE-d	10 g	30 °C에서 methylene chloride (100 mL x 3 회)로 추출 ; 10 분/회	2.2811 g

바. 산초, 초피 유래의 치아우식균 (*Streptococcus mutans*), 식중독 및 장내 병원성 미생물 (*Aeromonas hydrophila*, *Chryseobacterium joostei*, *Bacillus pumilus*)에 대한 항균활성 측정을 위한 시료 조제

1) 산초 과피 및 초피 과피 methylene chloride 층의 preparative TLC 분획실험

1차년도 (2003년) 실험결과, 산초 초피의 뿌리, 줄기, 잎에 대한 각 부위별 항균활성을 측정한 결과 큰 차이를 보이지 않았으며 낮게 나타났으나 초피 과피 추출분획에서는 강한 항균력을 보였다. 특히 *Esherichia coli*와 치아우식균인 *Streptococcus mutans*에 매우강한 활성을 나타냈다. 초피 과피 각 추출 분획중 methylene chloride 층에 치아우식균 *Streptococcus mutants*에 대한 항균활성이 가장 강하게 나타났다. 이러한 실험결과로부터 산초 과피, 초피 과피의 methylene chloride 층을 선택하여 preparative TLC 분획 실험을 하였다. 이 분획들은 제 3 세부과제에서 항균활성을 측정하기 위해 사용되었다.

가) 산초 과피 methylene chloride 층

산초 과피 methylene chloride 층 (SE-27) 4.7 g을 methylene chloride 10 mL에 녹여 6개의 preparative TLC plate에 loading한다. CH₂Cl₂: MeOH: H₂O (7: 1: 0.1) 혼합용액으로 TLC plate를 끝까지 전개시키고 전개된 TLC plate를 UV (254 nm)를 기준으로 하여 6개의 부분으로 나누었다. 각 부분을 긁어내어 MeOH (100 mL × 3 회)로 추출, 농축한다. (각 분획 무게: Table 27)

나) 초피 과피 methylene chloride 층

초피 과피 methylene chloride 층 (CE-24) 5.0 g을 methylene chloride 10 mL에 녹여 6개의 preparative TLC plate에 loading한다. CH₂Cl₂: MeOH: H₂O (10: 1: 0.1) 혼합용액으로 TLC plate를 끝까지 전개시키고 전개된 TLC plate를 UV (254 nm)를 기준으로 하여 6 개의 부분으로 나누었다. 각 부분을 긁어 내어 MeOH (100 mL × 3 회)로 추출, 농축한다. (각 분획 무게: Table 27)

Table 27. 산초 과피 및 초피 과피 preparative TLC 분획무게

시료 번호	총 무게 (g)	활성측정을 위한 시료 제공 무게 (g)	나머지 무게 (g)
CE-MC-A	0.9020	0.1132	0.7988
CE-MC-B	0.6515	0.1782	0.4733
CE-MC-C	0.8622	0.1330	0.7292
CE-MC-D	0.4604	0.1075	0.3529
CE-MC-E	0.4316	0.1076	0.3240
CE-MC-F	0.2805	0.1077	0.1728
SE-MC-A	1.8093	0.1061	1.7132
SE-MC-B	0.3572	0.1381	0.2191
SE-MC-C	0.8834	0.1010	0.7824
SE-MC-D	0.3599	0.0717	0.2882
SE-MC-E	0.4651	0.1195	0.3456
SE-MC-F	0.1667	0.0588	0.1079

2) 산초 과피와 초피 과피 및 종자의 용매별 추출실험과 수증기증류실험

1차년도 (2003년) 실험결과 산초 초피의 뿌리, 줄기, 잎 부위별 큰 차이를 보이지 않고 항균력이 낮게 나타났고 초피 과피 추출분획에서 강한 항균력을 보였으며, 특히 *Esherichia coli*와 치아우식균인 *Streptococcus mutants*에 매우강한 활성을 나타냈다. 이런 실험결과로부터 초피 과피를 methanol, ethyl acetate, hexane, methylene chloride 용매별 추출물과 수증기증류 분획으로 나누어 각 분획에 대해 항균활성을 측정하였다.

가) 산초 과피 수증기증류

산초 과피 30 g을 1 L의 공통으로 갈아 맞춘 경질 유리 플라스크에 넣고 300 mL의 물을 넣은 다음 정유정량기 (Fig. 16)를 장치하여 정량기의 상단에 환류냉각기를

달고 heating mantle에서 조심스럽게 130~150 °C로 가열한다. 5 시간 동안 끓인 다음 몇 분 방치한 후 환류냉각기를 떼어내고 조심스럽게 정유를 취해 약 0.2 g을 얻었다. (활성 보낸 무게: Table 28)

산초 과피 → 수증기증류 (30 g × 1 회) → 정유성분 (0.2 g) (2004. 8. 11)

나) 초피 과피 수증기증류

초피 과피 30 g을 1 L의 공통으로 갈아 맞춘 경질 유리 플라스크에 넣고 300 mL의 물을 넣은 다음 정유정량기 (Fig. 16)를 장치하여 정량기의 상단에 환류냉각기를 달고 heating mantle에서 조심스럽게 130~150 °C로 가열한다. 5 시간 동안 끓인 다음 몇 분 방치한 후 환류냉각기를 떼어내고 조심스럽게 정유를 취해 약 0.8 g을 얻었다. 이 조작을 여러 차례 반복하여 시료를 얻었다. (활성 보낸 무게: Table 29)

1차 : 초피 과피 → 수증기증류 (30 g × 2 회) → 정유성분 (1.46 g) (2004. 8. 11)

2차 : 초피 과피 → 수증기증류 (60 g × 3 회) → 정유성분 (4.7 g) (2004. 9. 21)

3차 : 초피 과피 → 수증기증류 (60 g × 26 회) → 정유성분 (40.8 g) (2005. 3. 24)

다) 초피 종자 수증기증류

초피 종자 30 g을 1 L의 공통으로 갈아 맞춘 경질 유리 플라스크에 넣고 300 mL의 물을 넣은 다음 정유정량기 (Fig. 16)를 장치하여 정량기의 상단에 환류냉각기를 달고 heating mantle에서 조심스럽게 130~150 °C로 가열한다. 5 시간 동안 끓인 다음 몇 분 방치한 다음 환류냉각기를 떼어내고 조심스럽게 정유를 취해 약 0.08~0.09 g을 얻었다. 이 조작을 여러 차례 반복하여 시료를 얻었다. (활성 보낸 무게: Table 30)

1차 : 초피 종자 → 수증기증류 (30 g × 4 회) → 정유성분 (0.24 g) (2004. 8. 11)

2차 : 초피 종자 → 수증기증류 (60 g × 7 회) → 정유성분 (1.05 g) (2005. 1. 19)

Table 28. 산초 과피 수증기증류 시료무게 및 활성 보낸 무게

진행 차수	수증기 증류한 정유무게 (g)	활성측정을 위한 시료제공무게 (g)	나머지무게 (g)	실행날짜
제1차	0.2	0.11	0.09	2004. 8. 11

Table 29. 초피 과피 수증기증류 시료무게 및 활성 보낸 무게

진행 차수	수증기 증류한 정유무게 (g)	활성측정을 위한 시료제공무게 (g)	나머지무게 (g)	실행날짜
제1차	1.46	0.10	1.35	2004. 8. 11
제2차	6.05	5.0	1.05	2004. 9. 21
제3차	40.8	40.0	0.8	2005. 3. 24

Table 30. 초피 종자 수증기증류 시료무게 및 활성 보낸 무게

진행 차수	수증기 증류한 정유무게 (g)	활성측정을 위한 시료제공무게 (g)	나머지무게 (g)	실행날짜
제1차	0.24	0.11	0.13	2004. 8. 11
제2차	1.05	1.0	0.05	2004. 9. 21

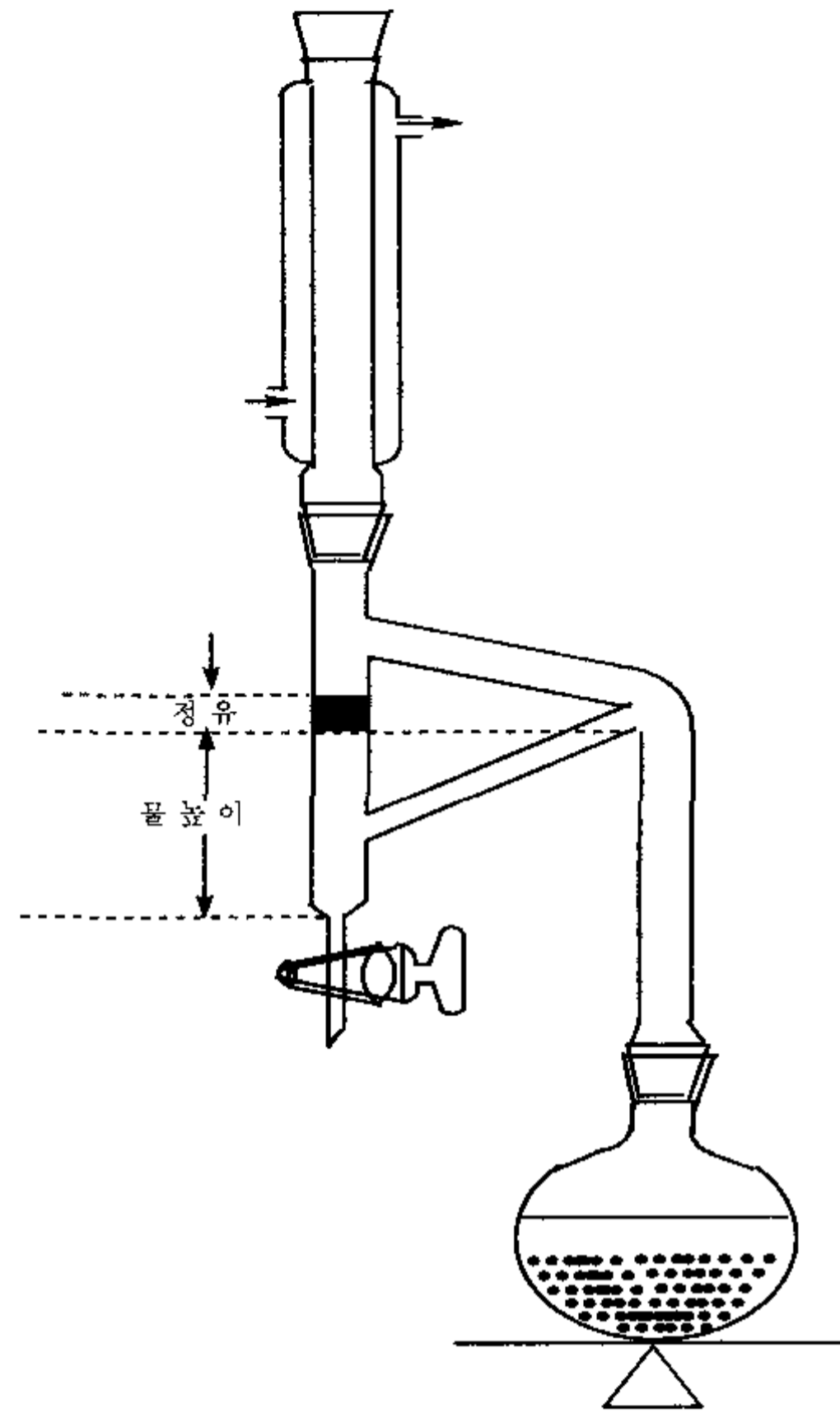


Fig. 16. 수증기증류장치

사. 과메기 가공 시 보존제로의 활용을 위한 산초 잎과 초피 과피의 시료조제

1) 산초 잎 80 % ethanol extract 조제

2005년 9월 14일 동아임장에서 산초 잎을 구입하여 동결건조한 후 그 2.7 kg을 80 % EtOH로 상온에서 추출 (20 L × 5 회) 및 진공 농축하여 얻은 총 270 g의 ethanol extract를 제 1 세부과제에 제공하였다.

2) 초피 과피 정유 성분 조제

초피 과피 30 g을 1 L의 공통으로 갈아 맞춘 경질 유리 플라스크에 넣고 300 mL의 물을 가한 다음 정유정량기를 장치하여 정량기의 상단에 환류냉각기를 달고 heating mantle에서 조심하여 130~150 °C로 가열하여 끓인다. 5 시간 계속 끓인 다음 가열을 중지하고 잠깐 방치한 다음 환류냉각기를 떼고 스포이드로 조심스럽게 정유를 취하여 정유 약 0.8 g을 얻었다. 이런 조작을 여러 차례 반복하여 얻은 초피 과피 정유성분 약 20 g을 제 1 세부과제에 제공하였다. (2006. 1. 9.)

아. 동물실험 및 활성물질 분리를 위한 시료 조제

1) 산초 잎의 추출 및 분획 활성 실험

산초 잎의 계통분획과정은 Scheme 8에 나타낸 바와 같이 산초 잎 10 kg을 상온에서 80 % methanol (22 L × 5 회, 1 회에 72 시간씩 추출)로 추출하여 그 추출액을 rotary vacuum evaporator로 농축하여 메탄올 농축액 (SL-13) 1,206 g을 얻었다. 메탄올 농축액(1,206 g)을 약 200 g씩 (6 개의 분획 깔대기 사용) 물 1,000 mL에 녹여서 methylene chloride (700 mL × 3 회)로 분획, 농축하여 methylene chloride 분획 (SL-14) 311 g을 얻었으며 수층에 *n*-butanol (700 mL × 7 회)을 가해 분획, 농축하여 *n*-butanol 분획 (SL-16) 385 g을 얻었다. 남아있는 수층의 침전부분을 여과하여 자연 건조시켜 수층침전 (SL-18) 11.3 g을 얻었고 나머지는 농축하여 수층분획 (SL-17) 492 g을 얻었다. Methylene chloride 분획 (SL-14)과 *n*-butanol 분획 (SL-16)을 각각 150 g씩 항산화, 항염증 및 항혈전 효능에 관한 동물실험에 사용되었고 그 무게는 Table 31에 나타내었다.

Table 31. 동물실험 시료 제공 무게

시료번호	총무게 (g)	동물실험시료무게(g) 1차(제 1 세부과제)	동물실험시료무게(g) 2차(제 1 세부과제)	나머지무게 (g)
SL-14	311	100	50	161
SL-16	385	100	50	235

2) Flash column chromatography 분획실험

가) *n*-BuOH 분획의 flash column chromatography 실험

Column (I.D.: 80 × 10 cm)에 silica gel (Merck No. 9385)를 약 45 cm정도 채우고 100 % hexane으로 elution시켜 stationary phase를 균일한 상태로 만든 후 *n*-butanol 분획 (SL-16) 150 g을 silica gel (Merck No. 7734) 400 g에 흡착시켜 시료를 loading 하였다. 이후 CH₂Cl₂ : MeOH : H₂O (15 : 1 : 0.05)로 mobile phase의

elution을 시작하여 CH₂Cl₂ : MeOH : H₂O (1 : 4 : 0.1)까지 gradient로 elution시켜 fraction SL-Bu-A~W의 23개의 분획으로 나누었다. 각 분획의 총 무게와 활성 측정을 위해 보낸 무게는 Table 32에 나타내었다.

Table 32. *n*-BuOH 분획의 flash column 분획 및 무게

분획 번호	총 무게 (g)	활성측정을 위한 시료 제공 무게 (g)	
		제 1 세부과제	제 3 세부과제
SL-Bu-A	0.2420	-	-
SL-Bu-B	1.1834	0.1248	0.1081
SL-Bu-C	2.3503	0.1242	0.1175
SL-Bu-D	1.3775	0.1072	0.1047
SL-Bu-E	4.2375	0.1296	0.1198
SL-Bu-F	4.2856	0.1111	0.1056
SL-Bu-G	1.1987	0.1119	0.1252
SL-Bu-H	9.2047	0.1176	0.1377
SL-Bu-I	4.6400	0.1152	0.1153
SL-Bu-J	6.0288	0.1345	0.1182
SL-Bu-K	4.8701	0.1382	0.1353
SL-Bu-L	9.5149	0.1099	0.1193
SL-Bu-M	4.6573	0.1180	0.1212
SL-Bu-N	6.6759	0.1261	0.1215
SL-Bu-O	4.6167	0.1127	0.1290
SL-Bu-P	7.6361	0.1359	0.1253
SL-Bu-Q	7.3041	0.1050	0.1171
SL-Bu-R	12.7815	0.1273	0.1026
SL-Bu-S	6.1417	0.1235	0.1070
SL-Bu-T	12.1260	0.1060	0.1231
SL-Bu-U	5.2574	0.1160	0.1162
SL-Bu-V	1.3479	0.1163	0.1074
SL-Bu-W	1.0097	0.1142	0.1134

나) Methylene chloride 분획의 flash column chromatography 실험

Column (I.D.: 80 × 10 cm)에 silica gel (Merck No. 9385)를 약 45 cm정도 채우고 100 % hexane으로 elution시켜 stationary phase를 균일한 상태로 만든 후 methylene chloride 분획 (SL-14) 110 g을 silica gel (Merck No. 7734) 200 g에 흡착시켜 시료를 loading 하였다. 이후 100 % hexane으로부터 시작하여 hexane : ethyl acetate (1 : 1) 및 100 % ethyl acetate까지 gradient로 elution시켜 분리 하였고 계속하여 100 % methylene chloride로 시작하여 CH₂Cl₂ : MeOH (1 : 1) 까지 gradient로 elution시켜 fraction SL-MC-A~W의 23개의 분획으로 나누었다. 각 분획의 총 무게와 활성 측정을 위해 보낸 무게는 Table 33에 나타내었다.

Table 33. Methylene chloride 분획의 Flash column 분획 및 무게

분획 번호	총 무게 (g)	활성측정을 위한 시료 제공 무게 (g)	
		제 1 세부과제	제 3 세부과제
SL-MC-A	0.3237	0.05	0.05
SL-MC-B	4.4382	0.05	0.05
SL-MC-C	5.2629	0.05	0.05
SL-MC-D	1.1673	0.05	0.05
SL-MC-E	0.6018	0.05	0.05
SL-MC-F	1.8231	0.05	0.05
SL-MC-G	4.8346	0.05	0.05
SL-MC-H	3.2347	0.05	0.05
SL-MC-I	2.9276	0.05	0.05
SL-MC-J	4.8226	0.05	0.05
SL-MC-K	6.7981	0.05	0.05
SL-MC-L	2.2711	0.05	0.05
SL-MC-M	0.6024	0.05	0.05
SL-MC-N	1.1037	0.05	0.05
SL-MC-O	1.3106	0.05	0.05
SL-MC-P	5.5682	0.05	0.05
SL-MC-Q	2.3934	0.05	0.05
SL-MC-R	2.2174	0.05	0.05
SL-MC-S	6.1417	0.05	0.05
SL-MC-T	5.1910	0.05	0.05
SL-MC-U	2.2723	0.05	0.05
SL-MC-V	6.8126	0.05	0.05
SL-MC-W	2.0152	0.05	0.05

자. 우수 생리활성 분획으로부터 활성 물질의 분리·정제 및 구조결정

1) 실험 배경

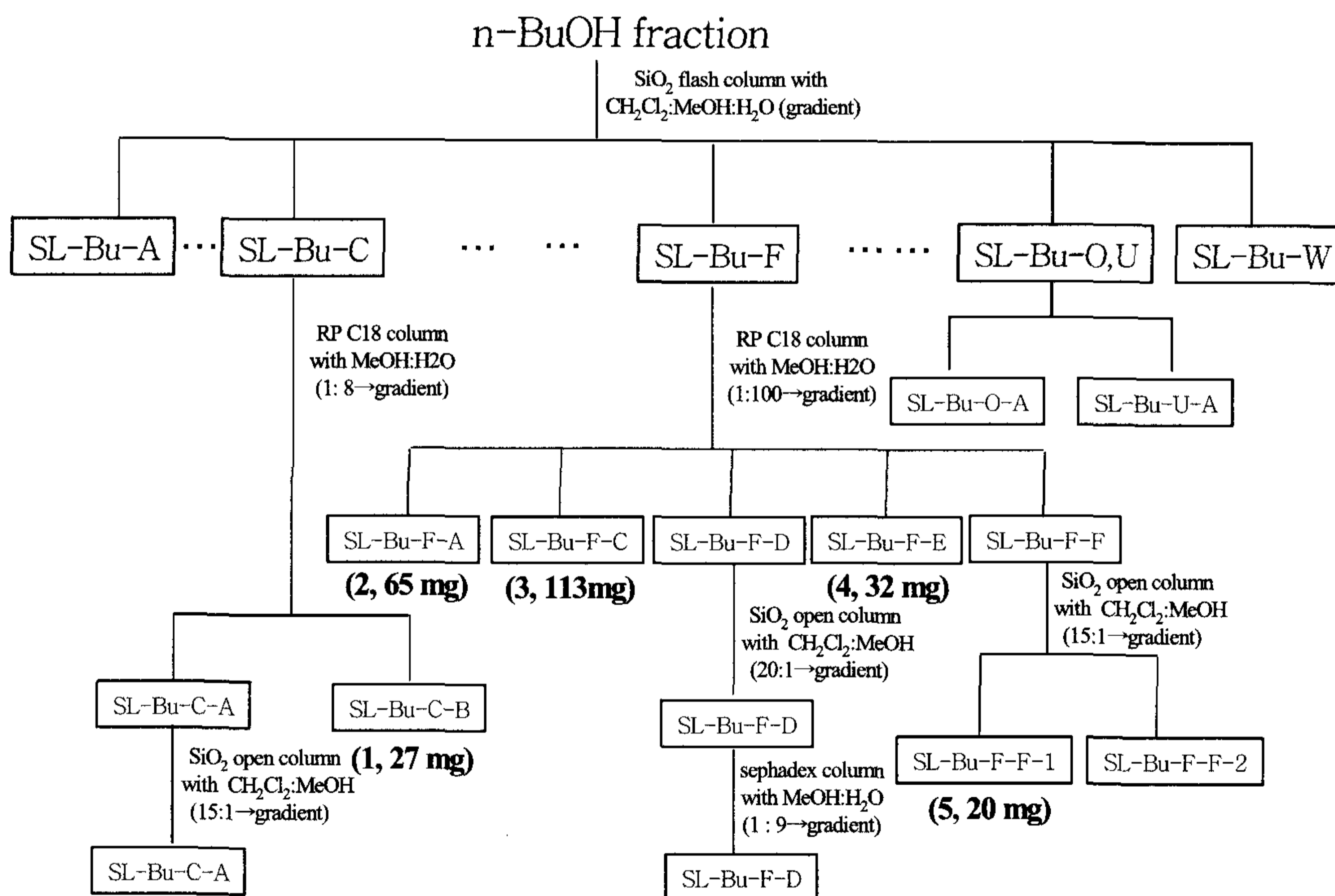
1차년도 (2003년) 실험 결과 산초나무 추출물의 부위별 지질과산화 억제활성, APTT 활성 및 DPPH radical 소거 활성 비교에서는 잎 > 줄기 ≥ 뿌리의 순으로 활성이 높게 나타났고, 산초 잎 ethyl acetate분획과 산초 잎 *n*-butanol 분획에서 강한 항산화력을 나타내었으며 산초 잎 methylene chloride 분획이 유방암 세포주 중 MDA438군주에 강한 세포독성을 나타내었다. 이 실험결과에 의하여 산초 잎 각 분획 (Scheme 8)에서 항산화활성이 가장 좋은 *n*-butanol 분획과 methylene chloride 분획을 선택하여 활성물질 분리를 시도하였다.

2) *n*-Butanol 분획으로부터 활성물질 분리

산초 잎 분획과정을 통해 얻은 각 분획에 대해 DPPH radical 소거활성, 지질과산화 억제활성, α -glucosidase와 APTT억제활성, 세포독성 등 여러 가지 활성을 측정한 결과 DPPH radical 소거활성이 우수한 *n*-buOH층을 flash column chromatography법으로 분리하였다. Column (I.D.; 75 × 9 cm)에 silica gel (230~400 mesh)을 약 40 cm 정도 채우고 100 % hexane으로 elution시켜 stationary phase를 균일한 상태로 만든 후, *n*-buOH 층 (360 g) 중 150 g을 silica gel (70~230 mesh) 300 g에 흡착시켜 column에 loading하였다. CH₂Cl₂ : MeOH (30 : 1)을 이동상으로 elution을 시작하여 CH₂Cl₂ : MeOH = 25:1, 20:1, 15:1, 10:1, 8:1, 6:1, 5:1, 4:1, 2:1, 1:1, 1:2 (gradient)로 elution시켜 fraction SL-Bu-A~W로 나누었다 (Table 32).

α -glucosidase 억제활성이 큰 분획 SL-Bu-C 분획(2.3 g)을 RP C18 column chromatography를 실시하였다. RP C18 (40~63 μ m)을 column (I.D.; 57 × 3.5 cm)에 약 20 cm정도 채우고 MeOH : H₂O = 1 : 8 혼합용액으로 elution시켜 균일한 상태로 만든 후 분획 약 1.0 g을 100 % methanol에 완전히 녹인 후 loading하여 methanol의 비율을 1 %씩 높이면서 elution시켜 SL-Bu-C-A 분획과 SL-Bu-C-B (1, 27 mg)을 분리하였다.

α -glucosidase 억제활성이 큰 또다른 SL-Bu-F 분획(4.0 g)은 RP C18 column chromatography를 실시하였다. RP C18 (40~63 μ m)을 column (I.D.; 57 \times 3.5 cm)에 약 22 cm정도 채우고 100 % methanol로부터 100 % H₂O까지 gradient로 활성화시킨 후 SL-Bu-F 4.0 g을 100 % methanol에 완전히 녹여 loading하고 methanol의 비율을 5 %씩 높이면서 elution시켜 SL-Bu-F-D 분획 약 0.3 g과 SL-Bu-F-F 분획 약 0.4 g을 얻었고 SL-Bu-F-A(2, 65 mg), SL-Bu-F-C(3, 113 mg), SL-Bu-F-E(4, 32 mg)를 분리하였다. SL-Bu-F-F 분획(0.4 g)에 대해 SiO₂ open column chromatography를 실시하였다. Column (I.D.; 53 \times 2.3 cm)에 silica gel (70 mesh 이하)을 약 15 cm 정도 채우고 100 % methylene chloride로 elution시켜 stationary phase를 균일한 상태로 만든 후, 시료(0.4 g)을 silica gel (70 mesh 이하) 약 60 mg에 흡착시켜 column에 loading하여 CH₂Cl₂ : MeOH = 15 : 1 혼합용액으로 elution시켜 SL-Bu-F-F-1(5, 20 mg)을 분리하였다.



Scheme 13. 산초 잎 *n*-butanol 분획의 활성물질 분리 과정

3) Methylene chloride 분획으로부터 활성물질 분리

산초 잎 methanol 추출물 분획 (Scheme 8) 중 세포독성이 큰 CH₂Cl₂ 층을 flash column chromatography를 실시하여 SL-MC-A~W까지 23개의 분획으로 나누었다. 그 중 세포독성이 큰 SL-MC-O, -R 그리고 SL-Bu-S 분획을 선택하여 SiO₂ column chromatography와 RP C-18 column chromatography를 반복 실시하여 화합물 6~17을 분리하였다. (Scheme 14, 15)

세포독성이 우수한 CH₂Cl₂ 층을 flash column chromatography법으로 분리한 과정은 다음과 같다. Column (I.D.; 75 × 9 cm)에 silica gel (230~400 mesh)을 약 40 cm 정도 채우고 100 % hexane으로 elution시켜 stationary phase를 균일한 상태로 만든 후, CH₂Cl₂층 (150 g) 중 100 g을 silica gel (70~230 mesh) 200 g에 흡착시켜 column에 loading하였다. 이 후 100 % hexane을 이동상으로 elution을 시작하여 hexane : EtOAc = 100:1, 80:1, 60:1, 40:1, 20:1, 15:1, 10:1, 8: 1, 6:1, 4:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:100 (gradient)으로 elution시켜 fraction SL-MC-A~W로 나누었다 (Table 33). SL-MC-D, SL-MC-H, SL-MC-I, SL-MC-J 분획에 대하여 각각 재결정하는 방법으로 SL-MC-D-A(6, 35 mg), SL-MC-H-A(7, 75 mg), SL-MC-J-A(8, 16 mg), SL-MC-I-1(10, 100 mg)을 분리하였다.

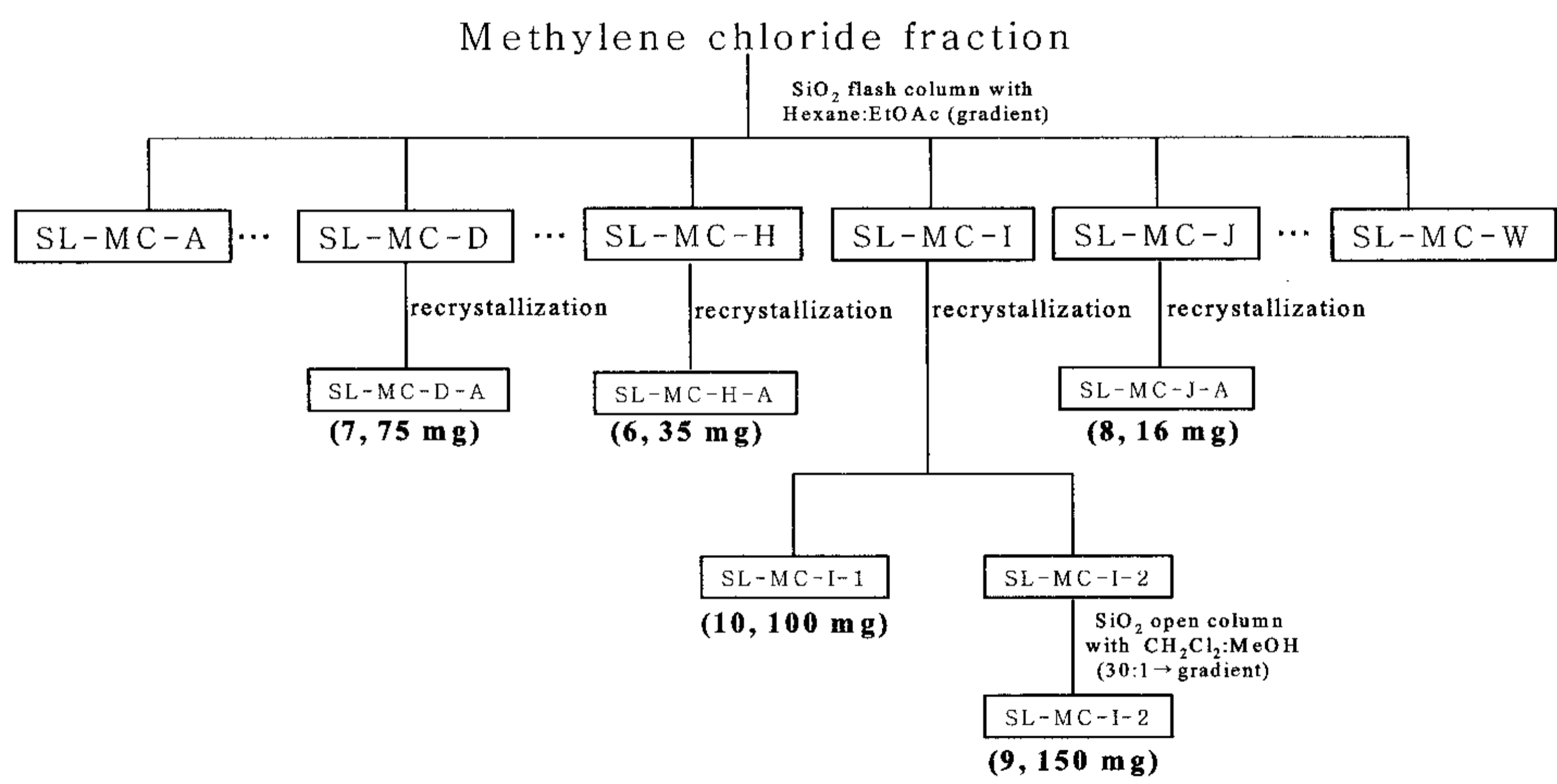
SL-MC-I 분획을 SiO₂ open column chromatography를 실시하였다. Column (I.D.; 53 × 2.3 cm)에 silica gel (70 mesh 이하)를 약 15 cm정도 채우고 100 % hexane으로 elution시켜 stationary phase를 균일한 상태로 만든 후 분획 약 200 mg을 silica gel (70 mesh 이하) 약 100 mg에 흡착시켜 column에 loading하여 CH₂Cl₂ : MeOH = 30 : 1 혼합용액으로 elution시켜 SL-MC-I-2(9, 150 mg)를 분리하였다.

활성이 가장 좋은 SL-MC-R 분획을 RP C18 column chromatography를 실시하였다. RP C18 (40~63 um)을 column (I.D.; 57 × 3.5 cm)에 약 20 cm정도 채우고 100 % MeOH로 elution시켜 균일한 상태로 만든 후 100 % MeOH로부터 MeOH : H₂O = 6 : 4까지 활성화 시킨 후 분획 약 1.1 g을 100 % MeOH에 완전히 녹인 후 loading 하여 MeOH의 비율을 5 %씩 높이면서 elution시켜 SL-MC-R-A~L까지 12개 분획으로 나누었으며, 그 중에서 SL-MC-R-O분획을 SiO₂ open column chromatography

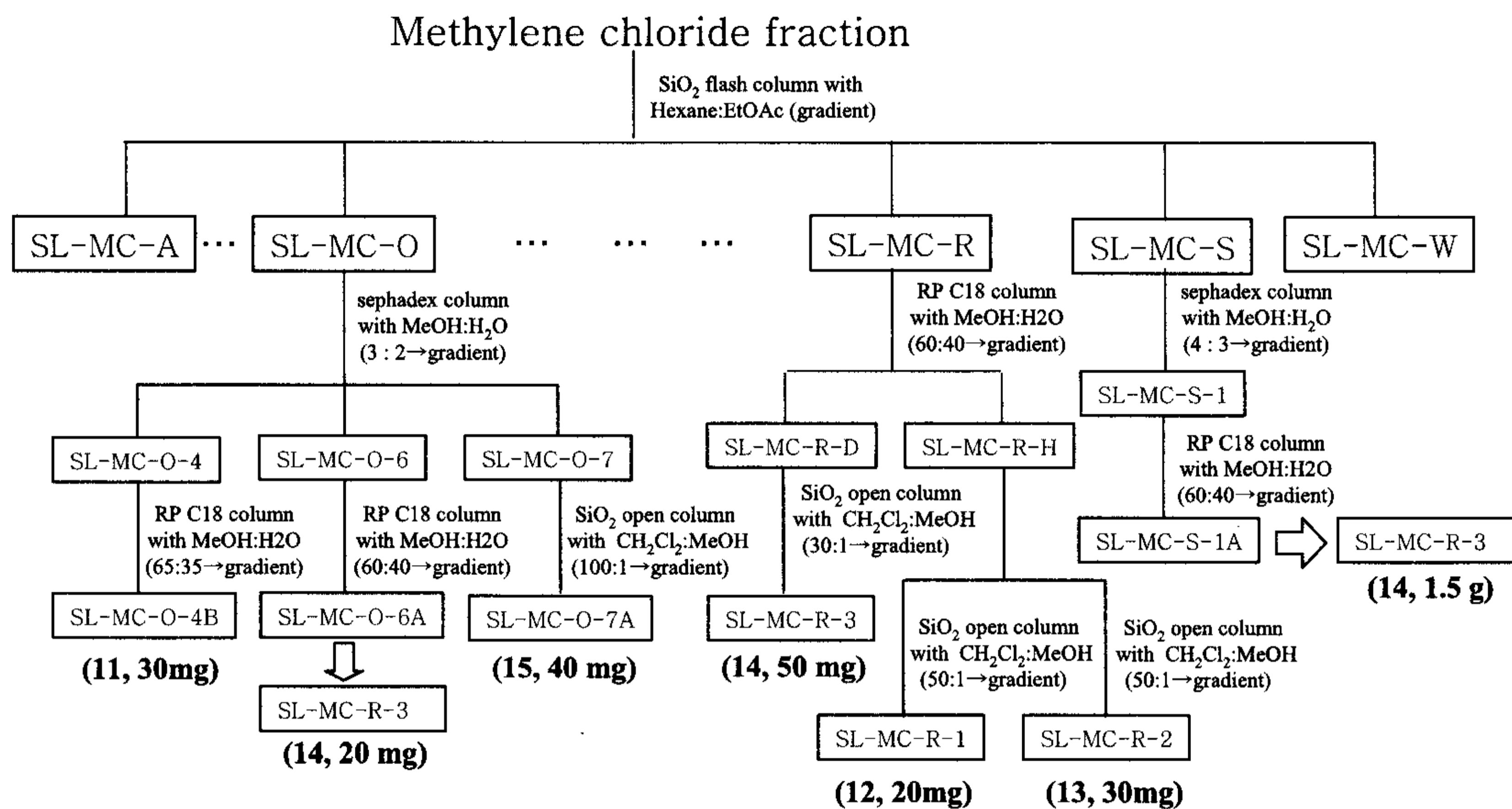
를 실시하였다. Column (I.D.; 53 × 2.3 cm)에 silica gel (70 mesh 이하)를 약 15 cm 정도 채우고 100 % CH₂Cl₂으로 elution시켜 stationary phase를 균일한 상태로 만든 후 분획 약 75 mg을 silica gel (70 mesh 이하) 약 40 mg에 흡착시켜 column에 loading하여 CH₂Cl₂ : MeOH = 30 : 1 혼합용액으로 elution시켜 SL-MC-R-3(14, 50 mg)를 분리하였다. 그리고 SL-MC-R-H를 SiO₂ open column chromatography를 실시하였다. Column (I.D.; 53 × 2.0 cm)에 silica gel (70 mesh 이하)를 약 15 cm 정도 채우고 100 % CH₂Cl₂으로 elution시켜 stationary phase를 균일한 상태로 만든 후 분획 약 75 mg을 silica gel (70 mesh 이하) 약 100 mg에 흡착시켜 column에 loading하여 CH₂Cl₂ : MeOH = 50 : 1 혼합용액으로 elution시켜 SL-MC-R-1(12, 20 mg)과 SL-MC-R-2(40 mg)을 분리하였다. SL-MC-R-2(40 mg)가 순수하지 않아 다시 SiO₂ open column chromatography를 실시하였다. Column (I.D.; 53 × 2.0 cm)에 silica gel (70 mesh 이하)를 약 15 cm 정도 채우고 100 % CH₂Cl₂으로 elution시켜 stationary phase를 균일한 상태로 만든 후 분획 약 40 mg을 silica gel (70 mesh 이하) 약 100 mg에 흡착시켜 column에 loading하여 CH₂Cl₂ : MeOH = 50 : 1 혼합용액으로 elution시켜 SL-MC-R-2-1(13, 30 mg)을 분리하였다.

또 하나의 활성이 좋은 분획인 SL-MC-O 분획을 선택하여 Sephadex LH-20 column chromatography를 실시하였다. Sephadex LH-20을 column (I.D.; 57 × 2.0 cm)에 약 40 cm 정도 채우고 100 % MeOH로 elution시켜 균일한 상태로 만든 후 100 % MeOH로부터 MeOH : H₂O = 3 : 2까지 활성화시킨 후 분획 약 1.2 g을 100 % MeOH에 완전히 녹인 후 loading하여 MeOH의 비율을 5 %씩 높이면서 elution시켜 SL-MC-O-1~10까지 10개 분획으로 나누었고 그중에서 SL-MC-O-4를 RP C18 column chromatography를 실시하였다. RP C18 (40~63 μm)을 column (I.D.; 57 × 2 cm)에 약 15 cm 정도 채우고 100 % MeOH로 elution시켜 균일한 상태로 만든 후 100 % MeOH로부터 MeOH : H₂O = 6 : 4까지 활성화 시킨 후 분획 약 146 mg을 100 % MeOH에 완전히 녹인 후 loading하여 MeOH : H₂O = 6 : 4로 elution시켜 SL-MC-O-4B 11, 30 mg)를 분리하였다. 그리고 SL-MC-O-6을 RP C18 column chromatography를 실시하였다. RP C18 (40~63 μm)을 column (I.D.; 57 × 2 cm)에 약 15 cm 정도 채우고 100 % MeOH로 elution시켜 균일한 상태로 만든 후 100 % MeOH

로부터 MeOH : H₂O = 6 : 4까지 활성화 시킨 후 분획 약 85 mg을 100 % MeOH에 완전히 녹인 후 loading하여 MeOH : H₂O = 6 : 4로 elution시켜 SL-MC-O-4B (SL-MC-R-3, 14, 20 mg)을 분리하였다. SL-MC-S 분획을 Sephadex LH-20 column chromatography를 실시하였다. Sephadex LH-20을 column (I.D.; 57 × 2.0 cm)에 약 40 cm정도 채우고 100 % MeOH로 elution시켜 균일한 상태로 만든 후 100 % MeOH로부터 MeOH : H₂O = 4 : 3까지 활성화시킨 후 분획 약 6.1 g을 100 % MeOH에 완전히 녹인 후 loading하여 MeOH의 비율을 5 %씩 높이면서 elution시켜 SL-MC-S-1~10까지 10개 분획으로 나누었고 그중에서 SL-MC-S-A를 RP C18 column chromatography를 실시하였다. RP C18 (40~63 μm)을 column (I.D.; 57 × 2 cm)에 약 15 cm정도 채우고 100 % MeOH로 elution시켜 균일한 상태로 만든 후 100 % MeOH로부터 MeOH : H₂O = 6 : 4까지 활성화 시킨 후 분획 약 1.5 g을 100 % MeOH에 완전히 녹인 후 loading하여 MeOH : H₂O = 6 : 4로 elution시켜 SL-MC-S-1A (SL-MC-R-3, 14, 1.3 mg)을 분리하였다. SL-MC-O에서 분리되어 나온 SL-MC-O-7을 SiO₂ open column chromatography를 실시하였다. Column (I.D.; 53 × 2.0 cm)에 silica gel (70 mesh 이하)를 약 15 cm정도 채우고 100 % CH₂Cl₂으로 elution시켜 stationary phase를 균일한 상태로 만든 후 분획 약 55 mg을 silica gel (70 mesh 이하) 약 100 mg에 흡착시켜 column에 loading하여 CH₂Cl₂ : MeOH = 100 : 1 혼합용액으로 elution시켜 SL-MC-O-7-A(15, 40 mg)을 분리하였다.



Scheme 14. 산초 잎 methylene chloride 분획의 활성물질 분리 과정-1



Scheme 15. 산초 잎 methylene chloride 분획의 활성물질 분리 과정-2

4) 분리된 화합물의 구조

n-BuOH층과 CH₂Cl₂층에 대하여 SiO₂ flash column chromatography를 실시하여 얻은 분획을 RP C18, SiO₂ 및 Sephadex LH-20 column chromatography를 반복 실시하여 17개의 화합물을 분리하였다. Phenylpropanoid 계열인 1, 2-propyl alcohol 배당체인 2, 특정된 계열에 속하지 않는 3, monoterpenoid 계열인 4와 5, triterpenoid 계열인 6과 7, 그리고 coumarin계열인 8과 10, β-sitosterol인 9 및 화합물 11~15을 분리하였으며, 이화학적 및 분광학적 방법으로 그 구조를 구명하였다. 분리된 물질 1~15의 구조는 Fig. 17~19에, 화합물명을 Table 34에 나타내었다.

Table 34. 분리 물질 1~15의 화합물명

Compound	Name
1	4-[(1 <i>E</i>)-3-hydroxy-1-propenyl]-2,6-dimethoxyphenol 1- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside (syringin)
2	2-propyl alcohol β -D-glucopyranoside
3	(6 <i>S</i> ,7 <i>E</i> ,9 <i>S</i>)-6,9-dihydroxy-4,7-megastigmadien-3-one 9- <i>O</i> - β -d-glucopyranoside (vomifoliol 9- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside)
4	(3 <i>R</i> ,6 <i>E</i>)-3,7-dimethyl-3,8-dihydroxy-oct-1,6-dien 8- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside
5	(3 <i>R</i> ,6 <i>E</i>)-3,7-dimethyl-3,8-dihydr-oxy-oct-1,6-dien 3- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside cnidioside
6	20(29)-lupen-3-ol (lupeol)
7	20(29)-lupen-3-one (lupeone)
8	bergapten
9	β -sitosterol
10	7-[(3,7-Dimethyl-2,6-octa-dienyl)oxy]-coumarin (auraptene)
11	6,7-Dimethoxy-2H-naphthalen-1-one
12	4-[4-(3-Hydroxy-propenyl)-phenoxy]-2-methyl-but-2-en-1-ol
13	4-[4-(3-Hydroxy-propyl)-phenoxy]-2-methyl-but-2-en-1-ol
14	2-(2-Methoxy-non-1-enyl)-benzoic acid
15	8-Hydroxy-7-methoxy-chromen-2-one

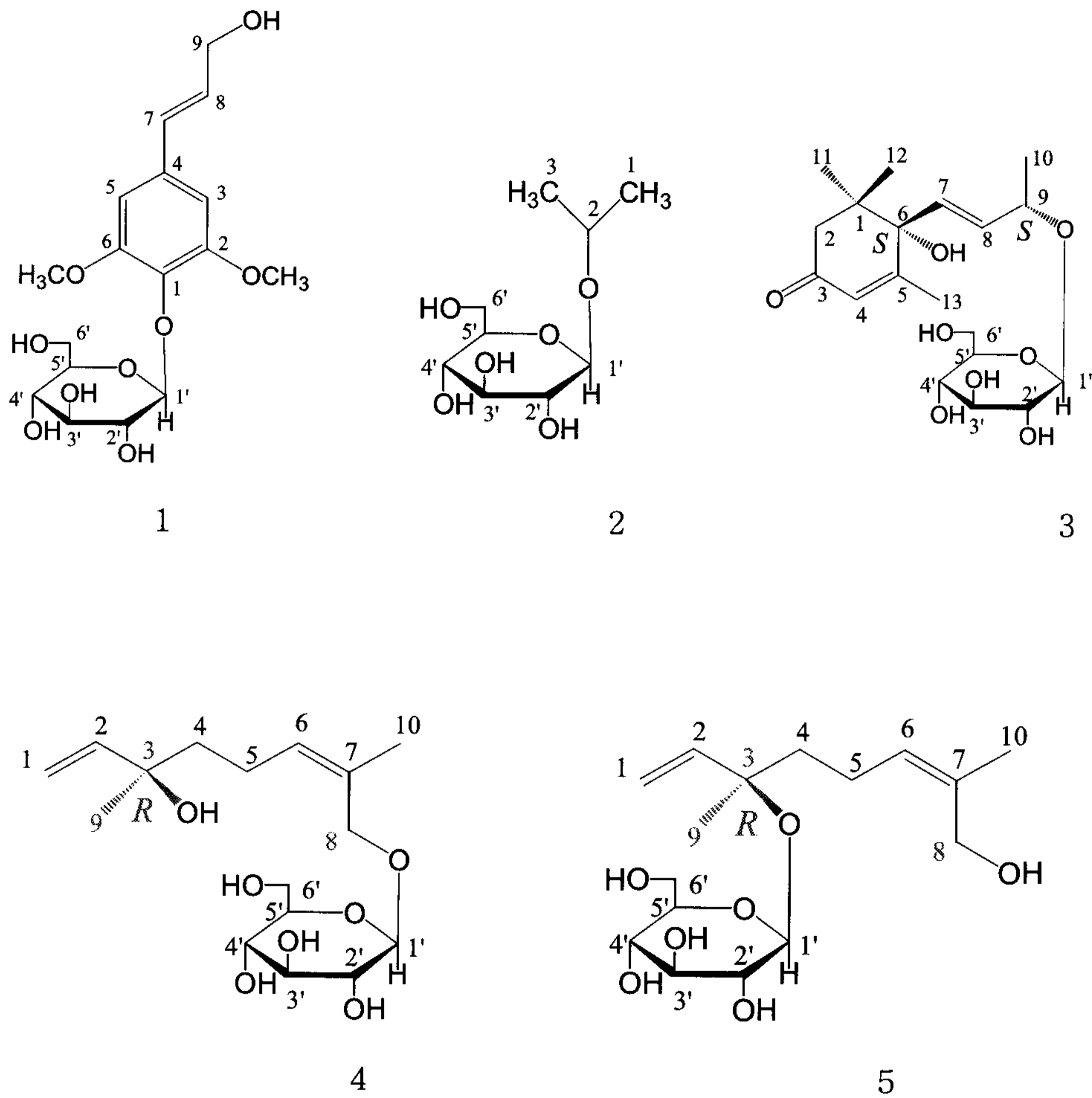


Fig. 17. 산초 잎 *n*-BuOH 분획에서 분리된 물질 1~5의 구조.

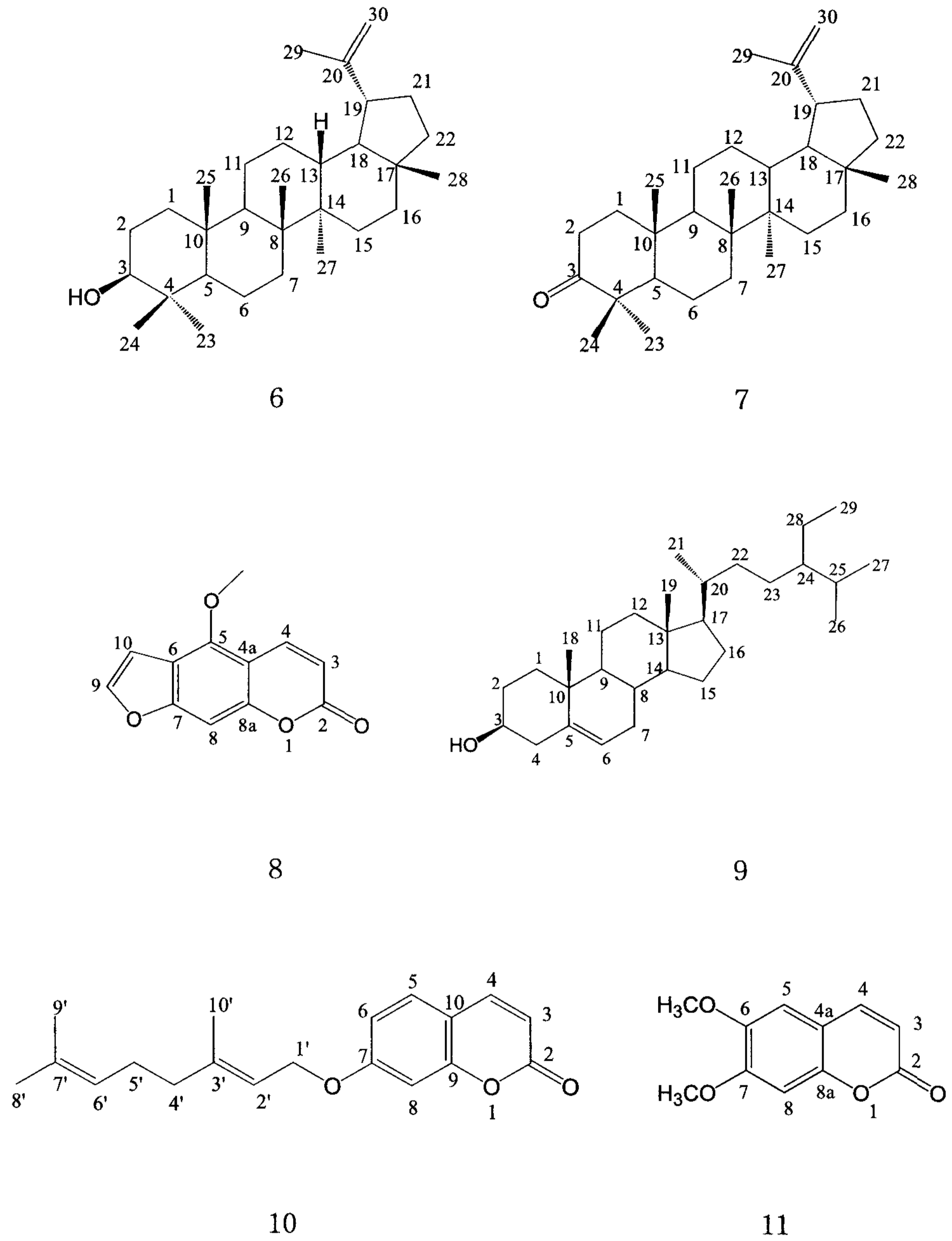
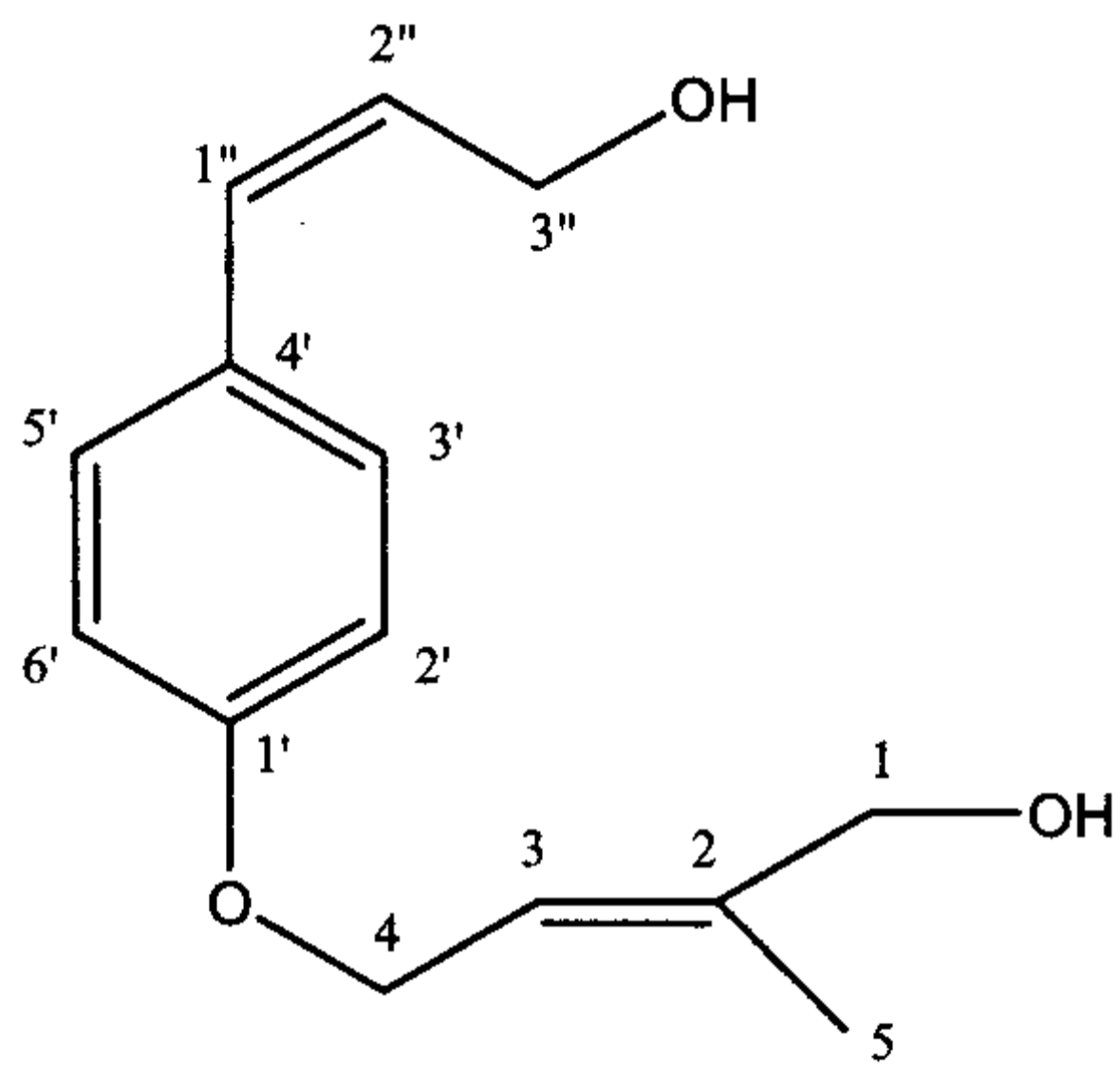
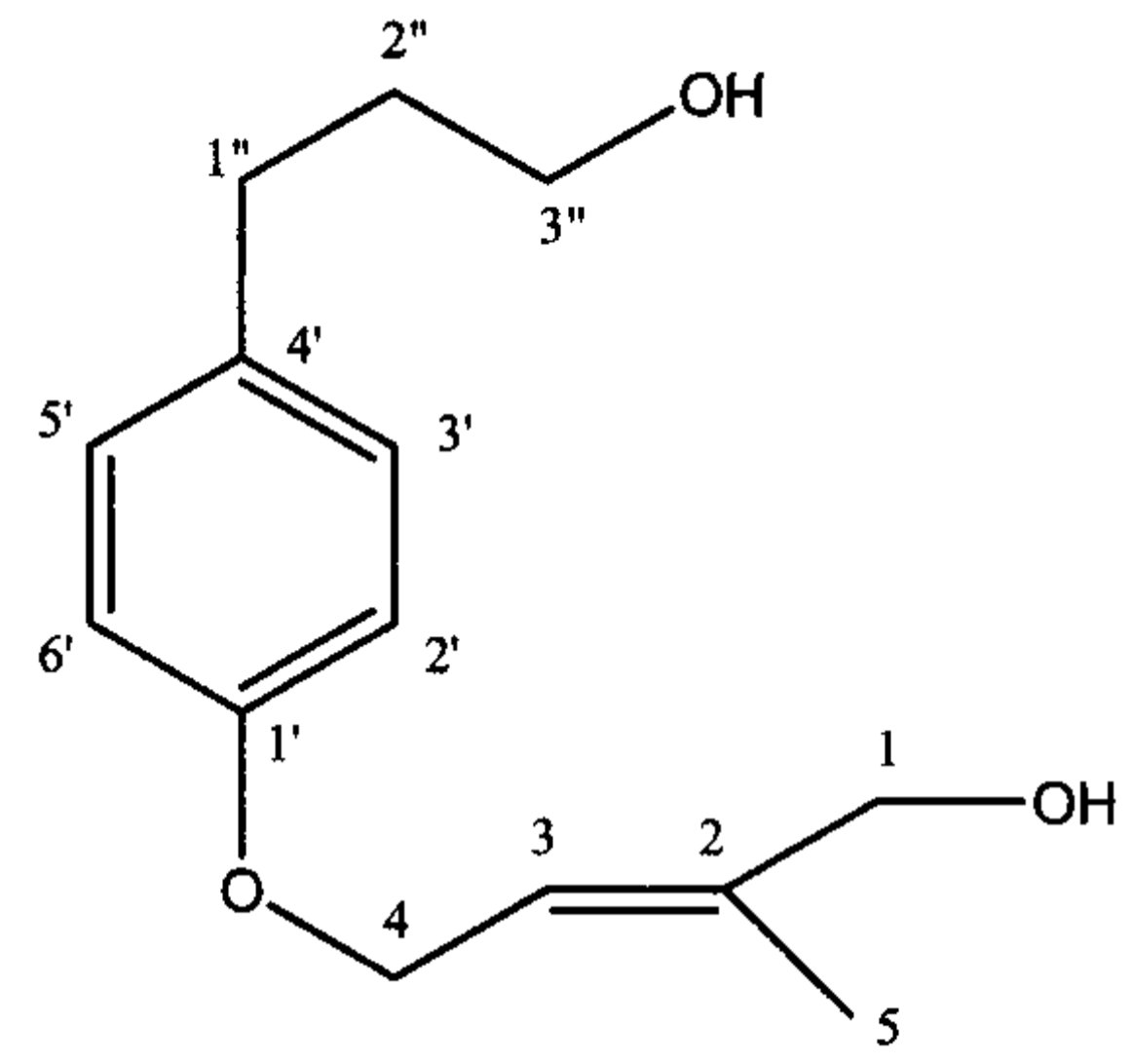


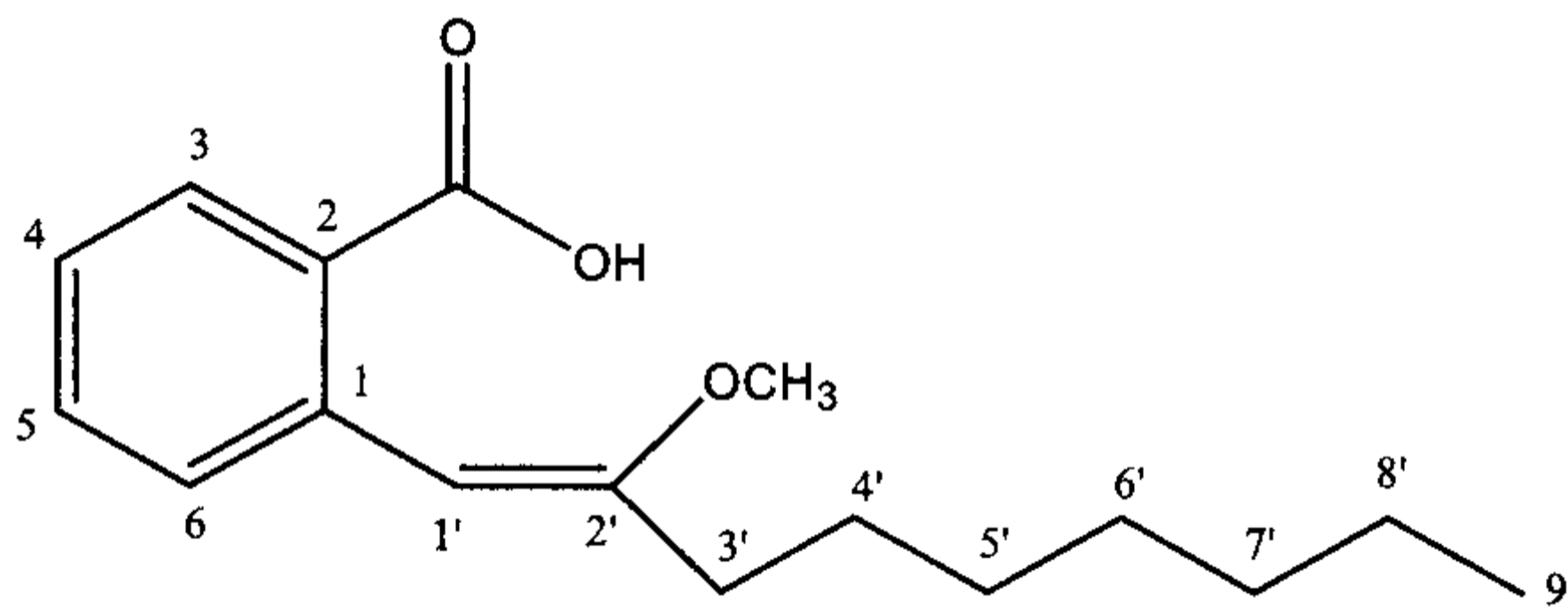
Fig. 18. 산초 잎 CH_2Cl_2 분획에서 분리된 물질 6~11의 구조.



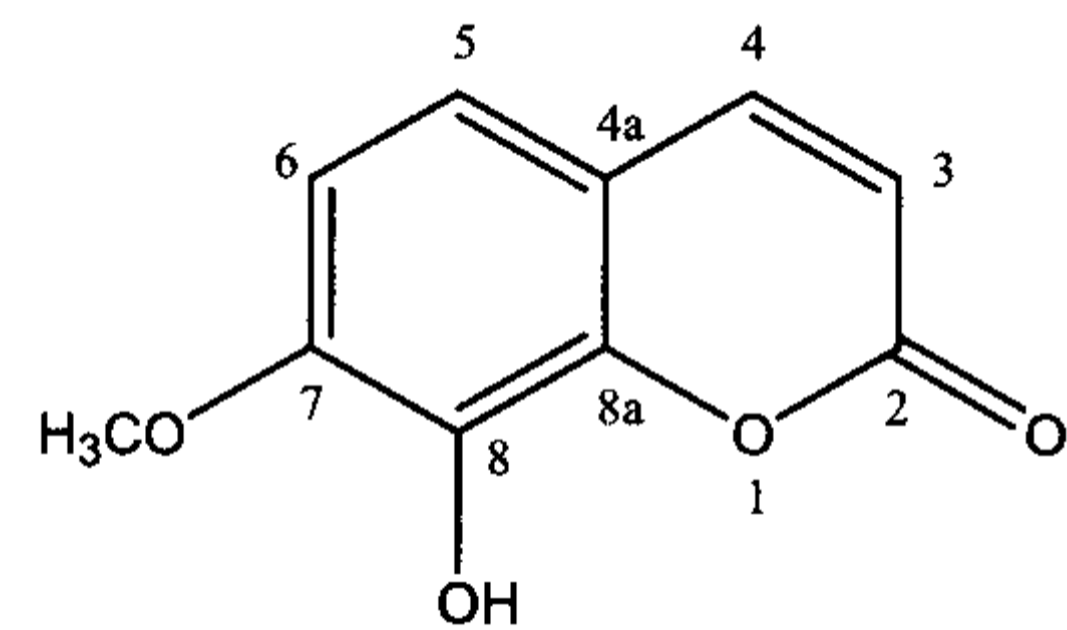
12



13



14



15

Fig. 19. 산초 잎 CH_2Cl_2 분획에서 분리된 물질 12~15의 구조.

5) 분리한 화합물의 물리화학적 및 분광학적 data

Compound 1

mp : 191.0~192.2 °C; $[\alpha]_D^{25}$: -18° (0.10 %, MeOH); UV λ_{max} (MeOH) nm (ϵ) : 229.0 (25,761), 267.5 (17,261); IR (KBr) cm^{-1} : 3,432, 3,390, 3,304 (OH), 1,588, 1,420 (aromatic ring), 1,133, 1,092 (C-O); Mass (EI) m/z (rel. int.) : 210 ($[M-gluc.]^+$, 100); Mass (FAB) m/z (rel. int.): 391.4 ($[M+H+H_2O]^+$, 40); 1H -NMR (CD₃OD, 250 MHz) δ : 6.74 (1H, s, H-3), 6.74 (1H, s, H-5), 6.54 (1H, d, $J=15.9$ Hz, H-7), 6.31 (1H, dt, $J=15.8, 5.5$ Hz, H-8), 4.21 (2H, d, $J=5.4$ Hz, H-9), 4.86 (1H, d, H-1'), 3.85 (3H, s, H-2-OMe), 3.85 (3H, s, H-6-OMe); ^{13}C -NMR (CD₃OD, 62.5 MHz) δ : 135.8 (C-1), 154.3 (C-2), 105.4 (C-3), 135.2 (C-4), 105.4 (C-5), 154.3 (C-6), 131.3 (C-7), 130.0 (C-8), 63.6 (C-9), 105.3(C-1'), 75.7 (C-2'), 78.3 (C-3'), 71.3 (C-4'), 77.8 (C-5'), 62.6 (C-6').

Compound 2

$[\alpha]_D^{25}$: -8.1° (0.10 %, MeOH); UV λ_{max} (EtOH) nm (ϵ) : 201.5 (444), 238.0 (78); IR (KBr) cm^{-1} : 3,401 (OH), 2,974, 2,925, 2,882 (C-H), 1,383 (CH₃), 1,077, 1038 (C-O); Mass (FAB) m/z (rel. int.) : 245 ($[M+Na]^+$, 100), 223.1 ($[M+H]^+$, 4), 163.3 (10), 145.4 (9), 127.6 (6); 1H -NMR (CD₃OD, 250 MHz) δ : 1.12 (3H, d, $J=6.2$ Hz, H-1), 3.37 (1H, m, H-2), 1.08 (3H, d, $J=6.2$ Hz, H-3), 4.23 (1H, d, $J=7.8$ Hz, H-1'); ^{13}C -NMR (CD₃OD, 62.5 MHz) δ : 23.3 (C-1), 72.5 (C-2), 22.0 (C-3), 102.5(C-1'), 75.1 (C-2'), 78.0 (C-3'), 71.7 (C-4'), 77.8 (C-5'), 62.8(C-6').

Compound 3

mp : 152.5~153.8 °C; $[\alpha]_D^{25}$: +32° (0.10 %, MeOH); UV λ_{max} (MeOH) nm (ϵ) : 200.5 (15,198), 235.0 (16,289), 327.5 (1,775); IR (KBr) cm^{-1} : 3,428 (OH), 2,970, 2,972, 2,876 (C-H), 1,651 (C=O), 1,428 (C=C), 1,373 (CH₃), 1,076, 1,038 (C-O); Mass (FAB) m/z (rel. int.) : 409.3 ($[M+Na]^+$, 27) 387.3 ($[M+H]^+$, 16) 307.1 (7), 289.2 (7), 225.1 (43), 207.1 (100), 154.3 (67), 136.5 (50); 1H -NMR (CD₃OD, 250 MHz) δ : 2.52

(1H, d, $J=17.0$ Hz, H-2a), 2.08 (1H, d, $J=17.0$ Hz, H-2b), 5.77 (1H, s, H-3), 5.90 (1H, d, $J=15.4$ Hz, H-7), 5.63 (1H, dd, $J=15.4, 7.1$ Hz, H-8), 4.45 (1H, m, H-9), 1.20 (3H, d, $J=6.4$ Hz, H-10), 0.92 (3H, s, H-11), 0.94 (3H, s, H-12), 1.84 (3H, d, $J=1.4$ Hz, H-13), 4.18 (1H, d, $J=7.4$ Hz, H-1'); ^{13}C -NMR (CD_3OD , 62.5 MHz) δ : 42.4 (C-1), 50.7 (C-2), 201.3 (C-3), 127.1 (C-4), 167.1 (C-5), 80.0 (C-6), 133.6 (C-7), 133.7 (C-8), 74.6 (C-9), 22.3 (C-10), 23.5 (C-11), 24.7 (C-12), 19.6 (C-13), 101.2 (C-1'), 74.9 (C-2'), 78.3 (C-3'), 71.6 (C-4'), 78.2 (C-5'), 62.8 (C-6').

Compound 4

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$: -8.5° ($c=0.10$ %, MeOH); UV λ_{max} (MeOH) nm (ϵ) : 201.5 (20,036); IR (KBr) cm^{-1} : 3,429 (OH), 2,922 (C-H), 1,636 (C=C), 1,077 (C-O); Mass (FAB) m/z (rel. int.) : 355.06 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, 100), 333.05 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 3), 289.01 (4), 219.01 (3), 176.07 (11), 154.26 (43), 136.45 (35); ^1H -NMR (CD_3OD , 250 MHz) δ : 5.31 (1H, dd, $J=17.4, 1.5$ Hz, H-1a), 5.03 (1H, dd, $J=10.8, 1.5$ Hz, H-1b), 6.00 (1H, dd, $J=17.4, 10.8$ Hz, H-2), 1.53 (2H, dd, $J=9.1, 7.5$ Hz, H-4), 1.98 (2H, m, H-5), 5.47 (1H, t, $J=7.1$ Hz, H-6), 4.19 (1H, d, $J=11.9$ Hz, H-8a), 4.03 (1H, d, $J=11.9$ Hz, H-8b), 1.25 (3H, s, H-9), 1.68 (3H, s, H-10), 4.24 (1H, d, $J=7.8$ Hz, H-1'); ^{13}C -NMR (CD_3OD , 62.5 MHz) δ : 112.1 (C-1), 146.2 (C-2), 73.7 (C-3), 42.9 (C-4), 23.4 (C-5), 130.1 (C-6), 132.8 (C-7), 75.8 (C-8), 14.1 (C-9), 27.6 (C-10), 102.5 (C-1'), 75.0 (C-2'), 78.1 (C-3'), 71.7 (C-4'), 77.9 (C-5'), 62.7 (C-6').

Compound 5

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$: -9.5° ($c=0.10$ %, MeOH); UV λ_{max} (MeOH) nm (ϵ) : 200.5 (12,201); IR (KBr) cm^{-1} : 3,428 (OH), 2,923, 2,852 (C-H), 1,567, 1,457 (C=C), 1,106 (C-O); Mass (FAB) m/z (rel. int.) : 355 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, 5) 329 (5), 307 (41), 289 (23), 235 (7), 219 (7), 176 (15), 154 (100), 136 (100), 107 (30); ^1H -NMR (CD_3OD , 250 MHz) δ : 5.09 (1H, dd, $J=17.2, 1.5$ Hz, H-1a), 4.84 (1H, dd, $J=10.7, 1.5$ Hz, H-1b), 6.13 (1H, dd, $J=17.2, 10.7$ Hz, H-2), 1.74 (2H, t, $J=8.2$ Hz, H-4), 2.43 (2H, m, H-5), 5.50 (1H, t, $J=7.5$ Hz, H-6), 4.64 (1H, d, $J=11.4$ Hz, H-8a), 4.40 (1H, d, $J=11.4$ Hz, H-8b), 1.41

(3H, s, H-9), 1.89 (3H, s, H-10), 4.20 (1H, d, $J=7.7$ Hz, H-1'); ^{13}C -NMR (CD_3OD , 62.5 MHz) δ : 111.3 (C-1), 146.9 (C-2), 72.3 (C-3), 43.3 (C-4), 23.0 (C-5), 130.8 (C-6), 131.9 (C-7), 66.8 (C-8), 21.9 (C-9), 28.3 (C-10), 102.6 (C-1'), 75.1 (C-2'), 78.6 (C-3'), 71.7 (C-4'), 78.4 (C-5'), 62.8 (C-6').

Compound 6

mp : 202.1~203.8 °C; $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$: +27° ($c=0.10$ %, CH_2Cl_2); UV λ_{max} (CH_2Cl_2) nm (ϵ) : 226.0 (1,299); IR (KBr) cm^{-1} : 3,309 (OH), 2,944, 2,872, (C-H), 1,638 1,465 (C=C), 1,379 (CH_3), 1,041 (C-O); Mass (EI) m/z (rel. int.) : 426 ($[\text{M}]^+$, 100), 411 (27), 315 (20), 257 (18), 234 (24); ^{13}C -NMR (CDCl_3 , 62.5 MHz) δ : 38.7 (C-1), 27.4 (C-2), 79.0 (C-3), 38.8 (C-4), 55.3 (C-5), 18.3 (C-6), 34.2 (C-7), 40.8 (C-8), 50.4 (C-9), 37.1 (C-10), 20.9 (C-11), 25.1 (C-12), 38.0(C-13), 42.8 (C-14), 27.4 (C-15), 35.6 (C-16), 43.0 (C-17), 48.0 (C-18), 48.3 (C-19), 151.0 (C-20), 29.8 (C-21), 40.0 (C-22), 28.0 (C-23), 15.4 (C-24), 16.1 (C-25), 15.9 (C-26), 14.5 (C-27), 18.0 (C-28), 19.3 (C-29), 109.3 (C-30).

Compound 7

mp : 168.2~170.1 °C; $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$: +60° ($c=0.10$ % CH_2Cl_2); UV λ_{max} (CH_2Cl_2) nm (ϵ) : 227.5 (975); IR (KBr) cm^{-1} : 2,975, 2,941, 2,856 (C-H), 1,704 (C=O), 1,643 1,453 (C=C), 1,381 (CH_3), 896 (=C-H); Mass (EI) m/z (rel. int.) : 424 ($[\text{M}]^+$, 73); lupeone 409 (25), 368 (12), 313 (31), 245 (26); ^{13}C -NMR (CDCl_3 , 62.5 MHz) δ : 39.6 (C-1), 34.1 (C-2), 218.2 (C-3), 47.3 (C-4), 54.9 (C-5), 19.6 (C-6), 33.5 (C-7), 40.7 (C-8), 49.7 (C-9), 36.8 (C-10), 21.4 (C-11), 25.1 (C-12), 36.8 (C-13), 42.8 (C-14), 27.4 (C-15), 35.5 (C-16), 43.0 (C-17), 48.2 (C-18), 47.9 (C-19), 150.9 (C-20), 29.8 (C-21), 39.9 (C-22), 26.6 (C-23), 21.0 (C-24), 16.0 (C-25), 15.7 (C-26), 14.4 (C-27), 18.0 (C-28), 109.4 (C-29), 19.3 (C-30).

Compound 8

mp : 187.4~188.9 °C; $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$: -29° ($c=0.10$ %, CH_2Cl_2); UV λ_{max} (CH_2Cl_2) nm

(ϵ) : 230.5 (18,295), 251.5 (21,686), 269 (21,837), 307 (16,038); IR (KBr) cm^{-1} : 2,957, 2,927 (C-H), 1732 (C=O), 1,625 1,471 (C=C), 1,360 (CH_3), 1,123 (C-O), 838 (=C-H); Mass (EI) m/z (rel. int.) : 216 ($[\text{M}]^+$, 100), 201 (29), 188 (12), 173 (45), 145 (18), 81 (12), 69 (24); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 250 MHz) δ : 8.12 (1H, d, $J=9.8$ Hz, H-3), 6.24 (1H, d, $J=9.8$ Hz, H-4), 7.09 (1H, s, H-8), 7.56 (1H, d, $J=2.4$ Hz, H-9), 6.99 (1H, d, $J=2.2$ Hz, H-10), 4.24 (3H, s, H-5-OMe); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 62.5 MHz) δ : 161.2 (C-2), 139.3 (C-3), 112.5 (C-4), 106.3 (C-4a), 149.5 (C-5), 112.5 (C-6), 158.3 (C-7), 93.8 (C-8), 152.6 (C-8a), 144.8 (C-9), 105.0 (C-10), 60.0 (C-OMe).

Compound 9

mp : 139.6~140.9 $^{\circ}\text{C}$; $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$: -37° ($c=0.10$ %, CH_2Cl_2); UV λ_{max} (CH_2Cl_2) nm (ϵ) : 227.5 (269); IR (KBr) cm^{-1} : 3,428 (OH), 2,937, 2,867 (C-H), 1,465 (C=C), 1,380 (CH_3), 1,054 (C-O); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 62.5 MHz) δ : 37.2 (C-1), 31.6 (C-2), 71.8 (C-3), 42.3 (C-4), 140.7 (C-5), 121.7 (C-6), 32.2 (C-7), 31.9 (C-8), 50.1 (C-9), 36.5 (C-10), 21.1 (C-11), 39.7 (C-12), 42.3 (C-13), 56.7 (C-14), 24.3 (C-15), 28.2 (C-16), 56.0 (C-17), 11.9 (C-18), 19.3 (C-19), 36.1 (C-20), 18.8 (C-21), 33.9 (C-22), 26.0 (C-23), 45.8 (C-24), 29.1 (C-25), 19.8 (C-26), 19.0 (C-27), 23.0 (C-28), 11.8 (C-29).

Compound 10

UV λ_{max} (CH_2Cl_2) nm (ϵ) : 227.5 (8,627), 326.0 (15,645); IR (KBr) cm^{-1} : 2,973, 2,897, 2,879 (C-H), 1729 (C=O), 1,612 1,453 (C=C), 1,348 (CH_3), 1,127 (C-O), 853 (=C-H); Mass (EI) m/z (rel. int.) : 298 ($[\text{M}]^+$, 1), 162 (48), 136 (20), 134 (30), 212 (6); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 250 MHz) δ : 7.60 (1H, d, $J=9.5$ Hz, H-3), 6.20 (1H, d, $J=9.5$ Hz, H-4), 6.83 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H-5), 7.33 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H-6), 6.79 (1H, s, H-8), 4.56 (1H, d, $J=8.2$ Hz, H-1'), 5.43 (1H, t, $J=6.6$ Hz, H-2'), 2.07 (2H, s, H-4'), 2.07 (2H, s, H-5'), 5.05 (1H, m, H-6'), 1.60 (3H, s, H-8'), 1.63 (3H, s, H-9'), 1.73 (3H, s, H-10'); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 62.5 MHz) δ : 161.2 (C-2), 143.4 (C-3), 112.3 (C-4), 113.2 (C-5), 128.6 (C-6), 162.1 (C-7), 101.5 (C-8), 155.8 (C-8a),

16.7 (C-4a), 65.4 (C-1'), 118.3 (C-2'), 142.3 (C-3'), 39.4 (C-4'), 26.2 (C-5'), 123.5 (C-6') 131.9 (C-7'), 17.6 (C-8'), 25.6 (C-9'), 16.7 (C-10').

Compound 11

mp : 144.5~145.9 °C; $[\alpha]_D^{25}$: -19.1° (c=0.2 %, CH₂Cl₂); UV λ_{max} (CH₂Cl₂) nm (ϵ) : 240.0 (2,455), 296.5 (901), 346.0 (1867); IR (KBr) cm⁻¹ : 2,921, 2,850 (C-H), 1724 (C=O), 1,617 1,448 (C=C), 1,382 (CH₃), 1,137 (C-O), 846 (=C-H); Mass (EI) m/z (rel. int.); Mass (EI) m/z (rel. int.) : 206 ([M]⁺, 100), 191 (39), 163 (27), 149 (9), 135 (14); ¹H-NMR (CDCl₃, 250 MHz) δ : 7.60 (1H, d, J =9.4 Hz, H-4), 6.81 (H, s, H-5), 6.83 (H, s, H-8), 6.25 (1H, d, J =9.4 Hz, H-3), 3.92 (3H, s, H-OCH₃), 3.89 (3H, s, H-OCH₃); ¹³C-NMR (CDCl₃, 62.5 MHz) δ : 161.4 (C-2), 152.7 (C-6), 149.9 (C-7), 146.3 (C-4a), 143.3 (C-8a), 113.5 (C-4), 111.4 (C-3), 107.9 (C-8), 99.9 (C-5), 56.3 (C-OCH₃), 56.3 (C-OCH₃).

Compound 12

mp : 52~53 °C; $[\alpha]_D^{25}$: -7° (c=0.2 %, CH₂Cl₂); UV λ_{max} (CH₂Cl₂) nm (ϵ) : 266.5 (11,007); IR (KBr) cm⁻¹ : 3,293, (-OH), 2,921, 2,854 (C-H), 1,606 1,457 (C=C), 1,396 (CH₃), 1,022 (C-O), 802 (=C-H); Mass (EI) m/z (rel. int.); Mass (EI) m/z (rel. int.) : 234 ([M]⁺, 2), 173 (9), 133 (6), 91 (7), 57 (10); ¹H-NMR (CDCl₃, 250 MHz) δ : 7.26 (2H, d, J =8.7 Hz, H-2, 6), 6.24 (2H, d, J =8.7 Hz, H-3, 5), 6.53 (1H, d, J =15.9 Hz, H-1'), 6.21 (1H, td, J =15.8, 5.9 Hz, H-2'), 5.75 (1H, d, J =6.4 Hz, H-2''), 4.57 (2H, d, J =6.3 Hz, H-3'), 4.27 (2H, d, J =5.8 Hz, H-1''), 4.06 (2H, s, H-4''), 1.74 (3H, s, H-5''); ¹³C-NMR (CDCl₃, 62.5 MHz) δ : 158.4 (C-1), 140.1 (C-4), 130.9 (C-1'), 129.5 (C-3''), 127.6 (C-2), 127.6 (C-6), 126.2 (C-2'), 119.7 (C-2''), 114.7 (C-3), 114.7 (C-5), 67.8 (C-4''), 64.3 (C-3'), 63.9 (C-1''), 14.0 (C-5'').

Compound 13

mp : 57~58 °C; $[\alpha]_D^{25}$: -32.6° (c=0.1 %, CH₂Cl₂); UV λ_{max} (CH₂Cl₂) nm (ϵ) : 240 (9,945), 279 (6,563); IR (KBr) cm⁻¹ : 3,359, (-OH), 2,925, 2,854 (C-H), 1,610

1,463 (C=C), 1,388 (CH₃), 1,037 (C-O), 813 (=C-H); Mass (EI) *m/z* (rel. int.) : 236 ([M]⁺, 5.8), 152 (83.4), 134 (51.6), 107 (100), 84 (24.1); ¹H-NMR (CDCl₃, 250 MHz) δ: 7.08 (2H, d, *J*=8.4 Hz, H-2, 6), 6.21 (2H, d, *J*=8.5 Hz, H-3, 5), 5.74 (1H, t, *J*=6.5 Hz, H-2''), 4.54 (2H, d, *J*=6.4 Hz, H-1''), 4.05 (2H, s, H-4''), 3.64 (2H, t, *J*=6.4 Hz, H-3''), 2.62 (2H, t, *J*=7.5 Hz, H-1'), 1.89~1.78 (2H, m, H-2'), 1.73 (3H, s, H-5''); ¹³C-NMR (CDCl₃, 62.5 MHz) δ: 156.8 (C-1), 139.9 (C-4), 134.0 (C-3''), 129.3 (C-2), 129.3 (C-6), 120.0 (C-2''), 114.5 (C-3), 114.5 (C-5), 67.8 (C-4'), 64.3 (C-1''), 62.2 (C-3'), 34.4 (C-1'), 31.1 (C-2'), 14.0 (C-5'').

Compound 14

mp : 63~64 °C; [α]_D²⁵ : -3.8° (c=0.5 %, CH₂Cl₂); UV λ_{max} (CH₂Cl₂) nm (ε) : 245 (28,873), 325 (17154), 339 (20,024); IR (KBr) cm⁻¹ : 3,448, (-OH), 2,921, 2,850 (C-H), 1,637 1,463 (C=C), 1,733 (C=O), 1,413 (CH₃); Mass (EI) *m/z* (rel. int.) : 276 ([M]⁺, 5.8), 156 (53.4), 186 (81.6), 173 (100), 84 (24.1); ¹H-NMR (CDCl₃, 250 MHz) δ: 8.39 (1H, dd, *J*=8.0, 1.5 Hz, H-3'), 7.60 (1H, ddd, *J*=8.7, 7.0, 1.6 Hz, H-5'), 7.44 (1H, d, *J*=8.6 Hz, H-6'), 7.30 (1H, dd, *J*=15.0, 7.8 Hz, H-4'), 6.16 (1H, s, H-1), 2.64 (2H, t, *J*=7.6 Hz, H-4), 1.67~1.56(2H, m, H-5), 1.37~1.25(4H, m, H-6~9), 0.85 (3H, t, *J*=6.9, H-10); ¹³C-NMR (CDCl₃, 62.5 MHz) δ: 177.7 (C-3), 154.7 (C-2'), 141.8 (C-2), 131.9 (C-6'), 126.5 (C-3'), 126.4 (C-1'), 123.2 (C-4'), 115.3 (C-5'), 111.0 (C-1), 34.7 (C-OCH₃), 34.1 (C-4), 31.6 (C-5), 29.2 (C-6), 28.9 (C-7), 28.4 (C-8) 22.5 (C-9), 14.0 (C-10).

Compound 15

mp : 173~174 °C; [α]_D²⁵ : -6.7° (c=0.2 %, CH₂Cl₂); IR (KBr) cm⁻¹ : 3,328, (-OH), 2,923, 2,852 (C-H), 1,457 (C=C), 1,698 (C=O), 1,457 (CH₃); Mass (EI) *m/z* (rel. int.) : 192 ([M]⁺, 100), 177 (23.0), 164 (20.7), 149 (23.4), 146 (10.1); ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ: 7.63 (2H, d, *J*=9.2 Hz, H-4), 7.12 (2H, d, *J*=8.4 Hz, H-6), 6.90 (2H, d, *J*=8.4 Hz, H-9), 6.25 (2H, d, *J*=9.2 Hz, H-8), 4.13 (3H, s, H-OCH₃); ¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ: 160.3 (C-2), 152.0 (C-8), 147.1 (C-4a), 144.2 (C-4), 133.6 (C-7), 123.3 (C-5), 113.2 (C-8a), 112.7 (C-3), 112.0 (C-6), 61.8 (C-OCH₃).

6) 분리한 화합물의 구조 결정

분리한 화합물 1~15에 대한 구조는 1D 및 2D NMR (DEPT, HMQC, HMBC, ^1H - ^1H -COSY)을 이용하여 결정하였다. 대표적으로 천연에서 처음으로 분리된 신물질인 화합물 4에 대한 구조결정과정을 다음에서 설명하고자 한다.

화합물 4는 무색의 점성의 액체이다. IR spectrum (Fig. 20)에서 $3,429\text{ cm}^{-1}$ 에서 OH, $2,922\text{ cm}^{-1}$ 에서 C-H stretching band, $1,636\text{ cm}^{-1}$ 에서 C=C의 흡수 band를 확인하였고, $1,077\text{ cm}^{-1}$ 에서 C-O의 stretching 흡수 peak를 확인하였다. 이 화합물의 FABMS spectrum (Fig. 20)에서는 m/z 355에서 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ion peak를 확인하였다.

화합물 4의 ^1H NMR spectrum (Fig. 21, Table 35)를 살펴보면 δ 5.47 (1H, t, $J=7.1\text{ Hz}$)에서 H-6의 proton이 triplet으로, δ 5.31 (1H, dd, $J=17.4, 1.5\text{ Hz}$)와 δ 5.03 (1H, dd, $J=10.8, 1.5\text{ Hz}$)에서 H-1의 두개의 이중결합 proton이 각각 double doublet으로 나타났고 δ 1.53 (2H, dd, $J=9.1, 7.5\text{ Hz}$)에서 H-4의 proton이 doublet으로 나타났고 δ 2.08에서 H-5의 proton이 multiplet으로 나타났다. H-2 (δ 6.00)는 coupling constant가 17.4와 10.8 Hz로 인접한 H-1a (δ 5.31)과, H-1b (δ 5.03)의 coupling으로 double doublet으로 나타남을 알 수 있다. H-6 (δ 5.47)의 proton은 coupling constant가 7.1 Hz로 바로 인접한 두 개의 H-5 (δ 2.08)와의 coupling으로 triplet으로 나타났다.

^{13}C NMR spectrum (Fig. 21, Table 35)에서 4개의 olefinic carbons을 δ 112.1~146.2에서 확인하였고, δ 75.8과 δ 73.7에서 OH의 영향으로 down-field shift된 C-8과 C-3을 확인하였다. δ 102.5에서 anomeric carbon을 확인하였으며 DEPT spectrum (Fig. 22)에서 δ 132.8 (C-7)과 δ 73.7 (C-3)이 4급 탄소임을 확인하였고, δ 146.2 (C-2)와, δ 130.1 (C-6)이 3급 탄소임을 확인하였으며 δ 112.1 (C-1), δ 42.9 (C-4), δ 23.4 (C-5)의 carbon이 2급 탄소임을 확인하였다.

HMQC spectrum (Fig. 23)에서 δ 146.2의 C-2와 δ 6.00의 H-2가 correlation하고, δ 130.1의 C-6이 δ 5.47의 H-6, δ 112.1의 C-1과 δ 5.31, δ 5.03의 H-1이 correlation,

δ 42.9의 C-4와 δ 1.43의 H-4, δ 27.6의 C-10과 δ 1.68의 H-10이 correlation함을 확인하였다.

HMBC spectrum (Fig. 23)에서 δ 6.00의 H-2가 δ 73.7의 C-3과 correlation하고, δ 5.47의 H-6은 δ 27.6의 C-10, δ 23.4의 C-5, δ 75.8의 C-8과 correlation, δ 4.19, δ 4.03의 H-8은 δ 27.6의 C-10, δ 130.1의 C-6, δ 132.8의 C-7과 correlation하고 있음을 확인하였다.

COSY spectrum (Fig. 24)에서 δ 6.00의 H-2는 δ 5.31, δ 5.03의 H-1과 correlation하고, δ 5.47의 H-6은 δ 1.53의 H-4, δ 2.08의 H-5와 correlation하며 δ 2.08의 H-5와 δ 1.53의 H-4가 correlation한다.

이중결합은 *cis*(*Z*)와 *trans*(*E*)의 2종의 이성질체를 가지는데 이 두 이성질체의 구별은 NMR spectrum으로 가능하다. ^{13}C NMR spectrum에서 이중결합을 하고 있는 탄소에 인접한 탄소들의 chemical shift가 *trans*(*E*)의 경우 32-33 ppm에서, *cis*(*Z*)의 경우 27-28 ppm에서 나타난다.²⁵⁾ 화합물 4에서 C-5의 chemical shift는 δ 23.4에서 나타났기에 *cis* (*6Z*)의 입체구조를 가짐을 알 수 있다.

화합물 4의 ^{13}C NMR chemical shift는 3*S* 구조를 갖는 betulalbuside A의 chemical shift와 완전히 일치하였지만 Table 35에서와 같이 CD_3OD 용매에서 측정한 ^1H NMR spectrum에서 H-1, 2의 chemical shift 및 H-4의 splitting pattern이 일치하지 않았다. 화합물 4에서 H-4는 δ 1.53에서 dd ($J=9.1, 7.5$ Hz)로 나타났고 betulalbuside A에서는 δ 1.54에서 multiple으로 나타났다. 화합물 4의 H-1a와 H-2를 제외한 나머지 proton의 chemical shift는 betulalbuside A의 대응하는 proton과 일치하였지만 H-1b와 H-2의 chemical shift값이 betulalbuside A에 비하여 0.1 ppm downfield shift되어 나타났다. 그리고 화합물 4의 비선광도는 -8.5° 이고 betulalbuside A의 비선광도는 -32.7° 로서 화합물 4와 다르다.[49] 이상의 차이점으로부터 화합물 4의 C-3의 입체구조는 betulalbuside A의 (3*S*, 6*E*)체와 다른 (3*R*, 6*Z*)체로 추정한다.[54~58]

H. Morikawa 등은 betulalbuside A의 C-3의 절대입체구조는 선풍도를 기지물질과 비교하는 방법으로 결정하였다. 시판되고 있는 (3*R*)-(-)-linalool을 SeO₂로 산화시켜 얻은 (3*R*)-(-)-dimethylcata-1,6-diene-3,8-diol의 비선풍도를 측정하여 -8.60°을 얻었고, betulalbuside A를 효소 가수분해하여 얻은 화합물을 선풍도를 측정하여 +7.59°를 얻었으므로 betulalbuside A의 C-3의 입체구조는 (3*R*)-(-)-linalool의 C-3의 입체구조와 다른 S체임을 확인하였다.[58]

이상의 결과로부터 이 화합물은 C₁₆H₂₈O₇의 분자식을 가지며 (3*R*, 6*Z*)-3,7-dimethyl-3,8-dihydroxy-oct-1,6-dien-8-*O*-β-D-glucopyranoside임을 확인하였다. 천연에서 분리된 화합물로는 (3*S*, 6*E*)의 입체구조를 가진 betulalbuside A이며[58], (3*R*, 6*Z*)의 입체구조를 갖는 화합물 4는 천연에서 처음 분리되었다.

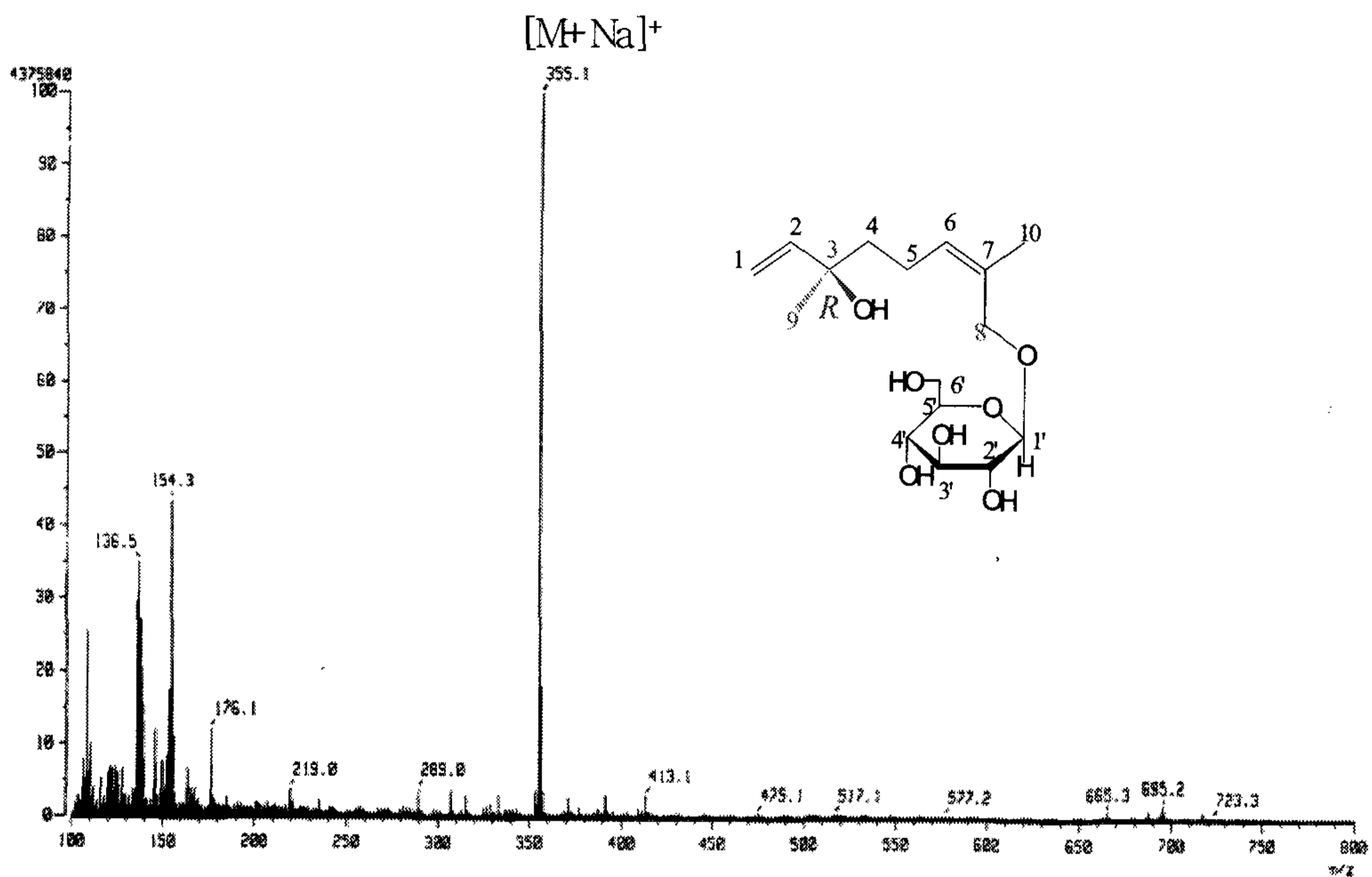
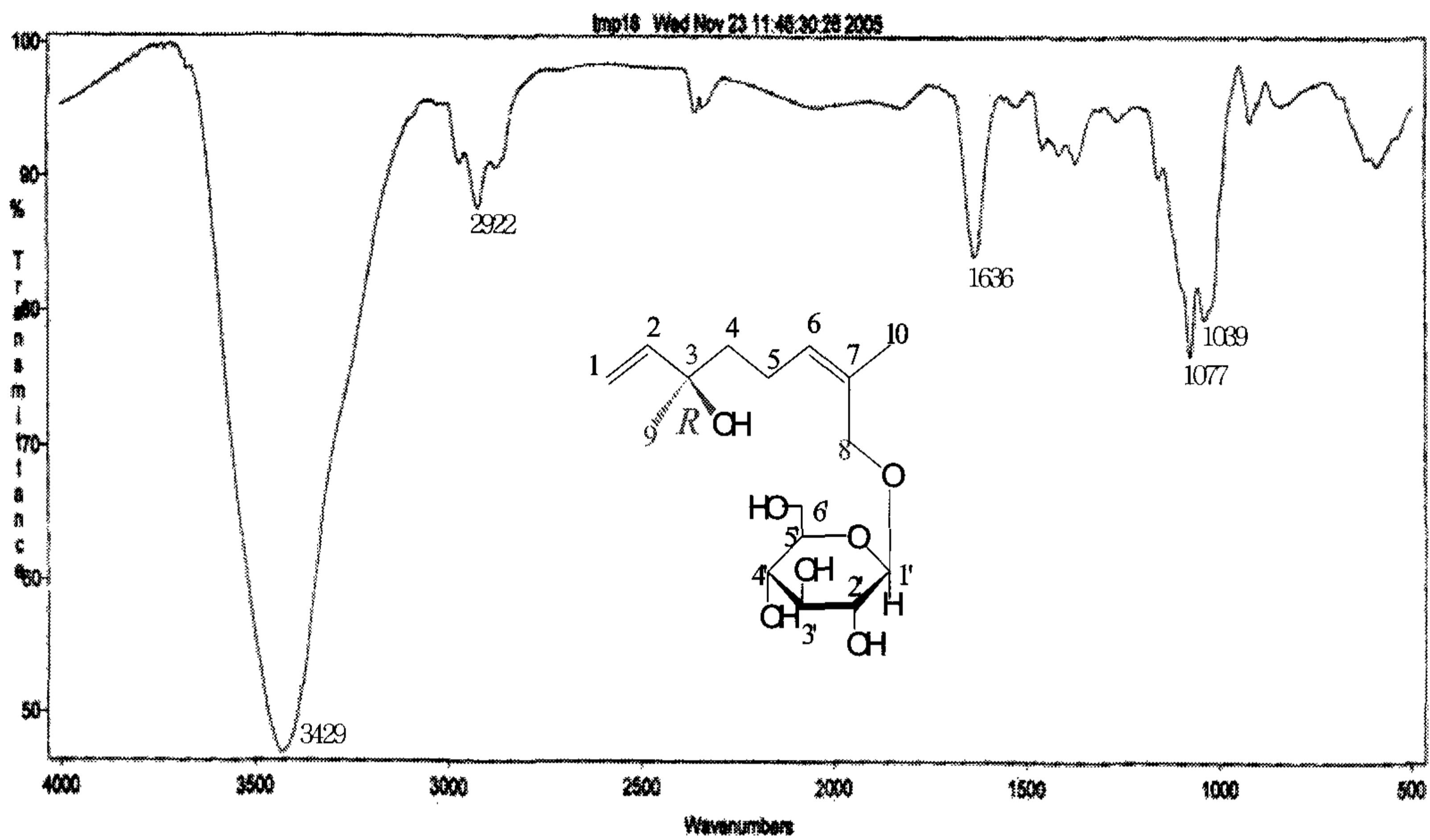


Fig. 20. IR and Mass (FAB) spectra of 4.

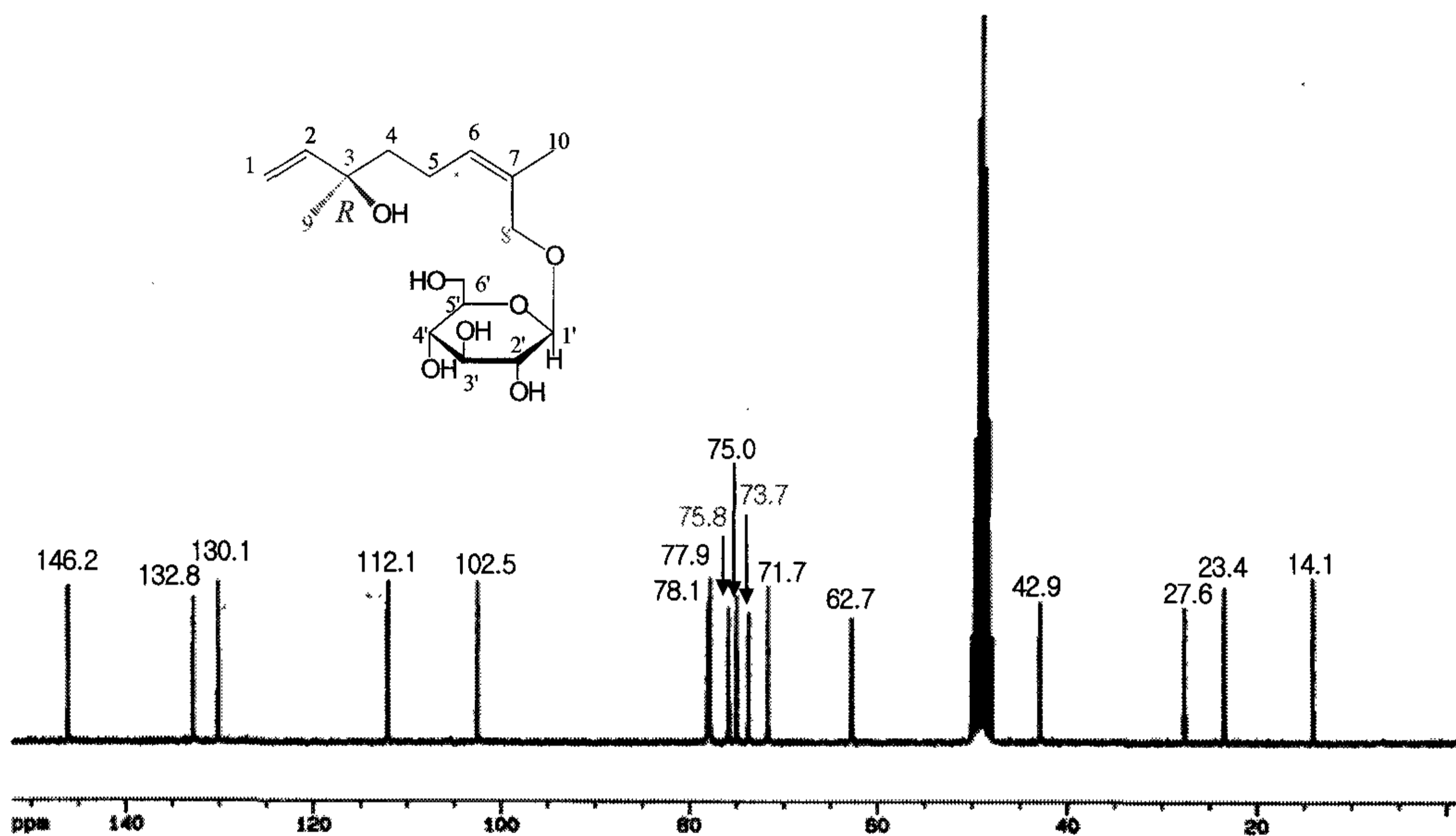
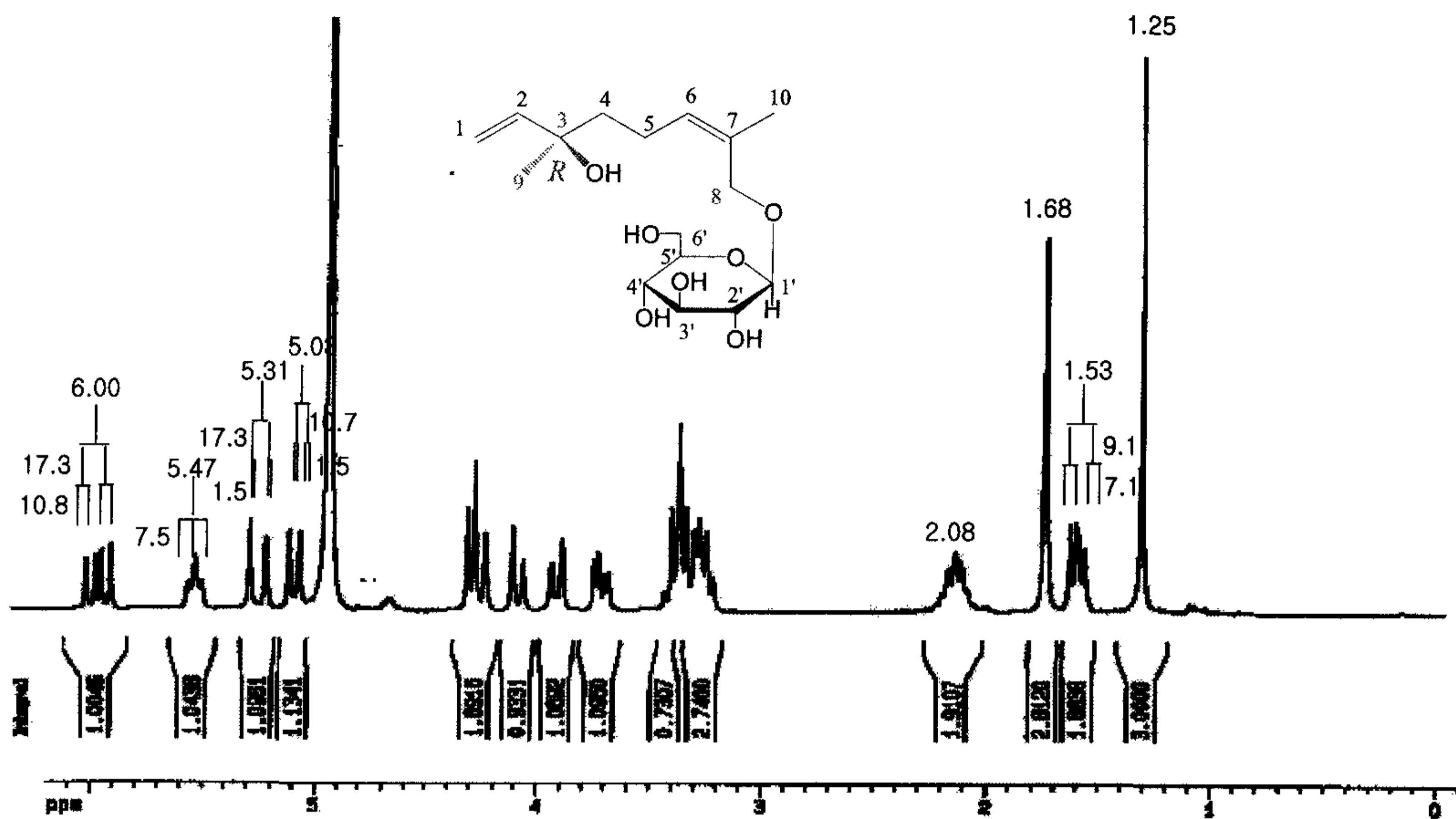


Fig. 21. ¹H NMR (250 MHz) and ¹³C NMR (62.5 MHz) spectra of 4 in CD₃OD.

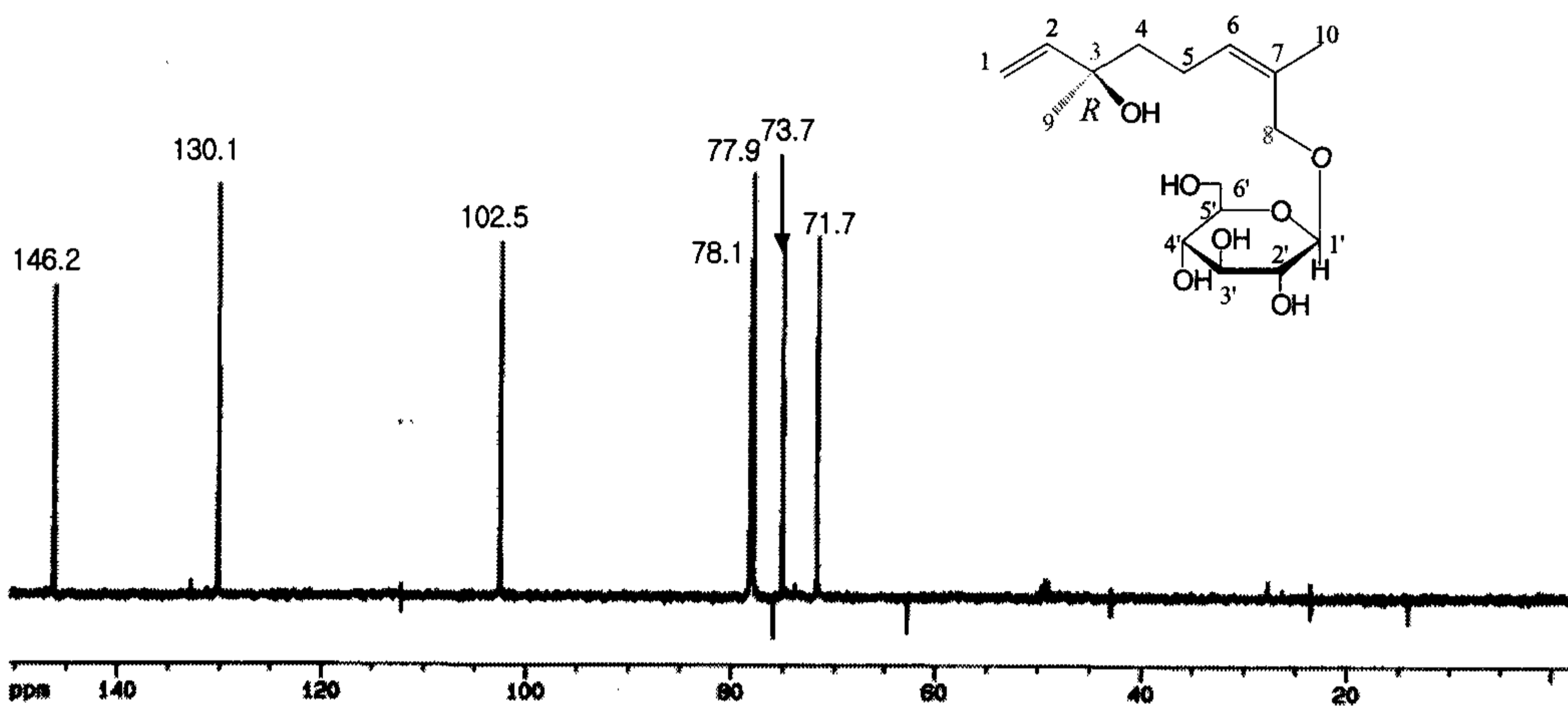
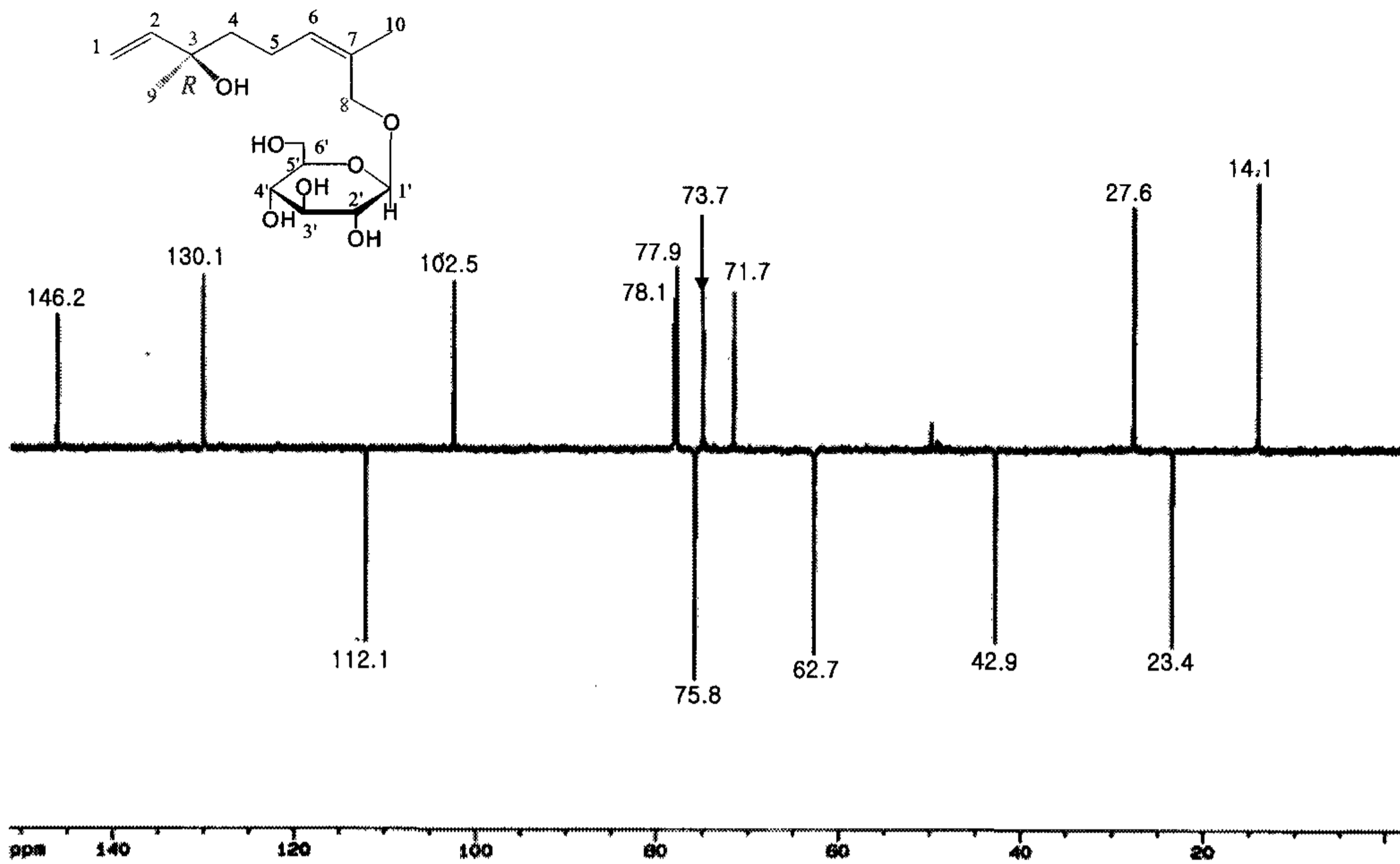


Fig. 22. DEPT (135°, upper) and DEPT (90°, lower) spectra of 4 in CD₃OD (62.5 MHz).

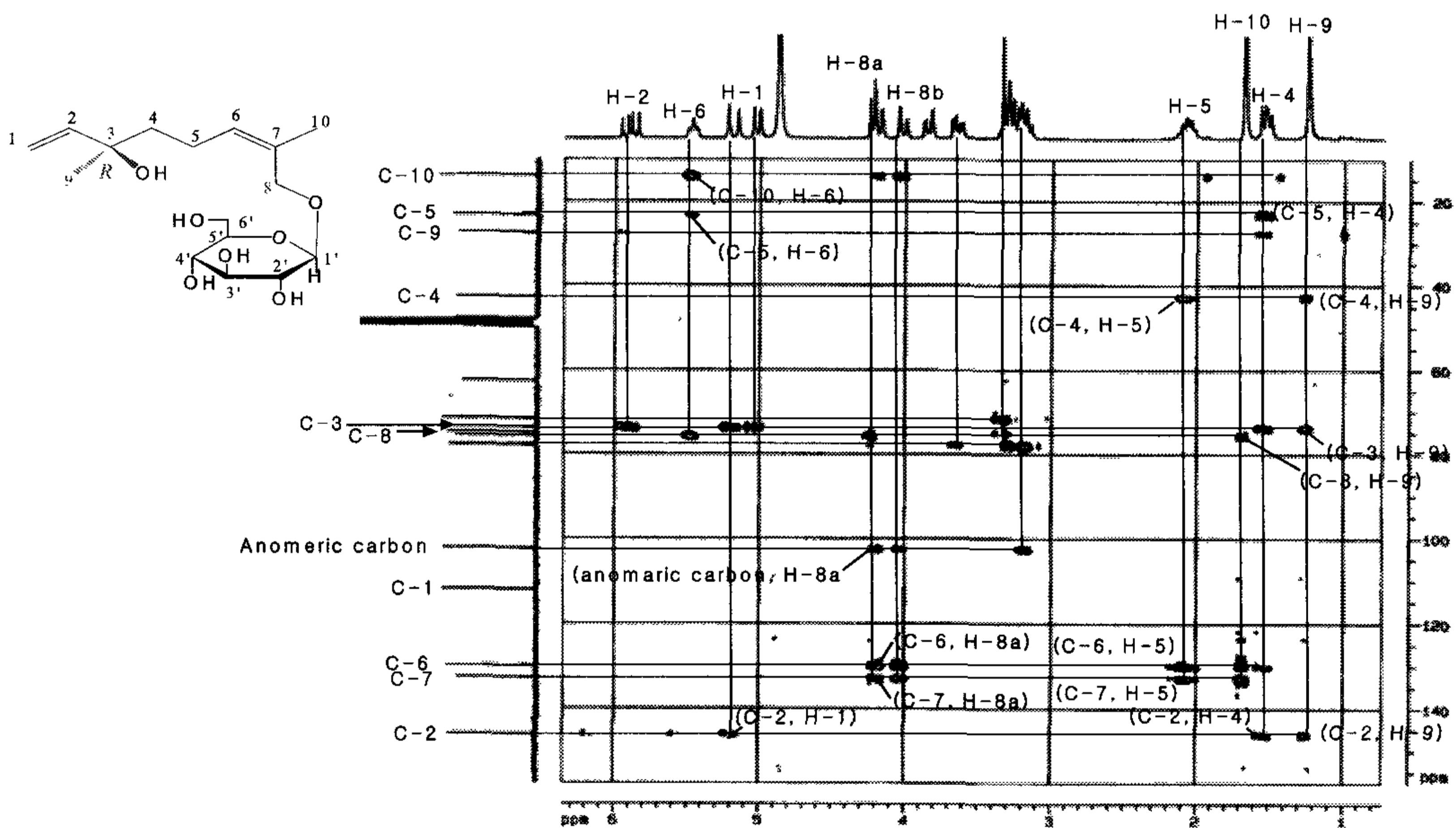
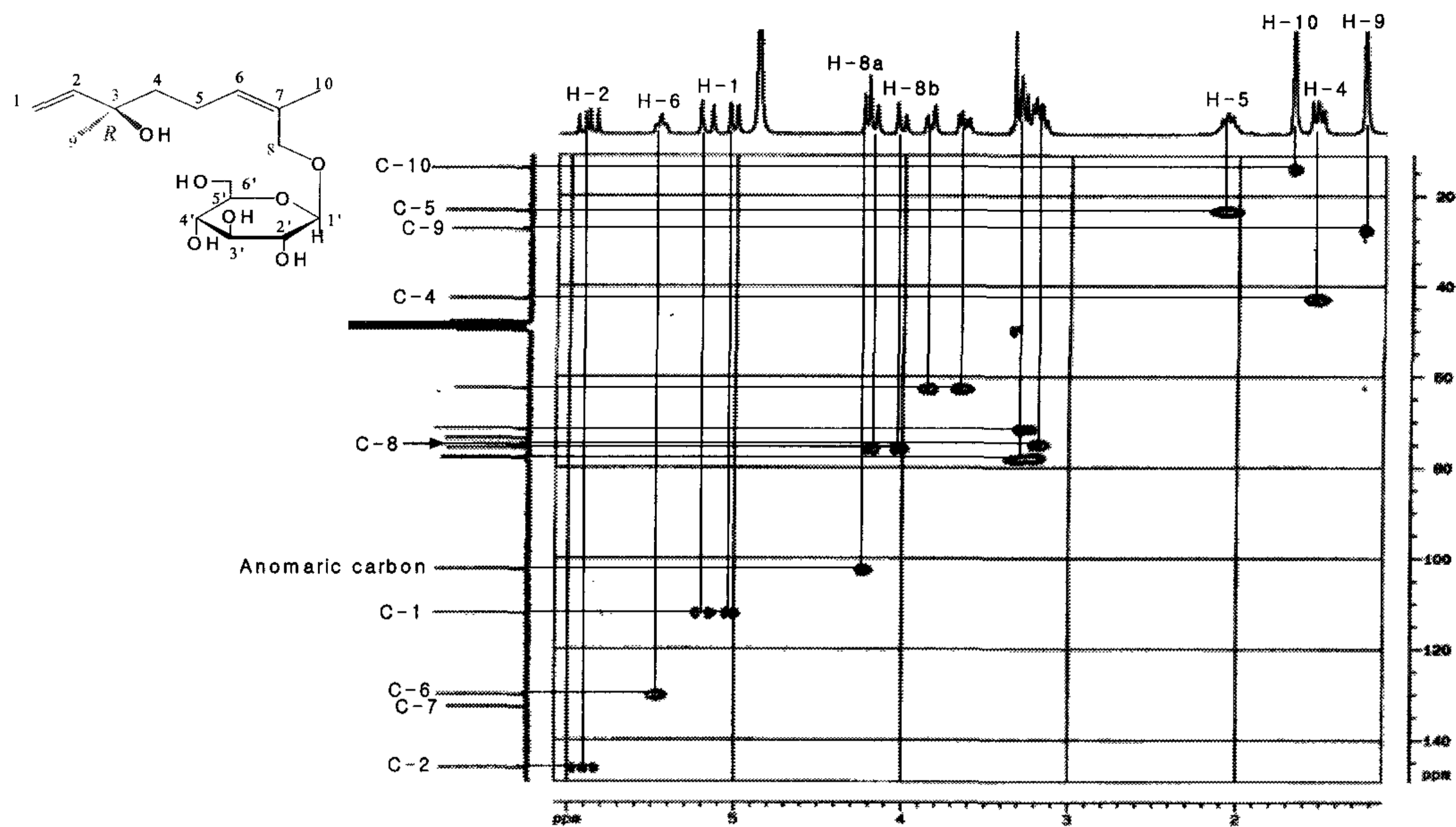


Fig. 23. HMQC and HMBC spectra of 4 in CD₃OD (250 MHz).

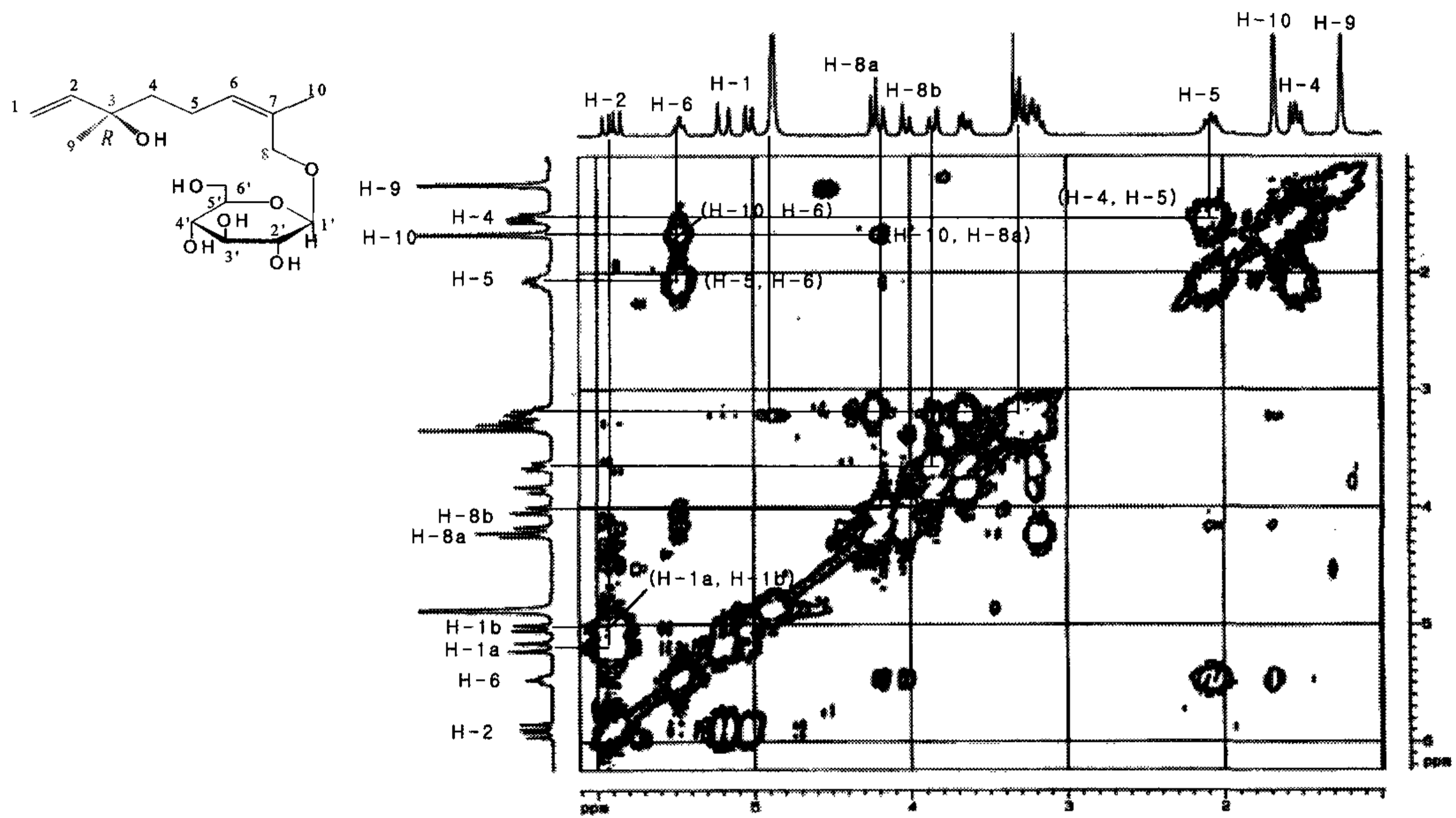


Fig. 24. COSY spectrum of 4 in CD₃OD (250 MHz).

Table 35. ^1H and ^{13}C NMR spectral data of 4 and betulalbuside A (in CD_3OD).

position	4 (3 <i>R</i> , 6 <i>Z</i>)		betulalbuside A (3 <i>S</i> , 6 <i>E</i>)	
	^1H NMR (250 MHz)	^{13}C NMR (62.5 MHz)	^1H NMR data (400 MHz)	^{13}C NMR (100 MHz)
1a	5.31 (1H, dd, $J=17.4, 1.5\text{Hz}$)	112.1	5.20 (1H, dd, $J=18.2, 1.5\text{Hz}$)	112.2
1b	5.03 (1H, dd, $J=10.8, 1.5\text{Hz}$)		5.03 (1H, dd, $J=11.2, 1.5\text{Hz}$)	
2	6.00 (1H, dd, $J=17.4, 10.8\text{ Hz}$)	146.2	5.91 (1H, dd, $J=18.1, 10.8\text{ Hz}$)	146.3
3	-	73.7	-	73.8
4	1.53 (2H, dd, $J=9.1, 7.5\text{ Hz}$)	42.9	1.54 (2H, m)	43.0
5	1.98 (2H, m)	23.4	2.09 (2H, m)	23.5
6	5.47 (1H, t, $J=7.1\text{ Hz}$)	130.1	5.48 (1H, t, $J=7.1\text{ Hz}$)	130.2
7	-	132.8	-	132.9
8a	4.19 (1H, d, $J=11.9\text{ Hz}$)	75.8	4.19 (1H, d, $J=12\text{ Hz}$)	76.0
8b	4.03 (1H, d, $J=11.9\text{ Hz}$)		4.03 (1H, d, $J=12\text{ Hz}$)	
9	1.25 (3H, s)	14.1	1.26 (3H, s)	14.1
10	1.68 (3H, s)	27.6	1.67 (3H, s)	27.7
1'	4.24 (1H, d, $J=7.8\text{ Hz}$)	102.5	4.25 (1H, d, $J=8\text{ Hz}$)	102.7
2'		75.0		75.1
3'		78.1		78.2
4'		71.7		71.8
5'		77.9		77.9
6'		62.7		62.9

화합물 1

화합물의 FABMS spectrum에서는 m/z 391.4에서 quasi-molecular ion peak를 확인하였다. ^1H NMR spectrum을 살펴보면 H-3, H-5 (δ 6.54)의 proton은 주위 proton의 영향을 받지 않기 때문에 singlet으로 나타났고, H-7 (δ 6.54)의 proton은 coupling constant가 15.9 Hz로 바로 인접한 H-8 (δ 6.31)과의 coupling으로 doublet으로 나타났으며, H-7 (δ 6.54)과 H-8 (δ 6.31)의 proton은 *trans*로 결합되어있음을 알 수 있다. H-8 (δ 6.31)은 coupling constant가 15.8과 5.5 Hz로 인접한 H-7 (δ 6.54)와, 두 개의 H-9 (δ 4.21)과의 coupling으로 double triplet으로 나타남을 알 수 있다. H-9 (δ 4.21)의 proton은 coupling constant가 5.4 Hz로 바로 인접한 H-8 (δ 6.31)과의 coupling으로 doublet으로 나타났으며, δ 3.85에서 두개의 methoxy methyl proton이 중첩되어 나타났음을 확인하였다[50].

화합물 2

이 화합물의 FABMS spectrum에서는 m/z 245.0에서 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ peak를 확인하였고 m/z 223.1에서 $[\text{M}+\text{H}]^+$ peak를 확인하였다. ^1H NMR spectrum을 살펴보면 δ 1.12 (H-1)와 δ 1.08 (H-3)의 proton은 δ 3.94 (H-2)의 영향을 받아 각각 doublet으로 나타남을 확인하였고, δ 3.94 (H-2)는 δ 1.12 (H-1)과 δ 1.08 (H-3)의 영향을 받아 multiplet으로 나타났다.

화합물 3

이 화합물의 FABMS spectrum에서 m/z 409.3에서 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ion peak를 확인하였고, m/z 387.3에서 $[\text{M}+\text{H}]^+$ ion peak를 확인하였다. I. Calis 등은 C-6의 절대입체구조는 CD spectroscopic spectrum을 측정하여 문헌치와 비교하는 방법으로 결정하였다. 화합물 3의 CD spectrum을 측정한 결과 $\Delta\epsilon_{237}$ +31.3, $\Delta\epsilon_{318}$ -2.5였고 화합물 3의 가수분해산물은 $\Delta\epsilon_{237}$ +4.1, $\Delta\epsilon_{318}$ -1.4였으며 문헌치와 일치하였으므로 C-6의 절대입체구조가 S체임을 확인하였다.[53] C-9의 절대입체구조는 화합물 3을 효소 가수분해하여 얻은 비당부를 (*R*)- 및 (*S*)- α -methoxyl- α -trifluoromethyl-phenylacetic acid (MTPA)와 반응시켜 각각 9-(*R*)-MTPA와 9-(*S*)-MTPA를 합성하여 그들의 ^1H NMR spectrum을 측정하여 H-7, 8, 9, 10의 chemical shift 값의 차($\Delta\delta=[\delta(\text{S-MTPA ester})-$

$\delta(R\text{-MTPA ester})$]에 의하여 C-9의 절대 입체구조가 S체임을 확인하였다[53]. 또 C-9가 각각 S체와 R체일때 ^{13}C NMR chemical shift가 각각 δ 74.7과 δ 77.0에서 나타나며[52] 화합물 3에서 C-9의 chemical shift가 δ 74.6이므로 C-9의 절대입체구조가 S체임을 알 수 있다. 화합물 3의 선광도는 $+32^\circ$ 이며 (6S,7E,9S) form인 화합물의 비선광도 31.2° 와 일치 하였다[53]. ^1H NMR spectrum에서 δ 5.90 (H-7)의 proton은 δ 5.63 (H-8)과 coupling constant가 15.4 Hz로 coupling하여 doublet으로 나타나는 것으로 보아 C-7, C-8의 이중결합은 *trans(E)*로 되었음을 알 수 있다[53].

화합물 5

이중결합은 *cis(Z)*와 *trans(E)*의 2종의 이성질체를 가지는데 이 두 이성질체의 구별은 NMR spectrum으로 가능하다. ^{13}C NMR spectrum에서 이중결합을 하고 있는 탄소에 인접한 탄소들의 chemical shift가 *trans(E)*의 경우 32-33 ppm에서, *cis(Z)*의 경우 27-28 ppm에서 나타난다[54]. 화합물 5에서 C-5의 chemical shift는 δ 23.0에서 나타났으므로 (6Z)의 입체구조를 가짐을 알 수 있다. 화합물 5의 ^1H NMR 및 ^{13}C NMR spectrum과 (3S, 6E) 구조를 갖는 cnidioside C의 chemical shift[59]를 비교한 결과 그 값의 차이가 있었다. 화합물 5에서 H-1a, H-1b는 각각 δ 5.09, δ 4.84에서 나타났고 cnidioside C에서는 각각 δ 5.39, δ 5.22로 나타났다. H-4는 화합물 5에서 δ 1.74 (2H, t, $J=8.52$ Hz)에서 나타났고 cnidioside C에서는 δ 1.81 (2H, m)에서 나타났다. 화합물 5에서 C-1a, 1b는 각각 δ 111.3, δ 146.9에서 나타났고, cnidioside C에서 δ 114.8, 144.5에서 나타났다. C-3은 화합물 5에서 δ 72.3에서 나타났고, cnidioside C에서 δ 80.0에서 나타났다. C-6, C-7은 화합물 5에서 각각 δ 130.8, 131.9에서 나타났고, cnidioside C에서 δ 124.9, 136.4에서 나타났다. C-9, C-10은 화합물 5에서 δ 21.9, 28.3에서 나타났고 cnidioside C에서는 δ 13.9, 23.6에서 나타났다. 화합물 5의 비선광도는 -9.5° 이고 cnidioside C는 -20° 이다[59]. 이상의 차이점으로부터 화합물 5는 cnidioside C의 입체구조(3S, 6E)와는 다른 (3R, 6Z)임을 추정하였다.[59~63] T. Ukiyama 등은 cnidioside C의 C-3의 절대입체구조를 아래와 같은 방법으로 결정하였다. Cnidioside C를 효소가수분해하여 얻은 비당부의 ^{13}C NMR spectrum을 측정하여 3S 구조를 갖는 (+)-linalool을 SeO_2 로 산화시킨 화합물의 ^{13}C NMR spectrum을 비교하는 방법으로 그 구조가 S체임을 확인하였다.[62]

화합물 6

^{13}C NMR spectrum에서는 δ 79.0에서 OH가 결합된 C-3의 carbon signal을 확인하였고, M. Sholichin 등은 3-OH의 입체구조는 3-OH를 acetylation시켜 ^{13}C NMR spectrum을 측정한 결과 C-24의 chemical shift가 acetyl기의 영향으로 15.3으로부터 16.5로 downfield shift 하였으므로 β 결합으로 되었음을 확인하였다.[64] 이 화합물은 $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}$ 의 분자식을 가지며 C-3에 한 개의 OH가 결합된 20(29)-lupen-3-ol (lupeol)임을 확인하였으며, 이와 같은 사실은 ^{13}C NMR spectral data가 문헌[64]과 일치하는 것으로도 확인할 수 있다.

화합물 7

^{13}C NMR spectrum에서는 δ 218.2에서 C-3의 carbonyl carbon signal이 나타났고, 이 화합물은 $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}$ 의 분자식을 가지며 한 개의 carbonyl carbon이 결합된 20(29)-lupen-3-one (lupeone)임을 확인하였으며, 이와 같은 사실은 ^{13}C NMR spectral data가 문헌[65, 66]과 일치하는 것으로도 확인할 수 있다.

화합물 8

^{13}C NMR spectrum에서 11개의 aromatic carbon을 δ 93.8~161.2에서 확인하였고, δ 60.0에서 $-\text{OCH}_3$ 의 carbon을 확인하였다. COSY spectrum에서 δ 6.24의 H-4는 δ 8.12의 H-3과 correlation하고, δ 6.99의 H-10은 δ 7.56의 H-9와 correlation함을 알 수 있다. ^1H NMR spectrum을 살펴보면 δ 8.12 (1H, d, $J=9.8$ Hz)에서 H-3의 proton이 doublet으로 나타났으며, δ 7.56 (1H, t, $J=2.4$ Hz)에서 H-9의 proton이 doublet으로 나타났다. δ 7.09(1H, s)에서 H-8의 proton이 singlet으로 나타났고 δ 6.99 (1H, d, $J=2.2$ Hz)에서 H-10의 proton이 doublet으로 나타났으며 δ 6.24 (1H, d, $J=9.8$ Hz)에서 H-4의 proton이 doublet으로 나타났다. δ 4.24 (3H, s)에서 methoxyl proton이 singlet으로 나타났다. H-3 (δ 8.12)는 coupling constant가 9.8 Hz로 인접한 H-4 (δ 6.24)와의 coupling으로 doublet으로 나타남을 알 수 있다. H-8 (δ 7.09)은 주위 proton의 영향을 받지 않으므로 singlet으로 나타났다. H-9 (δ 7.56)의 proton은 coupling constant가 2.4 Hz로 바로 인접한 H-10 (δ 6.99)과의 coupling으로 doublet으로 나타났다.

화합물 10

^{13}C NMR spectrum에서 12개의 aromatic carbon을 δ 101.5~162.1에서 확인하였고, δ 65.4에서 O의 영향으로 downfield shift된 C-1'를 확인하였다. ^1H NMR spectrum을 살펴보면 δ 7.60 (1H, d, $J=9.5$ Hz)에서 H-3의 proton이 doublet으로 나타났으며, δ 7.33 (1H, t, $J=8.4$ Hz)에서 H-6의 proton이 doublet으로 나타났다. δ 6.79(1H, s)에서 H-8의 proton이 singlet으로 나타났고 δ 6.20 (1H, d, $J=9.5$ Hz)에서 H-4의 proton이 doublet으로 나타났으며 δ 5.43 (1H, t, $J=6.6$ Hz)에서 H-2'의 proton이 triplet으로 나타났다. δ 5.05에서 H-6'의 proton이 multiplet, δ 4.57 (1H, d, $J=8.2$ Hz)에서 H-1'의 proton이 doublet으로 나타났고 δ 2.07에서 H-4', 5'가 singlet으로 나타났으며 δ 1.73, 1.63, 1.60에서 각각 H-10', 9', 8'가 나타났다. H-10', 9', 8'은 주위의 proton의 영향을 받지 않으므로 singlet으로 나타났고 H-3 (δ 7.60)은 coupling constant가 9.5 Hz로 인접한 H-4 (δ 6.20)과의 coupling으로 doublet으로 나타남을 알 수 있다. H-5 (δ 6.83)의 proton은 coupling constant가 8.4 Hz로 바로 인접한 두 개의 H-6 (δ 7.33)과의 coupling으로 doublet으로 나타났으며, H-2' (δ 5.43)의 proton은 인접한 두 개의 H-1' (δ 4.57)과의 coupling으로 triplet으로 나타났다.[81, 82]

화합물 11

^1H NMR spectrum에서 H-5 (δ 6.81), H-8 (δ 6.83)의 proton은 주위 proton의 영향을 받지 않기 때문에 singlet으로 나타났고, H-3 (δ 6.25)의 proton은 coupling constant가 9.4 Hz로 바로 인접한 H-4 (δ 7.60)과의 coupling으로 doublet으로 나타났다. δ 3.92와 δ 3.89에서 두개의 methoxy methyl proton이 나타났다. ^{13}C NMR spectrum에서 δ 99.9~152.7에서 coumarin ring의 carbon이 나타났고, δ 161.4에서 C=O의 carbon signal 이 나타났다.[83, 84]

화합물 12

^1H NMR spectrum을 살펴보면 H-2, 6 (δ 7.26)의 proton은 coupling constant가 8.7 Hz로 바로 인접한 H-3, 5 (δ 6.24)와의 coupling으로 doublet으로 나타났으며, H-2' (δ 6.21)은 coupling constant가 15.8과 5.9 Hz로 인접한 H-1' (δ 6.53)과, 두 개의 H-3' (δ 4.57)과의 coupling으로 double triplet으로 나타났다. H-2'' (δ 5.75)는

coupling constant가 6.4 Hz로 인접한 H-1" (δ 4.27)과의 coupling으로 triplet으로 나타났다. H-1' (δ 6.53)과 H-2' (δ 6.21)의 proton은 coupling constant가 15.8이므로 *trans*로 결합되어있음을 알 수 있다.

화합물 13

^1H NMR spectrum 을 살펴보면 H-2, 6 (δ 7.08)의 proton은 coupling constant가 8.4 Hz로 바로 인접한 H-3, 5 (δ 6.81)과의 coupling으로 doublet으로 나타났으며, H-2' (δ 1.89~1.78)은 multiplet으로 나타났고, H-1' (δ 2.62)는 인접한 H-2'(δ 1.89~1.78)의 영향으로 triplet으로 나타났다. H-2" (δ 5.74)는 coupling constant가 6.5 Hz로 인접한 H-1" (δ 4.54)와의 coupling으로 triplet으로 나타났고, H-4"(δ 4.05)는 주위 proton의 영향을 받지 않으므로 singlet으로 나타났다.

화합물 14

^1H NMR spectrum 을 살펴보면 δ 8.41~7.28에서 benzen ring 의 4개 proton을 확인할 수 있었고, H-1(δ 6.16)은 주위 proton의 영향을 받지 않으므로 singlet으로 나타났으며, -OCH₃의 proton은 δ 3.67에서 singlet으로 나타났다. H-4' (δ 2.64)는 인접한 H-5(δ 1.64)의 영향으로 triplet으로 나타났고, δ 1.38~1.25에서 H-6~9가 중첩되어 나타났으며, H-10(δ 0.85)는 H-9의 영향으로 triplet으로 나타났다.

화합물 15

^1H NMR spectrum 에서 H-5 (δ 7.12)의 proton은 coupling constant가 9.4 Hz로 바로 인접한 H-9 (δ 6.90)과의 coupling으로 doublet으로 나타났고, H-4 (δ 7.63)의 proton은 coupling constant가 8.4 Hz로 바로 인접한 H-8 (δ 6.25)과의 coupling으로 doublet으로 나타났다. δ 4.13에서 methoxy methyl proton이 나타났다. ^{13}C NMR spectrum 에서 δ 122.0~160.4에서 coumarin ring의 carbon이 나타났고, δ 160.3에서 C=O의 carbon signal 이 나타났다.

제 3 절. 산초나무와 초피나무로부터 신 기능성 생리활성

물질의 탐색과 안정성연구 및 제품 개발 (제 3 세부과제)

1. 김치 숙성에 대한 산초와 초피의 영향

가. 연구배경

김치에서 주로 발견되는 젖산균은 *Lactobacillus*, *Leuconostoc* 과 *Pediococcus*로 보고되어 왔으며, 그 중에서도 발효초기에는 *Leuconostoc mesenteriodes* 등의 *Leuconostoc*속이 우세하게 증식하여, 김치의 새콤한 맛을 내고, 발효후기에는 김치 발효의 산패균으로 알려진 *Lactobacillus plantarum*의 증식이 눈에 띄게 높아지면서 김치의 시큼한 맛을 내는 것으로 알려져 있다. 만약 이 두 가지 젖산균의 생육에 있어서, *Leuconostoc mesenteriodes*는 보다 높게 오랫동안 증식시킬 수 있고, *Lactobacillus plantarum*은 보다 낮게 그리고 느리게 증식시킬 수 있다면, 김치는 좀더 맛있게 먹을 수 있을 것이고 보다 길게 보관할 수 있을 것이다.

우리는 최근 천연물 연구에 대한 관심이 크게 고조된 배경을 바탕으로 우리나라 전통 향신료로 이용되어 왔으며, 한약재에 넣어 약용으로도 쓰이고 있는 산초잎과 초피잎을 이용하여 두 젖산균들의 생육에 대한 영향을 살펴보았다. 그 결과, 0.2 %의 산초잎의 직접적인 첨가가 *Leuconostoc mesenteriodes*의 증식과 *Lactobacillus plantarum*의 감소를 유도하는 것을 확인하였으며, 초피잎의 추출물의 경우 대조군 보다 훨씬 새콤하고 그 맛이 오래 간다는 관능검사의 결과와는 조금 다르게 두 유산균의 증식에 있어서 대조군과 큰 차이가 없었다. 산초잎의 메탄올과 에탄올 추출물에서는 동일 결과가 유도되지 않는 점에 착안하여 산초 잎의 다른 분획에 기대 효과를 가지는 물질이 포함되어 있을 것으로 예상된다.

그 추출물을 주재료로 하여 향신료를 개발하여 김치를 처음 숙성 시작단계에서 첨가해 준다면, 손쉽게 김치 고유의 맛과 신선도를 보다 오래 즐길 수 있을 것이며 보관기간 또한 길어질 것이다. 또한 김치 보관용 용기나 냉장고 또는 시중에 판매되는 김치들의 포장팩 등에 활용한다면 좀 더 김치시장의 제품 유통이 용이해지고 활발해

질 것이다.

나. 연구방법

1) 산초 잎과 초피 잎 가루 준비

산초나무와 초피나무의 잎과 열매는 경북 경산시 자인면 소재 동아임장에서 구입하여, 잎은 동결 건조 후 가루로 하여 사용하였다.

2) 산초 잎과 초피 잎 가루 첨가 김치 제조

마늘, 고춧가루, 등으로 양념된 일반 김치를 준비하여 각각 100 g씩을 분리하고, 동결 건조 시킨 산초 잎과 초피 잎 가루를 0.2 g, 0.5 g씩 첨가하여 손으로 버무렸다. 시료 측정시 김치의 발효가 진행될 것을 우려하여 100 g씩 따로 병에 넣어 4 °C에 보관하면서 일정 기간마다 1 병씩 꺼내어 실험에 사용하였다.

3) 일반세균수 측정

김치 발효 과정 중의 일반세균수 변화를 관찰하기 위하여 Difco사의 Plate-counting Agar (PCA) medium을 사용하였다.

4) 유산균수 측정

김치 발효 과정 중의 유산균수 변화를 관찰하기 위하여 Wako사의 BCP-plate counting agar pH 6.8 (BCP 0.002 %) medium을 사용하였다.

5) 대장균수 측정

김치 발효 과정 중의 대장균수 변화를 관찰하기 위하여 Difco사의 Deoxycolate lactose Agar medium을 사용하였다.

6) 공시균주

본 연구에 사용한 균주는 젖산균 *Leuconostoc mesenteriods* (KCTC 3100), *Lactobacillus plantarum* (KCTC 1048) 2종을 공시 균주로 사용하였으며, 균 생육배지는 MRS Agar (Difco)를 사용하였다.

는 MRS Agar (Difco)를 사용하였다.

7) 관능검사

김치 발효 시간에 따른 일반세균, 대장균수, 유산균수를 측정하기 위하여 sample을 1병 씩 취할 때마다 관능검사도 같이 실시하였으며, 기호도는 산초김치의 맛이 호감적인가, 일반 김치 보다 산초김치가 더 기호도가 높은가에 중점을 두었으며, 매운 맛과 향 외에 특이적으로 끈적임이나 시각적 효과가 들어간 것은 산초김치가 대조군 보다 시간이 지날수록 끈적임이 더해져 그것에 대한 선호도와 산초와 초피가 들어감으로 해서 김치의 색이 점점 어두워짐에 따라 그것에 대한 선호도 또한 같이 조사한 것이다.

다. 연구결과

산초, 초피 유래의 생리활성 물질의 신기능 탐색을 김치 숙성에 대한 영향으로 조사하였다. 실험에 사용한 재료는 산초 잎과 초피 잎을 사용하였다.

1) 김치발효시간에 따른 일반세균, 유산균, 대장균 수의 변화

일반세균 수는 대조군에 비해 크기는 아니지만 약간의 세균 증식 억제 효과를 보이는 것으로 나타났다. 특히 초피의 효과는 눈에 띄게 나타나는 데, 이것은 산초 추출물에 대해서는 특별한 항균 효과가 나타나지 않고, 초피 추출물에 대해서만 특이적 항균 효과를 보이는 항균 test 결과에서와 일치하였다 (Fig. 25).

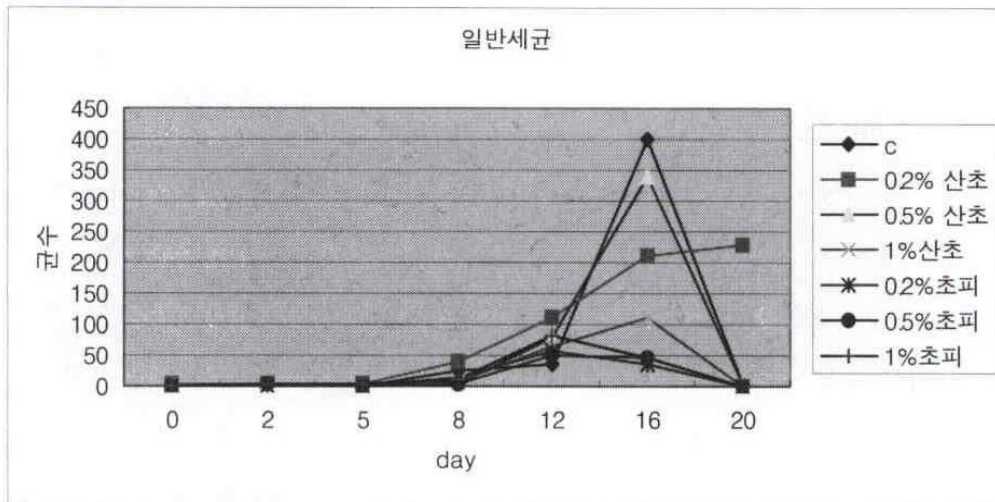


Fig 25. Changes in the number of bacteria of control kimchi, *Z. schinifolium* and *Z. piperitum*'s leaves added kimchi.

대장균은 김치숙성 초기에는 대조군과 실험군 둘 다 증식이 왕성하다가 유산균의 증식으로 김치의 pH가 떨어지면서 점점 그 수가 감소한다. 대장균에 대해서는 산초나 초피 잎 모두 큰 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다 (Fig. 26).

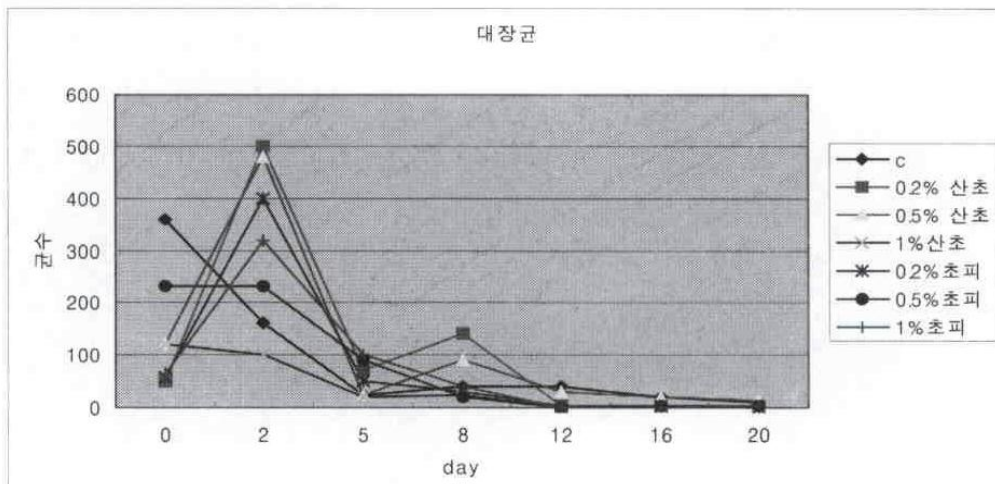


Fig. 26. Changes in the number of *E. coli* of control kimchi, *Zanthoxylum schinifolium* and *Zanthoxylum piperitum*'s leaves added kimchi.

유산균은 초기에는 *Leuconostoc* 종들이 증식하기 시작하나, 그 수는 그리 많지 않다. 김치의 신맛이 나기 시작하는 7~10일 정도에서 그 수가 크게 증가하며 시큼해지

는 14~20일 사이에는 점점 그 수가 감소한다. 초기에는 대조군과 실험군에 있어서 큰 차이가 없으나, 맛 드는 시기에 변화를 보면, 0.2 % 산초와 초피, 0.5 % 초피에서는 오히려 그 증식을 더 왕성하게 하고, 나머지들은 유산균의 증식 정도를 감소시키는 것으로 나타났다. 실제 초피는 0.2 %, 0.5 %에서 control보다 새콤한 맛이 나며, 산초는 좀 더 순한 맛이 나는 것으로 관능검사 결과 나타났다 (Fig. 27).

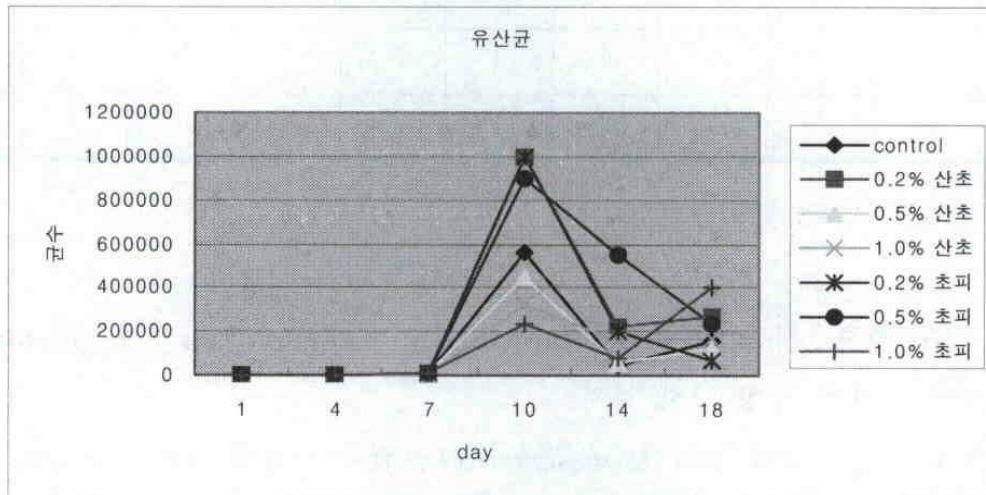


Fig. 27. Changes in the number of lactic acid bacteria of control kimchi, *Z. schinifolium* and *Z. piperitum*'s leaves added kimchi.

이상의 결과를 요약하면 김치 제조시 산초와 초피를 0.2 %와 0.5 % 첨가 시 일반세균의 생육이 약간 억제되는데 반해, 산초 및 첨가 김치에서는 일반 세균이나 대장균에 대한 영향은 적고 오히려 유산균의 수가 대조군보다 높으면서, 김치의 풍미나 숙성 시간이 무첨가군보다 약 3일에서 4일 간 지연됨을 알았다. 이를 규명하기 위하여 각각의 김치로부터 유산균과 일반 세균을 분리, 동정하여 각각 김치에 있어서의 microflora를 분석하였다.

Table 36. 산초 및 가루 첨가 김치의 관능검사결과

	기호도		매운 맛		끈적임		향		시각적 효과	
	0.2% 산초	0.5% 산초	0.2% 산초	0.5% 산초	0.2% 산초	0.5% 산초	0.2% 산초	0.5% 산초	0.2% 산초	0.5% 산초
0 days	6.67	7.2	1	1	1	1	1	2	4	3
2 days	7.2	4	1	1	1	1	1	2	5	3
5 days	6.1	3.2	1	1	1	1	2	2	5	3
8 days	6	6.7	2	2	2	2	4	4	5	4
12 days	6	6.1	2	2	2	8	6	7	5	3
16 days	6	5	3	4	5	8	5	5	4	2
20 days	2	1	4	4	6	8	5	5	2	1

※ 실험군 9명/ 매우 좋다(강하다) : 10 , 매우 나쁘다(약하다.) : 1

2) 초피 추출물과 산초추출물의 유산균(*L. mesenteriodes*, *L. plantarum*) 생육에 대한 영향 조사 결과

Fig. 28에서 보는 바와 같이 *L. mesenteriodes* 균주 생육에 대한 산초잎의 영향을 조사하기 위하여 메탄올 추출물과 에탄올 추출물을 각각 첨가한 것과 산초 잎 가루를 첨가하여 균 생육에 대한 영향을 조사한 결과, 모두 대조군보다 *L. mesenteriodes*의 생육이 무첨가구 보다 증가된 것을 볼 수 있다. 그리고 산초 잎 가루를 첨가했을 때 보다 추출물을 첨가한 것이 생육이 더 증가된 것으로 보아 산초 잎에는 생육을 증가시키는 성분, 감소시키는 성분 모두 함유되어 있다면, 추출물 속에는 *L. mesenteriodes*의 생육을 증가시키는 성분이 함유되었을 것이라 생각되며 *Leuconostoc* 속의 생육이 김치가 처음 맛 들었을 때의 새콤한 맛을 낸다고 보고된 것과 관련하여 산초 잎 추출물 첨가시 좀 더 맛있는 김치를 먹을 수 있고 좀 더 빠른 발효를 유도할 수 있을 것으로 생각된다. 이와 같은 결과는 Fig. 29의 *Lactobacillus plantarum* 생육에서도 같은 결과를 보였다.

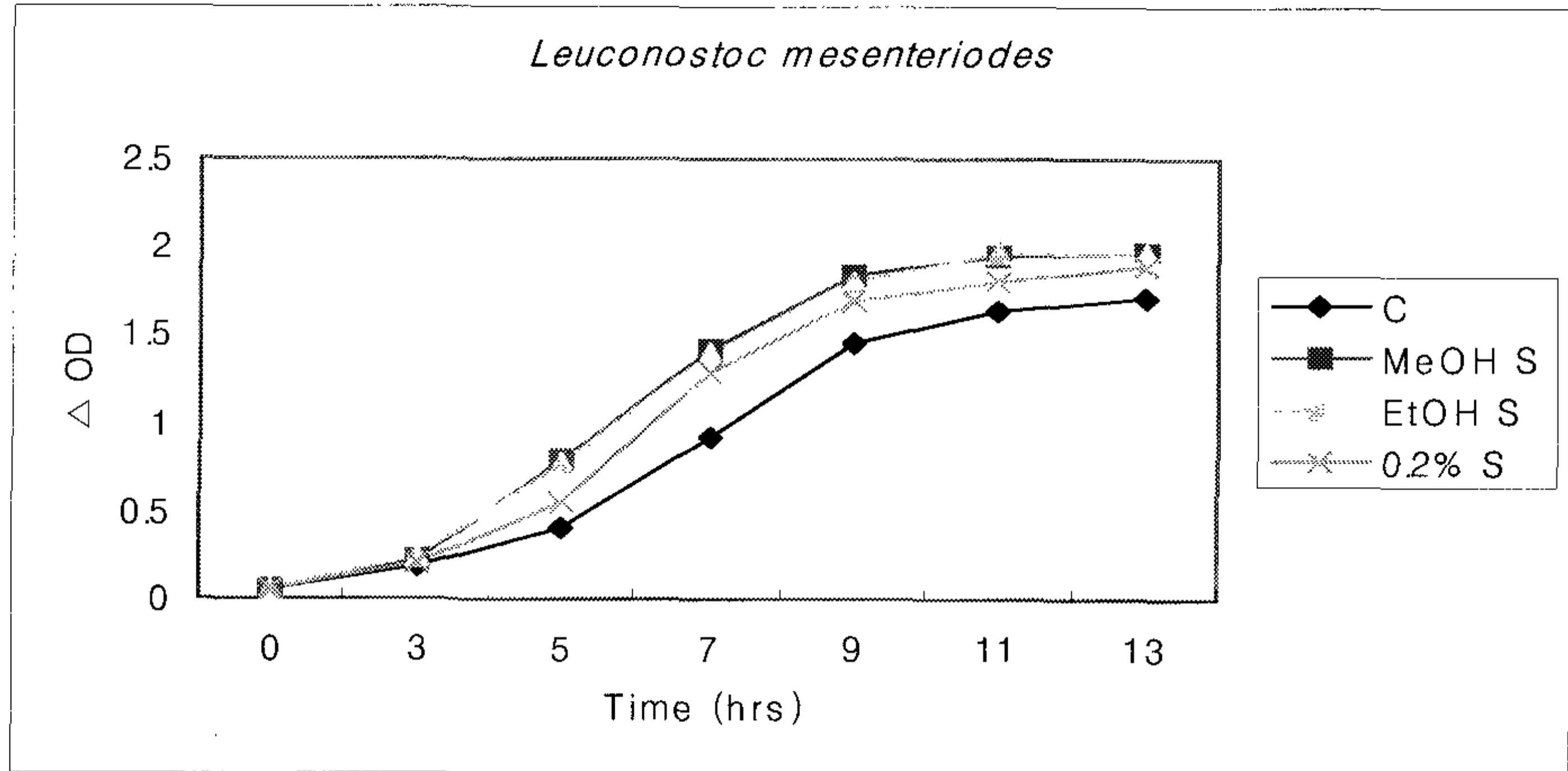


Fig. 28. Effect of *Zanthoxylum schinifolium* to the growth of *L. mesenteroides*

- ※ MeOH S: 산초 잎의 methanol 추출물
- EtOH S: 산초 잎의 ethanol 추출물
- 0.2 % S: 산초 잎 가루 0.2% 첨가

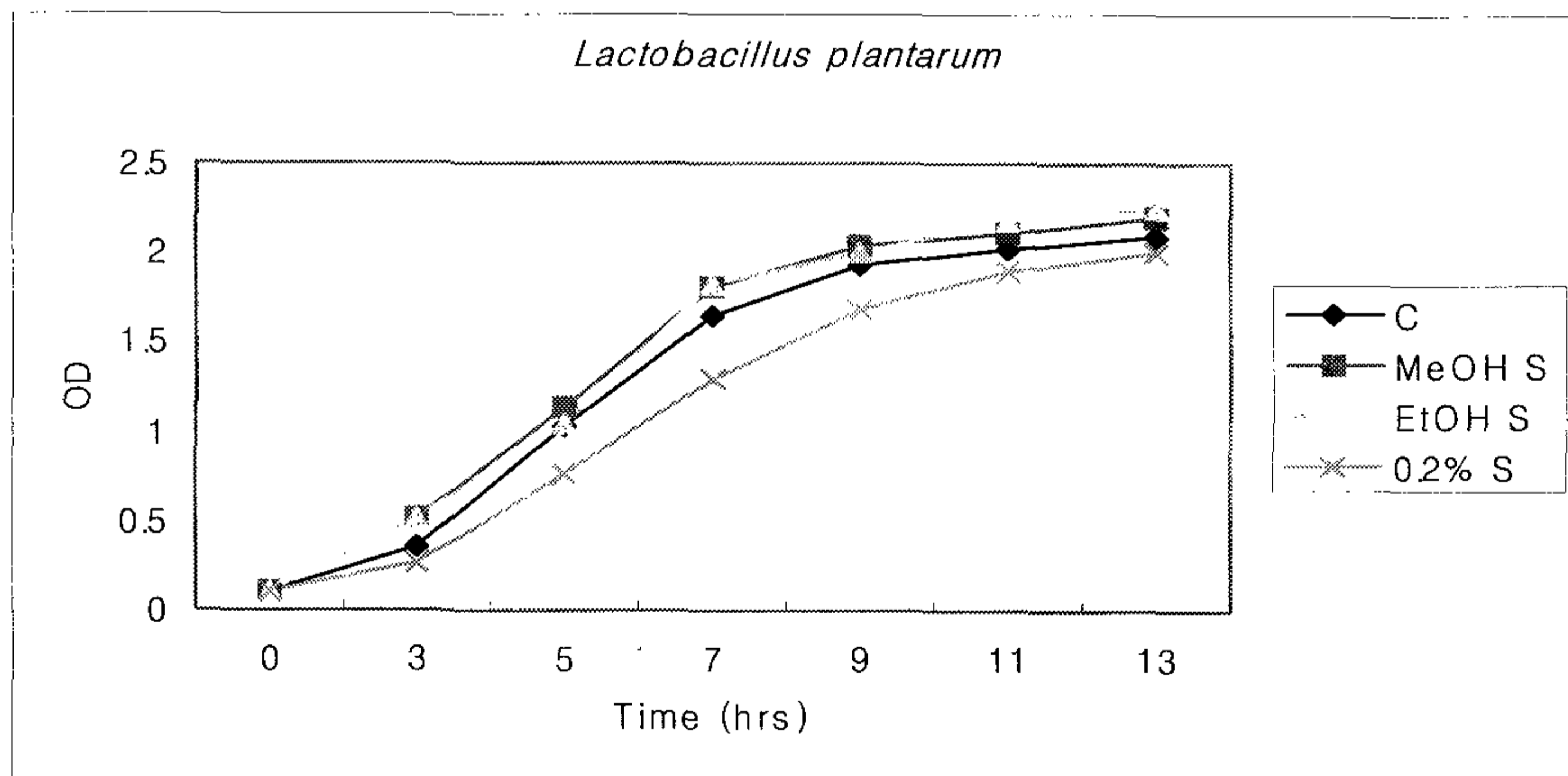


Fig. 29. Effect of *Zanthoxylum schinifolium* to the growth of *L. plantarum*

- ※ MeOH S: 산초 잎의 methanol 추출물
- EtOH S: 산초 잎의 ethanol 추출물
- 0.2 % S: 산초 잎 가루 0.2% 첨가

Graph에서 나타나는 바와 같이 0.2 % S는 *L. plantarum*의 증식을 억제하지만 산초의 MeOH와 EtOH 추출물의 경우, 더 높은 증식을 유발하는 것을 알 수 있다. 이것은 MeOH와 EtOH 추출물에는 함유되지 않은 산초 잎 고유성분이 *L. plantarum*의 증

식을 억제하는 것으로 생각되며, 관능검사 결과에서 산초 김치는 특징적으로 대조군보다 좀 더 새콤한 맛이 나는 초피 김치에 비해 대조군보다 훨씬 순한 맛이 난다고 평가된 것과 연관 지어 볼 때 아마도 이런 산패균의 증식을 억제함으로써 새콤하거나 시큼한 맛 자체를 좀 더 낮추는 것이 아닌가 생각되며 산초김치 또는 산초 추출물을 부재료로 이용하여 김치를 담그게 되면 좀 더 오랜 시간 김치를 맛있게 먹을 수 있을 것으로 기대된다. 한편 초피잎의 김치 숙성에 대한 영향을 산초잎과 같은 방법으로 조사한 결과 Fig. 30과 31에서 보는 바와 같이 상이한 결과를 보였다.

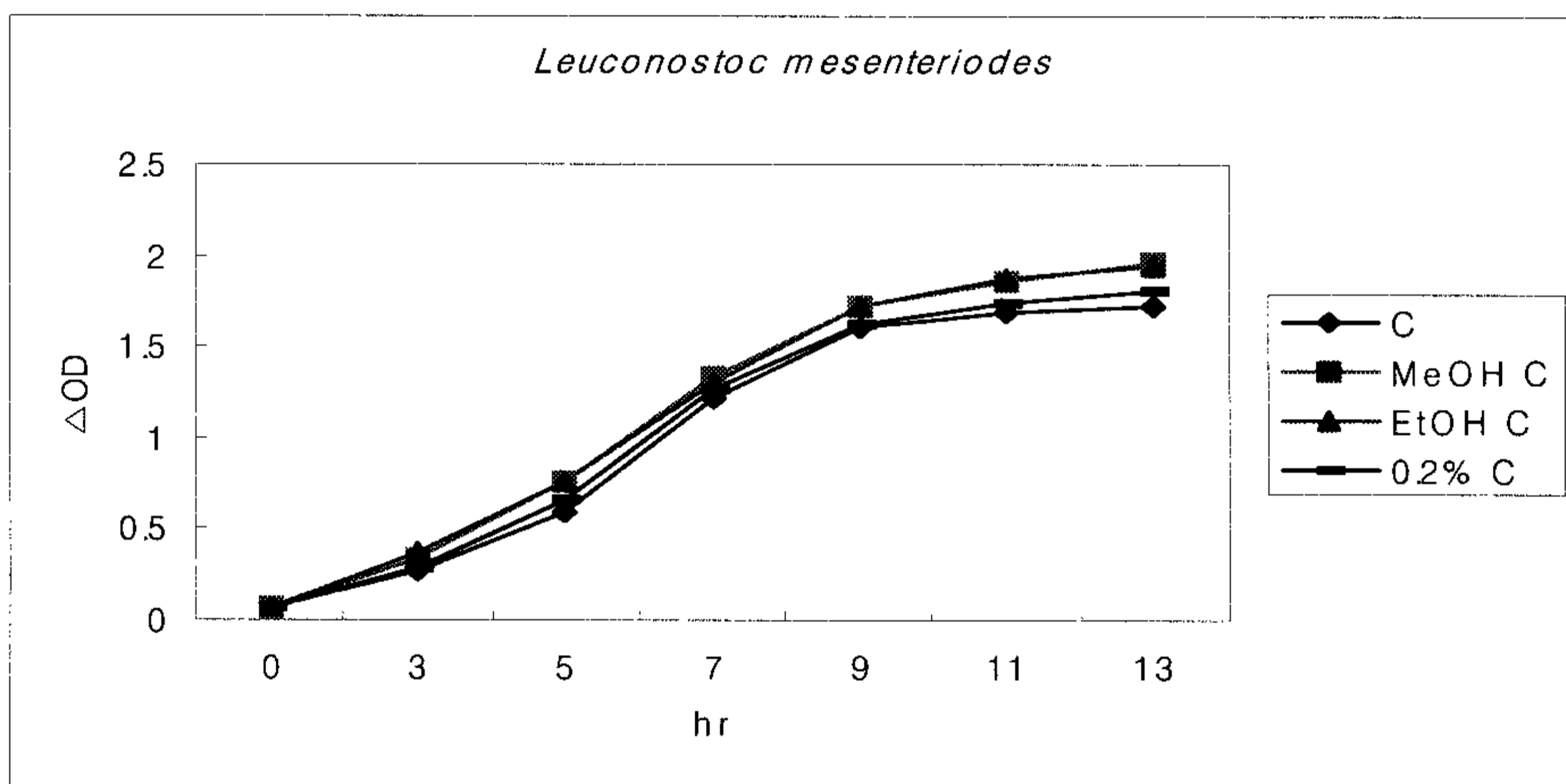


Fig. 30. Effect of *Zanthoxylum piperitum* DC to the growth of *L. mesenteriodes*

- ※ MeOH C: 초피 잎의 methanol 추출물
- EtOH C: 초피 잎의 ethanol 추출물
- 0.2 % C: 초피 잎 가루 0.2% 첨가

발효초기에는 *Leuconostoc mesenteriodes* 등의 *Leuconostoc* 속이 우세하게 증식하여, 김치의 새콤한 맛을 낸다는 여러 보고와 관련하여 관능검사 결과에서 확연하게 초피김치가 대조군보다 새콤하고 조금 매운 맛이 난다고 평가된 것과 연관지어 *L. mesenteriodes*의 생육에 대하여 초피 잎의 MeOH, EtOH 추출물과 초피 잎 가루가 생육을 크게 증가시킬 것을 예상하였으나, graph에서 나타나는 바와 같이 대조군과 큰 차이가 없었다. 따라서 아마도 초피김치 특유의 새콤하고 조금 매운 맛은 김치의 부재료 중 다른 물질이 초피 잎의 특정 성분과 반응하여 좀 더 *L. mesenteriodes*의 생육을 증가시키는 것이 아닌가 생각된다.

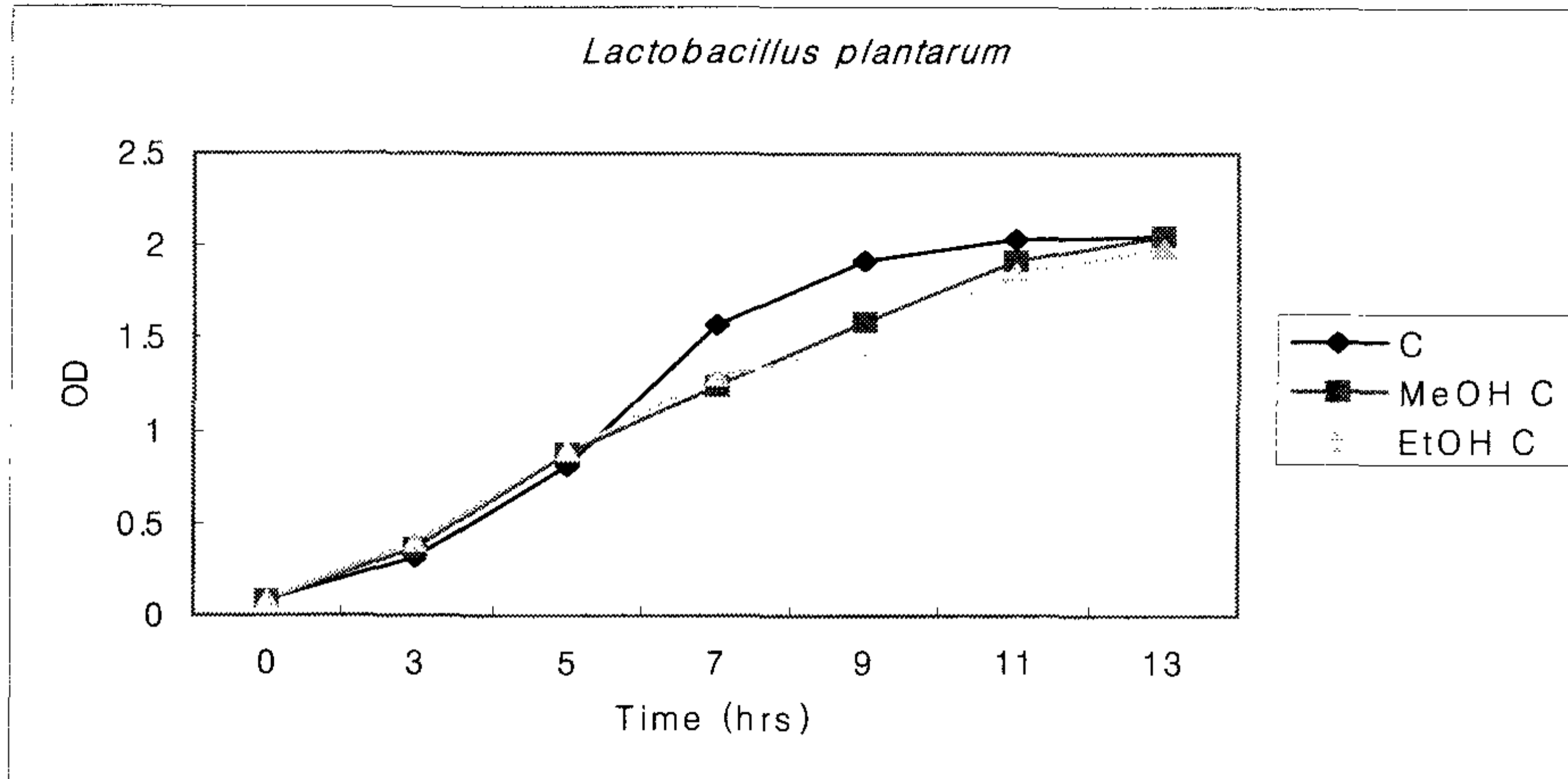


Fig. 31. Effect of *Zanthoxylum piperitum* DC to the growth of *L. plantarum*

※ MeOH C: 초피 잎의 methanol 추출물

EtOH C: 초피 잎의 ethanol 추출물

산초와는 달리 초피추출물은 *L. plantarum*의 증식을 억제하는 것으로 나타났다. 이것은 MeOH 또는 EtOH를 이용한 초피 잎 추출에서 *L. plantarum*의 증식을 억제하는 성분이 함께 추출되어 나온 것으로 생각되며 이 추출물들의 성분 분석이 가능하다면 *L. plantarum*의 증식을 억제하는 고유 성분을 찾을 수 있을 것이고 그 성분을 이용하여 김치의 오랜 시간 보관을 위한 보조첨가제로 사용될 수 있을 것이다.

2. 산초와 초피 유래 항균활성 성분에 관한 연구

가. 연구배경

병원성 미생물의 사멸이나 생육의 저해를 목적으로 많은 항균활성제들이 개발되고 있지만, 화학적 합성품에서 오는 부작용 등의 문제점으로 인체에 무해하면서 항균활성을 보이는 천연적 항균활성 물질의 탐색이 오래 전부터 계속해서 진행되어 왔다. 현대인들의 관심이 점차적으로 기본적인 의식주 충족에서 양질의 삶에 대한 것으로 옮겨가면서, 예전에는 이런 천연 생리 활성 물질이 주로 기능성 식품이나 의약에서만 한정되어 사용되었지만, 최근 들어 생활필수품이나 가전제품 등 생활 전반에 걸쳐 널

리 확대되어 활용되고 있는 실정이다. 1994년에 Cavallito 등이 마늘의 구근에서 에탄올 추출의 증기 분류법에 의해 주된 향균 성분인 allicin (diallylthiosulphinic acid)을 처음 분리하였으며, Conner 등은 allspice 외 31 종 식물의 추출물에서 13의 식품부패균과 효모에 대하여 항균활성을 시험하였으며, garlic oil에서 강한 항균활성을 확인하였다[105]. Sharma 등은 양파의 추출물에서 항균활성을 보고하였으며, Kubo 등은 녹차과 마테과에서 추출한 방향성 휘발 성분이 *Streptococcus mutans*의 증식을 억제한다고 보고하였다.

초피나무 (*Zanthoxylum piperitum* DC)는 운향과 (Rutaceae)에 속하는 낙엽 활엽 관목으로 근연식물로는 황초피 (*Zanthoxylum coreanum*), 개산초나무 (*Zanthoxylum planispinum*), 산초나무 (*Zanthoxylum schinifolium*) 등이 있으며 이들은 주로 한국을 중심으로 중국 본토와 일본 남부 지역에 걸쳐 자생하는 식물이다[106]. 초피나무는 신미 성분을 가지기도 하나 정유성분 중 향과 관련하여 많이 이용된다. 중국 등지에서는 초피, 계피, 회향, 진피, 정향 등의 오향 중에서 초피를 으뜸의 향신료로 이용하여 왔고, 일본에서도 어류와 육류 식품에 있어서의 특유의 비린내 제거와 풍미 가미를 위하여 오랫동안 천연 향신료로 사용하여 왔다. 특히 최근 들어 식품 첨가물로 인정된 인공 식품 보존제의 독성과 안전성이 문제시 되면서[107] 인체에 무해한 대체 식품 보존제 개발의 일환으로 천연물질에 존재하는 향균 물질 선별을 위해 식용, 약용으로 오랫동안 이용하여 온 약용 및 식용 작물로부터 향균관련 새로운 생리 활성물질 개발하고자 하는 노력과 관련되어 향균물질 보고가 있는 초피에 대한 관심이 높은 실정이다[108, 109].

초피에 대한 현재까지 연구를 살펴보면, 주로 일본에서 풍미제로 사용하는 것과 관련하여 잎에 있어서의 풍미성분 분석[110], 종자의 숙성시기에 따른 풍미관련 물질의 분석[111], 초피향의 전구체로서의 5~6 종의 glycoside 물질의 확인에 관한 보고[112]가 있다. 초피의 강한 항산화성 물질에 대한 연구로서는 Hisatomi 등이 초피 과피의 ethyl acetate 추출물과 종자의 methanol 추출물을 이용하여 TBA 방법으로 항산화력을 조사한 보고[113]와 Hur 등이 초피 잎 유래의 protocatechuic acid와 methanol 추출물을 사용하여 bromobenzene-treated rat의 liver에서 detoxification 작

용을 조사한 결과로서, epoxide 생성 관련 효소인 aniline hydroxylase 활성을 억제하여 지질 과산화 억제하는 효과를 규명한 보고[114] 등이 있다. 이외에도 초피 유래 생리활성 물질에 대한 작용 연구로서, Jeong 등이 초피 유래의 Quercetin과 Quercitrin을 분리, 동정하고 이들이 mushroom tyrosinase의 억제제 기능이 있음을 보고한 것[115]과 Epple 등이 초피의 정유성분과 비정유성분을 oat bran에 첨가하여 rat에 식이한 결과, 정유 성분 함유 식이군에 있어서는 식욕 감퇴 효과를 보였으나 비정유 성분군은 그렇지 않다는 다이어트 효과에 대한 보고[116]가 있다. 국내에서의 초피에 대한 연구 역시 초피 유래의 성분 분석[117~120], 항산력 효과[121] 및 항균 작용에 대한 보고[122~125]가 있다. 초피 유래의 항균활성 물질에 관한 연구는 임 등[126]이 초피 잎을 hexane, ethyl ether, ethanol과 물로 추출하여 각 활성 분획을 *Bacillus cereus*를 대상으로 항균력을 조사한 결과, 각 분획 간에 큰 활성의 차이 없이 항균력을 보인다고 보고한 이래, 정 등[127]이 잎을 순환식 무압력 한약 추출기에서 초피 잎을 증류수로 1: 5 비율로 추출한 추출액이 *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas syringe* 등에 항균력을 나타낸다고 보고한 반면, 김 등[128]이 역시 초피 잎을 methanol, ethanol, hexane, chloroform과 물로 추출한 결과 ethanol 분획에서만 항균력이 있으며 이 때 Gram-positive 또는 Gram-negative 균에 대해 공히 항균 활성을 보인다고 하였다. 초피 잎 외의 항균 활성 탐색은 서 등[129]이 초피 과피의 휘발 정유성분의 항균 작용을 연구한 것으로 초피 과피 정유액을 ether로 추출한 후, TLC로 분리 정제한 분획이 *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*와 *Salmonella enteritidis*의 생육을 억제한다고 보고하였다. 이와 같이 초피 유래의 항균 물질은 채취 시와 채취 장소, 분리 정제 방법에 따라 성분의 종류와 함량이 다양해 이에 대한 체계적인 연구 자료가 절실히 요구된다.

치과 질환은 인체의 다른 부위 질환과는 달리 저절로 낫거나 복구되는 경우가 없어 질환 예방이 치료보다 더 중요하다. 따라서 적극적인 예방법은 칫솔질과 구강 세척제 등을 이용하여 구강 내 미생물의 증식을 억제하거나 감소시키는 것이다. 이러한 목적으로 불소, 알코올, 계면활성제 및 항균 물질을 이용한 mouth rinse제와 치약 등이 개발되어 이용되고 있다. 현재까지 알려진 구강 미생물로는 *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus*

actinomycetemcomitans 와 *Fusobacterium nucleatum* 등이 보고되었고, 이 중 *Streptococcus mutans* 와 *Streptococcus sobrinus* 는 plaque 형성균으로 알려져 있다 [130]. 특히 *Streptococcus mutans*는 dextransucrase의 작용으로 sucrose를 기질로 이용하여 점성이 높은 다당류인 dextran을 생성할 수 있다. 이때 치아 표면에 형성된 dextran 점질층은 치아 표면에 *Streptococcus* 자신들 뿐만 아니라 *Lactobacillus*와 같은 산 생성능을 지닌 타 구강미생물의 부착을 용이하게 하므로, *Streptococcus mutans* 는 대표적인 치아 우식균으로 알려져 있다. 미국을 포함한 유럽인들 중 80~90 %의 경우는 구강에서 이 균을 확인할 수 있을 정도로 치과 위생에 있어서는 매우 중요한 미생물이며, 이 균을 대상으로 항 치아 우식을 위한 연구가 다양하게 이루어지고 있다[131~134].

본 연구에서는 이와 관련하여 초피로부터 천연 항균 물질을 탐색하고자 초피를 부위별로 구분하여 항균 물질 탐색을 시도하고 치아 우식균에 대한 항균활성성분을 확인하였으며, 이를 통해 새로운 치약, 구강청정제 및 껌 관련제품 등을 개발에 있어서의 초피의 활용가능성을 제시하는데 주안을 두었다. 또한 치아우식균 *Streptococcus mutans*에 대하여 강한 항균 활성을 보이는 초피 과피와 종자의 추출물들을 *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus pumilus*, 요로감염증과 연관이 있는 *Proteus vulgaris*와 항생제 내성과 관련하여 감염증에서 중요시되는 *Pseudomonas aeruginosa*, 피부염과 관련되는 *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, 심한 혈변성 대장염의 원인균으로 설사 등을 유발하는 병원성 대장균 *E. coli* O-157, 만성위염, 위궤양 및 십이지장궤양, 위암 등의 원인균인 *H. pylori*를 대상으로 항균활성을 검정하였다.

나. 연구방법

1) 각 부위별 추출물 준비

산초나무와 초피나무의 뿌리와 줄기는 경상북도 팔공산에서 채취하여 세절 건조 후 시료로 사용하였으며, 산초나무와 초피나무의 잎과 열매는 경북 경산시 자인면 소재 동아임장에서 구입하여, 잎은 동결 건조 후 가루로 하여, 그리고 열매는 자연 건조 후 과피와 종자로 분리하여 가루로 하여 시료로 사용하였다. 중국산 초피 과피와 한국산 초피 과피의 비교 실험을 위하여 별도로 대구시 약령시에서 중국산 초피 과피와

한국산 초피 과피를 구입하여 가루로 하여 시료로 사용하였으며, 산초는 국내에 중국산이 유통되지 않으므로 비교 실험을 수행하지 않았다.

2) 공시균주 및 배지

실험에 사용한 균주는 먼저 치아우식균 *Streptococcus mutans* KCTC3289이고, 균 생육 배지로는 Difco사 제품인 BHI (Brain Heart Infusion) agar 배지였다. 나머지 병원성 미생물들은 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermis* KCTC 1917, *Bacillus pumilus*, *Proteus vulgaris* KCTC 2433, *Aeromonas hydrophila*, *E. coli* O-157 ACTC 43895을 대상 균주로 사용하여 초피 유래 항균 물질 활성을 조사하였고 배지는 LB agar이다.

3) 초피 추출물의 Disc 확산법에 의한 항균활성 검정

초피 추출물의 병원성 미생물에 대한 항균활성 검정 실험을 위해서 Disc 확산법을 이용하였으며, 그 방법을 간략히 서술하면 다음과 같다. 추출물을 DMSO에 현탁하여 stock solution을 만들고, 그 solution의 30 uL를 disc 적셔 농도가 3.0 mg/disc가 되도록 하였다. 0.6 mg/disc, 1.5 mg/disc, 3.0 mg/disc 각각으로 test 결과, 1.5 mg/disc에서는 부분적으로 3.0 mg/disc에서는 완전히 그 효과가 나타나는 바, 이 농도로 실험을 진행하였다. control로 DMSO를 같이 올렸으며, 항균 효과가 보이는 plate, 보이지 않는 plate 둘 다에서 어떠한 변화도 나타내지 않았다. 균은 도말과 double layer 두 가지 방식으로 배양해 보았을 때, 더 고르고 깨끗하게 나타나는 double layer 방식으로 incubation 하였다. 균의 수는 OD에 따라 test 해 본 결과, OD600= 0.5-0.6에서 가장 뚜렷히 나타났다. 미리 준비된 BHI (또는 LB agar) 평판배지 상에, OD600 값이 0.5~0.6에 해당되는 균 배양액을 15 uL 와 혼합한 BHI soft agar (또는 LB soft agar) 배지를 붓고 agar를 굳힌 다음, 정제한 각각의 초피 추출물에 적신 disc (3 mg/disc)를 배지 표면에 올려놓고 배양기로 옮겨서 24 시간 동안 배양시켰다. 배양 후 disc 주위에 나타나는 clear zone의 직경을 측정하여 해당 물질에 대한 항균활성 정도를 나타내었다.

4) 활성성분의분석

활성성분의 Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) 분석은 Hewlett-Packard (HP) 6890 gas chromatography와 HP 5903N mass spectrometer 분석기기를 사용하였다. Column은 5 % Phenyl Methyl Siloxane을 충전한 capillary column HP-5MS이었고, helium carrier gas flow rate는 0.7 mL/min으로 60 °C에서 15 분간 holding 한 후 detector의 온도를 28 °C로 하였으며, split ratio은 30:1로 하였다. MS 부분은 electron impact (IM) mode로 50-800 mass 단위로 하였다. 시료의 각 성분은 실험에서 얻은 mass spectrum과 library search로 찾아낸 mass spectrum을 비교하여 확인하였으며, 사용한 program은 NIST/EPA/MSDC이었다.

5) 액체 배양법을 이용하여 *S. mutans* 의 병원성 미생물에 대한 초피 종자와 과피 정유성분의 최소 저해농도 (Minimum Inhibitory Concentration) 측정 전 배양한 병원성 미생물들을 BHI, LB broth 20 mL 에 OD₆₀₀ 값이 0.01~0.02가 되게 접종하고 초피 종자의 수증기 증류 분획 성분 (정유 성분)을 농도별로 처리한 후 24 시간 동안 배양하면서 2 시간마다 OD 값을 600 nm에서 측정하여서 14 시간이 경과 될 때까지 균이 자라지 못하는 해당 농도를 생육 저해 최소 농도로 결정하였다.

6) 열안정성 측정

초피 종자와 과피의 정유 성분을 온도 별로 50, 60, 70, 80, 90 °C에서 1 시간 동안 반응 시킨 후, 3 mg/disc 농도로 disc 확산법에 의하여 항균활성의 변화 여부를 검정 하였다.

7) 시제품의 Disc 확산법에 의한 *S. mutans*에 대한 항균활성 검정

시제품의 *S. mutans*에 대한 항균활성 검정 실험을 위해서 Disc 확산법을 이용하였으며, 그 방법을 간략히 서술하면 다음과 같다. 0.1 % 정유성분 첨가 시제품과 시중에 유통되고 있는 치약들 중에서 천연물을 재료로 하고 판매도가 높은 치약들 3종을 증류수에 각각 1, 2, 4, 6, 8 %씩 현탁하여 stock solution을 만들었다. 미리 준비된 BHI agar 평판배지 상에, OD₆₀₀ 값이 0.5~0.6에 해당되는 균 배양액을 15 uL와 혼합한 BHI soft agar 배지를 붓고 agar를 굳힌 다음, disc를 앞서 만들었던 치약들의 stock solution에 적셔서(3 mg/disc) 배지 표면에 올려놓고 배양기로 옮겨서 24 시간 동안

배양시켰다. 배양 후 disc 주위에 나타나는 clear zone의 직경을 측정하여 각각의 제품에 대한 항균활성 정도를 나타내었다.

8) 시제품에 대한 관능검사

연령에 따른 시제품에 대한 기호도를 조사하였으며, 각 참가자들이 평소 양치하는 습관대로 시제품을 사용하여 양치하도록 하였다. 시제품의 개운함이 타 회사 제품들과 비교해 탁월하다는 평가에 따라 얼마나 개운한가와 맛이 매운가, 혀에 닿았을 때 얼마나 부드러운가, 향이 괜찮은가 등을 주요 평가 항목으로 하였다. 또한 장기간 사용에 따른 관능검사도 실시하였는데 40대 연령의 검사자들이 2달 가까이 사용 결과, 시간이 지날수록 더욱 개운함이 강하고 오래 지속되어 타 회사 제품 보다 선호도가 높았다.

9) *Salmonella typhimurium* TA 100, 1538 균주에 대한 초피 종자와 과피 정유 성분의 세포 독성 측정

12-16 시간 전배양한 *Salmonella typhimurium* TA 100, 1538 균주 100 uL와 측정할 농도별로 준비된 시료 50 uL 0.7 % BHI top agar에 넣고 잘 현탁하여 BHI agar plate에 48 시간 배양하여 revertants 수를 측정하여 균의 생육에 대한 시료의 영향을 관찰하였다.

10) 돌연변이 유발성 측정

12-16 시간 전배양한 *Salmonella typhimurium* TA 100, 1538 균주 100 uL와 측정할 농도별로 준비된 시료 50 uL와 phosphate buffer (pH 7.4) 50 uL를 모두 같이 섞고 37 °C에서 30 분간 반응시킨다. 2 mL의 top agar에 반응 시킨 용액을 넣고 잘 현탁하여 minimal agar plate에 붓는다. Top agar가 굳고 나면 37 °C에서 48 시간 동안 키운 후 나타나는 revertants 수를 관찰한다.

다. 연구결과

1) 산초와 초피로부터 항균물질의 탐색과 동정

치아우식균 *S. mutans*에 대한 항균활성 성분 분포를 초피의 잎, 줄기, 뿌리, 과피와 종자 부위로 나누어 조사한 결과 잎, 줄기, 뿌리 부위에서는 항균활성을 확인할 수 없었고, 종자와 과피 추출 분획에서만 *S. mutans*의 생육을 저해하는 활성이 확인되

었다 (Table 37, Fig. 32). 이는 초피 잎의 추출물이 Gram 음성과 양성균에 항균활성을 보인다는 김과 정 등[123, 124]의 연구와는 상이한 결과이다. 따라서 초피 종자와 과피로부터 *S. mutans*의 생육저해 활성 물질을 분리하기 위해, 극성이 낮은 유기 용매부터 극성이 강한 용매로 추출하여 각 분획에 대한 항균활성을 조사하였다. Table 38와 Fig. 33에서 보는 바와 같이 초피 종자와 과피를 methanol, ethyl acetate, hexane, methylene chloride로 각각 추출한 extract와 수증기 증류하여 얻은 정유 성분에 대해서 항균활성을 조사한 결과, 과피에서는 *n*-butanol 외에 각 분획 간의 큰 활성 차이 없이 *S. mutans*에 대한 항균력을 나타내는데 반해 종자의 경우 수증기 증류 분획에서만 항균활성이 확인되었다. 강한 항균활성을 나타내는 초피 종자와 과피의 수증기 증류 분획의 항균활성 정도를 항생제인 ampicillin의 항균활성과 비교해 보기 위해, ampicillin을 0.1 및 0.5 mg/mL의 농도로 녹인 후 역시 disc에 30 μ L를 올려서 항균활성을 조사하였다. 그 결과, 종자의 수증기 증류 분획의 항균활성 정도는 0.1 mg/mL의 ampicillin의 그 효과와 비교될 만큼 높은 활성을 보였다 (Fig. 34).

한편, 초피 과피로부터 얻은 유기 용매 추출물들 중 항균활성이 가장 높게 나타난 methylene chloride extract를 다시 TLC로 분획하여 항균활성 성분을 조사한 결과, Table 39와 Fig. 35에서 보는 바와 같이 fraction A와 C 분획 외에는 항균활성이 전혀 나타나지 않았다. 시료들 중에 *S. mutans*에 대하여 강한 항균활성을 보이는 초피의 종자와 과피의 정유성분의 물질을 GC-MS로 비교 분석하였다. Table 40와 41에서 보는 바와 같이 sabinene, 2- β -pinene, γ -terpinene, terpinolene, linalool, citronellal, isopulegol, L-citronellol, cuminic aldehyde, phellandral, citronellyl acetate, α -humulene, α -morphene과 naphthalene 성분들이 초피 종자와 과피 두 정유 성분에서 공통적으로 검출되었으며, 초피 종자 정유 성분에서는 γ -terpinene(42.2 %), citronellal (14.4 %)과 geranyl acetate(10.7 %)가 주성분들이었고 초피 과피 정유 성분에서는 γ -terpinene (19.1 %), citronellal (12.2 %), lavandulyl acetate (11.1 %), 1- β -pinene (7.5 %), citronellyl acetate (5.0 %)이 주성분들이었다. 항균활성을 가지는 성분을 좀 더 구체적으로 탐색해보고자 *S. mutans*에 대한 비교적 높은 항균활성을 나타낸 Methylene chloride 추출 분획과 ethyl acetate, hexane, methylene chloride extracts도 GC-MS로 분석한 결과 (Table 42~45), 구조가 유사하고 분자량이 동일한

citronellal, citronellol, Isopulegol 등 citronello계와 Neryl acetate 또는 geranyl acetate계 그리고 sabinene, 2- β -pinene, γ -terpinene, β -myrcene, β -phellandrene류들이 공통적으로 검출되었다. 6 가지 물질들의 GC-MS 분석 결과를 종합해 보면, 항균 활성을 보인 물질들에게서 공통적으로 검출되며 가장 강한 항균활성을 보인 초피종자 정유의 주성분인 중 γ -terpinene (42.2 %), citronellal (14.4 %)과 geranyl acetate(10.7 %)이 항균활성을 가지는 후보물질로 추정된다. 이 분석 결과를 확인해 보고자 초피 과피 정유 성분을 TLC로 분리 정제하여 A~G 7 가지 물질을 얻었으며(Table 46), 이 중에 가장 높은 항균활성을 보인 E 정제물을 GC-MS로 추가 분석하였다. 구성 성분은 예상했던 바와 같이 Isopulegol (2 %), Cyclohexanol (3 %), 1- α -Terpineol (1 %), Citronellol (9 %), Trans-geraniol (2 %), Phellandral(2 %), Citronellyl acetate (2 %), Geranyl acetate (15 %), T-Muurolol (4 %) 등이었으며, 여기서 Geranyl acetate 는 더 높은 비율을 차지함에도 불구하고 초피 종자 정유 물질보다 정제물이 더 낮은 항균활성을 보인다는 점에서 후보 물질에서 제외될 수 있으며, 서 등[125]이 geranyl acetate 와 citronellal을 초피의 항균활성 성분으로 추정하고 Sigma-Aldrich사에서 구입하여 이들의 항균활성을 조사한 결과, 이 두 물질이 *E. coli*, *S. aureus*와 *S. enteritidis*에 대해서 매우 낮은 항균활성을 나타냈으며 이 두 성분 외에 다른 성분이 항균활성 물질로 작용할 것이라고 보고한 것과 관련하여 본 연구결과를 종합해 보면 초피 종자 정유 성분의 주성분 중 하나인 γ -terpinene이 항균활성을 가지는 물질로 추정된다 (Table 47).

또한 초피 종자와 과피 정유 성분의 *S. mutans*에 대한 최소 저해 농도를 조사해 본 결과, 초피 과피 정유성분은 0.3 mg/mL에서 초피 종자 정유성분은 4.0 mg/mL 농도로 처리했을 때 균의 생육이 완전히 저해되었다 (Fig. 36, 37). 이는 마늘 유래의 allicin이 27.5 μ g/mL로 농도에서 *S. mutans*의 생육을 저해한다는 보고보다는 낮은 활성이다[131]. 한편 Takarada 등이 manuka, 유칼리, lavadula, romarinus의 정유성분을 확보하여 구강 미생물에 대한 생육 저해를 살펴 본 결과에 의하면, *S. mutans* JC-2 균주에 대하여 manuka의 경우는 0.25 % 농도에서 그리고 그 외 정유 성분의 경우는 1 % 이상 농도에서 항균성을 보인다고 하였다[130]. 이에 반해 본 연구에서 정제한 초피 과피 정유 성분의 *S. mutans* 에 대한 최소 저해 농도를 조사한 결과, Fig. 36에

서 보는 바와 같이 0.03 % 농도에서도 완전한 생육 저해 효과를 보여 초피 과피 정유 성분의 치아우식균 *S. mutans*에 대한 항균활성이 매우 뛰어나다는 것을 알 수 있었다. 또한 *S. mutans*에 대하여 강한 항균 활성을 보이는 초피 과피와 종자의 추출물들에 대하여 어패류를 매개로 식중독을 일으키는 *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus pumilus*, 요로감염증과 연관이 있는 *Proteus vulgaris*와 피부염과 관련되는 *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, 심한 혈변성 대장염의 원인균으로 설사 등을 유발하는 병원성 대장균 *E. coli* O-157, 사람의 위내에 서식하면서 만성 위염, 위궤양 및 십이지장궤양, 위암 등을 유발하는 *H. pylori*를 대상으로 2 mg/disc 농도로 조사한 결과, *S. aureus*는 초피 과피의 ethyl acetate fraction과 *n*-butanol fraction에서 항균활성이 나타났으며, *B. pumilus*는 *n*-butanol fraction을 제외한 나머지 초피 과피 추출물에서 약하지만 항균활성이 나타났다. 그리고 *P. vulgaris*는 초피 과피의 ethyl acetate fraction에서, *E. coli* O-157은 초피 과피의 methylene chloride fraction에서, *A. hydrophila*는 초피 과피의 methylene chloride, ethyl acetate, *n*-butanol fraction에서 낮은 항균 활성이 나타났으며, *H. pylori*는 methanol, methylene chloride fraction에서 역시 활성이 나타났고, *S. epidermidis*의 경우는 전혀 모든 초피 종자와 과피의 추출물에서 항균력이 검정되지 않았다(Table 48). 이것으로 보아 다양한 병원성 미생물들에 대하여서도 초피 종자 보다는 과피의 추출물이 우수한 항균활성을 가지는 것을 알 수 있으며, *S. mutans*에 대해 가장 강한 항균활성을 보이는 초피 종자와 과피의 정유 성분을 앞서 소개된 병원성 미생물들에 대하여서도 항균활성을 조사한 결과, *S. mutans*와 마찬가지로 시험된 대부분의 병원성 미생물들에 대해서도 높은 항균 활성을 나타내는 것으로 미루어 초피 종자와 과피의 정유 성분에서 다양하고 넓은 범주의 병원성 미생물의 생육을 저해할 수 있는 항균 물질이 포함되어 있을 것이라 생각된다(Table 50). 또한 초피 과피의 methylene chloride extracts의 TLC 분획 A~F도 병원성 미생물들에 대한 항균활성을 조사하였는데, 이는 *S. mutans*에 대한 활성보다 높았다. 초피과피와 추출물에 대한 항균활성 검정 결과와 비슷하게 *S. aureus*, *B. pumilus*, *A. hydrophila*, *H. pylori*에서 2 mg/disc 농도 임에도 비교적 높은 활성이 나타났으며, *S. epidermidis*, *E. coli* O-157, *P. vulgaris*에서는 비교적 낮았다(Table 49). 가장 항균활성이 높게 나타나는 초피 과피의 정유성분에 대한 병원성 미생물들에 대한 Minimal inhibitory concentration (MIC)을 액체 배

양법을 이용하여 측정하였으며 그 결과, 그 범위는 0.1~0.48 mg/mL로 나타났다 (Table 51).

이와 같은 연구결과를 종합해 보면 균주마다의 차이는 있지만 초피 종자와 과피의 분획에서 병원성 미생물들에 대한 항균활성을 나타내며 특히 초피 종자와 과피의 정유성분의 항균활성이 매우 높게 나타났다. 그러나 추출물이라 그 속의 구성 물질들이 아주 많고, 항균활성을 나타내는 추출물들 사이의 GC-MS만으로는 공통물질의 검정이 어려워 강한 항균활성을 가지는 단일 물질의 분리가 쉽지 않다. 이에 본 세부과제의 연구에서 보다 확장적인 실험 기법과 분석법으로 초피 과피 정유성분의 구체적이고 명확한 분석이 요구되는 바이며 단일 생리활성물질 규명이 성공할 경우, 그 다양한 균주들에게 넓게 항균력이 적용 될 수 있어 여러 산업분야에 다양한 항균 제품으로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

끝으로 이 초피 종자와 과피 정유 성분에 대한 열 안정성을 검사하였으며, 그 결과는 Table 52에서 볼 수 있듯이 90 °C 이상 열처리로 40~50 % 정도의 활성이 감소되었지만 전체적으로 열에 대해 비교적 안정하였다.

Table 37. Antimicrobial activities of the fractions of the *Z. piperitum* DC against *S. mutans* tested based on disc diffusion method .

Sample	Clear zone (mm)			
	1 mg/disc	2 mg/disc	3 mg/disc	
Roots	*CR-methanol extract	-	-	
	CR-methylene chloride fraction	-	-	
	CR-ethyl acetate fraction	-	-	
	CR- <i>n</i> -butanol fraction	-	-	
	CR-water fraction	-	-	
Stems	**CST-methanol extract	-	-	
	CST-methylene chloride fraction	-	-	
	CST-ethyl acetate fraction	-	-	
	CST- <i>n</i> -butanol fraction	-	-	
	CST-water fraction	-	-	
Leaves	***CL-methanol extract	-	-	
	CL-methylene chloride fraction	-	-	
	CL-ethyl acetate fraction	-	-	
	CL- <i>n</i> -butanol fraction	-	-	
	CL-water fraction	-	-	
	CL-water precipitation	-	-	
	****CP-methanol extract	-	8.5	13.2
Pericarp	CP-methylene chloride fraction	-	8.5	14.4
	CP-ethyl acetate fraction	-	8.5	9.3
	CP- <i>n</i> -butanol fraction	-	-	9.0
	CP-water fraction	-	-	-
	*****CS-methanol extract	-	-	-
Seeds	CS-methylene chloride fraction	-	-	-
	CS-ethyl acetate fraction	-	-	-
	CS- <i>n</i> -butanol fraction	-	-	9.5
	CS-water fraction	-	-	-

*CL : Leaves of *Z. piperitum* DC

**CST: Stem of *Z. piperitum* DC

***CR : Roots of *Z. piperitum* DC

****CP : Pericarp of *Z. piperitum* DC

*****CS : Seeds of *Z. piperitum* DC

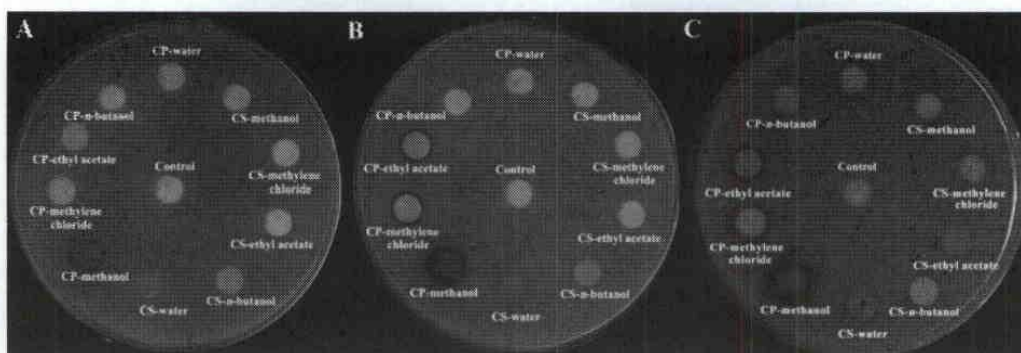


Fig. 32. Antimicrobial activities of the fractions of seeds and pericarp of the *Z. piperitum* DC against *S. mutans*. The sterilized paper discs of 7 mm diameter were saturated with 10, 20, 30 uL (per disc) of the essential oil dilution of 100 mg/mL and DMSO (dimethyl sulfoxide) was used as contro

Table 38. Antimicrobial activities of the extracts of seeds and pericarp of the *Z. piperitum* DC against *S. mutans*.

Sample	Clear zone (mm)			
	1 mg/disc	2 mg/disc	3 mg/disc	
Seed	*CS-methanol	-	-	
	CS-ethyl acetate	-	-	
	CS-hexane	-	-	
	CS-methylene chloride	-	-	
	***CS-essential oil	-	-	20.0
Pericarp	**CP-methanol	-	11.6	
	CP-ethyl acetate	-	13.2	
	CP-hexane	-	15.6	
	CP-methylene chloride	-	8.0	16.4
	CP-essential oil	-	9.5	23.6

*CP : Pericarp fraction of *Z. piperitum* DC

**CS : Seeds of *Z. piperitum* DC

***Essential oil obtained from steam distillation

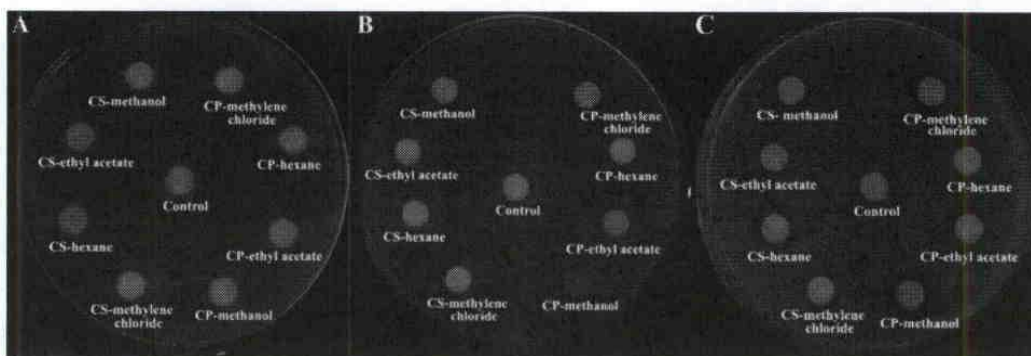


Fig. 33. Antimicrobial activities of the extracts of seeds (CS) and pericarp (CP) of the *Z. piperitum* DC against *S. mutans*. The sterilized paper discs of 7 mm diameter were saturated with 10, 20, 30 uL (per disc) of the stock solution dissolved in DMSO at a concentration of 100 mg/mL, and DMSO was used as control.

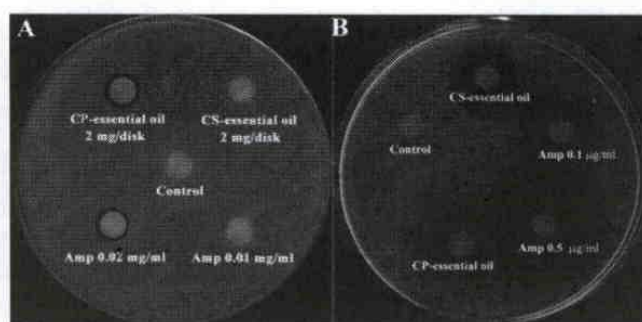


Fig. 34. Antimicrobial activities of the essential oils of seeds (CS) and pericarp (CP) of the *Z. piperitum* DC against *S. mutans*. The sterilized paper discs of 7 mm diameter were soaked with 10, 20, 30 uL (per disc) of the essential oil dissolved in DMSO at a concentration of 100 mg/mL, and DMSO was used as control.

Table 39. Antimicrobial activities of various TLC pools of methylene chloride fraction from *Z. piperitum* DC pericarps against *S. mutans*.

Extracts	Clear zone (mm)		
	1 mg/disc	2 mg/disc	3 mg/disc
*CP-MC-A	-	8	8.9
CP-MC-B	-	-	-
CP-MC-C	-	-	8.5
CP-MC-D	-	-	-
CP-MC-E	-	-	-
CP-MC-F	-	-	-

*CP-MC: Methylene chloride extract of *Z. piperitum* DC pericarp

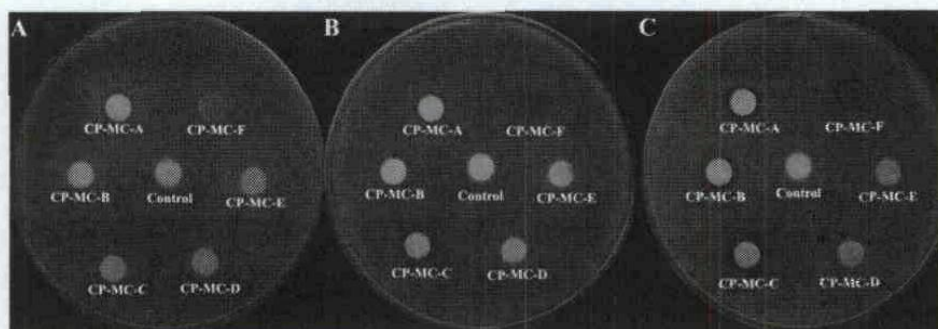


Fig. 35. Antimicrobial activities of various TLC pools of methylene chloride fraction from *Z. piperitum* DC pericarp against *S. mutans*. The sterilized paper discs of 7 mm diameter were soaked with 10, 20, 30 μ L (per disc) of various TLC fractions of methylene chloride extract dissolved in DMSO at concentration of 100 mg/mL, and DMSO was used as control.

Table 40. Volatile compounds identified from the essential oil of *Z. piperitum* DC pericarp.

No.	volatile compounds ^a	KI ^b	PA ^c (%)
1	thujene	0.482	tr
2	sabinene	0.495	1.4
3	2- β -pinene	0.557	0.3
4	1- β -pinene	0.576	7.5
5	γ -phellandrene	0.598	0.8
6	γ -terpinene	0.642	19.1
7	<i>trans</i> - β -Ocimene	0.661	2.8
8	terpinolene	0.737	1.9
9	linalool	0.742	1.4
10	rose oxide trans	0.764	tr
11	<i>cis</i> -p-2-methanol-1-ol	0.784	0.8
12	citronellal	0.836	12.2
13	isopulegol	0.851	0.9
14	12-cyclohexene-1-one	0.874	2.7
15	terpinene-4-ol	0.881	0.4
16	β -fenchyl alcohol	0.898	1.4
17	<i>cis</i> -piperitol	0.911	0.4
18	<i>trans</i> -carvenol	0.940	0.2
19	citronellol	0.962	3.3
20	cuminic aldehyde	0.966	0.6
21	piperitone	0.992	0.9
22	geraniol	1.002	0.8
23	linalyl acetate	1.011	1.2
24	phellandral	1.033	2.0
25	benzene methanol	1.052	0.4
26	2-4-decadienol	1.094	tr
27	11,3-isobenzofurandione	1.128	0.8
28	citronellyl acetate	1.171	5.0
29	neryl acetate	1.182	0.6

Table 40. Volatile compounds identified from the essential oil of *Z. piperitum* DC pericarp by GC/MS (continued).

No.	volatile compounds ^a	KI ^b	PA ^c (%)
30	methyl cinnamate	1.198	0.5
31	lavandulyl acetate	1.223	11.1
32	α -copaene	1.243	0.2
33	cyclotetradecane	1.260	tr
34	3-ethoxyl-4methyl oxyphenol	1.276	0.2
35	cinnamyl acetate	1.290	tr
36	eremophilene	1.299	tr
37	β -caryophyllene	1.312	1.2
38	1-pyridine,3-ethylthio	1.331	tr
39	1-neryl acetate	1.355	tr
40	α -humulene	1.362	0.7
41	γ -cardinene	1.372	tr
42	α -amorphene	1.391	tr
43	β -cubebene	1.400	0.4
44	caryophyllene oxide	1.541	tr
45	hexadecane	1.578	tr
46	δ -cadiene	1.620	0.6
47	T-muurolol	1.637	0.6
46	8-heptadecene	1.686	0.9
48	farnesyl acetate	1.873	tr
49	naphthalene	2.008	tr
50	14-(3,7,-dimethyl-6-o-Octenyl)	2.097	1.4
51	(+,-)-(2)-dihydrofarnesal	2.112	0.4
Total			83.7

^aThe volatile compounds are listed in order of their retention times.

^bKI, Kovats index on HP-5MS.

^cPA (Peak Area), average of relative percentage of total peak area, n=3

Table 41. Volatile compounds identified from the essential oil of *Z. piperitum* DC seeds by GC-MS.

No.	volatile compounds ^a	KI ^b	PA ^c (%)
1	sabinene	3.486	0.6
2	2- β -pinene	3.534	0.2
3	myrcene	3.734	8.7
4	1-phellandrene	3.943	0.2
5	12-pyridinamine	3.987	0.4
6	γ -terpinene	4.397	42.2
7	1,8-cineole	4.432	1.5
8	12-pentanol	4.558	0.2
9	2,6-dimethyl-hept-5-enol	4.846	tr
10	α -terpinolene	5.499	0.5
11	1-isopropyl-benzene	5.552	tr
12	linalool	5.922	0.8
13	rose oxide B	5.966	0.1
14	2,4-hexadiethyl α -diazo acetate	6.053	0.1
15	13-acetyl-4-methyl-3-pyrrolin-14-cyclopropyl-4-pentenol	6.362	0.4
16	citronellal	6.903	10.7
17	isopulegol	7.086	1.5
18	2-amino-phenol	7.434	0.2
19	4-isopropyl-2-cyclohexenel-one	7.739	4.0
20	linalyl propanoate	7.896	0.4
21	estragol	8.010	0.4
22	1,3-cyclooctane	8.262	0.2
23	<i>trans</i> -2-(1-pentenyl)furan	8.502	0.2
24	L-citronellol(rhodinol)	8.798	1.3
25	cuminic aldehyde	9.016	1.2
26	2-cyclohexen-1-one	9.104	tr
27	<i>O</i> -trideuteriomethoxy benzaldehyde	9.204	tr
28	12-cyclohexene-1-one	9.343	1.0
29	phellandral	9.779	0.5

Table 41. Volatile compounds identified from the essential oil of *Z. piperitum* DC seeds by GC-MS (continued).

No.	volatile compounds ^a	KI ^b	PA ^c (%)
30	17- β -propylenyl-1,6- β -benzen methanol	10.346	0.6
31	camphene	11.614	0.8
32	citronellyl acetate	11.705	3.0
33	geranyl acetate	12.499	14.4
34	β -caryophyllene	13.213	0.7
35	α -humulene	14.024	0.4
36	germacrene-D	14.673	tr
37	pentadecane	15.170	tr
38	α -muurolene	15.467	tr
39	α -amorphene	15.698	0.7
40	naphthalene	18.352	tr
41	caryophyllene oxide	18.374	tr
42	α -cadinol	18.648	0.3
43	δ -heptadecane	19.481	tr
44	12,2-dimethyl-2-methylene-1-(3-methyl-4-pentenyl)	25.656	0.7
Total			99.8

^aThe volatile compounds are listed in order of their retention times.

^bKI, Kovats index on HP-5MS.

^cPA (Peak Area), average of relative percentage of total peak area, n=3

Table 42. Volatile compounds identified from the methylene chloride fraction (CS-24) of the pericarp of the *Z. piperitum* DC by GC/MS

No.	volatile compounds	^a PA(%)
1	β -terpinyl acetate	1.08
2	citronella	2.46
3	cryptone	1.3
4	β -citronellol	1.86
5	2-cyclohexene-1-one	0.62
6	linalyl acetate	0.6
7	citronellyl acetate	3.82
8	geranyl acetate	11.29
9	<i>trans</i> -caryophyllene	0.68
10	crysanthenyl acetate	0.76
11	2-vinyladamantane	0.58
12	1-hydroxylinalool	0.53
13	1-heptadecene	1.96

^aPA (Peak Area), average of relative percentage of total peak area, n=3

Table 43. Volatile compounds identified from the ethyl acetate extract (CS-f) of the pericarp of the *Z. piperitum* DC by GC/MS

No.	volatile compounds	^a PA(%)
1	α -pinene	12.16
2	citronella	13.46
3	cryptone	1.52
4	citronellyl formate	1.33
5	2-cyclohexene-1-one	0.71
6	citronellyl 2-methylpropanoate	4.95
7	neryl acetate	19.85
8	<i>trans</i> -4,11,11-trimethyl-8-methylenebicyclo [7,2,0] undeca-4-ene	1.23
9	α -humulene	0.67
10	1-heptadecene	2.50
11	14-pentadecenoic acid	10.04

^aPA (Peak Area), average of relative percentage of total peak area, n=3

Table 44. Volatile compounds identified from the hexane extract (CS-g) of pericarp of *Z. piperitum* DC by GC/MS

No.	volatile compounds	^a PA(%)
1	β -myrcene	3.27
2	1-limonene	26.46
3	citronella	13.32
4	β -citronellol	1.26
5	2-cyclohexene-1-one	0.79
6	linalyl isobutyrate	0.9
7	citronellyl 2-methylpropanoate	4.04
8	geranyl acetate	14.1
9	<i>trans</i> -caryophyllene	1.02
10	α -humulene	0.82
11	γ -cadinene	0.64
12	1-heptadecene	1.94
13	heptadecene-(8)-carbonic acid-(1)	7.45

^aPA (Peak Area), average of relative percentage of total peak area, n=3

Table 45. Volatile compounds identified from the methylene chloride extract (CS-h) of pericarp of *Z. piperitum* DC by GC/MS

No.	volatile compounds ^a	^a PA(%)
1	geranyl formate	2.22
2	neryl acetate	21.81
3	linalyl formate	0.35
4	citronella	16.74
5	p-menth-2-en-1-ol	0.11
6	Isopulegol 3	0.32
7	cryptone	2.05
8	acyclopentane	0.1
9	β -citronellol	1.55
10	linalyl acetate	0.81
11	citronellyl 2-methylpropanoate	6.62
12	<i>trans</i> -sabinene hydrate acetate	0.36
13	geranyl acetate	17.05
14	γ -cadinene	0.99
15	<i>trans</i> -caryphyllene	1.31
16	α -humulene	0.67
17	(-)-caryphyllene oxide	0.2
18	1-heptadecene	2.85
19	citronellyl propionate	0.24

^aPA (Peak Area), average of relative percentage of total peak area, n=3

Table 46. Anti-microbial activities of various TLC fractions of the essential oil of the pericarp from *Z. piperitum* DC seeds against *S. mutans*.

Sample	<i>S. mutans</i> (clear zone)
CP-SD-A	10.5
CP-SD-B	13.8
CP-SD-C	-
CP-SD-D	12.6
CP-SD-E	18.9
CP-SD-F	15.0
CP-SD-G	9.0

Table 47. Volatile compounds identified from the TLC fraction CP-SD-E of the seeds of the *Z. piperitum* DC by GC/MS

No.	volatile compounds	^a PA(%)
1	isopulegol	2
2	cyclohexanol	3
3	1H-pyrazole	1
4	1- α -terpineol	1
5	citronellol	9
6	<i>trans</i> -geraniol	2
7	piperitone	0.
8	phellandral	2
9	citronellyl acetate	2
10	geranyl acetate	15
11	tau-Muurolol	0.58
12	α -Ylangene	1
13	T-Muurolol	4
14	hexadecanoic acid	3
15	<i>trans</i> -2-tridecenal	1
16	oxazole	1
17	benzofuran	1
18	1H-indazole	1

^aPA (Peak Area), average of relative percentage of total peak area, n=3

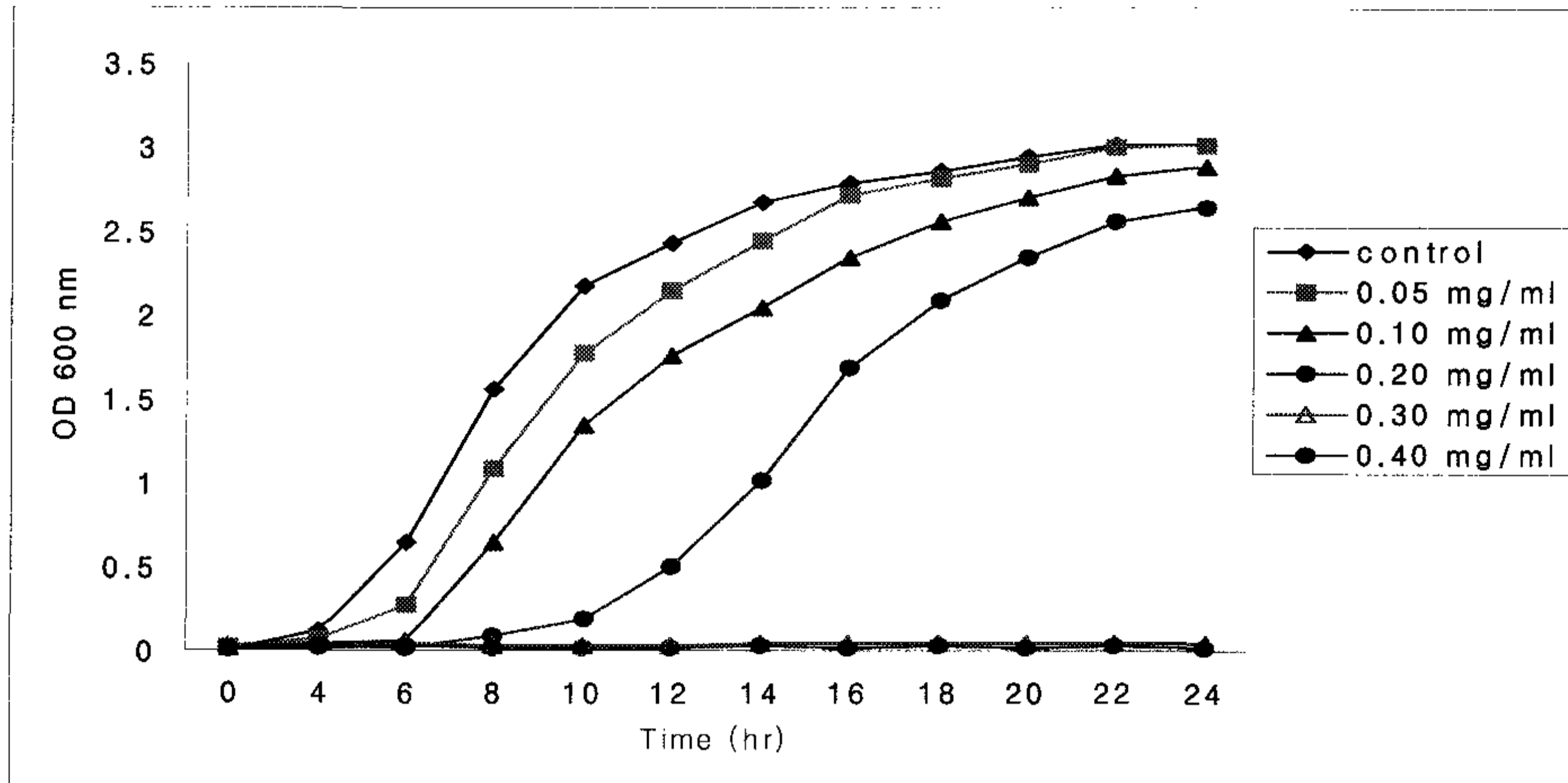


Fig. 36. Inhibitory effect of the essential oil from *Z. piperitum* DC seeds (pericarp) on the growth of *S. mutans*.

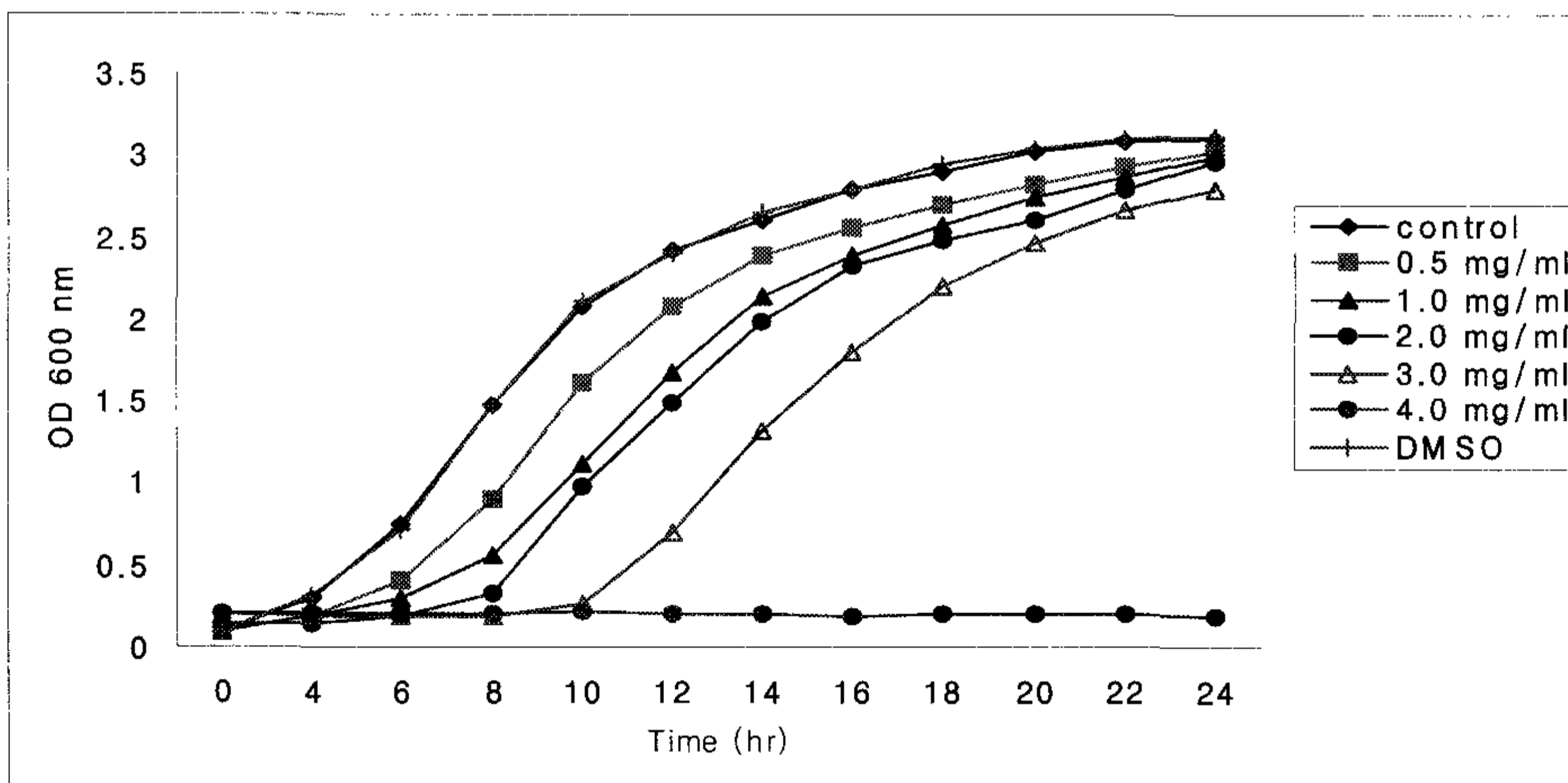


Fig. 37. Inhibitory effect of the essential oil from *Z. piperitum* DC pericarp (seeds?) on the growth of *S. mutans*.

Table 48. Antimicrobial activities of the fractions of seeds and pericarp of *Z. piperitum* DC against various bacteria.

Sample (2 mg/disc)	Clear zone (mm)						
	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermis</i>	<i>B. pumilus</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>E. coli</i> O-157	<i>A. hydrophila</i>	<i>H. pylori</i>
seeds	methanol extract	-	-	-	-	-	-
	methylene chloride fraction	-	-	-	-	-	-
	ethyl acetate fraction	-	-	-	-	-	-
	<i>n</i> -butanol fraction	-	-	-	-	-	-
	water fraction	-	-	-	-	-	-
pericarp	methanol extract	-	-	8	-	7.5	9.5
	methylene chloride fraction	-	-	8	-	8.5	9.5
	ethyl acetate fraction	11	-	9	9	-	7.5
	<i>n</i> -butanol fraction	10.5	-	-	-	-	-
	water fraction	-	-	8	-	-	-

Table 49. Anti-microbial activities of various TLC pools of methylene chloride fraction from *Z. piperitum* DC pericarp against various bacteria.

Extracts (2mg/ml)	Clear zone (mm)						
	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermis</i>	<i>B. pumilus</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>E. coli</i> O-157	<i>A. hydrophila</i>	<i>H. pylori</i>
CP-MC-A	12.0	11.0	10.0	10.0	-	8.0	8.0
CP-MC-B	8.5	-	8.0	-	-	8.5	9.0
CP-MC-C	9.5	-	8.0	8.5	-	10.0	-
CP-MC-D	-	-	-	-	-	-	-
CP-MC-E	-	-	-	-	-	-	-
CP-MC-F	-	-	-	-	-	-	8

Table 50. Anti-microbial activities of the essential oil from pericarp and seed of *Z. piperitum DC* against various bacteria.

Strains	CS-SD ¹		CP-SD ²	
	2 mg/disc	3 mg/disc	2 mg/disc	3 mg/disc
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	9	12 (unclear 14.5)	11.4	12.8 (unclear 15.3)
<i>S. epidermis</i> KCTC 1917	-	11.0	10.0	12.0
<i>B. pumilus</i>	11	15.0 (unclear 20.1)	10.0	11.6
<i>P. vulgaris</i> KCTC 2433	-	11.0	9.0	11.8
<i>E. coli</i> O-157 ACTC 43895	-	11.3	9.0	12.1
<i>A. hydrophila</i>	8.5	12.5	12.5	15.4
<i>H. pylori</i>	13	18	N.D	N.D

*1; The essential oil from the seed of *Zanthoxylum piperitum DC*

2; The essential oil from the pericarp of *Zanthoxylum piperitum DC*

Table 51. Minimal inhibitory concentration (MIC) of the essential oil from pericarps of *Z. piperitum DC* against various bacteria.

Strains	CP-SD (mg/ml)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	0.28
<i>Staphylococcus epidermis</i> KCTC 1917	0.10
<i>Bacillus pumilus</i>	0.28
<i>Proteus vulgaris</i> KCTC 2433	0.48
<i>E. coli</i> O-157 ACTC 43895	0.28
<i>Aeromonas hydrophila</i>	0.48

Table 52. Thermostability of the essential oil from *Z. piperitum* DC seeds and pericarp.

Temperature (°C)	control	50	60	70	80	90
Clear zone (mm)						
CP-SD	24	17	16	16	16	13
CS-SD	19	17	17	17	15	15

2) 초피의 항균력을 이용한 신기능성 향균 치약으로의 실용화 방안

초피 종자 정유성분을 0.1 % 가하여 치약 시제품 10개를 먼저 제조하였다. 이 시제품의 실용화를 위하여 경북대학교 자연대 미생물학과와 대구가톨릭대 생활과학대학 식품영양학과 학생과 교수를 대상으로 기호도 조사와 향균 활성 실험을 행하였다. 전체적으로 관능검사 결과를 분석해 보면, Table 53에서 보는 바와 같이 맛과 부드러움, 그리고 맵지 않은 점에서 다른 일반 치약 제품들 (PR, PR-G, OB)과 비교해 만족도가 높았으나 처음 입에 가까이 가져갔을 때 느껴지는 향이 너무 강한 것이 아주 큰 단점으로 나타났다. 그러나 이를 닦을수록 향은 점점 없어져 나중엔 느껴지지 않음으로 첫 향만 조금 약하게 하는 것이 가능하다면 아주 좋을 듯하다. 또한 초피 향 또는 휘발성 증류에서 비롯되는 냄새에 대한 개인적 기호도가 치약에 관한 기호도에도 크게 좌우하는 것으로 나타났으며, 치약으로써의 제품의 효능은 충분히 상품화 해 볼만한 만족도를 나타내었다. 그리고 이 제품의 가장 큰 장점이자 특성을 꼽는다면, 닦은 후에 개운함이 다른 일반 치약들과는 확연하게 비교될 만큼 오래간다는 것이다. 이 때 양치이후의 오랜 개운함이 치약내의 향균 성분에 기인하는 지 조사하기 위하여 치약 내에서의 초피 유래 물질의 항균력은 시중에서 팔고 있는 치약 제품 'LG 생활건강'사의 자일리톨을 함유한 페리오(PR)와 , 같은 회사 제품인 녹차 추출물을 함유한 페리오 녹차추출물 함유치약(PR-G), 그리고 '태평양'사의 한방생약성분을 함유한 오복치약(OB) 이렇게 3 가지를 대조군로 하여 *Streptococcus mutans*를 대상으로 Agar Disc diffusion 방법으로 향균 활성 비교 실험을 행하였다. 각 시료 치약을 증류수에 녹여 disc에 적셔서 *Streptococcus mutans*에 대해 24 시간 동안 반응시켰으며, 치약 제품들 중 시중에서 가장 향균 효과가 높다고 알려진 제품들 3 가지 제품들을 함께 시험

하였다. 반응시킨 결과 치약 1, 2, 4 % 농도에서는 4 가지 모두 향균 활성이 나타나지 않고, 6 % 농도에서 향균 활성이 약하게 나타나기 시작했으며, 8 % 농도에서는 본 연구팀이 제조한 초피 종자 정유 성분 함유 시제품에서 가장 높은 향균 활성이 나타났다, PR > PR-G >OB 순으로 활성이 나타났다(Fig. 38. 참고) 이 때 *E. coli* DH5a 균을 동시에 조사해 보았는데, 조사한 농도 하에서는 *E. coli*의 생육 저해능은 시제품을 포함해 모든 대조군에서 전혀 확인되지 않았다.

Table 53. The sensory evolution (Testing) of product.

Number	Age	Sex	Smelling	Acceptability	Smoothness	Hot taste	Refreshing
1	23	F	+*	+++	++	+	+++
2	23	F	+	+	+++	+	+++
3	23	F	+++	+++	++	+	+++
4	23	F	++	+++	+++	+	+++
5	24	F	+++	+++	+++	+	+++
6	25	F	+	++	++	+	+++
7	25	M	++	++	++	+	++
8	26	F	+	++	++	+	++
9	26	F	++	+++	+++	+	+++
10	26	M	+	+	++	+	++
11	27	F	+	+	+++	+	+++
12	27	F	++	++	+++	+	++
13	27	M	+	+	++	+	+++
14	27	M	+	+	++	+	++
15	28	M	+	++	++	+	+++
16	28	M	+	++	+++	+	++
17	46	F	++	+++	+++	+	+++
18	46	M	+++	+++	+++	+	+++
19	48	M	+++	+++	++	+	+++

※ +: dislike or not strong (flavor, smoothness, hot taste, refreshing)
 ++: neutral
 +++: like or strong

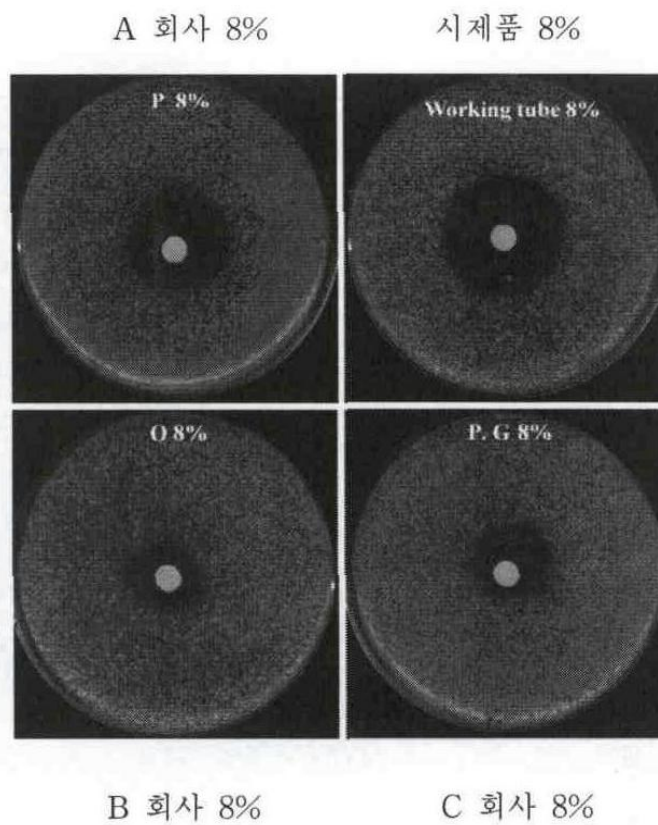
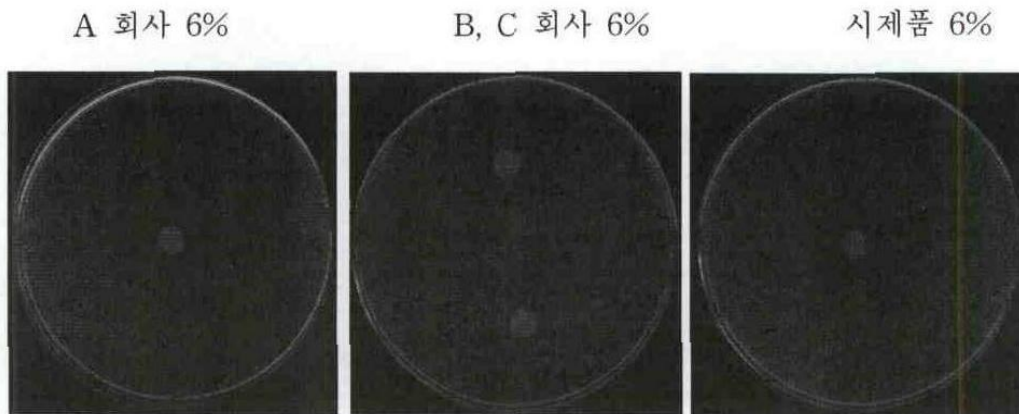


Fig. 38. Antibacterial activity of various toothpaste.

3) 항균 크림 및 화장품 보존료로의 실용화 방안

초피 유래의 항균활성을 위한 제품화의 실용화 방법의 하나로 항균성 크림으로의 개발 가능성을 타진하고자 초피 종자 정유 성분을 사임당 화장품 연구 개발실에 보내어 항균 크림 제조가능성을 부탁하였다. 현재까지의 사임당 화장품 연구실의 연구 결과에 따르면 세균에 대한 항균력은 기존에 사용할 항균물질과 비교해 볼 때, 그리 탁월한 효과가 검정되지 않았으나 특히 사상균인 *Aspergillus niger*, 여성 질염 원인균인 *Candida albicans* 등에 탁월한 항균활성을 보일 뿐만 아니라 여드름 원인균에 대해서도 높은 항균 활성을 보여 항균 및 신기능성 화장품과 화장품 보존료로의 활용가능성이 매우 높은 것으로 확인되었다(Table 54). 다음은 사임당 화장품에서 본 연구팀에 보낸 연구 방법과 결과이다. 사임당 화장품 연구실에서 보낸 전문을 그대로 실어 보고하는 바이다.

Table 54. 결과 (clear zone, mm)

	<i>E.coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>A.niger</i>	<i>P. acnese</i>	<i>C. albicans</i>
초피종자오일 (0.1%)	11.0	14.0	12.0	23.0	11.5	16
Unshiu Oil	7.0	7.0	8.0	6.0	7.0	11.0
Biosulfur Fluid	10.0	17.5	21.0	13.0	-	8.0

▣ 항균실험(MIC 측정)

1. 시료 초피종자오일 (대구가톨릭대학교)
 Unshiu Oil (선바이오텍)
2. 균주 *E. coli* (KCTC2571)
 S. aureus (KCTC1916)
 P. aeruginosa (KCTC2513)
 A. niger (KCTC6911)
 C. albicans (KCTC7965)

3. 실험방법

측정할 시료를 0.01, 0.1 %가 되도록 배지 (TSA, SDA)에 첨가하고 균힌다.
균주를 멸균수에 현탁하여 배지 표면에 streaking하고 35, 25 °C에서 배양한 후 균이 성장하지 않는 최저농도 (MIC)를 결정한다.

4. 결과 0.01, 0.1, 0.2, 0.4 % 농도에서 균 생존

5. 다음실험방법으로재실험예정

균주를 배양배지에 현탁하여 균액을 준비한다.

균액을 배지의 1 % (50 uL)이 되도록 접종한다.

적정 온도에서 배양한 후 탁도로 미생물 증식 여부를 확인하여 균이 증식되지 않는 최소 농도를 MIC로 결정한다.

▣ 항균실험 (PaperDisc법)

1. 시료 천연항균오일 (대구가톨릭대학교)

Unshiu Oil (선바이오텍)

Biosulfur Fluid (Provital)

2. 균주 *E. coli* (KCTC2571)

S. aureus (KCTC1916)

P. aeruginosa (KCTC2513)

A. niger (KCTC6911)

P. acnese (KCTC3314) / 여드름균

3. 실험방법

준비된 균액을 1/100로 희석하여 1 mL pour plating한다.

Paper disc에 시료를 각각 20 uL씩 점적하여 건조시킨다.

Agar plate가 굳으면 시료를 점적한 paper disc를 agar plate에 심는다

배양온도에서 배양하면서 관찰하여 형성된 clear zone을 측정한다.

(clear zone 형성이 클수록 항균효과가 큼)

* 연구기획사업 등 사업별 특성에 따라 목차는 변경 가능함

4) 초피나무 유래의 항균활성 물질의 돌연변이 유발성 조사를 통한 안정성 측정

짧은 시간 내 유전자 수준의 손상이 발암 위험에 대한 가장 항균활성이 높은 초피 종자와 과피 정유성분의 산업적 활용을 위한 준비 단계로 두 정유성분에 대한 안정성을 확인하고자 *Salmonella typhimurium* 돌연변이 균주 *Salmonella typhimurium* TA 100, TA 1538을 이용하여 돌연변이 유발성을 조사하였다. Ames test 하기에 앞서 시료의 *Salmonella typhimurium* TA 100, TA 1538에 대한 독성을 먼저 조사하여 실험 농도를 결정하고자 하였다. 초피과피 정유성분은 *Salmonella typhimurium* TA 100에 처리했을 때 Ames test에서 독성 조사하는 데 가장 높은 농도인 10 mg/mL에서도 균이 충분히 자라 10 mg/mL 이하 어느 농도에서도 측정이 가능하며, *Salmonella typhimurium* TA 1538에 대해서는 2 mg/mL 농도까지는 정유성분이 독성을 미쳐 1 mg/mL 이하 농도에서 실험을 계획하였다. 초피종자 정유 성분은 *S. typhimurium* TA 100, TA 1538 둘 다 0.1 mg/mL 이하에서는 세포가 충분히 자라 0.1 mg/mL 이하 농도에서 실험을 계획하였다.

Samples	TA 100		TA 1538	
	mg/mL	colony	mg/mL	colony
초피 과피 정유성분	4	>500	0.5	>500
	6	>500	0.8	>500
	8	>500	1	>500
	10	>500	2	2
초피 종자 정유성분	0.1	>500	0.1	>500
	0.25	0	0.25	2
	0.4	0	0.4	0
	0.5	0	0.5	0

Salmonella typhimurium TA 100 균주를 이용하여 초피 종자와 과피의 정유성분에 대한 돌연변이 유발성에 대해 조사한 결과, 초피 종자 정유성분은 *Salmonella typhimurium* TA 100을 이용하여 돌연변이 유발성을 조사결과 2.5 ug/mL에서 control

에 비해 revertants 수가 % 감소되었으며, 1 ug/mL에서 88.5 % 감소되었고, *Salmonella typhimurium* TA 1538에 대해서는 7.5 ug/mL에서 88.8 %, 2.5 ug/mL에서 90 % 감소되는 것을 볼 수 있었다. 초피 과피 정유성분은 *Salmonella typhimurium* TA 100을 이용하여 돌연변이 유발성을 조사결과 0.1 mg/mL에서 94 %, 25와 10 ug/mL에서 99 % 감소되었으며, *Salmonella typhimurium* TA 1538을 이용하여 돌연변이 유발성을 조사결과, 50 ug/mL 97.7 % 감소되었으며 *Salmonella typhimurium* TA 100을 20 ug/mL 99.3 %가 감소되었다. 결과적으로 돌연변이 유발성에 대한 초피 종자와 초피과피의 정유성분이 세포에 미치는 효과는 안전할 뿐만 아니라 돌연변이 유발성을 85 %이상 높은 억제 효과를 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

3. 산초나무 유래의 Mitochondria-dependant Apoptosis 유도 물질의 탐색과 그 작용기전 연구

가. 연구배경

운향과에 속하는 *Zanthoxylum* 속에 속하는 산초나무 (*Zanthoxylum schinifolium*) 과 초피나무 (*Zanthoxylum piperitium* DC)는 방향성 식물로 한국을 비롯한 중국과 일본을 포함하는 동북아시아 지역에서 오랫동안 전통적인 향신료, 약용 및 제유용으로 널리 사용되어 왔다. 산초나무와 초피나무는 매우 유사하지만 초피나무는 가시가 마주 나고 열매가 붉은 것에 반해 산초나무는 가시가 어긋나고 잎자루 밑 부분에 가시가 1개 달리며 열매가 녹색을 띤 갈색으로 구별된다. 산초나무의 활용을 살펴보면 산초 열매는 그 기름을 장기간 복용하면 해소가 떨어진다고 알려져 있으며, 산초 열매의 매운맛 성분은 살균작용과 구충작용을 하며, 염증이 있는 눈병을 진정시키는데 뛰어난 효과가 있다고 한다. 한방에서는 열매껍질을 야초(野椒)라는 약재로 쓰는데, 복부냉증을 제거하고 구토와 설사를 그치게 하며, 회충, 간디스토마, 치통, 지루성 피부염 등에 사용한다. 그러나 산초의 주 용도는 향신료인데 이는 단순히 매운 맛만 가지고 있는 것이 아니라 상쾌하고 시원한 산초 특유의 방향과 생선독의 완화 및 생선비린내 제거 효과가 있어 어류를 많이 섭취하는 한국과 일본에서 특히 많이 이용되고

있다. 그러나 그 안전성과 위해성이 규명되지 않아 이에 대한 과학적인 연구가 필요한 실정이다. 더구나 기능성식품 개발 시 가장 중요하게 고려해야 할 식품 안전성과 연관하여 분자 생물학적 및 세포 생물학적 연구가 절실히 요구되는 바이다.

나아가 최근 신규 생리활성물질 및 기능성식품 개발과 관련하여 식용과 약용으로 오래 동안 이용된 식물의 안정성이 인정되면서 초피속 (*Zanthoxylum species*)에 속하는 식물에 대한 연구 결과, 이들의 열매, 과피, 잎, 뿌리 등에서 항산화, 항균성, 항혈전성, NO 생성 및 항경련성 등 그 유용성이 다양하게 보고되어 이들에 대한 관심이 높다. 현재까지의 국외 산초나무 연구로는 대부분이 중국에서 기초적인 연구가 이루어져, Cheng 등[135]은 새로운 amide 성분인 *cis*-fagaramide를 보고하였으며, Tsai 등[136, 137]은 뿌리껍질로부터 coumarin과 peroxyterpenyl coumarin을 분리하였으며, Chang[138] 등은 껍질로부터 terpenyl coumarin을 확인하였다. Chen 등[139]은 껍질로부터 6종의 새로운 coumarin을 분리하여 *in vitro*에서 혈소판응집작용을 확인하였으며, Jiang 등[140]은 뿌리로부터 schinifolin과 5'-acetoxyschinifolin을 분리하여 보고하였다. 국내 산초나무 연구동향으로는 이 등[141]이 산초로부터 휘발성 정유성분을 분석하였으며, 조 등[142]은 줄기의 coumarin 성분인 lacinartin 성분이 monoamine oxidase(MAO)를 억제한다고 보고하였다. 문 등[143]은 산초에 대한 지질과산화와 간손상의 저해활성을 조사하였으나 활성성분에 대한 연구는 행해지지 않았다. 또한 문 등[144]은 산초나무의 항산화활성을 보고하였으며, 김 등[145]은 nitrite-scavenging activity에 대한 연구 보고가 있다.

따라서 본 연구에서는 산초나무의 활용성 확대와 민간 사용에 있어서의 안전성 확보를 위하여 산초 잎을 중심으로 세포 독성 성분 탐색과 그 작용기전을 밝히고자 하였다.

나. 연구방법

1) 산초의 획득

산초나무 뿌리와 줄기는 경상북도 팔공산에서 채취하여 세절 건조 후, 산초나무 잎과 열매는 2003년 6월 중순에 경북 경산시 자인면 소재 동아임장에서 구입하여 동

결건조 후 가루로 한 다음 실험재료로 사용하였다.

2) 시약 및 기기

산초의 추출과 분획에 사용한 시약은 99.8 % methanol, 95 % ethanol, 99.5 % methylene chloride, 99.5 % ethyl acetate, 96.0 % *n*-hexane(증류해서 사용), 99.0 % *n*-butyl alcohol 등이다. 사용한 기기는 Rotary Vacuum Evaporator (Eyela N-12, Heidolph WB 2000), Heating Mantle (110 V, 700 W, 5000mL), Aspirator (Eyela CA-1111, Eyela A-3S) 등이다.

3) 실험에 이용한 세포주 및 세포배양

본 연구에 사용한 암세포주는 estrogen receptor positive 인간 유방암 세포주인 MDA361와 estrogen receptor negative 인간 유방암 세포주인 MDA438 그리고 인간 혈액암 세포주인 Jurkat T cell 유래의 Jurkat T cell clone E6.1이었다. 모든 세포는 37 °C, 5 % CO₂ incubator에서 배양되었다. Jurkat T 세포는 RPMI 1640 배지에 10 % FBS (Fetal Bovine Serum), 20 mM HEPES, 100 µg/mL, 500 µM-mercaptoethanol 을 첨가하여 배양하였고 MDA361 세포와 MDA438세포는 DMEM 배지에 10 % FBS, 20 mM HEPES, 1 mM sodium pyruvate, 100 µg/mL gentamicin, 500 µM 2-mercaptoethanol을 첨가하여 배양하였다.

4) 유효물질 추출 및 분획

산초 줄기, 뿌리, 종자, 과피는 100 % methanol로, 산초 잎은 80 % methanol로 추출하였다. 추출액을 농축한 후 농축엑기스를 methylene chloride, ethyl acetate, *n*-butyl alcohol 및 수층으로 분획, 농축하여 활성측정에 사용하였다.

5) MTT assay를 통한 viability 조사

MTT를 반응시켜 540 nm에서 대조군의 흡광도 값이 0.6에서 0.8 수준이 되도록 일정한 수의 세포를 96 well plate에서 일정 시간 37 °C CO₂ incubator에서 배양한 후 1.1 mg/mL 농도로 PBS에 녹인 MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) 보존용액을 모든 well에 50 µL/well씩 가해주고 다시 4 시간 더

배양하였다. 이어서 배양을 종료하고 plate를 2300 rpm에서 10분간 원심 분리하여 생성된 formazan 결정을 가라앉힌 후 상등액 200 μ L를 제거하고 150 μ L의 DMSO에 결정을 용해시켜 micro plate reader로 540 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 이때 결과 분석은 실험군의 평균 OD값을 구하여 대조군의 평균 OD값에 대한 백분율 값을 산출하였다.

6) Apoptosis 에 의한 DNA fragmentation 추출

Apoptosis에 의해 세포내에 생성되는 apoptotic DNA를 분리하기 위해, 먼저 세포를 PBS용액으로 세척한 후 원심분리하여 pellet으로 얻은 다음 lysis buffer (0.5 % Triton X-100, 5 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4)에 현탁하여 4 $^{\circ}$ C에서 20분 동안 incubation하였다. 이 cell lysate를 14,000 rpm에서 원심분리하여 상등액을 확보하고 50 $^{\circ}$ C에서 2 시간 동안 proteinase K로 처리한 다음, 이어서 37 $^{\circ}$ C에서 4 시간의 RNase처리로써 RNA를 제거하였다. 단백질을 제거시키기 위해 동일 volume의 buffer-saturated phenol 용액으로 1회 추출을 시도한 다음, 0.5 M의 NaCl과 2.5 volume의 cold ethanol을 첨가하여 -20 $^{\circ}$ C에서 하룻밤동안 apoptotic DNA를 침전시켰다. 침전된 DNA를 원심분리하여 회수하고 이를 70 % cold ethanol로 세척한 다음, 적당량의 TE buffer에 녹여 1.2 % agarose gel에서 전기영동하고 ethidium bromide로 염색한 후 apoptotic fragmentation을 UV illuminator에서 조사하였다.

7) Flow cytometry 분석

약 1×10^6 세포를 2 %의 FBS와 0.02 % sodium azide를 함유한 PBS용액 4 mL로 세척한 후 70 % ethanol에 현탁하여 4 $^{\circ}$ C에서 1 시간동안 고정하였다. 고정된 세포를 다시 2 mL의 같은 용액으로 2회 세척한 후 50 μ g/mL 농도의 RNase A 용액 250 μ L에 현탁하여 37 $^{\circ}$ C에서 30 분 동안 처리하여 세포내 RNA를 제거하고 1.12 % sodium citrate buffer (pH 8.45) 용액에 propidium iodide를 50 μ g/mL으로 녹인 보존 용액 250 μ L를 가해 37 $^{\circ}$ C에서 20 분동안 세포내 DNA를 염색하였다. 이를 FACS Calibur로 분석하여 각 세포내 염색된 DNA의 함량을 기준으로 cell cycle distribution을 조사하였다.

8) Cell lysate 조제

세포의 total cell lysate는 다음과 같은 방법으로 조제하였다. 먼저 세포를 cold PBS로 4 °C에서 3회 세척한 후 20 mM Tris, 137 mM NaCl, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM phenylmethanesulfonyl (PMSF), 10 µg/mL aprotinin, 2.5 µg/mL E-64, 1% NP-40, pH 8.0의 lysis buffer 용액에 현탁한 다음 sonication하고 ice 상에서 30분 동안 lysis를 유도시킨 다음 14,000 rpm에서 20분 동안 원심분리하여 상등액을 total cell lysate로서 얻었다. 얻어진 cell lysate의 단백질 농도는 PIERCE사(Rockford, IL, USA)의 Micro BCA Protein Assay Reagent Kit으로 정량하였다.

9) Western blot analysis

Cell lysate (20~30 µg)를 Novex NuPAGE Gel Electrophoresis System에서 전기영동한 후 Immobilon-P Nylon membrane에 electrotransfer 하였다. 이어서 Nylon membrane blot을 blocking solution (3 % skim milk)으로 4 시간 처리하고, 0.5~1 µg/mL 농도의 primary antibody로 하룻밤 동안 반응시켰다. Secondary antibody로서 horse radish peroxidase conjugated anti-rabbit, anti-mouse 혹은 anti-rat IgG를 90 분 처리하고 세척한 다음, Amersham사의 ECL plus detection 방법으로 detection하였다.

10) 활성 성분 분석

활성성분의 Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) 분석은 Hewlett-Packard (HP) 6890 gas chromatography와 HP 5903N mass spectrometer 분석기기를 사용하였다. Column은 5 % Phenyl Methyl Siloxane을 충전한 capillary column HP-5MS이었고, helium carrier gas flow rate는 0.7 mL/min으로 60 °C에서 15 분간 holding 한 후 detector의 온도를 28 °C로 하였으며, split ratio은 30:1로 하였다. MS 부분은 electron impact (EI) mode로 50-800 mass 단위로 하였다. 시료의 각 성분은 실험에서 얻은 mass spectrum과 library search로 찾아낸 mass spectrum을 비교하여 확인하였으며, 사용한 program은 NIST/EPA/MSDC이었다.

다. 실험결과

1) 산초나무로 부터 세포독성 분획의 탐색

산초나무 유래의 암 독성 물질을 탐색하기 위하여 먼저 산초 각 부위별 분획 추출물을 human leukemia T세포 유래인 Jurkat E6.1 세포주를 대상으로 세포독성을 측정하였다. 산초의 뿌리, 줄기, 잎, 종자, 과피를 methanol, methylene chloride, ethyl acetate, *n*-butanol, 수층으로 각각 분획한 추출물로 처리하여 각각의 추출물의 세포독성을 비교하였을 때, 각 부위의 methylene chloride 분획층이 높은 세포독성을 나타내었고(data not shown), 각 부위별 methylene chloride 분획의 세포 독성은 잎 > 줄기 > 종자 > 뿌리 > 과피의 순서로 나타났다.

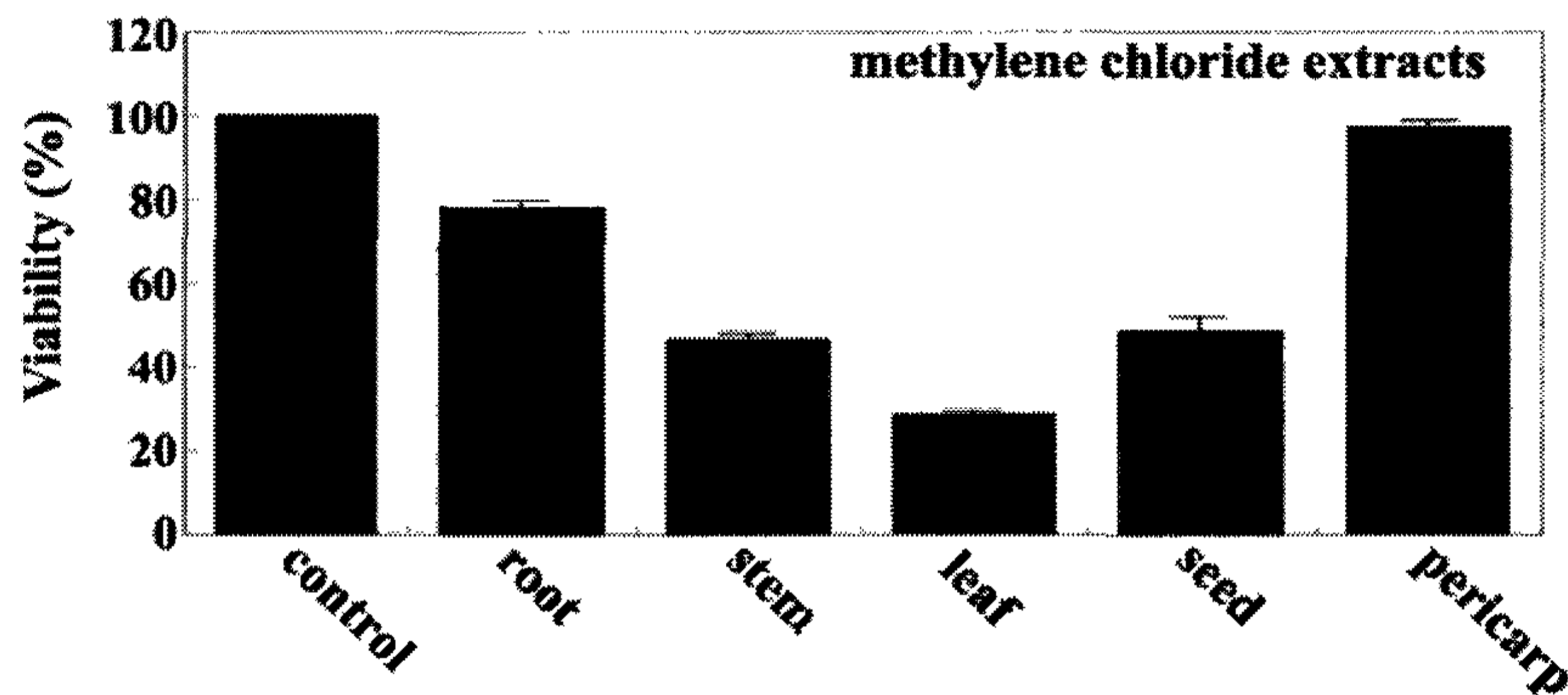


Fig. 39. Cytotoxic effect of the methylene chloride extracts from various parts of *Z. schinifolium* (100 μ g/mL) on human acute leukemia Jurkat T cells

2) 산초 잎 유래의 암세포독성물질의 탐색

산초 잎 유래의 암 독성 물질을 탐색하기 위하여 먼저 산초 잎의 분획 추출물을 estrogen receptor positive인 human breast cancer cell lines인 MDA361 과 estrogen receptor negative인 human breast cancer cell lines인 MDA438, 그리고 인체 혈액암 세포주인 Jurkat T cell 유래의 Jurkat T cell clone E6.1에 처리하여 세포 증식 독성을 조사한 결과 산초 잎 추출 분획 중 methylene chloride 층에서 세포독성이 가장 강하게 나타났다. 두 종류의 인체 유방암 세포주 중에서는 estrogen receptor positive MDA361 보다는 estrogen receptor negative MDA438 에 더 강한 활성을 보였다. 따라서 산초 잎 추출 분획 중 methylene chloride 층(SL-14)의 암세포 독성작용 물질을 중심으로 세포독성 작용기구를 연구하였다(Fig. 40).

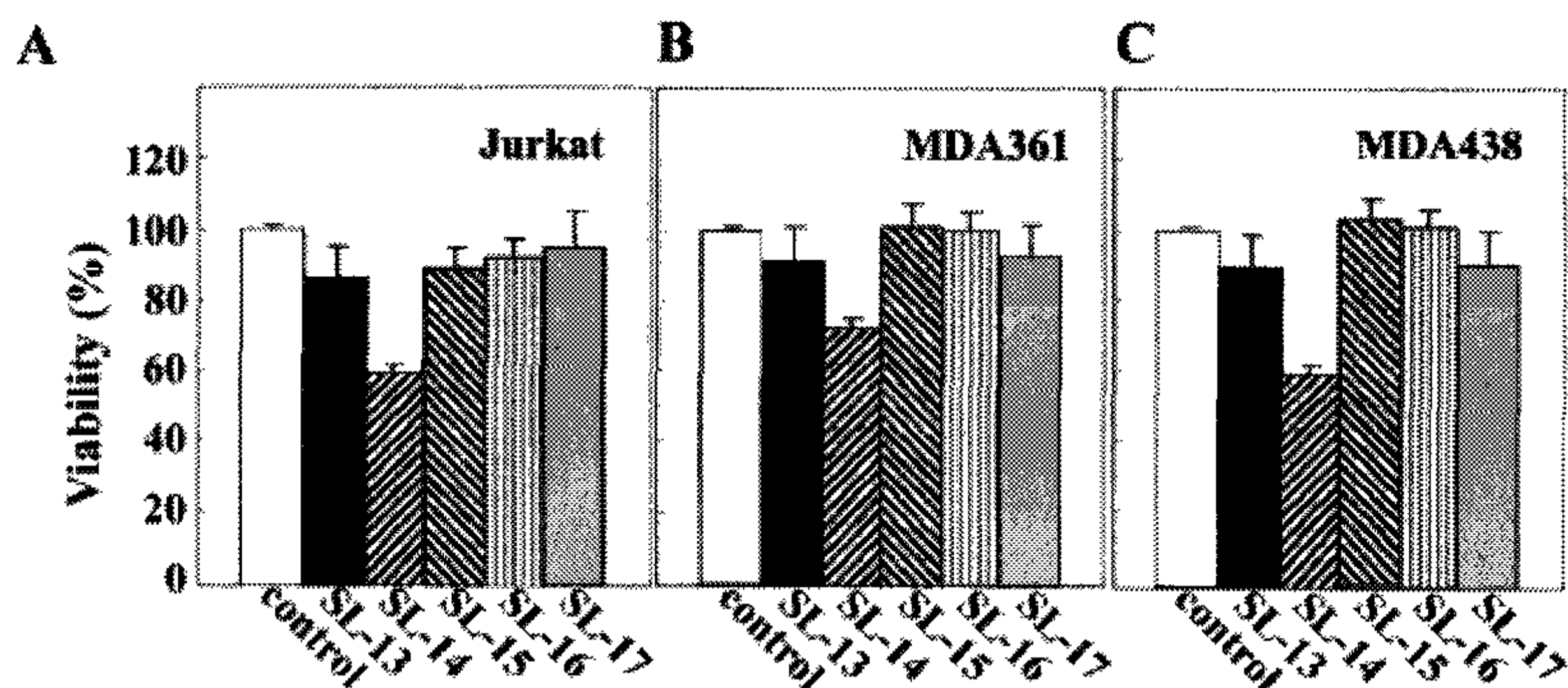


Fig. 40. Cytotoxic effect of the individual organic solvents from leaves extracts of *Z. schinifolium* (50 ug/mL) on human acute leukemia Jurkat T cells (A), estrogen receptor-positive breast cancer MDA361 cells (B), and estrogen receptor-negative breast cancer MDA438 cells (C).

3) 산초 잎 유래의 암세포독성물질의 작용 기전

산초 잎의 methylene chloride 분획의 암세포 독성 작용기전을 밝히기 위하여 인간 혈액암 세포주인 Jurkat T cell 유래의 Jurkat T cell clone E6.1와 Jurkat E6.1세포에 anti-apoptotic factor인 Bcl-xL과 control vector를 transfection시켜 확보한 stable cell line인 Jurkat T cell clone J/Bcl-xL와 Jurkat T cell clone J/Neo를 사용하였다. 먼저 SL-14 분획물의 세포 독성 유도 최소 농도를 조사하기 위하여 시료를 20 µg/mL의 농도로 DMSO에 녹여 보존용액을 준비하고 0, 25, 50, 100 µg/mL의 4 가지 농도로 Jurkat에 처리하고 일정 시간 동안 배양한 후 MTT assay 방법으로 세포의 viability를 측정하였다. Fig. 41 에서 보는 바와 같이 Jurkat에 대하여 25 µg/mL 농도에서 약 20 %의 세포 생육저해 활성을 나타내기 시작하여 100 µg/mL 농도에서 세포 증식을 완전히 저해함을 알았다. 그리고 이때 세포주기에 대한 영향을 Becton Dickinson사의 FACSCalibur를 가지고 flow cytometry 방법으로 조사해 본 바 Fig. 42. 에서 보는 바와 같이 Jurkat J/Neo에서는 50 µg/mL 농도에서 많은 세포가 apoptosis에 의해 사멸하여 subG₁ 세포가 많이 생성되는데 반해, anti-apoptotic factor로 알려진 Bcl-xL overexpressing시킨 Jurkat J/Bcl-xL세포에서는 100 µg/mL에서도 Bcl-xL에 의해 apoptosis가 억제됨을 알았다.

산초 잎의 methylene chloride 추출물 처리에 따른 subG₁ 세포 생성에 관한 기전을 확인하기 위하여 mitochondria-dependent pathway에 의한 apoptosis에 관여하는 단백질로 알려진 caspase 3, caspase 9와 PARP의 분해를 Western analysis로 조사해 본 결과 Fig. 43. 에서 보는 바와 같이 caspase 3 과 9 의 활성화에 따른 PARP의 분해를 확인할 수 있어 산초 잎 유래의 암세포 독성 물질은 mitochondria-dependent cytochrome C release에 의한 세포 사멸을 유도함을 알았다. 그리고 이는 apoptosis 특유의 현상인 DNA fragmentation에 대한 산초 잎 분획물의 영향에 있어서도 조사한 결과 (Fig. 41)와 같이 anti-apoptotic 유전자 Bcl-xL이 과발현 되는 Jurkat J/Bcl-xL 세포주에서 DNA fragmentation이 억제되는 결과와도 일치함을 알 수 있었다.

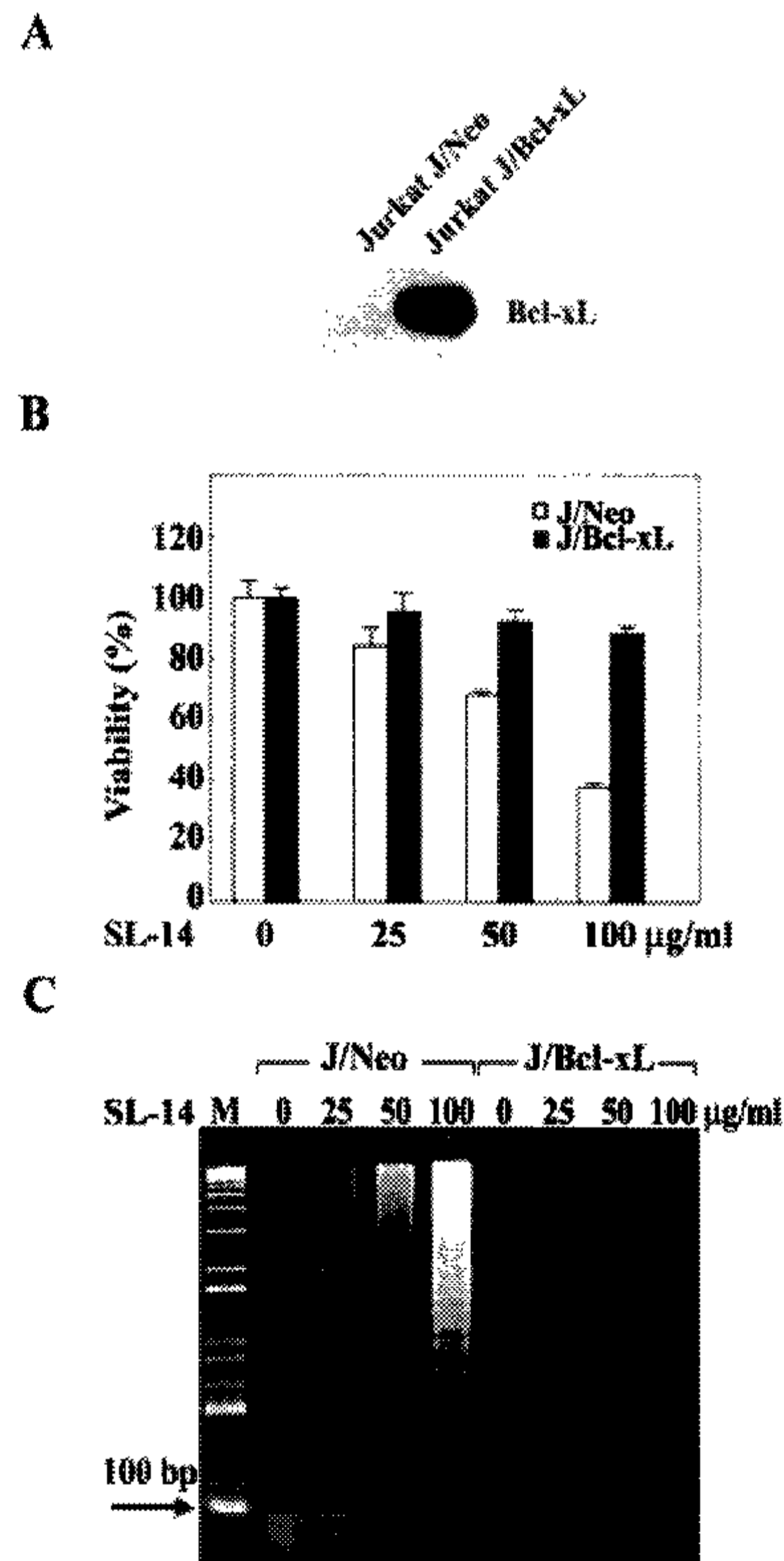


Fig. 41. Effect of the methylene chloride fraction (SL-14) on cell viability of Jurkat T cells transfected with vector (J/Neo) or Bcl-xL gene (J/Bcl-xL). Western blot analysis (A), MTT assay (B), apoptotic DNA fragmentation analysis (C) after treatment with SL-14.

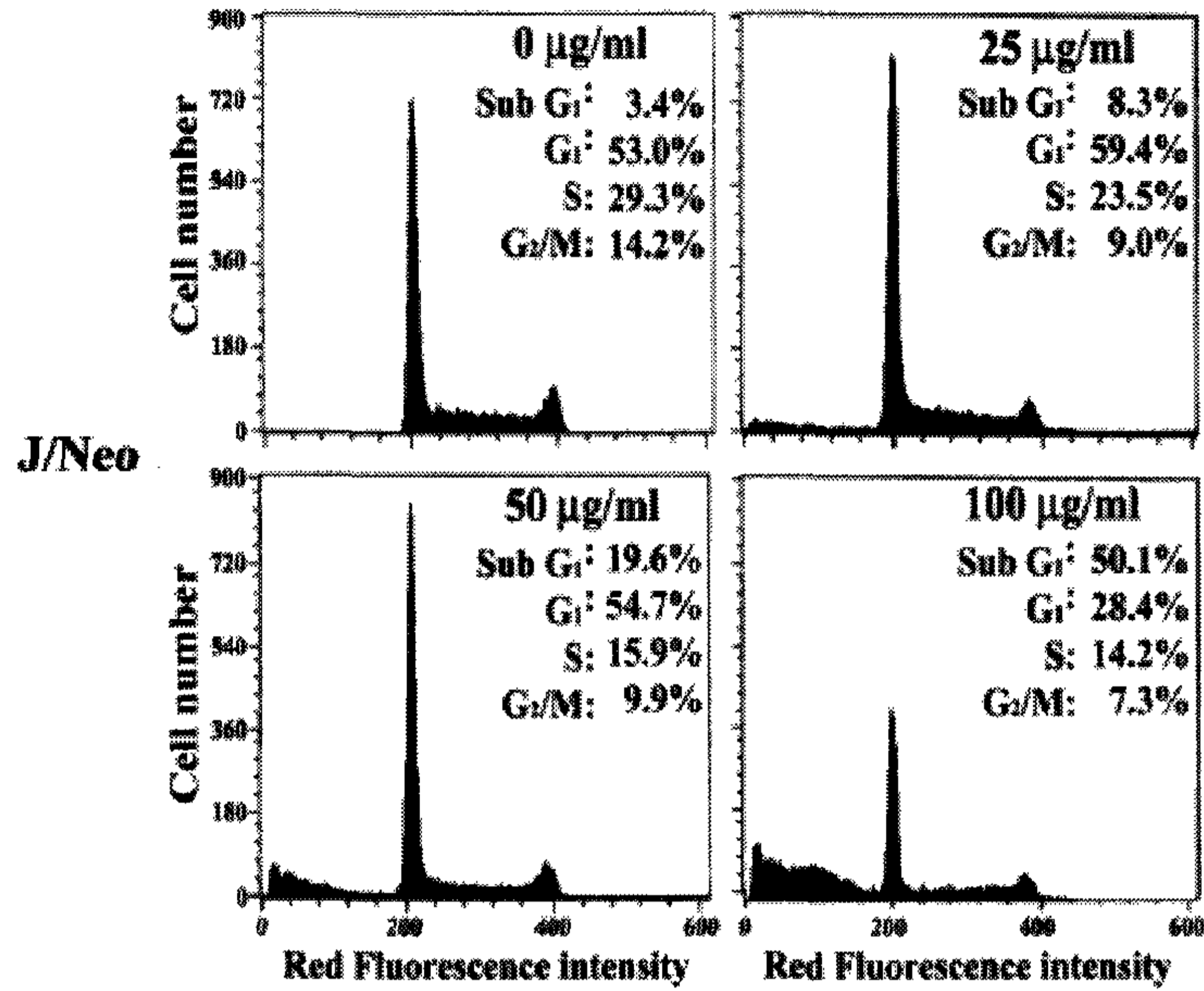
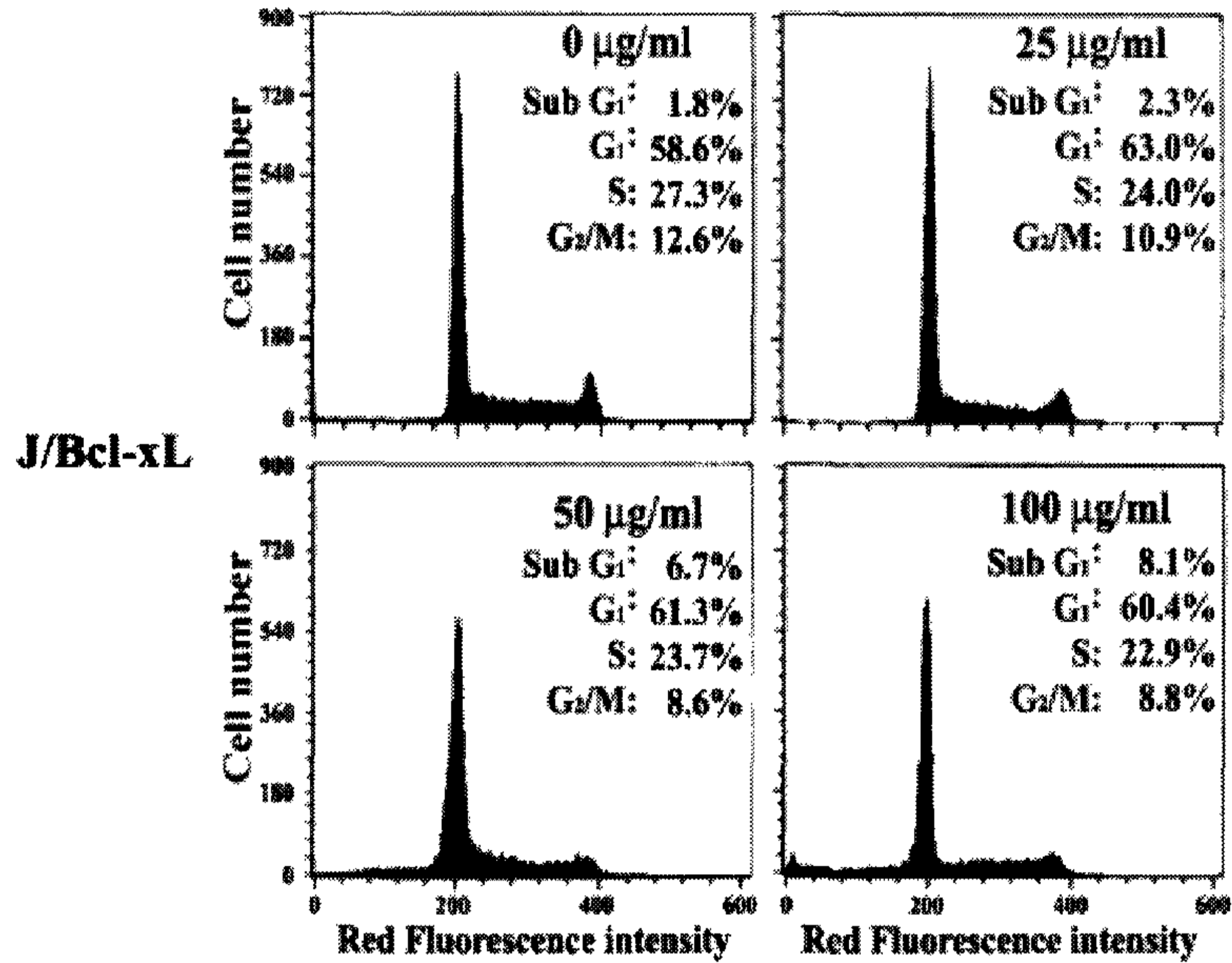
A**B**

Fig. 42. Flow cytometric analysis of the cell cycle distribution in Jurkat T cells transfected with vector (J/Neo) (A) and Jurkat T cells transfected with Bcl-xL gene (J/Bcl-xL) (B) after treatment with SL-14.

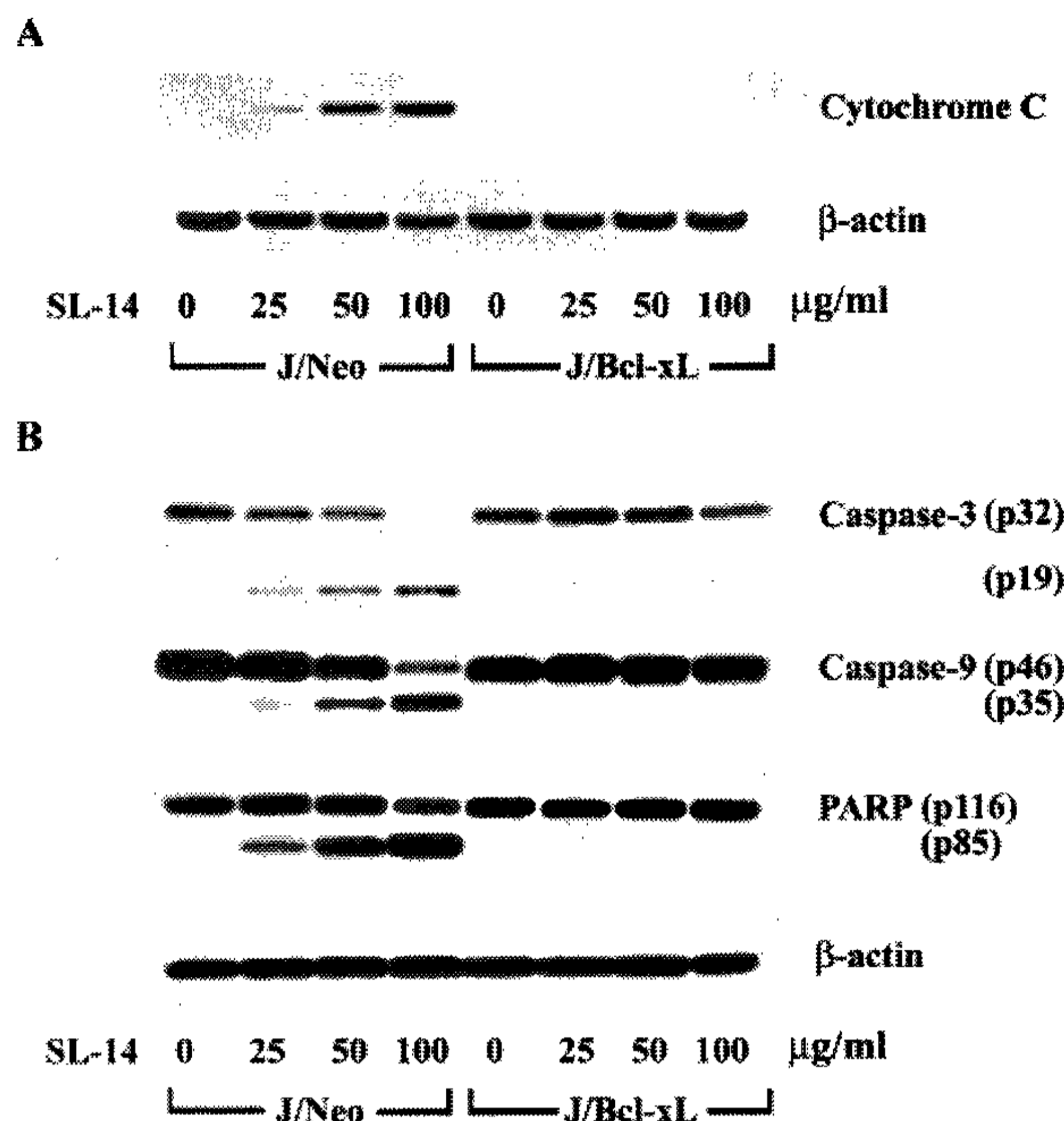


Fig. 43. Western blot analysis of mitochondrial cytochrome C release and β -actin (A), and caspase 3 activation, caspase-9 activation, cleavage of PARP and β an-actin in Jurkat T cells (B) after treatment with SL-14.

4) 산초 잎의 methylene chloride 분획 활성 성분의 분석

암세포에 대한 세포독성을 나타낸 SL-14의 유효성분을 찾아내기 위해서 SL-14를 GC-MS를 사용하여 SL-14에 포함된 성분들을 조사하였다. SL-14에 대한 GC-MS 분석결과 9, 19-cyclolanost-24-en-3-ol (15.10 %), 2-alpha-methyl-17, beta hop-21-ene (15.10 %), 15-methyl-2,3-dihydro-1H Benzazepin (11.95 %), Phytol (10.38 %), lupeol (9.92 %), 12-methylbenzofuran (8.23 %), hexadecanoic acid (5.96 %), cis,cis,cis-9,12,15-octadecatrienoic acid-methylester (5.49 %), 9,12,15-octadecatrienoic acid-methylester (3.59 %), 15-methyl-4-(1-methylethylidene)-2-(4'-nitrophenyl) (3.36 %), 23-S-ethylcholest-5-en-3, beta-1 (2.42 %), hexadecanoic acid methyl ester (1.93 %), vitamine E (1.88 %), beta-amyrin (0.96 %), auraptene (0.89 %), 23-S-methylcholesterol (0.72 %), 9,12-octadecadienoic acid (0.59 %)등이 확인되었다 (Table 55).

Table. 55. Volatile compounds identified from the methylene chloride fraction of *Zanthoxylum schnifolium*

No.	Compounds	+R (min) ^a	composition (%) ^b
1	2-ethyl-2,3-dihydro-1,3,2-benzoxaborole	12.581	0.39
2	germacrened	14.673	0.39
3	14-methoxy-2-methylcinnamic acid	20.775	0.31
4	hexadecanoic acid methyl ester	24.105	1.93
5	hexadecanoic acid	24.933	5.96
6	9,12-octadecadienoic acid	27.190	0.59
7	9,12,15-octadecatrienoic acid-methylester	27.325	3.59
8	phytol	27.530	10.38
9	cis,cis,cis-9,12,15-octadecatrienoic acid-methylester	28.162	5.49
10	15-methyl-4-(1-methylethylidene)-2-(4'-nitrophenyl)	31.884	3.36
11	auraptene	35.641	0.89
12	11-H-indole 1-methyl	36.133	0.31
13	I-indolize	36.377	0.14
14	12-methylbenzoforan	37.245	8.23
15	15-methyl-2,3-dihydro-1H Benzazepin	37.602	11.95
16	vitamine E	42.344	1.88
17	23-S-methylcholesterol	43.425	0.72
18	23-S-ethylcholest-5-en-3, beta-1	44.506	2.42
19	beta-amyrin	44.863	0.96
20	2-alpha-methyl-17, beta-hop-21-ene	45.159	15.10
21	9,19-cyclolanost-24-en-3-ol	45.164	15.10
22	lupeol	45.425	9.92

^a Retention time (in minutes)

^b Relative amount (%)

5) 산초 잎의 methylene chloride 분획 중에서 암세포독성물질 탐색

암세포에 대한 독성을 확인한 산초 잎의 methylene chloride 분획을 column으로 정제하였다. 정제한 물질들을 대상으로 MTT assay를 통하여 암세포 독성을 측정하였다. 산초 잎의 methylene chloride 분획을 column을 이용하여 23 종의 정제물을 얻었다. 이 정제물들을 0, 12.5, 25, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 인간 혈액암 세포주인 Jurkat T cell clone E6.1에 처리하였다. 96 well plate에 5×10^4 의 세포를 넣고 물질들을 각각의 농도로 처리한 후, 48 시간 동안 CO_2 incubator에서 배양하였다. 그리고 1.1 mg/mL 농도의 MTT 보존용액을 50 $\mu\text{L}/\text{well}$ 씩 가해주고 다시 4 시간 더 배양한 후, 540 nm에서 흡광도를 측정하여 대조군 대비 백분율을 구하였다. 용매에 불용성인 SL-MC-I-1을 제외한 22 종의 물질들 중에서 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 50 % 미만의 viability를 나타낸 물질들은 SL-MC-N (17.33 %), SL-MC-O (37.21 %), SL-MC-R (8.53 %), SL-MC-S (38.70 %), SL-MC-T (29.62 %)였으며, 가장 높은 처리 농도인 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 50 % 미만의 viability를 나타낸 물질들은 SL-MC-G (10.33 %), SL-MC-H (7.39 %), SL-MC-K (9.26 %), SL-MC-M (10.20 %), SL-MC-Q (27.35 %), SL-MC-W (16.70 %)였다. 이들 중에서도 SL-MC-N (42.62 %)과 SL-MC-R (31.58 %)은 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서도 50 % 미만의 viability를 나타내어 매우 강한 암세포독성 능력을 나타내었다. 이들 23 종의 추출물을 다시 정제하여 SL-MC-H-A, SL-MC-D-A, SL-MC-I-1, SL-MC-J-A를 단일성분물질로 분리 정제하여 각각 20(29)-Lupen-3-ol (lupeol), 20(29)-Lupen-3-one (lupeone), 7-[(3,7-Dimethyl-2,6-octadienyl)oxy]-coumarin (auraptene), bergapten으로 확인하였다. 이중 SL-MC-H-A, SL-MC-D-A는 DMSO에 불용성이라 세포수준의 실험에 이용할 수 없었다. 그러나 SL-MC-I-1는 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 14.73 %의 생존율을 나타내 매우 강한 암세포독성을 확인할 수 있었고 SL-MC-J-A는 SL-MC-I-1 만큼은 아니지만 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 73.13 %의 생존율을 나타냄을 알 수 있었다.

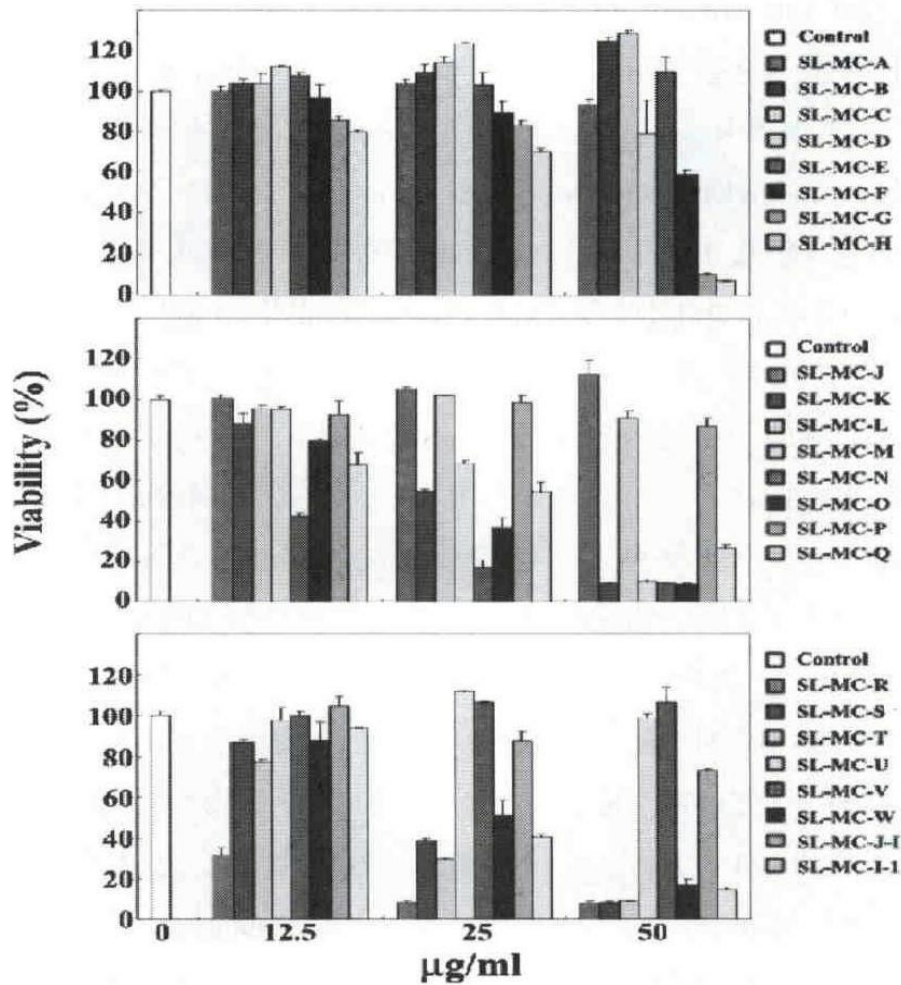


Fig. 44. Cytotoxic effect of the fractionated parts from SL-14 on human acute leukemia Jurkat T cells.

25 µg/mL의 농도에서 50 % 미만의 viability를 나타낸 물질들 중에서 SL-MC-O, -R을 더욱 정제하여 단일 물질로 분리하였다. 그 결과 SL-MC-O에서 SL-MC-O-4-B, SL-MC-O-6-A, SL-MC-O-7-A, SL-MC-O-7-B를 얻었으며, SL-MC-R에서는 SL-MC-R-1~4를 얻었다. 이들 물질들을 대상으로 SL-MC-O와 SL-MC-R의 강한 세포독성이 어떤 물질에 기인하는지 MTT assay로 분석하였다. SL-MC-O과 SL-MC-R이 25 µg/mL에서 50 % 미만의 viability를 나타냈기 때문에 정제한 물질들을 Jurkat T cell clone E6.1에 0, 6.25, 12.5, 25 µg/mL의 농도로 처리하였다. 물질을 처리하고 44 시간 동안 37 °C에서 배양하였고 PBS에 1.1 mg/mL의 농도로 준비한 MTT 용액을 50 µL씩 분주하고 4 시간 더 반응시켰다. 그 결과 Fig. 45에서 보는 바와 같이 SL-MC-O에서 정제한 물질들 중에서는 세포독성을 나타내는 정제물이 없었으나, SL-MC-R에서 정제한 물질들 중에는 SL-MC-R-2가 6.25 µg/mL 농도에서 54.61 %, 12.5 µg/mL 농도에서 27.40 %, 25 µg/mL 농도에서 10.73 %의 viability를 나타내 가

장 높은 세포독성을 보여주었고 SL-MC-R-4가 6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 84.90 %, 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 60.77 %, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 18.17 %의 viability로 두 번째로 높은 세포독성을 보여주었다.

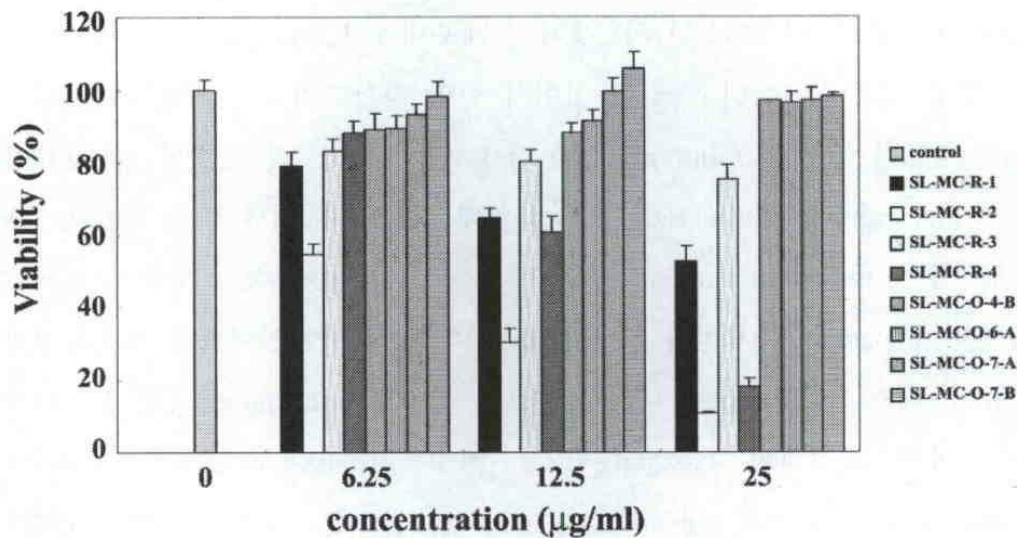


Fig. 45. Cytotoxic effect of the isolated compounds from SL-MC-R and SL-MC-O on human acute leukemia Jurkat T cells.

4. 산초 (*Zanthoxylum schinifolium*)의 세포독성 성분인 auraptene의 인체 백혈병 세포주 Jurkat T 세포에 대한 세포자살 유도 활성 및 그 분자기전: ER stress-매개 caspase-12 및 caspase-8 활성화

가. 연구배경

세포자살 혹은 세포계획사는 다세포 생물의 발생과 항상성유지에 있어서 대단히 중요한 역할을 수행한다. 비정상적인 세포증식의 특징을 지닌 종양에 있어서는 세포자살 기전의 비정상적 조절 및 이에 따른 세포자살과 세포분열 간의 밸런스 상실이 종양발생의 요인이 되는 세포생존에 있어서의 유리함을 줄 수 있다. 여러 가지 종양에 있어서 Fas[172, 173] 또는 그 하류의 신호전달 인자들[174]의 발현의 변화에 의해 Fas-매개 사망신호를 무력화되는 경우가 알려져 있다. 종양세포의 세포자살은 종양세포를 제거할 수 있는 훌륭한 기전이므로, 암세포에 대한 항암제의 효율적인 작용기전

으로 인정되고 있다. 이러한 관점에서 본 연구진은 자연계의 천연물로부터 새로운 세포자살 유도 항암성분을 찾기 위한 연구를 수행해오고 있다. 종양에 대한 항암물질의 세포자살 유도기전과 관련하여 세 가지의 서로 다른 세포자살 유도 경로가 제시되고 있다. 그 중 첫째는 세포외재성 사망수용체-의존적 경로이며, 둘째는 세포내재성 mitochondria-의존적 경로이고[175], 셋째는 세포내재성 endoplasmic reticulum (ER) stress-매개성 경로이다[176]. 종양에 있어서 항암 화학요법제 처리에 의한 사망 수용체-의존적 세포자살 신호는 upregulation of FasL 및 Fas 의 발현의 upregulation 및 이에 따른 Fas signaling[177~180] 유도에 의해 개시되며, 이에 반해 mitochondria-의존적 사망신호는 mitochondria로부터 세포질로의 cytochrome c의 방출에 의해 개시되며 뒤이어서 caspase-9의 활성화 및 caspase-3의 활성화가 일어나서 세포사멸에 이른다[181, 182]. 그리고 ER stress-매개성 세포자살 경로는 caspase-12의 활성화에 의해 개시되며, 이때 활성화된 caspase-12는 직접 pro-caspase-9를 미토콘드리아 cytochrome c와 무관하게 활성화할 수 있는 것으로 알려졌다[183, 184]. 또한 caspase-12의 활성화와 함께, ER stress는 caspase-8의 활성화 및 JNK의 활성화를 유도하며, 이들은 이어서 미토콘드리아 cytochrome c 방출을 초래하게 된다[185, 186]. 그러나, 항암 화학요법제의 세포자살 유도기전에 대한 연구는 여전히 매우 부족한 상태에 있으며, 특히 항암제의 세포자살 유도 활성이 표적이 정상세포를 제외하고 종양세포에만 국한되는 선택적인 것인지를 규명하기 위해서 더 많은 연구의 수행이 필요한 시점에 있다.

최근 본 연구진은 정상세포와는 달리 종양세포에 특이적으로 작용할 수 있는 새로운 세포자살 유도성 항암물질을 분리하고자, 식용식물의 구성성분의 경우 인체 정상 세포들에 대해 심각한 독성을 나타내지 않을 것이라는 단순한 개념에 근거하여 다양한 식용식물을 대상으로 하여 스크린 중에 있다. 본 연구에서는 한국, 중국, 일본 등지에서 식품의 풍미제로 사용하고 있는 산초 (*Zanthoxylum schinifolium*)의 잎을 대상으로 인체 급성백혈병 세포주인 Jurkat T 세포에 대하여 세포자살을 유도하는 성분의 분리 정제를 시도하였으며, 그 결과 세포자살 유도활성을 지닌 성분을 최종적으로 단일물질로서 얻었으며, 이를 기기 분석을 통해 구조를 규명한 결과, 7-[(3,7-Dimethyl-2,6-octadienyl)oxy]-coumarin (auraptene)으로 확인되었다. Auraptene은 감귤류

(Citrus fruit)에 함유된 천연물로서 최초로 확인된바 있으며, 동물 모델계에서 경구 투여에 의한 다양한 생리적 작용이 보고된바 있다. 이러한 생리적 작용에는 항염증 효과[187, 188], 항산화 효과[189], 대식세포 및 T 세포에 대한 면역조절능[190], 해독 효소들의 활성 강화효과[188], 그리고 특정 세포증식 표식인자들의 발현 억제 효과 [191] 등을 들 수 있다. 특히, auraptene은 마우스나 쥐 모델에서 화학적 발암인자의 처리에 의한 종양발생을 효과적으로 억제하는 종양억제활성을 지니고 있음이 보고된 바 있다[192, 193]. 그러나 종양발생억제활성과 직접 관련될 수 있는 auraptene의 종양 세포에 대한 세포자살 유도활성 및 그 분자적 기전에 대한 연구는 현재까지 거의 수행된 바가 없다.

본 연구에서는 인체 급성 백혈병 세포주인 Jurkat T 세포를 대상으로 하여 산초 (*Z. schinifolium*) 잎으로부터 정제한 auraptene의 세포자살 유도 활성을 조사하였다. 아울러 이미 동물실험을 통해 보고된 바 있는 auraptene의 종양발생억제효능과 auraptene의 세포자살 유도 활성과의 관련성을 밝히기 위해 auraptene에 의한 세포자살 유도의 분자적 기전을 규명하였다. 그 결과로서, auraptene은 인체 급성백혈병 세포주인 Jurkat T 세포에 대해 apoptotic DNA fragmentation을 유도할 수 있으며, 그 분자적 기전으로는 ER stress에 의해 매개되는 caspase-12 활성화 및 caspase-8의 활성화에 의해 개시되는 미토콘드리아-의존적 및 미토콘드리아-비의존적 caspase 연쇄반응을 통한 사망신호의 전달경로가 관련되어 있음을 규명하였다. 이러한 연구결과는 식용식물인 산초(*Z. schinifolium*) 잎으로부터 정제된 auraptene의 암예방작용의 기전규명뿐만 아니라 auraptene의 항암물질로서의 활용 가능성을 평가하는데 대단히 유용하게 활용될 것이다.

나. 재료 및 방법

1) 시약, 항체 및 배지

ECL Western blotting kit 은 Amersham (Arlington Heights, IL, USA)에서, 그리고 Immobilon-P 막은 Millipore Corporation (Bedford, MA, USA)에서 구입하였다. Anti-cytochrome c는 Pharmingen (San Diego, CA, USA)에서, anti-Fas 및 anti-FasL는 Transduction Laboratories (Lexington, KY, USA)에서, anti-caspase-3,

anti-caspase-8, anti-caspase-9, anti-PARP, anti-Bcl-xL와 anti- β -actin은 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)로부터 구입하여 사용하였다. A broad-range caspase inhibitor z-VAD-fmk, caspase-8 inhibitor z-IETD-fmk, calpain inhibitor E64d, 그리고 JNK inhibitor SP600125 등은 Calbiochem (San Diego, CA, USA)로부터 구입하였다. Human acute leukemia Jurkat T cell line clone E6.1, 그리고 J/Bcl-xL gene을 stable transfection 시킨 J/Bcl-xL clone 및 empty vector를 stable transfection 시킨 J/Neo clone은 미국 NIH, NIA, Gerontology Research Center 의 Dr. Dennis Taub로부터 제공받았다. 인체 peripheral blood mononuclear cells (PBMC)는 건강한 인체 말초혈액에 heparin을 처리한 후 Ficoll-Hypaque 용액 (Amersham) 상에서 원심분리하여 분리하였다. Jurkat T cells과 인체 PBMC는 10 % FBS, 20 mM HEPES (pH 7.0), 500 μ M β -mercapto-ethanol, 100 μ g/mL gentamycin을 함유한 RPMI 1640 (Hyclone, Gaithersburg, MD, USA) 완전배지를 이용하여 배양하였다. 한편 J/Neo 및 J/Bcl-xL 세포주는 400 μ g/mL의 G418을 첨가한 RPMI1640 완전배지를 이용하여 배양하였고 마우스 흉선상피세포주의 경우는 DMEM 배지에 10 % FBS, 20 mM HEPES, 1 mM sodium pyruvate, 100 μ g/mL gentamicin, 500 μ M 2-mercaptoethanol을 첨가하여 배양하였다.

2) *Zanthoxylum schinifolium*으로부터 세포독성성분의 분리

암세포 독성물질의 분리에 사용한 산초 (*Z. schinifolium*)의 잎은 경상북도 경산에 위치한 동아임장으로부터 구입하여 동결건조하여 사용하였다. 먼저 동결건조한 산초 잎 (4.4 kg)을 80 % methanol로 상온에서 추출한 다음 이를 감압농축하여 1.0 kg의 추출물을 얻었다. 이어서 이 methanol 추출물을 5 L의 물에 녹이고, methylene chloride (4 L \times 3) 및 *n*-butanol (4L \times 5)로 연속추출하여 311 g의 methylene chloride 분획과 385 g의 *n*-butanol 분획을 얻었다. 잔존하는 수용성 분획은 감압건조하여 300 g의 고형물로서 회수하였다. 이때 methylene chloride 분획이 대부분의 세포독성성분을 함유하고 있었으므로 이를 silica gel column을 이용하여 100 % hexane \rightarrow 100 % ethyl acetate의 조건으로 gradient elution시켜 23 분획 (SL-MC-A~W)을 확보하였다. 이때 얻어진 SL-MC-I 분획의 재결정화를 시도하여 세포자살유도활성을 지닌 auraptene (100 mg)을 최종적으로 순수하게 확보하였다.

3) Cytotoxicity assay

각 추출물 및 auraptene의 Jurkat T cells에 대한 세포독성은 cell viability를 측정하는 MTT assay로 조사하였다. 먼저, Jurkat T cells (5×10^4)를 단계별로 희석한 시료용액과 함께 96-well plates에서 20 시간 incubation 시킨 다음, 50 μ L의 MTT (3-(4, 5-dimethyl thiazolyl) 2, 5-diphenyl tetrazolium bromide) 용액 (1.1 mg/mL)과 혼합한 후 4시간 동안 더 incubation 하였다. 이때 형성된 formazan crystal을 150 μ L의 MTT 용액으로 용해시키고, 이를 plate reader를 이용하여 540 nm에서 OD를 측정하였다.

4) Apoptotic DNA fragmentation 분석

Jurkat T cells에서 유도되는 apoptotic DNA fragmentation의 확인을 위해, 먼저 세포를 PBS용액으로 세척한 후 원심분리하여 cell pellet을 얻은 다음 lysis buffer (0.5 % Triton X-100, 5 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4)에 현탁하여 4 $^{\circ}$ C에서 20 분 동안 incubation하였다. 이 cell lysate를 14,000 rpm에서 원심분리하여 상등액을 확보하고 50 $^{\circ}$ C에서 2 시간 동안 proteinase K로 처리한 다음, 이어서 37 $^{\circ}$ C에서 4 시간의 RNase처리로써 RNA를 제거한다. 단백질을 제거시키기 위해 동일 volume의 buffer-saturated phenol 용액으로 1회 추출을 시도하고, 0.5 M의 NaCl과 2.5 volume의 cold ethanol을 첨가하여 apoptotic DNA를 침전시켰다. 침전된 DNA를 원심분리하여 회수하고 이를 70 % cold ethanol로 1회 세척한 다음, 적당량의 TE buffer에 녹여 1.2 % agarose gel에서 전기영동하고 EtBr에 염색한 후 190-200 bp 크기의 apoptotic fragmentation을 UV illuminator에서 관찰 조사하였다.

5) Flow cytometry 분석

먼저 1×10^6 세포를 2 %의 FBS를 함유한 PBS용액으로 세 번 수세한 후 70 % ethanol에 현탁하고 4 $^{\circ}$ C에서 1시간 고정한다. 고정된 세포를 다시 같은 용액으로 2번 세척한 후 50 μ g/mL 농도의 RNase A 용액 250 μ L에 현탁하여 37 $^{\circ}$ C에서 30 분 동안 처리하여 세포내 RNA를 제거하고 50 μ g/mL의 propidium iodide/1.12 % sodium citrate buffer (pH 8.45) 용액 250 μ L를 가해 실온에서 20 분 동안 세포내 DNA를 염색한다. 이를 flow cytometer (FACSCalibur)로 분석하여 각 세포내 염색된 DNA의 함량을 기준으로 세포주기의 분포를 조사하였다.

6) DAPI 염색 방법

약제 처리로 유도되는 apoptosis를 확인하기 위하여 apoptosis 결과 생기는 nuclear fragmentation를 DAPI 염색법으로 조사하였다. 세포 (5×10^6)을 1,000 rpm에서 5 분간 원심 분리하여 모은 다음 4 °C PBS로 두 번 수세 한 후 2 %의 FBS를 함유하는 PBS로 1회 세척하고 70 % ethanol로 1 시간 동안 고정하였다. 고정된 세포는 다시 같은 용액의 buffer로 2회 세척하고 50 µg/mL 농도로 RNase처리하여 RNA를 제거한 후, PBS로 3회 수세하여 DAPI dye/PBS로 10 분간 염색하였다. 이를 형광 현미경 (Microphot-FX, Nikon, Tokyo, Japan)으로 관찰하였다.

7) Cell lysate 조제

세포 용해물은 다음과 같은 방법으로 조제하였다. 먼저 5×10^6 세포를 PBS로 4 °C에서 3회 세척한 후 lysis buffer (137 mM NaCl, 15 mM EGTA, 1 mM sodium orthovanadate, 15 mM MgCl₂, 0.1 % Triton X-100, 25 mM MOPS, 2.5 µg/mL proteinase inhibitor E-64, and pH 7.2)의 lysis buffer 용액에 현탁한 다음 sonication 하고 ice 상에서 30 분간 lysis를 유도시킨 다음 14,000 rpm에서 20분 동안 원심분리 하여 상등액을 세포용해물로서 얻었다. 확보된 세포용해물의 단백질 농도는 PIERCE 사 (Rockford, IL, USA)의 Micro BCA TM Protein Assay Reagent kit으로 정량한 후 실험에 사용하였다.

8) Western blot analysis

약제처리에 따른 세포자살 및 세포주기 단백질의 변화 양상을 알아보기 위해, 여러 가지 조건으로 세포에 처리한 후 PBS 용액으로 3회 세척하고 lysis buffer로 얻은 세포 추출물을 SDS polyacrylamide gel상에 전기영동하고 Western blot analysis를 수행하였다. 전기영동 조건은 detection하고자 하는 단백질의 분자량에 따라 4~12 %의 SDS gradient polyacrylamide gel (MOPS buffer) 또는 4~12 %의 SDS gradient polyacrylamide gel (MES buffer)을 사용하였고, 전기영동시 각 lane당 하는 단백질의 양은 10~20 µg으로 하였다. 전기영동 후 gel속에 함유된 단백질들을 Immobilon-P membrane (Millipore)에 30 volt에서 50 분 동안 electrotransfer하고, 3 % Non-fat

milk를 함유한 TBS로 blocking한 후, 각각의 primary antibody와 horse radish peroxidase (HRP)가 결합된 secondary antibody를 각각 반응시켰다. 이때 단백질 band의 확인에는 ECL plus Western blotting detection system (Amersham Life Science)을 이용하였다.

9) 마이토콘드리아 cytochrome c의 세포질로의 방출 조사

약제처리에 따른 Jurkat T cells에서의 마이토콘드리아 cytochrome c 방출의 조사하기 위해 먼저 세포질 단백질 추출물을 확보하였다[194]. 간략히 서술하면, 약제 처리된 5×10^6 정도의 세포들을 PBS로 3회 세척하고 200 μ L의 lysis buffer (250 mM sucrose, 10 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 2.5 μ g/mL E-64, 20 mM HEPES, and pH 7.2)에 현탁하였다. 이어서 세포들을 4 $^{\circ}$ C에서 30 분 동안 팽윤시킨 다음, Dounce homogenizer를 이용하여 20 strokes로 세포를 파쇄하였다. 세포 파쇄액을 3,500 rpm으로 10 분간 원심분리하여 상등액을 취하고 이 상등액을 13,700 rpm으로 15 분간 다시 원심분리하여 확보되는 상등액을 미토콘드리아가 제거된 세포질 추출물로 간주하였다. 이를 Western blot analysis로 분석하여 cytochrome c 방출을 조사하였다.

다. 실험결과

1) 산초 (*Z. schinifolium*) 잎에 함유된 세포자살 유도물질로서의 auraptene의 확인

동결 건조한 산초잎을 80 % methanol로 상온에서 추출한 다음 이를 감압농축하여 물에 녹이고 이어서 methylene chloride 및 *n*-butanol로 연속 추출하였을 때, 대부분의 세포독성성분이 methylenen chloride 분획에 함유되어 있었으며, 다른 분획들은 세포독성을 별로 나타내지 않았다. 이때 확보된 methylene chloride 분획의 Jurkat T 세포에 대한 IC_{50} 은 75 μ g/mL 정도였다 (Fig. 46A). 또한 methylene chloride 분획은 50 μ g/mL, 150 μ g/mL 농도 범위에서 apoptotic DNA fragmentation을 유도할 수 있었으며 (Fig. 46B), 그리고 세포자살을 진행 중인 subG₁ cells의 발생도 유도하는 것으로 flow cytometry 분석의 결과 확인되었다 (Fig. 46C).

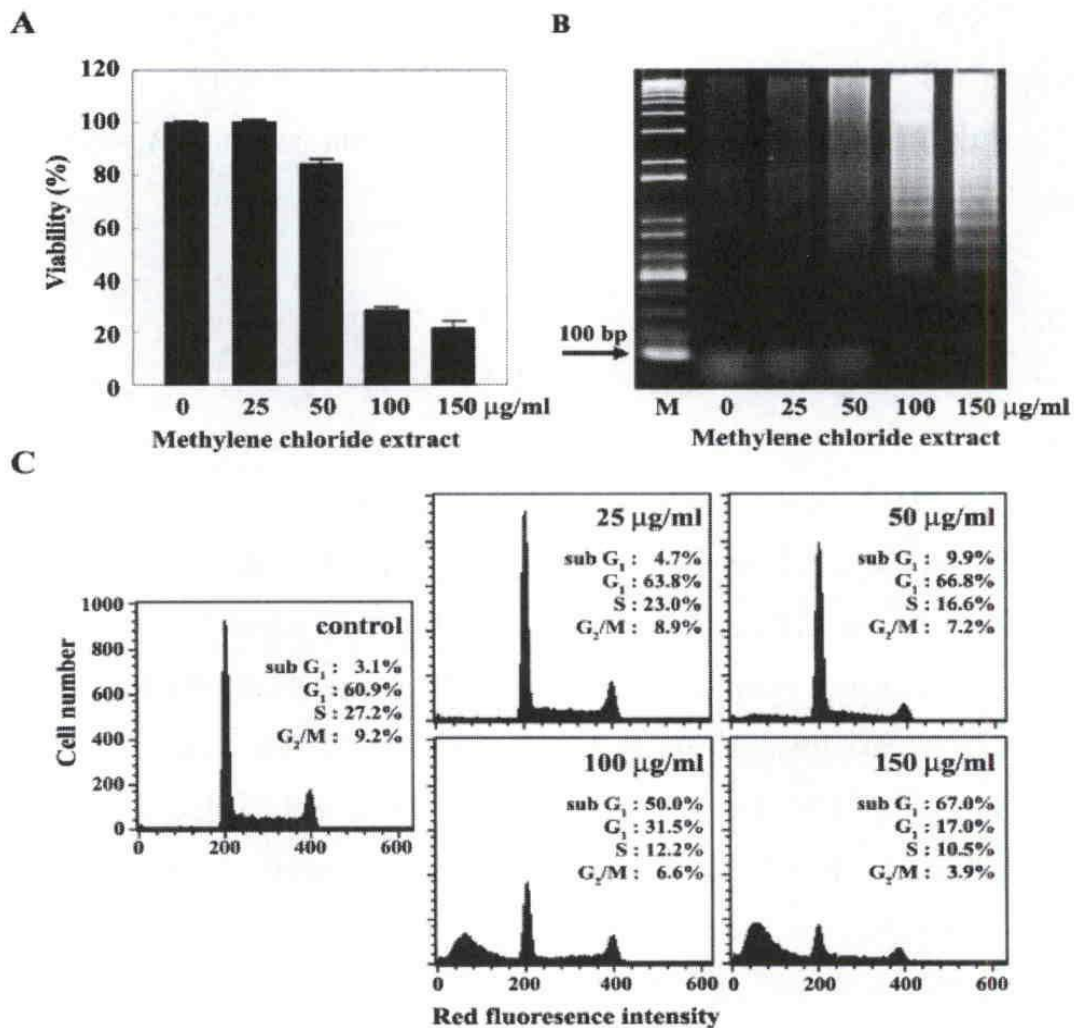


Fig. 46. Effect of the methylene chloride fraction of leaves of *Z. schinifolium* on cell viability (A), apoptotic DNA fragmentation (B), and cell cycle distribution (C) in Jurkat T cell clone E6.1. Continuously growing Jurkat T cells (5×10^4) were incubated with indicated concentrations of auraptene in a 96-well plate for 20 hr and the final 4 hr were incubated with MTT. The cells were sequentially processed to assess the colored formazan crystal produced from MTT as an index of cell viability. Equivalent cultures were prepared and the cells were collected to analysis apoptotic DNA fragmentation by Triton X-100 lysis methods using 1.2 % agarose gel electrophoresis. To assess cell cycle distribution of Jurkat T cells exposed to the methylene chloride extract for 24 hr, the cells were fixed with cold ethanol and then stained with PI for flow cytometric analysis.

이어서 methylene chloride 분획 속에 함유된 세포자살 유도 세포독성성분을 정제하기 위하여 silica gel column을 이용하여 100 % hexane → 100 % ethyl acetate의 조건으로 gradient elution시켜 23 분획 (SL-MC-A~W)을 확보하였다. 이때 얻어진 SL-MC-I 분획의 재결정화를 유도하여 세포자살유도활성을 지닌 auraptene을 최종 확보하였다 (Fig. 47).

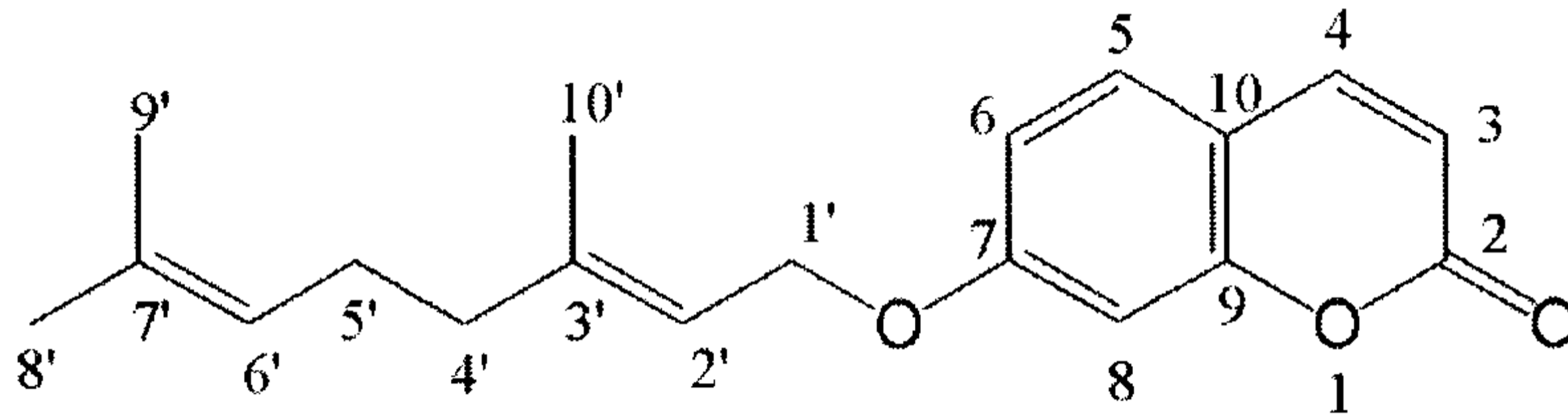


Fig. 47. The structure of auraptene isolated from leaves of *Z. schinifolium*.

4.4 kg의 산초 (*Z. schinifolium*) 잎으로부터 약 100 mg의 auraptene을 회수하였다. 회수된 auraptene의 세포독성을 MTT assay로 조사한 결과, Jurkat T 세포에 대한 IC₅₀ 값은 16.5 µg/mL로 나타났다 (Fig. 48A). 또한 apoptotic DNA fragmentation (Fig. 48B) 및 subG₁ peak의 유도도 처리된 auraptene의 농도에 비례하여 증가되는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 48C).

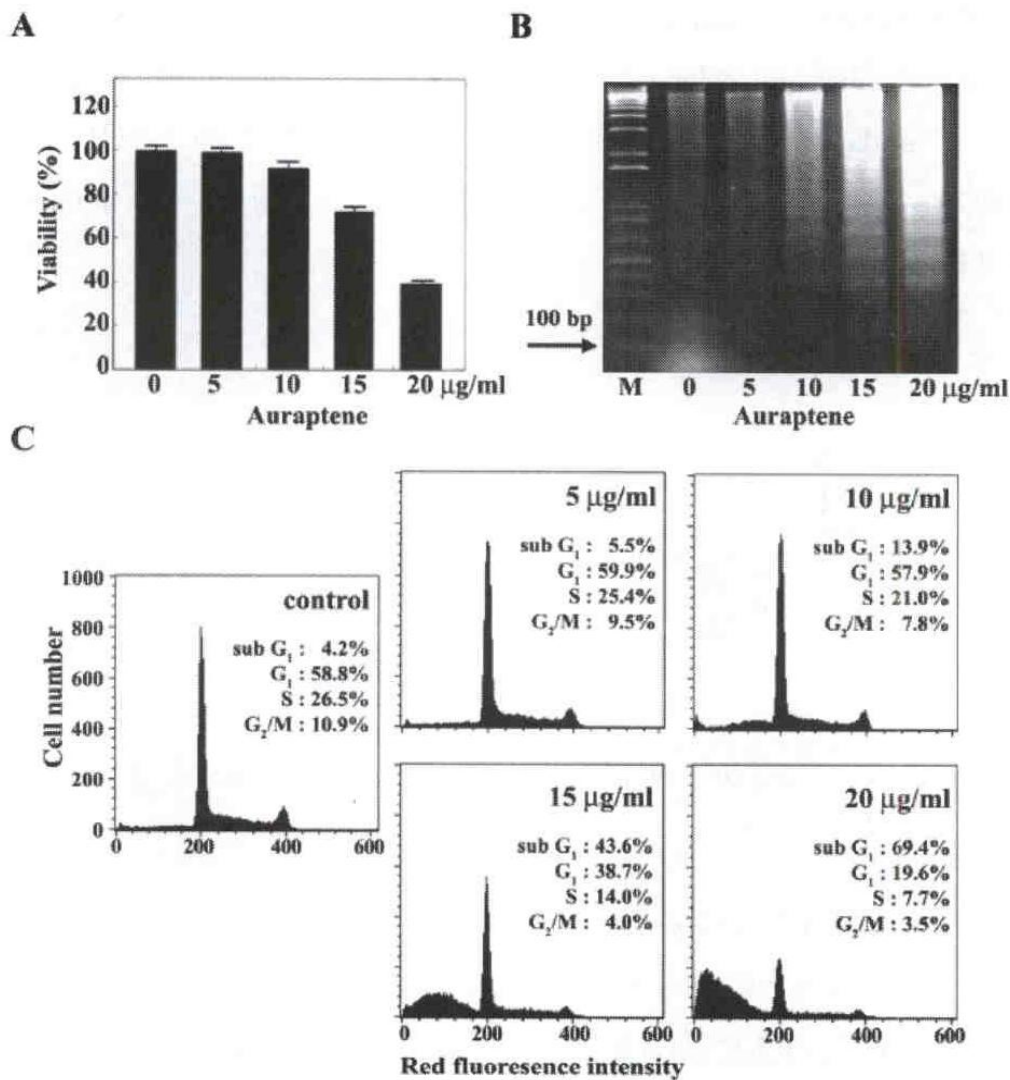


Fig. 48. Effect of auraptene on cell viability (A), apoptotic DNA fragmentation (B), and cell cycle distribution (C) in Jurkat T cell clone E6.1. Continuously growing Jurkat T cells (5×10^4) were incubated with indicated concentrations of auraptene in a 96-well plate for 20 hr and the final 4 hr were incubated with MTT. The cells were sequentially processed to assess the colored formazan crystal produced from MTT as an index of cell viability. Equivalent cultures were prepared and the cells were collected to analysis apoptotic DNA fragmentation by Triton X-100 lysis methods using 1.2 % agarose gel electrophoresis. To assess cell cycle distribution of Jurkat T cells exposed to auraptene for 24 hr, the cells were fixed with cold ethanol and then stained with PI for flow cytometric analysis.

2) Auraptene에 의해 유도되는 세포자살에 있어서 미토콘드리아 cytochrome c 방출 및 이에 의한 caspase 연쇄반응의 활성화

Auraptene에 의한 세포자살 유도기전을 규명하기 위해, auraptene의 세포자살 유도 활성이 세포자살 저해단백질인 Bcl-xL[195]에 의해 차단되는지를 조사하였다. 먼저 auraptene의 세포독성을 Jurkat T 세포에 empty vector를 transfection 시킨 J/Neo 세포주와 Bcl-xL 유전자를 transfection시킨 J/Bcl-xL 세포주 사이에서 비교하기 위하여 이들 세포주를 10, 15 혹은 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도의 auraptene으로 20 시간 동안 처리한 후 cell viability를 MTT assay로 조사하였다. 그 결과, J/Neo 세포주는 auraptene의 처리 농도에 비례하여 viability가 감소하는 것으로 나타났으며 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서는 33 % 정도의 viability를 나타내었다 (Fig. 49A). 그러나 J/Bcl-xL 세포의 경우는 10~20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도의 auraptene 처리 후에도 viability의 감소가 전혀 나타나지 않았다. 동일한 auraptene의 처리 조건에서 DNA fragmentation assay 또한 10~20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도의 auraptene의 처리에 의해 J/Neo 세포에서는 apoptotic DNA fragmentation이 농도에 비례하여 유도되었으나 J/Bcl-xL세포에서는 유도되지 않았다 (Fig. 49B). Flow cytometry 분석의 결과, J/Neo 세포에서는 auraptene의 처리에 의해 세포자살을 진행하고 있는 세포를 나타내는 subG₁ peak가 확인되었으나, J/Bcl-xL 세포에서는 subG₁ peak가 전혀 확인되지 않았다 (Fig. 49C). 이런 결과들은 auraptene에 의해 유도되는 Jurkat T 세포의 세포자살이 Bcl-xL에 의해 억제조절됨을 나타낼 뿐만 아니라 cytotoxicity of auraptene toward Jurkat T 세포에 대한 auraptene의 세포독성이 세포자살의 유도 때문임을 시사한다.

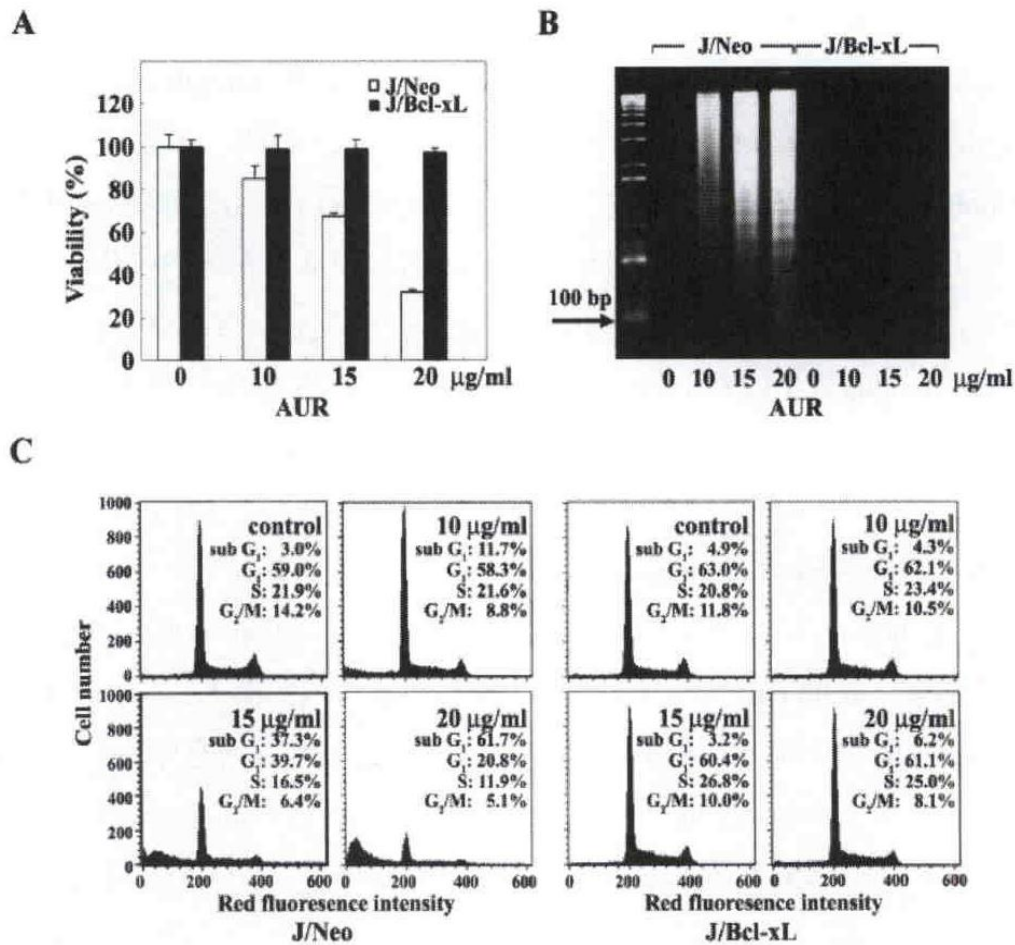


Fig. 49. Effect of auraptene on cell viability (A), apoptotic fragmentation (B), and cell cycle distribution (C) in Jurkat T cells transfected with Bcl-xL gene (J/Bcl-xL) or vector (J/Neo). J/Bcl-xL cells or control (J/Neo) cells were incubated at a density of 5×10^4 /well with various concentrations of auraptene in 96-well plates for 24 hr and the final 4 hr were incubated with MTT to assess the colored formazan crystals produced from MTT as an index of cell viability. Equivalent cultures were processed to analyze apoptotic DNA fragmentation (B). To investigate apoptotic change in cell cycle distribution of J/Bcl-xL or J/Neo cells after exposure to auraptene, the cells were fixed with cold ethanol, stained with propidium iodide, and an equal number of cells (2×10^4) were analyzed by flow cytometry.

한편, 약제에 의한 암세포자살의 유도에 있어서 세포질로의 미토콘드리아 cytochrome c 방출이 중요한 역할을 수행함이 보고된 바 있다[196, 197]. 또한 항세포자살단백질인 Bcl-2 및 Bcl-xL 등이 미토콘드리아 cytochrome c 방출을 억제하며 이 기전을 통해서 미토콘드리아 cytochrome c에 의존적인 caspase cascade의 활성화화를 차단할 수 있음이 보고된 바 있다[198, 199]. 이러한 선행 연구결과들 및 현재의 결과들은 Bcl-xL 단백질에 의해 차단되는 미토콘드리아 cytochrome c 방출이 auraptene에 의한 Jurkat T 세포의 세포자살에 중요하게 관여할 가능성을 시사하고 있다. 따라서 이러한 가능성을 타진하기 위해서, J/Neo 및 J/Bcl-xL 세포를 대상으로 auraptene에 의해 유도되는 세포자살에 있어서 미토콘드리아 cytochrome c 방출 및 이에 따른 caspase-9와 caspase-3 같은 caspase cascade의 활성화가 수반되는지 뿐만 아니라 Fas 및 FasL upregulation이 수반되고 그 결과 Fas-사망신호에 의한 caspase-8의 활성화가 미토콘드리아-의존적으로 혹은 미토콘드리아-비의존적으로 caspase-3을 포함한 caspase cascade 활성화를 유도할 수 있는지를 조사하였다. Fig. 50A에서 보는 바와 같이, J/Neo 세포에서는 미토콘드리아에서 세포질로 방출된 cytochrome c의 수준이 Western blotting으로 확인하기 어려운 낮은 농도였으나 auraptene의 처리 후에 농도에 비례하여 그 수준이 현저하게 증가하였다. 이에 반하여, J/Bcl-xL 세포에서는 auraptene의 처리에 의해서도 cytochrome c의 방출이 전혀 확인되지 않았다. J/Neo 세포에 있어서는 auraptene (10~20 ug/mL)에 의한 미토콘드리아 cytochrome c 방출과 함께 caspase-9 및 caspase-3 활성화가 유도되었다 (Fig. 50B). 활성화된 caspase-3의 기질로서 알려져 있는 poly (ADP-ribose) polymerase (PARP)의 두 개의 절편으로의 분해도 나타났다. 아울러, FLIP 단백질 수준의 down-regulation도 J/Neo 세포에서만 확인되었다. 그러나 Fas 및 Fas ligand (FasL)의 발현 수준에는 변화가 전혀 일어나지 않았다.

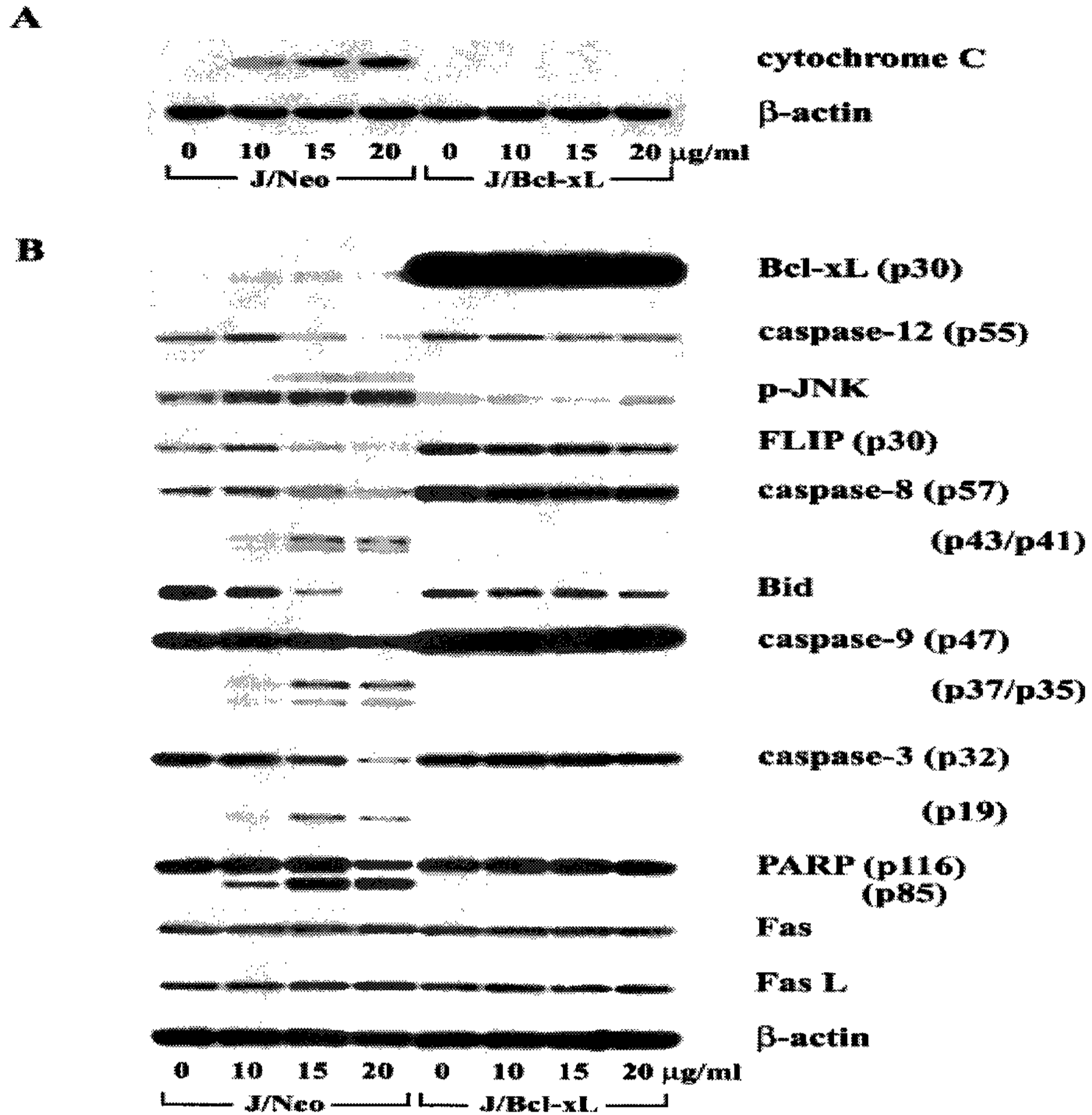


Fig. 50. Western blot analysis of mitochondrial cytochrome c release and β -actin (A), and Bcl-xL, caspase-12, p-JNK, FLIP, caspase-8 activation, Bid, caspase-9 activation, caspase-3 activation, cleavage of PARP, and expression level of Fas and FasL, and β -actin (B) in Jurkat T cells after treatment with various concentrations of auraptene. The cells (5×10^6) were incubated at a concentration of 4×10^5 /ml with indicated concentrations of auraptene for 24 hr and prepared for cell lysates. Equivalent amounts of cell lysates were electrophoresed on 4-12 % SDS gradient polyacrylamide gels and electrotransferred to Immobilon-P membrane. Western analysis was performed as described in Materials and Methods using ECL plus Western blotting detection system.

Auraptene에 의한 세포자살에 있어서, ER stress에 의한 세포자살 유도신호가 미토콘드리아 cytochrome c 방출 및 그에 따른 카스파제 연쇄반응(caspase cascade)의 활성화보다 먼저 유도되는 초기 신호인지를 조사하기 위해, caspase-12 및 caspase-8의 활성화 그리고 c-Jun N-terminal kinase (JNK)의 활성화 유무를 Western blotting으로 분석하였다. Auraptene (10~20 ug/mL)가 존재할 경우, caspase-12의 활성화를 나타내는 procaspase 12 (55 kDa)의 수준 감소가 확인되었고 또한 JNK의 활성화도 유도되었다. 특히 caspase-8의 활성화에 비례하여 Bid 단백질 (25 kDa)의 감소도 확인되었다. 활성화된 caspase-8에 의한 Bid 단백질의 분해결과, truncated Bid (tBid)가 생성되며 생성된 tBid는 mitochondria 막에 작용하여 cytochrome c 를 방출하는 것으로 알려져 있다. Auraptene 처리에 의해 J/Neo 세포에서 나타나는 이러한 세포자살관련 생화학적 현상들은 J/Bcl-xL 세포에서 전혀 나타나지 않았다. 결과적으로, 이러한 연구 결과들은 auraptene에 의한 세포자살이 ER stress에 의해 개시되는 사망신호에 의해 유도됨을 시사하며 또한 Bcl-xL 단백질에 의해 억제조절 됨을 나타낸다.

3) Auraptene에 의한 세포자살에 있어서 Fas-사망신호를 차단하는 anti-Fas 항체의 영향

Jurkat T 세포를 auraptene으로 처리하여 세포자살을 유도하더라도 세포 내 Fas 및 FasL의 발현 수준은 증가되지 않았다. Auraptene에 의해 유도되는 세포자살에 있어서 Fas/FasL계가 관계하지 않음을 최종 확인하기 위하여, Fas-사망신호를 차단하는 anti-Fas 항체로 알려져 있는 ZB-4를 이용하여 auraptene에 의한 Jurkat T 세포의 세포자살이 ZB-4에 의해 차단되는지를 조사하였다. ZB-4는 Fas-사망신호 유도 항체의 세포자살유도활성을 차단하는 항체로서 이미 보고된 바 있다[200, 201]. Fig. 51A에서 보는 바와 같이, ZB-4 (500 ng/mL)의 전처리에 의해 Fas-사망신호를 유도하는 항체로 알려진 CH-11 (50 ng/mL)의 사망유도활성이 현저하게 저해되었다. 이러한 조건에서 auraptene (20 ug/mL)의 세포독성은 ZB-4의 전처리에 의해 완화되지 않았다(Fig. 51B). 따라서, 이상의 결과는 auraptene에 의한 Jurkat T 세포의 세포자살 유도가 Fas/FasL 계의 활성화 때문이 아님을 나타낸다.

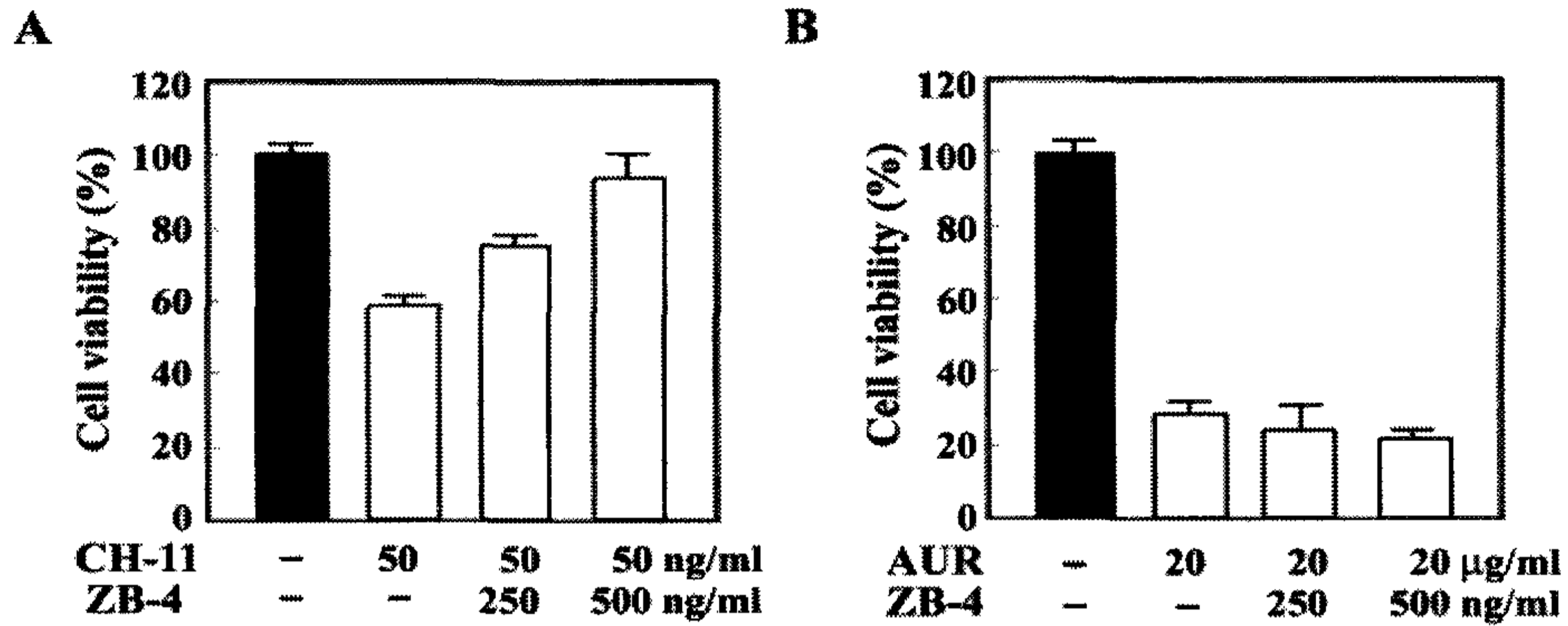


Fig. 51. Effect of anti-Fas neutralizing antibody ZB-4 on anti-Fas agonistic antibody CH-11 (A) or auraptene-mediated cytotoxicity (B) in Jurkat T cell clone E6.1. In 96-well plates Jurkat T cells were pretreated for 1 hr using 250 and 500 ng/ml of ZB-4, then challenged with either the anti-Fas agonistic antibody CH-11 (50 ng/mL) or auraptene (20 µg/mL). After 20 hr, an MTT assay was performed to determine the cell viability.

4) Auraptene에 의한 세포자살에 미치는 pan-caspase inhibitor, z-VAD-fmk 또는 caspase-8 inhibitor, z-IETD-fmk의 영향

Auraptene의 처리에 의해 유도되는 caspase cascade와 cytochrome c 방출의 연관성을 규명하기 위해, Jurkat T 세포에서 auraptene 처리에 의해 유도되는 세포자살 관련 생화학적 현상들에 미치는 broad-range caspase inhibitor인 z-VAD-fmk[202]의 영향을 조사하였다. 50 µM 또는 75 µM 농도의 z-VAD-fmk로 2 시간 동안 전처리한 다음, 이어서 20 µg/mL 농도의 auraptene으로 20 시간 처리하였을 때, Jurkat T 세포에 대한 auraptene의 세포독성은 현저하게 저해되었다 (Fig. 52A). 동일한 조건에서, auraptene 처리에 의한 apoptotic DNA fragmentation도 완전하게 저해되었다 (Fig. 52B). 또한 auraptene에 의한 cytochrome c 방출을 포함하여 auraptene 처리에 의해 유도되는 모든 세포자살관련 현상들은 z-VAD-fmk의 전처리에 의해 완전히 차단되었다 (Fig. 52C and 52D). 이러한 결과는 auraptene의 처리에 의해 유도되며 또한 z-VAD-fmk에 의해 저해를 받을 수 있는 caspase의 활성화가 auraptene에 의한 세포자살의 유도에 있어서 JNK의 활성화 및 미토콘드리아 cytochrome c 방출보다 먼저 일어나는 현상임을 나타낸다.

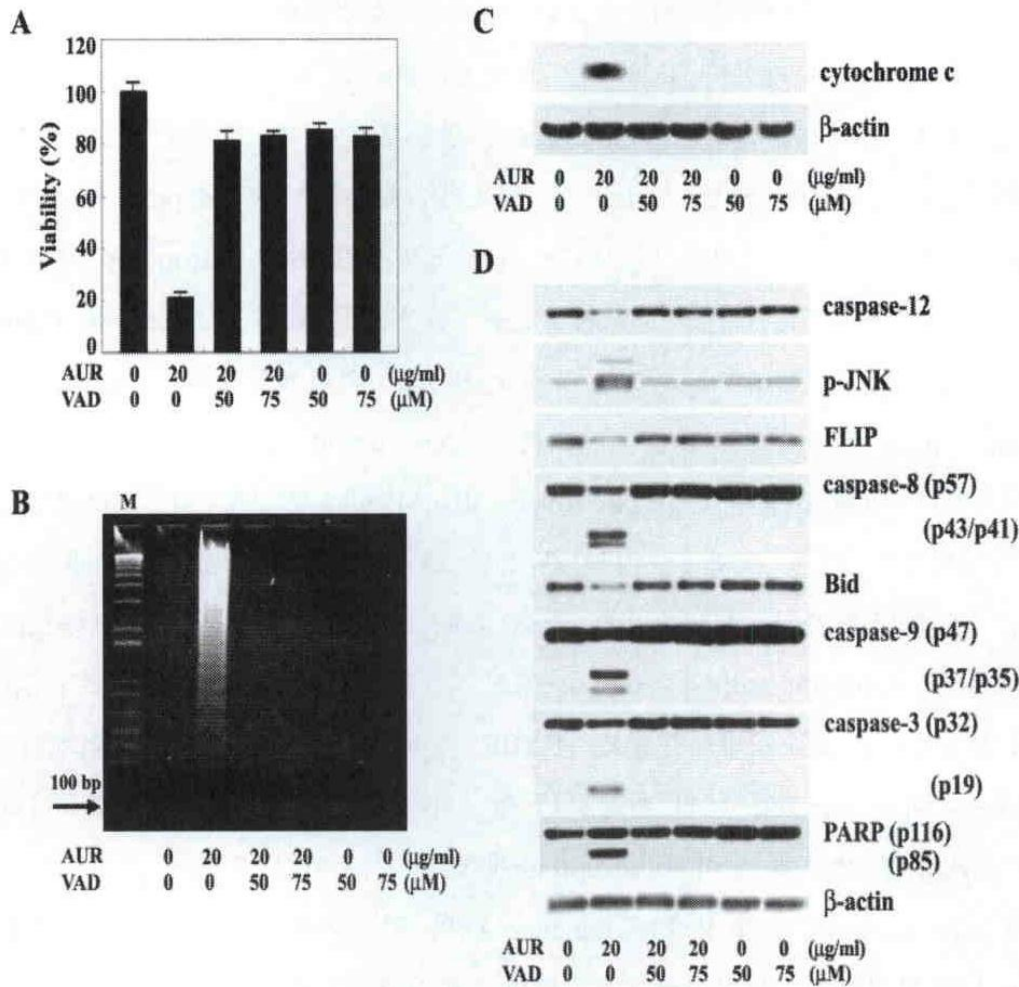
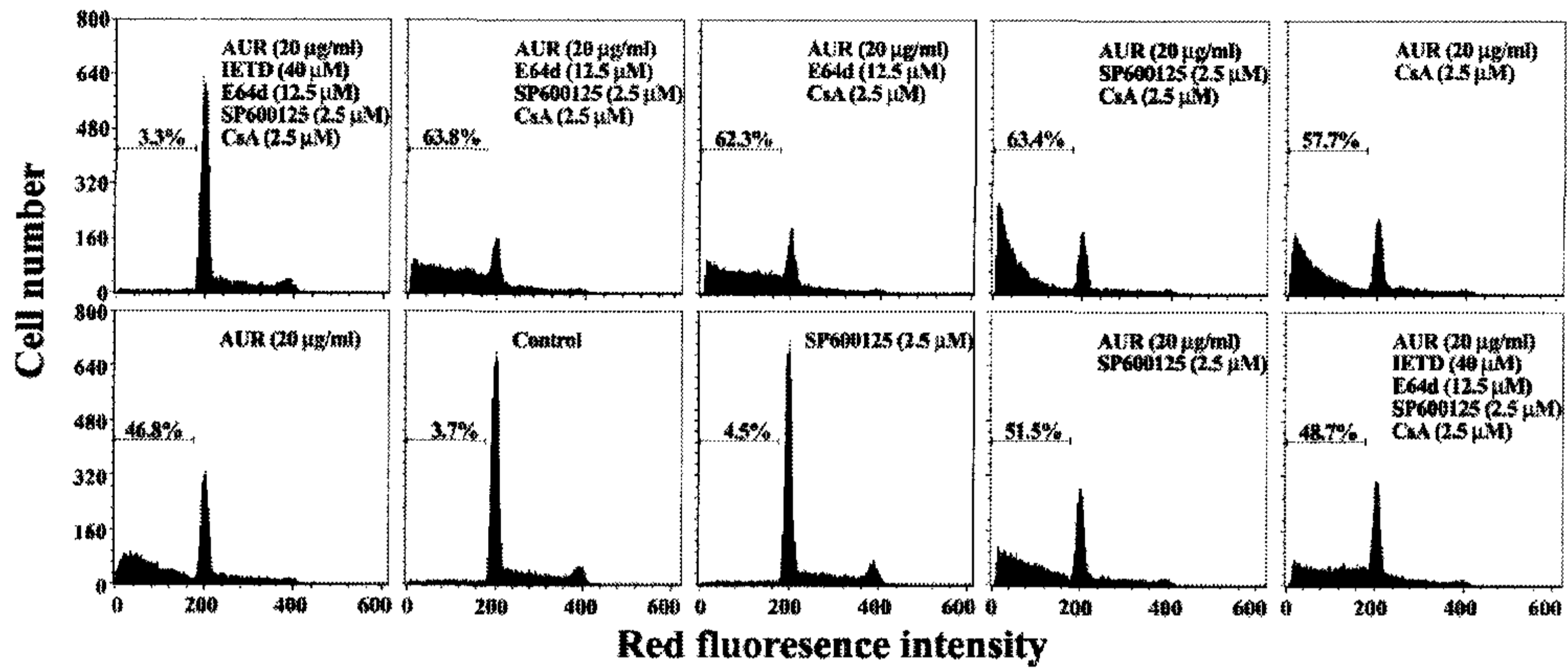


Fig 52. Suppressive effect of a broad-spectrum caspase inhibitor z-VAD-fmk on the cytotoxicity (A), apoptotic DNA fragmentation (B), mitochondrial cytochrome c release (C), and various apoptotic events including caspase cascade (D) induced by auraptene in Jurkat T cell clone E6.1. Jurkat T cells were pretreated with a caspase inhibitor Z-VAD-FMK at concentrations of 50 or 75 μM for 2 hr, and were then incubated at a density of $5 \times 10^4/\text{well}$ with 20 $\mu\text{g/ml}$ auraptene in 96-well plates. After incubation for 20 hr, MTT was added for additional 4 hr. The cells were processed to assess the colored formazan crystal produced from MTT as an index of cell viability. Equivalent cultures were prepared and the cells were processed to analyze apoptotic DNA fragmentation, and caspase activation induced by aurapteneas described in Materials and Methods.

한편, ER stress에 의한 caspase-8 및 JNK의 활성화가 미토콘드리아의 cytochrome c의 방출에 있어서 중요한 역할을 수행한다는 보고 등이 있으므로, auraptene에 의해 세포자살이 유도되는 동안 caspase-8 활성화 및 caspase-8에 의한 tBid의 생성이 미토콘드리아 cytochrome c 방출보다 먼저 일어날 것으로 추측되었다. 따라서 auraptene에 의한 Jurkat T 세포의 세포자살 중 caspase-8의 활성화가 cytochrome c 방출에 선행하여 일어나는 지를 규명하기 위해, auraptene 처리에 의해 Jurkat T 세포에서 일어나는 세포자살관련 현상들에 대한 caspase-8 inhibitor인 z-IETD-fmk, 미토콘드리아 cytochrome c 방출의 억제제인 cyclosporine A (CsA) [203], calpain inhibitor인 E64d [204], 그리고 JNK inhibitor인 SP600125 [205]의 영향을 조사하였다. 이때 사용한 z-IETD-fmk는 40 μ M, CsA는 2.5 μ M, SP600125는 2.5 μ M의 농도였으며, 이들 저해제를 2 시간 동안 전처리 한 다음 auraptene을 처리하였다. Fig. 53A와 53B에서 나타난 바와 같이, caspase-8 inhibitor (z-IETD-fmk)가 존재할 때에는 apoptotic subG₁ peak의 생성, 그리고 auraptene에 의한 caspase-8, caspase-9 및 caspase-3의 활성화, PARP 분해, Bid 분해 등이 억제되었으나, auraptene에 의한 caspase-12의 활성화는 억제되지 않는 것으로 나타났다. 이러한 결과들은 Jurkat T 세포에 있어서 auraptene에 의한 세포자살 유도에 있어서 필수적으로 요구되는 caspase-8 활성화는 caspase-12의 활성화와 별개로 유도되거나 또는 caspase-12 활성화에 뒤이어서 유도되며, 미토콘드리아 cytochrome c 방출, caspase-9 활성화, caspase-3의 활성화보다 선행하여 일어나는 현상임을 보여준다. 동일한 조건에서, auraptene에 의한 caspase-12 및 JNK, 그리고 미토콘드리아 cytochrome c 방출, caspase-9 및 caspase-3의 활성화 그리고 PARP 분해 등이 또한 저해되었다.

A



B

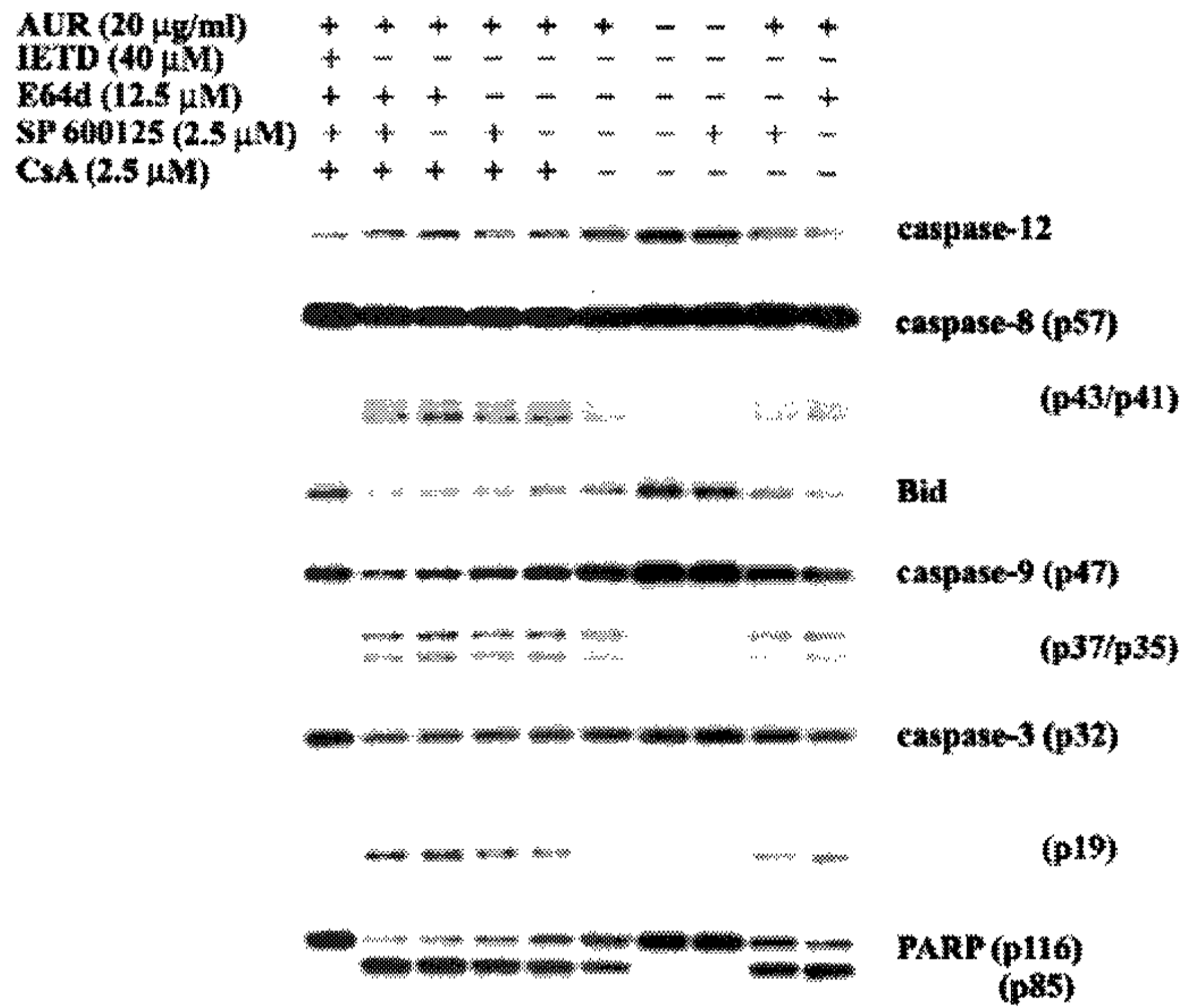


Fig. 53. Apoptotic change in the cell cycle distribution (A), and Western blot analysis of caspase-12, capase-8 activation, Bid, caspase-9 activation, caspase-3 activation, and cleavage of PARP in Jurkat T cell clone E6.1 after treatment with 20 ug/mL of auraptene in the presence of IETD, SP600125, E64d, or CsA (B). Jurkat T cells were preincubated at a density of 4×10^5 /mL in the presence of IETD, SP600125, E64d, or CsA for 2 hr and then treated with 20 ug/mL of auraptene for 20 hr. After the

cells were harvested, the analysis of cell cycle distribution was performed on an equal number of cells (5×10^5) by flow cytometry after staining of DNA by propidium iodide. Western analysis was performed as described in Materials and Methods using ECL Western blotting detection system.

5) Cytotoxic effect of auraptene on human peripheral T cells

현재의 연구 결과는 산초 잎 유래의 auraptene이 인체 급성백혈병 세포주인 Jurkat T 세포에 대해 세포자살을 유도하는 세포독성을 지니고 있으며, IC_{50} 값이 $16.5 \mu\text{g/mL}$ 임을 보여주고 있다. 따라서 백혈병 세포주에 대한 auraptene의 세포독성이 정상세포에 대해서도 동일한 세포독성을 나타내는지를 규명하고자, 정상인의 말초혈액에서 분리할 수 있는 peripheral blood mononuclear cells (PBMC) 및 PBMC를 60 시간 동안 PHA로 활성화 시킬 때 확보할 수 있는 활성화된 T 세포를 이용하여 auraptene의 세포독성을 MTT assay로 측정하였다. Fig. 54에서 보는 바와 같이, PBMC를 RPMI 1640 완전배지를 이용하여 20 시간 동안 여러 가지 농도의 auraptene과 incubation한 다음, MTT를 첨가하고 4 시간 동안 더 incubation하여 cell viability를 측정하였을 때 PBMC의 viability는 $5\sim 30 \mu\text{g/mL}$ 농도의 auraptene이 존재할 경우 별다른 영향을 받지 않았으나, $40 \mu\text{g/mL}$ 의 auraptene의 존재할 경우에는 control에 비해 88 % 정도의 viability를 나타내었다. 이는 인체 PBMC에 대한 auraptene의 IC_{50} 값이 $>40 \mu\text{g/mL}$ 임을 시사한다. 한편, IL-2 의존 T 세포 증식에 미치는 auraptene의 영향을 조사한 결과, $5\sim 10 \mu\text{g/mL}$ 농도의 auraptene이 존재할 경우에는 별다른 세포독성을 나타내지 않았다. 그리고 $20 \mu\text{g/mL}$ 농도의 auraptene이 존재할 경우에는 83 % 정도의 viability를 나타내었고 $30 \mu\text{g/mL}$ 농도의 auraptene이 존재할 경우에는 20 % 정도의 viability를 나타내었다. 이러한 결과는 auraptene의 세포독성이 급성백혈병 세포주인 Jurkat T 세포에 비해 정상세포에 대해서는 다소 약하게 작용함을 나타낸다.

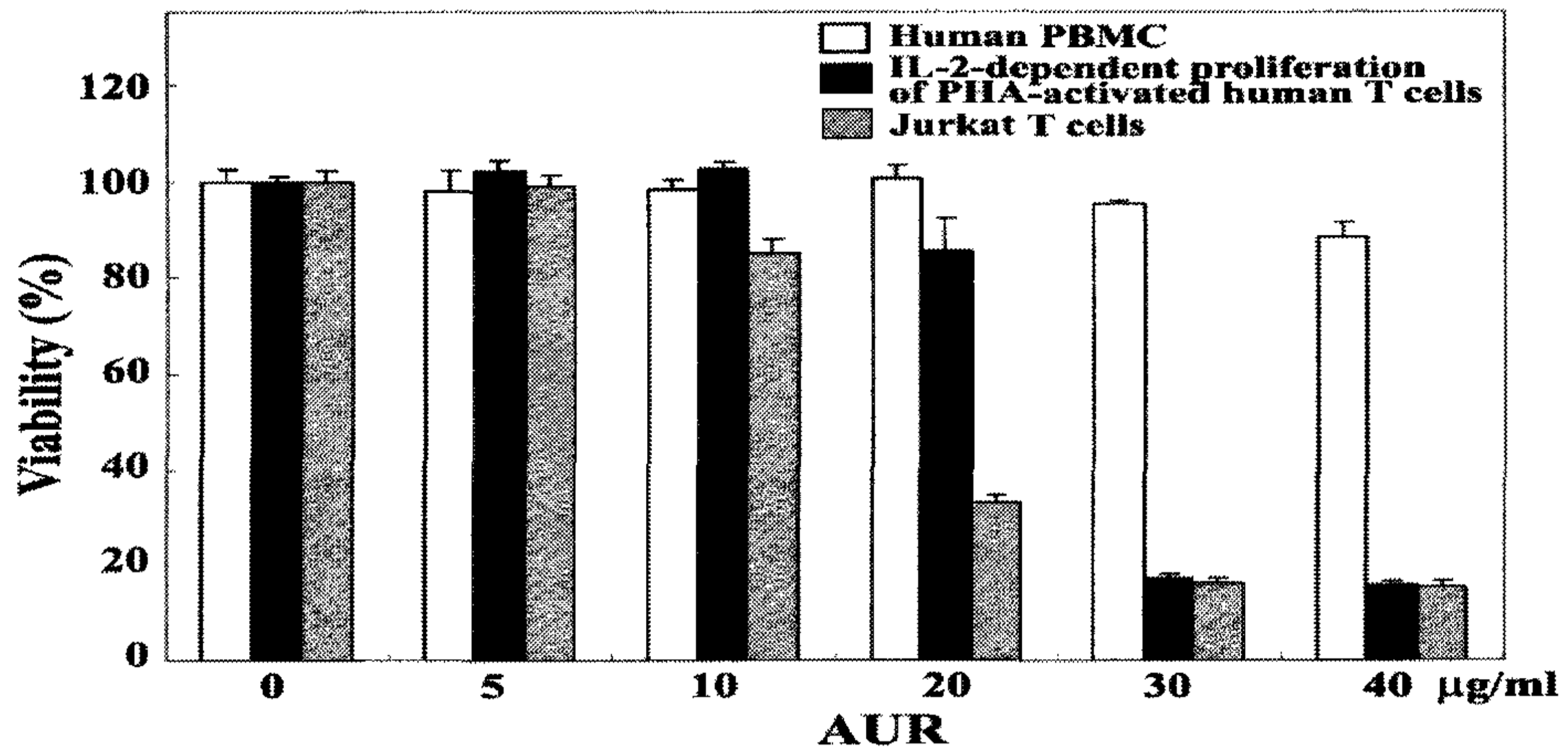


Fig. 54. Cytotoxic effect of auraptene on human peripheral blood mononuclear cells unstimulated, IL-2-dependent proliferation of PHA-activated T cells, and proliferation of Jurkat T cells. Peripheral T cells (2×10^5 cells/well) were incubated with various concentrations of auraptene for 20 hr, and the cells were further incubated with MTT solution for 4 hr, and then processed to assess the colored formazan crystal produced from MTT as an index of cell viability. To induce IL-2-dependent proliferation of activated T cells, human peripheral mononuclear cells were activated with $0.1 \mu\text{g/mL}$ of PHA for 60 hr, and then the activated T cells were harvested and incubated with various concentrations of auraptene at a density of 1×10^5 /well as well as 100 U of recombinant human IL-2 in 96-well plates. For the treatment of Jurkat T cells with auraptene, the cell density was 5×10^4 /well.

결론적으로, 이상의 연구결과들은 산초(*Z. schinifolium*) 잎으로부터 정제된 세포자살유도활성을 지닌 auraptene은 인체 급성백혈병 세포주인 Jurkat T 세포에 대해 apoptotic DNA fragmentation을 유도할 수 있으며, 그 분자적 기전으로는 ER stress에 의해 매개되는 caspase-12 활성화 및 caspase-8의 활성화에 의해 개시되는 mitochondria-dependent 및 mitochondria-independent caspase cascade를 통한 사망 신호의 전달과정이 관련되어 있음을 보여준다. 이러한 연구 결과들은 식용식물인 산초(*Z. schinifolium*) 잎에서 정제된 auraptene의 항암물질로서의 활용 가능성을 평가하는데 대단히 유용하다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1절. 세부과제별 평가착안점에 입각한 목표달성도

구분	연구개발 목표	연구개발 내용	척도 (점수)	달성도 (%)
세부과제 1	○ 동물 실험을 통한 우수 생리활성 물질의 효능 규명 (In vivo)	○ 우수 생리활성물질의 항산화 작용 - Oxidative stress완화 및 free radical scavenging 작용 간조직 Mixed function oxidase system 측정 간조직 Free radicals (Superoxide radical, H ₂ O ₂) 측정 혈장 Paraoxonase, Arylesterase	30	100%
		○ 혈중 지질개선 효과 - Total-lipid, TG, T-cholesterol, HDL-cholesterol LDL-cholesterol, AI	20	100%
		○ 생체 해독 작용 및 무독성 검증: - Glutathione S-transferase - GSH & GSSG, GSH/GSSG - GOT, GPT, T-TBARS, HDL-TBARS	20	100%
		○ 허용량, 사용 기준치 설정: 유효량 및 안전성 판정을 위한 animal-to-human extrapolation	10	100%
		○ 기능성 조미재료로의 활용을 위한 방안 모색 : - 어류 반가공품의 보존제 이용에 따른 보존효과와 관능검사	20	100%
세부과제 2	○ 우수 생리활성 분획으로부터 활성 물질의 분리·정제 및 구조결정	○ 산초나무와 초피나무의 부위별 생리활성 분획의 확인 - 산초나무와 초피나무의 잎, 열매, 줄기 및 뿌리로부터 추출물의 제조 - 산초나무와 초피나무의 잎, 열매, 줄기 및 뿌리로부터 생리활성분획의 확인	30	100%
		○ 우수생리활성분획으로부터활성물질의 분리·정제 및 구조결정 - 우수생리활성분획으로부터 활성물질의 분리 - 생리활성물질의 구조 결정 - 생리활성 물질의 작용기전 연구를 위한 물질제조(액, 가루, 추출물) 공급	40	100%
		○ 분리·동정된 우수 생리활성을 물질의 대량생산 - 생리활성물질의 구조 결정 - 우수 생리활성 물질의 대량 생산 (생리활성 오일, 파우더, 추출물) - 원료 물질의 안정화	30	100%

구분	연구개발 목표	연구개발 내용	척도 (점수)	달성도 (%)
세부과제 3	○ 분리·동정된 생리활성 물질의 신기능 관련 유효성분의 검색과 작용기전 규명	○ 산초 초피로부터 신기능관련 유효성분 탐색 - 항미생물성 유효성분 탐색 : 항세균, 항진균 활성 - 암세포의 증식억제 활성 검정 - 암세포의 자살유도 성분 검정 - 선천성 면역능 증강 성분의 탐색	30	100%
		○ 각 유효 성분의 작용 기전 규명 - 세포주기조절 기구 규명 - 암세포의 자살유도 기전 규명	30	100%
		○ <i>Ex vivo</i> 와 <i>in vivo</i> 실험계를 이용한 효능 물질의 안정성과 독성 검사	20	100%
		○ 신기능성 성분의 실용화를 위한 가능성 검토 - 초피정유성분 함유 치약의 제조 - 생물 농약으로의 활용가능성 타진 - 향균화장품 이용가능성 타진	20	100%

2절. 관련분야에의 기여도

- 가. 향균성이 높은 생리활성 물질을 이용한 기능성 생활용품 제조 산업(천연 향균세제, 천연 향균 주방용 세제, 천연 향균 film-주방용 랩)의 활성화를 유도한다.
- 나. 이상의 유효 성분과 이들 개발기술은 특허 출원과 논문 발표를 통하여 국내 생물자원의 보호 관련 학계 및 산업 분야에 활용할 수 있다.
- 라. 새로운 생의약 및 천연식품 첨가는 산업에로의 선도물질 개발가능성을 제시한다.
- 마. 앞으로 전국에 산재해있는 많은 천연자원으로부터 신소재를 발굴하여 기능성 제품으로 산업화하는데 활용한다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

본 연구과제 수행으로 획득한 산초 및 초피 추출물의 항산화, 항염증, 항혈전 기능, 지질개선효능, 항균, 항암관련 물질을 이용하여 성인용 예방 기능성 건강보조식품, 가공 어육류 품질보존제, 의약 및 항균관련 산업으로 활용 가능성은 다음과 같다.

1절. 활용 계획

1. 보편적 성인 건강증진용 기능성식품 성분으로 활용

산초 잎의 80 % 에탄올 추출물은 제조에 있어서 경제적이면서 항산화, 항염증, 항혈전 효과를 보인 2차 용매 (methylene chloride와 *n*-butanol) 분획 성분을 25~35 % 함유하고 그 자체로 지질개선효과를 가지고 있으며 1일 사람이 1~2 g 섭취하여도 독성이 예상되지 않으므로 다기능 건강식품 원료로 활용이 현실적이다.

2. 개별 만성 질병 예방용 기능성 식품 성분으로 활용

산초 잎의 2차 용매 (methylene chloride와 *n*-butanol) 분획 성분은 제조에 있어 다소 비용이 들어도 에탄올 추출물에 비하여 적은 양 (1일 0.4~0.5 g)으로 효능을 가질 수 있으며 항염증과 항혈전, 항당뇨를 분리하는 질환 특이성 건강보조식품으로 개별적으로 특성화하여 활용할 수 있다.

3. 가공 어육류 품질 보존제 및 조미재료로의 활용

산초 잎 에탄올 추출물은 매우 소량 (*in vivo* 무독성 용량의 1/1000 이하)으로도 과메기 품질 보존 효과를 보였으므로 산초와 초피의 잎 외의 뿌리, 줄기 등 각종 부위별로 나타난 대표적인 활성, 항산화 활성은 가공 어육류 품질보존제 및 각종 조미재료로 안전하게 활용 가능하다.

4. 김치 산업으로의 활용 계획

연구 수행 결과로 확인된 산초 잎 유래의 추출물이 *Leuconostoc mesenteroides*

와 *Lactobacillus plantarum* 생육에 미치는 영향과 관련하여 김치 발효 초기에 새콤한 맛이 나게 하는 *Leuconostoc mesenteroides*의 생육을 증가시키고 시큼한 맛이 나게 하는 산패균 *Lactobacillus plantarum*의 생육을 감소시키는 산초 잎 유래의 생리 활성 물질을 규명하여 현대인들에게 점점 필수가전 중 하나로 인식되고 있는 김치 냉장고와 같이 김치 고유의 맛을 좀 더 오래 보존시키고자 하는 목적으로 활용하고자 함으로써 제품 자체의 질을 한층 더 향상시킬 것으로 기대된다.

5. 치약 산업으로의 활용 계획

기능성 치약을 개발하기 위하여 대전의 한 치약 제조업체에 초피 과피 정유성분을 보내어 치약 시제품 100 개를 먼저 제조하였다. 이 시제품의 실용화를 위하여 경북대학교 자연대 미생물학과와 대구가톨릭대 생활과학대학 식품영양학과 학생과 교수를 대상으로 기호도 조사와 항균 활성 실험을 행하였다. 전체적으로 관능검사 결과를 분석해 본 결과 맛과 부드러움, 그리고 맵지 않은 점에서 다른 일반 치약 제품들 (PR, PR-G, OB)과 비교해 만족도가 높았으며 초피 유래 물질의 항균력은 시중에서 팔고 있는 치약 제품 'LG 생활건강'사의 자일리톨을 함유한 PR, 같은 회사 제품인 녹차 추출물을 함유한 PR-G, 그리고 '태평양'사의 한방생약성분을 함유한 OB 이렇게 3 가지를 대조군로 하여 *Streptococcus mutans*를 대상으로 Agar Disc diffusion 방법으로 항균 활성 비교 실험을 행한 결과 치약 1, 2, 4 % 농도에서는 4 가지 모두 항균 활성이 나타나지 않고, 6 % 농도에서 항균 활성이 약하게 나타나기 시작했으며, 8 % 농도에서는 본 연구팀이 제조한 초피 과피 정유 성분 함유 시제품에서 가장 높은 항균 활성이 나타났고, PR > PR-G > OB 순으로 활성이 나타났다. 이러한 연구 개발 결과를 활용하여 설탕 면역계가 급격히 약화되는 암환자, 장기 이식 환자용의 기능성 치약 개발에 활용하고자 한다.

6. 무독성 생물 농약으로의 활용 계획

화학농약에 대한 각종 병원균의 내성이 출현하고, 화학농약자체의 인체에 대한 유해성이 밝혀지면서 화학농약의 단점을 보완하고 무독한 생물농약 (biopesticides) 개발에 주력하고 있는 실정이다. 이와 관련하여 산초 및 초피 관련 항균물질을 이용한 생물 농약으로 활용할 수 있다. 특히, 딸기, 토마토, 버섯 등과 같은 작물의 경우 세척

이후 타 가열이나 조리과정 없이 이용하는 작물에 있어서의 농약 잔류 문제는 심각함으로, 보다 안정하며 효과가 정확한 농약 개발은 매우 중요한 사항이다. 이와 관련하여 본 과제 수행 중 초피 유래 생물농약을 제조하여 진균에 대한 효과를 조사하였으나 큰 효과는 확인하지 못하였다. 그러나 본 연구 수행 결과, 산초·초피 유래 항균 성분의 약효 활성 spectrum이 Gram-negative와 positive bacteria에 대한 탁월한 항균 작용을 발휘하므로 재배시설물이 표고, 송이 등과 같은 버섯류일 경우 이들 재배시 문제되는 오염균의 방제에는 효과가 클 것으로 기대된다. 따라서 경북 영천시 소재 (주)그린윈드 회사의 버섯 종묘 및 재배 시설 기구 및 재배지 대상으로 그 약효를 확인하고자 한다.

7. 항균성 플라스틱 제품으로의 활용계획

항균제품은 최근 생활환경 및 위생에 대한 관심이 높아짐에 따라 수요가 크게 증가하여 세계시장 규모가 약 34억불(미국 Biocide Information Services)에 이르는 등 년 평균 15 % 이상 급신장하고 있으며, 국내시장 규모도 매년 3,500억원 (2000년) 정도 증가되는 것으로 추산된다. 이에 따른 연구결과의 산업적 활용으로 탐색된 여러 병원성 미생물에 대하여 항균활성이 높게 나타난 초피 과피와 종자의 정유 성분을 첨가하여 그릇, 도마, 청소도구 등 일상생활에 자주 사용하는 생활용품에서부터 에어휠터·바닥장식재·포장용기 등 산업자재까지 광범위하게 사용되고 있는 플라스틱 제품에 항균활성 기능을 부가하여 보다 오래 그리고 보다 안전한 제품 생산에 활용하고자 한다.

8. 기능성 화장품관련 사업으로의 활용계획

(주) 사임당 실험실의 예비 실험 결과를 바탕으로 화장품에 첨가하는 화학항균 물질대체로의 활용과 초피정유 성분의 강한 사상균에 대한 항균력을 이용한 여성 질염 예방 및 치료 관련비누 세제 약제로의 활용계획을 가지고 관련 산업체에 그 가능성을 타진하고자 한다.

2절. 본 연구과제 수행으로 발표된 또는 발표 예정인 논문 및 특허

허건

발표 논문

1. 초피나무 추출물의 항산화, 항염증 및 항혈전 효능에 관한 연구, 한국식품영양과학회지, 35(1), (2006. 01).
2. 산초 뿌리, 줄기 및 잎 추출물의 항산화, DPPH radical 소거 작용 및 항혈전 효과, 한국영양학회지, 38(1), (2006. 02).
3. Chemical composition and anti-tumor apoptogenic activity of methylene chloride extracts from the leaves of *Zanthoxylum schinifolium*. *J. of Life Science*, 16(3). (2006. 06).
4. Effects of antioxidative and antiaging by the extract of Sancho (*Zanthoxylum schinifolium*) in liver of high fat diet fed rat, *Nutritional Science*, (2006년 12월 예정).

학술대회 발표

1. Cytotoxic effect of *Zanthoxylum schinifolium* on human acute leukemia Jurkat T cells. 한국 미생물 생명공학회, 22-23 (2004. 06).
2. GC/Mass spectrometric analysis of methylene chloride extract from leaf of *Zanthoxylum schinifolium*, which possesses apoptotic effect on human acute leukemia Jurkat T cells. 2005 Annual Meeting & International Symposium 한국 미생물 생명공학회 (2005. 06. 30~07. 01).
3. The Antimicrobial Activity of the Essential Oils from the Seeds and Pericarps of *Zanthoxylum piperitum* DC against Cariogenic *Streptococcus Mutans*. 2005 Annual Meeting & International Symposium 한국 미생물 생명공학회 (2005. 06. 30~07. 01).
4. A comparision of the Antimicrobial Activity and Compositions of the Essential

- Oils from the Seeds and pericarps of *Zanthoxylum piperitum* DC. 2005 Annual Meeting & International Symposium 한국 미생물 생명공학회 (2005. 06. 30~07. 01).
5. Apoptotic activity of auraptene, a cytotoxic component of *Zanthoxylum schinifolium*, toward human acute leukemia Jurkat T cells is associated with caspase-8 activation and subsequent induction of mitochondria-dependent death-signaling pathway regulated by Bcl-xL. 제14회 기초의학학술대회 (2006. 04. 27~28).
 6. Bioactive constituents from the leaves of *Zanthoxylum schinifolium*. 대한약학회, 2, 455-456 (2005. 11. 28~29).
 7. Inhibition of Lipid Peroxidation and DPPH Radical Scavenging Activity by the Extract of *Zanthoxylum scinifolium*, 2004 Annal Meeting and international Symposium "The Current prospects of functional and medicinal food", (2004. 11. 17~19).
 8. 산초(*Zanthoxylum scinifolium*) 뿌리, 줄기 및 잎의 항염증 및 항혈전 작용, 한국영양학회, (2004. 05. 14~15).
 9. 초피(*Zanthoxylum piperitum*) 뿌리, 줄기 및 잎의 지질과산화 억제 작용 및 DPPH radical 소거작용, 한국영양학회, (2004. 05. 14~15).
 10. 초피(*Zanthoxylum piperitum*) 뿌리, 줄기 및 잎의 항염증 및 항혈전 작용 관찰, 한국영양학회, (2004. 05. 14~15).
 11. 산초 (*Zanthoxylum Schinifolium*) butanol 추출물의 경구투여가 고지방식이 흰쥐 간조직의 지질과산화 및 항산화 효소 활성화에 미치는 영향, 한국생명과학회, (2005. 04. 8~9).
 12. 고지방식이 흰쥐에서 산초(*Zanthoxylum Schinifolium*) methylene chloride 추출물의 경구투여에 의한 항산화 및 항노화 효과, 한국생명과학회, (2005. 04. 8~9).

발표 예정논문

1. Chemical Composition and Antimicrobial activity of Essential Oils from the seed

and pericarp of *Zanthoxylum piperitum* DC.

2. Chemical, Antibacterial properties of Essential Oils from the seed and pericarp of *Z. piperitum* DC against *S. mutans*.
3. Apoptotic activity of auraptene, a cytotoxic component of *Zanthoxylum schinifolium*, toward human acute leukemia *Jurkat* T cells is associated with ER stress-mediated caspase-12 activation and caspase-8 activation stimulating mitochondrial cytochrome c release regulated by Bcl-xL.

특허권

1. 초피추출물 제조 방법 및 초피 추출물을 함유한 향충치 물질
(10-205-008949/2005. 9. 9)
2. 산초를 이용한 과메기 제조방법 (10-2006-0051280/2006. 6. 8)
3. 초피를 이용한 과메기 제조방법 (10-2006-0051282/2006. 6. 8)
4. 산초 유래 auraptene의 암세포 독성물질 특허출원 준비중

3절. 추가연구의 필요성

1. 기능성식품 원료 승인 규정에 따른 독성 연구

산초와 초피가 그대로 조미재료에 들어 있으나 추출물들은 기능성식품의 원료로 등재되어 있지 않다. 본 연구에서 무독성의 용량이 일차적으로 조사되었으나 식품의약품안전청의 기능성식품 원료로 승인을 받기 위해서는 산초와 초피 추출물의 장, 단기 독성 테스트가 필수적이므로 이를 GLP기관에서 수행하여야 한다.

2. 소량의 유효성분을 사용한 장기 *in vivo* 효능 검사 연구

본 연구에서 도출해 낸 안전 유효함량은 4~6주의 비교적 단기간의 동물실험을 통하여 수행되었으나 현실적으로 기능성식품을 섭취할 경우 장기간의 복용을 염두에 두어야 한다. 이러한 경우 안전유효량의 변화가 예상되어 적은 양의 장기 *in vivo* 효능과 안전성 실험이 필요하다.

3. 가공어육류 식품 보존제 및 조미재료 활용에 관한 연구

본 연구에서 산초 잎 추출물의 콩치 과메기 제조의 한 예에서 보존제로서 효능이 탁월함을 보였다. 따라서 다른 어육류 가공에서 활용에 대하여 연구할 필요가 있다. 경우에 따라 산초나 초피 잎 등의 자연재료를 추출하지 않고 사용하여 효능이 나타난다면 매우 경제적이다. 또 이미 식용되는 부위는 식품의약품안전청에 따로 승인을 받을 필요가 없으므로 현장에서 곧 응용이 가능하므로 이 부분의 연구는 실현성이 높은 것으로 조속히 요구된다.

4. 신기능 유효물질의 이용가능성 확대를 위한 연구

본 과제 수행으로 순수 분리 동정한 17 개의 화합물의 생리적 기능을 항산화, 항혈전, 항염증, 항균, 항암 및 면역과 관련하여 각 물질의 활용가능성을 타진하였다. 분리 동정한 물질 중 화합물 8번과 같은 coumarin 계열은 7-hydroxy coumarin이나 7-methoxy coumarin등이 고혈압환자에 사용되는 혈관 확장제로 의료약품으로 개발 시판되므로 이와 관련된 연구를 수행하여 이분야로의 활용가능성을 조사하는 것이 필요하다고 사료된다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1절. 해외과학기술정보

산초와 초피라는 재료가 아시아권에서 사용하는 식재료이므로 정보는 중국과 일본에 국한되었으며 아래에서 보는 바와 같이 성분분석과 매우 제한된 효능검사만이 이루어졌다.

1. 산초 뿌리의 쿠마린과 항혈전 성분 및 DNA 복제 억제 물질 분리 (Coumarins and antiplatelet constituents from the root bark of *Zanthoxylum schinifolium*)

가. 급원

(1) *Phytochemistry* 39(5): 1091-7, 1995 (Chen 등 중국연구자와 Ishikawa 등 일본연구자)

(2) *Planta med.* 66(7): 618-23, 2000 (Tsai IL 등 중국연구자)

나. 내용

산초뿌리의 클로로포름 추출물로부터 8종의 새로운 쿠마린 성분 분리하였으며 이중 terpenyl-coumarins과 furoquinolines은 항혈전효능을 갖는 활성 물질이며 collinin은 anti-HBC DNA replication 활성을 보유함.

2. 산초종실을 이용한 한약제에 대한 연구 (Morphological and histological studies of Chinese traditional drug "hua jiao" (pericarpium zanthoxyli) and its allied drugs)

가. 급원

Yao Xue Xue Bao 26(12): 938-47, 1991 (Xiong QB, Shi DW, 중국연구자)

나. 내용

산초를 사용하여 조제한 약제 "hua jiao"는 장내 기생충 감염에서 오는 오한, 구토, 설사와 복통 증상을 완화시켜 주고 습진 외용약으로 효과가 있음. 중국에서 산초 종은 18종이 넘으며 그 중 8종이 약리학적 효능이 보임.

3. 산초 및 산초활용 약제의 성분 분석

가. 급원

(1) *Yao Xue Xue Bao* 26(11): 836-40, 1991 (Liu 등 중국연구자)

(2) *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 16(6): 359-60, 1991 (Liu와 Wei 중국연구자)

나. 내용

산초를 활용한 전통약제인 Qinghuajiao로부터 5종의 화합물이 분리, 동정되었으며 이 중 umbelliferone, skimmianine과 schinifoline은 산초로부터 처음 동정되었고 신물질 하나가 분리됨.

4. Auraptene

Citrus fruit (*Citrus natsu daidai* Hayata) 껍질로부터 분리 동정된 auraptene은 항산화력이 뛰어난 phytochemical로 알려진 이 후, chemopreventive agent로 사용되고 있다. 현재까지 알려진 tumor 발생 및 치료과정에 있어서의 작용기전은 간이나 대장에 있어서 해독 과정에 관여하는 quinone reductase와 glutathione-S-transferase의 활성을 크게 증가시킬 뿐만 아니라 세포증식 biomarker가 되는 ornithine decarboxylase 활성과 polyamine 생합성을 크게 억제하는 것으로 알려져 있다 (*Cancer Res.* 1998. 58(12): 2550-2556). 128 마리의 rat에 여러 dosage로 auraptene을 38 주간 동안 투여하고 tumor을 유발하는 azoxymethane(AOM)으로 암을 유발한 결과 auraptene 500 ppm으로 투여한 군이 무처리 군보다 multiple carcinomas, proliferation biomarker 또는 lipid peroxidation production 등이 감소하는 반면 colone과 liver에서 해독에 관여하는 quinone reductase와 glutathione-S-transferase활성은 오히려 증가한다는 보고가 있다 (*Nutrition Res. News letter*, 1998).

5. Geraniol

화학명은 3,7-dimethyl-2,6-octadien-1-ol (C₁₀H₁₈O)이고 rhodinol로 주로 식물의 정유성분에 존재하는 성분으로 pale-yellow oil 물질이며, 향을 이용한 방향제 산업, insect repellents나 deterrants로 사용되고 있다. 그리고 1994년 이후부터는 담배향 보조제로 활용되기도 한다.

(<http://quitsmoking.about.com/les/nicotineinhaler/a/cigingredients.htm>)

* Insect repellents 산업

상표명 ① BugbandTM: 모기, 집파리, 불개미, 이, 바퀴벌레, gnats(각다귀), 진드기 등에 효과 (<http://www.bugband.net/home.htm>)

② NexTag^R

- Autofan Automatic Mosquito Repellent
- Mosquito Repellent kit for horses
- Repelling candle-Insect Repelling candle
- Weleda Shaving Lotion

6. Coumarin

화학명은 1,2-Benzopyrone 2H-1-Benzopyran-2-one ($C_9H_6O_2$)로 많은 식물체에서 발견되는 물질로 anti-coagulants로 많이 사용되고 있다. 자연계에서 umbelliferone (7-hydroxy coumarin), herniarin (7-methoxy coumarin) psoralen과 imperatorin 등의 구조 유사체등이 보고되어 있다. 간이나 신장에 대한 독성이 비교적 약해 $LD_{50}=275$ mg/kg 이며 FDA로부터 Generally Recognized as Safe (GRAS)로 분류되어 음료산업에서 향 관련 첨가제로 이용되고 있으나 장기간 사용하면 신장에 유독한 것으로 알려져 있다. 이외 고혈압환자에 있어 혈관 확장제로 개발 시판되고 있다. 한 예로 FirstData Bank사 제품을 소개한다.

* Coumarin-type drugs 혈관 확장제로써 경구투여용 약

- developed by FirstData Bank, Inc., San Bruno, CA
- 혈관 확장제 및 혈액 응고 방지제로 식용부진, 메스꺼움, 구토 등의 부작용이 언급

7. 기능성 및 화장품관련 분야

(주) 생그린은 상백피, 목단피, 밤 황금, 백련초, 치마버섯, 콩단백질 추출물, 감마 오리자놀 등이 함유되어 UVB 뿐만아니라 UVA까지 차단하는 이중 자외선 차단 기능의 '선베이직' 및 '선블록' 제품을 개발하였다. 또한 인삼과 산초 추출물, 솜다리 추출물 등의 전통 생리학을 이용하여 피부보호 및 피부진정효과가 있는 남성용 화장품인 '창조'를 개발하기도 했다. (출처: 한국기술은행/ '천연화장품 기술')

제 7 장 참고문헌

1. Mun SI, Ryu HS, Lee HJ, Choi JS. Further screening for antioxidant activity of vegetable plants and its active principles from *Zanthoxylum schinifolium*. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, 23, 466-471 (1994).
2. Cha YA, Cho MG, Song JS. Identification of Chemotypes in Traditional Aromatic Plant Resources *Z. schinifolium* Siebold et Zucc and *Z. piperitum* DC. *Korean J. Breed.*, 33, 126-132 (2001).
3. Woo IK, Yun HS, Chi HJ, Woo WS. Occurrence of alkaloids in Korean medicinal plants. *In Report of Natural Product Institute of Seoul National University, Seoul, Korea* 17, 17-19 (1978).
4. Slater TF, Sawyer BC. The stimulatory effects of carbon tetrachloride and other halogenoalkanes on peroxidative reactions in rat liver fractions in vivo. *Biochem. J.*, 123, 805 (1971).
5. Okhawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.*, 95, 351-361 (1979).
6. Tagashira M, Ohtake Y. A new antioxidative 1,3-benzodioxole from *Melissa officinalis*. *Planta Medica*, 64, 555-558 (1998).
7. Fletcher BL, Dillard CJ, Tappel AL. Measurement of fluorescent lipid peroxidation products in biological systems and tissues. *Analytical Biochemistry*, 52, 1-9 (1973).
8. Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn B, Shaltiel S, Stadtman ER. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol*, 464-478 (1986).
9. Thompson AR, Harker LA. In 'Manual of hemostasis and thrombosis', 3rd ed. Philadelphia USA 178-185 (1983).
10. Koshihara Y, Neichi T, Murota S, Lao A, Fujimoto Y, Tatsuno T. Caffeic acid is a selective inhibitor for Leukotriene biosynthesis. *Biochem. Biophys. Acta.*

- 792, 92-97 (1984)
11. Hye-Young Kim. In vitro Inhibitory on Rat Intestinal Mucosa α -Glucosidase by Rice Hull Extract. *Korean J. Food SCI Technol.*, 29, 601-608 (1997).
 12. Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the antioxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.*, 47, 469-474 (1974).
 13. Richard A Lawrence, Raymond F Burk. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem. and Biophysical Research Communications*, 71, 952-958 (1976).
 14. Aebi H, Wyss SR, Scherz B, Skvaril F. Heterogeneity of erythrocyte catalase II. Isolation and characterization of normal and variant erythrocyte catalase and their subunits. *Eur. J. Biochem.*, 48, 137-145 (1974).
 15. Mackness MI, Harty D, Bhatnagar D, Winocour pH, Arrol S, Ishola M, durrington PN. Serum paraoxonase activity in familial hypercholesterolemia and insulin-dependent diabetes mellitus. *Atherosclerosis*, 86, 193-199 (1991).
 16. La Du BN, Exkerson HW. The polymorphic paraoxonase/arylesterase isozymes of human serum. *Fed. Proc.*, 43, 2338-2341 (1992).
 17. Oliver H Lowry, Nira J Rosebrough, A Lewis Farr, Rose J Randall. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275 (1951).
 18. Omura T, Sato R. The carbon monoxide binding pigment of liver microsomes. *J. Biol. Chem.*, 239, 2379-2385 (1964).
 19. Azzi A, Montecucco C, Richter C. The use of acetylated ferricytochrome c for the detection of superoxide radicals produced in biological membrane. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 65, 597-603 (1975).
 20. Gay C, Gebicki JM. A critical evaluation of the effect of sorbitol on the ferric-xylene orange hydroperoxide assay. *Anal. Biochem.*, 284, 217-20 (2000).
 21. Folch JM, Lees M, Stanley GHS. A simple method for the isolation and purification of total lipid from animal tissue. *J. Biol. Chem.*, 26, 497-509 (1957).

22. Sale FD, Marchesini S, Fishman PH, Berra B.A sensitive enzymatic assay for determination of cholesterol in lipid extracts. Academic Press Inc, New York, 347-350 (1984).
23. Habig, WH, Pabst, MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferase: the first enzymatic steps in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.*, 249, 7130-7139 (1974).
24. Bernt E, Beugmeyer HU. Methods of enzymatic analysis: Glutathione. 2nd English Ed. Academic Press., 444, 1641 (1974).
25. Sreel RGD, Torrie JH. Principles and procedures of statistics. *McGraw Hill New York USA*. (1990).
26. Mun SI, Ryu HS, Choi JS. Inhibition effects of *Zanthoxylum schinifolium* and its active principle on lipid peroxidation and liver damage in carbon tetrachloride-treated mice. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 26, 942-951 (1997).
27. Kurita N, Koike S. Synergistic antimicrobial effect of sodium chloride and essential oil components. *Agric. Biol. Chem.*, 46, 159-165 (1982).
28. Kim TK, Shin HD, Lee YH. Stabilization of polyphenolic antioxidants using inclusion complexation with cyclodextrin and their utilization as the fresh-food preservative. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 35, 266-271 (2003).
29. 이호진. 포장재 및 저장형태, 온도, 기간이 콩치과메기의 품질변화에 미치는 영향. 대구가톨릭대학교 대학원 박사학위논문 (2006).
30. 趙武衍, 原色韓國樹木圖鑑, 아카데미사, 275 (1989).
31. 李昌福, 大韓植物圖鑑, 鄉文社, 서울, 696 (1999).
32. M. J. Cheng, C. H. Cheng, W. Y. Lin, Chemical constituents from the leaves of *Zanthoxylum schinifolium*. *J. Chinese Chem. Soc.* (Taipei, Taiwan), 49(1), 125-128 (2002).
33. S. Q. Zhao, T. P. Shi, R. A. Wang, Separation of polar compounds by preparation supercritical fluid chromatography. *Xibei Daxue Xuebao*, 31(3), 229-231 (2001).
34. I. L. Tsai, W. Y. Lin, C. M. Teng, Coumarins and antiplatelet constituents

- from the root bark of *Zanthoxylum schinifolium*. *Planta Medica*, 66(7), 618–623 (2000).
35. J. G. Lee, H. J. Jang, J. J. Kwang, Analysis of volatile components of Sancho (*Zanthoxylum schinifolium*) by solid phase microextraction. *Han'guk Sik'pum Yongyang Hakhoechi*, 12(2), 119–123 (1999).
 36. C. T. Chang, S. L. Doong, I. L. Tsai, Coumarins and anti-HBV constituents from *Zanthoxylum schinifolium*. *Phytochemistry*, 45(7), 1419–1422 (1997).
 37. I. S. Chen, Y. C. Lin, I. L. Tsai, Coumarins and anti-platelet aggregation constituents from *Zanthoxylum schinifolium*. *Phytochemistry*, 39(5), 1091–1097 (1995).
 38. S. L. Liu, L. X. Wei, D. Wang, Chemical constituents from the peel of *Zanthoxylum schinifolium* Sieb et Zucc. *Yaoxue Xuebao*, 26(11), 836–840 (1991).
 39. S. H. Kim, C. S. Kwon, J. S. Lee, Inhibition of carbohydrate-digesting enzymes and amelioration of glucose tolerance by Korean medicinal herbs. *J. Food Sci. Nut.*, 7(1), 62–63 (2002).
 40. Y. S. Jo, D. T. L. Huong, K. H. Bae, Monoamine oxidase inhibitory coumarin from *Zanthoxylum schinifolium*. *Planta Medica*, 68(1), 84–85 (2002).
 41. S. I. Mun, H. S. Ryu, H. J. Lee, Further screening for antioxidant activity of vegetable plants and its active principles from *Zanthoxylum schinifolium*. *Han'guk Sik'pum Yongyang Hakhoechi*, 23(3), 466–471 (1994).
 42. Z. Qin, Toosendanin-containing insecticides for crops. *Faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu*, (1989).
 43. D. S. Kim, W. Bang, D. M. Yeum, Degradation of carcinogenic nitrosamine formation factor by natural food components. 1. Nitrite-scavenging of vegetable extracts. *Han'guk Susan Hakhoechi*, 20(5), 463–468 (1987).
 44. I. L. Tsai, W. Y. Lin, C. M. Teng, Coumarins and antiplatelet constituents from the root bark of *Zanthoxylum schinifolium*. *Planta Medica*, 66(7), 618–623 (2000).
 45. S. L. Liu, L. X. Wei, D. Wang, Studies on the chemical constituents from the

- peel of *Zanthoxylum schinifolium* Sieb et Zucc. *Yao hsueh hsueh pao*, 26(11), 836-840 (1991).
46. M. Tagashira Y. Ohtake, A new antioxidative 1,3-benzodioxole from *Melissa officinalis*. *Planta Medica*, 64(9), 555-558 (1998).
 47. H. Okhawa, N. Ohishi, K. Yagi, Assay for lipid peroxides in nimal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.*, 95(1), 351 (1979).
 48. A. R. Thompson, L. A. Harker, In 'Manual of hemostasis and thrombosis', 3rd ed. *Philadelphia USA*, 178-185 (1983).
 49. B. L. Rhinehart, K. M. Robinson, P. S. Liu, Inhibition of intestinal disaccharidase and suppression of blood glucose by a new α -glucohydrolase inhibitor-MDL. *J. pharmacol. Exp. Ther.*, 241(3), 915-920 (1987).
 50. MTT. Sutarjadi, Th. M. Malingre, F. H. L. Van O, Iridoid and phenolic glycosides of *Fraxinus griffithii*. *Phytochemistry*, 17(3), 564 (1978).
 51. N. Matsuda, K. Isawa, M. Kiduchi, Megastigmane glycosides from *Lonicera gracilipes* VAR. *Glandulosa*. *Phytochemistry*, 45(4), 777-779, (1997).
 52. Y. Champavier, G. Comte, J. Vercauteren, Nortriterpenoid and sesquiterpenoid glucosides from *Juniperus phoenicea* and *Galega officinalis*. *Phytochemistry*, 50(10), 1219-1223 (1999).
 53. I. Calis, A. Kuruzum, P. A. Lorenzetto, (6S)-Hydroxy-3-oxo- α -ionol glucosides from *Capparis spinosa* fruits. *Phytochemistry*, 59(3), 451-457 (2002).
 54. M. Inagaki, Y. Harada, K. Yamada, Isolation and structure determination of cerbrosides from galic, the bulbs of *Allium sativum* L. *Chem. Pharm. Bull.*, 46(7), 1153-1156 (1998).
 55. R. X. Tan, J. Jakupovic, F. Bohlmann, Sequiterpene lactones and other constituents from *Artemisia xerophytica*. *Phytochemistry*, 30(2), 583-587 (1991).
 56. F. Bohlmann, K. Umemoto, J. Jakupovic, Seven sesquiterpene lactones from *Ferreyanthus* Species. *Phytochemistry*, 23(8), 1669-1672 (1984).
 57. J. Kitajima, Y. Tanaka, New monoterpenoid and hemiterpenoid tetraol of the

- crude drug "She chuang zi". *Chem. Pharm. Bull.*, 41(9), 1667– 1669 (1993).
58. H. Morikawa, R. Kasai, H. Otsuka, Terpenic and phenolic glycosides from leaves of *Breynia officinalis* Hemsl. *Chem. Pharm. Bull.*, 52(9), 1086–1090 (2004).
 59. O. Ishikawa, K. Kondo, K. Junichi, Water-Soluble constituents of corriander. *Chem. Pharm. Bull.*, 51(1), 32–39 (2003).
 60. Y. Konda, T. Toida, E. Kaji, Frist synthesis of two new diglycosides neohancosides A and B, from *Cynanchum hancockianum*. *Carbohydrate research*, 301(3–4), 123–143 (1997).
 61. D. Manns, H. Wintoeh, M. Suarez, Linalool and cineile-type glycosides from *Cunila spicata*. *Phytochemistry*, 39(5), 1115–1118 (1995).
 62. T. Ukiyama, T. Miyase, A. Ueno, Terpenic glycosides from *Pluchiea indica*. *Phytochemistry*, 28(12), 3369–3372 (1989).
 63. H. Kobayashi, J. Komatsu, Studies on the constituents *Cistanchis Herba*. *Yakugaku Zasshi*, 104(5), 508 (1983).
 64. M. Sholichin, K. Yamasaki, R. Kasai, ¹³C Nuclear magnetic resonance of lupane-type triterpenes, lupeol, betulin and betulinic acid. *Chem. Pharm. Bull.*, 28(3), 1006–1008 (1980).
 65. H. Fuchino, T. Satoh, N. Tnaka, Chemical evaluation of *Betula* species in Japan. I. constituents of *Betula Ermanii*. *Chem. Pharm. Bull.*, 43(11), 1937–1942 (1995).
 66. A. Hisiyam, G. J. Kumar, Y. Fujimoto, Salacianone and salacianol, two triterpenes from *Salacia beddomei*. *Phytochemistry*, 40(4), 1227–1231 (1995).
 67. H. Sasaki, H. Taguchi, T. Endo, The constituents of *Ledeboariella seseloides* wolff. I. structures of three new chromones. *Chem. Pharm. Bull.*, 30(10), 3555–3562 (1982).
 68. M. D. Grella, P. Monako, L. Previera, Stigmasterols from *Typha latifolia*. *J. Natural Products*, 53(6), 1430–1435 (1990).
 69. M. Hong, J. Pan, T. Jiang, Isolation and characterization of platelet-activating

- factor (PAF) inhibitors from *Zanthoxylum schinifolium*. *J. Chinese Pharm. Sci.*, 1(1), 13-19 (1992).
70. T. Y. Jiang, M. F. Hong, J. X. Pan, NMR study of two new compounds from the roots of *Zanthoxylum schinifolium* Sieb. et Zucc. *Bopuxue Zazhi*, 9(4), 413-417 (1992).
 71. J. X. Pan, Q. Y. Bai, G. Q. Han, The chemical constituents of *Zanthoxylum schinifolium* Sieb. et Zucc. *Zhiwu Ziyuan Yu Huanjing* 2(3), 26-28 (1993).
 72. M. F. Hong, J. X. Pan, T. Y. Jiang, Isolation and characterization of platelet-activating factor (PAF) inhibitors from *Zanthoxylum schinifolium*. *J. Chinese Pharm. Sci.*, 1(1), 13-19 (1992).
 73. I. L. Tsai, W. Y. Lin, C. T. Chang, Peroxycoumarins from the root bark of *Zanthoxylum schinifolium*. *J. Chinese Chem. Soc. (Taipei)*, 45(1), 99-101 (1998).
 74. S. L. Liu, L. X. Wei, Determination of chemical constituents in pepper tree pricklyash (*Zanthoxylum schinifolium*). *Zhongcaoyao*, 22(1), 16-18 (1991).
 75. Z. D. Chen, C. Y. Xu, L. Xie, Supercritical CO₂ fluid extraction of essential oil from *Zanthoxylum schinifolium* or *Zanthoxylum bungeanum*. *Zhong guo Zhongyao Zazhi*, 26(10), 687-688 (2001).
 76. N. Matsuda, K. Isawa, M. Kiduchi, Megastigmane glycosides from *Lonicera gracilipes* VAR. *Glandulosa*. *Phytochemistry*, 45(4), 777-779 (1979).
 77. M. Hiroyuki, K. Morikawa, O. Hideaki, Terpenic and phenolic glycosides from leaves of *Breynia officinalis* Hmsl. *Chem. Pharm. Bull.*, 52(9), 1086-1090 (2004).
 78. P. Anni, B. Denis, S. Etienne, S. Peter, Two diastereomeric 3-oxo- α -ionol β -D-glucosidase from Raspberry fruit. *Phytochemistry*, 31(5), 1649-1652 (1992).
 79. E. E. Sigatad, C. A. Catalan, J. D. Diza, Chromanones, benzofurans and other constituents from *Ophryosporus lurentzii*. *Phytochemistry*, 42(5), 1443-1445 (1996).
 80. J. Kitajima, Y. Aoki, T. Ishikawa, Monoterpenoid glucosides of *Cnidium*

- monnieri* fruit. *Chem. Pharm. Bull.*, 47(5), 639-642 (1999).
81. C. T. Chang, S. L. Doong, I. L. Tsai, Coumarins and anti-HBV constituents from *Zanthoxylum Schinifolium*. *Phytochemistry*, 45(7), 1419-1422 (1997).
 82. I. L. Tsai, W. Y. Lin, C. M. Teng, Coumarins and antiplatelet Constituents from the Root Bark of *Zanthoxylum Schinifolium*. *Plantamedica* 66(5), 618-623 (2000).
 83. A. Ulubelen, S. Oksuz, Capillarin and scaporone from *Artemisia Lamprocaulos*. *J. Natural Products*, 47(1), 170-171 (1984).
 84. U. Afek, A. Sztejnberg, S. Carmely, 6,7-dimethoxycoumarin, a citrus phytoalexin conferring resistance against *Phytophthora Gummosis*. *Phytochemistry*, 25(8), 1855-1856, (1986).
 85. R. Harada, M. Iwasaki. Volatile components of *Artemisia Capillaris*. *Phytochemistry*, 21(8), 2009-2011, (1982).
 86. 소명환, 김영배, 김치에서 분리한 저온성 젖산균의 배양특성, *Korean J. Food Sci. Technol.* 27(4), 506~515 (1995).
 87. 김호식, 전재근, 김치 발효 중 세균의 동적 변화에 관한 연구, 원자력원 연구논문집, 6, 112 (1996)
 88. 조재선, 김치 숙성 중 미생물의 동태와 성분 변화, 한국식문화학회지 6, 479 (1991)
 89. Mhean TI and Kwon TW. Effect of temperature and salt concentration on Kimchi fermentation, *Korean J. Food Sci. Technol.*, 16, 443 (1984)
 90. 소명환, 김영배. 김치에서 분리한 저온성 젖산균의 동정. *Korean J. Food Sci. Technol.* 27 (4), 495~505 (1995).
 91. 이영환, 강미선. 김치에서 분리한 유산균 *Lactobacillus plantarum*의 이화학적 특성 및 β -galactosidase 활성. *Agricultural Chemistry and Biotechnology*, 39(1), 54-59 (1996)
 92. Han-Taek Kim, Jae-Yong Park, Gang Gweon Lee, Jeong Hwan Kim. Isolation of a bacteriocin-producing *Lactobacillus plantarum* Strain from Kimchi. *Food Sci. Biotechnol.*, 12(2), 166-170 (2003).

93. 김선재, 박근형. 부추추출물의 김치발효 지연 및 관련 미생물 증식억제 *Korean J. Food Sci. Biotechnol.* 27(5), 813-818 (1995).
94. 김선재, 박근형. 부추의 향미생물 활성물질 *Korean J. Food Sci. Biotechnol.* 28(3), 604-608 (1996).
95. 박윤희, 권정주, 조도현, 김수일. 김치에서 분리한 젖산균의 미생물 생육 저해. *J. Korean Agri. Chem. Soc.*, 26(1), 35-40 (1983).
96. Kyeoung-Im Lee, Keun-Ok Jung, Sook-Hee Rhee, Myung-Ja Suh, Kun-Young Park. A study on Buchu(Leek, *Allium odorum*) Kimchi. *J. Food Sci. Nutr.* 1, 23-29 (1996).
97. 이귀주, 김유경. 부추첨가 김치의 발효특성 변화. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 28(4), 780-785 (1999).
98. 이신호, 김순동. 김치의 부재료가 김치 숙성에 미치는 효과. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, 17(3), 249-254.
99. 노홍균, 이신호, 김순동. 부재료가 배추김치 숙성에 미치는 영향. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, 24(4), 642-650 (1995).
100. Hyun Jeong Ryu, Chang-Ho Chung and Kyu Hang Kyung. Evaluation of Nisin as a preservative to Prevent Over-acidification of Kimchi. *Food Sci. Biotechnol.*, 7(3), 205-208 (1998).
101. 허우덕, 하재호, 석호문, 남영중, 신동화. 김치의 저장 중 향미성분의 변화, *Korean J. Food Sci.*, 20, 511-517 (1988).
102. Hae-Kyung Chung, Kyung-Mok Yeo, Myung-Hwan Kim. Kinetic modeling for quality prediction during Kimchi fermentation, *J. Food Sci. Nutr.*, 1(1), 42-45 (1996).
103. 김미경, 김소연, 우철주, 김순동. 밀폐용기에서의 김치숙성에 관한 연구, *J. Korean Soc. Food Nutr.*, 23(2), 268-273 (1994).
104. 이명기, 박완수, 강국희. 김치에서 젖산균의 선발 및 계수를 위한 선택배지, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 25(5), 754-760 (1996).
105. Bakri IM, Douglas CW. Inhibitory effect of garlic extract on oral bacteria, *Arch. Oral. Biol.*, 50(7), 645-51 (2005).

106. Lee SJ. Korean Folk Medicine-monographs Series No. 3, Publishing Center of Seoul National University, 88 (1966).
107. 成瀬治己, 庄司 禎: 現状における抗菌性物質とろの應用, 月刊 フードケミカル, 4, 53-99 (1984).
108. Conner DE and Beuchat LR. Effect of essential oils from plants on food spoilage yeasts, *J. Food Sci.*, 49, 429-434 (1984).
109. Okazaki K, Kato H and Wakatabe T. Antibacterial activity of higher plants. VI. Antibacterial activity of drugs. II, *Yakugaku Zasshi*, 71, 9-11 (1951).
110. Jiang L and Kubota K. Formation by Mechanical Stimulus of the Flavor Compounds in Young Leaves of Japanese Pepper (*Zanthoxylum piperitum* DC.), *J. Agric. Food Chem.*, 49, 1353-1357 (2001).
111. Jiang L and Kubota K. Differences in the Volatile components and their Odor Characteristics of Green and Ripe Fruits and Dried Pericarp of Japanese Pepper (*Zanthoxylum piperitum* DC.), *J. Agric. Food Chem.*, 52, 4197-4203 (2004).
112. Jiang L, Kojima H, Ymada K, Kobayashi A, and Kubota K. Isolation of Some Glycosides as Aroma Precursors in Young Leaves of Japanese Pepper (*Zanthoxylum piperitum* DC.), *J. Agric. Food Chem.*, 49, 5888-5894 (2001).
113. Hisatomi E, Matsui M, Kobayashi A and Kubota K. Antioxidative Activity in the Pericarp and Seed of Japanese Pepper (*Zanthoxylum piperitum* DC.), *J. Agric. Food Chem.*, 48, 4924-4928 (2000).
114. Hur JM , Park JG, Yang KH, Park JC, Park JR, Chun SS, Choi JS, and Choi JW. Effect of Methanol Extract of *Zanthoxylum piperitum* Leaves and of Its Compound, Protocatechuic Acid, on Hepatic Drug Metabolizing Enzymes and Lipid Peroxidation in Rats, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 67, 945-950 (2003).
115. Jeong CH and Shim KH. Tyrosinase Inhibitor Isolated from the Leaves of *Zanthoxylum piperitum*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 68, 1984-1987 (2004).
116. Epple G, Bryant BP, Mezzine I, Lewis S. *Zanthoxylum piperitum* (DC), a potential feeding deterrent for mammals: studies with *Mocrotus ochrogaster*

- (Wagner), *Pest Manag Sci.*, 60, 624-630 (2004).
117. 황진성, 김영두, 김제경. 초피나무의 성분이용 및 재배 방법에 관한 연구, 문교부 연구보고서 농학계, 1-9 (1979).
 118. 한희자. 한국산 초피와 산초의 과피 및 종자의 성분에 관한 연구, 한양대학교 박사학위논문 (1988).
 119. Kim, J. H., K. S. Lee, W. T. Oh, and K. R. Kim. Flavor componenets of the fruit peel and leaf oil from *Zanthoxylum piperitum* DC, *Korean J. Food Sci. Technol.* 21, 562-568 (1989).
 120. Ko YS and Han HJ. Chemical constituents fo Korean Chopi (*Zanthoxylum Schinifolium*), *Korean J. Food Sci. Technol.*, 28, 19-27 (1996).
 121. 최용희. 초피 oleoresin 제조시 용매에 따른 추출물 특성과 추출 조건에 따른 휘발성 성분 변화, 한국식품과학회지, 27, 406-412 (1998).
 122. 임상빈, 차미경, 송대진, 고정삼. 초피 추출물의 수율 및 항균활성, 제주대학교 산업기술 연구소 논문집, 6, 1-6 (1995).
 123. 정순경, 정재두, 조성환. 초피 추출물의 항균특성, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 28(2), 371-377 (1999).
 124. 김 정, 조영수, 서권일, 주옥수, 심기환. 산초와 초피 잎의 항균활성, *Korean J. POSTHARVEST SCI. TECHNOL.* 7(2), 195-200 (2000).
 125. 서기림, 이현주, 고경희. 초피(*Zanthoxylum piperitum* DC)의 과피의 휘발 성분과 항균작용, *Kor. J. Appl. Microbial. Biotechnol.*, 27(3), 179-183 (1999).
 126. Loeshe WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay, *Microbiol. Rev.* 50, 47-558 (1986).
 127. 손동화, 노정해, 김영봉, 한찬규, 성기승, 이남형: 난황으로부터 항 충치 항체의 분리 및 그 특성, 한국식품과학회지, 30(5), 1029-1034 (1998).
 128. Cai L and Wu CD. Compounds from *Syzygium aromaticum* possessing Growth Inhibitory Activity Against Oral pathogens, *J. Nat. Prod.*, 59, 987-990 (1996).
 129. Hammer KA, Dry L, Johnson M, Michalak EM, Carson CF, Riley TV. Susceptibility of oral bacteria to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil *in Vitro*,

- Oral Microbiol. Immunol.*, 18(6), 389–392 (2003).
130. Takarada K, Kimizuka R, Takahashi N, Honma K, Okuda K, Kato T. A comparison of the antibacterial efficacies of essential oils against oral pathogens, *Oral Microbiol. Immunol.*, 1961–64 (2004).
131. Duarte S, Koo H, Bowen WH, Hayacibara MF, Cury JA, Ikegaki M, and Rosalen PL. Effect of a Novel Type of Propolis and Its Chemical Fractions on Glucosyltransferases and on Growth and Adherence of Mutans Streptococci. *Biol. Pharm. Bull.* 26(4), 527–531 (2003).
132. Leitao SDP, Filho AAS, Polizello ACM, Bastos JK, and Spadaro ACC. Comparative Evaluation of in-vitro Effects of Brazilian Green Propolis and *Baccharis dracunculifolia* Extracts on Cariogenic Factors of *Streptococcus mutans*. *Biol. Pharm. Bull.* 27(11), 1834–1839 (2004).
133. Radford JR, Ballantyne HM, Nugent Z, Beighton D, Robertson M, Longbottom C, Pitts NB. Caries-associated micro-organisms in infants from different socio-economic backgrounds in Scotland. *J. Dentistry.*, 28, 307–312 (2000).
134. Gulluce M, Sokmen M, Daferera D, Agar G, Ozkan H, Kartal N, Polissiou M, Sokmen A, and Sahin F. J. In Vitro Antibacterial, Antifungal, and Antioxidant Activities of the Essential Oil and Methanol Extracts of Herbal Parts and Callus Cultures of *Satureja hortensis* L. *Agric. Food Chem.*, 57, 3958–3965 (2003).
135. I. L. Tsai, W. Y. Lin, C. M. Teng, T. Ishikawa, S. L. Doong, M. W. Huang, Y. C. Chen, and I. S. Chen, *Planta Medica*, 66(7), 618–623 (2000).
136. I. L. Tsai, W. Y. Lin, C. T. Chang and I. S. Chen, *J. Chin. Chem. Soc.*, 45(1), 99–101 (1998).
137. C. T. Chang, S. L. Doong, I. L. Tsai, and I. S. Chen, *Phytochemistry*, 45(7), 1419–1422 (1997).
138. I. S. Chen, Y. C. Lin, I. L. Tsai, C. M. Teng, F. N. Ko, T. Ishikawa and H. Ishii, *Phytochemistry*, 39(5), 1091–7 (1995).
139. T. Jiang, M. Hong, J. Pan, and X. Yang, *Bopuxue Zazhi*, 9(4), 413–17 (1992).

140. J. W. Lee, *Han'guk Sikp'um Yongyang Hakhoechi*, 11(5), 493-498 (1998).
141. Y. S. Jo, D. T. L. Huong, K. H. Bae, M. K. Lee and Y. H. Kim, *Planta Medica*, 68(1), 84-85, (2002).
142. S. I. Mun, H. S. Ryu, and J. S. Choi, *Han'guk Sikp'um Yongyang Kwahak Hoechi*, 26(5), 943-951 (1997).
143. S. I. Mun, H. S. Ryu, H. J. lee and J. S. Choi, *Han'guk Yongyang Siklyong Hakhoechi*, 23(3), 466-71 (1994).
144. D. S. Kim, B. W. Ahn, D. M. Yeum, D. H. Lee, S. B. Kim, and Y. H. Park, *Han'guk Susan Hakhoechi*, 20(5), 463-8 (1987).
145. H. Kojima, A. Kato, K. Kubota and A. Kobayashi, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 61(3), 491 (1997).
146. S. Morozumi, T. Wauke, Y. Kudoh and H. Hitokoto, *Bioactive Molecules*, 10, 155 (1989).
147. Y. Tanaka, Y. Konishi, T. Nishimura, and Y. Takagaki, *Shokuhin Eiseihen*, 25, 33 (1994).
148. M. Aritomi, *Kaseigaku Zasshi*, 34(4), 233 (1983).
149. F. Abe, S. Yahara, K. Kubo, G. Nonaka, H. Okabe and I. Nishioka, *Che. Pharm. Bull.*, 22(11), 2650 (1974).
150. E. Abe, M. Furukawa, G. Nonaka, H. Okabe and I. Nishioka, *Yakugaku Zasshi*, 93(5), 624 (1973).
151. G. Epple, P. Bruce, I. Mezine and S. Lewis, *J. Chem. Ecol.*, 27(8), 1627 (2001).
152. T. Izuta, T. Soma, A. Ishino, Y. Moriya, Y. Yamase, Y. Tsuji, Y. Kojima, O. Ifuku and N. Tanaka, *Jpn. Kokai Tokkyo Koho*, 7 (2000).
153. J. H. Shim, C. J. Lee, J. Y. Shen, Y. D. Kim and S. K. Kang, *Agricultural Chemistry & Biotechnology*, 44(3), 140 (2001).
154. K. L. Seo, H. J. Lee and K. H. Koh, *Sanop Misaengmul Hakhoechi*, 27(3), 179 (1999).
155. Y. D. Kim, S. K. Kang and M. R. Oh, *Han'guk Yongyang Siklyong*

- Hakhoechi*, 22(5), 617 (1993).
156. B. J. Kim, J. H. Kim, H. P. Kim and M. Y. Heo, *International Journal of Cosmetic Science*, 19(6), 299 (1997).
 157. J. M. Hur, J. C. park and Y. H. Hwang, *Nat. Prod. Sci.*, 7(1), 23 (2001).
 158. W. C. Still, M. Kahn and A. Mitra, *J. Org. Chem.*, 43, 2923 (1978)
 159. D. M. Doddrell, D. T. Pegg and M. R. Bendall, *J. Magn. Reson.*, 48, 323 (1892).
 160. W. P. Aue, E. Barttoldi and R. R. earnst, *J. Magn. Reson.*, 64, 2229 (1892).
 161. A. Bax and G. Morris, *J. Magn. Reson.*, 42, 501 (1981).
 162. J. K. Son, "Chemical and Biochemical Degradation of S Adenosyl L methionine", Thesis for Ph. D. in Univ. of Michigan (1988).
 163. R. E. Hurd, *J. Magn. Reson.* 91, 648 (1991).
 164. E. Hurd, B. K. John and H. D. Plant, *J. Magn. Reson.* 93, 666 (1991).
 165. Smoot LM, McCormick JK, Smoot JC, Hoe NP, Strickland I, Cole RL, Barbian KD, Earhart CA, Ohlendorf DH, Veasy LG, Hill HR, Leung DY, Schlievert PM, Musser JM. Characterization of two novel pyrogenic toxin superantigens made by an acute rheumatic fever clone of *Streptococcus pyogenes* associated with multiple disease outbreaks. *Infect. Immun. Dec.*, 70(12), 7095–7104 (2002).
 166. Muller Alouf H, Proft T, Zollner TM, Gerlach D, Champagne E, Desreumaux P, Fitting C, Geoffroy Fauvet C, Alouf JE, Cavillon JM: Pyrogenicity and cytokine inducing properties of *Streptococcus pyogenes* superantigens: comparative study of streptococcal mitogenic exotoxin Z and pyrogenic exotoxin A. *Infect. Immun.*, 69(6), 4141–5 (2001).
 167. Bjorkholm B, Falk P. Engstrand L, Nyren O, Helicobacter pylori: resurrection of the cancer link, *J. Intern. Med.*, 253(2), 102–19 (2003).
 168. Mascitelli L, Pezzetta F., Helicobacter pylori, *N. Engl. J. Med.* 348(4), 363–365.
 169. Danielsen M, Wind A: Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial

- agents. *Int. J. Food Microbiol.*, 15, 82(1), 1-11 (2003).
170. Gonzalez Avila M, Arriaga Alba M, de la Garza M, del Carmen HernandezPretelin M, Dominguez Ortiz MA, Fattel Fazenda Villa Trevino S., Antigenotoxic, antimutagenic and ROS scavenging activities of a *Rhoeo discolor* ethanolic crude extract, *Toxicol In Vitro*, 17(1), 77-83 (2003).
 171. Kim YH, Buchholz MJ, Nordin A., Murine T lymphocyte proliferation induced by interleukin 2 correlates with a transient increase in p56lck kinase activity and the tyrosine phosphorylation of a 97 kDa protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 90(8), 3187-91 (1993).
 172. Natoli,G., Ianni,A., Costanzo,A., De Petrillo,G., Ilari,I., Chirillo,P., Balsano,C. and Levrero,M., Resistance to Fas-mediated apoptosis in human hepatoma cells, *Oncogene* 11, 157-1164 (1995).
 173. Cascino,I., Papoff,G., De Maria,R., Testi,R. and Ruberti,G., Fas/Apo-1 (CD95) receptor lacking the intracytoplasmic signaling domain protect tumor cells from Fas-mediated apoptosis, *J. Immunol.*, 156, 13-17 (1996).
 174. Lamy,T., Liu,J.H., Landowski,T.H., Dalton,W.S. and Loughran Jr,T.P. Dysregulation of CD95/CD95 ligand-apoptotic pathway in CD3(+) large granular lymphocyte leukemia. *Blood*, 92, 4771-4777 (1998).
 175. Desagher,S. and Martinou,J.C., Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol.* 10, 369-377 (2000).
 176. Nakagawa,T., Zhu,H., Morishima,N., Li,E., Xu,J., Yankner,B.A. and Yuan,J., Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature*, 403, 98-103 (2000).
 177. Friesen,C., Herr,I., Krammer,P.H. and Debatin,K.M., Involvement of the CD95 (APO-1/FAS) receptor/ligand system in drug-induced apoptosis in leukemia cells. *Nature Med.*, 2, 574-578 (1996).
 178. Hannun,Y.A., Apoptosis and dilemma of cancer chemotherapy, *Blood*, 89, 1845-1853 (1997).
 179. Muller,M., Strand,S., Hug,H., Heinemann,E.M., Walczak,H., Hofmann,W.J.,

- Stremmel,W., Krammer, P.H. and Galle,P.R. Drug-induced apoptosis in hepatoma cells is mediated by the CD95 (APO-1/Fas) receptor/ligand system and involves activation of wild-type, 53. *J. Clin. Invest.* 99, 403-13 (1997).
180. Nagarkatti,N. and Davis,B.A., Tamoxifen induces apoptosis in Fas⁺ tumor cells by upregulating the expression of Fas ligand. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 51, 284-290 (2003).
181. Kaufman,S.H. and Earnshaw,W.C., Induction of apoptosis by cancer chemotherapy, *Exp. Cell Res.*, 256, 42-49 (2000).
182. Herr,I. and Debatin,K.M, Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. *Blood*, 98, 2603-2614 (2001).
183. Morishima,N., Nakanishi,K., Takenouchi,H., Shibata,T. and Yasuhiko,Y., An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12. *J. Biol. Chem.*, 277, 34287-34294 (2002).
184. Rao,R.V., Castro-Obregon,S., Frankowski,H., Schuler,M., Stoka,V., del Rio,G., Bredesen,D.E. and Ellerby,H.M. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. An Apaf-1-independent intrinsic pathway. *J. Biol. Chem.* 277, 21836-21842 (2002).
185. Jimbo,A., Fujita,E., Kouroku,Y., Ohnishi,J., Inohara,N., Kuida,K., Sakamaki,K., Yonehara,S. and Momoi,T. ER stress induces caspase-8 activation, stimulating cytochrome c release and caspase-9 activation. *Exp. Cell Res.*, 283, 156-166 (2003).
186. Urano,F., Wang,X., Bertolotti,A., Zhang,Y., Chung,P., Harding,H.P. and Ron,D., Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science*, 287, 664-666 (2000).
187. Curini,M., Epifano,F., Maltese,F., Marcotullio,M.C., Tubaro,A., Altinier,G., Gonzales,S.P. and Rodriguez,J.C., Synthesis and anti-inflammatory activity of natural and semisynthetic geranyloxycoumarins. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 14, 2241-2243 (2004).

188. Murakami,A., Nakamura,Y., Tanaka,T., Kawabata,K., Takahashi,D., Koshimizu, K. and Ohigashi,H., Suppression by citrus auraptene of phorbol ester-and endotoxin-induced inflammatory responses: role of attenuation of leukocyte activation. *Carcinogenesis*, 21, 1843-1850 (2000).
189. Murakami,A., Wada,K., Ueda,N., Sasaki,K., Haga,M., Kuki,W., Takahashi,Y., Yonei,H., Koshimizu,K. and Ohigashi,H., In vitro absorption and metabolism of a citrus chemopreventive agent, auraptene, and its modifying effects on xenobiotic enzyme activities in mouse livers. *Nutr. Cancer*, 36, 191-199 (1997).
190. Tanaka,T., Sugiura,H., Inaba,R., Nishikawa,A., Murakami,A., Koshimizu,K. and Ohigashi,H. Immunomodulatory action of citrus auraptene on macrophage functions and cytokine production of lymphocytes in female BALB/c mice. *Carcinogenesis* 20, 1471-1476 (1999).
191. Kohno,H., Suzuki,R., Curini,M., Epifano,F., Maltese,F., Gonzales,S.P., and Tanaka,T. Dietary administration with prenyloxycoumarins, auraptene and collinin, inhibits colitisrelated colon carcinogenesis in mice. *Int. J. Cancer*, 118, 2936-2942 (2006).
192. Kawabata,K., Tanaka,T., Yamamoto,T., Hara,A., Murakami,A., Koshimizu,K., Ohigashi,H., Stoner,G.D. and Mori,H. Suppression of N-nitrosomethylbenzyl-amine-induced rat esophageal tumorigenesis by dietary feeding of auraptene. *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, 19, 45-52 (2000).
193. Tanaka, T., Kohno, H., Murakami, M., Kagami, S. and El-Bayoumy, K. Suppressing effects of dietary supplementation of the organoselenium 1,4-phenylenebis(methylene)selenocyanate and the Citrus antioxidant auraptene on lung metastasis of melanoma cells in mice. *Cancer Res.* 60, 3713-3716 (2000).
194. Jun,D.Y., Rue,S.W., Han,K.H., Taub,D., Lee,Y.S., Bae,Y.S. and Kim,Y.H. Mechanism underlying cytotoxicity of lysine analog, thialysine, toward human acute leukemia Jurkat T cells. *Biochem. Pharmacol.*, 66, 2291-300 (2003).
195. Simonian,P.L., Grillot,D.A. and Nunez,G. Bcl-2 and Bcl-xL can differentially

- block chemotherapy-induced cell death, *Blood*, 90, 1208-1216 (1997).
196. Nagata,S., Apoptosis by death factor, *Cell*, 88, 355-365 (1997).
197. Kluck,R.M., Bossy-Wetzler,E., Green,D.R. and Newmeyer,D.D. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis, *Science*, 275, 1132-1136 (1997).
198. Yang,J., Liu,X., Bhalla,K., Kim,C.N., Ibrado,A.M., Cai,J., Peng,T.I., Jones,D.P. and Wang,X., Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked, *Science*, 275, 1129-1132 (1997).
199. Lazebnik,Y.A., Kanufmann,S.H., Desnoyers,S., Poirer,G.G. and Earnshaw,W.C., Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature*, 371, 346-347 (1994).
200. Hyer,M.L., Voelkel-Johnson,C., Rubinchik,S., Dong,J. and Norris,J.S. Intracellular Fas ligand expression causes Fas-mediated apoptosis in human prostate cancer cells resistant to monoclonal antibody-induced apoptosis. *Mol. Ther.*, 2, 348-358 (2000).
201. Liu,B. and Fan,Z., The monoclonal antibody 225 activates caspase-8 and induces apoptosis through a tumor necrosis factor receptor family-independent pathway. *Oncogene*, 20, 3726-3734 (2001).
202. Slee,E.A., Zhu,H., Chow,S.C., MacFarlane,M., Nicholson,D.W., Cohen,G.M., Benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp (OMe) fluoromethylketone (z-VAD-fmk) inhibits apoptosis by blocking the processing CPP32, *J. Biochem.*, 315, 21-24 (1996).
203. Broekemeier,K.M., Dempsey,M.E. and Pfeiffer,D.R. Cyclosporin A is a potent inhibitor of the inner membrane permeability transition in liver mitochondria. *J. Biol. Chem.*, 264, 7826-7830 (1989).
204. Inomata,M., Hayashi,M., Ohno-Iwashita,Y., Tsubuki,S., Saido,T.C. and Kawashima, S. Involvement of calpain in integrin-mediated signal transduction, *Arch. Biochem. Biophys.*, 328, 129-134 (1996).
205. Bennett,B.L., Sasaki,D.T., Murray,B.W., O'Leary,E.C., Sakata,S.T., Xu,W.,

- Leisten,J.C., Motiwala,A., Pierce,S., Satoh,Y., Bhagwat,S.S., Manning,A.M., and Anderson,D.W. SP600125, An anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 98, 13681-13686 (2001).
206. Nagata,S., Apoptosis by death factor. *Cell*, 88, 355-365 (1997).
207. Sun,X.M., MacFarlane,M., Zhuang,J., Wolf,B.B., Green,D.R. and Cohen,G.M., Distinct caspase cascades are initiated in receptor-mediated and chemical-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 274, 5053-5060 (1999).