

최 종
연구보고서

넙취와 누룩치를 이용한 효능검정 및 기능성 식품개발

Development of Functional Foods from *Ligularia fischeri* var.
spiciformis and *Pleurospermum kamtschaticum* by
Pharmacological Tests

주관연구기관명 : 상 지 대
세부연구책임자 : 박 희 준
협동연구기관명 : 연 세 대
협동연구기관명 : 고려지농업연구소

농림부 도서실



0001321

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “**넙취와 누룩치를 이용한 효능검정 및 기능성 식품개발**” 과제의 최종 보고서로 제출합니다.

2005 년 7 월 25 일

주 관 연 구 기 관 명 : 상지대학교
총괄연구책임자 : 박희준
연 구 원 : 정현주, 남정환

제1협동연구기관명 : 연세대
제1협동연구책임자 : 박광균
연 구 원 : 정원운

제2협동연구기관명 : 고령지농업연구소
제2협동연구책임자 : 김원배
연 구 원 : 조명래, 남춘우, 심석원

요 약 문

I. 제 목

넙취와 누룩치를 이용한 효능검정 및 기능성 식품개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

넙취와 누룩치의 약리적 유용성분 및 생리활성물질을 탐색 분리 및 정제 추출하고 표준품의 대량 생산기술체계를 확립하여 최종적으로 이를 이용한 고수요 고부가 기능성식품을 개발함으로써 국내 식품문화의 향상에 이바지할 뿐만 아니라 상품화를 통한 농가소득제고에 기여하는 것이다.

III. 연구개발 내용 및 범위

넙취로부터 테르페노이드 성분으로 spiciformisin a, b 및 monocyclosqualene, 6-oxoeremophilenolide, intermedeol과 스테로이드 성분으로 β -sitosterol이 분리되었다. 또한 페놀성 성분으로 3,4-dicaffeoylquinic acid, luteolin이 분리되었다. 누룩치로부터 saikosaponin 동족계의 사포닌 성분인 buddlejasaponin IV 및 buddlejasaponin IVa를 분리하였다. 넙취의 효능으로 혈청콜레스테롤 저하작용, 진통작용, 간보호작용, 항염, 항산화 항돌연변이 작용을, 누룩치의 효능으로 항염, 항발암 작용 등을 규명하였다. 넙취에서 dicaffeoylquinic acid가 누룩치에서 buddlejasaponin IV가 주로 기능성 물질로 작용하고 있음을 밝혔다. 두 식물을 이용하여 기능성식품으로 환제, 정제 등을 제조하였으며, 기호식품으로 김치, 고추장, 막장장아찌, 간장장아찌, 국수, 쿠키류 등을 제조하였다. 결과로서 쓴맛이 약화된 넙취 간장 장아찌의 제조를 할 수 있었으며, 10% 누룩치 국수가 가공적성의 시험결과 나타났

으며, 장아찌 등은 도시락 혹은 가정의 부식용을 위한 기업화 가능성이 시사되었다. 그러나 누룩치 고추장, 막장장아찌는 상품성이 부족하였으며 제조된 김치는 기호성에서 성공적이 못하였다. 또, 배발생 캡러스 유도 및 증식을 위해 체세포 배를 통한 신초유도 실험을 진행하였을 뿐 아니라 현탁배양조건을 확립하였다. 그리고 넘취 누룩치에 대한 식물체 급속증식법을 확립 및 기내 식물 액체배양 조건을 확립하였다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

넘취는 dicaffeoylquinic acid 성분에 기인한 간보호효과, 항염효과, 항산화효과 등이우수하게 나타났으므로 민간용도인 황달, 간질환 및 관절염 등에 대한 용도를 잘 규명하였으므로 이에 대한 산업화가 가능하므로 산업체와 접촉하고 있는 중이다. 또한 넘취와 누룩치는 본 연구자들이 특허를 출원하였으며 산업화를 위한 기술이전을 희망하고 있다. 논문 3건 게재 특허 2건 출원하였으며, 향후 논문을 2편을 발표할 예정이다. 본 연구결과가 잘 홍보되어 넘취와 누룩치가 대량소비될 수 있는 길이 열리기를 기대한다.

SUMMARY (영문요약문)

This study was designed to isolate biologically active substances and to demonstrate the traditional uses of the herbs of *Ligularia fischeri* var. *spiciformis* and *Pleuropermum kamtschaticum* and scheduled to establish mass production technique on tissue culture and manufacturing techniques on the functional foods using the two plant materials. Our efforts on many academic viewpoint were ultimately aimed to increase Koran farmers by enlarge the consuming of the two herbs.

We isolated terpenoid constituents, spiciformisin a, -b, monocyclosqualene, 6-oxoerremophilenolide, intermedeol and a steroid, β -sitosterol together with phenolic substances 3,4-dicaffeoylquinic acids and luteolin from the herb of *Ligularia fischeri* var. *spiciformis*. We also isolated buddlejasaponin IV and buddlejasaponin IVa, which are analogues of saikosaponins, from *Pleuropermum kamtschaticum*. It was established that *L. fischeri* var. *spiciformis* has the biological activities such as hypocholesterolemic, antinociceptive, antiinflammatory, antioxidative, antihepatotoxic, and antimutagenic and that *P. kamtschaticum* has the activities such as antiinflammatory, anticarcinogenic. It was elucidated that the former herb contains a main biologically active substance, 3,4-dicaffeoylquinic acid and the latter contains buddlejasaponin IV as a main active component. Using the two plant materials, pills, tablets were manufactured for functional foods, and kimchi, makjang-jangachi, ganjang-jangachi, noodles and cookies were made for tasty foods. As beneficial results, ganjang-jangachi with less bitter taste, which was prepared from *L. fischeri* var. *spiciformis*, was possibly manufactured, and noodles

composed of 10% *P. kamtschaticum* were made with a processing easiness. It was also appeared that jangachi could be a good source for industrialization so that it might be available for a lunch basket and a side dish. However, gochujang and makjang-janachi were not good sources for the commodity, and kimchi was unsuccessful for the citizen's liking. Shoot growth of a somatic cell embryo for callus induction and proliferation, and the suspension culture system were also established. In addition, a rapid proliferation method was established on the two plants.

Elucidation of the bioactivities such as antihepatotoxic, antiinflammatory, antioxidative due to the components dicaffeoylquinic acids of *L. fisheri* var. *spiciformis* demonstrated the folkloric uses on jaundice, hepatic diseases and arthritis. This plant could be industrialized using the present experimental results. Patents on the two plants, submitted by us, should be available for the transfer of the industrial techniques. Three papers were published in the academic journals, two patents were submitted using the present experimental results, and the two papers should be further submitted to the journals for publication. Information on the present results will lead a large consumption of *L. fisheri* var. *spiciformis* and *P. kamtschaticum* for citizen's favors.

CONTENTS (영 문 목 차)

Chapter 1 Summary	9
Chapter 2 The Present Condition on the Technical Development at Foreign & Domestic Countries	11
Chapter 3 Results of the Research and Development	16
1. Isolation of phenolic constituents from <i>Ligularia fischeri</i> var. <i>spiciformis</i> and structure elucidation	16
2. Isolation of a flavone from <i>L. fischeri</i> var. <i>spiciformis</i>	21
3. Isolation of terpenoids from <i>L. fischeri</i> var. <i>spiciformis</i>	26
4. Isolation of saponin constituents from <i>Pleurospermum kamtschaticum</i>	29
5. Animal experiments	41
6. Food processing on <i>L. fischeri</i> var. <i>spiciformis</i> and <i>P. kamtschaticum</i>	55
7. Bioactivity on <i>L. fischeri</i> var. <i>spiciformis</i> and <i>P. kamtschaticum</i>	67
8. Mass production utilizing the bioreactor	86
Chapter 4 Achievement Degree against the Target and Contribution to the Academic Field	110
Chapter 5 Utilization Schedule on the R & D results	112

Chapter 6 Information on Foreign Science & Technique Obtained throughout R & D Projects	113
Chapter 7 References	115

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	9
제 2 장	국내외 기술개발 현황	11
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	16
1절	넙취로부터 페놀성 성분분리 및 구조결정	16
2절	넙취로부터 Flavone 성분의 분리	21
3절	넙취로부터 테르페노이드 성분의 분리	26
4절	누룩치로부터 성분의 분리	29
5절	동물실험	41
6절	넙취 및 누룩치의 가공	55
7절	넙취와 누룩치를 이용한 효능검정	67
8절	생물반응기를 이용한 대량증식	86
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	110
제 5 장	연구개발결과의 활용계획	112
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	113
제 7 장	참고문헌	115

제 1 장 연구개발과제의 개요

1 절 연구의 필요성

1. 기술적 측면

최근 수입개방화와 재배기술의 발달로 농수산물이 과잉 공급됨에 따라 농가에서 고부가가치의 새로운 작물의 개발이 필요한 실정이며, 특히 고랭지 감자, 옥수수 등을 대체할 소득작물이 농가 보급이 필요한 실정이 있다. 그리고 근래 농업자원 및 자연자원을 활용하여 생명공학기술을 접목한 식품의약을 개발하고자 하는 추세에 있을 뿐 아니라, 더욱이 강원도와 같은 고령지에는 각종의 산나물 및 약용식물의 산지로서 적합한 곳이기 때문에 이들을 부가가치가 높은 가공식품으로 개발할 수가 있다. 특히 기능성식품군으로 1999년도 건강보조식품 시장은 제품검사 실적기준으로 전년도 대비 40.4% 증가한 8,729억원 매출을 기록한 사실로부터 이러한 식물의 산업화에 관련된 제반 기초연구는 매우 필요한 실정에 있다고 하겠다.

넙취(한대리 곰취, *Ligularia fischeri* var. *spiciformis*, Compositae)는 고산지에서 자생하는 국화과의 다년생 식물로서 고급건강식품으로 진해, 거담, 진통 등의 효능을 가지고 있고 혈액순환을 원활히 해 주므로 기침을 비롯한 백일해, 천식, 요통이나 관절통 등에 사용되어 왔다. 대중화된 곰취와 외부형태가 유사하며, 민간에서 생채(쌈, 무침 등), 또는 견채(묵나물) 등으로 식용되고 있을 뿐 아니라 약용으로는 전초를 황달, 관절염, 간장질환 등에서 사용할 만큼 유용성이 매우 높다.

누룩치(누리대, *Peurospermum kamtschaticum*, Umbelliferae)는 역시 북부 고산지에서 자생하는 미나리과의 다년생 식물로서 예부터 소화 및 식욕촉진 효과가 있다고 알려져 왔으며 북동의 치료제로 사용되었고 산모가 먹으면 젖이 잘 나온다고 알려져 있기도 하다. 최근의 연구결과에서도 인체의 소화효소체에 누룩치의 추출물을 첨가했을 경우 인체 소화제 단독처리 비해 전분은 1.9배, 단백질은 4배 정도의 소화력을 향상시키는 것으로 밝혀졌으며, 콜레스테롤을 저하시키는 기능도 있는 것으로 알려졌다. 약용으로는 열매와 뿌리를 풍사(風邪), 골통(骨痛), 중독(中毒) 등에 사용된다고 한다.

이와 같은 강원도의 자생식물이며 유용식물인 넙취와 누룩치를 생리활성, 식품가공기술, 생물반응기를 이용한 대량생산기술을 확립하는 기술의 강화가 필요하다.

2. 경제산업적 측면

현재 한국인들은 식생활 수준의 향상 및 서구화 그리고 만성퇴행성 질환의 증가 등으로 향신료와 식이성 섬유질에 대한 많은 관심을 가지고 있다. 또한, 각종 성인병 발병의 주요원인이 식생활임이 밝혀지고, 의약품의 오남용에 따른 부작용이 널리 인식됨에 따라 건강증진 내지 질병예방을 위한 새로운 접근방법의 하나로 기능성식품에 대한 관심이 고조되고 있는 실정이다. 기능성 식품 시장이 계속적으로 성장할 것으로 예측되는 요인들로서 고령화 사회로의 진입, 생활수준 향상에 따르는 건강지향 욕구 증대, 건강과 식품에 관한 지식 축적, 대체의학 및 자가치료에 대한 관심의 증대, 천연물성분에 관한 지식축적, 기능성 식품의 종류와 공급증대, 기능성식품에 대한 각국의 법규 마련 경향 등을 들 수 있다.

그리고 건강기능식품과 관련된 특허출원도 증가추세에 있어 건강기능식품관련 특허출원은 1991년 51건에서 1997년 114건, 1999년 95건으로 증가하였으며, 기능성식품 중 특정질병의 예방과 관련된 식품출원도 1991년 3건에서 1999년 11건으로 점차 늘어나고 있다. 특히 건강기능식품은 전통적 동양의 지식체계와 서양의 첨단기술이 접목되는 분야로서 WIPO를 중심으로 최근 활발하게 논의 중에 있는 야생식물에 대한 우수한 연구결과가 뒷받침된다면 자연 건강식품에 대한 기호도가 증가될 것이라 믿어진다. 본 연구과제의 연구대상 식물인 넝쿨과 누룩치는 강원도 특산의 산나물이기 때문에 독점적 생산이 가능하고 생리활성적 유효성이 나타나면 소비가 증대될 수 있을 것으로 판단된다. 뿐만 아니라 생물반응기를 이용하여 대량생산된 저단가가의 우량한 넝쿨과 누룩치를 농가에 보급할 수 있으므로 농가소득증대에 대한 기대도 가능하다. 나아가 생물반응기를 이용한 표준품 대량생산기술을 기업에 이전하여 산업적 생산을 할 수 있을 뿐 아니라 많은 이윤창출의 모색이 가능하다. 넝쿨과 누룩치에 대한 항암효과, 간보호효과, 항관절염효과, 지질과산화 저해효과 등을 밝혀면 강원도 특산 건강식품으로 개발이 가능하며, 누룩치는 식용하여 온 강원도, 특히 설악산 주민들로부터 최고의 산채로 꼽히는 야생식물이므로 건강식품으로의 개발이 밝을 것으로 전망되고 있다. 그러므로 넝쿨과 누룩치의 유효성분을 탐색하여 유용성을 증가시키게 됨으로써 이들 식물의 소비확대 및 그에 따르는 소득증대를 전장할 수 있다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1절 천연물로부터 생리활성물질의 도출 및 생리활성 기작에 대한 연구

1. Hee-Juhn Park, Sang-Hyuk Kwon, Ki-Oug Yoo, Il-Cheol Sohn, Kyung-Tae Lee and Hyeong-Kyu Lee: Sesquiterpenes from the Leaves of *Ligularia* var. *spiciformis*, *Planta Medica* 66, 783-784 (2000).

-넙취의 성분에 대한 연구를 수행하였고 세포독성을 나타내는 성분을 밝힌 연구결과임.

2. 넙취의 dicaffeoylquinic acids의 성분연구결과를 예비실험으로서 보유하고 있으며 생리활성에 대한 여러 정보를 가지고 있음.

3. 넙취의 terpenoid 성분의 분리와 이들의 세포독성에 미치는 효과와 기전을 예비실험결과로서 보유하고 있음.

4. 넙취의 유사식물인 곰취 유사종에 대한 terpenoid를 위주로 하는 성분에 대하여는 많이 알려져 있으나 상품화를 위한 생리활성에 대한 연구는 미약하고 특히 넙취의 연구에 대한 것은 본 연구진의 결과가 전부임.

5. 다양한 발암물질의 돌연변이성과 발암성에 대한 chlorophyllin (식물 엽록체의 수용성 유도체)의 억제효과를 *in vitro* 및 *in vivo* 연구를 통하여 조사하였으며, chlorophyllin이 암 개시단계 뿐만 아니라 어느 정도 암이 진행된 촉진단계도 억제한다는 것을 조사하여 보고하였으며, 중국 Quidong에서 임상실험을 하여 효과가 입증되었음.

- Chemoprotective properties of chlorophyllin against vinyl carbamate, p-nitrophenyl vinyl ether and their electrophilic epoxides, *Cancer Letters* 94:33-40, 1995.

- Inhibitory effects of chlorophyllin on chemically induced mutagenesis and carcinogenesis, *Annual New York Academic Science* 768:917-920, 1995.

- Chemopreventive activity of chlorophyllin against mouse skin carcinogenesis by benzo[a]pyrene and benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide, *Cancer Letters* 102:143- 149, 1996.

- The inhibitory effect of chlorophyllin is influenced by different promotion stages in DMBA-TPA-induced mouse skin carcinogenesis, *Environmental Mutagens and Carcinogens* 18:131-139, 1999.

- Inhibitory effects of chlorophyllin on 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced bacterial mutagenesis and mouse skin carcinogenesis, *Cancer Letters*, 145: 57-64, 1999.
- 6. 자연계에 널리 존재하는 포르피린 화합물의 암예방효과 및 암예방기작을 조사하여 보고하였음.
 - Protective effects of hemin and tetrakis(4-benzoic acid)porphyrin on bacterial mutagenesis and mouse skin carcinogenesis induced by 7,12-dimethylbenz[a]-anthracene, *Mutation Research* 472(1-2): 139-145 (2000).
- 7. 고추의 매운 성분인 capsaicin, 생강 성분인 gingerol, paradol, 마늘 성분인 diallyl sulfide, 인삼 추출물, 익지인 추출물 등 천연물질의 암예방효과와 그 작용기작에 대하여 연구하여 보고하였다. 특히 capsaicin의 경우 암을 촉진한다는 보고와 암을 예방한다는 보고가 서로 상반되고 있으나, 본 연구자의 연구를 통하여 capsaicin의 암예방효과를 명확히 밝혀 특허를 받았음.
 - Inhibitory effects of [6]-gingerol, a major pungent principle of Ginger, on phorbol ester-induced inflammation, epidermal ornithine decarboxylase activity and skin tumor promotion in ICR mice. *Cancer Letters* 129:139-144, 1998.
 - Lack of tumor promoting activity of capsaicin, a principal pungent ingredient of red pepper, in two-stage mouse skin carcinogenesis. *Anticancer Research*. 18(6A):4201-4206, 1998.
 - Suppression of mouse skin tumor promotion and induction of apoptosis in HL-60 cells by *Alpinia oxyphylla* Miquel (Zingiberaceae). *Carcinogenesis* 19(8):1377-1381, 1998.
 - Chemopreventive effects of 2-(allylthio)pyrazine on hepatic lesion, mutagenesis, and tumorigenesis induced by vinyl carbamate or vinyl carbamate epoxide. *Carcinogenesis* 19(7):1263-1267, 1998.
 - Anti-tumor promoting of selected pungent phenolic substance present in ginger, *J. Environ. Toxicol. Oncol.* 18(2):131-139, 1999.
 - Anti-tumor promoting potential of naturally occurring diarylheptanoids structurally related to curcumin. *Mutation Research* 428:49-57, 1999.
 - Antioxidative and antitumor promoting effects of [6]-paradol and its homologs, *Mutation Research*, 496:199-206, 2001.
- 8. 포도의 성분인 resveratrol을 분리하여 암예방효과를 조사하였음.

- Evaluation of the antioxidant potential of natural products, *Comb Chem High Throughput Screen*, 1(1):35-46, 1998.
 - Resveratrol analog, 3,5,2',4'-tetramethoxy-trans-stilbene, potentiates the inhibition of cell growth and induces apoptosis in human cancer cells, *Arch Pharm Res*, 24(5):441-5, 2001.
 - Induction of quinone reductase activity by stilbene analogs in mouse Hepa 1c1c7 cells, *Arch Pharm Res*, 24(6):597-600, 2001.
9. 마우스 피부암 모델에서 인도네시아의 전통생약인 *Curcuma xanthorrhiza*의 메탄올 추출물 및 정제성분인 xanthorrhizol의 항암효과를 조사하여 특허를 출원하였으며 국제 학술회의 및 국내 학술회의에 발표하였음.
10. 생강과속 국내전통생약인 아출로부터 ar-turmerone과 β -turmerone을 분리하여 2건의 특허를 출원하였음.

<특허출원현황>

구분	년도	발명의 명칭	출원국가	출원일 (출원번호)	등록일 (등록번호)	출원인
국내 특허	2001	잔토리졸을 포함하는 조성물 및 그 용도	한국	2001.3.22(10-2001-0015027)		박광균 (주)바이오케어
국내 특허	2001	ar-투메론을 포함하는 조성물 및 그 용도	한국	2001.4.18		이상국
국내 특허	2001	β -투메론을 포함하는 조성물 및 그 용도	한국	2001.4.18		이상국
국내 특허	1997	간기능보호작용을 가지는 시린진의 약학적 조성물	한국		(제0214883)	박희준
국내 특허	2001	신규한 5-O-부틸-3,4-디카페오일퀴닌 산 화합물, 이의 제조방법 및 용도	한국	2001(10-2001-0020954)		박희준
국내 특허	2001	3,4-디카페오일퀴닌 산의 제조방법 및 콜레스테롤 저하제로서의 용도	한국	2001(10-2001-0025040)		박희준
국내 특허	2001	해동피에서 분리한 칼로파낙스사포닌 A의 항발암제로서의 용도	한국	2001(10-2001-0064859)		박희준
국내 특허	2001	항산화 활성을 가지는 신남 알데히드를 함유한 계피 추출물	한국	2001(10-2001-0064860)		박희준
국내 특허	2001	텍토리게닌과 카이카사포닌 III의 제조방법 및 항돌연변이제로서의 용도	한국	2001(10-2001-0064861)		박희준

2절 천연물의 표준품 대량생산 및 공정화 기술개발

1. 현재 독일, 일본, 중국에서 인삼을 비롯한 각종 약용식물을 생명공학적 기법으로 대량생산하여 산업화하고 있으며, 국내에서도 삼양제넥스, micro plant, 충북대학교 첨단원예기술개발센터에서 주목, 산삼, 가시오갈피 등을 상업적 대량생산에 성공하여 상품화하였으나, 넘취와 누룩치에 대한 연구는 없었음.
2. 고령지농업시험장 연구진은 충북대학교 첨단원예기술개발센터의 생물반응기를 이용한 산삼, 사과왜성대목, 포도대목, 절화류 등의 대량생산 공정개발에 참여하여 관련 know-how를 축적하였음.
3. 넘취의 자생종 수집 및 특성검정, 종자 번식법 연구(고령지농업시험장) 등 국내외적으로 가장 많은 선행연구를 수행하였음.

3절 천연물의 기능성 제품 개발

1. 태백농협가공공장은 '95년 설립 이후 자체연구 및 상지대, 한림대, 태성대 등과의 산학협력연구로 총 56종의 건강보조제품을 개발 생산하여 국내는 물론, 미국, 일본, 멕시코 등 국제식품박람회 등을 통하여 홍보판매하고 있음(식약청 승인)

구 분	품 목 수	품 목 명
음 료	12종	켄음료 : 고원디,황기대추 (2종) 병음료 : 당귀대추, 사철쑥, 일송정, 푸른솔, 쌍화-A, 프리빈, 구론산, 영지, 홍삼, 매실, 오렌지 (10종)
환	2종	당귀인진쑥환
과립차	5종	황기차, 당귀차, 인진쑥차, 산뽕잎차, 태백산전통차 (1호)
중 탕	7종	대보중탕 2종, 용심대보중탕 2종, 유허오리1종, 토종오가피, 홍삼오가피
한약재	30 여종	황기,당귀등
합계	56 종	

3. 강원도 식품산업기술센터를 중심으로 도내 자생식물 또는 농산자원을 이용한 기능성 제품의 연구개발 know-how를 축적하여 태백농협 등 산업체가 요구하는 상품화 기술보급에 앞장서 오고있음.

- 약초류, 산채류, 감자, 버섯류, 목본류 등 20종을 대상으로 음료, 차, 제약원료 등 기능성 제품 연구개발

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

1절 넘취로부터 폐놀성 성분분리 및 구조결정

1. 실험방법

가. 추출

각 식물 재료를 MeOH로 3회 온침하여 추출하였다. 추출물을 진공 농축기로 농축하고 동결 건조하여 추출물을 얻었다.

나. 분획

계통적 분획법에 따라 넘취와 누룩치 추출물을 증류수에 현탁시키고 CHCl₃, EtOAc, BuOH로 순차적으로 분획한 후 각 가용부를 진공농축기로 농축하였으며 계속하여 동결건조한 후 실험에 사용하였다.

다. 분리

활성 분획 혹은 필요한 분획을 silica gel column chromatography로 분리를 하였다. 얻어진 각 소분획을 TLC 체크 시 50% 황산 혹은 자외선하에서 반점을 확인하면서 유사분획끼리 통합하였다. 이들을 재결정하거나, ODS column chromatography, Sephadex LH-20 chromatography로 반복하면서 순수물질을 얻도록 하였다. silica gel column chromatography 전개용매로는 CHCl₃-MeOH-H₂O(하층), CHCl₃-MeOH, 혹은 Hexane-EtOAc 용매계를 사용하였다. ODS column chromatography 전개용매로는 MeOH-H₂O 용매계를 사용하여 분리하였다.

라. 기기 측정 및 구조동정

분리된 물질의 구조를 측정하기 위해 mp, $[\alpha]_D$, IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, EIMS, FABMS, HRFABMS 등을 측정하여 그 데이터를 문헌치와 비교해 가면서 구조를 결정하였다.

2. 실험결과

가. 넘취로부터 페놀성 물질의 분리

EtOAc 분획 15g을 CHCl₃-MeOH-H₂O (65:35:10, lower phase) 용매로 silica gel column chromatography에서 전개하여 1.20-1.32 L의 분획을 농축하였다. 이를 ODS column chromatography (YMC gel ODS-A, YMC Co., LTD, Germany)에서 Eluent: MeOH-H₂O (10:2)로 전개하여 화합물 **1**을 분리하였다.

Compound **1**: Amorphous white powder from MeOH, IR ν (cm⁻¹): 3372 (broad, OH), 1701 (α,β -unsaturated ester), 1630, 1602, 1516, 1439 (aromatic C=C), 1285 (C-O); FAB-MS (m/z): 591 [M+Na]⁺, ¹H-NMR (500 MHz, DMSO), ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO): abbreviation

나. Caffeic acid methyl ester의 제조

3 g의 caffeic acid (Sigma Co.)를 acetone 150 ml에 녹이고 dimethylsulfate를 가하여 8시간 환류하였다. 이를 H₂O와 EtOAc 사이에서 분획하였고 EtOAc 분획을 silica gel column chromatography에서 CHCl₃-MeOH(12:1)로 전개하여 caffeic acid methyl ester (2.1 g)를 얻었다.

Caffeic acid methyl ester: white powder, mp 118.5°C, IR ν_{\max} (KBr) cm⁻¹: 3477(OH), 3098 (aromatic CH), 2955 (aliphatic CH), 1681 (α,β -unsaturated ketone), 1606, 1483 (aromatic C=C), 1283 (C-O); ¹H-NMR (500 MHz, pyridin-*d*₅) : 3.71 (3H, s, COOCH₃), 6.56 (1H, d, *J*=15.9 Hz, H-8), 7.16 (1H, dd, *J*=1.9 and 8.1 Hz, H-6), 7.19 (1H, d, *J*=8.1 Hz, H-5), 7.57 (1H, d, *J*=1.9 Hz, H-2), 7.92 (1H, d, *J*=15.9 Hz, H-7); ¹³C-NMR (125.5 MHz, pyridin-*d*₅) : 51.2 (COOCH₃), 114.6 (C-8), 115.7 (C-2), 116.7 (C-5), 122.0 (C-6), 126.8 (C-1), 146.0 (C-7), 147.7 (C-3), 150.5 (C-4), 167.8 (C-9).

다. Di-O-acetylcaffeic acid의 제조

2 g의 caffeic acid, m을 5.0 ml pyridine에 녹이고 3 ml anhydrous acetic acid을 가하여 여과하고 빙수를 가하였다. 이를 증류수로 세척하고 잔류물을 건조하여 di-O-acetylcaffeic acid (1.8 g) 분말을 얻었다.

Di-O-acetylcaffeic acid: White powder, ¹H-NMR (500 MHz, pyridine-*d*₅) : 2.24, 2.27

(each 3H, s, acetyl), 6.84 (1H, d, $J=16.0$ Hz, H-8), 7.35 (1H, d, $J=8.3$ Hz, H-5), 7.47 (1H, dd, $J=1.9$ and 8.3 Hz), 7.67 (1H, d, $J=1.9$ Hz, H-2), 7.93 (1H, d, $J=16.0$ Hz, H-7); ^{13}C -NMR (125.5 MHz, pyridine- d_5) : 20.79 (CH_3CO) and 20.81 (CH_3CO), 122.4 (C-8), 123.8 (C-2), 124.9 (C-5), 127.1 (C-6), 134.6 (C-1), 142.7 (C-7), 143.8 (C-3), 144.6 (C-4), 168.7, 168.8 (CH_3CO), 169.3 (C-9).

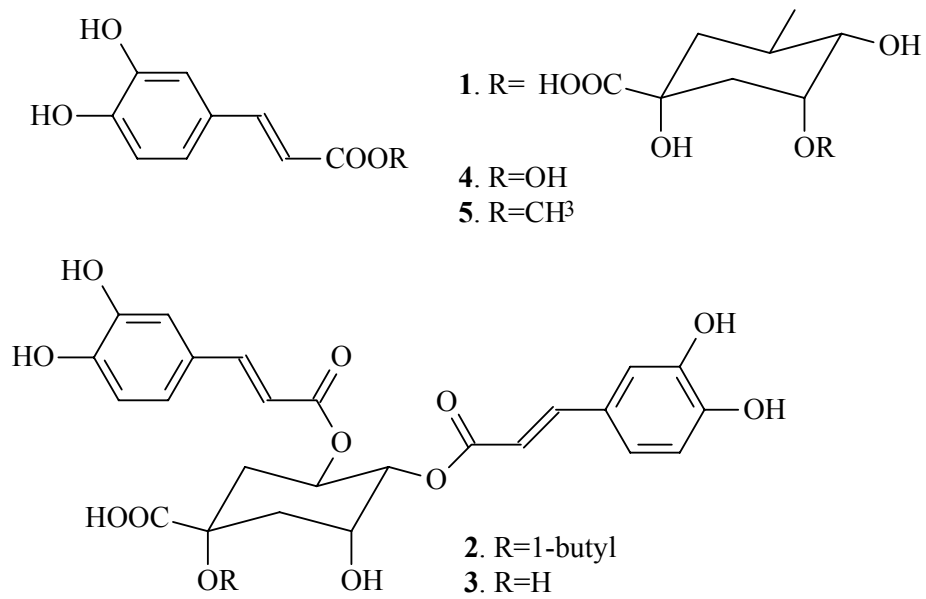


그림 1. 넘취에서 분리된 페놀성 물질 및 유도체

표 1. 넘취에서 분리된 caffeoylquinic acid (2, 3)의 ¹H-NMR 데이터 (500 MHz, DMSO-*d*₆)

Position	2	3	(2-3)
Quinic acid-2	1.85 (1H, d-like)	1.95 (1H, d-like)	-0.10
3	5.50 (1H, d-like)	5.50 (1H, d-like)	0.00
4	5.05 (1H, brs)	5.04 (1H, brs)	+0.01
5	3.79 (1H, d-like)	3.86 (1H, brs)	-0.07
6	1.75 (1H, d-like)	1.87 (1H, d-like)	-0.12
6	1.92 (1H, d-like)	1.81 (1H, d-like)	-0.11
Caffeoyl-2'	7.01 (1H, d, J=1.8 Hz)	7.00 (1H, d, J=1.8 Hz)	+0.01
2''	7.07 (1H, d, J=1.8 Hz)	7.07 (1H, d, J=1.6 Hz)	0.00
5''	6.71 (1H, d, J=8.2 Hz)	6.72 (1H, d, J=8.1 Hz)	-0.01
5''	6.76 (1H, d, J=8.2 Hz)	6.76 (1H, d, J=8.1 Hz)	0.00
6'	6.90 (1H, dd, J=8.2 & 1.8 Hz)	6.91 (1H, dd, J=8.1 & 1.6 Hz)	-0.01
6''	7.01 (1H, dd, J=8.2 & 1.8 Hz)	7.00 (1H, dd, J=8.1 & 1.8 Hz)	+0.01
7'	7.39 (1H, d, J=15.8 Hz)	7.40 (1H, d, J=15.8 Hz)	-0.01
7''	7.49 (1H, d, J=15.8 Hz)	7.50 (1H, d, J=15.8 Hz)	-0.01
8'	6.14 (1H, d, J=15.8 Hz)	6.16 (1H, d, J=15.8 Hz)	-0.02
8''	6.30 (1H, d, J=15.8 Hz)	6.30 (1H, d, J=15.8 Hz)	0.00
Butyl-1'''	3.37 (2H, t, J=6.5 Hz)		-
2'''	1.38 (2H, m)		-
3'''	1.30 (2H, m)		-
4'''	0.84 (3H, t, J=6.3)		-

같은 분자에 있는 두 caffeoyl기 동일 위치 chemical shift는 상호 바뀔 수 있음

표 2. 님취로부터 분리된 caffeoylquinic acid (**2**, **3**)의 ^{13}C -NMR data (125 MHz, DMSO- d_6)

Position	2	3	Chlorogenic acid ¹	(2-3)
1	73.5	73.6	77.3	-0.1
2	37.7	37.8	37.6	-0.1
3	68.5	68.2	71.4	+0.3
4	72.6	72.5	73.0	+0.1
5	66.7	66.1	71.3	+0.6
6	37.7	39.1	37.6	+2.6
7	179.3	179.1	178.3	+0.2
1'	125.8	125.4	125.6	+0.4
1''	125.8	125.4		+0.4
2'	115.2	114.8	114.8	+0.4
2''	115.4	114.9		+0.4
3'	146.0	145.7	145.8	+0.3
3''	146.1	145.6		+0.5
4'	149.0	148.6	148.6	+0.4
4''	149.0	148.5		+0.5
5'	116.2	115.8	116.1	+0.4
5''	116.3	115.8		+0.5
6'	121.9	121.5	121.4	+0.4
6''	121.9	121.5		+0.4
7'	145.0	145.3	144.8	-0.3
7''	145.2	145.4		-0.2
8'	114.3	114.0	114.6	+0.3
8''	114.3	114.0		+0.3
9'	166.1	165.8	166.5	+0.3
9''	166.3	165.9		+0.4
1'''	60.8			
2'''	35.1			
3'''	19.1			
4'''	6.3			

같은 분자에 있는 두 caffeoyl기 동일 위치 chemical shift는 상호 바뀔 수 있음

¹인용된 데이터: Arch. Pharm. Res. 14(2), 114-117

2절 넘취로부터 Flaovne 성분의 분리

1. 실험방법

가. 추출 및 분획

강원도 평창군 고령지 농업연구소에서 채취하여 음건한 후 사용하였다. 건조된 넘취의 잎 2.0 kg을 5L 라운드 플라스크에 담아 MeOH에 넣고 heating mantle에 온도 $50 \pm 5^\circ\text{C}$ 로 5시간씩 3회 추출하였다. 얻은 추출물을 여과한 후 진공농축기에서 건조하여 평량한 결과 526g이었다. 이 추출물을 증류수에 현탁시킨 후 diethyl ether로 3회 용매분획하였다. 남은 수층을 다시 EtOAc로 3회 분획하였으며, 계속하여 동일한 방법으로 BuOH로 3회 분획하였다. 각 분획층들을 농축하여 diethyl ether 분획 25g, EtOAc 분획 63g, n-BuOH 분획 45g을 각각 얻었다.

나. 분리

EtOAc 분획물 13g을 silica gel (950g, $9 \times 40\text{cm}$, Merck, Art 7734, Germany) column chromatography에서 이동상 $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-H}_2\text{O}$ (65:35:10, lower phase)로 전개하였다. 용리액은 200 ml 플라스크에서 120 ml씩 수집하였다. 130개의 fraction을 TLC plate를 이용하여 체크하였다. Retention volume 720-1440ml 부근에서 관찰된 화합물을 재컬럼을 통하여 정제를 시도하였다. 즉 Sephadex LH-20 (211g, $3 \times 60\text{cm}$, Germany) column chromatography에서 반복하여 실시하여 화합물 1을 얻었다.

다. 물리화학적 데이터

화합물 1(그림 2): 황색의 분말, mp $328\text{-}330^\circ\text{C}$, $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ : 12.97 (1H, s, OH), 10.81 (1H, s, OH), 9.39 (1H, s, OH), 9.91 (1H, s, OH), 7.41 (1H, dd, $J=8.4, 2.1$ Hz, H-6'), 7.38 (1H, d, $J=2.1$ Hz, H-2'), 6.88 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H-5'), 6.66 (1H, s, H-3), 6.43 (1H, d, $J=1.8$ Hz, H-8), 6.18 (1H, d, $J=1.8$ Hz, H-6), $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 125 MHz) δ : 164.1 (C-2), 102.9 (C-3), 181.6 (C-4), 157.3 (C-5), 98.8 (C-5), 163.9 (C-6), 93.8 (C-8), 161.5 (C-9), 103.7 (C-10), 121.5 (C-1'), 113.4 (C-2'), 149.7 (C-3'), 145.7 (C-4'), 116.0 (C-5'), 119.0 (C-6')

2. 결과 및 고찰

화합물 **1**은 미황색 분말로 융점 328-330°C를 나타내었다. 화합물 **1**의 $^1\text{H-NMR}$ spectrum (그림 3) 에서는 케톤기와 수소결합을 하는 5-OH가 관찰되었으며, δ 6.66에서 H-3가 singlet peak를 나타내었으며, δ 6.18과 6.43에서 J 치가 1.8 Hz인 doublet인 피크가 각각 나타나는 사실로부터 H-6, H-8로 assign될 수 있었다. 또 δ 7.38에서 J 치가 2.1 Hz로서 doublet로 나타나는 사실에서 H-6'와 meta-coupling하는 H-2'에 의한 피크로 확인할 수 있었다. 한편 δ 6.88에서 나타난 피크는 J 치가 8.4 Hz로 나타나는 사실로부터 H-6'와 ortho-coupling하는 H-5'에 의한 피크로 assign할 수 있다. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum (그림 4)에서는 총 15개의 탄소 피크가 나타남으로부터 플라보노이드 화합물임을 알 수 있으며 DEPT spectrum에서 6개의 aromatic carbon signal을 관찰할 수 있었다. 이상의 NMR data와 여러 물리화학적 성상들을 문헌치와 비교하여 (그림 5-6) 화합물 **1**은 2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-4H-1-benzopyran-4-one인 luteolin으로 동정하였다.

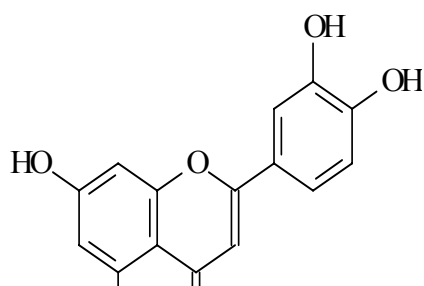


그림 2. 넘취로부터 분리된 luteolin의 구조

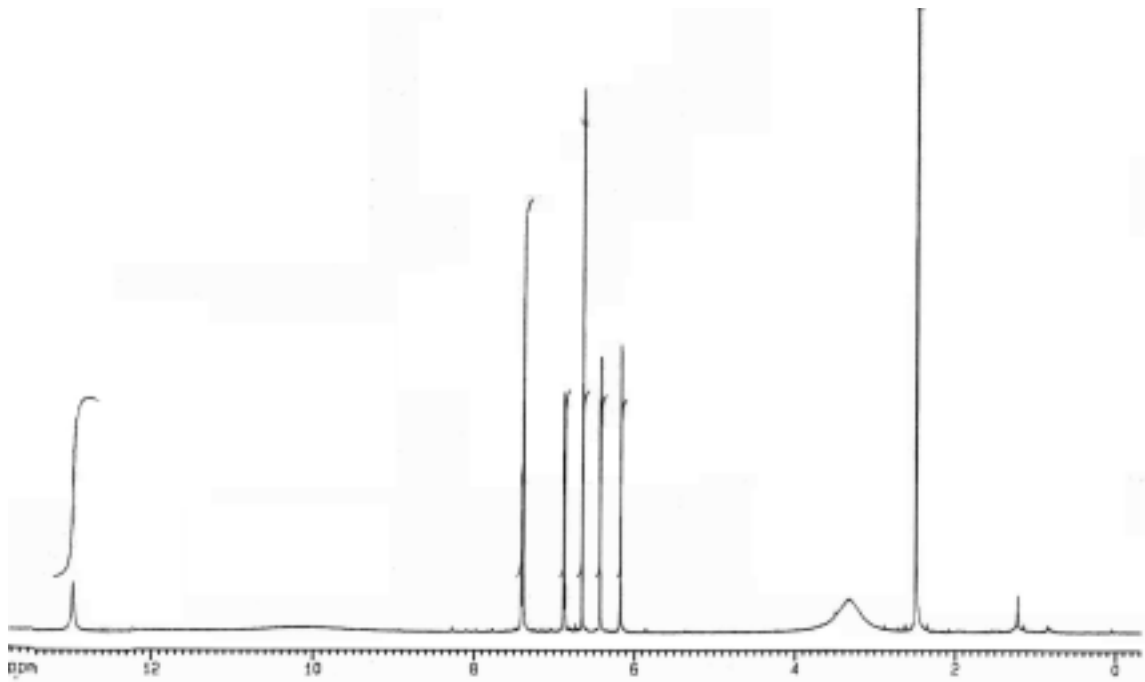


그림 3. 넘취로부터 분리된 luteolin의 ^1H -NMR 스펙트럼

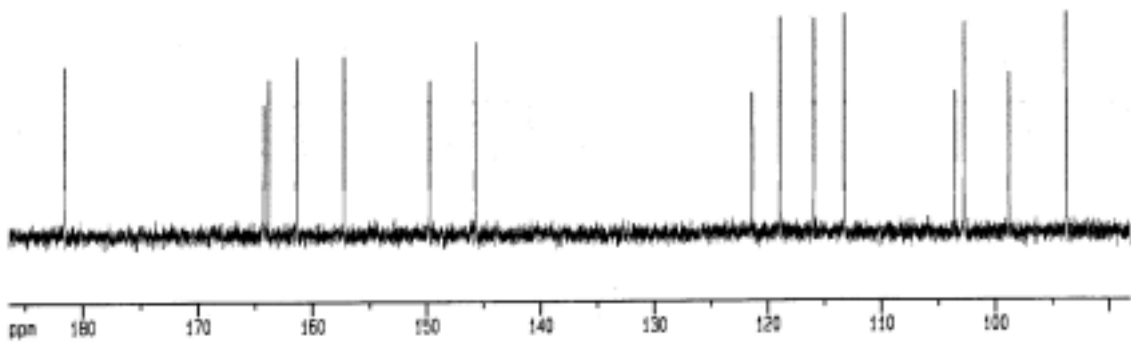


그림 4. 넘취로부터 분리된 luteolin의 ^{13}C -NMR 스펙트럼

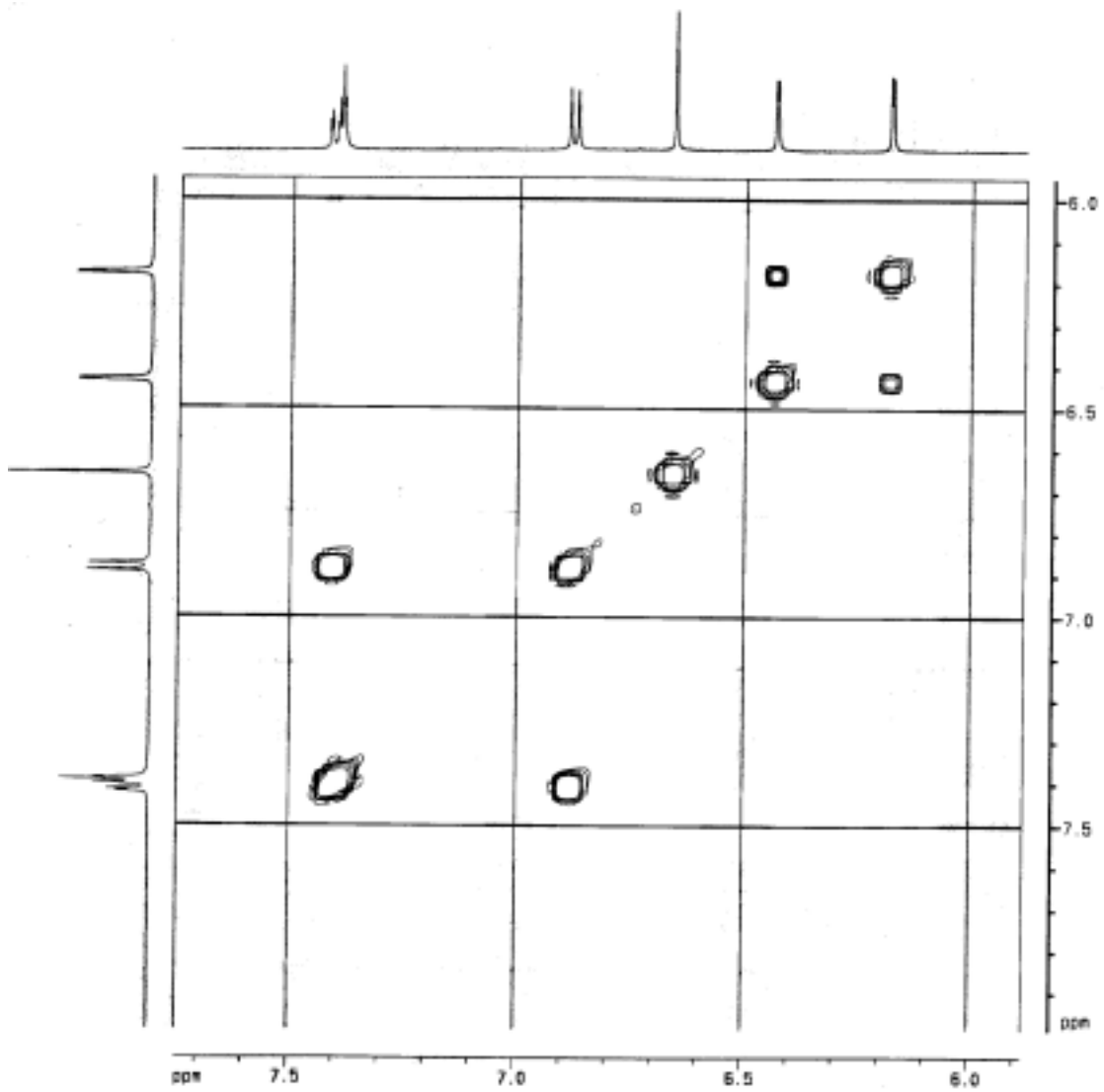


그림 5. 넘취로부터 분리된 luteolin의 ^1H - ^1H COSY NMR 스펙트럼

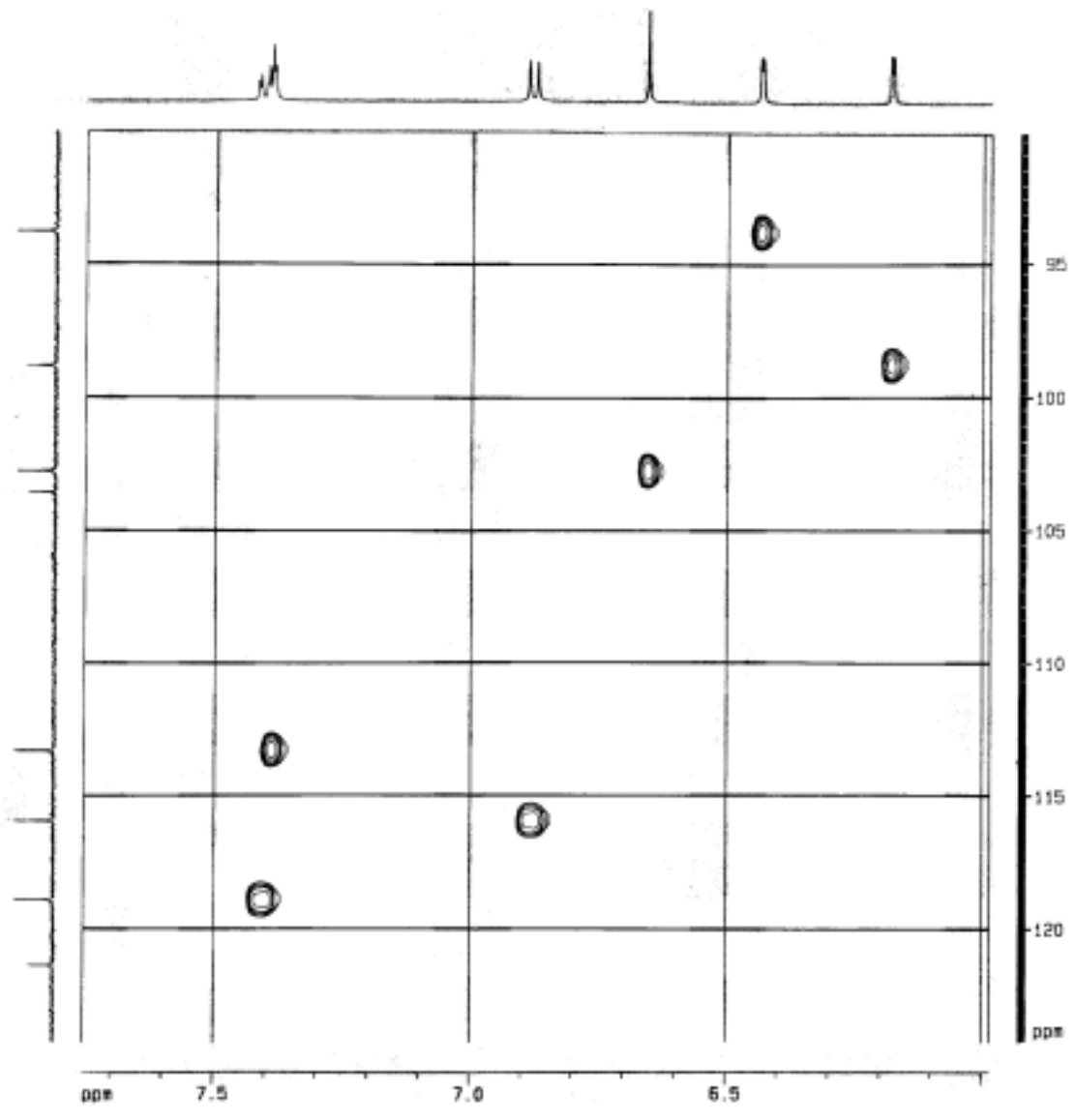


그림 6. 넘취로부터 분리된 luteolin의 ^1H - ^{13}C COSY NMR 스펙트럼

3절. 넘취로부터 테르페노이드 성분의 분리

1. 실험방법

넘취의 CHCl_3 분획 12 g을 n-hexane-ethylacetate (10:1)의 용매를 이용하여 silica gel (350 g, 660 cm, Merck, Art.No. 7734, Germany) column chromatography로 분리하였다. TLC 체크하여 모두 10개의 소분획으로 나눈 바 다음과 같다 : fraction 1 (fr. 1, 180 ml), fr. 2 (120 ml), fr. 3 (360 ml), fr. 4 (480 ml), fr. 5 (1000 ml), fr. 6 (540 ml), fr. 7 (240 ml), fr. 8 (240 ml), fr. 9 (300 ml), fr. 10 (180 ml), fr. 11 (600 ml). 여기서 fr. 1, fr. 3, 4를 같은 방법으로 반복하여 silica gel column chromatography로 전개하여 compound **1** (36 mg), **2** (50 mg) and **3** (53 mg)와 같은 무색의 오일을 얻었다. fr. 6, fr. 8 and fr. 11에 대한 반복된 column chromatography를 하여 compounds **4** (30 mg), **5** (80 mg), and **6** (32 mg)도 역시 분리되었다. Compounds **4-6**는 표품과의 NMR, IR data를 비교하여 각각 6-oxoeremophilanolide, intermedeol and β -sitosterol로 동정되었다. (그림 7-8)

2. 실험결과

가. 화합물 **1**의 분광분석치 및 구조

Compound **1**. Colorless oil, IR (KBr): ν_{\max} =3064 (=C-H), 2964 (C-H), 1644 cm^{-1} (C=C); $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 +DMSO- d_6) δ : 0.77 (3H \times 2, d, H-18,19), 0.79 (3H \times 2, d, J =4.1 Hz, H-16,17), 0.97-1.01 (6H, m, H-6,10,14), 1.04-1.08 (4H, m, H-8,12), 1.12-1.20 (2H, m, H-9), 1.33 (1H \times 2, m, H-7, 11), 1.39 (2H, m, H-5), 1.44 (1H, m, H-15), 2.08 (2H, m, H-4), 4.89 (1H, brs, H-20a), 4.90(1H, d, H-20b), 4.96 (1H, d, J =10.8, H-1a), 5.13 (1H, d, H-1b, J =17.6), 6.25 (1H, dd, J =10.8, 17.6); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3 +DMSO- d_6) δ : 20.5 (C-18,19), 23.3 (C-16,17), 24.9 (C-9), 25.3 (C-13), 26.1 (C-5), 32.3 (C-4), 33.1 (C-7,11), 37.4 (C-12), 37.8 (C-6), 37.9 (C-8, 10), 40.0 (C-14), 113.8 (C-20), 116.2 (C-1), 139.7 (C-2), 147.9 (C-3); EI-MS (70 eV) m/z (rel. int., %): 278 (M^+ , $[\text{C}_{20}\text{H}_{38}]^+$, 3), 137 (15), 125 (22), 109 (44), 95 (52), 82 (100).

나. 화합물 **2**의 분광분석치 및 구조

Compound **2**. Colorless oil, IR (KBr): ν_{\max} =3063 (=C-H), 2965 (C-H), 1644 cm^{-1} (C=C); $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 0.90 (3H, d, J =6.8 Hz, H-25), 0.95, 0.982 (each 3H, s, H-26,27,28), 1.03, 1.23 (each 3H, s, H-23, 24), 1.59 (1H, m, H-10), 1.64, 1.76 (each 3H, s,

H-29,30), 4.72, 4.75, 4.85, 4.97 (each 1H, brs, H-9,13,17,21); 5.34-5.36 (2H, m, H-2,3); ^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : methyls-16.7, 16.9, 20.9, 23.3 (CH_3 -25,26,27,28), 26.1 (C-23), 27.8 (C-24), 29.0 (C-29), 29.1 (C-30); 30.4, 30.5, 30.7, 35.4, 37.6, 39.2, 40.4, 40.6, 41.0; methine-38.7 (C-10), 49.1 (C-5); quaternary carbon-54.3 (C-4); olefins-108.8, 108.9, 112.3, 121.1, 124.9, 125.2, 136.1, 144.6, 150.6, 155.3 (olefinic carbons); HRFABMS: m/z 410.3891 (*calcd for* $\text{C}_{30}\text{H}_{50}$, 410.3915).

다. 화합물 3의 분광분석치 및 구조

Compound 3. Colorless oil, IR (KBr): ν_{max} =3066 (=C-H), 2967 (C-H), 1642 cm^{-1} (C=C); ^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3 +DMSO- d_6) δ : 1.61 (3H \times 2, s, H-18,19), 1.64 (3H, s, H-20), 1.69 (3H $_2$, s, H-16,17), 2.00 (2H \times 2, t, J=7.6, H-9,13), 2.07 (2H \times 2, t, J=7.6 Hz, H-8,12), 2.85 (2H, m, H-5), 5.05-5.15 (1H $_2$, t-like, H-10,14), 4.93 (1H, d, J=10.7, H-1a), 5.21 (1H, d, J=17.3 Hz, H-1b), 5.35 (1H, t, J=5.4 Hz, H-4), 6.38 (1H, dd, J=10.7, 17.3 Hz); ^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3 +DMSO- d_6) δ :12.3 (C-20), 16.7 (C-17), 18.3 (C-18,19), 26.3 (C-16), 27.0 (C-9), 27.9 (C-9,13), 40.3 (C-8,12), 114.1 (C-1), 122.7 (C-10), 123.0 (C-6), 124.9 (C-14), 130.4 (C-4), 132.6 (C-11), 134.3 (C-3,7,15), 142.2 (C-2); EI-MS (70 eV) m/z (rel. int., %): 272 (M^+ , $[\text{C}_{20}\text{H}_{32}]^+$, 2), 218 (37), 161 (61), 119 (75), 105 (91), 63 (100).

라. 6-oxoeremophilenolode와 intermedeol의 분광 분석치

1) 6-oxoeremophilenolide

IR ν_{max} (KBr) cm^{-1} : 2931 (aliphatic C-H), 1774 (α,β -unsaturated lactone), 1693 (α,β -unsaturated ketone), ^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 0.63 (3H, d, J=6.8 Hz, H-15), 1.13(3H, s, H-14), 1.21(1H, br s, H_a -3), 1.46 (1H, m, H_a -1), 1.53 (1H, m, H_b -3), 1.55 (2H, br s, H-2), 1.77 (1H, m, H_b -1) 1.94(3H, s, H-13), 2.23 (1H, dd, J=13.5, 3.9 Hz, H_a -9), 2.33 (1H, t, J=13.5 Hz, H_b -9), 3.12 (3H, s, OCH_3); ^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 25.7 (C-1), 20.7 (C-2), 30.3 (C-3), 30.6 (C-4), 54.5 (C-5), 203.2 (C-6), 132.3 (C-7), 107.5 (C-8), 37.3 (C-9), 37.7 (C-10), 152.1 (C-11), 170.5 (C-12), 9.5 (C-13), 13.7 (C-14), 16.9 (C-15), 51.2 (OCH_3); MS (70 eV) m/z (rel. int., %): 278.1 (13, M^+), 247.1 (33), 246.1 (31), 218 (14), 203.1 (15), 190.0 (43), 169.0 (100), 161.1 (25)

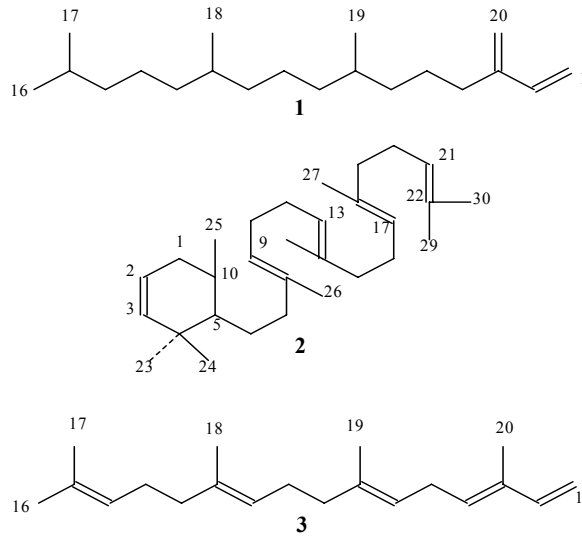


그림 7. 넘취에서 분리된 화합물 1 (spiciformisin a), 2 (spiciformisin b), 3 (monocyclosqualene)의 구조

2) Intermedeol

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 0.92 (3H, s, H-14), 1.05 (1H, m, H_a -9), 1.09 (3H, s, H-15), 1.28 (3H, m), 1.09 (3H, s, H-15), 1.25 (1H, m, H_a -1), 1.28 (1H, m, H-5), 1.31 (1H, m, H_b -9), 1.32 (1H, m, H_b -1), 1.34 (1H, m, H_b -3), 1.41 (1H, m, H_a -6), 1.48 (2H, m, H-2), 1.74 (3H, s, H-12), 1.69-1.77 (2H, m, H-8), 1.77(2H, m, H_a -3), 2.05 (1H, dd, $J=2.1$ and 13.3 Hz, H_b -6), 2.41 (1H, br s, H-7), 4.86 (1H, d, $J=1.4$ Hz, H_a -13), 4.90 (1H, d, $J=1.4$ Hz, H_b -13); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ : 41.7 (C-1), 20.5 (C-2), 43.9 (C-3), 72.4 (C-4), 49.5 (C-5), 23.1 (C-6), 39.7 (C-7), 23.9 (C-8), 40.7 (C-9), 35.7 (C-10), 147.2 (C-11), 23.2 (C-12), 111.2 (C-13), 18.8 (C-14), 1.09 (C-15)

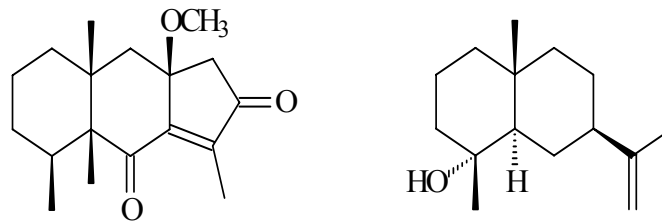


그림 8. 넘취로부터 분리된 6-eremophilanolide와 intermedeol의 구조

4절 누룩치로부터 성분의 분리

1. 실험방법

가. 추출 및 분획

음건한 누리대 1.8kg을 45°C에서 4시간 3회 MeOH로 추출한 후 농축하여 농축물 450 g을 얻었다. MeOH 농축물을 물 1L에 현탁하여 chloroform 800ml로 용매분획 하였고 같은 용매 분획을 5회 반복하여 분획물을 모아 농축한 결과 chloroform 농축물 70 g을 얻었다. 다음으로 수포화 BuOH로 분획하였으며 수포화 BuOH 800ml씩 5회 반복하여 수포화 BuOH 농축물 180 g을 얻었으며 나머지 물층을 농축하여 200 g의 물추출물을 수득하였다.

나. 사포닌의 분리

누룩치는 강원도 평창군 진부면의 진부시장에서 지상부 2kg을 구입하여 바람이 잘 통하는 음지에서 건조시켰다. 음건한 생약은 MeOH 500ml를 넣고 50°C에서 5시간 3회 추출하고 진공농축 하여 MeOH extract 50 g을 얻었다. 누룩치의 MeOH extract를 TLC한 결과는 아래 그림과 같다. 용매를 n-Butanol:EtOAc:H₂O=4:1:5(상층)과 Chloroform:MeOH:H₂O=65:35:10(하층)두 조건으로 하여 각각 전개시키고 10%-H₂SO₄를 분무시켜 가운을 컸을 때, 하나의 보라색 주 성분을 확인할 수 있었다. 누룩치 MeOH extract의 용이한 분리를 위하여 용매 분획을 실시하였으며 chloroform, n-butanol로 순차적인 진행을 하였다. 분획한 용액을 진공농축을 하였을 때 extract는 각각 chloroform 분획물 20 g, n-butanol 분획물 20 g을 얻을 수 있었고 분획의 나머지인 물층을 농축하였을 때 10 g의 엑기스를 얻을 수 있었다. 분획물을 n-Butanol:EtOAc:H₂O=4:1:5의 조건으로 TLC한 결과는 다음과 같다. MeOH extract에서 확인되었던 주성분이 n-butanol분획으로 이동한 것을 확인할 수 있으므로 n-BuOH 분획물에서 주성분의 분리를 시도하였다. n-Butanol extract 15 g을 silica gel 15 g에 코팅하여 로딩 sample을 제조하였다. Column에 사용한 silica gel 양은 150 g이었으며 전개용매는 Chloroform:MeOH:H₂O=65:35:10로 진행하면서 100ml씩 소분하였다. 주성분은 용출액이 약 700ml일 때 부터 나오기 시작하여 약 3600ml까지에 나타났다. 소분한 분획물은 6개의 분획으로 나누었으며 전개용매를 Chloroform:MeOH:H₂O=65:35:10으로 TLC한 결과는 위의 그림과 같다. 주성분이 나타난 fraction 3~5번을 혼합하여 재컬럼 크로마토그래피를 실시하였다. Sample은 약 5 g이었으며 이를 5 g의 silica gel에 코팅하여 silica gel 100 g을 고정상으로 전개용매 Chloroform:MeOH:H₂O=70:30:10으로 진행하였다. 80ml씩 소분하였을 때, 비교적

순수한 주성분이 용출액 1760 ml부터 나타나 3040 ml 까지 모을 수 있었다. 주성분의 용출액을 농축시킬 때 물이 과량 섞이면 흰색 침전이 생기는 것을 관찰 할 수 있었다. 그러나 침전물을 모아 물로 세척 후 건조하였을 때 황색의 필름이 생성되었으며 TLC 역시 불순하였다. 재결정이나 용매분획 등의 방법은 분리에 도움이 되지 않아 역상 컬럼을 걸기로 결정하였다. 전개용매는 MeOH:H₂O=7:3으로 하였으며 고정상은 YMC*GEL ODS-A(Lot No. 2927)를 사용하여 3cm 컬럼에 25cm 높이로 충전하였다. 20ml씩 소분할 때 노란색 색소가 약 40ml~120ml 사이에서 제거 되었으며 비교적 순수한 주성분이 440ml~840ml에서 나타났다. 주성분을 농축하여 앞에서 실시한 역상 조건과 같은 조건에서 재컬럼크로마토그래피를 실시하여 순수한 주성분 1950mg을 얻을 수 있었다. 주성분은 시료소량을 CHCl₃ 3~5방울에 녹이고 무수초산 1방울과 농황산 1방울을 넣었을 때 (Lieberman-Buchard 반응) 홍색→청색→짙은 녹색으로 용액이 변하여 triterpenoid 물질임을 예상할 수 있었다. 이물질의 mp는 258℃였고, UV spectrum의 결과로 triterpene에서 흔히 나타나는 C-28의 carboxyl carbon은 없는 것으로 확인되었다. BuOH농축물 90g은 전개용매 chloroform:methanol:H₂O = 7:3:1 (하층)을 사용하여 silica gel column chromatography를 하여 80ml씩 소분하였다 (580 g, 8×70cm, Merck, Art 7734, 독일). 소분한 4,080~13,600ml의 용액은 chloroform:methanol:Methanol:H₂O=65:35:10 (하층)의 전개용매로 TLC하고 10% 황산에서 발색 시켰을 때 R_f 0.37에서 자색으로 발색 되는 누리대 주성분이 확인되었으므로 이를 농축하여 동일한 조건으로 silica column chromatography를 실시하였다. 순상에서 얻어진 누리대 주성분 분취물을 reverse phase로 TLC하고 10%황산에서 발색한 결과 R_f 0.20과 R_f 0.12의 2개 물질이 관찰되었으므로 전개용매 Methanol:H₂O=7:3으로 C₁₈ column chromatography를 실시하였다 (95 g, 5×70 cm, YMC gel ODS). 전개용매 330~530 ml과 820~1,030ml에서 각각의 물질을 확인할 수 있었으며 530~820ml에서는 2개 물질의 혼합물이 관찰되었다. 전개용매 820~1,030 ml의 용액은 농축하여 Methanol:H₂O=7:3으로 C₁₈ column chromatography를 다시 실시하여 화합물 1(4g)을 얻을 수 있었다. 330~530 ml의 물질도 Methanol:H₂O=7:3으로 C₁₈ column chromatography를 실시하여 화합물 2(1g)을 분리하였다.

화합물 2: Mp 290-294, $[\alpha]_D^{23.1}$ -6.30(isopropyl alcohol, c=0.005), IR max(cm⁻¹): 3100-3500 (OH), 2919 (CH), 1449, 1388, 1357 1000-1100 (glycosidic C-O), 902, 851; ¹H-NMR (pyridine-d₅, 500 MHz): 1.63 (1H, m, H-5), 1.23 (3H, s, H-24), 1.23 (3H, s, H-25), 1.92 (1H, d, 8.5 Hz, H-8), 1.05 (3H, s, H-26), 3.80 (1H, dd, 3.6, 8.5 Hz, H-11), 5.50 (1H, d, 3.6 Hz, H-12), 1.34 (3H, s, H-27), 4.61 (1H, t-like, 16), 2.48 (1H, dd, 4.4, 13.8 Hz, H-18),

0.87 (3H, s, H-29), 0.98 (3H, s, H-30); FABMS(positive): m/z 997.6 [M+Na]⁺, FABMS(negative) m/z 973.3 [M-H]⁻ HRFABMS calcd C₄₉H₈₂O₁₉ 974.5452 observed C₄₉H₈₂O₁₉Na m/z 997.5348

다. 화합물 1과 2의 가수분해

신규 물질 2의 사포게닌을 얻고자 완전가수분해를 실시하였다. 화합물 2 500 mg을 10%-MeOH 80 ml에 용해시키고 염산이 5%가 되도록 가하여 80℃에서 3시간 동안 반응을 시켰다. 반응액은 서서히 식혀서 ethyl acetate 600 ml로 추출하였고 EtOAc 분획물은 증류수로 2회 세척하여 컬럼용 sample 75 mg을 준비하였다. EtOAc 분획물은 chloroform:methanol:H₂O=90:7:1 (하층)을 전개용매로 사용하여 Silica gel column chromatography를 실시하여 10ml씩 소분한 결과 70~290ml 사이에서 화합물 3이 확인되었고 농축하여 5mg의 물질을 분리하였다. 화합물 1도 사포게닌을 얻고자 화합물 2와 동일 조건으로 완전가수분해를 실시하였다. 가수분해물의 ethyl acetate로 추출물을 chloroform:methanol:H₂O=8:22:10 (하층)으로 TLC 하였을 때 화합물 2의 가수 분해물과 동일하게 UV 254nm 파장에서 검정색으로 나타나는 R_f0.46의 물질을 확인할 수 있었다. 화합물 1과 2의 산가수분해물에 대한 UV, IR, mp 등의 물리화학적 결과를 종합한 결과 이것은 동일한 물질로 확인되었다.

Saikogenin A(3,16,23,28-terahydroxyolean-11,13(18)-diene): mp 288-290C, [α]_D²³ 37.6 (c=0.85, ethanol), MS m/z (%): 472 (M⁺), ¹H-NMR (500 MHz, pyridine-*d*₅), ¹³C-NMR (125 MHz, pyridine-*d*₅): 문헌 (1, 2) 참조^{1,2)}

라. 세포의 배양 및 nitrite 양의 측정³⁾

Murine macrophage RAW 264.7 세포는 10% FBS (fetal bovine serum) 및 penicillin (100 μg/ml), streptomycin이 (100U/ml) 포함된 RPMI 배지에서 37℃ 5% CO₂ incubator에서 배양했다. Raw 264.7 세포를 5×10⁵/ml 농도로 24 well plate에 각각 분주한 후 다음날 여러 농도의 시료용액 10μl를 넣고 30분 후 1μg/ml LPS를 처리하고 24시간 배양하였다. Macrophage로부터 생성된 NO의 양은 Griess 시약을 이용하여 세포 배양액 중에 존재하는 NO²⁻의 형태로써 측정하였다. 즉 세포배양 상등액 100μl와 Griess시약[1% (w/v) sulfanilamide in 5% (v/v) phosphoric acid 와 0.1% (w/v) naphthylethylenediamine-HCl] 100 μl를 혼합하여 96 well plates에서 10분 동안 반응시킨 후 550nm에서 흡광도를 측정하였다.

마. PGE₂ and TNF- α assay

마크로파지 배지에서 NO, PGE₂ and TNF- α level은 manufacture's instruction에 따라 EIA kit를 이용하여 정량하였다.

2. 결과 및 고찰

부탄올 분획에서 분리된 두 사포닌은Liebermann-Burchard 반응에 양성이었고 Molisch test에서도 양성을 나타낸 바 사포닌 화합물로 추측되었다. 화합물 1에 대한 mp, $[\alpha]_D$, NMR spectra 및 FABMS spectrum의 측정에 의해 buddlejasaponin IV로 확인되었다. 이 화합물은 간보호효과를 나타내는 것으로 알려져 있다.⁴⁾

화합물 2의 IR spectrum에서 수산기를 3100-3500 cm⁻¹에서 배당체 결합을 1000-1100 cm⁻¹에서 각각 볼 수 있었다. ¹H-NMR spectrum (그림 13)에서 모두 7개의 tertiary methyl기가 singlet로 확인된 바 이것은 triterpene moiety가 oleanane계 triterpene임을 시사하며, 이 이외에 또 하나의 doublet methyl이 관찰된 바 이것은 당의 methyl에 의한 것으로 추정되었다. 화합물 2를 가수분해했을 때 당으로서 D-fucose, D-glucose가 각각 나타났다. 화합물 2의 ¹H-NMR 및 ¹³C-NMR spectrum (그림 14)에서는 3개의 당에 의한 anomeric proton이 각각 4.88 ($J=7.8$ Hz, D-fucose), 5.54 ($J=7.8$ Hz, D-glucose) 및 5.24 ($J=7.8$ Hz, D-glucose)에서 각각 나타났으며 ¹³C-NMR spectrum에서도 각각 104.0, 104.1 및 105.2 ppm에서 나타났으므로 3 당의 존재가 명확하다. 결합양식은 ¹H-NMR spectrum에서 당의 anomeric proton 피크의 J value로서 세 당이 모두 결합을 하고 있음이 나타났다. 이러한 당부는 buddlejasaponin IV(화합물 1)의 당부와 ¹³C-NMR data와 잘 일치하였으므로 Fig.9에서 나타낸 바와 같이 3-O-{-D-glucopyranosyl(1→2)-[-D-glucopyranosyl(1→3)]}- β -D-fucopyranoside로 결정될 수 있다.⁴⁾

이러한 당부에 기인한 산소-결합 탄소를 제외한 다른 산소결합 탄소를 보면 64.9 ppm, 82.9 ppm, 76.0 ppm, 66.3 ppm, 68.7 ppm에서 모두 5개의 탄소가 확인된다. 이중 76.0 ppm에 의한 것은 δ_H 3.20에서 나타난 methoxyl 수소와 인접해 있다는 것이 나타낸 바 수산기가 아닌 methoxyl의 치환에 의한 탄소 피크임이 확인되었다. Fig17에 나타낸 바와 같이 HMBC spectrum에서 H-11에 의한 δ_H 3.80 (dd, 3.6, 8.5 Hz), H-16에 의한 δ_H 4.61 (t, 8.7 Hz), H-24에 의한 δ_H 1.24 (3H, s) 및 δ_H 2.48 (dd, 4.4, 13.8 Hz)의 HMBC correlation으로부터 수산기가 C-23, 16, 28에 각각 결합하고 있으며 C 82.9는 C-3에 당이 결합한 결과 다른

산소-결합 탄소보다 저자장에서 나타난 것으로 확인되었다. 치환기의 절대배치를 결정하기 위해 NOESY experiment를 한 결과 Fig11에 제시한 바와 같이 11-methoxyl은 α -결합, 16-hydroxyl은 β -결합을 하고 있음이 확실하다. 그리고, 23-hydroxyl과 28-hydroxyl의 존재도 NOESY spectrum의 해석으로부터 명확하다. 흥미롭게도 화합물 2를 가수분해 하면 진정 sapogenin이 얻어지지 않고 saikogenin A가 얻어진다. 즉 문헌과의 대조에 의해 3,16,23,28-tetrahydroxyolean-11,13(18)-diene 구조로 확인된 바^{3,4)} 이것은 산에 의한 가수분해 중에 진정 사포게닌의 methoxyl기의 탈리로 이중결합 π -전자의 이동 및 연쇄적인 18-H의 탈리의 결과 생긴 artifact로 가정된다. 화합물 1의 가수분해시에도 분해되어 동일한 사포게닌인 saikogenin A가 생성된 것은 흥미로웠다.

화합물 2의 positive FAB-MS에서 m/z 997.6에서 $[M+Na]^+$ 에 의한 피크가 나타났으며, negative FABMS에서 m/z 973.3에서 $[M-H]^-$ 에 기인한 피크가 나타났으므로 이상의 사실을 뒷받침하였다. 특히 화합물 2의 positive FAB-MS에서 m/z 647.9에서 $[M-2\times\text{glucosyl}-H]^+$ 의 피크가, m/z 499.0에서 $[M-2\times\text{glucosyl}-H-\text{Fucosyl}]^+$ 에 의한 피크가 각각 관찰되어 당의 연쇄적인 분열도 함께 확인할 수 있었다. 뿐만 아니라HRFABMS에서 m/z 997.5348가 나타나 $C_{49}H_{82}O_{19}$ 의 분자식을 확인하였으므로 화합물 2는 3,16,23,28-tetrahydroxy-11-methoxyolean-12-ene-3-O- $\{-D\text{-glucopyranosyl}(1\rightarrow2)\}\text{-}\beta\text{-D-fucopyranoside}$ 임을 나타나 buddlejasaponin IVa로 확인되었다. 그림12에서 나타내었듯이 buddlejasaponin IV(1)는 LPS로 유도된 macrophage Raw264.7 cell에서 NO, PGE₂, TNF- α 를 강하게 저해하는 특성을 나타내었다.

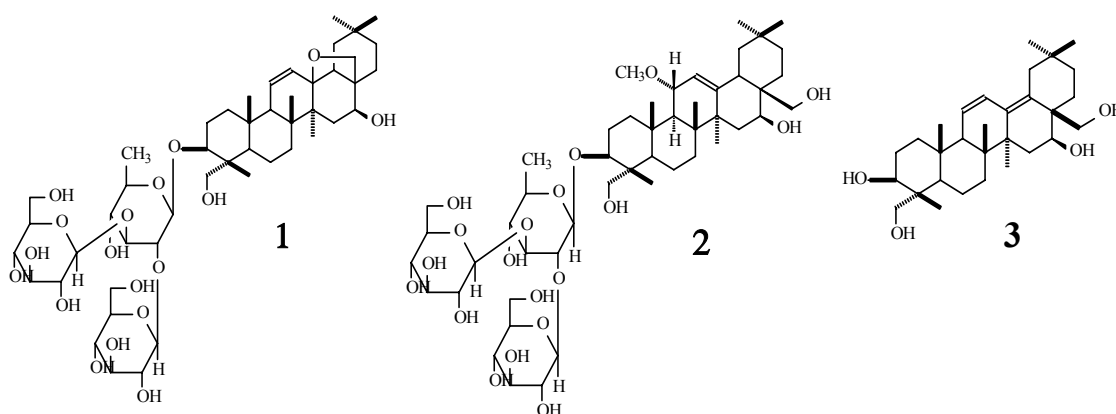


그림 9. 누룩치로부터 분리된 화합물 1-3의 구조

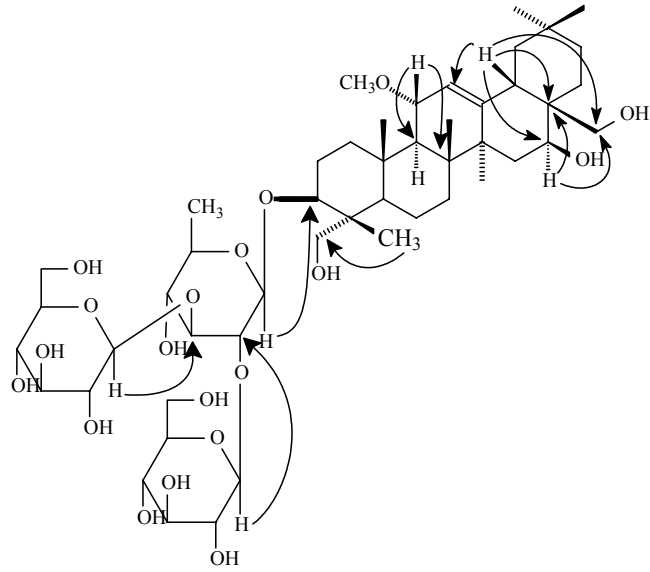


그림 10. buddlejasaponin IVa 화합물에 대한 HMBC correlation

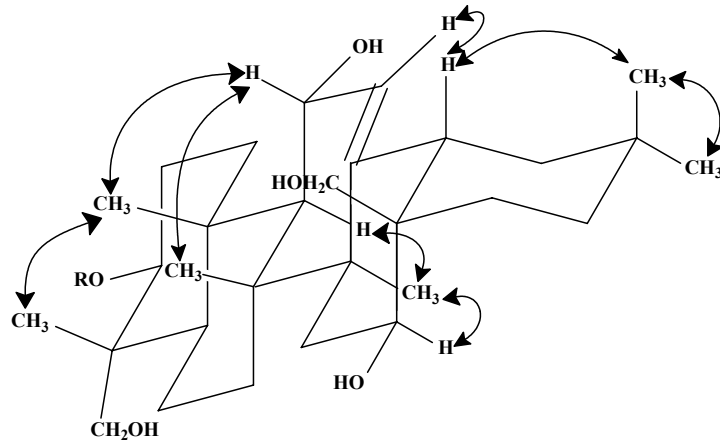


그림 11. Buddlejassaponin IVa의 selected NOESY correlation

표 3. Buddlejasaponin IV와 Buddlejasaponin IVa의 ¹³C-NMR data의 assignment

C	Buddleja- Saponin (1)	Buddlejasaponin IVa (2)	C	Buddleja- saponin (1)	Buddlejasaponin IVa (2)
1	39.0	40.1	25		17.1
2	26.2?	26.3	26	20.4	17.8
3	82.9	82.9	27	21.2	26.2
4	44.2	44.1	28	73.4	68.7
5	48.2	48.2	29	34.0	30.1
6	17.6?	19.1	30	24.2	18.4
7	32.0	33.2	Fuc-1	104.4	104.0
8	42.6	54.0	2	77.6	77.4
9	53.5	52.1	3	85.2	84.9
10	36.6	43.9	4	72.4	72.1
11	132.6	76.0	5	70.9	70.0
12	131.6	122.5	6	17.6	17.1
13	84.4	148.2	Glc-1	104.5	104.1
14	46.0	43.6	2	76.7	76.1
15	36.6	36.8	3	79.2	78.7
16	64.5	66.3	4	72.6	71.9
17	47.4	40.1	5	77.9	77.4
18	52.5	44.1	6	63.5	63.1
19	38.1	47.0	Glc-1''	105.6	105.2
20	32.0	31.1	2''	75.8	75.3
21	35.1	34.2	3''	78.8	78.4
22	26.2	26.0	4''	72.0	71.6
23	65.0	64.9	5''	78.9	78.4
24	13.2	13.2	6''	62.3	62.6

Ref Ring D/E of comp. 2: 23-hydroxylongispinogenin

Ring C/D1,3,11-trihydroxyolean-12-ene

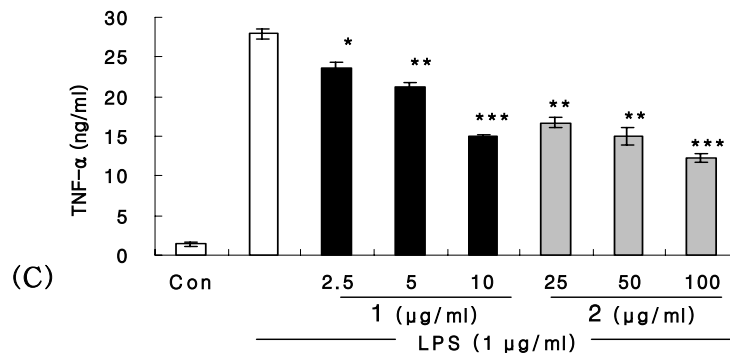
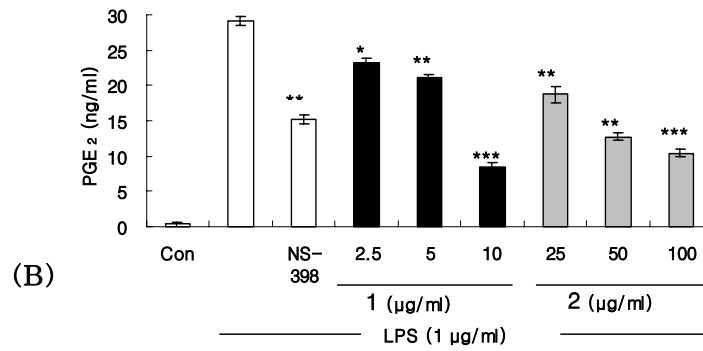
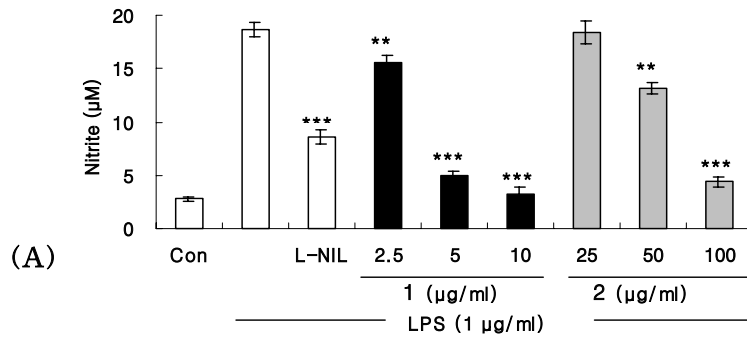


그림 12. LPS로 유도된 Raw 264.7 cell에서 Buddlejasaponin IV (1) and buddlejasaponin IVa (2)에 의한 nitrite (A), PGE₂ (B), and TNF-α (C) production에 대한 저해효과

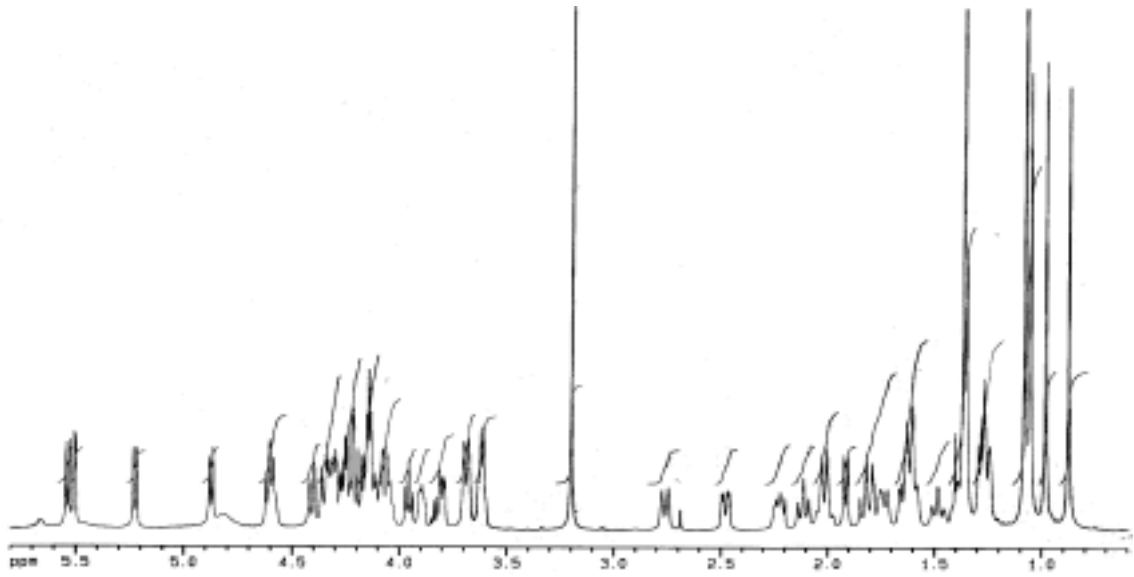


그림 13. Buddlejasaponin IVa의 ^1H -NMR 스펙트럼

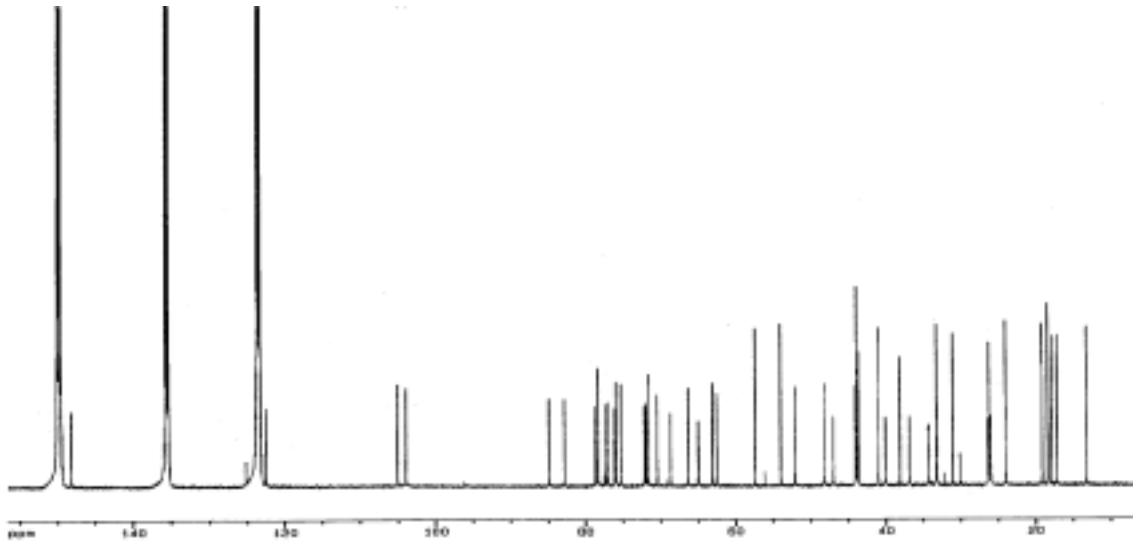


그림 14. Buddlejasaponin IVa의 ^{13}C -NMR 스펙트럼

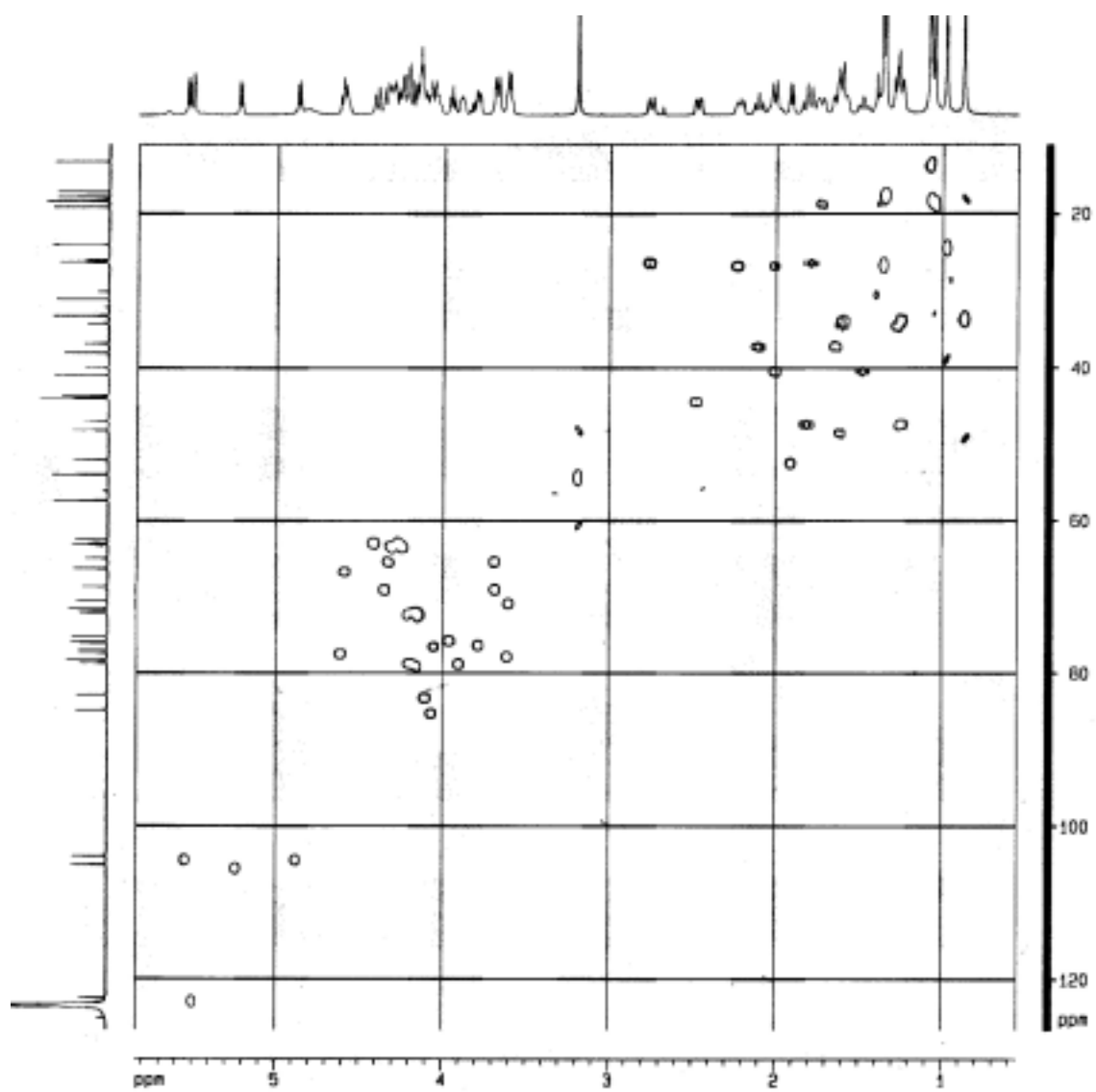


그림 15. Buddlejasaponin IVa의 ^1H - ^{13}H COSY NMR 스펙트럼

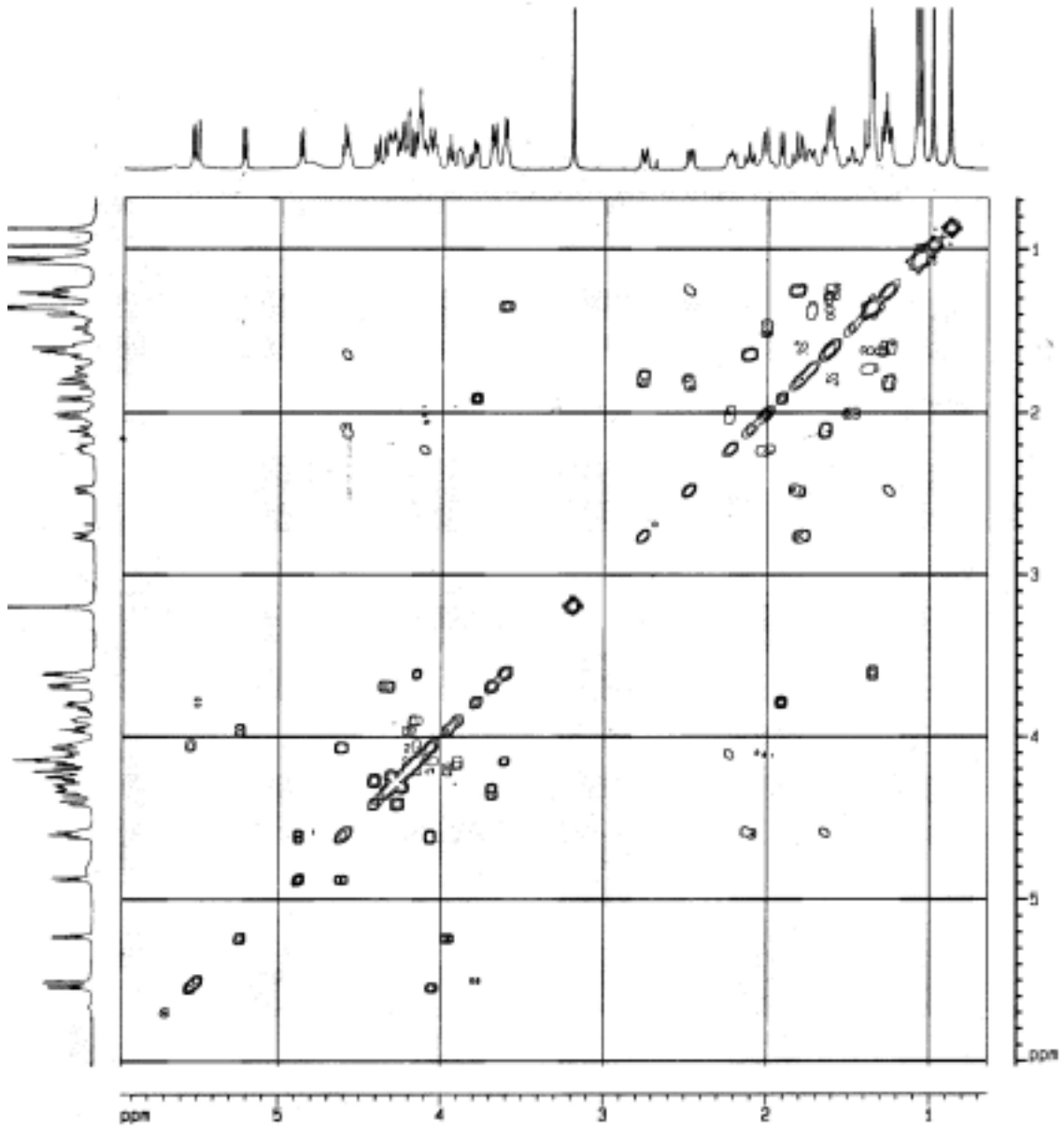


그림 16. Buddlejasaponin IVa의 ^1H - ^1H COSY NMR 스펙트럼

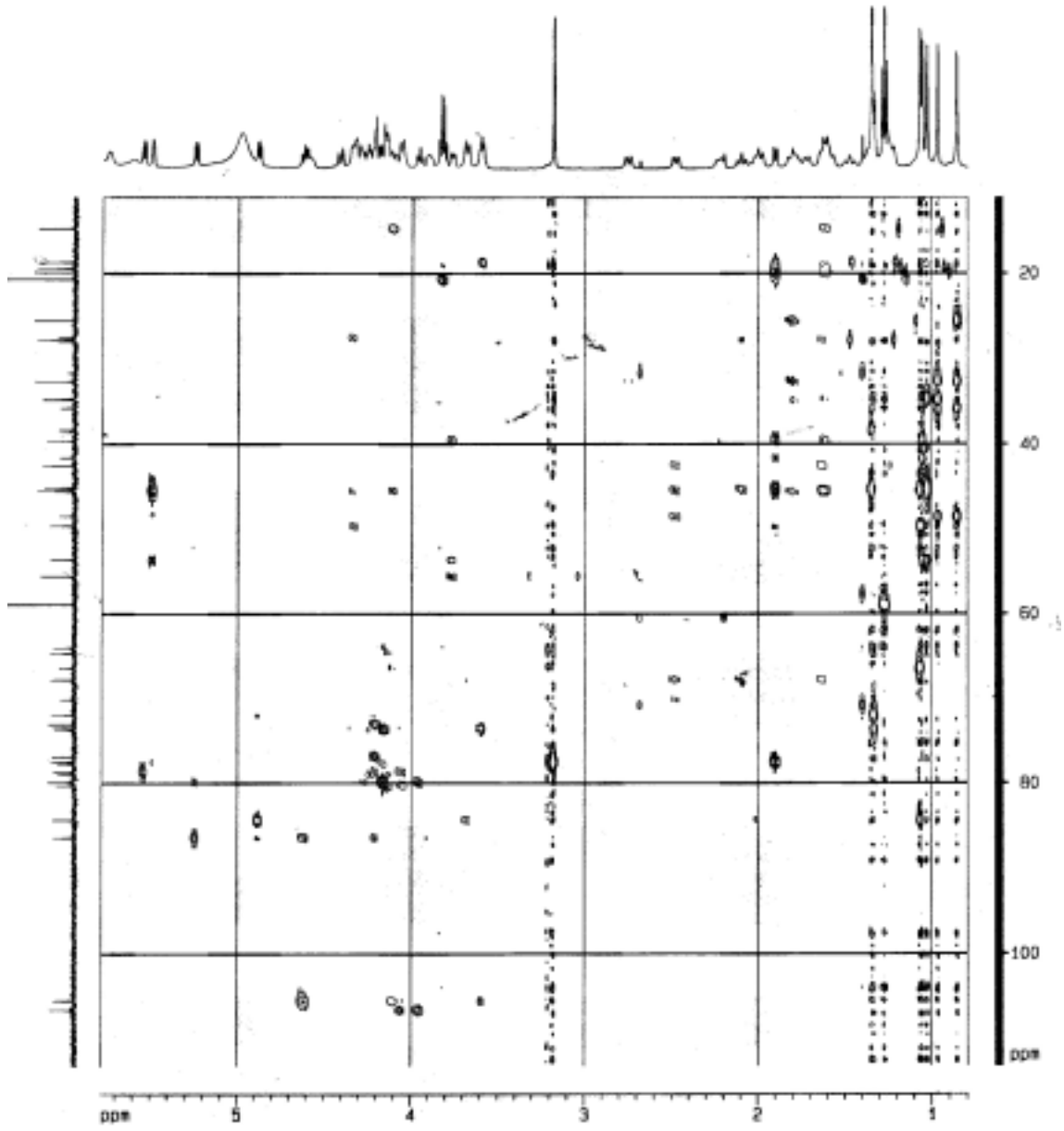


그림 17. Buddlejasaponin IVa의 HMBC 스펙트럼

5절 동물실험

1. 실험방법

가. 항고지혈 효과

1) 고콜레스테롤 식이

한국실험동물 개발사로부터 스프래그-둘리 (Sprague-Dawley)계 숫 흰쥐(120±5g)를 구입하여 일주일 동안 고형사료로 예비 사육 시켰다. 고지방식이의 조제는 표3과 같으며 식이와 물은 자유로이 6주간 섭취시켰고 마지막 1주일에는 념취의 추출물을 oral needle zonde를 사용하여 경구로 투여하였다. 사육실의 온도는 $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 습도는 $55 \pm 5\%$ 를 유지하며 명암은 12시간 주기로 조절하였다.

표 4. 고지방 식이의 조성

성 분	합 량 (%)
카제인(casein)	20.0
옥수수 기름(corn oil)	10.0
라드(lard)	12.0
녹말(starch)	46.75
셀룰로스(cellulose)	5.0
미네랄 혼합물(mineral mixture)	3.5
비타민 혼합물(vitamin mixture)	1.0
콜린 클로라이드(choline chloride)	0.2
DL-메티오닌(DL-methionine)	0.3
콜레스테롤(cholesterol)	1.0
콜린산(cholic acid)	0.25

2) 3,4-dicaffeoylquinic acid(DCQA)의 항고지혈효과 측정

고지방식을 한 Sprague-Dawley에 웅성 흰쥐에 념취의 MeOH 추출물, CHCl_3 분획, EtOAc 분획 및 BuOH 분획과 BuOH 분획에서 분리된 화합물인 DCQA를 용량별로 투여하였다. 콜레스테롤 저하효과를 측정하기 위하여 total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol을 측정 후 동맥경화 위험지수 A.I를 측정하였다.

나. 넘취 추출물 및 그 분리물질의 간보호효과 실험

1) Carbon tetrachloride 간 장애: 실험동물에 CCl_4 : olive oil(1;1 v/v)을 체중 100g당 0.2ml 씩 복강내에 투여하고 48시간 후에 채혈하여 원심분리 후 혈청을 취하여 transaminase(ALT, AST), γ -glutamyltransferase(γ -GT), sorbitol dehydrogenase (SDH), lactate dehydrogenase(LDH)의 활성을 측정하였다. 각시험 물질은 CCl_4 투여하기전 2주일 전에 10% Tween 80에 용해하여 경구투여하였다. 양성 대조약물로는 silymarin 100mg/kg 을 사용하였다.

2) D-galactosamine 간염 - 실험동물에 생리식염수로 용해시킨 D-galactosamine · HCl(GaIN)을 400mg/kg씩 복강내로 투여하고 24시간 경과후 채혈하여 원심분리후 혈청을 취하여 ALT, AST, γ -GT, SDH 및 LDH의 활성을 측정하였다. 각시험 물질은 GaIN 투여 하기전 2주일 전에 10% tween 80용액에 용해시켜 경구투여하였다. 양성 대조약물로는 silymarin 100mg/kg을 사용하였다.

3) 담즙울체 - 실험동물에 ANIT(α -naphthylisothiocyanate)를 olive oil에 현탁시켜 80mg/kg씩 경구투여 하였다. 각시험 물질은 ANIT 투여하기전 2주일전에 10% tween 80 용액에 용해시켜 경구 투여하였다. 양성 대조약물로는 ursodeoxycholic acid(이하 UDCA) 50mg/kg을 사용하였다. ANIT 투여 후 47시간 후 1시간 동안 담즙을 채취하여 담즙량을 산출하였으며, 48시간 후 채혈하여 혈청내 총 bilirubin량을 측정하였으며, 담즙중 담즙산량도 Irvin법에 따라 측정하였다.

4) 지방간 - 실험동물에 D,L-ethionine을 생리식염수에 녹여 200mg/kg씩 피하주사 하였다. 각 시험 물질은 ethionine 투여하기 전 2주일 전에 10% tween 80 용액에 용해시켜 경구투여 하였다. Ethionine 투여 24시간 경과후 에 간장을 적출하여 1.15% KCl 용액에 균질화 시킨후 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 얻은 상등액에서 간장내 총지질량은 Frings 방법으로 중성지방 및 총콜레스테롤량을 측정하였다. 양성 대조약물로는 methionine(이하 METH) 100mg/kg을 사용하였다.

5) 약물중독 - 실험동물에 phenobarbital(75mg/kg)을 4일간 전처리하고 acetaminophen (80mg/ml, NaOH로 pH 10.6으로 조정) 800mg/kg을 복강 내에 주사 하였다. 각 시험 물질

은 acetaminophen 투여하기 전 2주일 전에 10% tween 80 용액에 용해시켜 경구투여 하였다. Acetaminophen 투여 24시간 경과 후에 간장을 적출하였다. 양성 대조약물로 는 methionine 100mg/kg을 사용하였다.

다. 간손상의 측정

1) 혈청중 효소활성의 측정

간손상 지표의 효소로서 Aminotransferase(AST, ALT), Sorbitol dehydrogenase(SDH), Alkaline phosphatase(ALP), Lactate dehydrogenase(LDH)의 활성을 키트시약을 이용하여 측정하였다.

2) 간조직중 지질과산화의 함량 측정

Ohkawa등의 방법에 준하여 TBARS를 UV spectrophotometer에서 측정하고 표준곡선에서 그 함량을 간 조직 1g당 malondialdehyde nmole로 표시하였다

3) 간조직중 glutathione의 정량

Ellamn의 방법을 약간 변경하여 간 조직중의 glutathione을 정량하였다. non-protein-SH에서 cysteine을 제한 값을 glutathione의 양으로 하였다.

라. Phase I & II 효소의 활성 측정

Cytochrome P-450(Omura와 Sato등의 방법)⁵⁾, Cytochrome b5 함량(Omura와 Sato등의 방법을 약간 변경),⁵⁾ Aminopyrine demethylase의 활성(Nash등의 방법을 약간 변경),⁶⁾ Aniline hydroxylase의 활성(Bidlack등의 방법),⁷⁾ UDP-glucuronyltransferase의 활성(Reinke 등의 방법),⁸⁾ Sulfotransferase의 활성(Dawsen등의 방법), Glutathione S-transferase의 활성(Habig등의 방법),⁹⁾ γ -Glutamylcystein synthetase의 활성(Meister와 Richman의 방법),¹⁰⁾ Glutathione reductase 활성(Mize and Langdon의 방법)¹¹⁾ 문헌에 보고된 방법에 준하거나 또는 약간 변경하여 측정하였다.

마. 조직검사

간장을 적출하여 10% buffered neutral formalin에 24시간 고정 한 후 수세하고 60%에서

100% alcohol로 순차적으로 탈수하여 paraffin에 포매하고 block을 만든 다음 이 block을 rotary microtome을 사용하여 4 μ m의 두께로 조직 절편을 만들어 hematoxylin-eosin(HE)으로 염색한 후 광학현미경(10 x 40)으로 관찰하여 조직을 5등급(Mild: - : 0, \pm : 1, +: 2, Modulate: 3, Severe: 4)으로 표시하였다.

바. 진통작용 측정

- 1) Whittle 등(44)의 0.7% 초산에 의한 생쥐의 writhing syndrome 억제법으로 측정하였고 양성대조물질은 aminopyrine을 사용하였다.
- 2) Hot plate를 이용하여 온도를 52~55 $^{\circ}$ C로 일정하게 조절하여 생쥐가 열자극을 감지하여 발을 뺄거나 뛰는 반사작용을 보이기 시작하는 시간을 측정하였다.

2. 실험결과

가. 넘취 추출물과 성분의 고지혈증에 대한 효과

고지방식이한 실험쥐 군에 메탄올 추출물, 에테르 분획, 부틸알콜 분획 및 에틸아세테이트 분획 (250, 500 mg/kg)을 일주일에 걸쳐 매일 경구 투여하거나 또는 3,4-DCQA (10, 20mg/kg)을 복강 투여하였다. 24시간 뒤에 쥐를 잡아 혈청 콜레스테롤 양을 측정하고 동맥경화 지수를 계산하였다 (표 5). 총 콜레스테롤 농도 및 LDL-콜레스테롤의 함량은 정상군 보다 고지방식으로 사육한 실험군에서 현저히 증가되었으나 HDL-콜레스테롤의 함량에는 별다른 변화가 없었다. 고지방식이군에 넘취 추출물 또는 DCQA를 투여한 경우 대조군에 비하여 총 콜레스테롤 함량 및 LDL-콜레스테롤 함량이 감소되었으나 HDL-콜레스테롤 함량에는 큰 변화가 없었다.

나. 넘취 추출물의 진통효과

넘취 메탄올 추출물을 100, 250, 500mg/kg을 경구투여 하여하고 초산-생리식염수액을 복강내로 주사 하였을때 대조군에 비하여 발현시간 및 writhing 수가 250mg/kg의 투여에서는 통계적인 유의성이 없었으나, 250, 500mg/kg의 투여에서 유의성 있게 작용발현 시간이 연장 되었으며 writhing수도 유의성있게 억제하여 진통작용을 나타내었다. 한편, hot plate의 방법에서도 작용발

현 시간이 유의성 있게 연장되었다. 양성대조물질로 사용한 aminopyrine과 정도 및 용량의 차이는 있으나 유사한 진통 작용을 관찰하였다 (그림 18-19).

표 5. 넘취 추출물 및 DCQA의 혈청 콜레스테롤 저하 효과

실험군	투여량 (mg/kg)	콜레스테롤 (mg/dl)			A.I.
		Total	HDL	LDL	
Normal		91.2±3.77 (100)	19.6±1.15 (100)	27.4±4.10 (100)	3.63±0.21 (100)
Control	-	163.4±8.43 (0)	22.8±1.86 (116)	98.4±7.21 (0)	6.17±0.33 (0)
MeOH ext.	250	158.2±5.66 (7)	23.2±2.84 (118)	103.1±8.60 (-7)	5.83±0.43 (13)
	500	145.6±5.66 (25)	25.7±5.36 (131)	89.6±8.96 (1.2)	4.67±0.32 (59)
Ether fr.	250	161.9±4.53 (2)	20.9±1.99 (107)	106.4±8.43 (-11)	6.75±0.31 (-23)
	500	167.8±8.77 (-6)	23.2±3.12 (118)	99.2±7.20 (-1)	6.23±0.50 (-2)
BuOH	250	170.3±4.27 (-10)	21.8±4.21 (111)	113.1±6.48 (-21)	6.83±0.47 (-26)
	500	165.0±3.29 (-2)	24.1±3.67 (122)	110.8±5.55 (-18)	5.75±0.38 (17)
EtOAc fr.	250	146.2±5.89 (24)	23.2±2.84 (118)	90.6±3.89 (11)	5.30±0.40 (34)
	500	138.1±6.42 (35)	24.0±3.11 (122)	74.2±5.56 (34)	4.49±0.46 (66)
DCQA	10	150.6±3.11 (18)	21.9±4.12 (112)	100.3±8.75 (-3)	5.88±0.41 (11)
	20	123.8±5.49 (55)	22.6±3.19 (115)	65.2±5.66 (47)	4.48±0.30 (67)

수치는 평균 ±S.D.(n=8)이다. DCQA = 3,4-디카페오일퀴닌산. 총 콜레스테롤(total), LDL 및 동맥경화 지수 (A. I.)의 괄호 안의 값은 정상치에 대한 억제율 내지 저하율(%)의 평균 값을, HDL의 괄호안 값은 정상치에 대한 상승률(%)의 평균 값을 나타낸다.

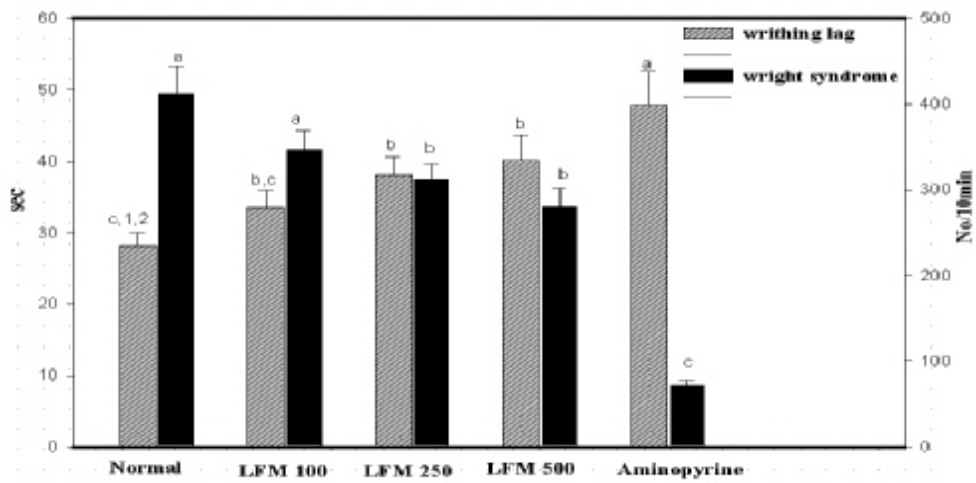


그림 18. 마우스를 이용한 acetic acid-induced writhing test에서 넘취 추출물의 진통효과. 수치는 평균 ± 표준편차 (n=10); 같은 문자를 가지는 데이터는 p<0.05에서 통계적으로 유의성이 없음

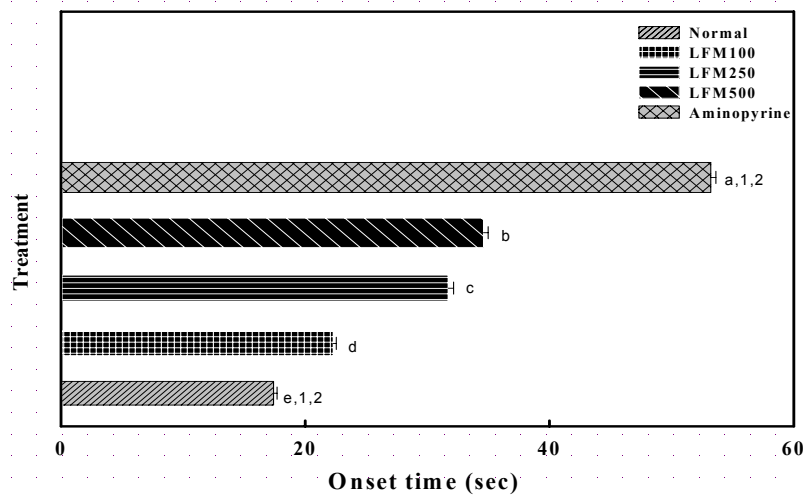


그림 19. 마우스를 이용한 hot-plate test에서 넘취 추출물의 진통효과. 수치는 평균 ± 표준편차 (n=10); 같은 문자를 가지는 데이터는 p<0.05에서 통계적으로 유의성이 없음

다. 녀취의 각 분획 및 성분의 전처리 후 사염화탄소에 의해 유도된 간독성에 미치는 영향

1) 혈중 생화학적 변동

녀취의 각분획 및 성분을 2주간 투여한 후 CCl₄를 투여하고서 혈중 간지표에 미치는 생화학적 변동을 관찰한 성적이 표 6, 7이다. 사염화탄소를 투여하므로서 현저히 증가되던 aminotransferase 및 sorbitol dehydrogenase, γ -glutamyltrnasferase, alkaline phosphatase와 lactate dehydrogenase의 활성이 녀취의 각분획 및 성분을 투여하므로서 methanol 추출물(250mg/kg) 및 ethylacetate 추출물(250mg/kg)의 투여에서 사염화탄소의 투여군에 비하여 현저히 억제 되었으며, 성분인 compound 1(10mg/kg)의 투여에서도 현저히 억제되었다. 한편 녀취의 chloroform(250mg/kg), butanol(250mg/kg) 분획 및 DCQA(5mg/kg)의 투여에서는 다소 감소되는 경향은 보였으나 통계적인 유의성이 없었다.

표 6. CCl₄로 유도된 간염 흰쥐에서 혈청 aminotransferase와 sorbitol dehydrogenase 활성에 대한 녀취 추출물, 분획물 및 그 성분의 효과

Treatment	Dose (mg/kg)	Activity		
		ALT(IU/L)	AST(IU/L)	SDH(mU/ml)
Normal		32.6±6.58 ^f	59.4±6.07 ^f	18.4±4.63 ^e
CCl ₄		98.6±7.49 ^a	194.9±20.7 ^a	65.3±7.49 ^a
CCl ₄ + LFM	250	58.5±6.99 ^d	147.9±14.3 ^c	32.5±3.80 ^c
LFC	250	85.2±5.43 ^b	179.3±16.4 ^{a,b}	58.9±4.22 ^{a,b}
LFE	250	53.5±6.43 ^d	100.2±11.3 ^d	28.3±3.06 ^{c,d}
LFB	250	91.6±5.55 ^{a,b}	189.2±20.0 ^a	62.3±4.11 ^a
Compound 1	5	69.1±3.89 ^c	160.3±12.3 ^{b,c}	52.7±3.08 ^b
	10	50.4±3.21 ^{d,e}	90.1±8.23 ^{d,e}	26.3±2.19 ^{c,d}
Silymarine	100	42.3±2.56 ^{e,f}	73.2±9.97 ^{e,f}	21.4±3.57 ^{d,e}

녀취와 silymarin을 경구적으로 2주간 연속하여 하루에 한번씩 경구투여한 후 사염화탄소로 복강투여를 1회 하였다. 사염화탄소 주사후 48시간에 채혈하였다. 수치는 평균 ± 표준편차; Duncan's new multiple range test로 통계분석하여 같은 문자를 가지는 데이터는 p<0.05에서 통계적으로 유의성이 없음을 나타냄

표 7. CCl₄로 유도된 간염 흰쥐에서 혈청 γ -glutamyltransferase, alkaline phosphatase (ALP)와 lactate dehydrogenase(LDH) 활성에 대한 념취 추출물, 분획물 및 그 성분의 효과

Treatment	Dose (mg/kg)	Activity		
		γ -GT(mU/ml)	ALT(K-Aunit)	LDH(Wroblewski unit)
Normal		26.3±3.07 ^{f,1,2}	39.1±2.66 ^e	25.4±2.10 ^e
CCl ₄		68.1±4.96 ^a	75.7±3.56 ^a	48.7±3.27 ^a
CCl ₄ +LFM	250	58.5±3.27 ^{bc}	65.8±4.55 ^{b,c}	38.4±3.25 ^c
LFC	250	63.2±4.44 ^{a,b}	73.1±2.97 ^a	42.9±2.09 ^{b,c}
LFE	250	54.1±3.21 ^{c,d}	60.5±3.22 ^c	32.6±3.12 ^d
LFB	250	66.2±4.39 ^a	73.1±4.11 ^a	44.6±3.23 ^{a,b}
Comp. 1	5	62.3±2.99 ^{a,b}	70.2±3.47 ^{a,b}	43.7±2.43 ^b
	10	50.2±4.20 ^{a,b}	5.21±4.29 ^d	30.2±3.37 ^{d,e}
Silimarine	100	34.7±2.94 ^d	46.3±4.25 ^d	28.5±2.41 ^{d,e}

수치는 평균 ± 표준편차(n=8); Duncan's new multiple range test로 통계분석하여 같은 문자를 가지는 데이터는 p<0.05에서 통계적으로 유의성이 없음을 나타냄

라. 념취의 각 분획 및 성분의 전처리 후 D-galactosamine에 의해 유도된 간독성에 미치는 영향

1) 혈중 생화학적 변동

위의 결과(표 6, 7)에서 념취의 각분획 및 성분의 간독성 경감을 확인할 목적으로 간독성 물질로 알려진 D-galactosamine에 의한 효과를 관찰한 성적이 표 8, 9이다. D-galactosamine의 투여로서 현저히 증가되던 aminotransferase 및 sorbitol dehydrogenase, γ -glutamyltransferase, alkaline phosphatase와 lactate dehydrogenase의 활성이 념취의 각분획 및 성분을 투여함으로써 methanol(250mg/kg) 및 ethylacetate(250mg/kg)의 투여에서 사염화탄소의 투여군에 비하여 현저히 억제 되었으며, 성분인 compound 1(10mg/kg)의 투여에서도 현저히 억제되었다. 한편 념취의 chloroform 분획(250mg/kg), butanol분획(250mg/kg) 분획 및 DCQA(5mg/kg)의 투여에서는 다소 감소되는 경향은 보였으나 통계적인 유의성이 없었다.

표 8. D-갈락토사민으로 유도된 간염 흰쥐에서 혈청 aminotransferase와 sorbitol dehydrogenase에 대한 넘취 추출물 전처리의 효과

Treatment	Dose (mg/kg)	Activity		
		ALT(IU/L)	AST(IU/L)	SDH(mU/ml)
Nomal		30.9±3.47 ^e	61.4±9.91 ^f	19.4±3.32 ^g
GaLN	400	793.2±34.3 ^a	957.9±30.2 ^a	198.1±12.2 ^a
GaLN+LFM	250	690.1±23.7 ^c	859.1±28.4 ^b	143.2±13.5 ^c
LFC	250	763.8±30.1 ^{b,c}	931.7±31.7 ^a	170.5±20.0 ^b
LFE	250	613.4±29.8 ^d	639.4±23.2 ^c	102.4±13.1 ^d
LFB	250	770.1±21.0 ^{a,b}	939.6±24.8 ^a	181.3±18.7 ^{a,b}
Comp. 1	5	759.9±19.5 ^b	917.8±33.4 ^a	169.2±12.4 ^b
	10	560.3±26.6 ^{d,e}	579.6±18.6 ^d	79.3±9.67 ^e
sil	100	437.9±17.9 ^{b,c}	530.0±20.5 ^e	52.9±8.45 ^f

넘취와 silymarin을 경구적으로 2주간 연속하여 하루에 한번씩 경구투여한 후 D-갈락토사민으로 복강투여를 1회 하였다. 사염화탄소 주사후 48시간에 채혈하였다. 수치는 평균 ± 표준편차; Duncan's new multiple range test로 통계분석하여 같은 문자를 가지는 데이터는 p<0.05에서 통계적으로 유의성이 없음을 나타냄

표 9. D-갈락토사민으로 유도된 간염 흰쥐에서 혈청 γ -glutamyltransferase, alkaline phosphatase, lactate dehydrogenase에 대한 넘취 추출물 전처리의 효과

Treatment	Dose (mg/kg)	Activity		
		γ -GT(mU/ml)	ALP(K-A unit)	LDH(Wroblewski unit)
Nomal		28.6±3.54 ^g	39.4±3.17 ^h	30.7±5.01 ^e
GaLN	400	116.7±4.27 ^a	147.6±10.3 ^a	97.6±6.77 ^{a,b}
GaLN+LFM	250	88.2±3.70 ^d	109.3±8.49 ^d	77.3±5.61 ^c
LFC	250	104.7±10.3 ^{b,c}	126.5±9.98 ^{b,c}	83.1±6.34 ^{b,c}
LFE	250	76.3±9.81 ^e	89.6±6.37 ^e	102.4±9.00 ^a
LFB	250	109.4±9.12 ^{a,b}	138.7±8.88 ^{a,b}	90.2±8.73 ^{a,b,c}
Comp. 1	5	93.0±7.63 ^{c,d}	120.2±10.2 ^{c,d}	89.5±5.47 ^{a,b,c}
	10	65.2±5.55 ^e	73.8±6.54 ^f	56.5±6.63 ^d
Sil.	100	41.6±3.56 ^f	58.7±4.63 ^g	35.7±3.26 ^e

수치는 평균 ± 표준편차; Duncan's new multiple range test로 통계분석하여 같은 문자를 가지는 데이터는 p<0.05에서 통계적으로 유의성이 없음을 나타냄

마. 녘취의 각 분획 및 성분의 전처리 후 담즙울체 모델에서의 영향

념취로부터 간독성의 경감에 미치는 생리활성 물질을 검색할 목적으로 사염화탄소 및 D-galactosamine에 의하여 유도되는 간독성의 경감이 녘취의 분획 중 methanol, ethylacetate 및 DCQA에 의한 작용임을 확인하고서 이들 분획 및 성분을 실험동물에 전처리하고 α -naphthylisothiocyanate (ANIT)로 담즙울체를 유도하고서 관찰한 성적이 표 10이다. ANIT의 투여로서 현저히 감소되던 bilirubin의 배설량 및 cholic acid의 양이 녘취의 분획 및 성분을 투여 하므로써 녘취 중의 DCQA, ethyl acetate 분획, methanol 추출물 순으로 증가되었으며 ANIT의 투여로서 현저히 증가되던 총 bilirubin의 양도 유사한 결과를 관찰할수 있었다.

한편 녘취의 분획인 ethyl acetate 분획물, methanol 추출물의 투여로서 ANIT에 의한 담즙울체는 개선되었으나 두물질의 투여에서 서로 간에는 통계적인 유의성이 없었다.

표 10. ANIT로 유도된 cholestasis에 대한 녘취 추출물 전처리의 효과

Treatment	Dose (mg/kg)	Bile Flow (ml/hr/100g b.wt)	Total Bilirubin (mg/dl)	Cholic Acid (mg/hr/100g b.wt)
Nomal		310.1±43.7 ^a	0.66±0.09 ^d	3.83±0.46 ^a
ANIT	80	27.4±3.21 ^c	8.79±1.28 ^a	0.32±0.08 ^d
ANIT+LFM	250	43.8±3.98 ^{b,c}	7.83±1.33 ^{a,b}	0.79±0.10 ^c
LFE	250	48.5±4.43 ^{b,c}	6.89±1.05 ^{b,c}	0.9±0.09 ^{b,c}
DCQA	10	59.3±4.97 ^{b,c}	6.16±0.58 ^c	1.09±0.21 ^{b,c}
UDCA	50	69.8±4.92 ^b	5.93±0.27 ^c	1.27±0.19 ^b

념취와 ursodeoxycholic acid(UDCA)을 경구적으로 2주간 연속하여 하루에 한번씩 경구투여 한 후 α -naphthylisothiocyanate(ANIT)으로 복강투여를 1회 하였다. 사염화탄소 주사후 24 시간에 채혈하였다. 수치는 평균 ± 표준편차; Duncan's new multiple range test로 통계분석하여 같은 문자를 가지는 데이터는 p<0.05에서 통계적으로 유의성이 없음을 나타냄

바. 녘취의 각 분획 및 성분의 전처리 후 지방간에서의 영향

념취로부터 실험실적 지방간에 미치는 영향을 관찰할 목적으로 D,L-ethionine을 투여하고서

지방간의 경감에 미치는 녀취의 분획중 methanol, ethylacetate 및 DCQA의 작용을 관찰한 성적이 표 11이다. DL-ethionine의 투여로서 현저히 증가되던 중성지방 및 총지질의 함량이 녀취의 분획 및 성분을 투여함으로써 감소하는 경향은 보였으며 총 cholesterol의 함량에도 유사한 결과를 관찰하였다.

표 11. DL-ethionine 전처리에 의한 지방간 흰쥐에 대한 녀취의 효과

Treatment	Dose (mg/kg)	Triglyceride (mg/dl)	Cholesterol (mg/dl)	Total lipid (mg/dl)
Nomal		3.78±0.18 ^c	9.13±1.24 ^c	36.7±19.2 ^f
ETH		43.9±4.27 ^a	14.5±3.36 ^a	468.1±21.4 ^a
ETH+LFM	250	37.5±3.12 ^b	11.9±2.11 ^{a,b,c}	365.2±12.9 ^b
LFE	250	25.9±3.97 ^c	12.3±1.98 ^{a,b,c}	259.6±10.4 ^c
DCQA	10	18.0±4.97 ^d	13.8±3.10 ^{a,b}	185.3±9.98 ^d
METH	100	12.7±2.11 ^d	9.93±2.48 ^{b,c}	139.2±8.89 ^c

녀취와 methionine(METH)을 경구적으로 2주간 연속하여 하루에 한번씩 경구투여한 후 DL-ethionine(ETH)으로 복강투여를 1회 하였다. 사염화탄소 주사후 24시간에 채혈하였다. 수치는 평균 ± 표준편차; Duncan's new multiple range test로 통계분석하여 같은 문자를 가지는 데이터는 p<0.05에서 통계적으로 유의성이 없음을 나타냄

사. UDP-glucuronyltransferase 및 sulfotransferase에 미치는 영향

녀취로부터 약물대사 효소계의 2상 반응인 포합반응에 미치는 영향을 관찰할 목적으로 녀취의 분획중 methanol, ethylacetate 및 DCQA를 실험동물에 전처리하고 acetaminophen을 복강내에 주사하고서 간 약물대사인 sulfotransferase 및 UDP-glucuronyltransferase의 활성을 관찰한 성적이 표 12다. 정상군에 비하여 acetaminophen을 투여한 군에서는 간 sulfotransferase 및 UDP-glucuronyltransferase의 활성이 증가되었으며 녀취의 methanol, ethylacetate 분획 및 DCQA를 각각 2주간 전처리 한군에서는 acetaminophen의 투여군보다 증가되는 경향은 보였으나 통계적인 유의성은 없었다.

표 12. 아세트아미노펜 유도 흰쥐에 대한 간 sulfortransferase and UDT-glucuronyl transferase 활성에 대한 넘취 전처리의 효과

Treatment	Dose (mg/kg)	Activity	
		UDPG*	Sulfortransferase**
Normal		5.30±1.55 ^{a,1,2)}	14.50±6.43 ^a
AA		6.87±2.29 ^a	18.7±5.54 ^a
AA + LFM	250	7.10±2.88 ^a	19.4±7.72 ^a
LFE	250	7.13±3.41 ^a	21.7±4.55 ^a
DCQA	10	7.45±3.33 ^a	23.1±6.26 ^a
METH	100	7.30±3.29 ^a	20.5±7.18 ^a

수치는 평균 ± 표준편차; Duncan's new multiple range test로 통계분석하여 같은 문자를 가지는 데이터는 p<0.05에서 통계적으로 유의성이 없음을 나타냄. *: p-aminophenol glucuronide nmole/mg protein/min, **: p-nitrophenol sulfate nmole/mg protein/min

아. Microsomal 대사 효소계에 미치는 영향

넘취의 추출물인 methanol, ethylacetate 및 DCQA를 실험동물에 2주간 전처리하고 acetaminophen을 복강내에 주사하였을 때 acetaminophen의 투여로서 현저히 증가된 간조직중의 지질과산화의 함량이 넘취의 전처리로 현저히 감소되는 기전을 구명할 목적으로 간 microsomal 대사효소계를 관찰한 성적이 표 13이다.

정상군에 비하여 acetaminophen을 투여한 군에서는 간 microsomal 효소인 cytochrome P450, b5, aniline hydroxylase 및 aminopyrine N-demethylase의 활성이 현저히 증가되었으며, 넘취의 methanol, ethylacetate 분획 및 DCQA를 각각 2주간 전처리 한군에서는 DCQA, ethylacetate, methanol 투여군의 순서로 현저히 억제되었다.

자. 간조직중 glutathione의 농도 및 glutathione 생성계에 미치는 영향

넘취의 추출물인 methanol, ethylacetate 및 DCQA를 실험동물에 2주간 전처리하고 acetaminophen을 복강내에 주사하였을 때 acetaminophen의 투여로서 현저히 감소되던 glutathine S-transferase의 활성이 넘취의 전처리로 증가되는 기전을 추구할 목적으로 간조직중의 glutathione의 농도 및 glutathione의 생성계에 미치는 영향을 관찰한 성적이 표 14이다. 정상 쥐에 acetaminophen 투여함으로써 정상군에 비하여 현저히 억제되던 간조직중의 glutathione의

농도와 glutathione reductase의 활성이 념취의 methanol, ethylacetate 분획 및 DCQA를 각각 2주간 전처리한 군에서는 DCQA, ethylacetate, methanol 투여군의 순서로 현저히 증가되었으며, Ψ -glutamylcysteine synthetase의 활성은 acetaminophen의 투여로서 억제되었으나 념취의 전처리로서는 별다른 영향이 없었다.

표 13. 아세트아미노펜 유도 흰쥐에서 간 microsomal enzyme system에 대한 념취 전처리의 효과

Treatment	Dose (mg/kg)	Activity			
		Cyto p450*	Cyto b5*	AH**	AD***
Normal		1.20±0.09 ^{f1,2)}	0.33±0.03 ^f	1.58±0.17 ^d	3.86±0.33 ^d
AA	800	2.93±0.11 ^a	1.62±0.10 ^a	2.80±0.13 ^a	9.26±0.58 ^b
AA+LFM	250	2.29±0.12 ^b	1.23±0.03 ^b	2.19±0.11 ^b	7.27±0.39 ^b
LFE	250	1.87±0.06 ^c	0.99±0.07 ^c	1.96±0.14 ^{b,c}	6.94±0.29 ^b
DCQA	10	1.68±0.08 ^d	0.64±0.05 ^d	1.82±0.13 ^{c,d}	5.63±0.42 ^c
METH	100	1.47±0.05 ^e	0.53±0.04 ^e	1.70±0.09 ^d	4.45±0.42 ^d

수치는 평균 ± 표준편차; Duncan's new multiple range test로 통계분석하여 같은 문자를 가지는 데이터는 p<0.05에서 통계적으로 유의성이 없음을 나타냄. *: nmole/mg protein, **: Aniline hydroxylase: p-aminophenol nmole/mg protein/min, ***: Aminoprine N-demethylase: HCHO nmole/mg protein/min

표 14. 아세트아미노펜 유도 흰쥐에서 간 glutathione cocentration and glutathione biosynthesis enzyme activity에 대한 념취 전처리의 효과

Treatment	Dose (mg/kg)	Content	Activity	
			Gutathione*	GR**
Normal		5.41±0.64 ^{a,1,2)}	31.2±3.13 ^a	15.37±2.67 ^a
AA		2.48±0.22 ^d	16.7±1.50 ^e	8.64±0.48 ^c
AA+LFM	250	2.93±0.29 ^d	21.1±2.11 ^{c,d}	8.82±0.61 ^c
LFE	250	3.88±0.39 ^c	24.3±2.50 ^{b,c}	8.92±0.77 ^c
DCQA	10	4.26±0.40 ^{b,c}	26.1±1.98 ^b	9.02±0.98 ^c
METH	100	5.01±0.55 ^{a,b}	18.3±1.54 ^{d,c}	12.21±1.92 ^b

수치는 평균 ± 표준편차; Duncan's new multiple range test로 통계분석하여 같은 문자를 가지는 데이터는 p<0.05에서 통계적으로 유의성이 없음을 나타냄. * μ mole/g of tissue, **Glutathione reductase: glutathione nmole/mg protein/min, *** Ψ -Glutamylcysteine synthetase: Pi nmole/mg protein.min

차. 조직학적으로 간조직에 미치는 영향

넙취의 methanol 추출물, ethylacetate 분획물 및 DCQA를 실험동물에 2주간 전처리하고 acetaminophen을 복강내에 주사하였을 때 간조직의 변화를 관찰한 성적이 표 15이다. Acetaminophen을 투여하므로써 전예에서 중심소엽, 지방의 축적 및 소엽에서의 병변을 관찰할 수 있었으며(total score 4~5), 넙취의 methanol 분획을 전처리하고 acetaminophen을 투여함으로써 total score가 2~4로 ethyl acetate 분획을 투여하므로써 total score가 2~3으로 감소되었으며 이의 성분인 DCQA를 실험동물에 전처리하고 acetaminophen을 복강내에 주사하였을때는 total score가 2로 현저히 감소하였다.

표 15. 아세트아미노펜으로 유도된 간염 흰쥐에서 넙취 추출물의 처리에 따른 Histopathological score

Treatment	Dose (mg/kg)	case	Centrilobular Degen.			Lubular Acidophilic Degen.			Fatty Change		Total	Score
			mild	mod	sev	mild	mod	sev	mild	mod		
Normal		1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
		2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
		3	-	-	-	-	-	-	+	-	-	1
		4	+	-	-	-	-	-	-	-	-	1
		5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
AA		1	-	+	-	-	-	-	-	±	-	5
		2	±	-	-	+	-	-	+	-	-	4
		3	-	-	±	-	±	-	-	-	-	4
		4	-	-	+	-	-	-	+	-	-	5
		5	-	+	-	+	-	-	-	-	-	4
AA+LFM	250	1	-	-	-	+	-	-	±	-	-	4
		2	±	-	-	±	-	-	+	-	-	3
		3	+	-	-	-	-	-	-	±	-	2
		4	+	-	-	-	±	-	+	-	-	3
		5	+	-	-	+	-	-	+	-	-	4
LFE	250	1	-	-	-	+	-	-	±	-	-	3
		2	+	-	-	±	-	-	-	-	-	2
		3	+	-	-	+	-	-	±	-	-	3
		4	-	-	-	+	-	-	+	-	-	3
		5	+	-	-	-	-	-	±	-	-	2
DCQA	10	1	-	-	-	+	-	-	-	-	-	2
		2	+	-	-	+	-	-	±	-	-	3
		3	±	-	-	-	-	-	+	-	-	2
		4	-	-	-	±	-	-	+	-	-	2
		5	+	-	-	-	±	-	±	-	-	2
METH	100	1	±	-	-	-	-	-	+	-	-	2
		2	±	-	-	±	-	-	+	-	-	2
		3	-	-	-	-	-	-	+	-	-	1
		4	-	-	-	±	-	-	+	-	-	1
		5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0

3. 고찰

넙취의 각분획 및 ethylacetate의 성분인 3,4-dicaffeoyl quinic acid(DCQA)를 전처리하고 사염화탄소, D-galactosamine 및 α -naphthylisothiocyanate(ANIT)로 담즙울체를 유도한 실험에서 넙취의 분획인 ethylacetate, methanol 및 DCQA의 투여로서 간보호작용을 관찰하였으며, D,L-ethionine로 유발한 지방간에서도 유의성 있는 효과를 관찰하였다. 넙취의 분획중 methanol, ethylacetate 및 DCQA를 실험동물에 전처리하고 acetaminophen을 복강내에 주사하고서 간조직중의 지질과산화 및 microsomal 효소계는 acetaminophen의 투여로서 현저히 증가되던 것이 감소되었다. 한편 glutathione S-transferase, glutathione reductase 및 간조직중의 glutathione의 농도는 acetaminophen의 투여로서 감소되던 것이 넙취 methanol, ethylacetate 및 DCQA를 실험동물에 전처리하므로써 증가되었다. UDP-glucuronyltransferase, sulfotransferase 및 γ -glutamylcysteine synthetase의 활성은 acetaminophen의 투여로서 증감되었으나 넙취의 전처리로서는 별다른 영향이 없었다.

Acetaminophen을 투여함으로써 병리학적으로 조직의 변화가 total score가 4~5인데 비해 넙취의 methanol 분획, ethyl acetate 및 DCQA의 전처리로 total score(2~3)가 현저히 억제하였다.

이상의 실험 성적을 종합하여 볼 때 넙취의 생리활성 물질인 DCQA는 glutathione을 내인성 물질로하여 해독작용에 관여하는 효소인 glutathione S-transferase와 glutathione의 환원계 효소인 glutathione reductase의 활성이 증가되어 acetaminophen의 대사를 촉진시킴으로서, 이에 의하여 유도된 간독성을 예방할 수 있을 것으로 생각되며, 이와같은 DCQA의 작용이 넙취의 해독작용과 관련이 있을 것으로 사료되어진다.

6절. 넙취 및 누룩치의 가공

1. 서론

강원도의 각 지역을 비롯하여 특히 오대산 지역에서 생산되는 넙취와 누룩치는 그 향이 독특하여 일반인들에게 식용으로 이용하기에는 어려운 자원 식물로서 어려서부터 그 맛을 본 사람을 제외하고는 기호성을 기대하기 어려운 식물이다. 이제는 지방 소비자가 많아져서 자연산 자원만으로는 소비량을 충족할 수 없어서 고려지 연구소에서 재배방법을 개발하여 평창지역에서는 인공 포장에서 재배하여 수익을 올리고 있는 작목반도 있을 정도이다.

이 자원이 다른 지역에서도 생산 되고 있는데 오대산을 제외한 대부분의 지역의 자원들은 거부감을 발생하는 향이 거의 없는 것으로 알려져서 오대산 지역의 주민들은 그러한 무취의 누룩치에 대하여 오히려 거부감을 느낀다고 한다. 이번에 연구하는 자원은 오대산 자원으로 오대산 인근 지역의 오래된 주민들은 생 재료를 전통적으로 장류와 함께 적당히 먹는 것을 가장 선호하고 있으나 신세대에 속하는 사람들에게는 누구나 호감을 가지기를 거부하고 있는 듯 하다.

이러한 이유로 이것을 가공하여 제품화 하는 것은 초기 단계부터 어려운 일이다. 우선 연구 기간이 생 자원의 경우 3주 정도내에 해결하여야 하는 수확 기간과 맛 물려 기간이 짧고, 가열, 건조, 데치기등의 공정으로 저장성을 가지며 가공하기에는 향이 없어져서, 기존 대량 소비대상인 생산 지역 인근 주민들과 같은 소비자들 에게는 외면당하기 쉬운 어려운 단점이 있다.

그러나 앞으로 자신의 건강을 생각하는 노인 인구의 증가로 이러한 자원은 소비처가 꾸준하게 늘어날 전망이므로 어떤 형태로는 저장성이 좋고 소지자가 선호하는 제품을 제조하는 기술이 개발 되어야 지역 재배 농업인들에게 수익성을 도모하고 아울러 지역 경제활성화, 주민 이동의 속도를 억제하는데 기여할 것으로 사료된다.

2. 실험방법

재료를 어떤 제품의 제조에 어떻게 이용할 것인가를 고려하기 위하여 우선 분말화와 액즙을 제조하여 다음 단계의 제품화에 이용하고자 하였다. 생 재료는 쉽게 공기중에서 변화하고, 변색반응이 진행하므로 자연상태에서 생 재료의 이러한 성분의 변화와 의 성분 변화를 억제하는 것이 우선적인 수단이다.

생 재료의 쉽게 갈변하는 성질을 없애기 위하여 잘 씻고 즉시 삶아서 제품을 제조하기 위하여 즙을 만든다. 가열을 한 생 재료는 그 향기 성분이 휘발되어 냄새는 많이 줄어들 단점도 있으나 실온에서 4 시간 경과하여도 변색은 쉽게 일어나지 않는다. 누룩취 분말은 삶은 재료를 열풍 건조하여 분쇄기로 분쇄하여 분말화 한 것으로 케익 과 환 및 정제품을 만드는데 사용 하고자 하였다.



그림 1. 넘취-누룩치의 분쇄 즙

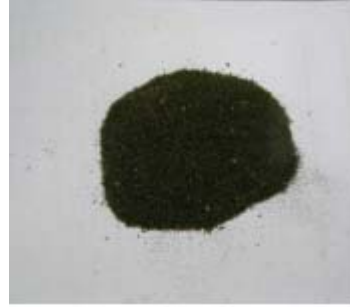


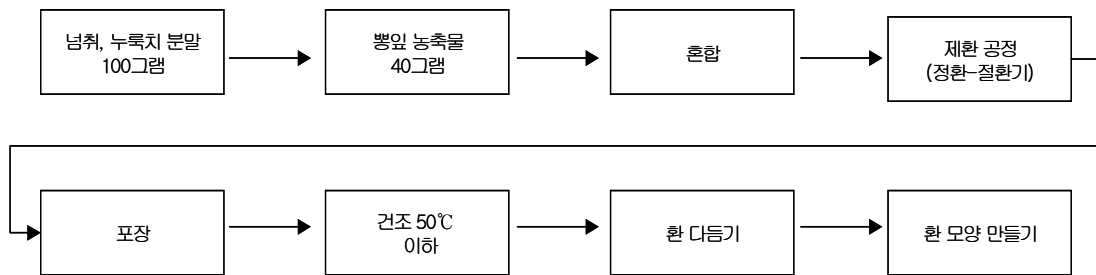
그림 2. 넘취 및 누룩치의 분말 모양

가. 환(丸) 제품

재료를 50℃ 의 열풍 건조기 중에서 48 시간 건조하여 분말화 한다.

이 재료 분말은 자체로 점도가 없어 환을 제조하기 곤란하므로 점질성 물질로 혼합하여 제환 공정에 임한다. 점질성 재료는 여러 가지가 있으나 지방에서 쉽게 구할 수 있고 생리 활성 기능을 가진 원료중에서 뽕잎의 물 추출물을 농축한 것을 이용하고자 하였다.

이 뽕잎 농축물은 인제군 기린면 기린 농협 제품을 사용하였다. 점질성 물질로 뽕잎 농축물(brix 65도 이상)외에 다양한 재료로 부터 얻을 수도 있다. 이 공정은 아래의 그림과 같다.



Scheme 1. 환 제품 제조 공정

나. 정제(錠劑) 제품

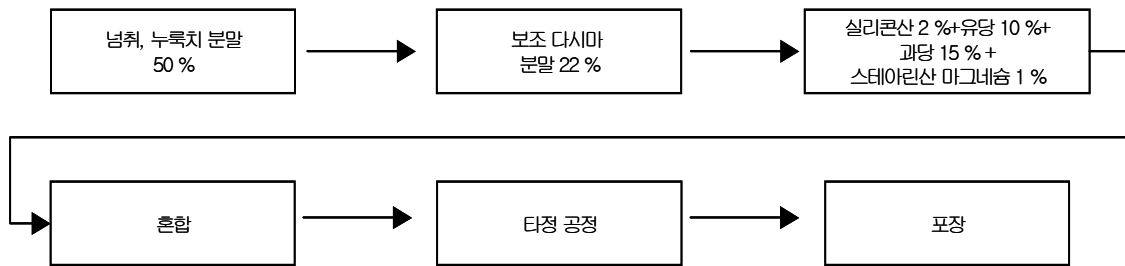
재료의 분말을 아래 배합비로 정 제품 부재료와 함께 혼합하여 아래와 같이 제조한다.

정제는 재료 분말 자체로 제조할 수 없으므로 부재료와 함께 혼합하여 타정기에서 제조한다.

1) 배합비

분말 (50 %) + 보조 다시마 분말(22 %) + 실리콘산 (2 %) + 유당(10 %) +과당 (15 %) + 스테아린산 마그네슘(1 %) 을 분말 혼합기에서 혼합하여 타정기에서 타정공정을 실시하여 정제를 얻는다.

배합비중다시마 분말은 맛을 개선하기 위하여 첨가하고 그 외 다른 부재료는 타정용으로 건조 상태에서 결착을 유도하기 위하여 사용하는 보조 재료이다.



Scheme 2. 정제(錠劑 : Tablet) 제품 제조 공정

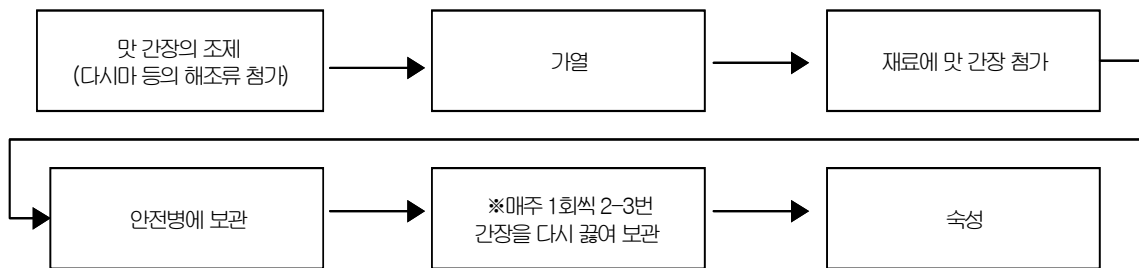
다. 절임 제품(장아찌 류 제품)

장아찌등의 절임은 간장이나 장 맛이 제품의 품질을 좌우하므로 맛 좋은 장류를 확보하는 것이 제 1의 과제이다.

다음은 재료의 맛으로 현재 사용되는 야생 산채류는 기본으로 쓴 맛이 강하여 일반 도시 소비자 에게는 혐오적인 맛으로 애로가 많고, 산지 주민들은 어려서 부터 그 맛을 느끼며 생활한 탓에 쓴맛등의 맛이 약하면 가짜 재료로 인식하는 등의 문제로 제품화에 애로가 많은 산채류 이다. 특히 누룩치는 쓰고 아린 맛이 뒤에 있어 더욱 어려운 재료이다.

1) 간장 장아찌 절임

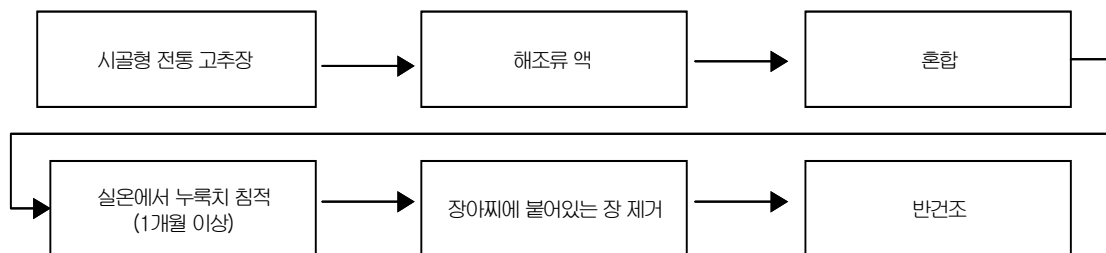
맛 간장 조제 : 일반 시중 간장에 맛을 내기 위하여 다시마등의 해조류를 첨가하여 맛이 양호한 간장을 만든 다음 가열하여 재료에 가하여 밀폐용 안전병에 보관하여 절인다. 저장중의 잡균의 오염을 막기 위하여 매주 1회씩 2-3 번 정도 간장을 다시 끓여서 가하여 저온 저장하여 2 개월 정도 숙성시키면 간장 장아찌를 얻을 수 있다.



Scheme 3. 간장 장아찌 제조 공정

2) 고추장 장아찌

일반 공장 제조 고추장은 물엿등의 성분을 단 맛이 강하여 장아찌 제조에 부적당 하여 시골형 전통 고추장을 사용하였다. 전통 고추장에 맛을 내게 하기 해조류를 가하여 조제한 액을 가하고 충분히 섞은 후 누룩치 대를 꼭 잠기도록 섞고, 실온에서 1 개월 이상 침적 시켜 맛이 들도록 한다. 강원도 막장의 장아찌도 같은 공정으로 제조한다.



Scheme 4. 고추장-막장 장아찌 제조 공정

라. 면류 제품

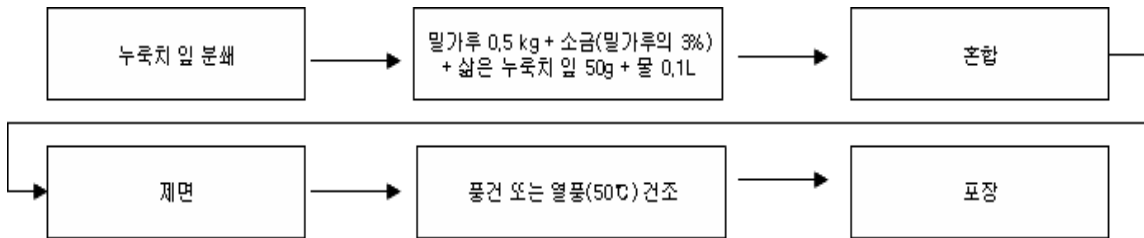
재료의 대량 소비를 유도하기 위하여 면류 제품을 시도하였다.

배합비 : ① 밀가루 0.5 kg + 소금 (밀가루의 3%) + 삶은 누룩치 잎 50 g + 물 0.1 L

② 밀가루 1 kg + 소금 (밀가루의 3%) + 생누룩치 대 200 g + 물 0.1 L

누룩치 재료는 믹서로 잘 분쇄하여 다른 재료와 함께 잘 혼합하여 국수용 반죽을 만들었다. 생 누룩치 대를 혼합한 이유는 누룩치 양을 많이 할 경우 누룩치의 생리활성 기능을 강화 할 목적과 생 누룩치의 대가 수확 후에도 섬유소가 많고 강하여 제면에 대한 영향을 비교하여 볼 목적으로 제조하였다.

국수 기계로 칼국수를 제면하였다.



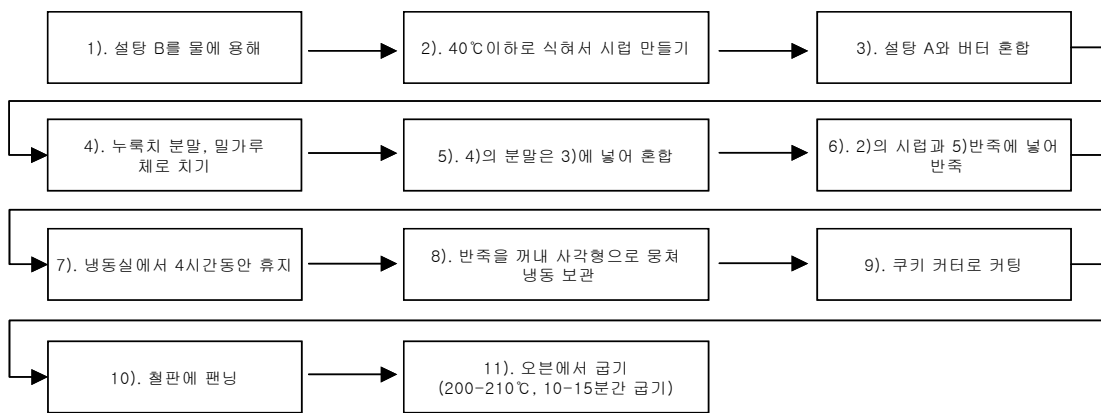
Scheme 5. 제면(칼국수) 제조과정

마. 쿠키류 제품

쿠키명 : 누룩치 프로켄트 ; <배합표>

재료명	비율(%)	무게
설탕 A	100	500
버터	144	720
소금	1	5
박력분	310	1550
베이킹파우더	0.4	2
누룩치 전초 분말	22	110
오트밀	100	500
물	40	200
설탕 B	30	150

- ① 먼저 설탕 B를 물에 녹여서 40℃이하로 식혀서 시럽을 만들어 둔다.
- ② 설탕 A를 버터와 섞어주어 포마드 상태로 풀어준다.
- ③ 누룩치 분말과 밀가루를 체로 쳐서 2에 넣고 섞어준다.
- ④ 1의 시럽을 3의 반죽에 넣고 비타로 반죽한다.
- ⑤ 쿠키 반죽이 되면 냉동실에 넣고 휴지 4시간 정도 휴지시킨다.
- ⑥ 휴지된 반죽을 꺼내서 사각형으로 뭉쳐서 만들고 냉동고에 넣고 다시 휴지 시킨다.
- ⑦ 쿠키 커티로 커팅하여 철판에 팬닝하고 오븐에서 200-210℃에서 10-15분간 굽는다.



Scheme 6. 쿠키 제조 공정

바. 김치 제조

재료의 장기적인 저장용 반찬의 하나로 김치를 시험 제조하였다.

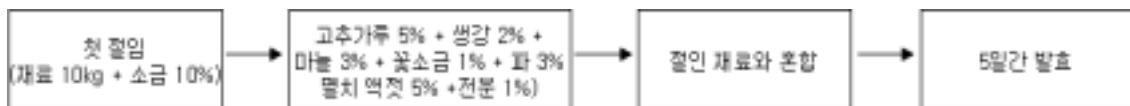
열무김치 하는 방법을 따라 제조하였으며 따로 물을 추가 하지 않았다.

<배합비>

첫 절임 : 재료 10 Kg + 소금 10% -----초 절임

마무리혼합 : 절임재료+고춧가루5%+생강2%+마늘3%+꽃소금1%+파3%+멸치액젓5%+전분1%

첫 소금절임한 재료를 마무리 혼합배합 재료와 잘 혼합하여 김치냉장고에서 5일 발효시킴



Scheme 7. 넘취 제조 공정

2. 실험결과 및 고찰

가. 환(丸) 제품 : 환제품의 제품은 색깔은 분말의 짙은 갈색과 점질 재료의 영향으로 암갈색으로 일반 시중의 다른 환제품과 유사한 형태로 아래 그림과 같다.



사진 1. 환 제품

나. 정제(錠劑) 제품

정제품은 분말의 색을 살려야 제품으로 산체의 특성인 녹색으로 신선도와 신뢰성을 높이고자 하였으며 제품은 아래와 같다.



사진 2. 정제품 모양

다. 절임 제품(장아찌 류 제품)

1) 간장 장아찌 절임

넙취의 잎은 큰 모양으로 제조 공정에 의하여 색깔과 맛이 좋은 제품으로 제조 가능성을 확인하였다. 이 제품은 충분한 숙성 기간이 경과한 후에야 쓴 맛이 다소 약화된 제품을 얻을 수 있다. 그리고 넙취의 잎 줄기가 큰 것은 잎의 제조 공정으로 구분하여 장아찌를 제조할 수도 있다.



넙취 잎의 간장 장아찌(1)



넙취 잎의 간장 장아찌(2)



넙취 잎의 간장 장아찌 제품



넙취 대의 간장 장아찌



누룩치 대의 간장 장아찌 담금



누룩치 간장 장아찌

사진 3. 넙취 및 누룩치의 간장 장아찌 제품 모양

2) 고추장-막장 장아찌

고추장 및 막장에서의 장아찌는 누룩치의 대를 이용하는 것이 모양을 좋게 제조할 수 있으며 넘취 익은 고추장등에 숙성시킨 후 부착한 장을 제거 하거나 소비자들이 다루는데 매우 불편하여 상품성이 다소 부족한 점이 있어서 자료는 여기서 생략하였다. 막장을 사용한 이유는 강원도의 독특한 장맛이 있어서 흔히 말하는 된장 보다는 더 선호하는 소비자가 많다.

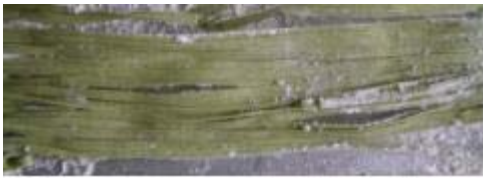
이상의 간장 장아찌와 고추장의 장아찌의 맛은 어느 것이나 쓴맛은 남아 있고 어린이등이 섭취하거나 신세대 들을 대상으로 소비하고자 하는 데는 다소 거부감이 있었고, 연령층이 높으면 산나물이나 몸에 기능상 좋다는 설득력으로 쓴 맛의 거부감은 다소 약화 시킬 수 있었다.



누룩치대-고추장장아찌 누룩치대-고추장장아찌(장제거) 누룩치대-막장장아찌(장제거)

사진 4. 누룩치의 줄기 대를 이용한 고추장-막장 장아찌 모양

라. 면류 제품



10% 누룩치 잎 국수 (1)



20% 생 누룩치 대 첨가 국수



10% 누룩치 잎 국수 삶은 후



2 종의 국수 건조 후의 모양

<(상) 20% 누룩치 대 (하) 10%누룩치 잎>

사진 5. 누룩치 국수의 다양한 모양

넙취 및 누룩치의 전초를 삶은 후 냉각하여 건조한 후 분말화 하거나 삶은 직후 곧 마쇄하여 액즙 형태로 국수용으로 사용하였다. 제면은 국수 기계를 사용하여 제조하였다. 생면과 마른 면의 사진은 아래와 같다. 10%의 누룩치 잎의 액즙을 첨가하여 제조할 경우 섬유소가 적어서 국수의 모양이 고르고 색깔도 고운 제품이 얻어졌으나 20%의 누룩치 대의 즙액을 첨가하였을 경우는 제면후의 모양이 섬유소가 보이고 면이 다소 거친 듯이 보였다. 또한 제면시의 반죽의 결합력이 불량하여 국수 반죽이 끊어지기 쉬운 단점이 있었다. 이러한 섬유소가 많은 식물 자원을 사용하여 제면 등의 표면이 쉽게 나타나는 제품의 경우는 먼저 성능이 우수한 액즙용 마쇄기 개발과 구비가 선결 되어야 하고, 다음은 제품의 기능성을 중시한 재료의 함량을 제품의 상품성에 악영향을 줄 정도로 첨가하는 것은 바람직하지 않는 공정으로 사료된다.

제면을 건조한 후의 외형의 모양에서 볼 수 있듯이 누룩치 대를 혼합한 경우는 상품성 면에서 고려할 점이 많은 것 같다. 그러므로 분말의 첨가할 경우는 더욱 고려할 점이 많을 것이다. 다행히 제분기용 마쇄기는 고가의 미분쇄기가 시판 되고 있으나 제분 시나 미분쇄한 분말을 조작하는 일은 또한 작업실 공간 내에 분말의 비산으로 작업환경과 공장관리에 또 다른 문제점이 발생할 수도 있다.

마. 쿠키류 제품

산나물류 특히 쓴 맛이 있는 누룩리 등과 같은 재료를 사용하는 쿠키류도 약간의 쓴 맛을 가지나 일단 녹색을 살려 신선함을 나타내고 자 하였다. 쿠키에 첨가하는 당의 양으로는

그 쓴 맛을 없애기에 역부족이어서 이와 같은 쓴 재료를 이용한 제품의 제조 공정은 다른 차원의 다양한 연구 기간과 환경이 필요할 것 같다.



사진 6. 누룩치 프로켄트 쿠키시제품 사진
(같은 쿠키를 여러 면에서 촬영한 것임).

바. 김치 제조

김치의 색은 쉽게 갈변하는 이 재료의 특성상 녹색을 살린 열무김치 처럼 제조하는 데는 어려움이 있다. 배추나 열무는 발효 중에 쉽게 갈변하지 않고 단기간이나 공기 중에 장시간 노출되어야 갈변하는데 이 재료는 발효 중에 갈변하는 성질이 있어서 이 성질을 정지 시키는 것이 어려운 문제로 상품성이 우선 떨어진다. 그리고 독특한 즐겁지 않는 발효 제품의 향으로 섭취 직전에 호기심이 줄어들 우려가 있었다. 맛은 재료의 쓴 맛이 남아 있고 누룩취의 경우 아린 맛도 약간 남아 있어서 대학생을 대상으로 한 기호성등을 조사하려 하였으나 상기 두 가지의 거부감이 있는 맛 때문에 관능 검사의 의미가 없었다. 마을 중년 이후의 주부들에게도 시식을 권유하였으나 쓴맛과 발효 중의 새로운 향기의 거부감 때문에 모에 좋으니 먹지 하는 반응으로 관능검사의 의미를 둘 수 없었다.



사진 7. 넙취 김치

이상의 넘취 및 누룩취를 이용한 제품중에서 장아찌등은 주로 중년 이상의 연령층에, 쿠기등은 젊은 층을 대상으로 한 소비자를 차별화한 제품화가 필요하다고 사료된다.

그러나 장아찌등은 도시락 혹은 가정의 부식용으로 기업화 할 경우 경영의 묘를 살려 기능성 김치 또는 신선한 산나물 김치 제품등으로 폭 넓은 소비층을 만들 가능성이 있다.

이 재료의 제품화 어려운 점의 하나는 섬유소가 많고 강하여 분쇄하는 특별한 분쇄기가 제품에 따라서 반드시 필요한 것도 제품화의 한 장애로 볼수 있으나 섬유소의 장내활동 및 장내 대사기능을 살린 면 제품류로 어필하여 공격적인 경영을 한다면 약간의 가능성은 있다고 볼수 있다.

7절 넘취와 누룩취를 이용한 효능검정

1. 연구배경

세계보건기구(WHO)는 암 발생을 높이는 서구식 생활습관의 확산과 현재의 흡연추세로 볼 때 2020년에는 암 진단자가 1천500만 명으로 50% 증가할 것으로 예상된다고 발표하였다. 또한 우리나라 보건복지부와 국립암센터에 따르면 2001년 발생, 등록된 암은 9만1천9백 44건으로 전년에 비해 9.7% 증가했으며, 이 가운데 위암이 20.3%로 가장 많았고 폐암(11.9%), 간암(11.8%), 대장암(10.5%), 유방암(7.1%)으로 나타남. 이와 같이 암 발생률과 이로 인한 사망률은 계속 증가하고 있는 실정이지만, 현재까지는 확실한 치료법이 개발되어 있지 않다.

암 진단을 받은 후 1년 내 사망률이 32%로 국내 암 환자는 평균적으로 3명에 1명꼴로 진단 후 1년 안에 사망하는 것으로 밝혀져있다.

통계자료에 따르면, 2001년 현재 국내 암환자는 25만여 명으로 이들의 치료에 든 8천~9천억에 이르는 것으로 나타났고, 서울 시민 지표 조사 자료를 활용 분석한 결과 암으로 인한 활동 제한에 따라 초래된 생산성 손실액도 연간 2000억여 원에 이르는 것으로 추측되고 있다. 이와 같은 액수는 암 환자들의 대체 의학과 같은 병원 외적인 치료에 사용한 의료비, 환자 및 가족들의 정신적인 고통 및 사회생활의 제한에 따르는 기회 비용 등은 전혀 반영되지 않은 것이다. 이 같은 금액까지 포함할 경우 암으로 인한 경제적 손실은 훨씬 더 크다.

여러 역학 조사에 의하면 암의 원인은 환경 요인이 가장 큰 부분을 차지하고 있으므로 암

발생의 50-80%는 충분히 예방 할 수 있을 것으로 생각한다.¹²⁻¹⁵⁾

뿐만 아니라, 전 세계적으로 암 발생 및 사망률이 증가하고 있고 이러한 추세가 앞으로도 지속될 것이라는 점에서 우수한 암예방 및 치료용 기능성 식품 소재 개발은 국가 경제 발달에 기여할 수 있을 것이다.

암예방은 외형상 건강한 사람을 대상으로 암 발생을 억제하기 위한 1차 예방, 양성암을 앓고 있는 사람을 대상으로 진행과정을 역전시키거나 악성화를 억제시키기 위한 2차 예방, 악성암을 가진 환자나 전에 암을 치료한 적이 있는 사람들을 대상으로 암의 재발과 침윤 및 전이를 억제하기 위한 3차 예방으로 대상과 진행상태에 따라 단계적으로 적용할 수 있는 장점이 있다¹⁶⁾. 또한 암예방은 예방뿐만 아니라 치료목적으로도 활용할 수 있는 포괄적 개념으로, 성인병이나 만성질환의 예방 및 개선에 도움이 되는 효과적인 암예방제를 개발하는 것이 무엇보다 중요하다. 따라서 야채, 과일 등에 함유된 천연물질들(phytochemicals) 중에서 효능이 우수한 암예방 물질을 개발하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다.¹⁷⁾ 독성이 없고 효능이 뛰어난 암예방 물질을 개발한다면 암예방뿐만 아니라 항암제 및 항암보조제로 적용할 수 있으며, 현재 사용되는 항암제로 인한 부작용을 완화시키고 효능을 증진시키는데도 도움이 될 것이다.

미국의 경우, National Cancer Institute(NCI)에서 효능이 확인된 암예방후보물질 중 16종을 선정하여 임상시험을 진행하고 있음. 그러나, 대부분 이런 물질들은 높은 농도에서 효능을 나타내므로 생리적인 농도에서 좀 더 효능이 탁월한 물질을 도출하여 효능과 안전성이 우수하고 국제 경쟁력이 있는 암예방, 항암물질로 개발할 필요가 있다.

발암 과정은 크게 발암 물질이 생체 표적 세포의 DNA를 공격하여 돌연변이를 유도하는 암 개시단계(initiation), 개시화된 세포가 빠르게 증식하여 양성암 상태로 전환되는 암 촉진단계(promotion), 그리고 양성암이 악성암으로 변형되는 암 진행단계(progression)로 구분된다.¹⁸⁻¹⁹⁾ 암 개시단계는 발암물질의 활성화를 억제하거나 해독화를 촉진시키고, DNA 복구(repair)를 증가시키며, 활성화된 발암물질이나 활성산소종(ROS: reactive oxygen species)을 제거함으로써 억제할 수 있음. 또한, ROS 제거, 염증반응 억제, 암세포의 증식 억제 및 분화 촉진, 암화에 관여하는 유전자 혹은 단백질 발현의 변화 억제를 통해 암 촉진단계를 차단할 수 있으며, 돌연변이가 발생한 암 개시세포의 세포사멸(apoptosis)을 유도함으로써 암화를 억제할 수 있다는 것이 알려져 있다.²⁰⁻²¹⁾

본 연구에서는 넘취 추출물 및 누룩치 추출물과 그 유효성분으로서 본 연구에서 처음 분리된 buddlejasaponin IV의 암예방 및 항암 효능을 조사하기 위해, 사람 대장암 세포주인 HT-29 세포에서 넘취, 누룩치 추출물 및 buddlejasaponin IV의 세포자살 유도능을 조사하

였음. 또한 암화와 밀접한 관련이 있는 항산화, 항돌연변이, 항염증 효능을 조사하였다.

2. 실험방법

가. 항산화효능 조사

HL-60 세포를 2.5×10^5 cells/ml의 농도로 100 ml를 만들어 1.3% DMSO를 가하고 일주일 동안 배양하였다. 시료는 DMSO에 녹여 이차 증류수로 5배 희석하고, 10% DMSO로 계속 5배씩 연속적으로 희석하였다. 96 well plate에 시료를 10 μ l 씩 quadruplicate로 넣고, 공시험으로 시료 대신 100% DMSO를, 양성대조군으로 TPA (8 μ M/well)를 사용하고 음성대조군에는 TPA를 첨가하지 않는다. HL-60 cell을 원심분리(2000 rpm x 5 min)하여 배양액을 제거하고 HBSS (w/o phenol red)로 두 번 세척하여 배양액을 완전히 제거한 후 1.0×10^6 cells/ml의 농도가 되도록 HBSS를 넣는다. 시료를 넣은 quadruplicate 중 duplicate는 세포 용액을 넣고 나머지는 세포용액대신 HBSS를 넣는다. 30초 동안 진탕하고 5 분 동안 CO₂ 배양기에서 배양한다. 5분 후 TPA 용액과 cytochrome c (160 μ M/well)를 각각 20 μ l 씩 가하여 30초 동안 섞어주고 1 시간 동안 CO₂ 배양기에서 배양한다. 550 nm에서 ELISA reader로 흡광도를 측정 한 후, % control을 구하고 log 농도에 대한 IC₅₀을 구한다. 실험 결과는 IC₅₀ 값으로 표시하여 상대적 활성도를 비교한다.

나. 항염증 효능 조사를 위한 mouse ear edema test

acetone/DMSO(1:1)에 시료를 녹여 생쥐의 오른쪽 귀에 국소도포하였다. 30분 뒤 acetone에 녹인 TPA (5nmol/50 μ l)를 생쥐 오른쪽 귀에 국소도포하여 부종을 유발하였다. 4시간 뒤 6mm 펀치를 이용하여 같은 크기로 귀를 잘라낸 뒤 미세 저울을 이용하여 무게를 측정하였다. 모든 생쥐의 왼쪽 귀는 용매만을 처리하였다. 오른쪽 귀의 무게에서 왼쪽 귀의 무게를 뺀값을 비교하였다. 부종 억제효과는 [(넙취로 전처리 후 TPA로 부종을 유발한 군에서 무게차)/(TPA로 부종을 유발한 군에서 무게차)]x100로 계산하였다.

다. 염증관련 단백질인 cyclooxygenase-2(COX-2)의 발현 조사

5주된 암컷 생쥐를 폴라스 인터내셔널(서울, 한국)에서 구입하여, 12시간을 주기로 빛과 어

두운 환경에서 적응시켰다. 실험에는 6주~7주령에 있는 생쥐를 사용하였다. 생쥐 등의 털을 제거한 다음 이틀 후에 넘취 추출물, 누룩치 메탄올 추출물과 buddlejasaponin IV를 용매(아세톤: DMSO = 1:1), 200 μ l에 녹여 생쥐 피부에 국소 도포 하였다. 30분 뒤 TPA (10nmol/200 μ l)를 아세톤에 녹여 국소 도포하고 4시간 뒤에 생쥐를 희생시켰다. 피부를 잘라내어 얼음 위에서 지방조직을 제거하고 액체 질소를 가한 후 유봉을 이용하여 분말로 만들었다. 분말에 단백질 lysis 용액[150 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, 50mM Tris-HCl, pH 7.4, 20mM EGTA, 1mM DTT, 1mM Na₃VO₄, protease inhibitor cocktail tablet]을 가하고 3시간 동안 얼음 위에 방치한 뒤, 원심분리(12000rpm, 10min)하여 상층액을 얻었다. 상층액의 단백질은 BIO-Rad protein assay 용액을 이용하여 정량하였다. 각각의 시료에서 일정량을 가지고 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)를 한 후, 분리된 단백질을 PVDF 막으로 옮겼다. 단백질이 옮겨진 PVDF 막을 인산 완충액에 녹인 5% 탈지 분유액에 3시간 담근 다음, 1:1000으로 희석한 COX-1, COX-2, β -actin에 대한 일차 항체를 4°C에서 12시간 붙이고, 이 일차 항체에 특이적으로 반응하는 이차 항체를 붙였다. 각 단계가 끝나면 0.1% PBST(phosphate buffered saline Tween 20) 이차 항체를 붙인 후 Enhanced chemiluminescence (ECL) 용액으로 반응시킨 후 x-ray 필름에 노출시켜 COX-1, COX-2, β -actin의 변화를 확인하였다.

라. 항돌연변이 효능 조사

Salmonella typhimurium TA100, TA102 균주를 사용하여 Ames test를 수행하여 물질의 DMBA 또는 산화제로 유발한 돌연변이에 대한 억제능을 조사한다. DMSO에 녹인 DMBA 또는 증류수로 희석한 tert-butylhydroperoxide (t-BOOH), 시험균주 배양액, 0.1M potassium phosphate buffer 혹은 S9 mix를 포함한 반응혼합물에 시료를 가하거나 가하지 않고 37 oC에서 30분 동안 반응시킨다. 반응을 멈추고 45 oC에서 0.5 mM histidine-biotin 이 포함된 top agar, 2 ml에 반응혼합물을 가하여 잘 섞어준 다음 plate에 부어 굳힌다. 37 oC에서 2일 동안 배양하여 colony의 수를 헤아린다.

마. MTT assay

96-well plate에 well당 HT-29 세포를 5x10³개씩 넣고 1% antibiotic-antimycotic 을 포함하는 10% fetal bovine serum(FBS)-Dulbecco's Modified Eagle medium (DMEM) 배지에서 24시간 동안 배양하였다. 배지를 제거하고 누룩치 추출물이 포함된 배지를 200 μ l씩 가하였

다. 시료를 DMSO(dimethyl sulfoxide)에 녹인 후 serum이 없는 DMEM 배지로 희석하여 사용하였다. 배지 내의 DMSO의 농도는 0.1%가 되도록 하였다. 2시간, 24시간이 지난 후 5mg/ml의 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT)용액을 한 well당 20 μ l씩 첨가하여 4시간동안 37 $^{\circ}$ C에서 배양하였다. 배지 및 MTT 용액을 완전히 제거한 후 DMSO를 200 μ l씩 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 20분 배양 후 570nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 대조군(배지만 가한 well)의 흡광도에 대한 시료를 포함한 배지를 가한 well의 흡광도의 백분율로 계산하였다.

바. DAPI staining

25T flask에 2 \times 10⁶ cells를 넣고 24시간동안 키운 후 0.1%의 DMSO에 녹인 시료를 처리하였다. 24시간이 지난 후에 cell을 scraper로 떼어낸 후 PBS로 1회 washing(1500rpm, 3분, 4 $^{\circ}$ C)하고, 75mM의 KCl로 씻어주었다(800rpm, 5분, 4 $^{\circ}$ C). methanol과 acetic acid의 비율을 3:1로하고 거기에 formaldehyde 3drop씩을 더 넣어서 2회 고정시켰다(800rpm, 5분, 4 $^{\circ}$ C). Air dry가 끝난 후 1mg/ml의 DAPI solution을 1000배 methanol로 희석하여 염색하였다. 37 $^{\circ}$ C에서 20분간 방치한 후 형광현미경으로 관찰하였다.

사. DNA 분절능 조사

60 π 세포배양 Dish에서 2 \times 10⁶개의 세포를 1% Antibiotic-Antimycotic 을 포함하는 10% FBS-DMEM 배지에서 24시간 동안 배양하였다. 배지를 제거하고 누룩치 추출물이 포함된 배지를 5ml씩 가하였다. 누룩치 추출물은 DMSO(Dimethyl Sulfide)에 녹인 후 Serum이 없는 DMEM 배지에 누룩치 추출물이 0, 0.01, 0.05,mg/ml 되게 희석하여 사용하였다. 2시간, 24시간이 지난 후에 세포를 Scraper로 떼어낸 후 원심 분리 하였다.(1500rpm, 3분, 4 $^{\circ}$ C) 상등액을 버린 후 1ml의 PBS로 세포를 잘 현탁시켜 10000rpm, 10분, 4 $^{\circ}$ C에서 다시 한번 세포를 원심분리 하였다. 상등액 900 μ l는 따라 버리고 남은 100 μ l의 상등액으로 세포를 잘 현탁시킨 후 500 μ l의 lysis buffer [0.6% SDS, 10mM EDTA(pH7.5)]를 넣었다. 5M의 NaCl을 100 μ l씩 넣고 4 $^{\circ}$ C 에서 2시간 반응시켰다. 15000rpm, 10분, 4 $^{\circ}$ C 에서 원심분리하여 상등액만 얻은 후 10 μ g/ml의 RNase를 3 μ l씩 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시켰다. Phenol/Chloroform/Isoamylalcol(25:24:1)을 500 μ l 씩 넣고 조심스럽게 섞어 준 후 15000rpm, 10분, 4 $^{\circ}$ C로 원심분리 하였다. 투명한 상등액만 조심스럽게 다른 튜브로 옮긴 후 다시 한번위의

과정을 반복하였다. 70% 에탄올을 1ml 넣고 하루동안 반응시킨 다음 15000rpm, 10분, 4°C로 원심분리 하여 공기 중에서 말렸다. 18 μ l의 TE buffer로 녹이고 37°C에서 1시간 반응시킨 다음 1.2% Agarose gel에서 전기영동하여 DNA 분절능을 확인하였다.

아. Flow cytometry analysis

60 μ m 세포배양 dish에 2 \times 10⁶개의 대장암 세포를 1% Antibiotic-Antimycotic을 포함하는 10% FBS-DMEM 배지에서 24시간 동안 배양하였다. 배지를 제거하고 누룩치 추출물이 포함된 배지를 5ml 씩 가하였다. 누룩치 추출물을 DMSO에 녹인 후 serum이 없는 DMEM에 0, 0.01, 0.05, 0.1mg/ml 되게 희석하여 사용하였다. 배지 내의 DMSO의 농도는 0.1%가 되도록 하였다. 2시간, 24시간이 지난 후에 세포를 Trypsin-EDTA로 떼어내 세포를 모았다. 세포를 1 \times Annexin V Binding Buffer 1ml로 잘 섞어준 후 그 중에서 100 μ l만 FACS용 튜브로 옮겨 담고 Annexin V-FITC 5 μ l 와 PI Buffer 10 μ l씩을 튜브에 넣어주었다. 어두운 실온에서 15분을 더 둔 후에 400 μ l의 Annexin V Binding Buffer를 넣고 1시간 이내에 Flow Cytometry로 분석하였다.

자. 암전이 억제 효능

생쥐의 대장암세포주인 CT-26 세포를 1% antibiotic-antimycotic을 포함하는 10% FBS-DMEM 배지에서 배양하였다. 에탄올-tween 20-PBS(1:1:8)을 용매로 하여 시료를 녹였다. 실험동물은 Balb/c(4주령, 수컷)를 사용하였으며, (주)오리엔트(한국, 경기도 가평)에서 분양받은 후 1주일 동안 적응시켜(22 \pm 2°C, 12h light/dark cycle) 실험하였다. 각 그룹당 3마리의 생쥐를 사용하였다. 생쥐에 CT 26 세포를 주입하기 30분전에 시료를 각 농도별로 복강 주사하였고, CT-26 세포를 칼슘과 마그네슘이 없는 PBS에 5 \times 10⁵ cells/ml로 잘 현탁시킨 후, 200 μ l씩 꼬리 정맥으로 주입하였다. 2주 동안 하루에 한번씩 시료를 농도별로 복강주사하였다. 생쥐를 희생시킨 후 폐를 떼내 사진을 찍고 무게를 측정한다. 다음, Bouin 용액으로 염색하여 해부현미경으로 폐에 생긴 종양결절(tumor nodule)의 수를 세었다.

3. 결과 및 고찰

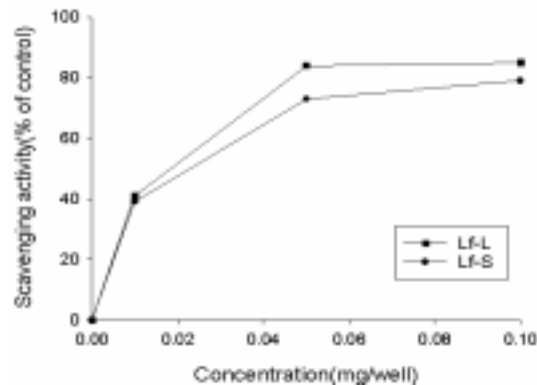
가. 넘취 성분의 생리활성 조사

1) 항산화 효능

정상 세포가 암세포로 발전하는 것(암화)은 장기간 동안 여러 단계를 거쳐 이루어지는데, 크게 정상 세포가 변이를 일으키는 단계, 변이를 일으킨 세포가 분열 증식하는 단계, 그리고 생성된 암이 전이하여 2차 종양을 생성하는 단계로 나눌 수 있다. 이러한 암발생의 각 단계는 활성산소종과 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있다. 발암물질의 대사과정을 통해, 또는 UV에 과도하게 노출되거나 만성 염증 반응 등으로 인해 활성산소종의 생성이 늘어나게 되면 DNA의 손상을 유발하여 정상 세포의 변이를 일으킬 뿐만 아니라, 세포신호전달에 영향을 미쳐 암화를 촉진한다. 또한, 현재까지 알려진 뛰어난 암예방 및 항암물질들은 항산화 효과가 매우 우수한 것으로 알려져 있다. 따라서 넘취 추출물의 항산화효능을 조사하였다.

분화된 HL-60 cells에서 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)로 유도한 활성산소종(superoxide anion)의 생성이 넘취 추출물에 의해 용량의존적으로 억제되는 것을 관찰하였다. 넘취 잎과 줄기 추출물 모두 뛰어난 항산화효과를 나타내었다.

[그림 1] 넘취 잎(Lf-L)과 줄기(Lf-S) 추출물의 항산화 효능



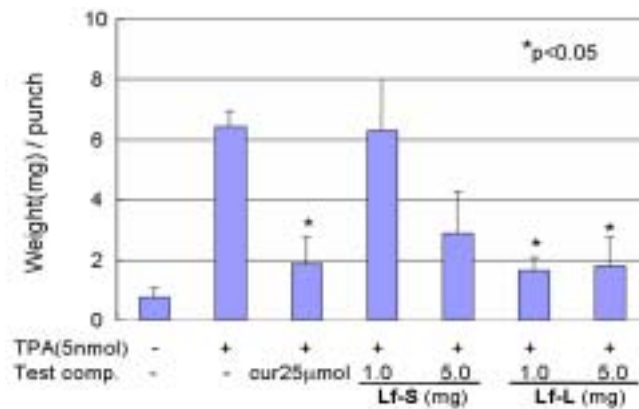
2) 항염증 효능

다단계로 진행되는 암화 과정 암 촉진단계(tumor promotion)는 염증 반응과 밀접한 관련

이 있는 것으로 알려져 있다. 또한 효능이 뛰어난 항암 및 암예방물질의 대부분이 뛰어난 항염증효과를 보인 것으로 알려져 있다. 항염증 효능이 우수한 물질은 뛰어난 암예방 및 항암효과를 나타낼 가능성이 매우 높다. 따라서 본 연구에서는 넘취 추출물의 항염증 효능을 평가하였다.

mouse ear edema 모델을 사용하여 항염증효능을 조사한 결과, TPA로 유발한 염증반응을 넘취추출물이 용량의존적으로 유의성있게 억제하는 것을 관찰하였고 잎 추출물(Lf-L)이 줄기추출물(Lf-S)보다 염증반응 억제효과가 좋은 것으로 나타났다.

[그림 2] 넘취 추출물의 항염증 효능



3) 항돌연변이 효능

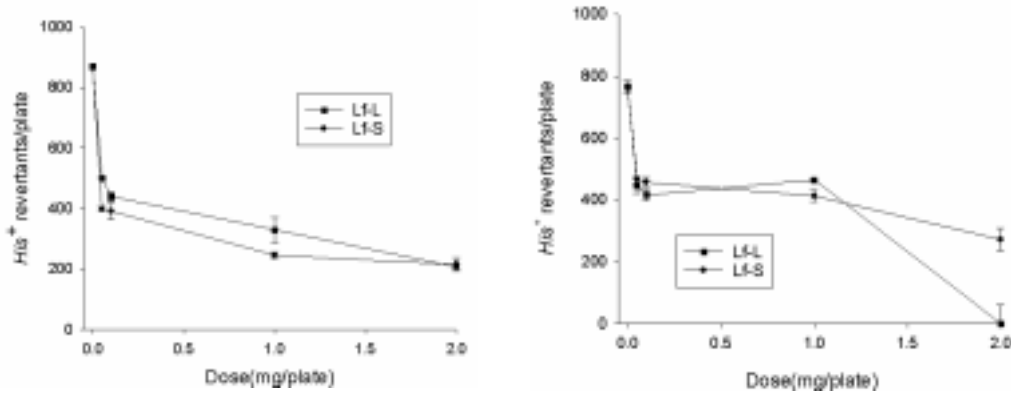
발암물질이나 활성산소종에 의해 DNA에 돌연변이가 발생하면 DNA 변이를 인식하여 대부분 복구되지만, 복구되지 못하고 복제가 진행될 경우 세포에 변이가 초래되어 암화의 원인이 된다. 따라서 발암물질이나 활성산소종에 의한 DNA 돌연변이를 억제할 수 있다면 암발생을 억제할 수 있으므로 넘취 잎(Lf-L) 및 줄기(Lf-S) 추출물의 돌연변이 억제 효능을 조사하였다.

Salmonella typhimurium TA100 균주에서 발암물질인 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)로 유도한 돌연변이를 넘취 줄기(Lf-S) 및 잎(Lf-L) 추출물이 용량의존적으로 억제하였다. 또한, *S. typhimurium* TA102 균주에서 *t*-BOOH로 유도한 돌연변이를 넘취 줄기

및 잎 추출물이 용량의존적으로 억제하였다. *t*-BOOH는 세포내에서 과산화수소를 발생한다.

[그림 3] 넝취 추출물의 항돌연변이 효능

(A) DMBA로 유도한 돌연변이 억제능 (B) *t*-BOOH로 유도한 돌연변이 억제능

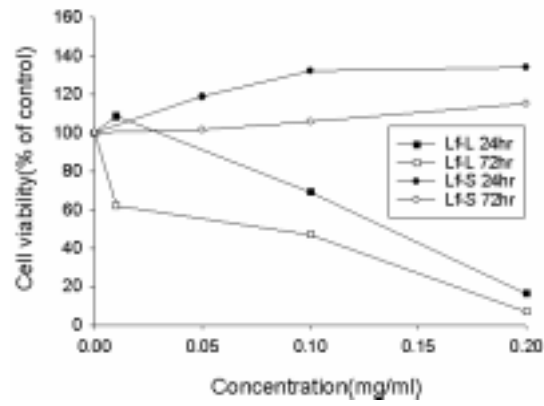


4) 세포사멸 유도능

정상 세포에서는 세포 내 생존 및 사멸과 관련된 신호체계가 균형을 이루는 상태에 있는데 이 균형이 깨어져 세포 생존 관련 신호체계가 과도해지거나 세포사멸 관련 신호체계가 억제되면 세포가 비정상적으로 증식하여 암화가 촉진될 수 있다. 따라서 세포 변이가 일어난 세포에서 세포 사멸을 유도하거나 세포 성장을 억제하는 물질은 암예방 및 항암제로 적용될 수 있다. 따라서 본 연구에서는 넝취 성분의 세포사멸 유도능을 조사하였다.

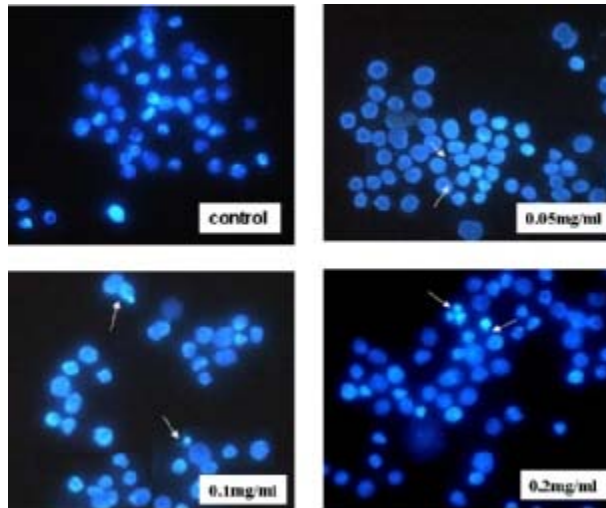
사람 대장암 세포주인 HT-29 cells에서 넝취 추출물의 세포사멸 유도능을 조사한 결과, 넝취 잎 추출물(Lf-L)에 의해 용량의존적으로 암세포의 생존율이 감소되는 것을 관찰하였으며, 줄기 추출물(Lf-S)은 암세포의 생존율을 감소시키지 못하였다.

[그림 4] 사람 대장암 세포주인 HT-29 cells에서 넝취 추출물의 세포독성



또한, 세포사멸시 관찰되는 핵농축 및 apoptotic body의 생성을 조사하기 위해 DAPI로 세포를 염색하여 관찰한 결과, 넘취 추출물에 의해 용량의존적으로 대장암세포주의 세포사멸이 유도되는 것을 관찰하였다.

[그림 5] 사람 대장암 세포주인 HT-29 cells에서 세포사멸 유도능 (DAPI 염색)



나. 누룩치 추출물 및 유효성분인 buddlejasaponin IV(BS-IV)의 생리활성 조사

1) 항염증 효능

6주된 암컷 ICR 생쥐의 귀에 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)로 유발한 부종을 누룩치 메탄올 추출물(표 1, 그림 6A)과 BS-IV(표2, 그림 6B)가 용량의존적으로 억제하였다.

표 I. ICR 생쥐의 귀에 TPA로 유발한 부종에 대한 누룩치 메탄올 추출물의 억제효과

Treatment ^a	weight(mg)/punch	<i>p</i> -value	Inhibition (%)
acetone/DMSO + acetone	1.50±0.252		
acetone/DMSO + TPA5nmol	5.07±0.549		
누룩치(1mg/50 μ l)+TPA	5.77±0.612	0.4423	0
누룩치(5mg/50 μ l)+TPA	3.77±1.299	0.4087	36
누룩치(10mg/50 μ l)+TPA	0.43±0.338	0.0019	100

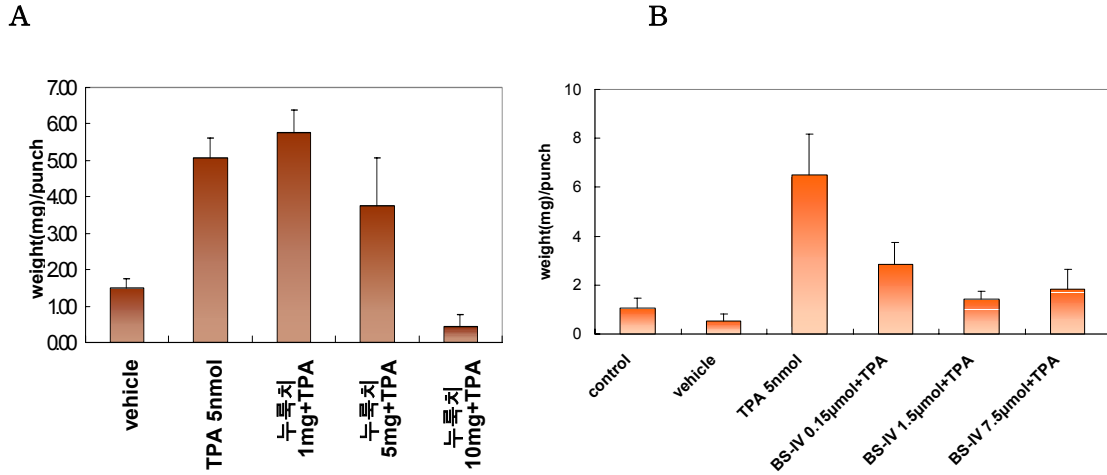
^a누룩치 메탄올 추출물은 용매(아세톤:DMSO=1:1)에 녹여 사용하였으며 TPA는 아세톤에 녹여 사용하였다.

표 II. ICR 생쥐의 귀에 TPA로 유발한 부종에 대한 BS-IV의 억제효과

Treatment ^a	weight(mg)/punch	<i>p</i> -value	Inhibition (%)
acetone/DMSO + acetone	0.52±0.294		
acetone/DMSO + TPA5nmol	6.52±1.637		
BS-IV(0.15 μ mol/50 μ l)+TPA	2.84±0.910	0.085	61.3
BS-IV(1.5 μ mol/50 μ l) +TPA	1.44±0.294	0.0157	84.7
BS-IV(7.5 μ mol/50 μ l) +TPA	1.82±0.814	0.0031	78.3

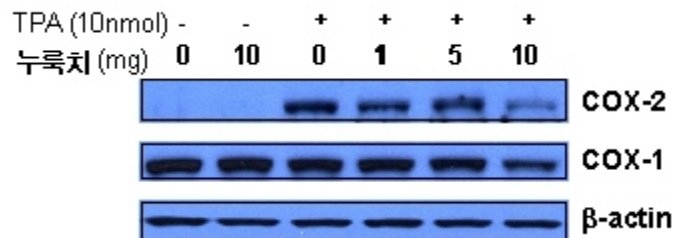
^aBS-IV는 용매(아세톤:DMSO=1:1)에 녹여 사용하였으며, TPA는 아세톤에 녹여 사용함.

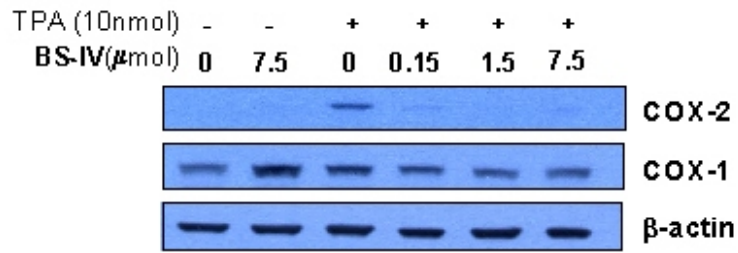
[그림 6] ICR 생쥐의 귀에 TPA로 유발한 부종에 대한 누룩치 메탄올 추출물(A) BS-IV(B)의 억제효과



암촉진제 (tumor promoter)일 뿐만 아니라 염증반응을 유도하는 TPA를 생쥐 피부에 국소 도포하면 COX-2의 발현이 현저히 증가된다는 것이 알려져 있다. 본 실험에서도 생쥐 피부에 TPA를 국소 도포시 COX-2의 발현이 현저히 증가되는 것이 관찰되었다. 1, 5, 10mg의 누룩치 메탄올 추출물과 0.15, 1.5, 7.5 μ mol의 BS-IV를 각각 전처리시 TPA에 의해 증가된 COX-2의 발현이 용량의존적으로 감소하였다(그림 7). 따라서 누룩치 메탄올 추출물과 BS-IV는 COX-2의 발현을 억제함으로써 TPA로 유도된 염증반응을 억제하는 것으로 생각된다.

[그림 7] ICR 생쥐 피부에 TPA로 유발한 COX-2 단백질 발현에 대한 누룩치 메탄올 추출물과 BS-IV의 영향

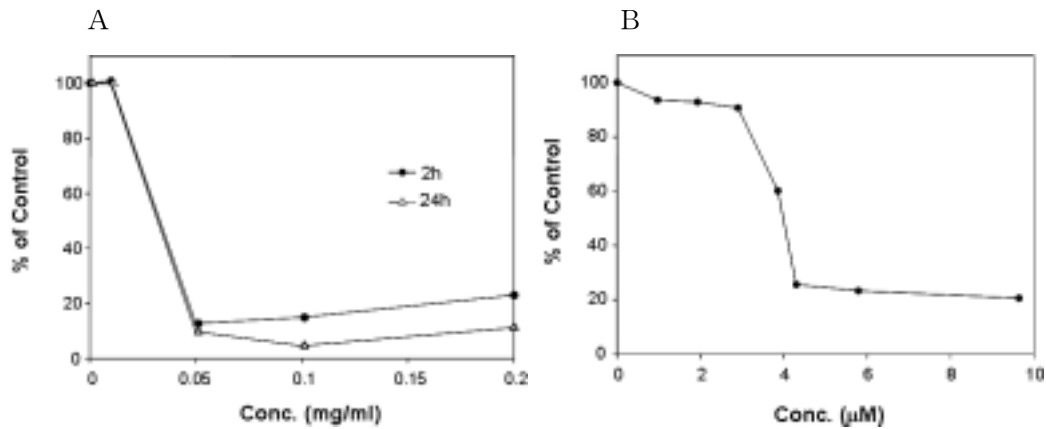




2) 세포사멸(apoptosis) 유도능

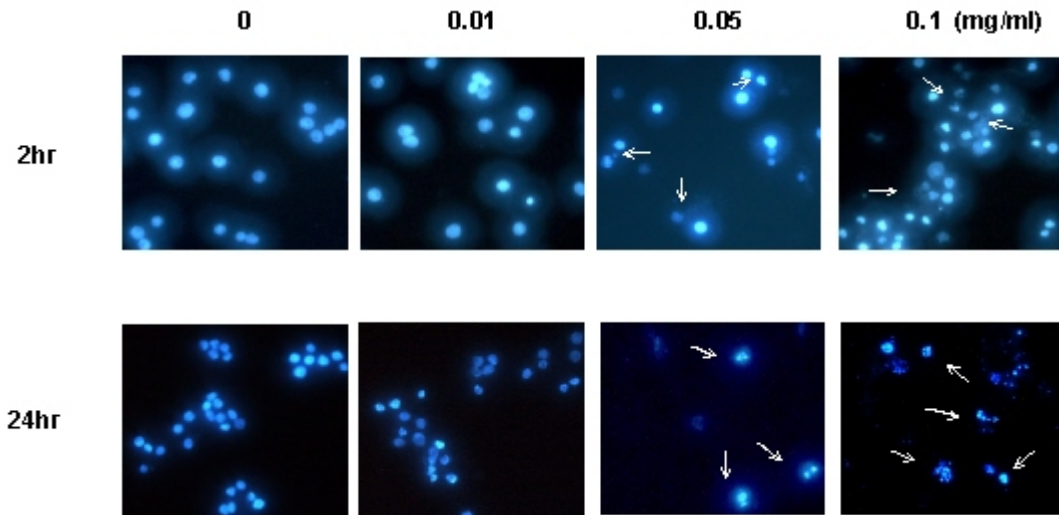
누룩치 추출물을 대장암세포에 처리한 결과 2시간 만에 대장암세포의 세포 생존율이 용량 의존적으로 현저히 감소하였다 (IC_{50} : 0.033mg/ml). 동일한 방법으로 24시간을 처리하였을 때 2시간을 처리하였을 때 보다 세포생존율이 다소 감소하였으나 (IC_{50} : 0.032mg/ml) 큰 차이는 보이지 않았다. 또한 동일한 방법으로 대장암세포에 BS-IV를 2시간동안 처리하였을 때 용량 의존적으로 세포 생존율이 감소하였다 (IC_{50} : 2.73 μ M)

[그림 8] 대장암세포의 세포 생존율에 대한 누룩치 추출물(A) 및 BS-IV(B)의 효과



누룩치 추출물을 대장암세포에 처리하고 2시간, 24시간동안 배양한 후, DAPI 염색시약을 세포에 처리하여 핵을 염색시킨 결과, 누룩치 추출물에 의해 세포사멸시 관찰되는 apoptotic body가 생성되며, DNA 농축이 일어나는 것을 관찰하였다(그림 9).

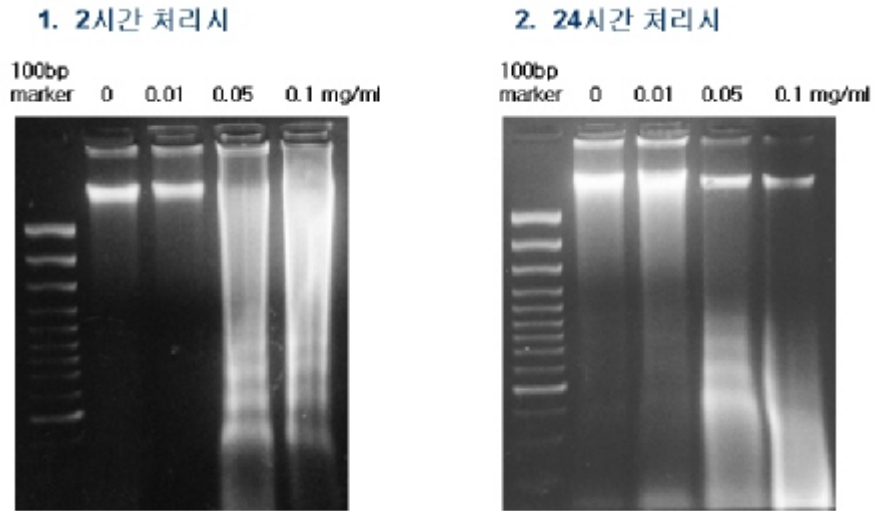
[그림 9] 대장암 세포에 누룩치 추출물을 처리했을 때의 세포의 형태 변화



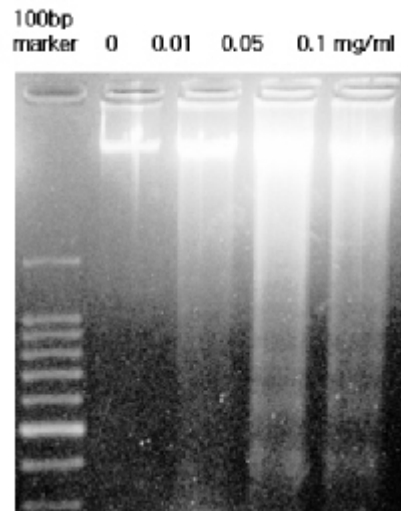
누룩치 추출물 및 BS-IV가 대장암세포에서 세포자살을 유도하는가를 알아보기 위해 세포자살시 관찰되는 특징인 DNA 분절능(DNA Fragmentation)을 agarose gel을 이용해 확인하였다. 대장암세포에 누룩치 추출물을 2시간 동안 처리했을 때 0.01mg/ml 농도에서는 누룩치 추출물에 의해 DNA가 분절되지 않았으나 0.05, 0.1mg/ml의 농도에서는 DNA가 분절되는 것을 관찰하였다. 24시간 처리시에는 0.05mg/ml에서 DNA 분절이 확인 되었으나 0.1mg/ml을 처리한 경우에는DNA ladder가 확인되지 않고 끌리는 경향을 보였는데, 이는 세포 괴사(necrosis)에 도달했다고 추측된다(그림 10). 또한, 대장암세포에 BS-IV을 2시간 동안 처리했을 때 4 μ M농도에서는 누룩치 추출물에 의해 DNA가 거의 분절되지 않았으나 5, 6 μ M의 농도에서는 DNA가 분절되는 것을 관찰하였다(그림 11). 따라서 누룩치 추출물 및 BS-IV가 암세포의 세포사멸을 유도하는 것으로 생각된다.

누룩치 추출물 및 BS-IV에 의한 대장암 세포의 세포사멸이 어떠한 경향을 나타내는지 확인하기 위해 Annexin V-Fluorescein isothiocyanate(FITC)와 propidium iodide(PI)로 세포를 염색한 후, Fluorescence Activated Cell Sorter(FACS)를 통하여 분석하였다. Annexin V는 세포사멸이 유도된 세포에서 세포막으로 이동한 phosphatidylserine을 인식하며, PI는 세포사멸이 유도된 세포의 DNA 사이로 끼어 들어가서 세포를 염색하는 것으로 알려져 있다.

[그림 10] 대장암세포를 누리대 추출물로 처리 시 DNA 분절능

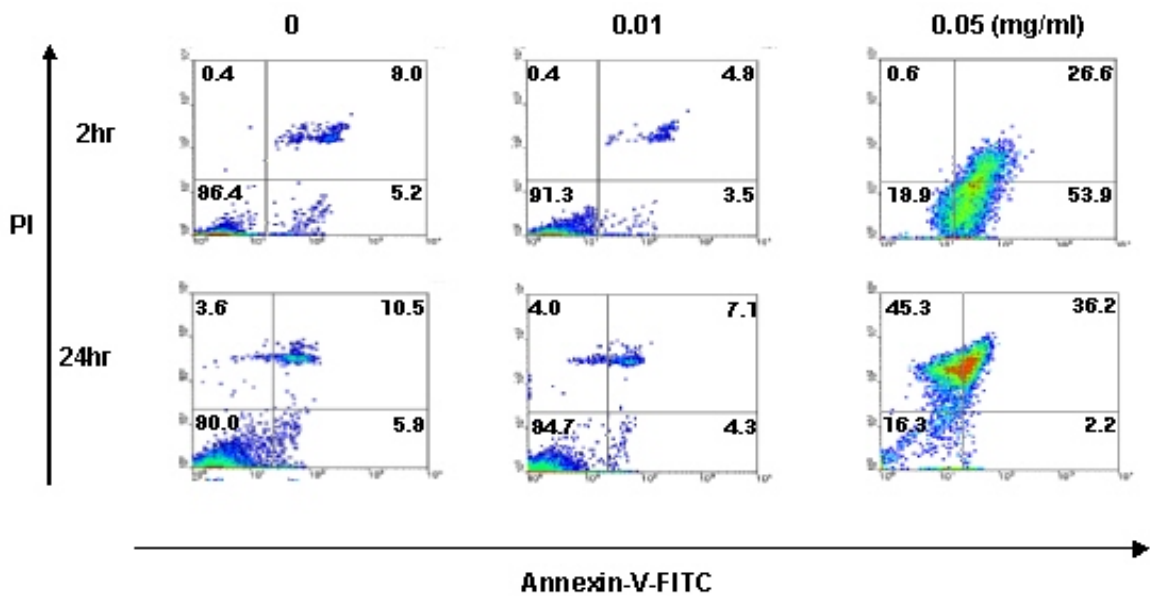


[그림 11] 대장암세포를 BS-IV로 2시간 처리시 DNA 분절능



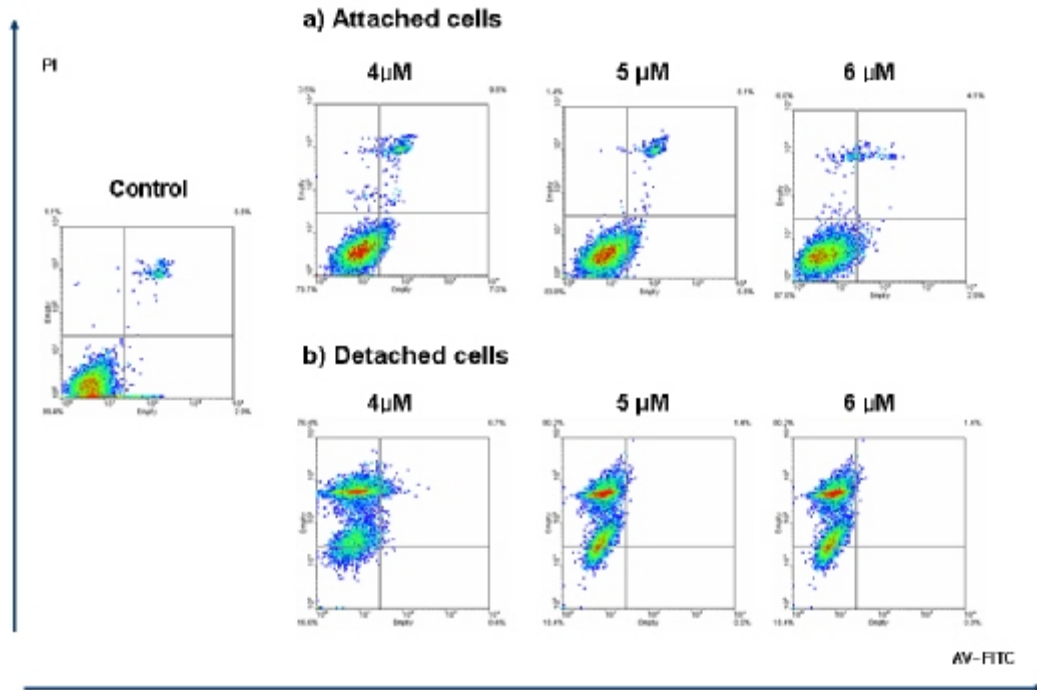
따라서 시료에 의한 세포사멸 유도 및 유도된 세포자살의 경향을 확인 할 수 있다. 누룩치 추출물을 2시간 처리 시 0.05mg/ml 농도에서 early apoptosis(53.9%)가 일어나는 대장암 세포가 현저히 증가하였으나 24시간 처리시에는 late apoptosis(36.2%)가 현저히 증가 하였다(그림 12). 또한 누룩치 추출물과 BS-IV 처리시 배양 dish에 부착된 세포들에서는 세포자살이 거의 일어나지 않는 반면 떨어진 세포에서는 late apoptosis 및 necrosis가 일어나는 것으로 보아(그림 13) 누룩치 추출물과 BS-IV는 대장암 세포주의 부착을 억제함으로써 세포자살을 유도하는 것으로 생각된다.

[그림 12] 대장암 세포에서 누룩치 추출물의 세포사멸 유도능



	Late apoptosis or necrosis
Viable cells	Early apoptosis

[그림 13] 대장암 세포에서 BS-IV의 세포사멸 유도능



3) 암전이 억제 효능

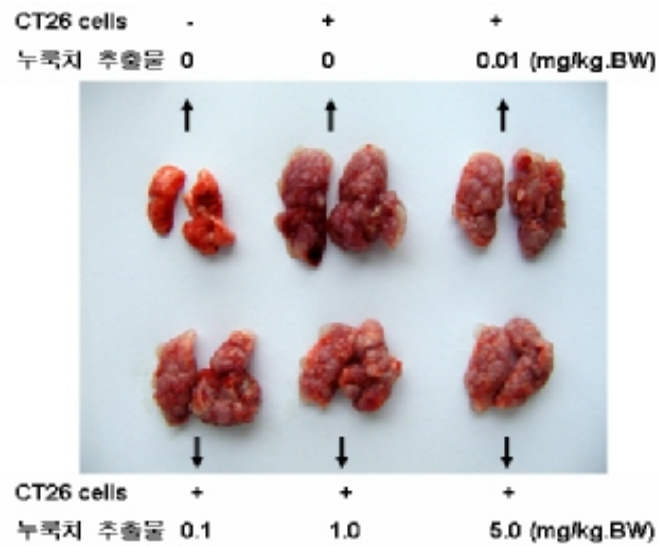
Balb/c 생쥐의 꼬리 정맥으로 대장암 세포인 CT-26 세포를 주입하면 암세포가 폐로 전이되어 폐에서 암세포가 증식하게 된다. 본 실험에서는 누룩치 추출물 및 누룩치 추출물의 유효성분인 BS-IV가 대장암 세포에 의한 폐 전이(lung metastasis)를 억제하는지 조사하였다. 실험결과, 누룩치 추출물(표 3) 및 BS-IV(표 4)를 매일 생쥐에 복강주사 한 군에서 폐 전이가 용량의존적으로 억제되는 것을 관찰하였다. 폐를 떼내어 관찰한 결과 (그림 14), 누룩치 추출물 및 BS-IV를 투여하지 않고 대장암 세포만을 꼬리정맥으로 주입한 양성 대조군과 비교하였을 때, 누룩치 추출물 및 BS-IV를 매일 복강 주사한 군에서 종양결절의 크기가 더 작을 뿐만 아니라 종양결절의 수도 유의적으로 감소되는 것을 관찰하였다 (그림 15, 16). 대장암 세포가 전이되어 현저히 증가된 폐의 무게도 누룩치 추출물 및 BS-IV를 투여한 군에서 용량의존적으로 감소되었다 (그림 15, 16).

[표 3]. 대장암 세포로 유도된 폐 전이에서 종양결절 생성에 대한 누룩치 추출물의 효과

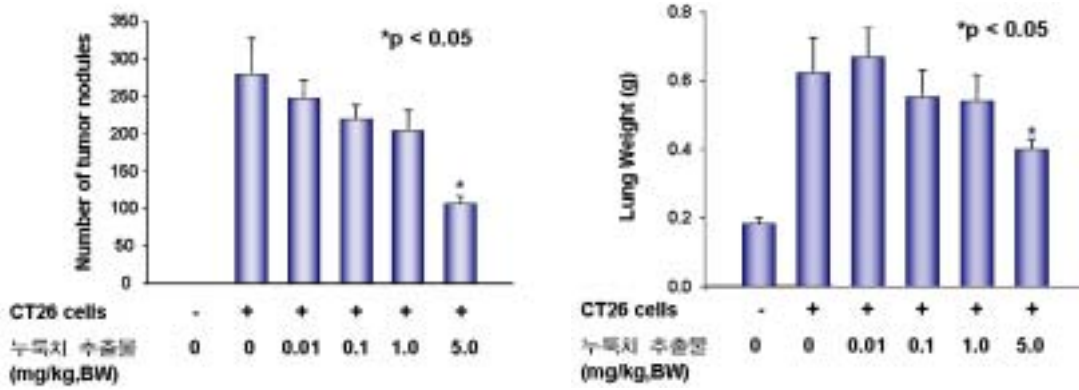
누룩치 추출물의 농도 (mg/kg, BW)	전이이 일어난 폐의 무게(g)	종양결절(tumor nodule) 의 수	암전이 억제능 (%)
media +용매	0.182 ± 0.0189	0	
CT26 cells+추출물 0	0.623 ± 0.103	280 ± 48.3	
CT26 cells+추출물 0.01	0.670 ± 0.0850	247 ± 25.0	11.9
CT26 cells+추출물 0.1	0.553 ± 0.0786	219 ± 19.5	21.8
CT26 cells+추출물 1.0	0.540 ± 0.0777	204 ± 28.0	28.1
CT26 cells+추출물 5.0	0.333 ± 0.0033	106 ± 11.0	62.1

*BW: body weight, 용매: 에탄올-tween 20-PBS (1:1:8)

[그림 14] 대장암 세포의 폐 전이에 대한 누룩치 추출물의 억제 효능



[그림 15] 대장암 세포로 유도된 폐 전이에서 종양결절 생성 및 폐 무게 증가에 대한 누룩치 추출물의 억제 효능

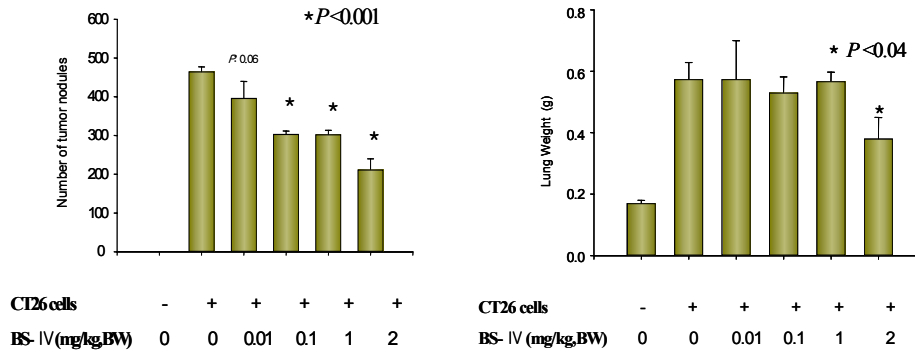


[표 4]. 대장암 세포로 유도된 폐 전이에서 종양결절 생성 및 폐의 무게 증가에 대한 BS-IV의 효과

BS-IV의 농도 (mg/kg, BW)	전이 발생 폐의 무게(g)	종양결절(tumor nodule)의 수	암전이 억제능 (%)
배지+용매	0.17 ± 0.01	0	
CT26 cells+B.S IV 0	0.57 ± 0.03	462 ± 7.8	
CT26 cells+B.S IV 0.01	0.57 ± 0.73	396 ± 25.1	14.1
CT26 cells+B.S IV 0.1	0.53 ± 0.03	303 ± 5.0	34.3
CT26 cells+B.S IV 1	0.57 ± 0.18	302 ± 6.5	34.5
CT26 cells+B.S IV 2	0.38 ± 0.04	212 ± 16.3	52.9

BW: body weight, 용매: 에탄올-tween 20-PBS (1:1:8)

[그림 16] 대장암 세포로 유도된 폐 전이에서 종양결절 생성 및 폐 무게 증가에 대한 BS-IV의 억제 효능



4. 고찰

넝쿨의 잎과 줄기 추출물은 용량의존적으로 항산화, 항염증, 항돌연변이 효능을 나타냈으며, 사람 대장암 세포주에서 암세포의 세포사멸을 유도하였다. 누룩치 추출물과 유효성분인 buddlejasaponin IV는 cyclooxygenase의 발현을 억제함으로써 항염증 효능을 나타내며, 사람 대장암 세포에서 암세포의 세포사멸을 유도하였다. 또한 동물모델에서 암세포가 폐로 전이되는 것을 억제하였다. 따라서 넝쿨 및 누룩치 추출물은 항염증, 암예방 및 항암 효능이 우수한 기능성 식품 소재로 개발 가능성이 매우 높은 것으로 생각된다.

8절 생물반응기를 이용한 대량증식

1. 서론

자원의 중요성이 국제적으로 확산됨에 따라 우리나라는 1994년 생물다양성협약에 가입하였

으나 국제적 흐름에 수동적으로 접근하고 있는 실정이고 국제교역 요구에 따라 수입개방 압력에 어려움을 겪고 있다. 세계적으로 이용되고 있는 약초의 종류는 4,000 여종 되나 우리나라에서 재배되거나 야생에서 실제로 이용되는 식물은 300여종에 불과하다. 이 중에서 생산에 필요한 번식 및 재배방법 등이 개발되어 있는 약초는 100여종에 불과한 실정이다. 식물을 산업적으로 대량생산하기 위하여 최근 생물반응기를 이용한 배양방법이 이용되고 있다. 생물반응기는 재래적 조직배양에 비해 대규모화할 수 있고, 배양체의 연중생산이 가능하며, 자동화가 가능하여 생산비를 최소화할 수 있다. 또한 최적조건의 구멍으로 배양 식물체 및 그 밖의 배양체 등을 대량생산할 수 있어 향후 지속적인 연구가 이루어질 경우 이차 대사산물의 대량생산이나 식물의 기내생산에 많이 이용될 것으로 전망된다.²²⁾ 생물반응기를 이용하여 식물세포,²³⁻²⁶⁾ 체세포배²⁷⁻⁴⁰⁾ 및 신초,²⁵⁾ 괴경,²³⁾ 자구³⁹⁾ 등 식물조직을 배양한 연구와 대규모화하여 대량생산의 실용화가 연구되었다.^{33-34,38,40)} 생물반응기에서의 체세포배의 대규모 생산은 알팔파, 자작나무, 당근, 커피, 가문비나무, 고구마 등에서 이루어졌고³⁰⁾ 기관배양은 감자,²⁴⁾ *Stevia rebaudiana*²⁶⁾ 및 난³³⁾ 등을 대상으로 하였다. 특히, 생물반응기를 이용한 산삼의 대량증식체계는 실용화 되었으나 그 외의 기능성 약용식물의 번식, 재배관리 및 대량생산기술 등에 관한 연구는 미흡한 실정이다. 생물반응기를 이용한 대량증식방법은 대체로 첫째, 배발생 캘러스 유도 및 증식, 체세포발생, 신초 급속증식 액체배양조건 확립이다. 둘째, 생물반응기 배양공정의 최적화로서 배양의 온도, pH, 환기, 생체밀도, 영양원 농도 등 배양 환경조건의 최적화이다.

따라서 본 연구는 한국특산 식물을 포함한 재배면에서 고랭지에서 유리한 넘취, 누룩치, 식물을 대상으로 조직배양 및 생물반응기를 이용한 증식방법의 효율을 높이고 순화방법구명 등 대량증식체계의 확립하고자 수행하였다.

2. 재료 및 방법

본 시험은 2003~2005년 3년 동안 넘취, 누룩치를 이용하여 대량증식체계를 위하여 수행하였다.

가. 배발생 캘러스 유도 및 증식

절편부위는 자엽, 정단, 엽병을 이용하였고, 성장조절제는 2,4-D(오옥신)와 BA(사이토키닌)를 0~1mg/l 처리로 캘러스 유도 적정 농도 구명하였으며 환경조건으로 광주조건(명, 암) 및 적

합한 배지 무기물농도 조사하였다.

나. 우량 세포주 선발 및 체세포배 발생은 육안선택을 하였다.

다. 현탁배양조건 확립

현탁배양시 적합한 2,4-D 농도, 무기물농도, 탄소원 농도를 구명하였다.

라. 기내 식물체 급속증식

절편부위는 자엽, 정단부위로 하였고, 성장조절제는 BA와 zeatin은 0~4 mg/l, TDZ는 0~1mg/l 처리로 신초 유도에 적합한 성장조절제와 그 농도를 구명하였다. 신초증식에 적합한 무기물농도, 적정온도, 배지의 견고제 유무(액체, 고체), 광강도 조사하였다.

마. 기내식물 액체배양조건 확립

액체배양시 기내 식물 증식에 적합한 시토키닌 농도, 무기물농도, 탄소원 농도 조사하였다.

바. 생물반응기를 이용한 넘취 대량증식

시험재료는 자생종인 넘취를 이용하여 신초유도를 위하여 절편부위는 성장점을 배양하였고 성장조절제는 BA(0, 0.1, 1 mg · L⁻¹), NAA(0, 0.1, 1 mg · L⁻¹), 배양방법은 Immersion, Ebb & flood, Raft를 이용하였고 Aeration은 0.1vvm, 배양액 공급(Ebb & flood)은 15분마다 15분간 공급하였으며 식물체 순화는 시험 1과 같았다.

사. 생물반응기를 이용한 누룩치 대량증식

시험재료는 한국 특산종인 누룩치를 기내 증식을 위한 기초 조직배양 조건 확립을 위하여 (1) 절편부위 및 cytokinin의 종류와 농도에 따른 누룩치 신초형성 시험에서는 배지종류는 MS배지,³²⁾ 성장조절제는 BA(0.5, 1.0, 2.0, 4.0 mg/L), TDZ(0.02, 0.10, 0.50, 1.00 mg/L), 절편부위는 정단, 엽, 엽병을 처리하였다. (2) 유도된 신초덩어리의 유지 증식을 위하여 1) TDZ과 NAA의 농도에 따른 누룩치 신초덩어리의 기내 생육시험에서는 배지종류는 MS배지, 식물생장조절물질은 TDZ(0.02, 0.1 mg/L, NAA - 0, 0.1 mg/L), 2) 배지종류에 따른 누룩치 신초덩어리의 기내 생육시험에서는 배지종류는 1/2MS, MS, N6, B5, 식물생장조절물질은 TDZ(0.1 mg/L), NAA(0.1 mg/L)를 공급하였다. (3) 생물반응기 배양방법에 따른 누룩치 기내 생육시험에서는 1) 생물반응기 종류는 balloon type, 2) 생물반응기 배양방법은

immersion, raft, ebb & flood, 다) 배지조성은 1/2MS + TDZ 0.1 mg/L + NAA 0.1 mg/L 을 사용하였고 절편체당 신초수, 생체중, 건물중 등을 조사하였다.

3. 실험결과 및 고찰

가. 넘취 기내 증식

(1) 넘취의 켈러스 배양

넘취의 기내 증식을 위하여 자엽, 정단 및 엽병으로부터 켈러스를 유도한 결과 2,4-D 1mg/l와 BA 0.1mg/l가 첨가된 MS 배지에 치상한 정단에서 켈러스 발생이 가장 양호하였는데(표 1), Reisch가³⁶⁾ 고농도의 BA처리에 의해 신초 길이가 억제되었다는 보고와 일치하였다.

발생한 켈러스의 지속적인 증식을 위하여 MS 배지를 농도별로 처리한 결과 1/2MS에서 가장 높은 켈러스 무게를 나타내었다 (그림 1). 광의 유무에 따른 켈러스 증식은 암상태로 배양한 켈러스가 명상태로 배양한 켈러스보다 높은 무게를 나타내었다(그림 2). 그러나 모든 처리구에서 배양과정 중 페놀 화합물이 다량으로 나오면서 고사하거나 증식이 억제되어 넘취의 증식방법으로 켈러스를 이용하는 것은 적합하지 않다고 생각된다.

표 1. 넘취의 자엽, 정단 및 엽병으로부터 켈러스 유도

생장조절제 (mg/l)		자엽	정단	엽병
2,4-D	BA			
1.0	1.0	+	+	+
0.1	0.1	-	-	-
0.0	0.0	-	-	-
1.0	0.1	+	++	+
0.1	0.0	-	+	-
0.0	1.0	-	-	-
1.0	0.0	+	+	+
0.1	1.0	-	+	-
0.0	0.1	+	+	-

- : 무반응, + : 불량, ++ : 양호, +++ : 우수

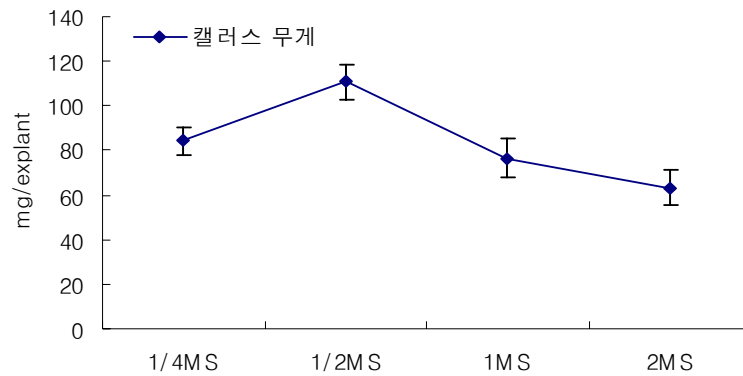


그림 1. 넙취의 캘러스 증식에 적합한 MS 배지의 무기물 농도

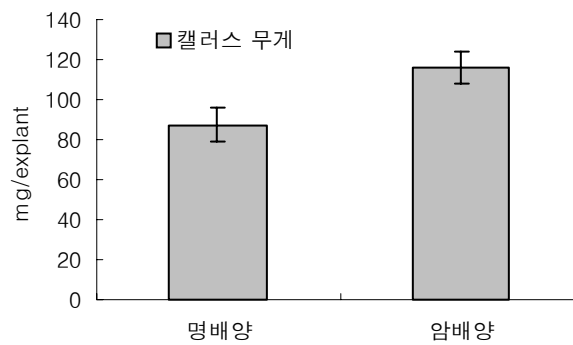


그림 2. 명배양 및 암배양이 넙취의 캘러스 증식에 미치는 영향 조사

(2) 넙취의 신초 배양

넙취의 자엽, 정단 및 엽병으로부터 신초를 유도한 결과, 넙취의 정단을 BA 1mg/l 첨가한 MS 배지에서 배양했을 때 가장 높은 신초형성율과 신초수를 나타내었다(표 2).

Moon 등(1999)은³¹⁾ 미선나무의 기내 증식을 위하여 BA의 처리는 다신초 유도에 효과적이었으나, zeatin과 kinetin의 효과는 저조했다고 한 결과와 신초 형성율, 신초수 면에서 일치하는 경향이였다.

표 2. 넘취의 자엽, 정단 및 엽병으로부터 신초 유도

생장조절제(mg/l)	자엽		정단		엽병	
	신초형성율 (%)	신초수	신초형성율 (%)	신초수	신초형성율 (%)	신초수
무처리	0.0	0.0d ^z	86.7	1.0d	0.0	0.0c
BA	0.50	0.0	100.0	1.8cd	0.0	0.0c
	1.00	6.7	100.0	4.6a	10.0	1.4b
	2.00	13.3	100.0	4.0ab	8.3	1.8ab
	4.00	0.0	83.3	1.6cd	16.7	2.2ab
zeatin	0.50	0.0	86.7	1.2d	0.0	0.0c
	1.00	0.0	100.0	1.6cd	11.7	1.4b
	2.00	0.0	95.0	2.8bc	6.7	1.4b
	4.00	16.7	83.3	2.2cd	20.0	2.8a
TDZ	0.02	0.0	100.0	1.6cd	0.0	0.0c
	0.10	0.0	95.0	3.6ab	16.7	2.2ab
	0.50	18.3	73.3	2.0cd	13.3	1.8ab
	1.00	0.0	78.3	1.4d	13.3	2.2ab

^zMean separation within columns by Duncan's test, 5% level.

유도된 넘취 신초를 계속 증식하기위해서 MS 배지의 농도, 배양 온도 및 광강도를 조사한 결과, MS 배지농도는 1/2~1MS에서 가장 높은 신초수와 신초무게를 나타내었고(표 3), 온도는 신초수에서는 22~26℃에서 가장 많은 수를 나타내었으며, 신초무게는 18~26℃에서 가장 많이 증가하였다(표 4). 광강도에 있어서 25~50 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 에서 신초수가 가장 많았고, 신초무게는 50 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 에서 가장 많이 증가하였으며 100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 의 높은 강도에서는 신초수, 신초무게 모두 억제되었다(표 5).

표 3. 넙취의 신초 증식 및 생장에 적합한 MS 배지의 무기물 농도

배지 농도	신초수	신초무게(mg/plantlet)
1/4MS	3.4 ^{b*}	313.7 ^b
1/2MS	6.1 ^a	437.0 ^a
1MS	6.5 ^a	451.0 ^a
2MS	2.8 ^b	267.8 ^b

*Mean separation within columns by Duncan's test, 5% level.

표 4. 넙취의 신초 증식 및 생장에 적합한 온도

온도(°C)	신초수	신초무게(mg/plantlet)
18	5.4 ^{b*}	419.9 ^a
22	6.6 ^{ab}	453.3 ^a
26	7.2 ^a	488.9 ^a
30	3.4 ^c	286.2 ^b

*Mean separation within columns by Duncan's test, 5% level.

표 5. 넙취의 신초 증식 및 생장에 적합한 광강도

광강도 (umol/m ² /s)	신초수	신초무게(mg/plantlet)
25	5.9 ^{a*}	415.0 ^b
50	5.4 ^a	504.8 ^a
100	3.9 ^b	358.7 ^b

*Mean separation within columns by Duncan's test, 5% level.

대량생산에 이용되는 생물반응기 배양방법을 도입하기 위해서는 우선 액체배양이 가능해야 하는데, 넙취의 대량증식을 위해서 액체 및 고체배양을 한 결과, 신초수는 처리간의 유의차

가 없었으나 신초무게는 액체배양시 고체배양보다 더 높게 나타나 생물반응기 도입의 가능성을 나타내었다(표 6).

표 6. 액체 및 고체 배양이 넘취의 신초 증식 및 생장에 미치는 영향 조사

배지 물리성	신초수	신초무게(mg/plantlet)
액체	6.8 ^{a*}	615.1 ^a
고체	6.0 ^a	426.7 ^b

*Mean separation within columns by Duncan's test, 5% level.

또한 액체배양에 따른 적합한 성장조절제(BA) 농도, 무기물 농도 및 탄소원 흡수 정도를 조사한 결과, BA 1mg/l에서 신초수와 신초무게 모두 각각 6.2개와 627.2mg으로 가장 양호하였고(표 7), 배지농도와 배지내 당농도는 각각 1/2MS로 농도를 낮춘 처리구와 30g/l의 처리구에서 신초수와 신초무게 모두 가장 양호한 생장을 나타내었다(표 8, 9, 그림 3).

표 7. 액체배양시 넘취의 신초 증식 및 생장에 적합한 BA 농도

BA (mg/l)	신초수	신초무게(mg/plantlet)
0.5	4.3 ^{b*}	585.3 ^a
1.0	6.2 ^a	627.2 ^a
2.0	6.6 ^a	451.3 ^b

*Mean separation within columns by Duncan's test, 5% level.

표 8. 액체배양시 넘취의 신초 증식 및 생장에 적합한 MS 배지의 무기물 농도

배지 농도	신초수	신초무게(mg/plantlet)
1/4MS	5.7 ^{b*}	590.6 ^b
1/2MS	7.1 ^a	696.7 ^a
1MS	6.5 ^{ab}	558.5 ^b
2MS	4.3 ^c	404.1 ^c

*Mean separation within columns by Duncan's test, 5% level.

표 9. 액체배양시 넘취의 신초 증식 및 생장에 적합한 탄소원 농도

Sucrose (g/l)	신초수	신초무게(mg/plantlet)
10	5.2 ^{b*}	485.8 ^c
20	6.9 ^a	647.7 ^b
30	7.3 ^a	721.6 ^a
40	5.9 ^{ab}	530.2 ^c

*Mean separation within columns by Duncan's test, 5% level.



그림 3. 액체배양시 탄소원 농도에 따른 넘취의 생장

나. 누룩치 기내 증식

(1) 누룩치의 켈러스 배양

누룩치의 기내 증식을 위하여 자엽, 정단 및 엽병으로부터 켈러스를 유도한 결과 2,4-D 1mg/l와 BA 0.1mg/l가 첨가된 MS 배지에 치상한 정단에서 켈러스 발생이 가장 양호하였다(표 1). 발생한 켈러스의 지속적인 증식을 위하여 MS 배지를 농도별로 처리한 결과 1MS에서 가장 높은 켈러스 무게를 나타내었다(그림 4). 또한 암배양시 켈러스의 증식은 더욱 촉진되었다(그림 5).

표 10. 누룩치의 자엽, 정단 및 엽병으로부터 캘러스 유도

생장조절제 (mg/l)		자엽	정단	엽병
2,4-D	BA			
1.0	1.0	+	++	+
0.1	0.1	-	+	+
0.0	0.0	-	-	-
1.0	0.1	+	+++	++
0.1	0.0	-	++	+
0.0	1.0	-	+	+
1.0	0.0	+	++	+
0.1	1.0	++	+	+
0.0	0.1	-	+	-

- : 무반응, + : 불량, ++ : 양호, +++ : 우수

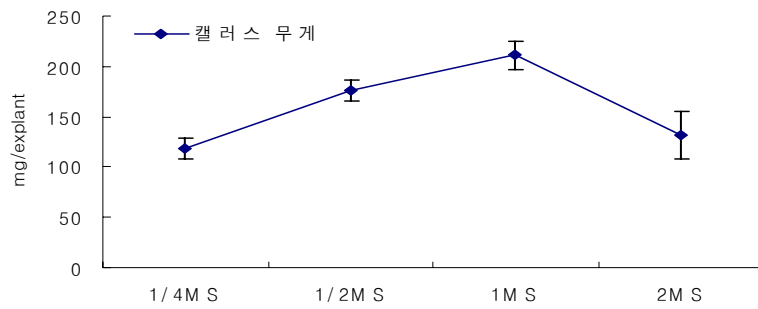


그림 4. 누룩치의 캘러스 증식에 적합한 MS 배지의 무기물 농도

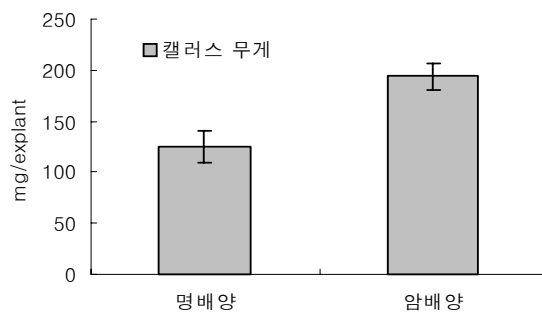


그림 5. 명배양 및 암배양이 누룩치의 캘러스 증식에 미치는 영향 조사

위(표 10, 그림 4, 5)에서 증식된 켈러스 중 증식이 잘되고 신초로 발육이 잘될 것으로 예상되는 켈러스를 선발하였는데 노란색을 띄면서 구형의 모양을 한 YG line과 미백색이면서 YG line에 비하여 작은 구형인 WG line, 그리고 연한 노란색으로 입자가 매우 작은 형태인 PY line인 3가지 line을 선발하였다(그림 6). 이러한 켈러스의 증식정도를 알아보기 위하여 켈러스 증식배지에 배양해본 결과 켈러스 증식은 PY line이 가장 잘되는 것으로 나타났다(그림 7).



그림 6. 누룩치의 우량 세포주 선발

YG : Yellow Globular, WG : White Globular, PY : Pale Yellow

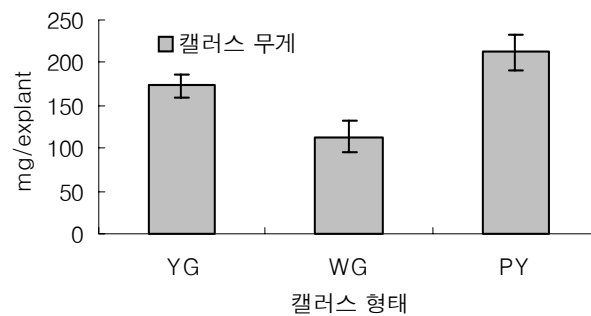


그림 7. 누룩치 켈러스 종류에 따른 성장차이

YG : Yellow Globular, WG : White Globular, PY : Pale Yellow

이렇게 증식된 캘러스를 대량증식하기 위하여 액체배양조건에서 배양한 결과는 그림 8~11과 같다. 2,4-D 농도는 1mg/l에서 캘러스 무게가 가장 많이 증가하였고(그림 8), MS 배지의 농도는 1/2MS에서 가장 많이 증가하였다(그림 9). 탄소원으로 sucrose를 10~40g/l의 농도로 처리한 결과, sucrose 20g/l 가 가장 많은 증가를 나타내었다(그림 10~11).

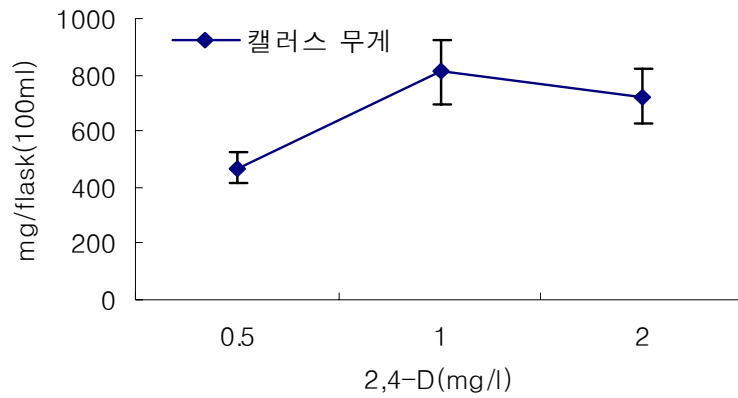


그림 8. 현탁배양시 누룩치의 캘러스 증식에 적합한 2,4-D 농도

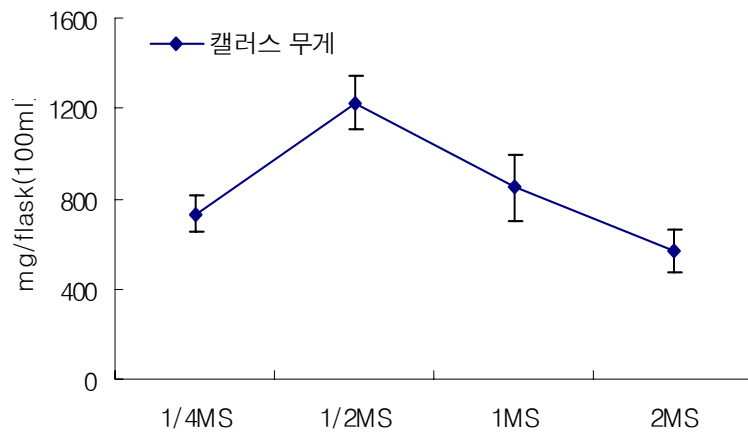


그림 9. 현탁배양시 누룩치의 캘러스 증식에 적합한 MS 배지의 무기물 농도

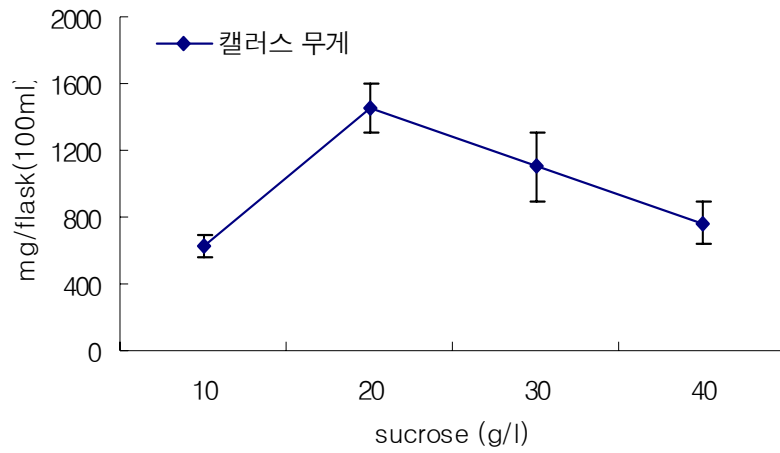


그림 10. 현탁배양시 누룩치의 켈러스 증식에 적합한 탄소원 농도

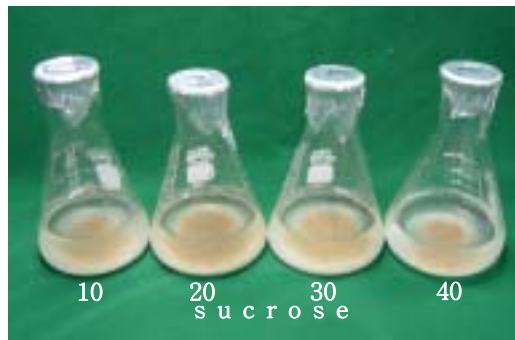


그림 11. 현탁배양시 탄소원 농도에 따른 누룩치 켈러스의 생장

(2) 누룩치의 신초 배양

누룩치의 자엽, 정단 및 엽병으로부터 신초를 유도한 결과, 념취의 정단을 TDZ 0.5mg/l 첨가한 MS 배지에서 배양했을 때 가장 높은 신초형성율과 신초수를 나타내었다(표 11).

표 11. 누룩치의 자엽과 정단으로부터 신초 유도

생장조절제(mg/l)	자엽		정단		엽병		
	신초형성율(%)	신초수	신초형성율(%)	신초수	신초형성율(%)	신초수	
무처리	0.0	0.0 ^{b*}	93.3	1.0 ^f	0.0	0.0 ^c	
BA	0.50	0.0	100.0	1.2 ^{ef}	0.0	0.0 ^c	
	1.00	0.0	100.0	2.2 ^{cde}	3.3	0.8 ^{ab}	
	2.00	0.0	96.7	2.4 ^{cd}	0.0	0.0 ^c	
	4.00	8.3	1.2 ^a	86.7	1.6 ^{cdef}	6.7	0.6 ^b
zeatin	0.50	8.3	0.0 ^b	100.0	1.4 ^{efd}	0.0	0.0 ^c
	1.00	16.7	0.0 ^b	85.0	2.6 ^{bc}	11.7	1.0 ^{ab}
	2.00	13.3	1.2 ^a	90.0	2.2 ^{cde}	3.0	0.8 ^{ab}
	4.00	23.3	1.6 ^a	100.0	2.6 ^{bc}	0.0	0.0 ^c
TDZ	0.02	5.0	0.0 ^b	100.0	1.2 ^{ef}	0.0	0.0 ^c
	0.10	10.0	1.6 ^a	96.7	3.4 ^{ab}	16.7	1.8 ^a
	0.50	6.7	1.0 ^a	100.0	3.8 ^a	23.3	1.4 ^a
	1.00	25.0	1.2 ^a	80.0	2.2 ^{cde}	13.3	1.0 ^{ab}

*Mean separation within columns by Duncan's test, 5% level.

유도된 누룩치 신초를 계속해서 증식하기 위해서 MS 배지의 농도, 배양 온도 및 광강도를 조사한 결과, MS 배지농도는 1MS에서 가장 높은 신초수와 신초무게를 나타내었고(표 12), 온도를 18~30℃로 처리하였을 때 신초수는 18~26℃에서 가장 많은 수를 나타내었고, 신초무게는 22~26℃가 가장 많은 증가를 나타내어, 신초수와 신초무게가 모두 양호한 적정온도는 22~26℃임을 알 수 있었다(표 13). 광강도에 있어서 신초수와 신초무게 모두 25~50umol/m²/s에서 증가하였고, 100umol/m²/s의 높은 강도에서는 억제되는 경향을 나타내었다(표 14).

표 12. 누룩치의 신초 증식 및 생장에 적합한 MS 배지의 무기물 농도

배지 농도	신초수	신초무게(mg/plantlet)
1/4MS	3.6 ^{ab*}	581.7 ^b
1/2MS	3.2 ^{ab}	639.5 ^b
1MS	4.3 ^a	841.5 ^a
2MS	2.8 ^b	428.1 ^c

*Mean separation within columns by Duncan's test, 5% level.

표 13. 누룩치의 신초 증식 및 생장에 적합한 온도

온도(°C)	신초수	신초무게(mg/plantlet)
18	3.8 ^{a*}	599.4 ^b
22	4.5 ^a	803.5 ^a
26	4.3 ^a	671.9 ^{ab}
30	2.7 ^b	416.9 ^c

*Mean separation within columns by Duncan's test, 5% level.

표 14. 누룩치의 신초 증식 및 생장에 적합한 광강도

광강도 (umol/m ² /s)	신초수	신초무게(mg/plantlet)
25	4.0 ^{a*}	865.0 ^a
50	3.5 ^a	713.2 ^a
100	2.4 ^b	430.4 ^b

*Mean separation within columns by Duncan's test, 5% level.

위에서(표11~14) 생산된 누룩치의 신초덩어리를 배지의 물리성 즉, 배지 견고체의 유무에 따라 액체배양 및 고체배양을 한 결과, 신초수는 처리간의 유의차가 없었으나 신초무게는 액체배양시 고체배양보다 더 많은 증가를 나타내었다(표 15).

표 15. 액체 및 고체 배양이 누룩치의 신초 증식 및 생장에 미치는 영향 조사

배지 물리성	신초수	신초무게(mg/plantlet)
액체	5.3 ^{a*}	947.4 ^a
고체	4.8 ^a	790.8 ^b

*Mean separation within columns by Duncan's test, 5% level.

또한 액체배양에 따른 적합한 성장조절제(TDZ) 농도, 무기물 농도 및 탄소원 흡수 정도를 조사한 결과, TDZ 0.1mg/l에서 신초수와 신초무게 모두 각각 4.8개와 863.9mg으로 가장 양호하였고(표 16), 배지농도에서 신초수와 신초무게는 1/4~1MS에서 증가하였고, 2MS에서는

억제되는 경향을 나타내었고(표17), 배지내 당농도에서 신초수는 처리간 유의차가 없었으나, 신초무게는 20g/l의 처리구에서 가장 많이 증가하였다(표 18, 그림 12).

표 16. 액체배양시 누룩치의 신초 증식 및 생장에 적합한 TDZ 농도

TDZ (mg/l)	신초수	신초무게(mg/plantlet)
0.02	3.8 ^{a*}	722.3 ^b
0.10	4.8 ^a	863.9 ^a
0.50	4.0 ^a	758.0 ^b

*Mean separation within columns by Duncan's test, 5% level.

표 17. 액체배양시 누룩치의 신초 증식 및 생장에 적합한 MS 배지의 무기물 농도

배지 농도	신초수	신초무게(mg/plantlet)
1/4MS	4.1 ^{ab*}	790.8 ^a
1/2MS	4.6 ^a	956.5 ^a
1MS	4.3 ^a	831.3 ^a
2MS	3.1 ^b	539.0 ^b

*Mean separation within columns by Duncan's test, 5% level.

표 18. 액체배양시 누룩치의 신초 증식 및 생장에 적합한 탄소원 농도

Sucrose (g/l)	신초수	신초무게(mg/plantlet)
10	4.2 ^{a*}	638.2 ^c
20	5.4 ^a	1118.5 ^a
30	5.0 ^a	856.3 ^b
40	4.4 ^a	600.2 ^c

*Mean separation within columns by Duncan's test, 5% level.



그림 12. 액체배양시 탄소원 농도에 따른 누룩치 성장

다. 생물반응기를 이용한 넘취 대량증식

넘취 성장점을 절취하여 BA와 NAA 농도에 따라 배양한 결과 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BA와 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA가 첨가된 MS배지에서 신초수와 신초무게는 각각 10.5개와 670mg으로 가장 양호한 성장을 하였다(표 19). BA농도에 따른 식물체 생장은 $1.0 > 0.1 >$ 무처리 순으로 나타났고 NAA농도에 따른 식물체 생장은 무처리에 비하여 $0.1, 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 에서 성장량이 많은 경향이였다(표 19). 성장점으로부터 유도된 넘취 신초를 대량증식하기 위하여 Immersion, ebb & flood, raft 3가지 배양방법으로 배양한 결과 신초수와 신초길이는 ebb & flood에서 배양한 식물체가 각각 18.5개와 6.6cm로 가장 양호한 성장을 하였으며, 고체배양에 비해 약 2배 이상 증가하였다. 한편, immersion과 raft는 생물반응기 내에서 각각 57%와 71%의 낮은 생존율을 나타내었는데, 이는 절편체가 배지에 계속해서 침지되어 심한 스트레스를 받았기 때문인 것으로 생각된다 (표 20, 그림 13).

⌘ 19. Effects of concentrations of cytokinins on the shoot formation from growing point of *Lingularia fischeri* var. *spiciformis* after 6 weeks of culture.

Growth regulators(mg · L ⁻¹)		Number of shoots	Shoot length (mm)	Shoot weight(mg)
BA	NAA			
0.0	0.0	2.5 ^{c*}	13 ^{cde}	255 ^e
	0.1	3.0 ^c	17 ^{bcd}	295 ^{de}
	1.0	3.3 ^c	25 ^a	330 ^{de}
0.1	0.0	5.3 ^{bc}	12 ^{de}	388 ^{cd}
	0.1	4.0 ^c	9 ^e	300 ^{de}
	1.0	4.8 ^{bc}	27 ^a	458 ^{bc}
1.0	0.0	5.5 ^{bc}	10 ^e	383 ^{cd}
	0.1	10.5 ^a	20 ^b	670 ^a
	1.0	7.5 ^b	18 ^{bc}	498 ^b

*Mean separation within columns by Duncan's test, 5% level.

⌘ 20. Growth characteristics of *Lingularia fischeri* var. *spiciformis* in bioreactors with three culture methods after 4 weeks of culture.

Culture method	No. shoots	Shoot length (cm)	Shoot weight (g)			Survival rate (%)
			Fresh	Dry	Dry/Fresh (%)	
Immersion	13.0 ^{bc*}	6.1 ^{ab}	4.0 ^a	0.29 ^a	7.3 ^c	57
Ebb & flood	18.5 ^a	6.6 ^a	2.3 ^b	0.22 ^b	9.5 ^b	91
Raft	15.0 ^{ab}	4.9 ^b	1.7 ^c	0.13 ^c	7.7 ^c	71
Solid	9.3 ^c	3.3 ^c	0.5 ^d	0.06 ^d	11.0 ^a	100

*Mean separation within columns by Duncan's test, 5% level.

라. 생물반응기를 이용한 누룩치 대량증식

누룩치의 정단부를 TDZ 0.1 mg/L가 첨가된 MS배지에 배양하였을 때 유도된 신초수는 3.6 개로 가장 많았으며 정단에서는 신초가 계속적으로 유도되었고, 잎과 엽병에서는 부정아로 생각되는 것이 다소 나타났으나 신초로 발육이 진전되지 않았다(표 21, 그림 15).

유도된 누룩치 신초덩어리를 유지 증식하기 위해서 TDZ 0.1mg/L와 NAA 0.1mg/L를 1/2MS 배지에 배양했을 때 가장 양호한 성장을 하였다(표 22, 그림 16).

누룩치 신초덩어리를 생물반응기 내에서 immersion, ebb & flood 및 raft 방식으로 배양한 결과 ebb & flood로 배양한 결과 신초수는 ebb & flood가 6.8개로 가장 많이 증가하여 누룩치 개체증식에는 ebb & flood 배양방식이 적합하다고 생각되었다(표 23, 그림 17). 포도배양의 경우 Raft 배양방식과 공기공급을 한 처리에서 shoot 길이, 마디수, 엽수, 엽면적, 생체중 등에서 양호한 결과를 보인 결과와 다르게 나타나 식물의 환경적응성이 다른 것으로 생각되었다.³⁶⁾



그림 13. Growth of *Lingularia fischeri* var. *spiciformis* in bioreactors with three culture methods after 4 weeks of culture. A : Immersion, B : Ebb & flood, and C : Raft

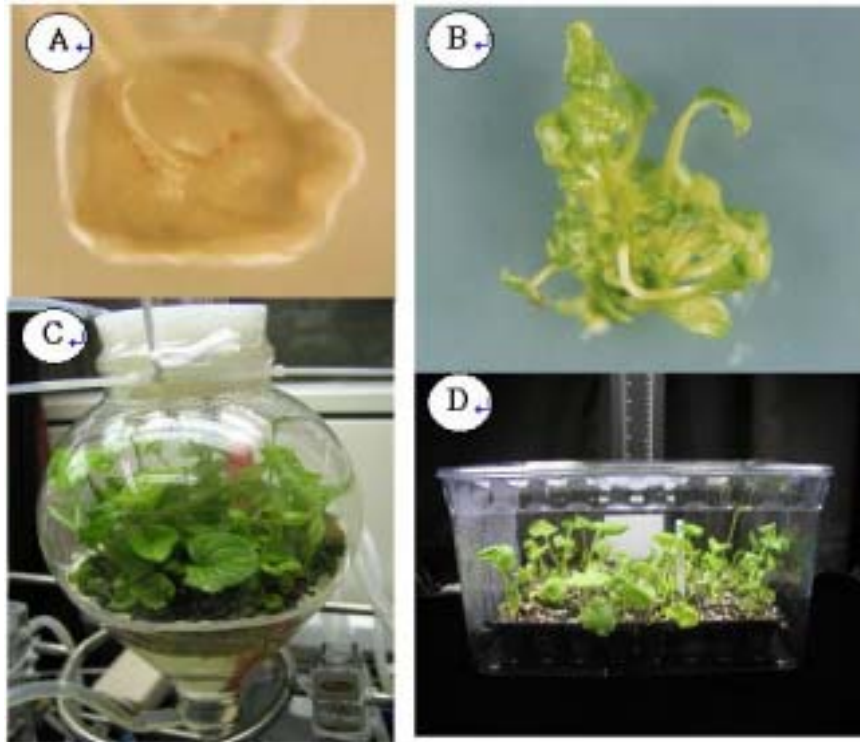


그림 14. Micro-propagation and acclimation of *Lingularia fischeri* var. *spiciformis*.

A : Growth point culture during 6 week.

B : Multiple shoots on MS medium contained $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BA and $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA during 4 weeks.

C : Propagation with bioreactor in MS medium with $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BA and $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA during 4 weeks.

D : Acclimation during 3 weeks.

표 21. 절편부위 및 cytokinin의 종류와 농도에 따른 누룩치 신초형성

Cytokinins (mg/L)	정단		잎		엽병	
	신초형성율 (%)	신초수	신초형성율 (%)	신초수	신초형성율 (%)	신초수
BA	0.50	95	1.7 ^{d*}	0	0	0
	1.00	100	2.2 ^{cd}	0	0	0
	2.00	100	2.8 ^b	0	0	0
	4.00	90	2.1 ^{cd}	0	0	0
TDZ	0.02	100	2.9 ^b	0	0	0
	0.10	100	3.6 ^a	0	0	0
	0.50	95	2.5 ^{bc}	0	0	0
	1.00	80	2.1 ^{cd}	0	0	0

*Mean separation within columns by Duncan's test, 5% level.

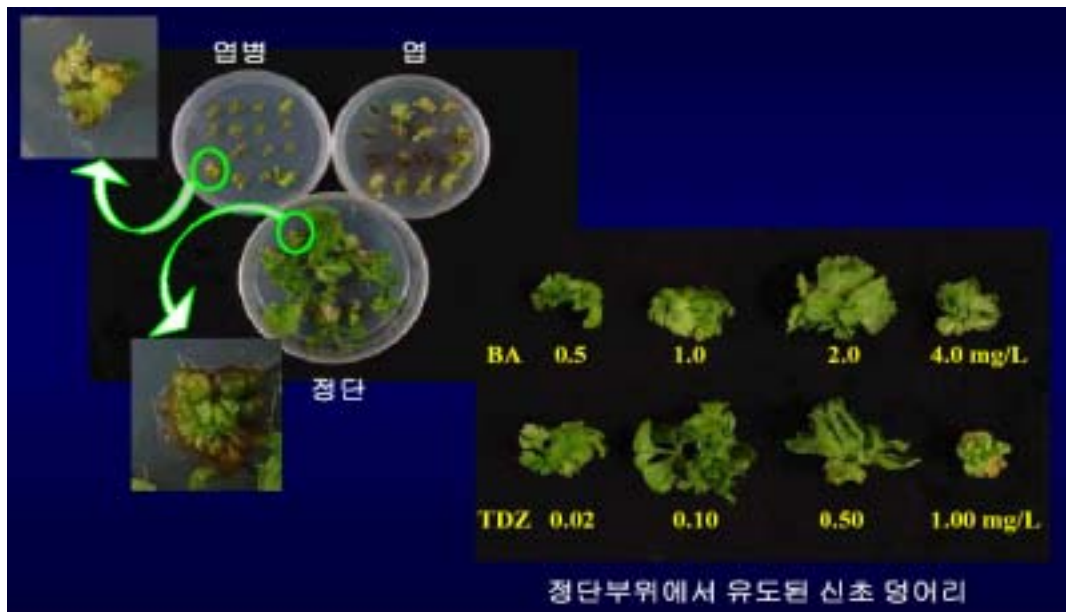


그림 15. 누룩치 절편부위와 cytokinin의 종류와 농도에 따른 신초형성

표 22. TDZ와 NAA의 농도에 따른 누룩치 신초덩어리의 기내 생육

생장조절제 (mg/L)		신초수	신초길이 (cm)	신초생체중 (mg)
TDZ	NAA			
0.02	0.00	4.0 ^{ab*}	2.1 ^a	608 ^b
	0.10	3.8 ^b	1.9 ^a	524 ^b
0.10	0.00	4.6 ^{ab}	2.1 ^a	744 ^b
	0.10	5.2 ^a	2.3 ^a	1050 ^a

*Mean separation within columns by Duncan's test, 5% level.

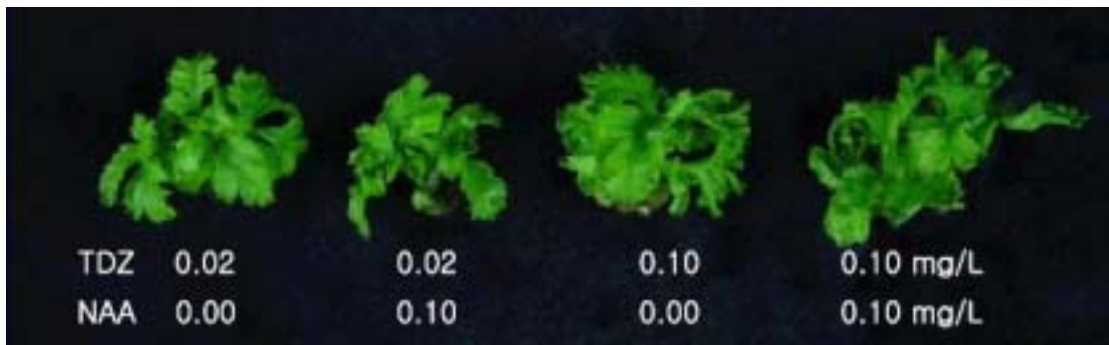


그림 16. TDZ와 NAA의 농도에 따른 누룩치 신초덩어리의 기내 생육

표 23. 배지종류에 따른 유도된 누룩치 신초덩어리의 기내 생육

배지종류	신초수	신초길이 (cm)	신초무게 (mg)
1/2MS	5.5 ^{a*}	2.4 ^a	1097 ^a
MS	3.8 ^{bc}	2.0 ^a	808 ^b
N6	4.4 ^b	2.1 ^a	739 ^{bc}
B5	3.4 ^c	1.8 ^a	605 ^c

*Mean separation within columns by Duncan's test, 5% level.



그림 17. 배지종류에 따른 유도된 누룩치 신초덩어리의 기내 생육

배지조성 : 각 1/2MS, MS, N6, B5 배지에 TDZ 0.1 mg/L와 NAA 0.1 mg/L 첨가

표 24. 생물반응기 배양방법에 따른 누룩치 기내 생육

배지종류	신초수	신초길이 (cm)	신초무게 (mg)
Immersion	4.2 ^{b*}	4.4 ^a	2402 ^a
Ebb & flood	6.8 ^a	4.0 ^a	1944 ^b
Raft	5.0 ^b	3.6 ^a	1420 ^c

*Mean separation within columns by Duncan's test, 5% level.

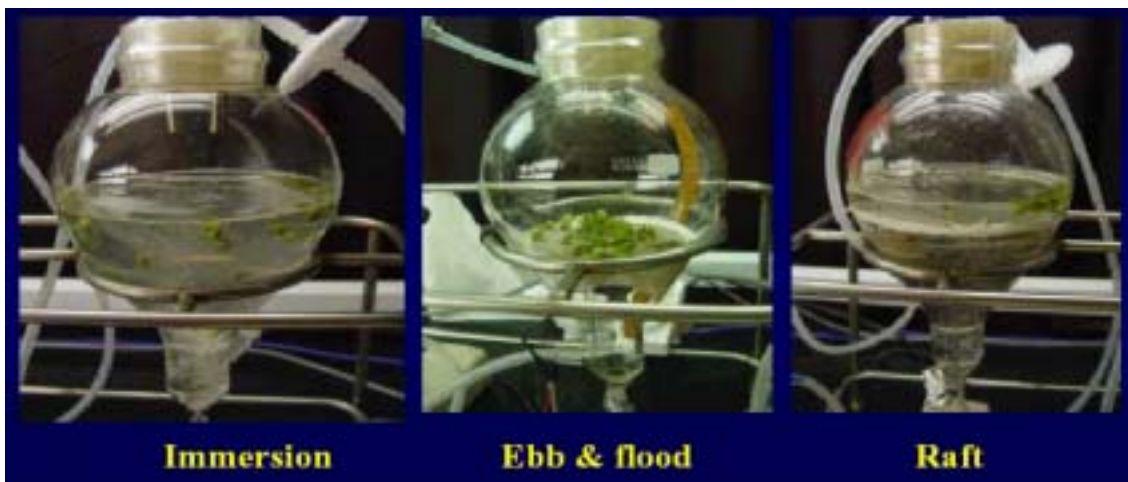


그림 18. 생물반응기 배양시스템. 배지조성 : 1/2 MS + TDZ 0.1 mg/L + NAA 0.1 mg/L

4. 적요

가. 생물반응기를 이용한 넘취 대량증식체계 확립

넘취의 캘러스 유도는 정단을 2,4-D 1 mg/l, BA 0.1 mg/l가 첨가된 MS 배지에 배양했을 때 유도되었고 지속적인 유지를 위해서는 MS 농도를 1/2로 낮추고 암상태로 배양하는 것이 가장 양호하였다. 넘취의 싹은 BA 1 mg/l가 첨가된 MS 배지에 배양된 정단에서 가장 양호하였고, 유도된 싹의 증식에는 BA 1mg/l와 sucrose 30g/l가 첨가된 1/2MS액체배지에서 효과적이었으며, 싹의 생장에 적합한 온도는 26°C, 광강도는 50 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 이었다.

넘취 성장점을 절취하여 BA와 NAA 농도에 따라 배양한 결과 1.0 mg \cdot L⁻¹ BA와 0.1 mg \cdot L⁻¹ NAA가 첨가된 MS배지에서 싹수와 싹무게는 각각 10.5개와 670mg으로 가장 양호한 성장을 하였다. 성장점으로부터 유도된 넘취 싹을 대량증식하기 위하여 Immersion, ebb & flood, raft 3가지 배양방법으로 배양한 결과 싹수와 싹길이는 ebb & flood에서 배양한 식물체가 각각 18.5개와 6.6cm로 가장 양호한 성장을 하였으며, 고체배양에 비해 약 2배 이상 증가하였다. 한편, immersion과 raft는 생물반응기 내에서 각각 57%와 71%의 낮은 생존율을 나타내었는데, 이는 절편체가 배지에 계속해서 침지되어 심한 스트레스를 받았기 때문인 것으로 생각된다.

나. 생물반응기를 이용한 누룩치 대량증식체계 확립

누룩치의 캘러스 유도는 2,4-D 1mg/l, BA 0.1 mg/l가 첨가된 MS 배지에 정단을 암배양했을 때 효과적이었고, 현탁배양시 캘러스 증식은 2,4-D 1mg/l와 sucrose 20g/l를 1/2MS에 배양했을 때 가장 효과적이었다. 누룩치의 싹은 TDZ 0.5 mg/l가 첨가된 MS 배지에 배양된 정단에서 가장 양호하였고, 유도된 싹의 증식에는 TDZ 0.1mg/l와 sucrose 20g/l가 첨가된 1/2MS액체배지에서 효과적이었으며, 싹의 생장에 적합한 온도는 22°C, 광강도는 25 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 이었다. 누룩치의 정단부를 TDZ 0.1 mg/L가 첨가된 MS배지에 배양하였을 때 유도된 싹수는 3.6 개로 가장 많았다. 유도된 누룩치 싹덩어리를 유지 증식하기 위해서 TDZ 0.1mg/L와 NAA 0.1mg/L를 1/2MS 배지에 배양했을 때 가장 양호한 성장을 하였다. 누룩치 싹덩어리를 생물반응기 내에서 immersion, ebb & flood 및 raft 방식으로 배양한 결과 ebb & flood로 배양한 결과 싹수는 ebb & flood가 6.8개로 가장 많이 증가하여 누룩치 개체증식에는 ebb & flood 배양방식이 적합하다고 생각되었다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야의 기여도

넙취와 누룩치의 약리적 유용성분 및 생리활성물질을 탐색 분리 및 정제 추출하고 표준품의 대량생산기술체계를 확립하여 최종적으로 이를 이용한 고수요 고부가 기능성식품을 개발함으로써 국내 식품문화의 향상에 이바지할 뿐만 아니라 상품화를 통한 농가소득제고에 기여하는 것이었다.

넙취에서 terpenoid와 페놀성 성분의 분리는 기대 수준 이상으로 잘 이항되었으며 그 구조의 규명이 명확히 이루어져 넙취의 기능성을 증명하기 위한 필요실험이 성공적으로 수행되었다. 테르페노이드 성분으로 spiciformisin a, b 및 monocyclosqualene, 6-oxoeremophilinolide, intermedeol과 스테로이드 성분으로 β -sitosterol이 분리되었다. 또한 페놀성 성분으로 3,4-dicaffeoylquinic acid, luteolin이 분리되었다. 누룩치로부터 saikosaponin 동족계의 사포닌 성분인 buddlejasaponin IV 및 buddlejasaponin IVa를 분리하였을 뿐 아니라 그 사포닌 saikogenin A 및 saikogenin H를 분리하고 동정하였다. 이 사포닌은 미나리과의 한약인 시호의 성분과 유사한 것으로 나타나 육체피로, 염증성질환에 사용되는 중요한 단서를 얻은 바 세포생물학적으로 특히 염증과 암질환에 대한 효능을 규명하였다.

넙취는 진통효과, 소염효과를 나타내었으므로 향후 관절염에 사용되어 온 넙취의 민간적 용도에 관해서 그 유효성분을 입증할 수 있게 되었다. 또 넙취가 황달 및 간질환에 사용되어 온 바 그 추출물 및 그 성분에 대해 간보호활성에 대해 실험하였다. 특히 사염화탄소 혹은 D-galactosamine 유도 간질환 모델, ANIT 유도 담즙울체 및 DL-ethionine 유도 지방간 모델에서 모두 활성을 나타내었으므로 넙취의 민간적 용도에 관한 유효성분이 DCQA임이 입증되었다. 그 이외에도 넙취의 DCQA가 streptozotocin으로 유도된 고지혈 흰쥐의 cholesterol을 감소시키는 효과가 나타나 동맥경화질환에 유효할 것으로 제시되었다.

그리고 넙취의 메탄올 추출물은 항산화작용, 항염증작용, 항돌연변이 작용을 농도의존적으로 나타내었다. 또 이 추출물은 대장암 세포주인 HT-29 세포에 대한 세포사멸을 유도한 것으로 보아 대장암에 효과가 있음을 밝혔다. 누룩치에서 분리된 buddlejasaponin IV는 COX-2 효소의 억제를 기구로 하는 TPA로 유도된 마우스의 ear edema를 저해하였다. 더욱이 누룩치 추출물과 분리된 buddlejasaponin IV는 대장암 세포주인 HT-29의 세포사멸을 유도하였을 뿐 아니라 암 세포의 lung metastasis를 저해하였다. 이러한 생리활성의 결과는 넙취와 누룩치가 현저한 항염, 항발암효과를 가지는 chemopreventive임을 의미하는 것이다.

생체의 단순 가열 건조나 가열 건조등의 처리 과정에서 생체 본래의 향기가 많이 제거되었

고, 이 정도의 향기 성분의 휘발은 특히 누룩취의 경우에는 초기 이용하는 소비자에게 혐오감을 약화시키는 계기가 될 수 있을 것으로 사료된다. 상기와 같은 넘취와 누룩취에 관한 실험결과의 제공은 향후 강원도 특산식물의 관광상품화 및 기능성 식품개발을 위한 유익한 결과였다고 자평하므로 성공리에 연구목표를 달성하였다고 생각한다.

또, 배발생 캘러스 유도 및 증식을 위해 캘러스 유도 조건인 2,4-D와 BA의 농도, 광조건 및 무기물 농도를 구명하였다. 우량 세포주 선발 및 체세포배 발생을 위해 우량한 형질의 3가지 cell line을 선발하였고, 이로부터 체세포 배를 통한 신초유도 실험을 진행 중이다. 현탁배양시 적합한 2,4-D농도, 무기물농도, 탄소원농도 구명하여 현탁배양조건을 확립하였다. 신초유도에 적합한 절편부위와 성장조절제의 종류와 농도를 구명하였고, 유도된 신초증식에 적합한 무기물농도, 적정온도, 배지의 견고제 유무(액체, 고체), 광강도를 구명하여 기내 식물체 급속 증식법을 확립하였다. 액체배양시 기내 식물 증식에 적합한 시토키닌 농도, 무기물농도, 탄소원 농도를 구명하여 기내 식물 액체배양 조건을 확립하였다.

상기와 같이 넘취와 누룩취는 당초 기대한 이상으로 유망식품 및 기능성식품 원료를 위한 기초자료를 충분히 확보하였으며, 그 이용전망을 잘 밝혔다고 자평한다.

논문으로 SCI 논문 1편, SCI-E 논문 1편, 비 SCI 논문 1편을 각각 게재하였으며 특히 2건 출원, 학술발표회에서 국내 8건, 국외 2건 총 10건을 발표하였다. 그리고 향후 계속해서 본 연구결과를 바탕으로 계속해서 논문을 투고할 것이다.

최종적인 연구평가의 착안점에 대한 평가는 분리성분의 기능성 효능, 대량생산 시스템, 개발제품의 대중화 가능성 및 생리활성의 특이성을 제시하였는데 95% 이상 달성하였다고 생각한다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

본 연구는 순조로이 연구가 수행되었을 뿐 아니라 특히 넘취에서는 페놀성 물질이, 누룩치에서는 사포닌이 각기 기능하고 있음을 밝힌 것이 가장 핵심적인 연구성과이며 추가연구는 불필요한 실정이라고 생각하고 있다. 그러나 부들레자사포닌은 앞으로 더욱 관심을 가지고 연구로서의 가치를 추구할 생각이다.

향후 본 연구결과를 바탕으로 새로운 물질탐색을 위해 국내 미나리과 식물의 사포닌에 대한 집중적인 연구가 요망되는 바 그 연구의 지평을 넓혀나갈 수 있다고 생각된다. 더욱이 이러한 NO 억제 천연물이 콜레스테롤 저하효과와 밀접히 관련되어 있는 점을 감안해 볼 때 동맥경화치료제로서의 가능성이 시사되므로 약리학적으로 지속적인 관심을 가지고 더욱 연구해 볼 가능성이 있다.

또한 넘취는 dicaffeoylquinic acid 성분에 기인한 간보호효과, 항염효과, 항산화효과 등이 우수하게 나타났으므로 민간용도인 황달, 간질환 및 관절염 등에 대한 용도를 잘 규명하였으므로 이에 대한 산업화가 가능하므로 산업체와 접촉하고 있는 중이다. 또한 넘취와 누룩치는 본 연구자들이 특허를 출원하였으므로 산업화를 위한 기술이전을 희망하고 있다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1절. 넘취 관련 식물의 성분과 효능에 관한 정보

넘취의 성분으로 인 (+)-intermedeol은 분화를 나타내는 것으로 보고되어 있다.⁴¹⁾

넘취 성분의 성분으로 dicaffeoylquinic acid 성분이 밝혀졌는데 그 유도체로 caffeic methylester가 NF-kB signaling pathway를 저해하여 진통소염효과를 나타낸다는 보고가 있었다.⁴²⁾

Ligularia 속 식물로부터는 지금까지 여러 타입의 sesquiterpene,⁴³⁻⁴⁶⁾ phenylpropanoid,⁴⁷⁻⁴⁸⁾ pyrrolizidine type alkaloid가⁴⁹⁾ 보고된 바 있으나 넘취에 대한 성분 연구는 본 durn가 처음이다.

Basnet 등⁵⁰⁾은 propolis에서 분리된 dicaffeoylquinic acid의 간보호효과에 대해 보고했지만 그 메커니즘은 규명한 바 없다. 아세트아미노펜이 xenobiotics의 성질을 나타내는 바 본 연구자들은 dicaffeoylquinic acid가 microsomal enzyme의 활성을 감소시키고 free radical scavenging activity를 증가시키는지 실험하였다. 아세트아미노펜의 과잉투여는 간 glutathione의 감소를 일으키고 결국 간세포를 파괴하는 것으로 알려져 있다.⁵¹⁾

간조직에서 cytochrome P450 효소에 의해 아세트아미노펜이 macromolecule에 공유결합하면 매우 반응성이 높은 아릴(aryl)을 생성하고 이것이 간 글루타티온의 고갈을 유도한다고 한다. 적어도 간 글루타티온 50%의 감소는 간괴사에 의한 간독성을 나타낸다고 알려져 있다.⁵²⁻⁵³⁾

Caffeic acid 유도체는 일종의 카테콜성 화합물이라고 할 수 있으며 이러한 것은 많은 약용 식물에 분포되어 있다.⁵⁴⁾ 또 caffeic acid는 항염, 항돌연변이, 항발암 등의 성능을 나타낸다고 알려져 있으며⁵⁵⁻⁵⁸⁾ 이들 중 몇몇은 항산화작용 및 항염작용을 나타내는 것으로 알려지고 있다.⁵⁹⁻⁶¹⁾

2절. 누룩치 관련 성분과 효능에 관한 정보

Luo 등은⁶²⁾ Pleurospermum franchetianum에서 수종의 사포닌을 분리하여 구조를 밝힌 바 있으나 동속의 Pleurospermum kamtschaticum에서는 그 성분에 관한 보고가 없다. 그러

므로 본 연구의 목적은 그 생리활성 성분을 규명하기 위해 식물화학적 연구를 수행하였던 바 이 식물의 주요 사포닌인 2가지 성분을 분리할 수 있었다.

이들 분리된 화합물을 LPS로 유도한 macrophage 264.7 cell의 NO 생성을 억제하는지를 테스트하였다. NO는 다양한 생리적 역할을 하며, 또한 바이러스, 박테리아, 기생충에 대한 면역적 방어에 기여한다. 그러나, 과잉의 NO 생성은 관절염, 당뇨병, stroke, septic shock, 자동면역질환 및 만성염증성 질환, 동맥경화와 같은 각종 질병에 밀접히 연관되어 있다.⁶³⁾

누룩치에서 분리된 buddlejasaponin IV로 *Bupleurum fruticosum*에서 이미 분리된 바 있었으며 이 화합물은 간보호효과를 나타내는 것으로 알려져 있다.⁶⁴⁾ 또 다른 사포닌 중에서는 Taponjou가 *Cussonia bancoensis*에서 분리한 23-hydroxyursolic acid가 NO 억제작용을 가지는 것으로 보고된 바 있다.⁶⁵⁾

미나리과 식물에서 분리된 특이 사포닌으로서는 시호의 saikosaponin 동족계 사포닌이 있는 바 이에 관한 문헌적 정보를 많이 수집할 수 있었다. Shku 등⁶⁶⁾은 saikosaponin C가 내피세포성장과 migration과 angiogenesis가 자해되는 현상을 관찰한 바 있다. Park 등은⁶⁷⁾ *Bupleurum falcatum*에서 분리된 saikosapogenin-A가 실험적으로 유도된 알리지성 천식에 대한 효과를 낸다고 하였으며 Kodama 등⁶⁸⁾은 saikogenin D가 C6 rat glioma cell에서 세포내 칼슘이온의 농도와 prostagladin E₂의 생성을 저해한다고 하였다.

제 7 장 참고문헌

1. Shimizu, K., Amagara, S., and Ogihara, Y. New derivatives of saikosaponins, Chem. Pharm. Bull., 33, 3349-3355 (1985).
2. Ahmad V. U. and Atta-ur-Rahman, Handbook of Natural Products Data Vol. 2, pp. 245-246, Elsevier, Amsterdam (1994).
3. 김룡규, 신경민, 천성국, 지사영, 서성훈, 박희준, 최종원, 이경태: 넘취 정유의 Murine Macrophage Raw 264.7 세포에서 *In vitro* 항염효과, 약학회지 46(5), 343-347 (2002).
4. Guinea, M. C., Parellada, J., Lacille-dubois, and Wagner, H., Biologically active triterpene saponins from *Bupleurum fruticosum*, Planta Medica, 60, 163-167 (1993).
5. Omura, T. and Sato, R., The carbon monoxide binding pigments of liver microsomes In: Evidence for its hemoprotein nature. Journal of Biological Chemistry, 239, 2370-2385 (1964).
6. Nash, T., The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the hantzsch reaction. Journal of Biological Chemistry, 55, 416-422 (1953).
7. Bidlack, W. R., Lowry, G. L., Multiple drug metabolism: p-nitroaniline reversal of acetone enhanced aniline hydroxylation. Biochemical Pharmacology, 31, 311-317 (1982)
8. Reinke, L. A., Meyer, M. J., and Notley, K. A., Diminished rates of glucuronidation and sulfation in perfused rat liver after chronic ethanol administration. Biochemical Pharmacology, 35, 439-447 (1986).
9. Habig, W. H., Pabist, M. J., Jakoby, W. B., Glutathione S-transferase : The first enzymatic step in mercapturic acid formation. Journal of Biological Chemistry, 249, 7130-7139 (1974).
10. Richman, P. G. and Meister, A., Regulation of γ -glutamylcysteine synthesis by nonallosteric feedback inhibition by glutathione. Journal of Biological Chemistry, 250, 1422-1426 (1975).
11. Mize, C. E. and Langdon, R. G., Hepatic glutathione reductase: purification and general kinetic properties. Journal of Biological Chemistry, 237, 1589-1593 (1962).
12. Doll R and Peto R. The Causes of Cancer, New York: Oxford University Press, 1981
13. Weinstein IB, Cancer prevention; recent progress and future opportunities, Cancer

- Res., 51:5080S-5085s, 1991.
14. Weinstein IB, Santella RM and Perera FP, Molecular biology and molecular epidemiology of cancer, In: Greenwald P, Kramer BS and Weed DL (eds.), *Cancer Prevention and Control*, pp83-110, New York: Marcel Dekker, 1995.
 15. Weinstein IB, Carothers AM, Santella RM and Perera FP, Molecular mechanisms of mutagenesis and multistage carcinogenesis, In: Mendelsohn, J, Howley, PM, Israel, MA and Liotta, LA (eds.), *The molecular basis of cancer*, pp59-85, Philadelphia: Saunders, WB, 1995.
 16. Flora DF, Bennicelli C and Bagnasco M, Rationale and mechanisms of cancer chemoprevention, In: Senn HJ, Costa A, Jordan VC(eds.) *Chemoprevention of cancer*, pp29-44, Springer, 1999.
 17. Kelloff GJ, Crowell JA, Steele VE, et al., *Progress in cancer chemoprevention*, 889:1-13, 1999.
 18. DiGiovanni J, Multistage carcinogenesis in mouse skin. *Pharmacol Ther* 54:63-128, 1992.
 19. Hursting SD, Slaga TJ, Fischer SM, DiGiovanni J and Phang JM, Mechanism-based cancer prevention approaches: targets, examples, and the use of transgenic mice, *J. Natl. Cancer Inst.*, 91:215-225, 1999.
 20. Xiong Y, Hannon GJ, Zhang H, Casso D, Kobayashi R, Beach D. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 366:701-704, 1993.
 21. Katso R, Okkenhaug K, Ahmadi K, White S, Timms J, Waterfield MD. Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17:615-675, 2001.
 22. Aitken-Christie, J., T. Kozai, and S. Takayama. 1995. Automation in plant tissue culture. General introduction and overview. pp 1-18. In: Aitken-Christie J., T. Kozai, and M.A.L. Smith (eds.). *Automation and environmental control in plant tissue culture*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
 23. Akita, M. and S. Takayama. 1988. Mass propagation of potato tubers using jar fermentor techniques. *Acta Hort.* 230:55-61.
 24. Akita, M. and S. Takayama. 1993. Induction and development of potato tubers in a jar fermentor. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 36:177-182.

25. Akita, M. and Y. Ohta. 1998. A simple method for mass propagation of potato (*Solanum tuberosum* L.) using a bioreactor without forced aeration. *Plant Cell Rep.* 18:284-287.
26. Akita, M., T. Shigeoka, Y. Koizumi, and M. Kawamura. 1994. Mass propagation of shoots of *Stevia rebaudiana* using a large scale bioreactor. *Plant Cell Rep.* 13:180-183.
27. Baeck, H.W. and K.W. Park. 2001. Effects of substrate and nutrient solution concentration on growth and essential oil content of sweet basil (*Ocimum basilicum*). *Kor. J. Hort. Sci. & Technol.* 19:92-97.
28. Gupta, PK, R Timmis, and W.C. Carlson. 1993. Somatic embryogenesis: A possible tool for large-scale propagation of forestry species. pp 18-37. In: Soh W.Y., J.R. Liu, and A Komamine (eds) *Advances in developmental biology and biotechnology of higher plants.* Kor. Soc. Tiss. Cult., Korea.
29. 고려지농업시험장. 2002. 기능성자생식물을 이용한 고부가가치 상품화 방안. 농촌진흥청.
30. Leather, R.R., M.A.L. Smith, and J. Aitken-Christie. 1995. Automation of the bioreactor process for mass propagation and secondary metabolites. pp 187-214. In: Aitken-Christie J., T. Kozai, and M.A.L. Smith (eds.). *Automation and environmental control in plant tissue culture.* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
31. Moon, H.K., G.Y. Suk, Y.J. Kwon, and S.H. Son. 1999. Micropropagation of a rare species, *Abeliophyllum distichum* Nakai. via axillary bud culture. *Korean J. Plant Tissue Culture.* 26:133-136.
32. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
33. Park, S.Y., H.N. Murthy, and K.Y. Paek. 2000. Mass multiplication of protocorm-like bodies using bioreactor system and subsequent plant regeneration in *Phalaenopsis*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 63:67-72.
34. Preil, W. 1991. Application of bioreactors in plant propagation. pp 425-445. In: Debergh, P.C. and R.H. Zimmerman (eds.). *Micropropagation technology and application.* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
35. Reisch, B.I. 1986. Influence of genotype and cytokinins on in vitro shoot proliferation of grapes. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 111:138-141.
36. Shim, S.W., J.W. Heo, S.K. Kim, and K.Y. Paek. 2001a. Effects of number of air

- exchanges, sucrose and BA on shoot proliferation and growth of 'Cambell Early' grape (*Vitis* hybrid) plantlets. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 42:540-544.
37. Shim, S.W., S.K. Kim, and K.Y. Paek. 2001b. Effects of micro-environmental conditions on organogenesis of 'Beni Izu' grapes. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 42:238-242.
 38. Son, S.H., S.M. Choi, S.R. Yun, O.W. Kwon, Y.H. Lee, and K.Y. Paek. 1999. Large scale culture of plant cell and tissue by bioreactor system. J. Plant Biotech. 1:1-7.
 39. Takahashi, S., K. Matsugara, H. Yamagata, and T. Morimoto. 1992. Micropropagation of virus free bulblets of *Lilium longiflorum* by tank culture. Acta Hort. 319:83-88.
 40. Vasil, I.K. 1994. Automation of plant propagation. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 39:105-108.
 41. Jeong SH, Koo SJ, Choi JH, Park JH, Ha JH, Park HJ, Lee KT: Intermedeol isolated from the leaves of *Ligularia fischeri* var. *spiciformis* induces the differentiation of human acute promyelocytic leukemia HL-60 cells. *Planta Med* 2002; 68: 681-685.
 42. Shin KM, Kim IT, Park YM, Ha J, Choi JW, Park HJ, Lee YS, Lee KT: Anti-inflammatory effect of caffeic acid methyl ester and its mode of action through the inhibition of prostaglandin E₂, nitric oxide and tumor necrosis factor- α production, *Biochemical Pharmacology* 68, 2327-2336 (2004).
 43. Zhao Y, Peng H, Jia Z. Six new eremophilane derivatives from two *Ligularia* species, *Journal of Natural Products*. 1994; 57: 1626-1630.
 44. Gao K, Yang L, Jia Z. New sesquiterpenes from the roots of *Ligularia danta*, *Planta Medica* 1997; 63: 461-463.
 45. Jia Z, Zhao Y, Tan R. New sesquiterpenes from the roots of *Ligularia veitchiana*, *Journal of Natural Products* 1993; 56: 194-499.
 46. Bohlmann F, Fritz U. Isofukinone, an eremophilane from *Ligularia specioforsa*, *Phytochemistry* 1980; 19: 2471-2472.
 47. Zhao Y, Jia Z, Yang L. Sinapyl alcohol derivatives and other constituents from *Ligularia nelumbifolia*, *Phytochemistry* 1994; 37: 1149-1152.
 48. Ma B, Gao K, Shi Y-P, Jia Z-J. Phenol derivatives from *Ligularia intermedia*, *Phytochemistry* 1997; 46: 915-919.
 49. Asada Y, Furuya T. Studies on constituents of crude drugs. XV. New pyrrolizidine alkaloids from *Ligularia dentata*, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 1984; 32:

475-478.

50. Basnet, P., Matsushige, K, Hase, K, Kadota, S., Namba, T., Four di-O-caffeoylquinic acid derivative from propolis. Potent hepatoprotective activity in experimental liver injury models. *Biological Pharmaceutical Bulletin*, 19, 1479-1484 (1996).
51. Miners, J. O., Drew, R., and Birkett, D. J., Mechanism of action of paracetamol protective agent in mice *in vivo*. *Biochemical Pharmacology*, 33, 2995-3000 (1984).
52. Clissold, S. P., Paracetamol and phenacetin. *Drugs*, 4, 46-59 (1986).
53. Prescott, L. F. and Critchley, J. A., The treatment of acetaminophen poisoning. *Annual Review of Pharmacological Toxicology*, 23, 87-101 (1983).
54. Moridani MJ, Scobie H, Jamshidzadeh A, Salehi P, Orlie PJ, caffeic acid, chlorogenic acid, and dihydrocaffeic acid metabolism: glutathione conjugate formation. *Drug. Metab. Dispos.* 2001; 29: 1432-1439.
55. Challi BC, Barlett CD. Possible cocarcinogenic effects of coffee constituents. *Nature* 1975; 254: 533-533.
56. Koshhara Y, Neichi T, Murota S, Lao A, Fujimoto Y, Tapamo T. Caffeic acid is a selective inhibitor for leukotriene biosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta.* 1984; 792: 92-97.
57. Tanaka T, Kojima T, Kawamori T, Wang A, Suzuki M, Okamoto K, Mori M. Inhibition of 4-nitroquinoline-1-oxide-induced rat tongue carcinogenesis by the naturally occurring plant phenolics caffeic, ellagic, chlorogenic and ferulic acids. *Carcinogenesis*, 1993(a); 14: 1321-1325.
58. Tanaka T, Kojima T, Kawamori T, Yoshimi N, Mori M. Chemopreventive of diehtylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis by a simple phenolic acid protocatechuic acid in rats. *Cancer Res.*, 1993(b); 53: 2775-2779.
59. Hsiao G, Shen MT, Chang WC, Cheng WC, Cheng YW, Pan SL, Kuo YH, Chen TF, Shen JR. A novel antioxidant, octyl caffeate, suppression of LPS/IFN-gamma-induced inducible nitric oxide synthase gene expression in rat aortic smooth muscle cells. *Biochem. Biopharm.* 2002; 65: 1383-1392
60. Wells PG, Kim OM, Laposa RR, Nicol CJ, Pharman T, Winn LM. Oxidative damage in chemical teratogenesis. *Mut. Res.* 1997; 396: 2161-2168.
61. Kikujak H, Hisamoto M, Hirose K, Akiyama K, Tamiguchi H. Antioxidant properties

- of ferulic acid and its related compounds. J. Agric. Food. Chem. 2002; 50: 2161–2168.
62. Luo, Y. G., Li, B. G., Zhang, G. L. Four new glycosides from *Pleurospermum franchetianum*, Journal of Asian Natural Products Research, 4, 155–163 (2002).
63. Brecht, D. S., Snyder, S. H., Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 682–685 (1990).
64. Guinea, M. C., Parellada, J., Lacille-dubois, and Wagner, H., Biologically active triterpene saponins from *Bupleurum fruticosum*, Planta Medica, 60, 163–167 (1993).
65. Tapondjou L. A., Lonsti D, Sondengam B. L., Shaheen F., Choudhary M. I., Atta-ur-Rahman, van Heerden F. R., Park H. J., and Lee K. T., Saponins from *Cussonia bancoensis* and their inhibitory effects on nitric oxide production, Journal of Natural Products, 66, 1266–1299 (2003).
66. Shky KG, Tsai SC, Wang BW, Liu YC, Lee CC. Saikosaponin C induces endothelial cells growth, migration and capillary tube formation, Life Science, 76: 813–826 (2004).
67. Park KH, Park J, Koh D, Lim Y. Effect of saikosaponin A, a triterpenoid glycoside, isolated from *Bupleurum falcatum*, Phytotherapy Research, 16: 359–363 (2002).
68. Kodama Y, Xiaochuan L, Tsuchiya C, Ohizumi Y, Yoshida M, Dual effect of saikosaponin D: *in vitro* inhibition of prostaglandin E₂ production and elevation of intracellular free Ca²⁺ concentration, Planta Meica 69: 765–767 (2003).