



# 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “국내자생 뱀무와 배암차즈기로부터 생리활성물질의 분리 및 기능성 식의약소재 개발에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2007 년 5 월 24 일

주관연구기관명 : 농업생명공학연구원

총괄연구책임자 : 조강진

세부연구책임자 : 조강진

연 구 원 : 배신철

연 구 원 : 김정봉

연 구 원 : 김삼선

연 구 원 : 이선주

연 구 원 : 이숙향

협동연구기관명 : 서울벤처정보대학교

협동연구책임자 : 강순아

협동연구기관명 : 경남농업기술원

협동연구책임자 : 김만배

여 백

# 요 약 문

## I. 제 목

국내자생 뱀무와 배암차즈기로부터 생리활성물질의 분리 및 기능성 식의약소재 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

### 1. 필요성

산업의 발달, 식생활의 변화 및 환경오염원들은 인간에게 다양한 질병을 일으키는 원인으로 알려진 생체내의 활성산소의 생성량을 증대시켜 노화, 염증, 동맥경화, 혈관질환 및 암 등과 같은 여러 가지 질병들의 병인임이 밝혀지고 있다. 이러한 성인병의 예방 및 치료를 위하여 자연계에 존재하는 많은 천연물질로부터 활성산소 장해를 방해하는 항산화 물질 등과 같은 생리활성 물질이 많은 주목을 받고 있으며, 21세기의 정밀화학 산업은 식물자원 소재에서 유용 천연물을 탐색하여 고부가가치의 천연색소, 천연향료, 천연농약, 천연 기능성 식품 등과 나아가서 천연약물 등을 창출하고자 하는 연구가 세계적으로 수행되고 있다.

또한, 현재 한국의 농업은 WTO와 미국과 FTA 체결로 대부분의 농산물이 수입개방 됨으로 해서 우리 농산물의 경쟁력 강화가 무엇보다 중요한 이때, 작물의 생산성과 부가가치를 높이고, 기능성 식물자원을 탐색하여 고부가성 작목으로 정착시키는 연구 개발 노력이 절실히 요청되고 있는 시기이다. 또한 국민소득증대에 따른 생활수준 향상이 개인의 건강에 대한 욕구를 증대시켰으나, 의학발달로 인구의 고령화, 공해에 의한 직업병 증가, 스트레스 증가 등은 성인병 즉 당뇨병, 고혈압, 동맥경화증 등의 만성적 퇴행성 질환들을 증가시켜 사회문제로 되고 있다. 따라서 건강 지향적 시대 흐름에 부응하여 국내 자생식물에서 이러한 성인병을 예방할

수 있는 천연 생리활성물질을 탐색하여 건강기능성 식품 및 식의약 소재의 개발이 절실히 필요한 시점이다.

## 2. 목적

본 연구의 최종목표는 국내산 뱀무(*Geum japonicum* THUNBERG)와 배암차즈기(*Salvia plebeia* R. Br.)에서 항산화 활성이 강한 활성물질을 분리정제하여 항비만, 고지혈증, 동맥경화와 같은 성인병의 예방 및 효과 등의 생리활성을 구명하고, 수집된 자원식물의 특성과 재배방법을 구명하여 뱀무와 배암차즈기를 농가 소득 작물로 개발하는 것이다.

## Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 우리나라 자생식물인 뱀무와 배암차즈기를 원료로 항산화성, 및 성인병(고지혈증, 비만, 동맥경화 등)을 예방할 수 있는 선도 소재를 발굴하고 기능성 식품화를 위한 응용기술을 개발하는 것이다. 이를 위한 본 연구개발과제의 연차별 연구개발 목표 및 내용은 다음과 같다.

구분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차 년도 (2004)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 뱀무 및 배암차즈기 자원 수집 및 농업적 특성 조사</li> <li>○ 뱀무 및 배암차즈기의 항산화 활성 검정</li> <li>○ 생리활성 물질 분리</li> <li>○ <i>In vitro</i> 면역 세포 활성 효과 검정</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 유전자원 수집 및 보존포에 증식</li> <li>- 수집종의 특성 조사 : 생육특성 등</li> <li>- 수소공여능 등 항산화성 효과 분석</li> <li>- 유기용매에 의한 대량추출, 극성에 따른 용매분획, silica gel column chromatography 등을 이용한 생리활성 물질 분리</li> <li>- 대식세포주 RAW 264.7 cell 증식을</li> <li>- 대장암 세포주 SNU-C4 cell line 이용하여 MTT assay, SRB assay 등으로 세포사멸 효과 검정</li> </ul>

구분	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위
2차 년도 (2005)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 뱀무 및 배암차즈기 안전 다수확 재배 기술 개발</li> <li>○ 주 생리활성 물질의 분리 및 구조 규명</li> <li>○ 고지혈증 동물 모델을 이용한 성인병 예방효과 작용기전 규명</li> <li>○ 활성물질의 항산화 효과 검정</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 뱀무 재배기술 개발 : 분주 및 이식시기 및 파종기 등</li> <li>- 배암차즈기 재배기술 개발 : 파종량 및 파종기 등</li> <li>- HPLC, 등을 이용한 분리 및 LC-MS, NMR 등을 이용한 구조 분석</li> <li>- Sprague-Dawley계 숫쥐로 고지방식이로 유도된 고지혈증 동물모델을 이용 추출물의 생리활성 검정 : 체중변화량, 사료섭취량측정, 지방세포의 크기 측정, 혈액의 생화학적 분석 (TG, TC, HDL-C, LDL-C, 등)</li> <li>- DPPH radical scavenging 능력 등</li> </ul>
3차 년도 (2006)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 고품질 뱀무 생산기술 개발</li> <li>○ 활성물질의 대량 분리 정제기술 확립 및 식품 소재화 기술 개발</li> <li>○ 뱀무 추출물의 안전성 검정, 활성물질의 세포 및 모델 동물에서 작용기작 규명</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 재배조건별, 수확시기별 품질비교 및 재배방법 확립</li> <li>- 대량 분리 체계 및 정제기술 확립</li> <li>- 성인병 예방 기능성 식품 소재화를 위한 특성 평가 : 소재의 용해성 및 열안정성 평가, 소재의 저장안정성 평가 등</li> <li>- 저, 중, 고농도 등 농도별 단회투여에 의한 독성조사</li> <li>- 농도별 4주 반복 투여에 의한 독성 조사</li> <li>- Cell line을 이용한 항동맥경화 예방 기능</li> <li>- 고지방 식이 유도 비만동물 모델에서 활성물질의 지방세포 분화억제기전, 에너지 소비 단백질 발현, 식욕 조절 비만 단백질 발현 등</li> </ul>



#### IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

##### 1. 뱀무 추출물을 이용한 항비만 및 항염증 효과를 가지는 기능성 식품소재 개발

국내 자생 식물인 뱀무(*Geum japonicum* THUNBERG)에서 메탄올 추출물을 조제한 다음 다시 메탄올 추출물을 헥산, 메칠렌클로라이드, 에칠아세테이트, 물로 분획하여 항비만과 항염증 활성과 관련된 기능성 검정을 실시하여 활성이 높은 분획물을 확인하였다. 뱀무의 분획물 중 에칠아세테이트 분획은 지방세포 분화 억제 작용을 나타내고, 특히 지방의 축적 과정을 조절하는 GPDH 활성과 Triglyceride 축적을 저해하여 미성숙 지방 세포의 지방화 작용을 차단함으로써 항비만 효과를 나타내며, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  등과 같은 초기 염증성 사이토카인(pro-inflammatory cytokine)과 산화질소(NO)의 생성억제를 유도함으로써 항염증 효과를 나타낸다. 따라서 이를 이용한 항비만 및 항염증 효능이 있는 식품 및 의료용 소재로 개발가능성이 있었다. 이 결과는 특허출원하여 현재 특허등록이 결정되었다.

##### 2. 항산화, 항지방화 및 항비만 효과가 있는 배암차즈기 추출물 개발

배암차즈기에서 항산화, 항지방화 활성 물질을 탐색, 분리하여 추출물 특성과 기능을 규명함으로써 인체 내에서 활성산소의 제거, 지방의 합성과 축적을 저해하여 항비만 활성 효과를 갖는 배암차즈기 추출물의 조제방법 및 용도를 개발하였다. 배암차즈기(*Salvia plebeia* R. Br.)의 에칠아세테이트 분획은 지방세포 분화 억제 작용을 나타내고, 특히 지방의 축적 과정을 조절하는 GPDH 활성과 Triglyceride 축적을 저해하여 미성숙 지방 세포의 지방화 작용을 차단함으로써 항비만 효과와 DPPH에 대한 항산화 효과가 우수함을 구명하였다. 따라서 이를 이용한 항비만 및 항산화 효능이 있는 식품 및 의료용 소재로 개발가능성이 있었다. 이 결과는 특허출원하여 현재 심사 중이다.

### 3. 뱀무 추출물 및 분획물을 함유하는 동맥경화증의 예방 또는 치료용 조성물 개발

뱀무(*Geum japonicum* THUNBERG)의 메탄올 및 주정 추출물과 이 추출물의 에칠아세테이트 가용 추출물과 유효성분인 3,4,5-trihydroxybenzaldehyde가 동맥경화 또는 혈관계 질환의 예방 효과가 있음을 구명하였다. 3주령 Sprague-Dawley 중 숫컷 흰쥐를 고지방 식이로 사육하면서 뱀무의 에칠아세테이트 가용 추출물과 유효성분인 3,4,5-trihydroxybenzaldehyde 급이시 혈중 고밀도 콜레스테롤 (HDL-cholesterol)의 수준을 높여주고 중성 지방의 함량을 감소시켜 주었다. 또한, 뱀무 추출물에서 분리한 THBA(3,4,5-trihydroxybenzaldehyde)는 사람 동맥평활근 세포(HASMC)에 대한 독성은 미약하였으며, 사람 동맥평활근 세포(HASMC)가 생성하는 MMP-9(Matrix metalloproteinase)의 활성을 억제하고 TNF- $\alpha$ 에 의해 유도되는 동맥평활근세포의 이주능을 억제하여 줌으로서 동맥경화 및 혈관계 질환을 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였다. 따라서 고지혈증 및 MMP 과다활성으로 기인한 혈관계질환인 동맥경화증, 고혈압, 빈혈, 편두통, 혈관종, 바람직하게는 동맥경화증 예방 효과를 가지는 뱀무 추출물 또는 유효성분을 특허출원 하였으며, 금후 기능성 식품소재화 연구와 식품의약품안전청이 요구하는 개별인정형 기능성 식품 소재로 개발 할 것이다.

### 4. 뱀무와 배암차즈기에서 생리활성물질의 분리 및 동정

배암차즈기 경엽을 메탄올로 추출하여 추출액의 에칠아세테이트 분획을 칼럼크로마토그래피와 HPLC 등으로 항산화활성이 있는 물질 3종을 분리하여  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR 등으로 구조를 분석한 결과 rosmarinic acid, luteolin 7-O- $\beta$ -glucopyranoside, hispidulin 7-O- glucopyranoside로 동정되었다. 이 중 rosmarinic acid의 항산화활성이 가장 높았다.

뱀무 (*Geum japonicum* THUNBERG)의 용매 분획물 중 ethylacetate (EtOAc) 분획물을 silica gel column chromatography 등으로 활성물질을 분리하였다. 분리된 화합물들을 LC/MS/MS와 NMR로 구조분석을 하여



구조를 확인하였다. 분리된 활성물질은 3,4,5-trihydroxybenzaldehyde, 6,7-dihydroxy-2H-chromen-2-one과 6,8-dihydroxy-2-oxo-2H-chromene-4-carbaldehyde이다. 이 중 3,4,5-trihydroxybenzaldehyde가 가장 항산화활성이 높았으며, 항비만 및 동맥경화증 예방 효과가 우수하였다. 6,7-dihydroxy-2H-chromen-2-one과 6,8-dihydroxy-2-oxo-2H-chromene-4-carbaldehyde 구조는 현재까지 알려지지 않은 것으로 신규성을 갖는다고 할 수 있으나 조금 더 넓은 범위의 신규성 확인 절차가 필요하다.

#### 5. 기능성식품 소재화 관련 기술 연구

식품소재 원료로서 뱀무 추출물과 주 활성물질인 THBA(3,4,5-trihydroxybenzaldehyde)의 특성을 살펴보기 위하여 HPLC로 분석방법을 확립한 다음 열 및 저장 안전성을 조사하였다. 그 결과 추출물과 THBA는 조사된 pH 3.5-6.5 조건에서 안정하였고, 80°C에서 1시간 처리하였을 때 약 5%의 함량 감소를 나타낸 것을 제외하고는 조사된 조건에서 비교적 안정한 것으로 나타났다. 뿐만 아니라 뱀무 추출물을 약 6개월 동안 냉동저장(-20°C)한 결과에서도 비교적 안정한 것으로 나타났다. 뱀무의 주 생리활성물질인 THBA를 80°C에서 2시간 처리하여 화합물의 변화를 모니터링한 결과 변화가 관찰되지 않았다. 한편, 인체 섭취시 안정성을 고려하여 뱀무 추출물의 급성 및 아급성 경구 급성 독성을 살펴본 결과, 급성 독성 실험에서는 뱀무 추출물의 경구투여 시 마우스에서 아무런 급성독성을 나타내지 않았고, LD<sub>50</sub> 값은 마우스에서 경구 투여 최고용량 200 mg/kg 이상일 것으로 사료되었다. 아급성 경구 독성시험에서는 체중, 일반증상, 사료섭취량, 음수량, 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사, 육안적 소견, 장기 중량, 병리조직학적 검사 등에서 특이한 독성병변은 관찰되지 않았으며, 본 시험조건에서 뱀무추출물의 SD계 흰쥐에 대한 14일간 반복 경구 투여 시 무관찰 부작용량은 500 mg/kg 이상인 것으로 인정되었다.

#### 6. 뱀무 및 배암차즈기 재배방법 확립

뱀무와 배암차즈기를 지역별로 자생지의 토양, 고도 등의 환경과 생육상

태를 조사하였으며, 수집된 식물체는 경남 함양군 안의면 소재 약초시험포장에 이식하여 생육상황을 조사하였다. 선발된 자생종을 이용하여 파종기와 재식거리를 시험한 결과, 배암차즈기는 파종기는 4월11일. 재식거리는 30×20 cm로 재배하는 것이 가장 최적 재배방법이었으며, 뱀무는 파종기는 4월20일. 재식거리는 40×40 cm로 재배하는 것이 가장 생육상황이 좋았으며 수확량이 많았다.

이상의 결과와 같이 국내 자생 식물인 뱀무로부터 항산화 활성이 높으면서 지방세포의 분화 억제, 혈중 중성지방의 생성 억제, 동맥경화 및 혈관계 질환을 예방 할 수 작용기전을 구명함으로써 산업적으로 활용할 수 있는 기초기술을 확립하였으며, 이후 건강기능식품으로서 개별인정을 받을 수 있도록 연구를 보완하여 국민의 건강 보호와 농가소득 작물로서 개발 효과가 전망된다.

여 백

# SUMMARY

## **I . Title of the Study**

Development of Functional Medicinal Food Materials and Separation of Physiological Active Substances from Native Plants.

## **II . Objectives and Significance of the Study**

The active oxygen and nitrogen species may induce some damage to the human body. Over production of various forms of activated oxygen species, such as oxygen radicals and non-free radical species are considered to be the main contributor to oxidative stress. These oxygen radicals may induce some oxidative damage to biomolecules such as carbohydrates, proteins, lipids and DNA and pollutant, change of dietary life, and industrial development, thus accelerating aging, inflammation, atherosclerosis, vascular disease, cancer and various neurodegenerative disease. Phytochemicals are bioactive substances of plants that have been associated in the protection of human health against chronic degenerative diseases. In recent years, the form of World Trade Organization has led to an urgent condition to domestic agricultural economy, as we have got to compete fiercely with foreign products for the weakened competitive edge in agricultural field by the imported agricultural products due to conclusion of a FTA and WTO treaty. Therefore, it is necessary to develop and commercialize the high value-added agricultural products to cope with an open trade policy and a foreign competition. Moreover, it is the fact that in the grim reality of international society the know-how about an investigation procedure of useful substances, especially anticancers, antitumors and antioxidants with physiological active agent is thoroughly kept a secret. It is very important to develop the new functional medicinal food materials from

native plants owing to prevention of diabetes, hypertension, arteriosclerosis and cardiovascular diseases. Consequently we are badly in need of the investigation of these new substances and the development of manufacturing technique and process in order to strengthen the competitiveness of our native plants and increase wealth in agricultural community.

This research is to investigate the antioxidant, anti-inflammatory, anti-obesity, anti-arteriosclerosis, anti-hyperlipidemia activity, owing to develop many edible, nontoxic agricultural food grade medicinal materials.

### III. Contents and Scope of the Study

	Research Contents and Areas
First year (2004- 2005)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Search for biomaterials from agricultural resource(<i>Geum japonicum</i> and <i>Salvia plebeia</i>)</li> <li>○ Investigation of characterization of native plants</li> <li>○ Investigation of antioxidant activity of methanol extract and fractions</li> <li>○ Separation of functional substances in <i>Geum japonicum</i> and <i>Salvia plebeia</i></li> <li>○ Anti-oxidant activity of <i>Geum japonicum</i> and <i>Salvia plebeia</i></li> <li>○ Analysis of immunological activity of <i>Geum japonicum</i> &amp; <i>Salvia plebeia</i> (Nitrite Quantification, cytokine production, Cell Viability)</li> <li>○ Investigation of physiological active substances of <i>Geum japonicum</i> and <i>Salvia plebeia</i></li> <li>○ Apoptosis effect of <i>Geum japonicum</i></li> <li>○ Inhibition of Adipocyte Differentiation of 3T3-L1 Cells</li> </ul>



	Research Contents and Areas
Second year (2005-2006)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Development of safe cultivating technology for <i>Geum japonicum</i> and <i>Salvia plebeia</i></li> <li>○ Separation of physiological active substances of <i>Geum japonicum</i> and <i>Salvia plebeia</i></li> <li>○ Structural analysis of physiological active substances of <i>Geum japonicum</i> and <i>Salvia plebeia</i></li> <li>○ Verification of antioxidant substance in ethyl acetate fraction</li> <li>○ Anti-inflammatory activity of <i>Geum japonicum</i> and <i>Salvia plebeia</i></li> <li>○ Anti-hyperlipidemia activity of <i>Geum japonicum</i> and <i>Salvia plebeia</i></li> </ul>
Third year (2006-2007)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Development industrial technology for high quality product</li> <li>○ Separation of physiological active substances of <i>Geum japonicum</i> and <i>Salvia plebeia</i></li> <li>○ Development of purification technology form separation of active substances</li> <li>○ Evaluation of stability of <i>Geum japonicum</i> using acute and subacute toxicity analysis</li> <li>○ Evaluation of the anti-obesity effect using <i>Geum japonicum</i> in cell and animal</li> <li>○ Evaluation of the lipid metabolism and energy consumption improvement effect of <i>Geum japonicum</i></li> </ul>



## **IV. Results and Recommendation**

### **1. Development of the anti-obesity and anti-inflammatory functional medicinal food materials using *G. japonicum***

Anti-obesity and anti-inflammatory activities of *G. japonicum* and *Salvia plebeia* that have not been experimented before were examined and methanol extracts from *G. japonicum* and *Salvia plebeia*. Various fractions of methanol extract was separated and examined physiological active substances and verified of antioxidant activity. The murine 3T3-L1 preadipocyte cell line represents one of the most characterized *in vitro* models currently used to study adipocyte differentiation. The activities of glycerolphosphate dehydrogenase(GPDH), and accumulation of TG, markers of adipose differentiation, was affected by the extracts of *G. japonicum*. The ethyl acetate fraction of *G. japonicum* methanol extract(EFGJ) showed a remarkable scavenging activity on the 1,1-diphenyl-2 picrylhydrazyl radical. These results suggest that extracts of *G. japonicum* may have an inhibitory role on the early stage of 3T3-L1 cell differentiation and may be useful source as natural antioxidants. We investigate the antiinflammatory action of extracts from *G. japonicum*. *G. japonicum*, a potent antitumor agent with anti-inflammatory and antioxidant properties, inhibited NO generation, TNF- $\alpha$ , and IL-1 $\beta$  as pro-inflammatory cytokine. Therefore, *G. japonicum* supplementation is beneficial for the suppression of adipocyte differentiation, anti-inflammatory and antioxidant properties,

### **2. Development of the antioxidant, anti-lipidemia, and anti-obesity functional extracts using *Salvia plebeia***

Antioxidant, anti-lipidemia, and anti-obesity activities of *Salvia plebeia* that have not been experimented before were examined and methanol extracts from *Salvia plebeia*. Various fractions of methanol extract was separated and examined physiological active substances and verified of antioxidant activity. The murine 3T3-L1 preadipocyte cell

line represents one of the most characterized in vitro models currently used to study adipocyte differentiation. The activities of glycerolphosphate dehydrogenase(GPDH), and accumulation of TG, markers of adipose differentiation, was affected by the extracts of *Salvia plebeia*. The ethyl acetate fraction of *Salvia plebeia* methanol extract showed a remarkable scavenging activity on the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. These results suggest that extracts of *Salvia plebeia* may have an inhibitory role on the early stage of 3T3-L1 cell differentiation and may be useful source as natural antioxidants. Therefore, *Salvia plebeia* supplementation is beneficial for the suppression of adipocyte differentiation, and antioxidant properties,

### **3. Development of the anti-atherosclerosis functional medicinal food materials using *G. japonicum***

Anti-atherosclerosis activities of *G. japonicum* were examined using methanol extracts and ethylacetate fractions from *G. japonicum*. The antioxidative active compound of *G. japonicum* was isolated and identified as 3,4,5-trihydroxy benzealdehyde. To determine whether the 3,4,5-trihydroxy benzealdehyde may have the hypolipidemic effects, 4 wk old Sprague Dawley male rats fed high fat diet for 6 wks to induce obesity, and subsequently orally fed 3,4,5-trihydroxy-benzealdehyde for further 4 wk. Supplementation with 3,4,5-trihydroxy-benzealdehyde resulted in a significant reduction of body weight gain and visceral fat mass. Adipocyte cell size was significantly reduced by 3,4,5-trihydroxy- benzealdehyde. Serum triglyceride and leptin level was significantly reduced and serum HDL-cholesterol level was significantly increased by 3,4,5-trihydroxy benzealdehyde. The present results suggest that 3,4,5-trihydroxybenzealdehyde supplementation is beneficial for the suppression of diet-induced obesity and hyperlipidemia. These results suggest that 3,4,5-trihydroxy benzealdehyde may have an inhibitory role in the HASMC Toxicity and inhibition effect of MMP-9 matrigel migration from TNF-alpha and may be useful source as

natural anti-atherosclerosis. Therefore, 3,4,5-trihydroxybenzaldehyde supplementation is beneficial for the suppression of hyperlipidemia, atherosclerosis, heart attack, Cardiovascular ischemia, hypertension, anemia, paralysis, and head ache.

#### 4. Separation of Physiological Active Substances of *Geum japonicum* and *Salvia plebeia*

The antioxidative compounds and antioxidant contents of *G. japonicum* were determined. Substances reextracted using ethylacetate from crude methanol extract of fresh *G. japonicum* were separated through thin layer chromatography. Ten phenolic antioxidative bands were visualized through color reactions using ferric chloride-potassium ferricyanide and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH). Extract from *G. japonicum*(Bammu in Korean) were analyzed for their antioxidative activities and scavenging effects of free radicals. The ethyl acetate fraction of *G. japonicum* methanol extract showed a remarkable scavenging activity on the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) radical. The methanol extract of *G. japonicum* did not show mutagenicity as revealed through SOS chromotest. Based on the results, the extracts of *G. japonicum* may be useful source as natural antioxidants.

The antioxidative compounds were purified through preparative TLC and high performance liquid chromatography(HPLC), among which, three antioxidants were identified as *G. japonicum* on the basis of their molecular weights determined through LC/MS, <sup>1</sup>H NMR, and <sup>13</sup>C NMR. Three active compounds are rosmarinic acid, luteolin 7-O- $\beta$ -glucopyranoside, and hispidulin 7-O-glucopyranoside, rosmarinic acid was very active compound. The Ethyl acetate fraction of *G. japonicum* methanol extract was separated to five Fractions (I ~ V) by silica gel column chromatography and TLC patterning. Four of them (Fraction I, II, III, V) was re-separated by silica gel column chromatography, Sephadex LH-20 column chromatography, and Shimadzu preparative HPLC. Finally three single compounds were isolated and analyzed by



LC/MS/MS and NMR. The active substance was 3,4,5- trihydroxybenzaldehyde, 6,7-dihydroxy-2H-chromen-2-one, and 6,8-dihydroxy-2-oxo-2H-chromene-4-carbaldehyde. The most active compound was 3,4,5-trihydroxybenzaldehyde, and also have antioxidant, anti-obesity, and anti-atherosclerosis effect. The structure of 6,8-dihydroxy-2-oxo-2H-chromene-4-carbaldehyde was not confirmed, so further examination was needed.

## 5. Study of Materials for Functional Food

In order to characterize the extracts and THBA(3,4,5- trihydroxybenzaldehyde), HPLC and heat stability and preserve stability were examined.

These results suggest that extracts of *G. japonicum* may have an inhibitory role on the early stage of 3T3-L1 cell differentiation and may be useful source as natural antioxidants. Therefore, the results obtained from this study provide an alternative protective mechanism of ethyl acetate fraction of *G. japonicum* and provide information on the potential use of ethyl acetate fraction of *G. japonicum* in chemoprevention or its pathogenic conditions related to overproduction of NO and PGE<sub>2</sub>. Ethyl acetate fraction of *G. japonicum* methanol extract also showed excellent antioxidative activity on linoleic acid during long-period storage and on rat liver microsome peroxidation system, and good anti-peroxidation effect on lipid in Rancimat system using lard, palm oil, and perilla oil, as compared with BHT and alpha-tocopherol. However, the mechanism of the inflammatory effect must be evaluated through various parameters for induction of NO production.

The present results suggest that *G. japonicum* supplementation is beneficial for the suppression of diet-induced obesity, hyperlipidemia, antioxidant, anti-inflammation, and anti-atherosclerosis, further research was needed for the individualized recognition of the functional food and agricultural good products.

여 백

# CONTENTS

SUMMARY .....	11
Chapter 1. Resume of the Research .....	33
1. Objective and Necessity of the Research .....	33
1-1. Objective of the Research .....	33
1-2. Necessity of the Research .....	33
2. Scope of the Research .....	36
3. Application and the Future Prospect .....	37
Chapter 2. State of the Art .....	38
1. Foreign .....	38
2. Domestic .....	40
Chapter 3. Results and Discussion .....	42
1. Materials and methods .....	42
1-1. Separation of Functional Products in <i>Geum japonicum</i> and <i>Salvia plebeia</i> .....	42
1-1-1. Experimental Materials Preparation .....	42
1-1-2. Separation and Analysis of Functional Products .....	42
1-1-2-1. Materials .....	42
1-1-2-2. Reagents and Equipment .....	44
1-1-2-3. Separation of Antioxidative Substance in <i>Geum japonicum</i> THUNBERG .....	44
1-1-2-4. Separation of Antioxidative Substance in <i>Salvia plebeia</i> .....	45
1-1-2-5. Antioxidant Analysis .....	46
1-2. Determination of Physiological Activity of <i>Geum japonicum</i> and <i>Salvia plebeia</i> .....	49
1-2-1. Analysis of Immunological Activity of <i>Geum japonicum</i> & <i>Salvia plebeia</i> .....	49
1-2-1-1. Nitrite Quantification .....	49



1-2-1-2. Measurement of Cytokine Production .....	49
1-2-1-3. Cell Viability .....	49
1-2-2. Apoptosis .....	49
1-2-2-1. MTT Assay .....	49
1-2-2-2 SRB Assay .....	50
1-2-2-3 Cox2 Promoter Assay .....	50
1-2-3 Inhibition of Adipocyte Differentiation of 3T3-L1 Cells .....	50
1-2-3-1. 3T3-L1 Cell Culture .....	50
1-2-3-2. Triglyceride Accumulation Analysis .....	50
1-2-3-3. Glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) activity .....	51
1-2-3-4. Oil red O staining .....	51
1-2-4 Determination of Physiological Activity of <i>Geum japonicum</i> & <i>Salvia plebeia</i> .....	51
1-2-4-1. Experimental Animals and Diets .....	51
1-2-4-2. Sampling .....	52
1-2-4-3. Adipocyte Cell Size .....	52
1-2-4-4. Blood Lipid Analysis .....	52
1-2-4-5. Blood Leptin Analysis .....	53
1-2-4-6. Uncoupling Protein m-RNA Anlalysis .....	53
1-2-4-7. Statistical Analysis .....	54
1-2-5. Prevention Effect of Artherosclerosis of <i>Geum japonicum</i> .....	54
1-2-5-1. Cell Culture .....	54
1-2-5-2. Toxicity .....	54
1-2-5-3. Inhibition of MMP-9 in HASMC .....	55
1-2-5-4. HASMC Matrigel Migration Assay .....	56
1-2-6. Improvement of Energy Consumption by <i>Geum japonicum</i> .....	56
1-2-6-1. Experimental Animals and Diets .....	56
1-2-6-2. Sampling .....	57
1-2-6-3. Adipocyte Size .....	57
1-2-6-4. Blood Lipids Analysis .....	57
1-2-6-5. Blood Leptin Analysis .....	57

1-2-6-6. Expression of Uncoupling Protein m-RNA .....	57
1-2-6-7. Expression of Neuropeptide Protein .....	58
1-2-6-8. Statistical Analysis .....	58
1-3. Study on Application of Functional Food Technology .....	59
1-3-1. Optimum Extraction Methods for Functional Food Resources .....	59
1-3-1-1. Efficiency of Methanol Concentration and Condition for Extraction Yield .....	59
1-3-1-2. Efficiency of Alcohol Concentration for Extraction .....	59
1-3-1-3. Efficiency of Alcohol Extraction after Hexane Treatment .....	59
1-3-1-4. Analysis of THBA .....	59
1-3-1-5. Analysis of Extracts by LC/MS/MS .....	60
1-3-2. Stability Test on the Extract of <i>G. japonicum</i> .....	60
1-3-2-1. Stability at Different pHs .....	60
1-3-2-2. Stability at High Temperature .....	60
1-3-3. Acute Toxicity of <i>Geum japonicum</i> in ICR mouse .....	61
1-3-3-1. Materials and Experimental Animals .....	61
1-3-3-2. Sample Administration & Test Groups .....	61
1-3-3-3. Sample Preparation & Administration .....	62
1-3-3-4. Biochemical Analysis .....	62
① General Symptoms & Mortality .....	62
② Body Weight .....	62
③ Postmortem Examination .....	62
1-3-3-5. Statistical Analysis .....	62
1-3-4. Subacute Toxicity of <i>Geum japonicum</i> in SD Rats .....	63
1-3-4-1. Materials and Experimental Animals .....	63
1-3-4-2. Sample Administration & Test Groups .....	63
1-3-4-3. Sample Preparation & Administration .....	63
1-3-4-4. Biochemical Analysis .....	64
① General Symptoms & Mortality .....	64

② Body Weight .....	64
③ Blood Biochemical Analysis .....	64
④ Clinical Symptoms and Organ Weight .....	64
1-3-4-5. Statistical Analysis .....	65
1-4. Development of Safety Cultivation Technology of <i>Geum japonicum</i> and <i>Salvia plebeia</i> .....	65
1-4-1. Sampling, Investigation of Habitat and Transplanting Environment .....	65
1-4-2. Examination for Method of Cultivation .....	65
2. Results and Discussion .....	66
2-1. Investigation of Antioxidant Activity of Methanol Extract and Fractions .....	66
2-1-1. DPPH Radical Scavenging Effect .....	66
2-1-2. Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assay .....	67
2-1-3. Hydroxyl Radical Scavenging Activity .....	67
2-1-4. Antioxidant Activity for Linoleic Acid .....	69
2-1-5. Total Phenol Contents by Folin & Dennis Method .....	71
2-2. Separation of Physiological Active Substances of <i>Geum</i> <i>japonicum</i> and <i>Salvia plebeia</i> .....	71
2-2-1. Verification of Antioxidant Substance in Ethyl Acetate Fraction .....	71
2-2-2. Structural Analysis of Physiological Active Substances of <i>Geum japonicum</i> .....	72
2-2-2-1. Structural Analysis of Compound 2 .....	72
2-2-2-2. Structural Analysis of Compound 3 .....	74
2-2-2-3. Structural Analysis of Compound 1 .....	77
2-2-3. Structural Analysis of Physiological Active Substances of <i>Salvia plebeia</i> .....	80
2-2-4. TLC Analysis of Physiological Active Substances of <i>Geum</i> <i>japonicum</i> and <i>Salvia plebeia</i> .....	82

2-3. Investigation of Physiological Active Substances of <i>Geum japonicum</i> and <i>Salvia plebeia</i> .....	84
2-3-1. Anti-inflammatory Activity of <i>Geum japonicum</i> and <i>Salvia plebeia</i> .....	84
2-3-1-1. Nitrite Quantification .....	84
2-3-1-2. MTT assay .....	84
2-3-2. Apoptosis Effect .....	85
2-3-2-1. SRB Cytotoxicity Analysis .....	85
2-3-2-2. Cytotoxicity Analysis of Hexane Fraction .....	87
2-3-2-3. Cox2 promoter assay .....	89
2-3-3. Inhibition Effect of Lipid Synthesis .....	90
2-3-3-1. Inhibition Effect of Triglyceride accumulation of <i>G. japonicum</i> .....	90
2-3-3-2. GPDH Activity of <i>G. japonicum</i> .....	90
2-3-3-3. Inhibition Effect of Triglyceride Accumulation of <i>S. plebeia</i> .....	91
2-3-3-4. GPDH activity of <i>S. plebeia</i> .....	92
2-3-4. Determination of Physiological Activity of <i>Geum japonicum</i> & <i>Salvia plebeia</i> .....	92
2-3-4-1. Food Intake, Weight Gain and FER .....	92
2-3-4-2. Adipose Tissue Mass .....	93
2-3-4-3. Adipocyte Size .....	94
2-3-4-4. Blood Lipids Contents .....	95
2-3-4-5. Blood Leptin Contents .....	95
2-3-4-6. Expression of Adiponectin .....	96
2-3-4-7. Expression of UCP mRNA .....	97
2-3-5. Prevention Effect of Artherosclerosis of <i>Geum japonicum</i> .....	97
2-3-5-1. HASMC Toxicity .....	97
2-3-5-2. Inhibition Effect of MMP-9 and MMP-9 Matrigel Migration Assay .....	98
2-3-6. Improvement of Energy Consumption by <i>Geum japonicum</i> .....	100
2-3-6-1. Food Intake, Weight Gain and FER .....	100



2-3-6-2. Adipose Tissue Mass .....	101
2-3-6-3. Adipocyte Size .....	102
2-3-6-4. Blood Lipids Contents .....	102
2-3-6-5. Blood Leptin Contents .....	104
2-3-6-6. Expression of Adiponectin .....	104
2-3-6-7. Expression of UCP mRNA .....	105
2-3-6-8. Expression of Neuropeptide Y .....	105
2-4. Study on Application of Functional Food Technology .....	107
2-4-1. Optimum Extraction Methods for Functional Food Resources .....	107
2-4-1-1. Efficiency of Methanol Concentration and Condition for Extraction Yield .....	107
2-4-1-2. Efficiency of Alcohol Concentration for Extraction .....	108
2-4-1-3. Efficiency of Alcohol Extraction after Hexane Treatment .....	108
2-4-2. Stability Test on the Extract of <i>G. japonicum</i> .....	109
1-3-2-1. Stability at Different pHs .....	109
1-3-2-2. Stability at High Temperature .....	110
2-4-3. Acute Toxicity of <i>Geum japonicum</i> in ICR mouse .....	113
2-4-3-1. Mortality .....	113
2-4-3-2. Changes in Body Weight .....	113
2-4-3-3. General Symptoms .....	114
2-4-3-4. Clinical & Postmortem Examination .....	114
2-4-3-5. Results .....	114
2-4-4. Subacute Toxicity of <i>Geum japonicum</i> in SD Rats .....	115
2-4-4-1. General Symptoms & Mortality .....	115
2-4-4-2. Body Weight Changes .....	115
2-4-4-3. Blood Biochemical Analysis .....	116
2-4-4-4. Hematology .....	116
2-4-4-5. Clinical Symptoms and Organ Weight .....	117
2-4-4-6. Result .....	117

2-5. Development of Safety Cultivation Technology of <i>Geum japonicum</i> and <i>Salvia plebeia</i> .....	118
2-5-1. Collection of Resources and Evaluation of Characterization of <i>Salvia plebeia</i> .....	118
2-5-2. Collection of Resources and Evaluation of Characterization of <i>Geum japonicum</i> .....	123
2-5-3. Cultivation Method of <i>Geum japonicum</i> and <i>Salvia plebeia</i> .....	125
2-5-3-1. Cultivation Method of <i>Salvia plebeia</i> .....	125
2-5-3-2. Cultivation Method of <i>Geum japonicum</i> .....	125
2-5-4. Changes of Main Bioactive Compound at Different Growth Stages of <i>G. japonicum</i> .....	127
2-5-4-1. Concentration of THBA and Phenolic Compounds at Different Growth Stages of <i>G. japonicum</i> .....	127
2-5-4-2. Chemical Analysis of Different Part of <i>G. japonicum</i> .....	127
<b>Chapter 4. Achievement and Contribution to Related Fields .....</b>	<b>129</b>
<b>Chapter 5. Application Plan .....</b>	<b>131</b>
<b>Chapter 6. Foreign Scientific Information Acquired .....</b>	<b>132</b>
<b>Chapter 7. Reference .....</b>	<b>141</b>



여 백

# 목 차

요 약 문 .....	3
제 1 장 연구개발과제의 개요 .....	33
제 1 절 연구개발의 목적 및 필요성 .....	33
1. 연구개발의 목적 .....	33
2. 연구개발의 필요성 .....	33
제 2 절 연구개발과제의 범위 .....	36
제 3 절 활용방안 및 전망 .....	37
제 2 장 국내외 기술개발 현황 .....	38
제 1 절 국외 기술개발 현황 .....	38
제 2 절 국내 기술개발 현황 .....	40
제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과 .....	42
제 1 절 연구수행 방법 .....	42
1. 뱀무 및 배암차즈기에서 기능성물질 분리 및 동정 .....	42
가. 식물 재료의 확보 .....	42
나. 기능성물질 분리 및 동정 .....	42
1) 공시 재료 .....	42
2) 시약 및 기기 .....	44
3) 뱀무 ( <i>Geum japonicum</i> THUNBERG)의 항산화활성 물질 분리 및 동정 .....	44
4) 배암차즈기에서 항산화 활성물질의 분리 및 동정 .....	45
5) 항산화활성 검정 .....	46
2. 뱀무 및 배암차즈기 추출물 및 유효성분에 대한 생리활성 검정 .....	49
가. 뱀무 및 배암차즈기 추출액의 용매분획별 면역세포에 대한 활성 분석 .....	49
1) Nitrite Quantification .....	49
2) Measurement of cytokine production .....	49

3) Cell Viability 측정 .....	49
나. 세포사멸 효과 .....	49
1) MTT assay .....	49
2) SRB Assay .....	50
3) Cox2 promoter assay .....	50
다. 3T3-L1 세포에서 지방화 억제 효과 .....	50
1) 3T3-L1 cell culture .....	50
2) Triglyceride accumulation 측정 .....	50
3) Glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) activity 측정 .....	51
4) Oil red O staining .....	51
라. 실험동물을 이용한 뱀무 및 배암차즈기 추출물 및 유효성분에 대한 생리활성 검정 .....	51
1) 실험동물의 사육 및 식이 .....	51
2) 시료수집 .....	52
3) 지방 세포 크기 측정 .....	52
4) 혈중 지질 분석 .....	52
5) 혈중 렙틴 함량 분석 .....	53
6) Uncoupling protein m-RNA 분석 .....	53
7) 자료의 처리 .....	54
마. 뱀무 추출물의 동맥경화 예방효과 검정 .....	54
1) 세포배양 .....	54
2) 세포독성 검정 .....	54
3) 사람동맥평활근 세포(HASMC)가 생성하는 MMP-9의 저해력 검정 .....	55
4) 동맥평활근 세포의 이주능 실험 .....	56
바. 실험동물을 이용한 뱀무 추출물의 에너지소비 증진 효과 검정 .....	56
1) 실험동물의 사육 및 식이 .....	56
2) 시료수집 .....	57
3) 지방 세포 크기 측정 .....	57
4) 혈중 지질 분석 .....	57
5) 혈중 렙틴 함량 분석 .....	57

6) Uncoupling protein m-RNA 분석 .....	57
7) 식이섭취관련 유전자 분석 .....	58
8) 자료의 처리 .....	58
3. 기능성 식품 소재화를 위한 응용기술 연구 .....	59
가. 뱀무 생리활성 물질의 최적 추출 방법 .....	59
1) 메탄올 농도별 추출과 sonication에 의한 추출 효과 .....	59
2) 주정농도별 추출효율 .....	59
3) Hexane처리 후 주정 추출 효율 .....	59
4) 뱀무의 THBA 분석 방법 .....	59
5) LC-MS/MS 분석 .....	60
나. 뱀무 추출물의 저장 안전성 조사 .....	60
1) pH 안정성 .....	60
2) 온도 안정성 .....	60
다. ICR계 마우스에 대한 뱀무추출물의 급성 경구 독성시험 .....	61
1) 시험물질 및 실험동물 .....	61
2) 투여량 및 시험군의 구성 .....	61
3) 시험물질의 조제 및 투여 .....	62
4) 관찰 및 검사항목 .....	62
(가) 일반증상 및 사망동물의 관찰 .....	62
(나) 체중측정 .....	62
(다) 부검소견 .....	62
5) 통계 처리 .....	62
라. 뱀무 추출물의 SD계 흰쥐에 대한 아급성 경구독성 시험 .....	63
1) 시험물질 및 실험동물 .....	63
2) 투여량 및 시험군의 구성 .....	63
3) 시험물질의 조제 및 투여 .....	63
4) 관찰 및 검사항목 .....	64
(가) 일반증상 및 사망동물의 관찰 .....	64
(나) 체중측정 .....	64
(다) 혈액학적 및 혈액생화학적 검사 .....	64
(라) 육안소견 및 장기 중량 .....	64
5) 통계 처리 .....	65

4. 뱀무 및 배암차즈기 안전 생산기술 개발 .....	65
가. 시료의 수집, 생육지 환경 및 이식후 생육상황 조사 .....	65
나. 재배방법 시험 .....	65
다. 뱀무 생육시기별 주 생리활성 물질의 함량 변화 .....	65
1) 뱀무 생육시기별 THBA와 phenol 함량 분석 .....	65
2) 뱀무 부위별 무기성분, phenol 화합물 함량 및 THBA 함량 분석 .....	66
제 2 절 결과 및 고찰 .....	66
1. 메탄올 추출액 및 용매분획에 대한 항산화 활성 검정 .....	66
가. DPPH방법에 의한 radical 소거능 .....	66
나. Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay .....	67
다. Hydroxyl radical 소거 활성 .....	67
라. Linoleic acid 및 유지류에 대한 항산화 활성 .....	69
마. Folin & Dennis법에 의한 총 페놀함량 .....	71
2. 배암차즈기 및 뱀무의 생리활성 물질 분리 .....	71
가. Ethyl acetate 분획에서 항산화성 물질의 확인 .....	71
나. 뱀무에서 분리된 활성물질의 구조분석 및 동정 .....	72
1) compound 2의 구조분석 .....	72
2) compound 3의 구조분석 .....	74
3) compound 1의 구조분석 .....	77
다. 배암차즈기에서 분리된 활성물질의 구조분석 및 동정 .....	80
라. 뱀무 및 배암차즈기에서 분리된 활성물질의 TLC 및 항산화활성 .....	82
3. 뱀무 및 배암차즈기 추출물 및 유효성분에 대한 생리활성 검정 .....	84
가. 뱀무와 배암차즈기의 항염증 활성 .....	84
1) Nitrite 정량과 활성 측정 .....	84
2) MTT assay .....	84
나. 뱀무와 배암차즈기의 세포사멸 효과 결과 .....	85
1) SRB평가법에 의한 Cytotoxicity 검정 .....	85
2) Hexane 분획별의 Cytotoxicity 검정 .....	87
3) Cox2 promoter assay .....	89



다. 뱀무와 배암차즈기 분획물의 지방합성 억제효과 .....	90
1) 뱀무의 Triglyceride accumulation 저해 효과 .....	90
2) 뱀무의 GPDH activity 활성 .....	90
3) 배암차즈기의 Triglyceride 축적저해 효과 .....	91
4) 배암차즈기의 GPDH activity .....	92
라. 실험동물들을 이용한 뱀무 및 배암차즈기 추출물 및 유효성분에 대한 생리활성 검정 .....	92
1) 식이 섭취, 체중 증가량 및 식이효율 .....	92
2) 지방 조직의 무게 .....	93
3) 지방 세포의 크기 .....	94
4) 혈중 지질 함량 .....	95
5) 혈중 렙틴 함량 .....	95
6) Adiponectin 발현 .....	96
7) UCP mRNA 발현 .....	97
마. 뱀무에서 분리한 THBA 화합물의 동맥경화 예방 효과 .....	97
1) 사람 동맥평활근 세포(HASMC)에 대한 독성 .....	97
2) MMP-9 저해 활성 및 세포의 이주능 .....	98
바. 실험동물을 이용한 뱀무 추출물의 에너지소비 증진 효과 검정 .....	100
1) 식이 섭취, 체중 증가량 및 식이효율 .....	100
2) 지방 조직의 무게 .....	101
3) 지방 세포의 크기 .....	102
4) 혈중 지질 함량 .....	102
5) 혈중 렙틴 함량 .....	104
6) Adiponectin 발현 .....	104
7) UCP mRNA 발현 .....	105
8) NPY 발현 .....	105
4. 기능성 식품 소재화를 위한 응용기술 연구 .....	107
가. 뱀무 생리활성 물질의 최적 추출 방법 .....	107
1) 메탄올 농도별 추출과 sonication에 의한 추출 효과 .....	107
2) 주정 농도별 추출효율 .....	108
3) Hexane처리 후 주정 추출 효율 .....	108



나. 뱀무 추출물의 저장 안전성 조사 .....	109
1) pH별 안정성 .....	109
2) 온도 안정성 .....	110
다. ICR계 마우스에 대한 뱀무추출물의 급성 경구 독성시험 .....	113
1) 폐사율 .....	113
2) 체중변화 .....	113
3) 일반증상 .....	114
4) 육안적 해부소견 .....	114
5) 결론 .....	114
라. 뱀무 추출물의 SD계 흰쥐에 대한 아급성 경구독성 시험 .....	115
1) 일반증상 및 사망동물 .....	115
2) 체중변화 .....	115
3) 혈액생화학적 검사 .....	116
4) 혈액학적 검사 .....	116
5) 육안소견 및 장기중량의 변화 .....	117
6) 결 론 .....	117
5. 뱀무 및 배암차즈기 안전 생산기술 개발 .....	118
가. 배암차즈기 유전자원 수집 및 특성 평가 .....	118
나. 뱀무 유전자원 수집 및 특성 평가 .....	123
다. 뱀무 및 배암차즈기 재배방법 .....	125
1) 배암차즈기 재배방법 .....	125
2) 뱀무 재배방법 .....	125
라. 뱀무 생육시기별 주 생리활성 물질의 함량 변화 .....	127
1) 뱀무 생육 시기별 THBA와 phenol 화합물 함량 .....	127
2) 뱀무 부위별 무기성분, phenol 및 THBA 함량 .....	127
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	129
제 5 장 연구개발결과의 활용계획 .....	131
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	132
제 7 장 참고문헌 .....	141

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1 절 연구개발의 목적 및 필요성

### 1. 연구개발의 목적

본 연구의 최종목표는 국내산 뱀무와 배암차즈기로부터 항산화성, 소염진통 및 성인병(고지혈증, 비만, 동맥경화 등) 예방 기능성 물질을 개발하여 새로운 건강기능성 식품 소재를 창출하고, 고품질의 원료생산을 위한 안전 다수확재배 기술 등으로 새로운 농가소득원 개발을 위한 응용기술을 개발코자 하였다.

### 2. 연구개발의 필요성

산업의 발달, 식생활의 변화 및 환경오염원들은 인간에게 다양한 질병을 일으키는 원인으로 작용하는 슈퍼옥사이드 라디칼 (superoxide radical), 하이드록실 라디칼 (hydroxyl radical, HO·), 과산화수소 (hydrogen peroxide, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), 일중항산소 (singlet oxygen, <sup>1</sup>O<sup>2</sup>)와 같은 반응성이 매우 큰 활성산소를 과다 생성하게 한다. 이들 활성산소는 세포구성 성분들인 지질, 단백질, 당, DNA 등에 대하여 비선택적, 비가역적인 파괴작용을 함으로써 노화는 물론 암을 비롯하여 뇌졸중, 파킨슨병 등의 뇌질환과 심장질환, 동맥경화, 피부질환, 소화기질환, 염증, 자기면역질환 등의 각종 질병을 일으키는 것으로 알려져 있다. 또한 잦은 인스턴트 음식물 섭취와 육식 위주의 식생활의 변화는 비만인구의 증가를 유도하고 있다. 비만은 과다한 지방세포의 분화와 불균형적인 에너지 대사에 의해 유발되므로 비만을 예방하기 위해서는 지방세포의 분화와 지방 축적에 관한 대사과정을 저해할 수 있는 방향으로 연구가 진행되고 있다. 체내에서 지방화(Adipogenesis)는 미성숙지방세포(preadipocyte)로부터 지방세포가 분화되어 지방을 축적하게 되는 과정으로서, 성숙한 지방 세포(adipocytes or fat cells)는 섬유아세포(fibroblast)와 같은 미성숙 지방세포(preadipocytes)로부터 분화되어 궁극적으로 세포 내에 지방 방울(lipid droplet)을 형성하게 된다. 그러므로 비만에 대한 저해활성을 나타내는 물질의 탐색은 미성숙지방세포의 성숙지

방세포로의 지방세포 분화 저해활성을 측정하고, 성숙되는 과정에 지방의 축적을 저해하는 기능성을 지닌 물질은 비만을 예방할 수 있을 것으로 기대된다. 또한, 체내에서 염증반응은 생체의 세포나 조직에 어떠한 기질적 변화를 가져오는 침습으로 인한 손상을 수복 재생하기 위한 생체 방어 반응과정으로, 조직(세포)의 손상이나 외부감염원(박테리아, 곰팡이, 바이러스 등)에 감염되었을 때 국소 혈관과 체액 중 각종 염증 매개인자 및 면역세포가 관련되어 효소활성화, 염증매개물질 분비, 체액 침윤, 세포이동, 조직 파괴 등 일련의 복합적인 생리적 반응과 홍반, 부종 발열 통증 등과 같은 외적 증상을 나타낸다. 이러한 염증반응에 관여하는 염증성 인자인 NO(nitric oxide)는 NO 합성효소(nitric oxide synthase, NOS)에 의해 L-알지닌(L-arginine)으로부터 중간 대사물질인 히드록시알지닌(hydroxyarginine)을 거쳐 NO와 시트룰린(citrulline)이 만들어 진다. NO 생성에 관여하는 NOS는 칼슘( $Ca^{2+}$ )이나 칼모듈린(calmodulin) 의존성 여부에 따라 크게 2가지 즉, cNOS(constitutive NOS)와 iNOS(inducible NOS)로 분류되는데, cNOS는 칼슘이나 칼모듈린 의존성이고 주로 뇌, 상피세포, 호중구, 위장 점막 세포에 존재하며, iNOS는 칼슘이나 칼모듈린 비의존성으로 대식세포, 간세포, 암세포 등에 존재하며, IL-1 $\beta$ (interlukin-1 $\beta$ ), IFN- $\gamma$ (interferon- $\gamma$ ), TNF- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ ) 등과 같은 사이토카인류(cytokines)와 내독소인 세균성 LPS(lipopolysaccharide) 등에 의해 유도된다. 따라서, NF- $\kappa$ B의 염증반응 관련 전사인자, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  및 IL-6 등의 프로-염증성 사이토카인들, 및 iNOS의 유전자는, 폐혈증, 류마티스 관절염 등의 과도한 염증반응에 의해서 발생하는 질병들을 치료하기 위한 새로운 항염증제의 스크리닝에 있어서 표적으로 이용될 수 있다. 따라서 iNOS에 의한 NO의 생성을 억제하는 물질을 확보하고 이를 의약품으로 개발하려는 노력이 다양하게 진행되고 있다. 또한, 동맥경화증은 현대인의 주요 성인병으로서 혈관벽에 콜레스테롤이 침착되어 일어나는 증상이다. LRCP(Lipid Research Clinica Program)의 연구보고에 의하면 혈중 콜레스테롤치를 1% 감소시키면 관상동맥질환의 위험도가 2% 정도 감소하는 것으로 보고하였으며, 혈관벽에 있는 콜레스테롤을 간으로 운반하여 제거하는 역할을 하는



고밀도 콜레스테롤(HDL-cholesterol)의 증가는 관상동맥 협착병변의 진행을 억제하고 동맥경화를 예방하는 것으로 알려져 있다. 동맥경화와 동맥벽 손상 후 혈관협착(intimal thickening, stenosis)은 혈관평활근세포(vascular muscle cells)의 증식과 이주능이 주요 요인으로 알려져 있으며, 혈관조직 중간층(media)에 존재하는 VSMC는 낮은 세포 분열능을 가지지만, 동맥경화나 혈관벽 손상 개시단계에서 혈관평활근세포(aortic smooth muscle cells)는 여러 가지 성장 인자들의 협조로 증식 단계로 들어가 혈관 비대를 유발시킨다. 그러나 VSMC의 복제와 이주는 세포주위의 세포외기질의 리모델링과 분해를 필요로 하며, 그 분해효소 중에서 MMP(Matrix metalloproteinase)들이 주요 역할을 한다. 최근의 생체 내(*in vivo*) 연구 결과, MMP-9가 VSMC 이주와 증식을 통하여 동맥병변유발에 결정적임이 알려져 있으며, MMP에 대한 저해활성을 나타내는 물질은 동맥경화증의 예방 및 치료 물질로 활용이 가능하다.

한편, 뱀무(*Geum japonicum* THUNBERG)는 우리나라 울릉도, 남부지방, 중부지방의 산야지 초원 및 길가 언덕 등에 자생하는 장미과(薔薇科)에 속하는 다년생 초본이다. 식용, 관상용, 약용으로 쓰이고 어린잎을 나물로 먹으며 관상초 및 한방과 민간에서 쏘초를 胃潰瘍, 高血壓, 痔血 등에 약재로 사용하나, 아직까지 지방세포의 분화와 축적 저해 효과 및 항염증 작용기전 등에 대해서는 알려진 바 없다. 배암차즈기(*Salvia plebeia* R. Br.)는 꿀풀과(Labiatae)에 속한 1년생 혹은 2년생 直立草本으로 높이 15-90cm로 자라며, 우리나라 전지역의 개울가 황무지 혹은 길가에서 자생한다. 이 식물의 쏘초를 한약으로 사용할 수 있는 것으로 諸文獻에 기록되어 있으며, 異名으로는 水羊耳, 過冬靑 등이 있다. 이 약은 한의학적으로 性味가 苦辛, 涼하며, 淸熱解毒, 利水消腫 등의 효능이 있어 感昌發熱, 咽喉腫痛, 吐血, 尿血, 腎啖數腫, 痢疾 등을 치료한다고 하였다. 배암차즈기의 밝혀진 성분으로는 전초에 flavonoid 즉 homo-plantagin, hispidulin, eupafolin, 등을 함유하고, 그 밖에 phenol성 물질, 精油, saponin, 불포화 sterol 등을 함유하고 있다. 따라서 국내산 뱀무와 배암차즈기로부터 항산화 효과와 비만, 동맥경화 등으로 인한 성인병을 예방할 수 있는 건강기능

성 식품으로 응용할 수 있는 기술을 개발함으로써 향후 효과에 대한 개별 인정이 가능한 건강기능성 식품을 개발할 수 있도록 과학적인 기초자료를 마련하는 체계적인 연구가 필요하다.

## 제 2 절 연구개발과제의 범위

본 연구의 최종목표는 우리나라 자생식물인 뱀무와 배암차즈기를 원료로 항산화성, 및 성인병 (고지혈증, 비만, 동맥경화 등)을 예방할 수 있는 선도 소재를 발굴하고 기능성 식품화를 위한 응용기술을 개발하는 것이다. 이를 위한 본 연구개발과제의 연차별 연구개발 목표 및 내용은 다음과 같다.

구분	연구 개발 목표	연구개발 과제의 범위
1차 년도 (2004)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 뱀무 및 배암차 즈기 자원 수집 및 농업적 특성 조사</li> <li>○ 뱀무 및 배암차 즈기의 항산화 활성 검정</li> <li>○ 생리활성 물질 분리</li> <li>○ <i>In vitro</i> 면역세포 활성 효과 검정</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 유전자원 수집 및 보존포에 증식</li> <li>○ 수집종의 특성 조사 : 생육특성 등</li> <li>○ 수소공여능 등 항산화성 효과 분석</li> <li>○ 유기용매에 의한 대량추출, 극성에 따른 용매분획, silica gel column chromatography 등을 이용한 생리활성 물질 분리</li> <li>○ 대식세포주 RAW 264.7 cell 증식을</li> <li>○ 대장암 세포주 SNU-C4 cell line 이용하여 MTT assay, SRB assay 등으로 세포사멸 효과 검정</li> </ul>
2차 년도 (2005)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 뱀무 및 배암차 즈기 안전 다수확 재배기술 개발</li> <li>○ 주 생리활성 물질의 분리 및 구조규명</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 뱀무 재배기술 개발 : 이식시기 및 파종기 등</li> <li>○ 배암차즈기 재배기술 개발 : 파종량 및 파종기 등</li> <li>○ HPLC, 등을 이용한 분리 및 LC-MS, NMR 등을 이용한 구조 분석</li> </ul>



구분	연구개발목표	연구개발 과제의 범위
	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 고지혈증 동물 모델을 이용한 성인병 예방효과 작용기전 구명</li> <li>○ 활성물질의 항산화 효과검정</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Sprague-Dawley계 숫쥐로 고지방 식이로 유도된 고지혈증 동물모델을 이용 추출물의 생리활성 검정 : 체중 변화량, 사료섭취량 측정, 지방세포의 크기 측정, 혈액의 생화학적 분석(TG, TC, HDL-C, LDL-C, 등)</li> <li>○ DPPH radical scavenging 능력 등</li> </ul>
3차 년도 (2006)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 고품질 뱀무 생산 기술 개발</li> <li>○ 활성물질의 대량 분리기술 및 식품화 소재화 기술 확립</li> <li>○ 뱀무 추출물의 안전성 검정, 활성물질의 세포 및 모델동물에서 작용기작 구명</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 재배조건별, 수확시기별 품질비교 및 재배 방법 확립</li> <li>○ 대량 분리 체계 및 정제기술 확립</li> <li>○ 성인병 예방 기능성 식품 소재화를 위한 특성평가 : 소재의 용해성 및 열안정성 평가, 소재의 저장안정성 평가 등</li> <li>○ 저, 중, 고농도 등 농도별 단회투여에 의한 독성조사</li> <li>○ Cell line을 이용한 항동맥경화 예방기능</li> <li>○ 고지방 식이 유도 비만동물 모델에서 활성물질의 지방세포 분화억제 기전, 에너지 소비 단백질 발현, 식욕조절 비만 단백질 발현 등</li> </ul>

### 제 3 절 활용방안 및 전망

국내 자생 식물자원으로부터 항산화성, 항비만, 동맥경화증 등 심혈관 질환을 예방할 수 있는 건강기능성 후보물질의 효과를 여러 실험 모델에서 조사하고 가능한 작용기전을 연구함으로써 산업적으로 활용할 수 있는 기초기술이 축적될 수 있을 것으로 예상된다. 특히 노령화 사회에서 비만, 당뇨, 동맥경화 등의 성인병 관련 건강기능 식품 시장은 계속 성장할 것이며, 개별인정형을 받을 수 있는 건강기능성식품을 개발하는 것은 국내 건강기능식품 시장을 활성화하고 이를 생산하는 농가의 소득증대에 기여할 것으로 전망된다.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 1 절 국외기술개발 현황

기능성식품이란 여러 생리 활성물질을 함유하여 생체 조절 기능을 나타냄으로써 일반적인 식품의 기능인 영양 공급, 감감 충족 이 외에 예방의학적으로 건강 증진효과가 기대되는 식품을 말하며, 건강보조식품, 특수영양식품, 식이보조제를 포함하는 개념이다. 구미에서는 기능성식품(functional food)이 Nutraceuticals, Designer foods, Pharmafoods, Performance foods, Vita-foods, Foodaceuticals 등의 비슷한 의미의 용어가 혼용되고 있으며, Dietary supplements, Food supplements, Health foods, Medical Foods, 건강보조식품, 특수영양식품 등의 일부가 광의의 기능성식품에 속한다고 볼 수 있다. 우리나라의 경우 기능성식품이라는 용어는 법규나 규정상의 용어는 아니며, 식품공전 제4 식품별 기준 및 규격 중 “12. 특수영양식품”에 영아용 조제식 등 8종이 있고, “13. 건강보조식품”에 정제어유가공식품 등 24종이 있으며, 인삼 제품류와 다류, 기타 식품류의 추출 가공식품 등의 일부가 광의의 기능성식품에 속한다고 볼 수 있다

세계 기능성식품 시장은 1997년 650억 달러에서 2000년 1,380억 달러로 높은 성장을 보이고 있으며, 2005년도에는 현재 시장의 10배 이상의 규모로 증가할 것으로 예상되고 있다. NBJ(Nutrition Business Journal, 2000)의 자료에 의하면, 미국이 '99년에 445억 달러로 기능성식품 전체 해외시장의 35%를 차지하였으며, 유럽은 422억 달러(33%), 일본은 232억 달러(18%)를 차지하는 것으로 나타나 선진국을 중심으로 기능성식품 시장이 형성되고 있음을 알 수 있다. 미국에서는 1994년 “건강보조식품의 건강 및 교육법”(DSHEA; Dietary Supplement Health and Education Act)의 시행으로 과학적 근거가 있는 제품에 효능 표시를 할 수 있게 되고, 소비자들의 건강식품에 대한 인식이 널리 확산됨에 따라 기능성식품 시장은 매년 두 자리 수 이상의 성장을 보여 '99년 279억 달러 상당의 시장을 형성하고 있으며, 2005년에는 500억 달러를 넘어설 것으로 예측된다(Nutrition Business Journal, 1999). 또한 2000년 현재 미국 건강보조식품 시장의 약

40%는 비타민이, 30%는 허브류가 차지하고 있으며, 5년간의 변화율을 볼 때, 허브류가 56%로 가장 높은 수치를 보이고 있어 허브류, 식물유래 기능성식품에 대한 미국인의 관심이 대단히 높다는 것을 알 수 있다. 허브류를 제품별로 살펴보면, 해마다 순위에는 차이가 있지만 에키나시아 (Echinacea/면역력증진), 은행잎 추출물(Ginkgo biloba/기억력, 혈행 개선), 세인트존스워트(St. Johns's wort/우울증 개선), 마늘(Garlic/혈행 개선), 알로에(Aloe/면역력증진, 배변) 등 각각의 효능이 입증된 허브류가 그 유용성을 기반으로 기능성식품 시장에서 높은 점유율을 보이고 있다

최근에는 식품으로 사용되고 있는 식용식물의 추출물 또는 해당 식물의 주 생리활성 phytochemicals의 소재화에 대한 연구개발이 활발히 이루어지고 있으며, 노팔선인장, 톱야자, 산사나무 열매, 콩소재, 버섯 추출물 소재, 로즈메린산과 같은 항산화물질, 누룩효모나 전립 곡물, 브로콜리, 매실, 버섯 등에 들어있는 크롬소재, 감자소재 등이 신소재로 주목받고 있다. 또한 대체의학요법의 확산과 함께 허브의 생리 및 약리 활성화에 관한 연구개발이 국가연구사업으로 자리잡고 있다. 이 Phytochemical 중에서 가장 많이 연구되고 생리활성이 우수한 화합물 그룹이 폴리페놀계 화합물이다. 2006년에 캐나다에서 개최된 "23th International Conference on Polyphenols"에서 발표된 논문들을 분석하면 폴리페놀 화합물 중에서 가장 많이 연구되고 있는 것이 anthocyanidin과 그 유도체, 식물 호르몬 화합물로 알려진 이소플라본계 화합물, 녹차류에서 가장 많이 생성되는 플라보노이드계 화합물과 그 유도체들이었으며, 이들 화합물의 생합성과 관련한 효소와 유전자, 이를 이용한 형질전환 작물 개발, 인체내에서 생리활성 효과 및 흡수대사 과정, 각종 식물자원 및 농산물에서 이들 화합물의 함량 및 조성 등에 관한 연구결과 발표가 주류를 이루고 있었다. 또한, 2007 미국 영양학회(2007.4.28-5.2, 워싱턴 D.C)에서 발표된 연구동향을 보면, 현존의 당뇨병, 고혈압, 심장병과 같은 단순 질환의 개념에서 대사의 질환이상에 의하여 복합적으로 동시다발적으로 발생하는 Metabolic Syndrome같은 대사성질환의 개념에 많은 관심이 모아지고 있었다. 특히 동물실험의 모델에서도 대사성 증후군을 유도할 수 있는 식이성 인자의 조절에 의하여 동물



임상모델을 확인하는 실험의 연구가 진행되고 있었으며, 주요 연구대상 질병도 Childhood type 2 Diabetes, Immunity, Cancer, Obesity, Dahl Salt-Sensitive Rat(대사성질환 유도 쥐)에 연구가 집중되고 있었다. 그리고 질환예방을 위한 기능성 소재탐색(Dietary Bioactive compound : Medicinal Food)연구에서는 대두 genestein의 항암효과, isoflavone과 골질환과의 관계 연구, 알로에 추출물의 염증반응 완화작용, 생강의 비만 유도쥐에서의 hypoglycemic effect, berry 종류인 Euterpe Oleracea Mart (acai)의 항산화 효과, Almond의 흡연자의 oxidative DNA damage 감소와 지방과산화 반응 억제 효과 등이 보고되었다. 이상과 같이 최근의 선진 외국의 연구동향을 보면 국내 식물자원을 이용한 새로운 기능성 소재 연구에 자신감을 가질 필요가 있으며, 본 연구에서 나온 결과물에 대한 논문발표도 수행한 바 사용 기술이나 내용면에서도 큰 차이가 없었다. 금후 성인병의 복합성 질환의 양상인 대사성 질환의 예방측면을 고려한 생리활성이 우수한 천연 화합물의 탐색과 연구를 통하여 건강보조 식품 소재로 활용할 수 있는 우수 농산물을 생산하는 작물개발에 더욱 집중할 필요가 있다.

## 제 2 절 국내기술개발 현황

국내 식품산업에 있어서 약용식물의 이용은 민간 전통요법의 이용에서 비롯 되었다고 할 수 있으며, 오래 전부터 학계를 중심으로 국내자원식물에 대한 생리활성 물질 탐색이 연구되어 왔다. 최근에는 사회적으로 성인병의 발생이 증가하고 이에 대한 예방 차원에서 천연물에 대한 관심의 증대에 힘입어 한약재 혹은 생약의 유효성에 대한 연구가 더욱 활기를 띠고 있다. 오늘날에는 이들 생약재 혹은 식물의 약리학적 효능을 식품이나 의약품, 화장품 등의 소재로 활용하고, 산업화하려는 연구가 크게 각광을 받고 있으며, 그 동안 민간에서 전해오던 한약재를 산업화하기 위한 기초연구 및 제품화연구도 활발히 진행되고 있다. 이상윤의 연구에 의하면, 국내 식품 관련 학회지에 게재된 생약 관련 논문 수가 80년대에 비해 90년대에 평균 5배 이상 증가되었으며, 특히 항산화작용, 항암활성에 대한 연구가 주류를 이루고 있는 것으로 보고되었다. 국내에서 연구된 생약자원의 약리

활성 화합물로는 주로 세포독 작용, 소염활성, 간보호 작용 등의 연구가 주를 이루며, 성분으로는 플라보노이드(flavonoid), 사포닌(saponin), 트리테르페노이드(triterpenoid)가 많이 분리되고 연구되었다.

최근에 국내에서 추진되고 있는 한약재를 이용한 기능성식품의 개발은 최첨단의 생명공학기술을 이용하여 부가가치의 창출과 그 기능성을 극대화하려는 방향으로 진행되고 있다. 따라서 기능성 식품소재 혹은 의료용 소재로서 식물 추출물 및 유효성분에 대한 특허 출원도 매년 증가되고 있다. 본 연구와 관련된 항비만, 동맥경화 예방 소재에 대한 특허로서는 풀무원에서 2002년에 특허등록한 천연식물소재 추출물을 이용한 항혈전 및 고지혈증 억제 조성물, 영남대학교 산학협력단에서 2006년에 등록된 단삼 추출물 및 분획물을 함유하는 동맥경화증의 예방 또는 치료용 조성물, 한국디디에스제약 주식회사에서 2004년에 특허 등록된 항비만 및 항콜레스테롤 효과를 나타내는 보이차 조성물, 주식회사 엠디바이오알파가 2004년에 특허 등록된 항비만 및 항당뇨 효과를 보이는 자생식물 추출물 등이 있다. 하지만 국내 자생식물을 이용한 많은 기능성 식품 소재 개발연구에 비하여 아직 산업화된 예는 많지 않다. 이는 한국식품의약품안전청에서 요구하는 건강기능식품에 관한 법률 제15조제2항 및 “건강기능식품 기능성 원료 인정에 관한 규정(식품의약품안전청고시)”을 충족시킬 수 있는 연구가 미흡하였기 때문이라고 추정된다.



## 제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과

### 제 1 절 연구 수행방법

#### 1. 뱀무 및 배암차즈기에서 기능성물질 분리 및 동정

##### 가. 식물 재료의 확보

본 연구에 사용된 뱀무는 경남농업기술원 함양 약초시험장의 포장에서 2004년부터 재배한 것을 매년 지상부를 수확하였으며, 배암차즈기는 2004년에는 경남 함양군 일원에서 자생하는 것을 2005년부터는 함양 약초시험장 포장에서 재배된 것의 지상부를 직접 채취하였다. 식물체는 음건하여 보관하면서 사용하였다.

##### 나. 배암차즈기(*Salvia plebeia* R. Br.) 및 뱀무(*Geum japonicum* THUNBERG)의 용매별 분획

배암차즈기와 뱀무의 음건 시료를 50°C dry oven에서 완전히 건조시킨 다음, 곱게 마쇄하여 80% Methanol로 실온에서 3회 반복 추출한 후, Whatman No. 2 filter paper로 여과하여 45°C 수온의 rotary vacuum evaporator로 감압농축 하였다. 얻어진 80% Methanol추출물을 동결건조한 후 그림 1의 방법으로 계통 분획하였다. Methanol 추출물을 먼저 Hexane:H<sub>2</sub>O(1:1)로 3~4회 분획하여 Hexane 분획분을 취해 감압 농축하였고, Methylene Chloride : H<sub>2</sub>O(1:1)와 Ethyl acetate : H<sub>2</sub>O(1:1)의 순으로 같은 방법으로 계통분획한 후 rotary vacuum evaporator로 감압 농축하여 각각의 fraction을 얻었다. Methanolic extract와 각각의 용매 fraction에 대한 수율은 표 1.에 나타냈다.

#### 2. 기능성물질 분리 및 동정

##### 1) 공시 재료

뱀무(*Geum japonicum* THUNBERG) 및 배암차즈기 (*Salvia plebeia* R. Br.) 조추출물의 용매분획 중 항산화활성 및 항지방화(anti-adipogenicity)

활성, 항비만(anti-obesity) 활성과 면역기능을 증진시키는 효과가 우수한 ethylacetate(EtOAc) 분획물을 대상으로 항산화활성물질의 분리 및 정제를 수행하였다.

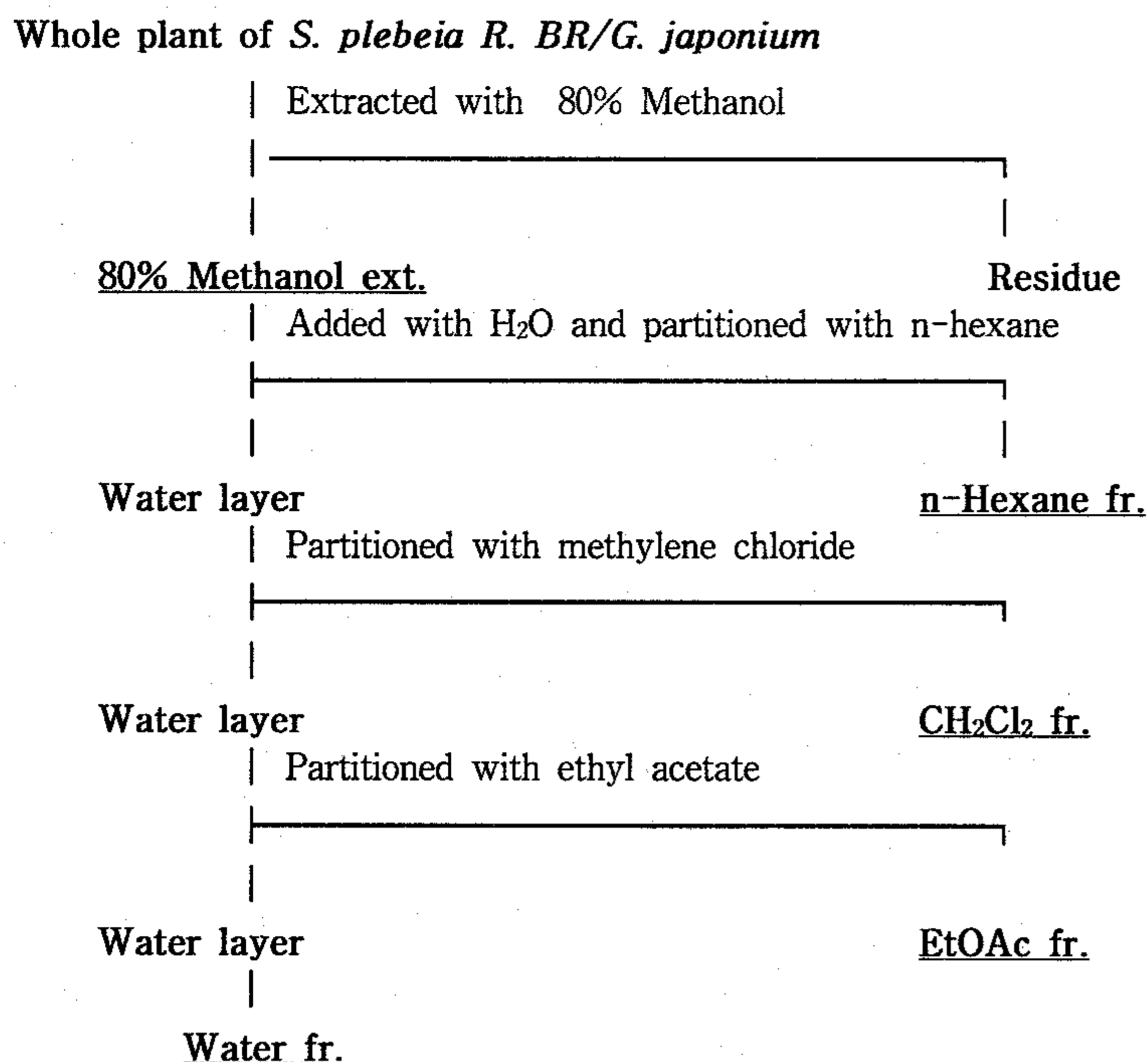


Fig. 1. Preparation of several extracts obtained from the whole plant of *Salvia plebeia* R. Br. and *G. japonium*

Table 1. Extraction yield of solvent fractions and methanol extract obtained from the plant of *Salvia plebeia* R. Br. and *G. japonium*

Solvents used	<i>Salvia plebeia</i> R. Br. (yield %)	<i>Geum japonicum</i> THUNBERG (yield %)
Plants powder(g)	1,500	1,500
MeOH extract(g)	344 used/374.6 (25.0)	385 (25.7)
Hexane fraction(g)	8.6 (2.5)	2.7 (0.7)
Methylene Chloride fraction(g)	8.4 (2.4)	2.3 (0.6)
EtOAc fraction(g)	5.3 (1.5)	18.0 (4.7)
Water fraction(g)	239 (69.5)	178 (48.6)

## 2) 시약 및 기기

Column 충전용 매질은 Kieselgel 60(Merck)과 Sephadex LH-20(Amersham Pharmacia Biotech AB)을 사용하였고, TLC plate는 Kieselgel 60 F<sub>254</sub>(Merck)를 사용하였다. 발색시약은 3mM 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) 및 phenolic compounds 검출시약인 Ferric Chloride -Potassium ferricyanide를 분사하였으며, UV 파장은 254 nm와 365 nm의 두 가지 detection을 병행하였다. 추출·분획 및 column chromatography용 용매는 1급을 사용하였고, 기기분석용 용매는 HPLC급을 사용하였다. Elution은 Bio-rad에서 생산된 fraction collector를 이용하여 수집하였고, 물질의 흡광도는 Shimadzu spectrophotometer로 측정하였다. Preparative chromatography HPLC는 Shimadzu제품으로 LC-6AD pump 2개, SPD-10A UV-vis detector, SCL-10A VP controller, SIL-10AD VP auto injector, CTO-10A column oven을 사용하였고, preparative column으로는 Phenomenex (00G-4336-NO, 250×10mm I.D.)제품을 이용하였다. Recycling prep-HPLC 수행은 Jai제품으로 LC-9104 series를 이용하여 JAI GEL-GS 310, 20 ∅ 50cm 2개와 20 ∅ 30cm 1개의 column을 직렬로 연결하여 사용하였다. 또한 UV detector(254 nm) 와 IR detector를 이용하여 수집하였다. Analytical HPLC는 Shimadzu 제품으로 LC-10AD pump 2개, SPD-M10A VP Photo diode array detector를 이용하여 Phenomenex column(00G-4336-E0, Synergi 4μ Polar-RP 80A, 250 × 4.60mm 4micron)을 통과시켜 분석하였다. MS분석은 Thermo Finigan LCQ Deca MAX MS/MSN/DS system를 이용하여 수행하였다.

## 3) 뱀무(*Geum japonicum* THUNBERG)의 항산화활성 물질 분리 및 동정

용매 계통분획으로 얻어진 뱀무(*Geum japonicum* THUNBERG)의 용매 분획물 중 ethylacetate(EtOAc) 분획물을 Toluene : Ethylacetate : Methanol : Formic acid(25 : 12 : 5 : 3)의 전개용매를 사용하여 TLC (Silica gel 60 F<sub>254</sub>, Merk) 상에 전개시켰고, 이 때 spot의 항산화 활성을 검출하기 위해 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)를 사용하였고, phenolic compounds를 확인하기 위해서는 Ferric Chloride-Potassium ferricyanide를 이용하였다. 이 EtOAc 분획물(49.5g)을 EtOAc-MeOH용매 (100:0 → 0:100 ; gradient)

로 silica gel column chromatography를 실시한 후 TLC pattern에 의해 5개의 분획(Fraction I ~ V)으로 나누었다. 이 중 Fraction IV를 제외한 4개의 분획물 (Fraction I, II, III, V)을  $\text{CHCl}_3$ -MeOH 용매체계(100:0 → 0:100 ; gradient)로 2차 silica gel column chromatography를 수행하여 활성분획을 얻었으며, 활성분획들을 MeOH-H<sub>2</sub>O 용매 조건(8 : 2)으로 Sephadex LH-20 column chromatography로 활성물질을 분리하였다. 여기에서 분리된 활성물질들을 최종적으로 Shimadzu preparative HPLC를 이용하여 단일 물질을 분리하였다. 분리된 화합물들을 LC/MS/MS와 NMR로 구조분석을 하여 구조를 확인하였다.

#### 4) 배암차즈기에서 항산화 활성물질의 분리 및 동정

배암차즈기(*Salvia plebeia* R. Br.)의 용매 분획물 중 ethylacetate (EtOAc) 분획물을 Toluene : Ethylacetate : Methanol : Formic acid (25 : 12 : 5 : 3)의 전개용매를 사용하여 TLC(Silica gel 60 F<sub>254</sub>, Merk) 상에 전개시켰고, 이 때 spot의 항산화 활성을 검정하기 위해 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)를 사용하였고, phenolic compounds를 확인하기 위해서는 Ferric Chloride-Potassium ferricyanide를 이용하였다. 이 EtOAc 분획물 (40.3g)을 EtOAc-MeOH용매(100:0 → 0:100 ; gradient)로 silica gel column chromatography를 실시한 후 TLC pattern에 의해 4개의 분획(Fraction I ~ IV)으로 나누었다. 이들 각각의 fraction을 농축하여 Fraction I 은 0.1g, II는 10.5g, III은 7.3g, IV는 6.3g의 소분획을 회수하였다. 이들은 전체적으로 높은 항산화활성을 나타내었고, 우선 항산화 활성이 가장 높은 Fraction II(10.5g)분획 중, 5.6g을  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH-H<sub>2</sub>O = 15 : 3 : 1의 혼합 용매로 용출을 시작하여, 점차 극성을 높여서 13 : 3 : 1, 9 : 3 : 1, 6 : 4 : 1의 혼합용매를 용출 용매로 사용하여, silica gel column chromatography를 수행하여 총 10개의 분획 (SPE-II-1~SPE-II-10)을 얻었다. 10개의 분획 중에서 활성이 높은 분획을 Sephadex LH-20 c.c를 수행하여, 3종의 항산화 활성 물질을 분리하였다.



## 5) 항산화활성 검정

항산화성 효과와 관련된 성인병 예방효과를 살펴보기 위하여 활성산소로 유발되는 병인 즉, 활성산소에 의한 비정상적 세포자살은 암세포 유발과 동맥경화를 유발하므로 이에 대한 땀무와 배암차즈기의 추출 분획의 항산화 효과를 검정 하였다.

### 가) DPPH방법에 의한 radical 소거활성 검정

배암차즈기(*Salvia plebeia* R. Br.)와 땀무(*Geum japonicum* THUNBERG)에 대한 각각의 용매 fraction은 DPPH 방법에 의해 radical 소거활성 검정을 하였으며, Duh와 Yen의 방법을 응용하여 수행하였다. 시료의 fraction과 표준물질은 각각 0, 20, 40, 60, 100 $\mu$ g/ml의 농도로 DMSO로 희석시켰으며, 이것을 반응시료로 사용하였다. DPPH는 농도가 0.1mM이 되도록 에탄올에 용해시켜 반응용액으로 사용하였으며, 반응시 시료 100 $\mu$ l에 DPPH 용액 2mL을 첨가하여 실온에서 약 10분간 정치한 후에 517nm에서 흡광도를 측정하였다.

측정된 흡광도는 아래의 수식에 따라 Inhibition value(%)를 산출했다.

$$\text{Inhibition value(\%)} = (1-A/B) \times 100$$

A: 시료의 absorbance

B: 대조구의 absorbance

Inhibition value(%)에 의거하여 검량선을 작성해서 얻어진 방정식을 이용하여, *Salvia plebeia* R. Br.와 *Geum japonicum* THUNBERG의 SC<sub>50</sub>( $\mu$ g/ml)을 구하였다.

### 나) Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay

FRAP assay는 화합물의 환원력 (ferric reducing ability)을 측정하는 것이다. 3.6의 낮은 pH에서 ferric tripyridyltriazine (Fe<sup>III</sup>-TPTZ) 복합체가 환원제 (antioxidant)에 의해서 파란색의 ferrous tripyridyltriazine (Fe<sup>II</sup>-TPTZ) 복합체로 될 때 흡광도를 측정하여 검색하고자 하는 화합물에 대한 환원력 (ferric reducing ability)를 보는 것이다.

먼저 3.1 g의 C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub> × 3H<sub>2</sub>O와 16 ml의 acetic acid (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>)를 넣어서 1 L의 acetate buffer (pH 3.6, 300 mM)를 만든다. 그리고 40 mM



HCl로 10 mM의 TPTZ(2,4,6-tripyridyl-s-triazine)와 증류수로 20 mM의 FeCl<sub>3</sub> × 6H<sub>2</sub>O를 각각 만들어 사용하였다 (Benzie and Stratin, 1996). 그 후 FRAP assay을 위한 반응액(working solution)은 100 ml acetate buffer, 10 ml TPTZ solution, 10 ml FeCl<sub>3</sub> × 6H<sub>2</sub>O를 혼합하여 즉 각각 10 : 1 : 1의 비율로 섞어 실험에 사용하였다. 그리고 96 well plate에 FRAP 반응액(working solution) 190 µl를 넣고 400 ng의 화합물 10 µl를 넣었다. 그 후 30분 동안 590 nm에서 흡광도를 측정하였다. FRAP 반응액(working solution)은 항상 실험 전에 만들어 사용하였다.

#### 다) Hydroxyl radical 소거 활성

Hydroxyl radical 소거 활성은 2-deoxyribose 산화 방법을 이용하였다. Fe<sup>II</sup>와 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 반응하는 Fenton 반응에 의해 생성되어진 hydroxyl radical이 2-deoxyribose를 산화시켜 MDA(malondialdehyde)로 분해시키며 이 MDA를 530nm에서 측정한다. 우선 50 mM의 FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 10 µl와 50 mM의 EDTA(ethylenediaminetetraacetic acid) 10 µl을 각각 넣는다. 그리고 증류수에 녹인 50 mM 2-deoxyribose 20 µl, 0.2 ng/µl 화합물을 20 µl 첨가한 후 100 mM phosphate buffer(pH 7.4) 120 µl, 50 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 20 µl 넣고 37°C에서 4시간 동안 배양하고 2.8 % trichloroacetic acid 100 µl 그리고 50 mM NaOH에 녹인 1 % TBA(2-thiobarbituric acid) 100 µl를 반응물에 첨가하였다. 그 후 시료액을 혼합하고 100°C에서 15분 동안 가열시켰고, 얼음 속에서 급속히 냉각하여 530 nm에서 흡광도를 측정하였다. Hydroxy radical 소거 활성(%)은 아래의 식으로부터 계산하였다.

$$\text{Hydroxy radical 소거 활성 (\%)} = (1 - \text{HAS}/\text{HAC}) \times 100$$

HAS: 시료 첨가구의 흡광도

HAC: 시료 무첨가구의 흡광도

#### 라) Linoleic acid 및 유지류에 대한 항산화 활성

Linoleic acid에 대한 항산화 활성은 Takao 방법과 linoleic acid를 기질로 하는 반응 시스템(reaction system)에서 과산화물의 생성을 억제하는 Nakatani의 ferric thiocyanate 방법을 응용하여 사용하였다. 과산화 지질

(linoleic acid)에 의해 FeII가 FeIII로 산화되게 되고 FeIII는 ammonium thiocyanate와 반응해서 붉은색으로 변하게 되는데 이것을 490 nm에서 비색 정량한 것이다. 1.5 ml E-tube에 0.2 ng/ $\mu$ l의 화합물을 20  $\mu$ l, 에탄올에 녹인 25 mg/ml의 linoleic acid를 100  $\mu$ l를 넣는다. 그리고  $5 \times 10^{-2}$  M의  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 와  $5 \times 10^{-2}$  M의  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 를 잘 혼합한 다음 pH 7.0의 50 mM sodium phosphate buffer 880  $\mu$ l를 넣고 40-60  $^{\circ}\text{C}$ 의 암소에서 다양한 시간 동안 반응시켰다. 위에서 반응시킨 혼합물을 각각 시간별로 100  $\mu$ l 취하여 15 ml falcon tube에 넣고 75 % ethanol을 3 ml 가하여 희석하였다. 증류수로 희석한 30 % ammonium thiocyanate 100  $\mu$ l를 넣고 마지막으로 3.5 % HCl로 용해한 20 mM  $\text{FeCl}_2$ 를 100  $\mu$ l 넣고 30시간 동안 진탕한 후 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. lipid peroxide에 대한 항산화 활성(%)은 아래의 식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{lipid peroxide에 대한 항산화 활성 (\%)} = (1 - \text{LAS}/\text{LAC}) \times 100$$

LAS: 시료 첨가구의 흡광도

LAC: 시료 무첨가구의 흡광도

또한 유지류에 대한 항산화활성은 Rancimat 679(METROHM AG, CH-9100 Herisau, Swiss)를 이용하였다. 돈지, 팜 오일, 들깨유 30g을 반응조에 넣고 항산화성 물질을 0.005% 농도로 반응조에 첨가하여 130  $^{\circ}\text{C}$ 에서 가열하여 유지의 산화를 방지하는 시간을 측정하였다.

마) 총 페놀성 물질(Total phenolic compounds) 함량분석.

총 페놀성 물질 함량은 Folin-Denis방법에 따라 분석하였다. 배암차즈기 (*Salvia plebeia* R. Br.)와 뱀무(*Geum japonicum* THUNBERG)의 분쇄된 시료 5g에 80% Methanol 100ml를 가하여 shaking bath에서 1일간 추출한 다음, 추출용액은 Whatman No. 42 여과지를 이용하여 여과한다.

추출용액 1ml에 증류수와 Folin & Ciocalteu's phenol reagent를 넣고 잘 혼합한 후 5분간 정치시킨 후,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  포화용액 1ml를 넣어 혼합하여 실온에서 1시간동안 정치시킨 후 760nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질은 Chlorogenic acid를 사용하였다.

## 2. 뱀무 및 배암차즈기 추출물 및 유효성분에 대한 생리활성 검증

### 가. 뱀무 및 배암차즈기 추출액의 용매분획별 면역세포에 대한 활성 분석

#### 1) Nitrite Quantification

Raw 264.7 세포주를 이용하여 96well plate에 well당  $5 \times 10^4$  cell/ml의 농도로  $80 \mu\text{l}$ 씩 분주한 뒤  $10 \mu\text{g/ml}$ 농도의 LPS( $10 \mu\text{l}$ )를 가하고 sample을 처리하여 Nitrite의 생성정도를 알아보았다. 세포배양 상등액  $100 \mu\text{l}$ 와 Griess 시약 [1% (w/v) sulfanilamide in 5%(v/v) phosphoric acid와 0.1% (w/v) naphthylenediamone- HCl]  $100 \mu\text{l}$ 를 혼합하여 96 well plate에서 10분 동안 반응시킨 후 550nm 흡광도를 측정하였다.

#### 2) Measurement of Cytokine Production

TNF- $\alpha$ 는 ELISA kits (S&D System, Minneapolis)를 이용하여 측정하며 PGE<sub>2</sub>는 commercially available enzyme immunoassay system(Amersham Phramacia Biotech, Buckinghamshire, UK)를 사용하여 측정함

#### 3) Cell Viability 측정

분리 한 thymocyte로 세포증식율을 MTT법으로 측정한다. 본 실험에 사용한 MTT법은 Mosmann이 개발하여 Kotnik 등이 변형시킨 방법으로, 흉선세포 부유액을 RPMI 1640배지로 희석하고 96-well palte에  $1.2 \times 10^6$  cells/ml 농도로 접종하여 Con A  $5 \mu\text{g/ml}$ 를 첨가한 후 37°C의 CO<sub>2</sub> incubator에서 48시간 배양한 다음, 배양 종료 4시간 전에 MTT시약을 가한다.

### 나. 세포사멸 효과

Human lung adenocarcinoma cell인 A549 cell을 이용하여 시료의 Cytotoxicity 를 관찰하였다.

#### 1) MTT assay

MTT assay에서 세포 수 측정은 CCK-8 kit(DOJINDO, Kumamoto, Japan)를 사용하여 실험하였다. 이 kit는 수용성의 tetrazolium salt를 포함



하고 있으며 2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt)는 살아 있는 세포의 미토콘드리아의 탈수소 효소 (dehydrogenases)에 의해서 노란색의 산물 (formazan)로 환원되는데 살아있는 세포의 수와 직접적으로 비례하는 탈수소효소 (dehydrogenases)에 의해서 생성되는 formazan의 양을 450 nm에서 측정함으로써 세포의 생존율을 관찰 할 수 있다. 본 실험에서는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 산화 스트레스를 주어서 세포사멸을 유도한 다음 세포의 생존율을 비교하였다. 세포의 생존율(%)은 다음의 계산식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{세포 생존율 (\%)} = \text{AS/AC} \times 100$$

AS: toxicant (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 무첨가구의 흡광도

AC: 시료 첨가구의 흡광

## 2) SRB Assay

세포의 생육도를 평가하기 위하여 SRB assay를 하였다. 각각의 시료는 1000, 250, 62.5, 15.625 (ug/ml)의 농도로 최종 DMSO의 농도가 0.4%가 되게 하여 한 well당 10ug씩 처리하여 48, 72hr을 관찰하였다.

## 3) Cox2 promoter assay

Cox2 는 위암과 관련된 유전자로 많이 알려져 있다. 이 유전자의 활성을 측정함으로써 위암의 억제효과를 알 수 있는 물질을 검색할 수 있다. 본 실험은 Cox2 의 promoter 부분을 이용하여 luciferase activity를 측정함으로써 유전자의 expression pattern을 보고자 하였다.

### 다. 3T3-L1 세포에서 지방화 억제 효과

#### 1) 3T3-L1 cell culture

Mouse embryo 3T3-L1 cells(ATCC, Rockville, MD)을 10% FBS, penicillin/streptomycin(Sigma) 함유된 DMEM(GIBCO)으로 배양하여 Preadipocyte를 differentiatio 시킨 후 시료에 의한 증식도를 측정하였다.

#### 2) Triglyceride accumulation 측정

PBS로 세포를 washing 후 lysis buffer(50mM Tris-HCl, pH7.5)로 lysis하여 total triglycerol (Wako, Triglyceride G-test kit) 측정정도를 측정하였다.

### 3) Glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) activity 측정

PBS로 washing 한 후 lysis buffer(50mM Tris-HCl, pH7.5, 1mM EDTA)로 lysis하여 GPDH 분석을 하였다.

### 4) Oil red O staining

지방의 분화가 된 후 9일 되는 시점에서 세포를 wash 한 후 10% formaldehyde로 fix 후 0.5% Oil red O로 staining 한다. 세포를 stain 하기 전에 세포사진을 촬영하고 염색 후에도 사진을 촬영하였다. 염색 정도의 농도를 측정하기 위하여 isopropyl alcohol로 녹여서 UV spectrometer 로 510nm에서 측정하였다.

## 라. 실험동물들을 이용한 뱀무 추출물 및 유효성분에 대한 생리활성 검증

### 1) 실험동물의 사육 및 식이

본 연구에서는 3주령 Sprague-Dawley 종 숫컷 흰쥐를 중앙실험동물사에서 구입하여 두 군으로 나누어 정상 식이군과 고지방 식이군을 두었다. 비만 유도 후 10주령부터 4주간 뱀무의 에칠아세테이트 분획을 각각 식이 섭취량의 1%, 5%(w/w) 씩, 그리고 뱀무의 주 항산화성 물질인 THBA (3,4,5-trihydroxybenzaldehyde)를 에칠아세테이트 분획물에 있는 함량과 비슷한 양의 농도(3mg/ml)로 경구투여하여 고지방대조군, 1% GJ군, 5% GJ군, THBA군으로 하였다. 정상 대조군은 4주령부터 10주의 실험 기간 동안 AIN-76A diet # 100000 (Dyets Inc., Bethlehem, PA, USA)를 공급하였고, 고지방 식이군은 지방 급원으로 beef tallow를 사용하여 AIN-76A high fat diet # 100496 (Dyets Inc., Bethlehem, PA, USA)으로 총 열량의 40%를 지방으로 공급하여 사육하였다(Table 2). 각 실험군은 8마리로 하였다.

실험동물은 한 마리씩 분리하여 사육하였고, 물과 식이는 제한없이 공급하였다. 실험 기간 동안 식이 섭취량과 체중은 일주일에 2회 측정하였다. 식이 효율 (FER)은 실험식이 공급 일로부터 희생 일까지를 총 실험기간으로 하여 실험 기간 동안의 체중 증가량을 실험 기간 동안의 식이 섭취량으로 나누어 산출하였다.



Table 2. Composition of experimental diets (g/Kg diet)

Ingredients	Normal diet <sup>1)</sup>	High fat diet <sup>2)</sup>
Casein	200	200
DL-Methionine	3	3
Corn starch	150	150
Sucrose	500	345
Cellulose	50	50
Corn Oil	50	-
Beer Tallow	-	205
Salt Mixture	35	35
Vitamin Mixture	10	10
Choline Bitartrate	2	2
Fat % (Calories)	11.7	40.0

1) Normal diet ; AIN-76A diet #100000

2) High fat diet ; AIN-76 diet #100496 (Dyets Inc. Bethlehem, PA, USA)

## 2) 시료수집

실험동물을 14주령에 희생하여 혈액과 장기를 채취하였다. 부고환 지방(epididymal fat), 내장 지방(visceral fat), soleus 근육을 분리하여 중량을 측정하였고, 추출 즉시 액체 질소로 동결하였다. 혈액은 희생 시 heart puncture 방법으로 채취한 후 3000 rpm에서 15분간 원심분리하여 혈청을 얻었으며 이들 시료는 분석 시까지 -70°C에서 보관하였다.

## 3) 지방 세포 크기 측정

16 주령의 실험 동물에서 추출한 visceral fat 조직을 분해하여 지방 세포의 크기를 측정하였다. 지방 조직을 collagenase를 함유한 NaCl-buffer로 37°C에서 1시간 동안 분해한 후 450µm nylon mesh로 filtration 하여 지방 세포를 얻고, 눈금을 가진 현미경으로 지방 세포의 크기를 관찰하였다. 각 조직마다 30개 세포의 직경을 측정하여 평균을 구하였다.

## 4) 혈중 지질 분석

혈청의 총 콜레스테롤 및 HDL 콜레스테롤, 중성지방의 함량을 Sigma Chemical 사 (St. Louis. MO)의 Kit을 이용하여 측정하였다.

### 5) 혈중 렙틴 함량 분석

혈청 중 렙틴 함량은 Linco leptin Assay Kit (Linco Research Immunoassay, St. Charles, MO)를 이용하여 방사선 면역능을 측정하였다.

### 6) Uncoupling protein m-RNA 분석

Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction을 이용하여 지방 축적과 대사의 주요 조직인 백색지방조직의 분석을 위해 내장 지방조직에서 UCP1, 3 mRNA를 측정하였다.

실험동물에서 분리한 조직으로부터 Trizol reagent(Gibco 15596-026)를 이용하여 RNA를 분리하고 spectrophotometer를 이용하여 정량 하였다. 분리된 총 RNA로부터의 cDNA를 합성을 위하여 2 µg의 RNA를 70°C에서 5분간 열처리한 후 4°C에서 5분동안 방치하고 여기에 M-MLV(Promega M1705) 200 U, dNTP(each 2.5 mM) mix 2 µl, RNasin(Promega N2111) 40 units, oligo (dT) primer (Promega C1101) 1 µl 를 혼합한 후 DEPC-water로 25 µl를 맞추어 42°C 1시간, 75°C 30분 조건하에서 cDNA를 합성하였다.

합성된 cDNA로부터 UCP1의 발현량을 측정하기 위하여 primer를 제작하였고 house keeping gene으로는 β-actin을 이용하였다. 실험에 사용한 primer와 product size는 다음과 같다. UCP1 sense 5'-TAC CCA CAT CAG GCA ACA G-3', antisense 5'-TCA TTG CAC AGC TGG GTA C-3', (product size 842 bp), UCP3 sense 5'-ACC ATG GTT GGA CTT CAG C-3', antisense 5'-AGT TCC CAG CGT ATC CAT G-3' (product size 450 bp).

유전자 발현량을 측정하기 위한 PCR 조건은 다음과 같다. Tag polymerase (TaKaRa Taq R001A) 0.125 µl, 10×PCR buffer 2.5 µl, dNTP mix 2 µl, Primer, sample, 증류수로 25 µl를 맞추는 후 94°C 3분, 94°C 30초, 60°C 1분, 72°C 1분30초, 30회 반복한 후 94°C 30초, 60°C 1분, 72°C 10분, 1회 PCR을 하였다. PCR 산물은 1.5% agarose에서 100 V 하에서 전기 영동하여 분리한 후 10µg/ml의 EtBr에서 30분동안 염색하고 증류수에서 15분동안 탈색하여 transilluminator에서 관찰하였다.

## 7) 자료의 처리

각 실험군간의 차이를 one-way ANOVA에 의하여 검정하고  $\alpha=0.05$  수준에서 Duncan's multiple range test를 실시하였다. 유의성은  $\alpha=0.05$ ,  $\alpha=0.01$  수준에서 검정하였고, 모든 통계 분석은 SAS program을 이용하여 처리하였다. 결과는 평균(mean) $\pm$ 표준편차(standard deviation, SD)로 표시하였다.

### 마. 뱀무추출물의 동맥경화 예방효과 검정

#### 1) 세포배양

사람 동맥평활근 세포(HASMC)를 문헌에 기재된 방법으로 배양(Moon, et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 301, pp1069-1078, 2003b)하였다. 배양액은 (평활근 세포 성장 배지-2: 10% FBS, 2 ng/ml 인간 기본 섬유아세포 성장 인자, 0.5 ng/ml 인간 내피 성장 인자, 50  $\mu$ g/ml 젠타마이신(gentamicin, 50  $\mu$ g/ml amphotericin-B, 5  $\mu$ g/ml 소 인슐린)로 준비하고, 모든 실험에는 초대 폐세지(passage) HASMC를 80-90% 컨플루언스(confluence)로 배양하였고, 무혈청(serum starvation, 0.1% FBS)에서 보존하였다.

#### 2) 세포독성 검정

세포독성 검정은 HASMC에서 XTT 키트(XTT II, Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany)로 측정하였다. 세포를 96-웰 배양 플레이트(culture plate)에서 2시간 동안  $1 \times 10^4$ 세포/웰 DMEM로 키우고 뱀무추출물에서 분리한 THBA(3,4,5-trihydroxybenzaldehyde)을 여러 농도로 (0, 10, 50, 200, 및 500  $\mu$ g/ml) 하여 3개의 실험 군으로 나누어 처리하였다. 20시간 후에 50 $\mu$ l의 XTT 환원 용액(나트륨 3'-[1-(페닐-아미노카보닐)-3, 4-테트라졸리움]-비스(4-메톡시-6-니트로)벤젠술포산 수화물 및 N-메틸 디벤조피라진 메틸 설페이트; 50:1로 혼합)을 첨가하였다. 24시간 후에 490 nm에서 엘리사(ELISA) 플레이트 리더(plate reader)로 XTT와 함께 배양기에서 측정하였다(37°C, 5% CO<sub>2</sub> + 95% 공기). 실험은 3회씩 독립적으로 실시하였고, 결과는 평균치(mean $\pm$  SE)로 표시하였다.



3) 사람동맥평활근 세포(HASMC)가 생성하는 MMP-9의 저해력 검정  
 MMP-9 활성은 문헌에 기재된 방법을 다소 변형하여 실시하였다 (Chung, et al.). THBA의 MMP-9억제활성을 검토하기 위하여 TNF- $\alpha$ (100 ng/ml)를 처리 및 무처리한 사람 동맥평활근 세포 (HASMC)의 배양액을 62.5 mM 농도의 트리스-염산(TrisHCl, pH 6.8), 10% 글리세롤(glycerol), 2% 에스디애스(SDS)와 0.00625% (w/v) 의 브로모페놀 블루(bromophenol blue)를 함유한 완충액에 현탁하여 가열하지 않은 상태로 젤라틴 0.1% (w/v)를 함유한 7.5%의 아크릴아미드/비스아크릴아마이드(acrylamide/bisacrylamide, 29.2:0.8) 전기영동용 분리 겔에 적하하였다. 100 볼트 전압으로 일정하게 전기영동을 하였으며, 전기영동 후 겔을 실온에서 Triton X-100 0.25%액에 30분간 2회 침윤한 다음 순수한 물로 세척하였다. TNF- $\alpha$ 로 유도된 MMP-9의 발현에 대한 THBA의 저해 효과를 검정하기 위하여 HASMC를 THBA 농도(0, 20, 50, 100, 200, 500  $\mu$ g/ml) 별로 처리하였으며 zymography 하였다. HASMC 세포들을 10% FBS/DMEM 배지에서 배양하여 PBS로 세척한 다음 TNF- $\alpha$ 를 처리한 혈청이 없는 DMEM 배지에 THBA를 처리하여 24시간 배양하였다. 이후 정상 생육된 세포들을 수거하여 젤라틴 0.1%가 함유도니 폴리아크릴아마이드 10% 겔에 현탁하여 전기영동하였다. 전기영동한 겔은 SDS를 제거하기 위하여 Triton X-100 2.5%(v/v)용액으로 1시간 세척한 다음 젤라틴의 단백질이 분해 될 수 있도록 37°C에서 24시간 배양하였다. 이후 겔을 Coomassie Brilliant blue R-250 (Bio-Rad, Richmond, CA, USA)로 염색하여 효소 활성의 정도를 측정하였다.

TNF- $\alpha$ 를 처리한 HASMC, LPS를 처리한 raw 264.7 세포, MMP-9이 상시 발현되는 Hep3B 세포에서 MMP-9에 대한 THBA의 저해효과를 검정하기 위하여 젤라틴 SDS-PAGE에서 전기영동하였다. MMP-9을 함유한 겔을 THBA 농도별로 처리하여 37°C에서 24시간 항온 배양한 다음 Coomassie Brilliant blue로 염색하여 효소의 저해정도를 검정하였다. 그 결과 도4에서 보는 바와 같이 THBA에 의한 MMP-9 저해활성은 세포 종류별로 차이는 있었지만 50에서 500  $\mu$ g/ml 농도에서 활성이 거의 소멸되었다.



#### 4) 동맥평활근 세포의 이주능 실험

TNF- $\alpha$ 로 유발된 동맥 평활근 세포의 이주능을 시험하기 위하여 문헌에 기재된 매트리지젤 이주 분석법(Matrigel migration assay)을 사용하였다.(Chung, et al.). 매트리지젤(Matrigel)-코팅된 여과 삽입물(8m 공작크기)을 벡톤-디킨슨(Becton-Dickinson, NJ, USA)사의 24-웰 인베이션 챔버(invasion chambers)에 고정 후 HASMC( $5 \times 10^4$  세포/웰) 세포를 일정 시간 배양한 후, TNF- $\alpha$ 처리 HASMC를 24시간 배양 후 다양한 농도의 THBA(0, 20, 50, 및  $100\mu\text{g/ml}$ )을 처리하였다. 대조군으로는 TNF- $\alpha$ 처리배지를 처리하지 않은 세포와 동맥경화 예방 및 치료 효과가 알려져 있는 에피갈로카테킨(EGCG, epigallocatechin-3-gallate)를 사용하였다. 매트리지젤 인베이션 챔버를  $37^\circ\text{C}$ , 24시간, 5%  $\text{CO}_2$ 에서 보온하였다.

#### 바. 실험동물을 이용한 뱀무 추출물의 에너지소비 증진 효과 검증

##### 1) 실험동물의 사육 및 식이

본 연구에서는 3주령 Sprague-Dawley 종 스킷 흰쥐를 중앙실험동물사에서 구입하여 두 군으로 나누어 정상 식이군과 고지방 식이군을 두었다. 비만 유도 후 10주령부터 4주간 뱀무의 에칠아세테이트 분획을 각각 식이 섭취량의 1%, 3%, 5%(w/w) 씩, 그리고 뱀무의 주 향산화성 물질인 THBA(3,4,5-trihydroxybenz-aldehyde)를 에칠아세테이트 분획물에 있는 함량과 비슷한 양의 농도( $3\text{mg/ml}$ )로 경구투여하여 고지방대조군, 1% GJ군, 3% GJ군, 5% GJ군, THBA군으로 하였다. 정상 대조군은 4주령부터 10주의 실험 기간 동안 AIN-76A diet # 100000 (Dyets Inc., Bethlehem, PA, USA)를 공급하였고, 고지방 식이군은 지방 급원으로 beef tallow를 사용하여 AIN-76A high fat diet # 100496 (Dyets Inc., Bethlehem, PA, USA)으로 총 열량의 40%를 지방으로 공급하여 사육하였다. 각 실험군은 8마리로 하였다.

실험동물은 한 마리씩 분리하여 사육하였고, 물과 식이는 제한없이 공급하였다. 실험 기간 동안 식이 섭취량과 체중은 일주일에 2회 측정하였다. 식이 효율(FER)은 실험식이 공급 일로부터 희생 일까지를 총 실험기간으로 하여 실험 기간 동안의 체중 증가량을 실험 기간 동안의 식이 섭취량으로 나누어 산출하였다.

## 2) 시료수집

실험동물을 14주령에 희생하여 혈액과 장기를 채취하였다. 부고환 지방(epididymal fat), 내장 지방(visceral fat), soleus 근육을 분리하여 중량을 측정하였고, 추출 즉시 액체 질소로 동결하였다. 혈액은 희생 시 heart puncture 방법으로 채취한 후 3000 rpm에서 15분간 원심분리하여 혈청을 얻었으며 이들 시료는 분석 시까지  $-70^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하였다.

## 3) 지방 세포 크기 측정

16 주령의 실험 동물에서 추출한 visceral fat 조직을 분해하여 지방 세포의 크기를 측정하였다. 지방 조직을 collagenase를 함유한 NaCl-buffer로  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간 동안 분해한 후  $450\mu\text{m}$  nylon mesh로 filtration 하여 지방 세포를 얻고, 눈금을 가진 현미경으로 지방 세포의 크기를 관찰하였다. 각 조직마다 30개 세포의 직경을 측정하여 평균을 구하였다.

## 4) 혈중 지질 분석

혈청의 총 콜레스테롤 및 HDL 콜레스테롤, 중성지방의 함량을 Sigma Chemical 사(St. Louis, MO)의 Kit을 이용하여 측정하였다.

## 5) 혈중 렙틴 함량 분석

혈청 중 렙틴 함량은 Linco leptin Assay Kit(Linco Research Immunoassay, St. Charles, MO)를 이용하여 방사선 면역능을 측정하였다.

## 6) Uncoupling protein m-RNA 분석

Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction을 이용하여 지방 축적과 대사의 주요 조직인 백색지방조직의 분석을 위해 내장 지방조직에서 UCP1, 3 mRNA를 측정하였다.

실험동물에서 분리한 조직으로부터 Trizol reagent (Gibco 15596-026)를 이용하여 RNA를 분리하고 spectrophotometer를 이용하여 정량 하였다. 분리된 총 RNA로부터의 cDNA를 합성을 위하여  $2\mu\text{g}$ 의 RNA를  $70^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 열처리한 후  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 5분동안 방치하고 여기에 M-MLV(Promega M1705) 200 U, dNTP(each 2.5 mM) mix  $2\mu\text{l}$ , RNasin(Promega N2111)

40 units, oligo (dT) primer (Promega C1101) 1  $\mu$ l를 혼합한 후 DEPC-water로 25  $\mu$ l를 맞추어 42°C 1시간, 75°C 30분 조건하에서 cDNA를 합성하였다.

합성된 cDNA로부터 UCP1의 발현량을 측정하기 위하여 primer를 제작하였고 house keeping gene으로는  $\beta$ -actin을 이용하였다. 실험에 사용한 primer와 product size는 다음과 같다. UCP1 sense 5'-TAC CCA CAT CAG GCA ACA G-3', antisense 5'-TCA TTG CAC AGC TGG GTA C-3', (product size 842 bp), UCP3 sense 5'-ACC ATG GTT GGA CTT CAG C-3', antisense 5'-AGT TCC CAG CGT ATC CAT G-3' (product size 450 bp).

유전자 발현량을 측정하기 위한 PCR 조건은 다음과 같다. Tag polymerase(TaKaRa Taq R001A) 0.125  $\mu$ l, 10 $\times$ PCR buffer 2.5  $\mu$ l, dNTP mix 2  $\mu$ l, Primer, sample, 증류수로 25  $\mu$ l를 맞춘 후 94°C 3분, 94°C 30초, 60°C 1분, 72°C 1분30초, 30회 반복한 후 94°C 30초, 60°C 1분, 72°C 10분, 1회 PCR을 하였다. PCR 산물은 1.5% agarose에서 100 V 하에서 전기 영동하여 분리한 후 10 $\mu$ g/ml의 EtBr에서 30분동안 염색하고 증류수에서 15분동안 탈색하여 transilluminator에서 관찰하였다.

## 7) 식이섭취관련 유전자 분석

NPY(Neuropeptide Y) 수용체등의 mRNA level의 분석은 뇌를 균질화하여 RNA를 추출하고 RT-PCR에 의하여 증폭하여 NPY 유전자 발현을 보정. 전기영동결과를 관찰한 후 GEL-DOG(Photodoc system, Bio-Rad)을 사용하여 확인하고 사진으로 제작하였다.

## 8) 자료의 처리

각 실험군 간의 차이를 one-way ANOVA에 의하여 검정하고  $\alpha=0.05$  수준에서 Duncan's multiple range test를 실시하였다. 유의성은  $\alpha=0.05$ ,  $\alpha=0.01$  수준에서 검정하였고, 모든 통계 분석은 SAS program을 이용하여 처리하였다. 결과는 평균(mean) $\pm$ 표준편차(standard deviation, SD)로 표시하였다.



### 3. 기능성 식품 소재화를 위한 응용기술 연구

#### 가. 뱀무 생리활성 물질의 최적 추출 방법

##### 1) 메탄올 농도별 추출과 sonication에 의한 추출 효과

50ml Falcon tube에 2g 뱀무 분말을 70, 80, 90% 에탄올과 메탄올 40ml로 각각 추출하였다. 또한 추출시 sonication을 1시간 동안 실시 한 후 추출한 것과 추출은 실온에서 2시간 진탕(230 strokes/min)한 후 3000rpm, 19℃, 15분간 원심 분리하는 과정을 3회 반복 하였다. 상등액은 rotary evaporator(water bath Temp. 50℃)로 농축하여 20ml 증류수에 녹여 4일간 동결 건조시켰다. 건조된 시료 0.01g을 4ml MeOH에 녹여 2.5mg/ml 농도로 맞추는 후 Whatman Paper(No.4)로 여과하고 0.45 $\mu$ m membrane filter로 여과 한 후 HPLC C18 column chromatography로 THBA의 함량을 조사하였고 표준 물질로는 Sigma 사로부터 구입한 THBA를 농도별로 희석하여 HPLC의 area 값으로 환산한 검량식을 기준으로 구하였다.

##### 2) 주정농도별 추출효율

식품 공정시 공업용 에탄올이나 메탄올의 사용을 금지하기 때문에 주정을 이용하여 실험하였다. 2N HCl과 4N NaOH를 이용하여 pH를 4, 7, 10으로 조정한 주정 에탄올을 60, 70, 80, 90%로 하여 뱀무 식물체의 음건 분말 시료로부터 THBA를 추출하였고 2.5mg/ml 시료농도로 맞추는 후 20 $\mu$ l를 HPLC에 주입시켜 10~40% B 용매로 40분간 전개시켰다. 표준품 THBA와 retention time과 UV spectrum을 비교하여 나타난 area 값을 THBA 검량선에 대입하여 실제 농도를 환산하였다.

##### 3) Hexane처리 후 주정 추출 효율

뱀무 분말 2g을 40ml Hexane으로 3회 추출하여 탈지 후 다시 주정을 60, 70, 80, 90%농도별로 처리한 후 추출하였고 위와 동일한 방법으로 농축 후 HPLC로 THBA의 함량을 조사하였다.

##### 4) 뱀무의 THBA 분석 방법

THBA는 Sigma사에서 구입하여 농도별 area값을 이용하여 검량선을 작성하였고, HPLC 분석 조건은 다음과 같이 실시하였다.



Diode array detector (DAD) (SPD M20A Prominence)가 장착이 된 Shimadzu Prominence HPLC system을 사용하였고, C18 역상 분석용 칼럼( $4\mu\text{m}$ ,  $4.6 \times 250\mu\text{m}$ , Phenomenex, USA)을 사용하였다. 이동상 용매 A는 95% water(HPLC 급), 5% acetonitrile(MeCN, HPLC 급), 0.025 % formic acid로 만들어 졌고, 이동상 용매 B는 50% MeCN, 0.025% formic acid, 50% water로 만들어졌다. 시료  $20\mu\text{l}$ 를 주입한 후  $1\text{ml}/\text{min}$ 의 유속으로 이동상 용매를 0min (90% A, 10% B), 30 min (40% B), 35 min (40% B), 40 min(10% B), 45min(10% B)와 같이 gradient로 용출시켰다.

### 5) LC-MS/MS 분석

칼럼은 역상 칼럼(phenomenex LC-18)을 사용하였고, 용매는 HPLC 분석시에 사용된 것과 동일한 용매를 사용하였다.  $5\mu\text{l}$  시료를 주입한 후 5%에서 65%로 B용액을  $0.2\text{ml}/\text{min}$  유속으로 40분까지 흘려보내고 10분간 다시 5%로 흘려보내주었다. HPLC에 ESI positive ion mode가 장착된 mass spectrometer (Finnigan LCQ Deca XP MAX ion trap (San Jose, CA, USA)를 이용하여 시료를 분석하였다.

### 나. 뱀무 추출물의 저장 안전성 조사

#### 1) pH 안정성

뱀무 THBA의 pH별 안정성 조사는 다음과 같이 실시하였다. pH를 달리한 완충액  $0.5\text{ml}$ 에 (pH3.5 50mM sodium acetate buffer, pH6.5 50mM sodium phosphate buffer, pH9.5 50mM Tris- buffer) 80% 주정(pH4)으로 추출된 시료  $10\text{mg}/\text{ml}$ ,  $0.5\text{ml}$ 를 혼합하여,  $38^\circ\text{C}$  수조에서 4시간 방치하였다. 위 처리된 시료를  $0.45\mu\text{m}$  membrane filter로 여과 후 HPLC 분석을 통해 나타난 THBA area를 검량선을 이용하여 실제 THBA 함량을 측정하였다.

#### 2) 온도 안정성

뱀무 THBA의 온도에 대한 안정성 조사는 80% 주정(pH6.5) 추출물  $0.5\text{ml}$ 에 50mM sodium phosphate buffer(pH 6.5)  $0.5\text{ml}$ 를 각각 1: 1로 혼합한 후  $80^\circ\text{C}$  수조에서 30분 간격으로 2시간 동안 시료를 열처리 한 후 HPLC 분석을 하였다. HPLC를 통해 나타난 THBA함량을 조사하여 상대적인 온

도 안정성을 조사하였다. 대조구로는 Sigma 사로부터 구입한 THBA를 이용하여 동일한 조건에서 실험하였고, HPLC를 통해 잔존해 있는 THBA의 함량을 기준으로 온도 안정성을 조사하였다.

#### 다. ICR계 마우스에 대한 뱀무추출물의 급성 경구 독성시험

##### 1) 시험물질 및 실험동물

본 연구의 시험물질인 뱀무의 에칠아세테이트 분획물을 시험에 사용하였다. 시험구역은 청정 동물실험실에서 실시하였으며, 청정구역에서 생산된 SPF(특정병원체 부재) ICR계의 4주령 된 수컷 마우스를 중앙실험동물(Japan)로부터 분양받아 온도  $23\pm 3^{\circ}\text{C}$ , 습도  $55\pm 5\%$ , 배기 10-18회/h, light/dark 12h, 조도 150-300 Lux의 사육환경에서 폴리카보네이트 사육상자 ( $280\text{W} \times 420\text{L} \times 170\text{H mm}$ )에 각각 5마리씩 넣어 사육하였다. 1주일간의 순화사육 기간 동안에 증상관찰 등을 시행하여 정상적인 동물만 시험에 사용하였다. 사료는 실험동물용 고품사료(Samyang Co., Korea)를 자유롭게 먹도록 하였으며, 물은 멸균수도물을 자유롭게 섭취시켰다. 시험자들은 모두 고압증기멸균( $121^{\circ}\text{C}$ , 20 min)된 작업복, 두건, 마스크 및 장갑 등을 착용하고 작업을 실시하였다.

##### 2) 투여량 및 시험군의 구성

1주간 실험실 환경에 적응시킨 실험동물을 대조군과 뱀무 투여군으로 나누었으며, 각 군은 10마리로 하였다. 동물의 군 분리는 다음과 같이 실시하였다. 우선, 순화 기간 중 건강하다고 판정된 동물의 체중을 측정 후 구분시켜 두었다. 그리고 평균체중에 가까운 개체를 각 군에 10마리씩 균등히 들어가도록 체중을 이용한 무작위법을 이용하여 분배하였다. 동물의 개체식별은 피모색소마킹법 및 개체식별카드 표시법으로 실시하였다. 본 시험물질은 신물질로서 식품의약품 안전청의 "의약품 등의 독성시험기준"에는 한계용량에 대한 기준이 없기 때문에, 시험물질의 투여용량은 예비실험 결과와 시험물질의 용해도 등을 고려하여 고용량군(200 mg/kg), 중간용량군(100 mg/kg), 저용량군(50 mg/kg)을 투여 농도로 설정하고 대조군을 포함하여 모두 4개 군으로 정하였다.

### 3) 시험물질의 조제 및 투여

투여 직전에 주사용 생리식염수를 매체로 하여 시험물질을 50, 100, 200 mg/10ml/kg으로 조제하였다. 대조군(vehicle control)의 동물에는 매체인 생리식염수만을 투여하였다. 시험물질은 투여 전날 하룻밤을 절식시킨 후 경구투여용 зонде(zonde)를 장착한 주사기를 이용하여 조제시험물질을 강제 경구투여 하였다. 시험물질의 투여 경로는 임상예정 경로로서 경구투여를 선택하였다. 투여 당일 오전에 개체별로 단회 투여하였다. 투여액량은 투여 당일의 측정된 체중을 기준으로 투여액량(10 ml/kg)을 계산하였다.

### 4) 관찰 및 검사항목

#### (1) 일반증상 및 사망동물의 관찰

시험물질을 투여한 후 매 시간마다 6시간 동안, 투여 다음 날부터 14일까지는 1일 1회씩 일정 시간에 투여 동물의 일반상태, 중독증상 및 사망유무를 대조군과 비교 관찰하였다.

#### (2) 체중측정

시험에 사용된 모든 동물에 대하여 투여 당일을 0일로 하여 투여 후 매일 2주일간 체중을 측정하였다.

#### (3) 부검소견

투여 후 14일째 모든 생존 동물을 ether로 흡입 마취하여 개복 및 복대동맥 절단법으로 방혈 치사시킨 다음 외관 및 내부 장기의 이상 유무를 육안적으로 해부소견을 관찰하였다.

### 5) 통계 처리

체중의 변화에 대한 통계학적 분석은 one-way analysis of variance test(ANOVA) 검정에 의해 대조군과 시험물질 투여군을 비교하였고, LD<sub>50</sub>치는 Pharmacologic Calculating System을 이용하여 Litchfield-Wilcoxon법에 의하여 95% 신뢰 한계 내에서 결정하였다.

## 라. 뱀무 추출물의 SD계 흰쥐에 대한 아급성 경구독성 시험

### 1) 시험물질 및 실험동물

본 연구의 시험물질인 뱀무의 에칠아세테이트 분획물을 시험에 사용하였다. 시험구역은 청정 동물실험실에서 실시하였으며, 청정구역에서 생산된 SPF (특정병원체 부재) SD계의 4 주령 된 수컷 흰쥐를 중앙실험동물 (Japan)로부터 분양받아 온도  $23\pm 3^{\circ}\text{C}$ , 습도  $55\pm 5\%$ , 배기 10-18회/h, light/dark 12h, 조도 300-500 Lux의 사육환경에서 폴리카보네이트 사육상자 ( $280\text{ W} \times 420\text{ L} \times 170\text{ H mm}$ )에 각각 5 마리씩 넣어 사육하였다. 1주일간의 순화사육 기간 동안에 증상관찰 등을 시행하여 정상적인 동물만 시험에 사용하였다. 사료는 실험동물용 고품사료 (Samyang Co., Korea)를 자유롭게 먹도록 하였으며, 물은 멸균수돗물을 자유롭게 섭취시켰다. 시험자들은 모두 고압증기 멸균( $121^{\circ}\text{C}$ , 20 min)된 작업복, 두건, 마스크 및 장갑 등을 착용하고 작업을 실시하였다.

### 2) 투여량 및 시험군의 구성

1주간 실험실 환경에 적응시킨 실험동물을 대조군과 뱀무 투여군으로 나누었으며, 각 군은 10마리로 하였다. 동물의 군 분리는 다음과 같이 실시하였다. 우선, 순화 기간 중 건강하다고 판정된 동물의 체중을 측정 후 구분시켜 두었다. 그리고 평균체중에 가까운 개체를 각 군에 5마리씩 균등히 들어가도록 체중을 이용한 무작위법을 이용하여 분배하였다. 동물의 개체식별은 피모색소마킹법 및 개체식별카드 표시법으로 실시하였다. 시험물질을 투여하기 직전 시험동물의 체중범위는 145-164 g이었고, 주령은 약 5 주령이었다.

본 시험물질은 신소재로서 식품의약품 안전청의 "의약품 등의 독성시험 기준"에는 한계용량에 대한 기준이 없기 때문에, 시험물질의 투여용량은 예비실험 결과와 시험물질의 용해도 등을 고려하여 500 mg/kg을 투여 농도로 설정하고 대조군을 포함하여 모두 2개 군으로 정하였다.

### 3) 시험물질의 조제 및 투여

투여 직전에 주사용 생리식염수를 매체로 하여 시험물질을 500 mg/10ml/kg으로 조제하였다. 대조군(vehicle control)의 동물에는 매체인



생리식염수만을 투여하였다. 시험물질은 경구투여용 존데 (zonde)를 장착한 주사기를 이용하여 조제시험물질을 강제 경구투여 하였다. 시험물질의 투여 경로는 임상예정 경로로서 경구투여를 선택하였다. 투여용량의 차이를 배제하기 위하여 각 시험물질 용액을 동물 체중 kg당 10 ml에 매일 투여하였다. 14 일간 시험물질을 1 일 1 회 14 일간 연속으로 투여하여 2 주 아 급성독성시험을 수행하였다.

#### 4) 관찰 및 검사항목

##### (가) 일반증상 및 사망동물의 관찰

모든 시험동물에 대하여 매일 1 회 이상 사망 유무 확인과 함께 일반상태의 변화, 중독증상 및 사망유무를 대조군과 비교 관찰하였다. 일반증상은 식욕부진, 타액분비, 설사, 구토, 다뇨 및 무뇨, 분변의 변화를 중심으로 관찰하였다.

##### (나) 체중 측정

시험에 사용된 모든 동물에 대하여 투여 당일을 0일로 하여 투여 후 매일 2주일간 체중을 측정하였다.

##### (다) 혈액학적 및 혈액생화학적 검사

부검시에 모든 동물을 ether로 마취한 후 heart puncture방법으로 채혈한 혈액 중에서 백혈구 수(white blood cell, WBC), 적혈구 수(red blood cell, RBC), 혈색소(hemoglobin, Hgb) 농도, Hct, MCV, 혈소판 수(platelet count)를 ADIVATM 120 hematology system (Bayer co. U.S.A.) 기기를 사용하여 측정하였다. 혈액생화학치는 총단백, 알부민, BUN, creatinine, globulin, AST(GOT) 및 ALT(GPT) 및 ALP를 대상으로 ADIVA 1650 (Bayer, Germany) 기기를 사용하여 측정하였다.

##### (라) 육안소견 및 장기 중량

투여 후 14일째 모든 생존 동물을 ether로 흡입 마취하여 개복 및 복대동맥 절단법으로 방혈 치사시킨 다음 부검하였으며 흉선, 부신, 정소, 심장, 폐, 신장, 비장, 간장을 포함한 주요 장기를 육안으로 관찰하였다. 간장, 신장, 정소는 장기 중량을 측정하였다.

## 5) 통계 처리

본 실험에서 얻은 체중, 혈액학치, 혈액생화학치 등 모든 자료는 평균  $\pm$  표준편차로 나타내었으며, 통계학적 분석은 Student's t-test 검정법에 의해  $p < 0.05$  수준에서 대조군과 시험물질 투여군을 비교하였다.

## 4. 뱀무 및 배암차즈기 안전 생산기술 개발

### 가. 시료의 수집, 생육지 환경 및 이식후 생육상황 조사

배암차즈기는 경북의 경산시, 경남의 함양군, 의령군, 전남의 해남군 등 21개 자생지에서 2004년 3-4월중에 수집하였으며, 뱀무는 2004년 7월에서 10월 중에 평창군, 무주군 함양군 등 7개 지역에서 수집하였다. 이때 자생지의 토양, 고도 등의 환경과 생육상태를 조사하였다. 수집된 식물체는 경남 함양군 안의면 소재 약초시험포장에 이식하였으며, 배암차즈기는 개화기에 생육상황을 조사하였다.

### 나. 재배방법 시험

#### 1) 배암차즈기 재배기술 개발

배암차즈기의 최적 생산을 위한 재배기술을 개발하기위하여 파종기 및 재식거리 시험을 함양에 있는 경남농업기술원 약초시험장 포장에서 실시하였다. 파종기를 4월1일, 4월11일, 4월20일, 4월30일로하여 생육최성기인 6월8일에 생육조사를 하였다.

#### 2) 뱀무 재배기술 개발

뱀무의 최적 생산을 위한 재배기술을 개발하기위하여 파종기 및 재식거리 시험을 함양에 있는 경남농업기술원 약초시험장 포장에서 실시하였다. 파종기를 4월20일, 4월30일, 5월10일로 40\*30cm로 재배하여 생육최성기인 8월31일에 생육조사를 하였다.

### 다. 뱀무 생육시기별, 부위별 생리활성물질의 함량 변화

#### 1) 뱀무 생육시기별 THBA와 phenol 함량 분석

경남 농업기술원 함양 약초시험장에서 재배실험 중인 뱀무 식물체(경엽)을 성숙기, 개화기, 수확기에 채취하여 음건하여 사용하였다. 시료를 분쇄

한 다음, 분쇄 시료 2g을 2N HCl로 pH4로 조정한 80% 주정 40ml을 넣고 1시간 sonication 한 다음 3회 연속 추출하고, 위와 동일한 방법으로 농축 여과 후 HPLC로 THBA함량을 측정하였다.

## 2) 뱀무 부위별 무기성분, phenol 화합물 함량 및 THBA 함량 분석

뱀무 지상부와 뿌리 부위를 채취하여 음건하여 사용하였다. 무기성분 함량은 강산으로 식물체를 분해한 다음 증류수로 휘석하여 농촌진흥청의 표준분석법에 준하여 분석하였다. THBA와 Phenol 화합물 앞에서 제시한 분석 방법과 같았다.

## 제 2 절 결과 및 고찰

### 1. 메탄올 추출액 및 용매분획에 대한 항산화 활성 검증

#### 가. DPPH방법에 의한 radical 소거능

배암차즈기(*Salvia plebeia* R. Br.)와 뱀무(*Geum japonicum* THUNBERG)의 메탄올 추출물과 각각의 용매 분획에 대한 free radical 소거능을 측정한 결과 Table 3에서 보는 바와 같이 배암차즈기와 뱀무의 에칠아세테이트 분획에서 항산화활성이 가장 크다는 것을 알 수 있었다. 또한 항산화표준물질인 BHT보다 더 높은 free radical 소거능을 보여 주었으며, BHA와는 거의 동등한 활성이 있음을 알 수 있었다.

Table 3. DPPH radical scavenging effects of five different solvent fractions derived from *Salvia plebeia* R. Br. and *Geum japonicum* THUNBERG

Solvent fraction	<i>Salvia plebeia</i> R. Br. SC <sub>50</sub> <sup>1</sup> (μg/ml)	<i>Geum japonicum</i> THUNBERG SC <sub>50</sub> (μg/ml)
Methanolic extract	233	102
Hexane	3,229	25,001
Methylene Chloride	589	396
EtOAc	67	50
Water	391	125
BHA(control)	55	55
BHT(control)	278	278

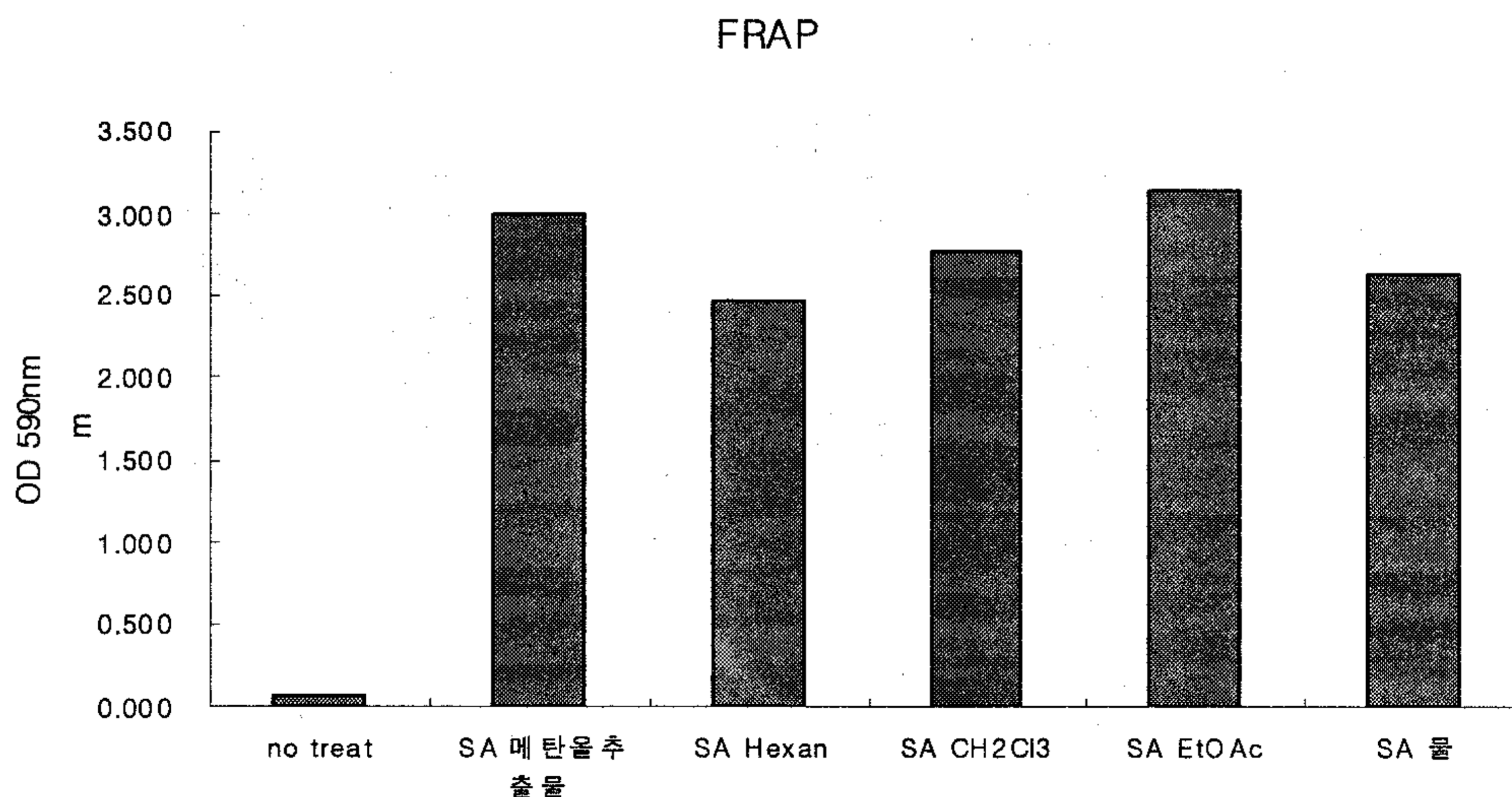
1) Concentration of antioxidant required scavenging 50% of free radical(DPPH) in a reaction solution

### 나. Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay

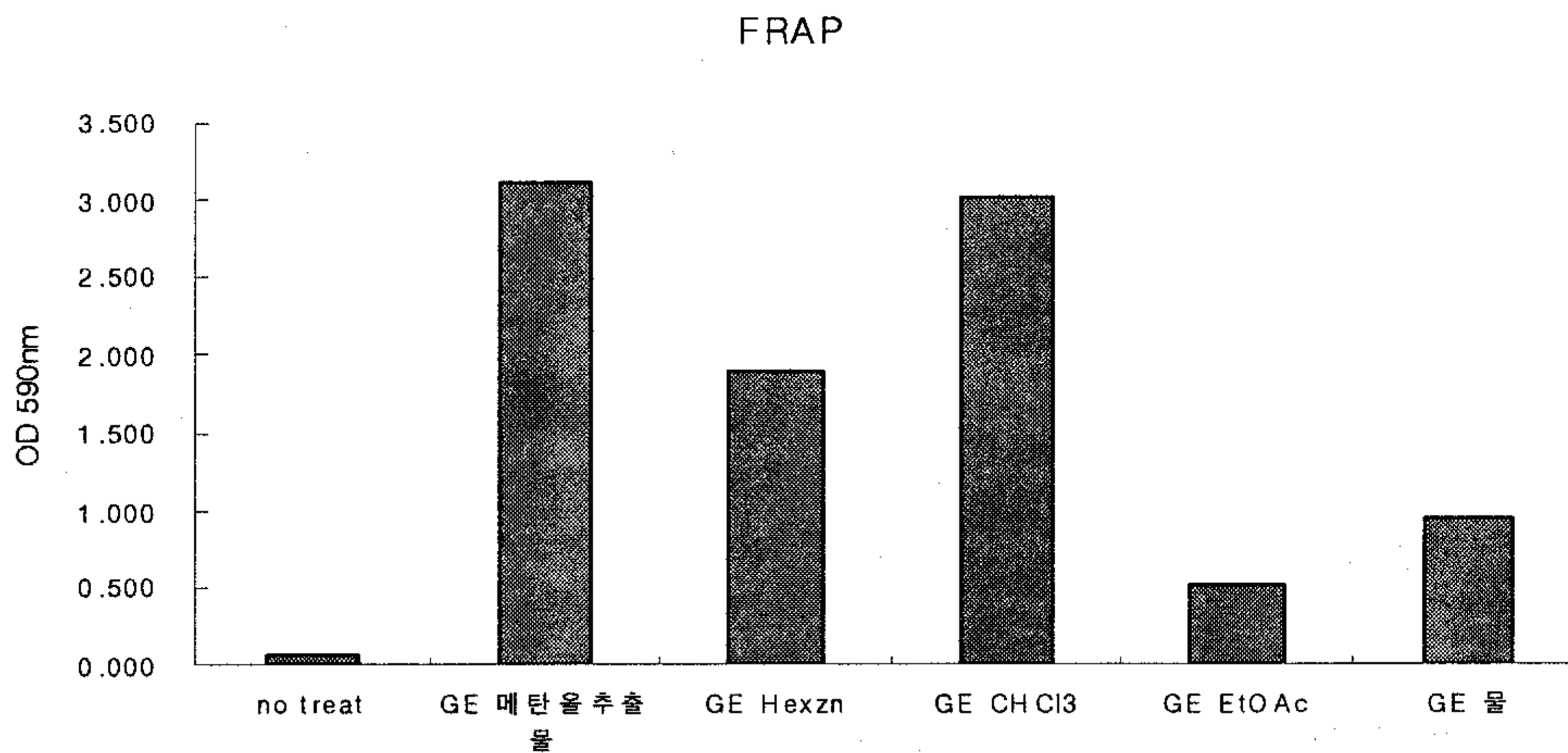
뱀무 와 배암차즈기 추출물에 대한 화합물의 환원력(ferric reducing ability)을 측정한 결과 Fig. 2에서 보는 바와 같이 뱀무와 배암차즈기 메탄올 추출물의 환원력은 높았으며 배암차즈기의 경우 전 유기용매 분획에서 활성이 높음을 확인 할 수 있었다. 그러나 뱀무의 경우 DPPH 소거 활성이 가장 높았던 에칠아세테이트 분획에서 활성이 낮게 나타났다. 이는 FRAP 환원력 측정시 동일 농도로 처리함에 따라 농도에 따른 반응정도가 다소 다르게 나타 난 것으로 보인다.

### 다. Hydroxyl radical 소거 활성

뱀무 와 배암차즈기 추출물에 소거 활성은 Hydroxyl radical 소거 활성을 측정한 결과 Fig. 3에서 보는 바와 같이 뱀무와 배암차즈기 메탄올 추출물의 소거 활성은 높았다. 배암차즈기의 분획별 소거활성은 메칠렌클로라이드 분획에서 활성은 매우 낮았으며 물 분획에서 가장 활성이 높았다. 그러나 뱀무 분획에서는 헥산과 메칠렌클로라이드 분획에서 활성이 높았으며, 물분획과 에칠아세테이트 분획에서는 활성이 매우 낮았다. 이로서 황성산소 종에 따라서 식물 항산화성 물질의 효과가 다름을 알 수 있었으며 이후 주 항산화성물질의 황성산소 종에 따른 작용 기작을 구명할 필요가 있다.

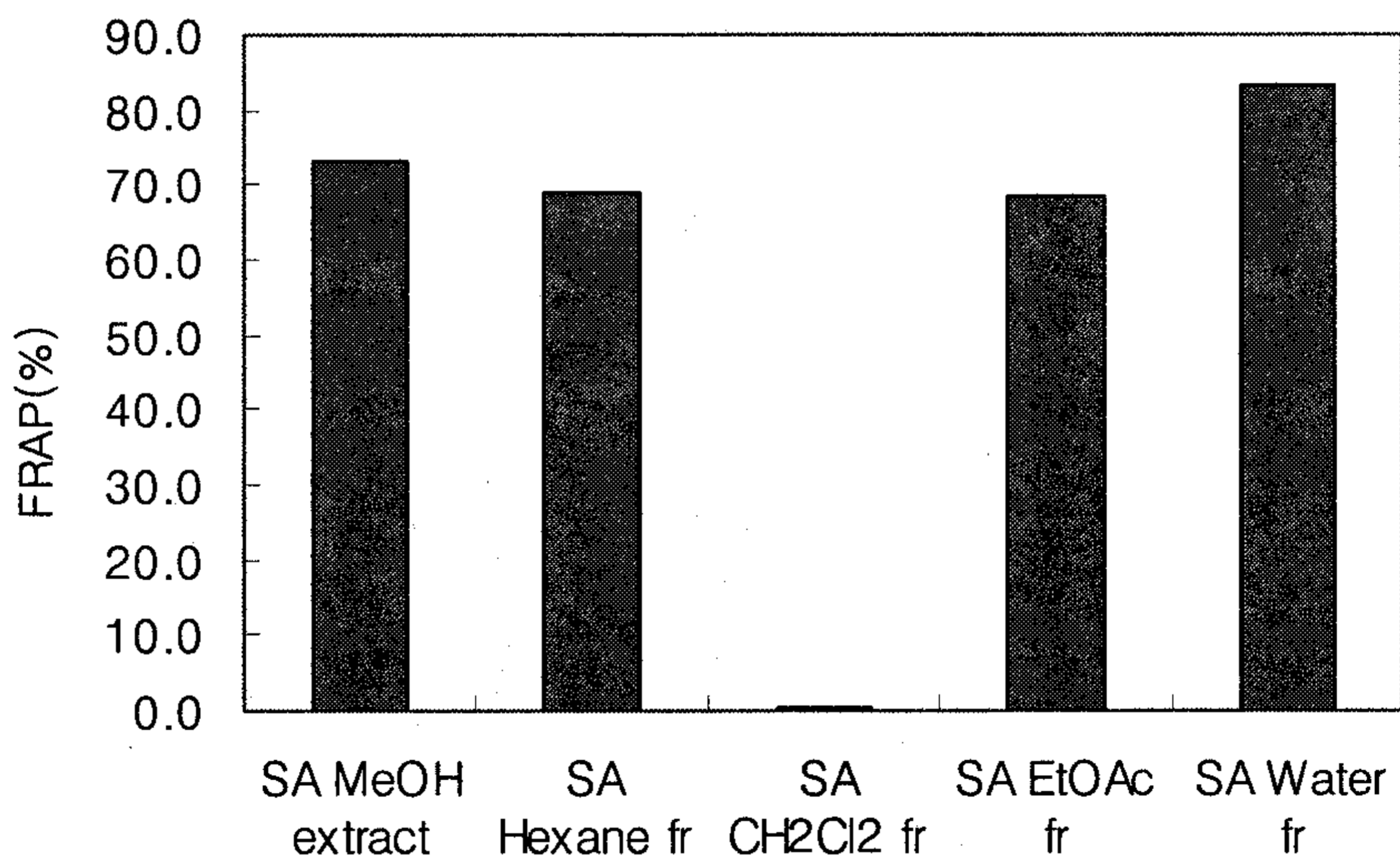




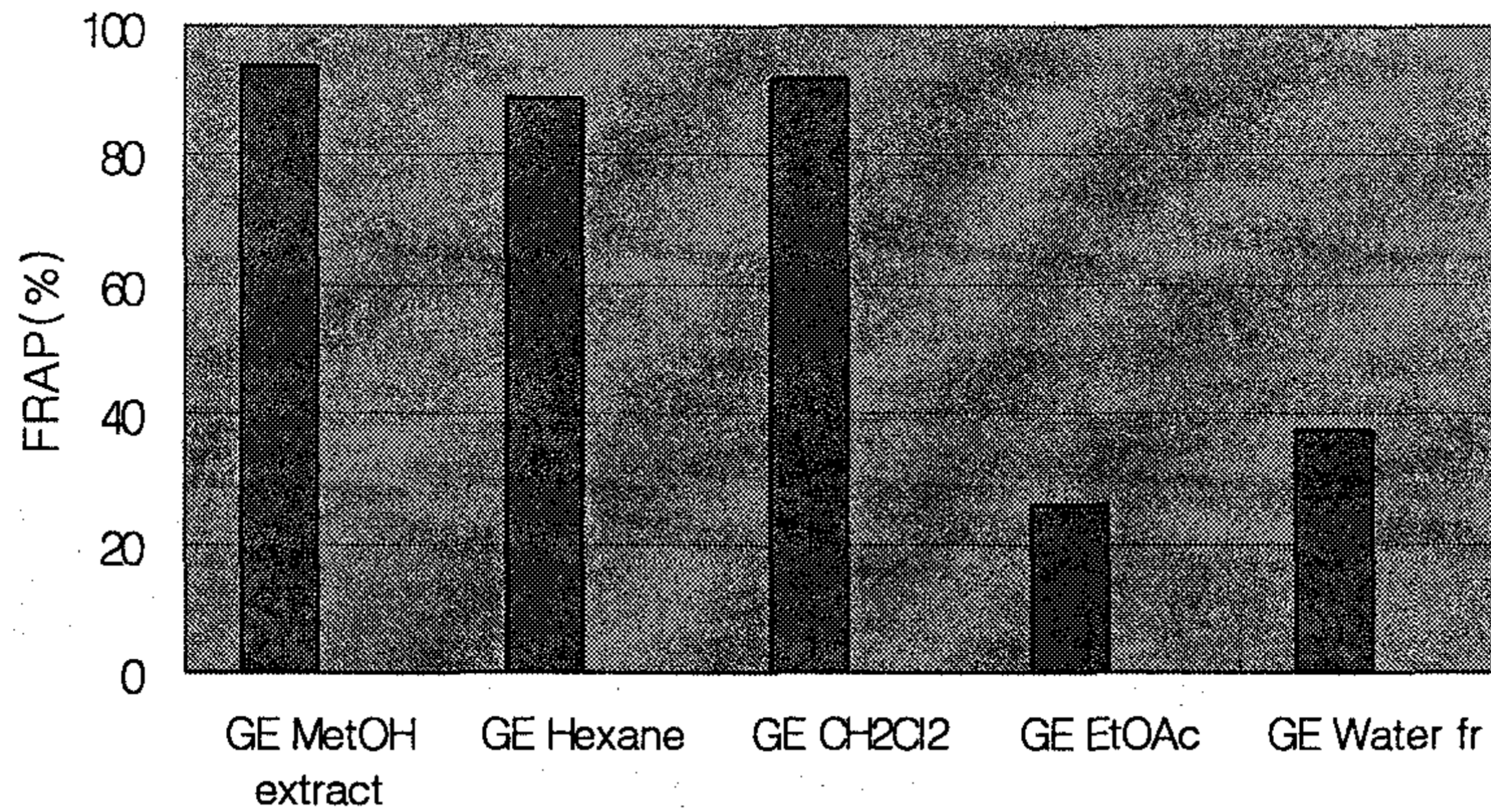


GE methanol extracts and solvent fractions

Fig. 2. Ferric reducing antioxidant power of the solvent fractions and methanol extracts derived from *Salvia plebeia* R. Br. and *Geum japonicum* THUNBERG.



SA methanol extracts and solvent fractions



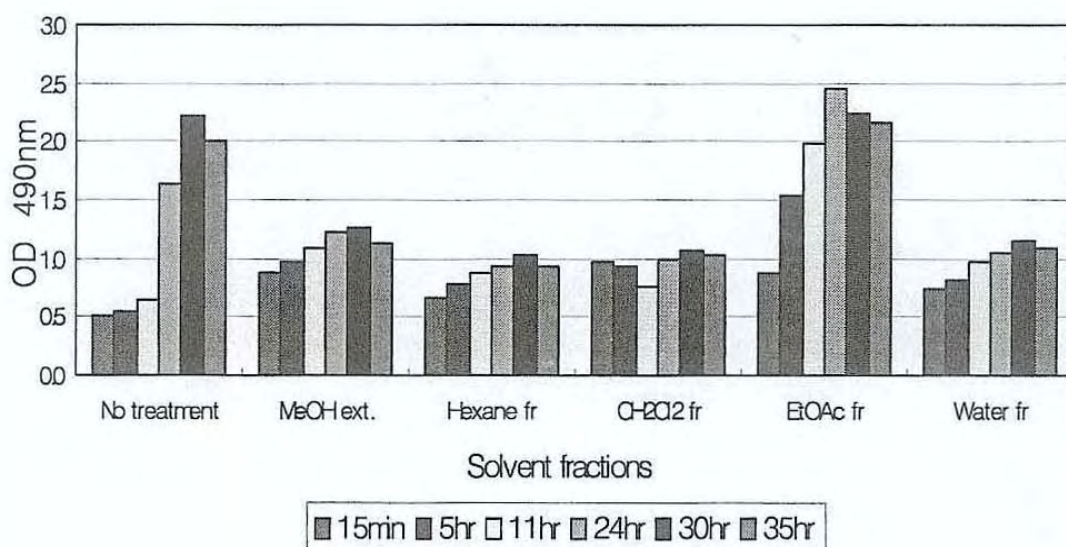
### GE methanol extracts and solvent fractions

Fig. 3. Hydroxyl radical scavenging effects of the solvent fractions and methanol extracts derived from *Salvia plebeia* R. Br. and *Geum japonicum* THUNBERG.

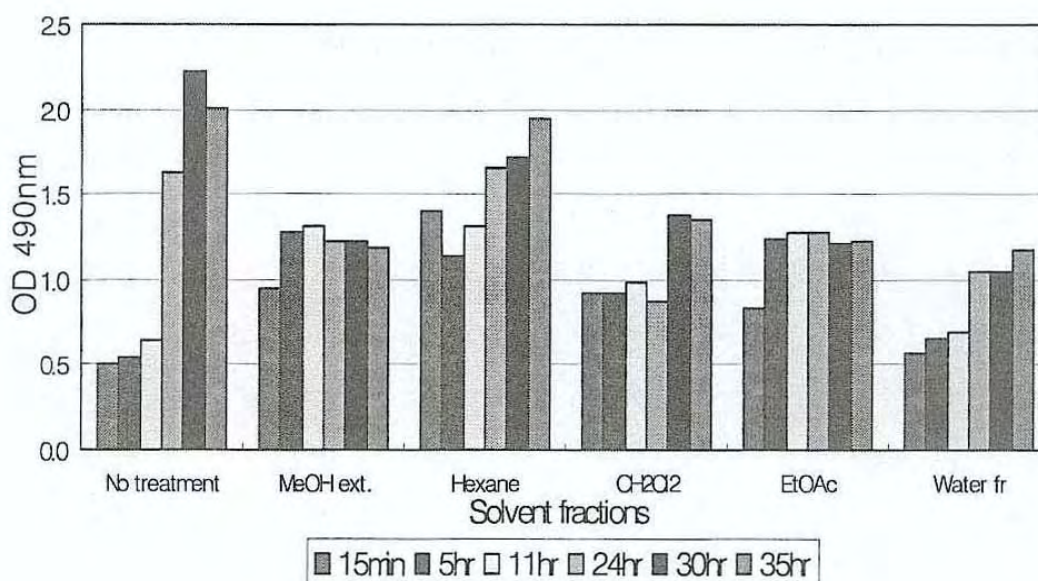
#### 라. Linoleic acid 및 유지류에 대한 항산화 활성

Linoleic acid에 대한 항산화활성을 측정한 결과 Fig. 4에서 보는 바와 같이 배암차즈기와 뱀무의 용매 분획별 항산화 정도가 다소 달랐다. 배암차즈기에서는 에칠아세테이트 분획을 제외한 물층과 메칠렌클로라이드 분획이 Linoleic acid의 산화를 안정적으로 방어하였다. 그러나 뱀무 분획에서는 에칠아세테이트 분획과 물층이 안정이 항산화 활성을 보여주었다. 그리고 Table 4에서 보는 바와 같이 Rancimat를 이용하여 유지류에 대한 항산화활성을 조사한 결과 뱀무 에틸아세테이트 분획이 현재 항산화제로 사용되고 있는 알파 토크페롤이나 BHT보다 유지류의 산화 억제효과가 더 높음을 볼 수 있었다.





SA methanol extracts and solvent fractions



GE methanol extracts and solvent fractions

Fig. 4. Antioxidative effects of the solvent fractions and methanol extracts derived from *Salvia plebeia* R. Br. and *Geum japonicum* THUNBERG on linoleic acid

Table 4. Antioxidative activity of ethyl acetate fraction of *G. japonicum methanol* extract on various edible oil and fat as compared to  $\alpha$ -tocopherol and BHT.

Sample	Lard	Palm oil	Perilla oil
	-----Antioxidant index-----		
EtOAC fr	1.66	2.29	1.03
$\alpha$ -Tocopherol	1.35	1.63	0.8
BHT	1.39	1.39	0.93

Antioxidant index was expressed as induction period of oil containing sample was determined by Rancimat test at 130 °C.

#### 마. Folin & Dennis법에 의한 총 페놀함량

총페놀 함량을 정량한 결과 배암차즈기는 303.6 $\mu$ g/g DW의 함량을 보였고, 뱀무는 이보다 두 배나 높은 621.4 $\mu$ g/g DW의 함량을 나타내었다.

Table 5. Total phenol contents( $\mu$ g/g) using Folin-Dennis methods from *Salvia plebeia* R. Br. and *Geum japonicum* THUNBERG

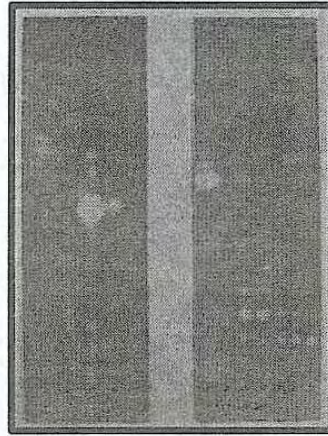
Plants	Total phenol contents( $\mu$ g/g)
<i>Salvia plebeia</i> R. Br.	303.6
<i>Geum japonicum</i> THUNBERG	621.4

## 2. 배암차즈기(*Salvia plebeia* R. Br.) 및 뱀무(*Geum japonicum* THUNBERG)의 생리활성 물질 분리

### 가. Ethyl acetate 분획에서 항산화성 물질의 확인

뱀무와 배암차즈기의 용매 분획 중에서 항산화성이 가장 높은 에칠아세테이트 분획을 실리카겔 크로마토그래피로 분리하였다. 이 때 용출 용매는 에칠아세테이트에 메탄올을 농도구배로 하였으며 분리된 분획들을 박층 크로마토그래피로 항산화활성물질 존재 여부를 확인하였다.





SA fr. GE fr.

Fig. 5. Thin-layer chromatographic separation of the fractions of Silica gel column chromatography eluted of the *Salvia plebeia* R. Br. and *Geum japonicum* THUNBERG ethylacetate fraction.

\* Antioxidative compounds were visualized by spraying 1 mM DPPH

#### 나. 뱀무에서 분리된 활성물질의 구조분석 및 동정

뱀무에서 분리한 활성물질을 동정한 결과는 다음과 같다.

##### 1) compound 2의 구조분석

<sup>1</sup>H-NMR spectrum에서 7.04ppm peak 1개만이 관찰되고 <sup>13</sup>C-NMR spectrum에서 100ppm-170ppm 사이의 peak 5개가 관찰되었기에 benzene ring의 존재를 추정할 수 있다. 168.2ppm의 <sup>13</sup>C peak은 이 화합물이 aldehyde(혹은 carboxyl) group을 가지고 있음을 예측하게 해준다. benzene ring과 carboxyl group을 가지는데 단지 5개의 <sup>13</sup>C peak이 관찰된다는 것은 benzene ring에 치환된 group들이 대칭으로 붙어있음을 보여준다. 109.3, 120.7, 139.0, 145.7 ppm에서 관찰되는 화합물은 trihydroxybenzaldehyde 또는 trihydroxybenzoic acid가 가능하다. 하지만 LC/MS/MS 분석결과(Fig. 8) 분자량이 154로 확인되었기에 이 화합물은 trihydroxybenzaldehyde가 가능하다. 세 개의 hydroxyl group의 위치는 대칭이어야 하므로 3,4,5 위치만이 가능하다. 결과적으로 compound 2의 구조는 3,4,5-trihydroxybenzaldehyde(Fig. 9)가 된다. 이 화합물의 <sup>1</sup>H-NMR data, <sup>13</sup>C-NMR data는 아래 그림과 같고 각 proton과 carbon의 assignment table은 아래 표시하였다.

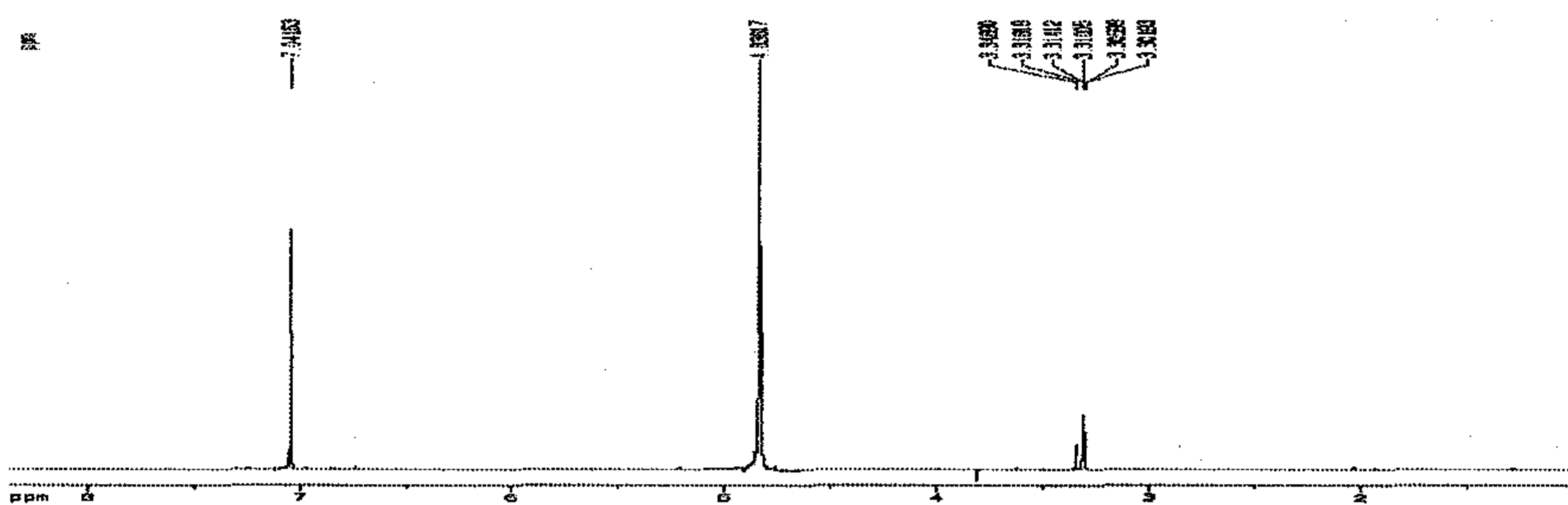


Fig. 6.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of the compound 2 isolated from *G. japonicum*

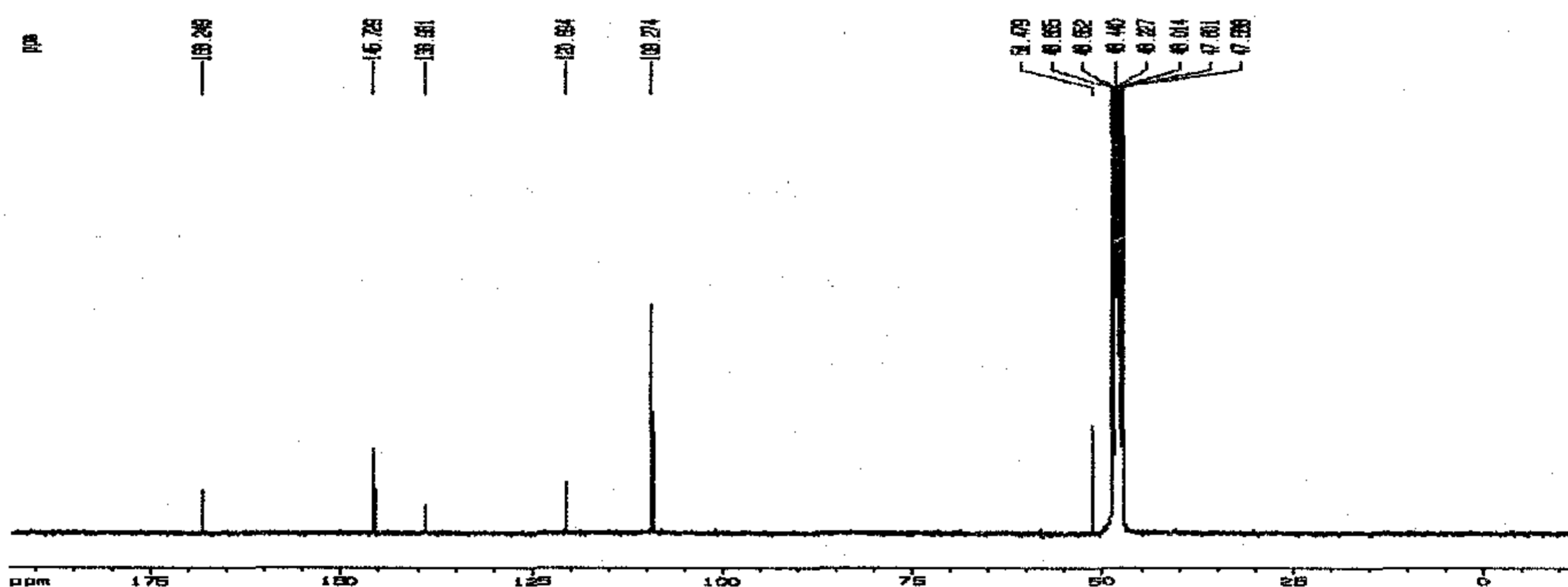


Fig. 7.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of the compound 2 isolated from *G. japonicum*

Table 6. Assignment of the compound 2 isolated from *G. japonicum*

	$\delta$ of $^{13}\text{C}$	$\delta$ of $^1\text{H}$
1'	168.2	-
3,5	145.7	-
4	139.0	-
1	120.7	-
2,6	109.3	7.04(s)

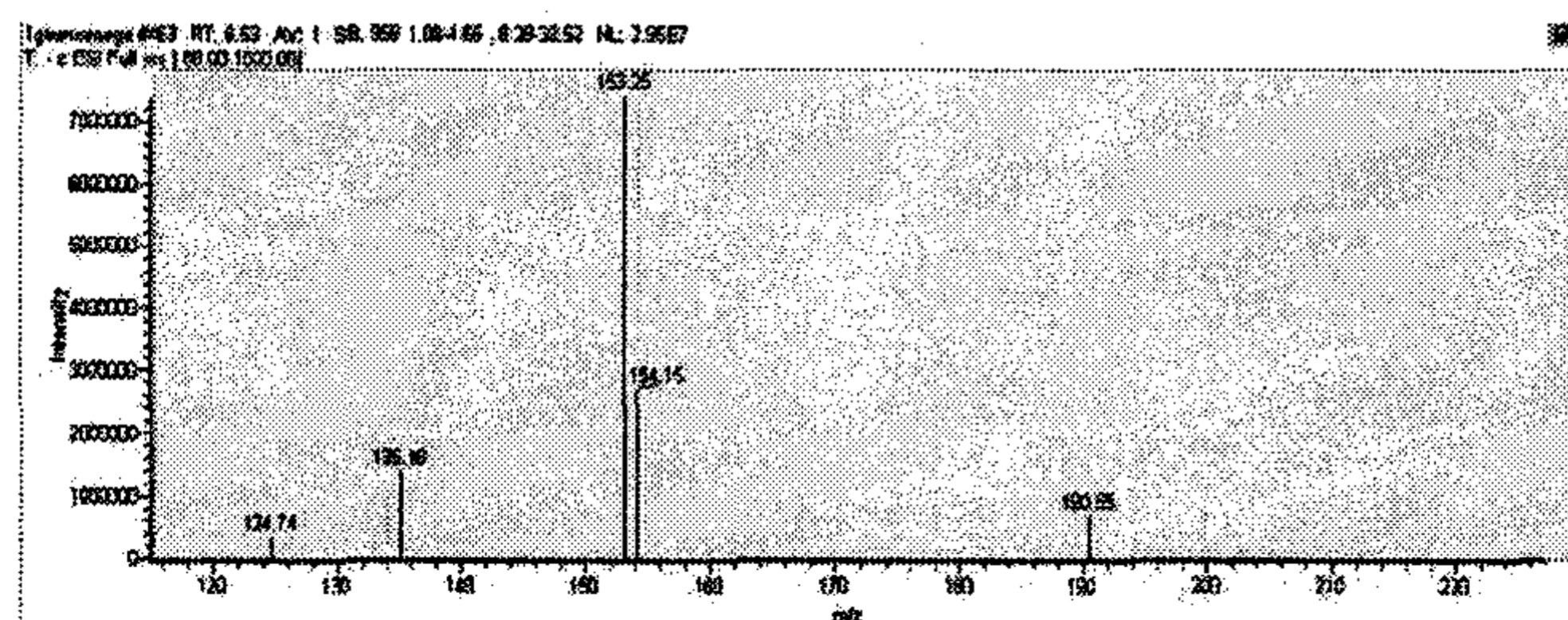


Fig. 8. Mass spectrum of the compound 2.

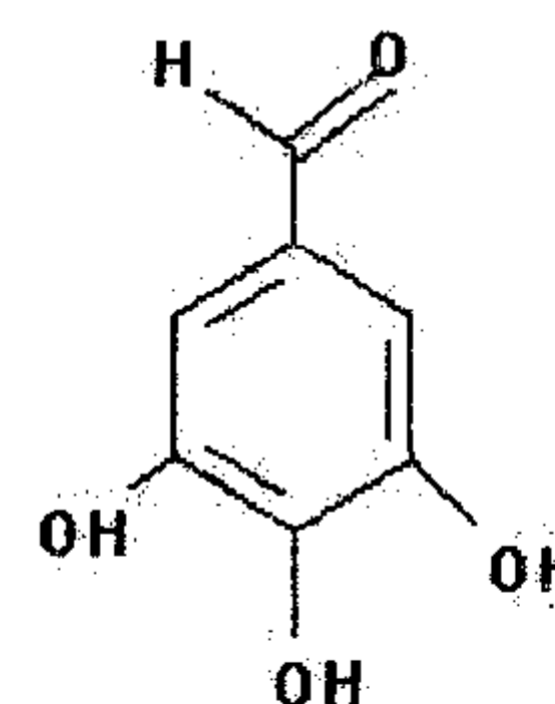


Fig. 9. Chemical structure of compound 2



## 2) compound 3의 구조분석

$^{13}\text{C}$ -NMR spectrum에서 164ppm에서 peak이 나타남으로 이 화합물은 ketone기를 가지고 있고, 144.7-152.1ppm 사이에 4개의 peak들이 관찰됨으로써 benzene ring을 가지고 있음을 예측할 수 있다. Heteronuclear multiple quantum coherence(HMQC) 2D spectrum에서  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum의 146.2, 113.1, 112.6, 103.7ppm의 peak들이 각각  $^1\text{H}$ -NMR spectrum의 7.7, 6.93, 6.1, 6.75ppm의 peak들과 correlated된 것을 관찰할 수 있다. Distortionless enhancement by polarization(DEPT) spectrum에서 146.2, 113.1, 112.6, 103.7ppm의 peak들은 CH인 것을 확인하였다. Heteronuclear multiple bond coherence(HMBC) 2D spectrum에서 164ppm의  $^{13}\text{C}$  peak은 7.7, 6.1ppm의  $^1\text{H}$  peak과 correlation됨을 관찰할 수 있고, Correlated spectroscopy(COSY) 2D spectrum과 Total correlated spectroscopy(TOCSY) 2D spectrum에서 7.7, 6.1ppm의 두  $^1\text{H}$  peak은 서로 correlation되기 때문에 146.2ppm  $^{13}\text{C}$  peak과 112.6ppm의  $^{13}\text{C}$  peak은 서로 옆에 존재함을 알 수 있다. 또한 그 옆에 164ppm의 탄소가 존재함을 예측할 수 있다. HMBC spectrum에서 112.6ppm의 탄소가 correlate하는 수소가 없고, 146.2ppm의 탄소가 6.93ppm의 수소와 correlate하는 것으로부터 146.2ppm 탄소의 위치를 예측할 수 있다. HMBC spectrum에서 7.7, 6.93ppm의 수소와 동시에 correlation되는 150.6ppm의 탄소 위치를 예측할 수 있다. 또한 112.9peak의 탄소 위치를 HMBC spectrum에서 6.1ppm의 수소와 correlated되기 때문에 예측할 수 있다. 이것은 또한 103.7ppm의 탄소 위치를 예측하게 해준다. HMBC spectrum에서 144.7ppm의 탄소는 6.75ppm의 수소와 더욱 강하게 correlate하기 때문에 그 위치를 예측할 수 있다. 이 화합물의  $^1\text{H}$ -NMR data,  $^{13}\text{C}$ -NMR data, DEPT data, HMQC data, HMBC data, COSY data, TOCSY data는 아래 그림과 같고 각 proton과 carbon의 assignment table은 아래 표시하였다. 결국 compound 3은 6,7-dihydroxy-2H-chromen-2-one 이다. 이 구조는 현재까지의 신규성 확인으로는 신규물질일 가능성이 높은 것으로 보이나 좀 더 넓은 범위의 신규성 조사가 필요한 것으로 판단된다.

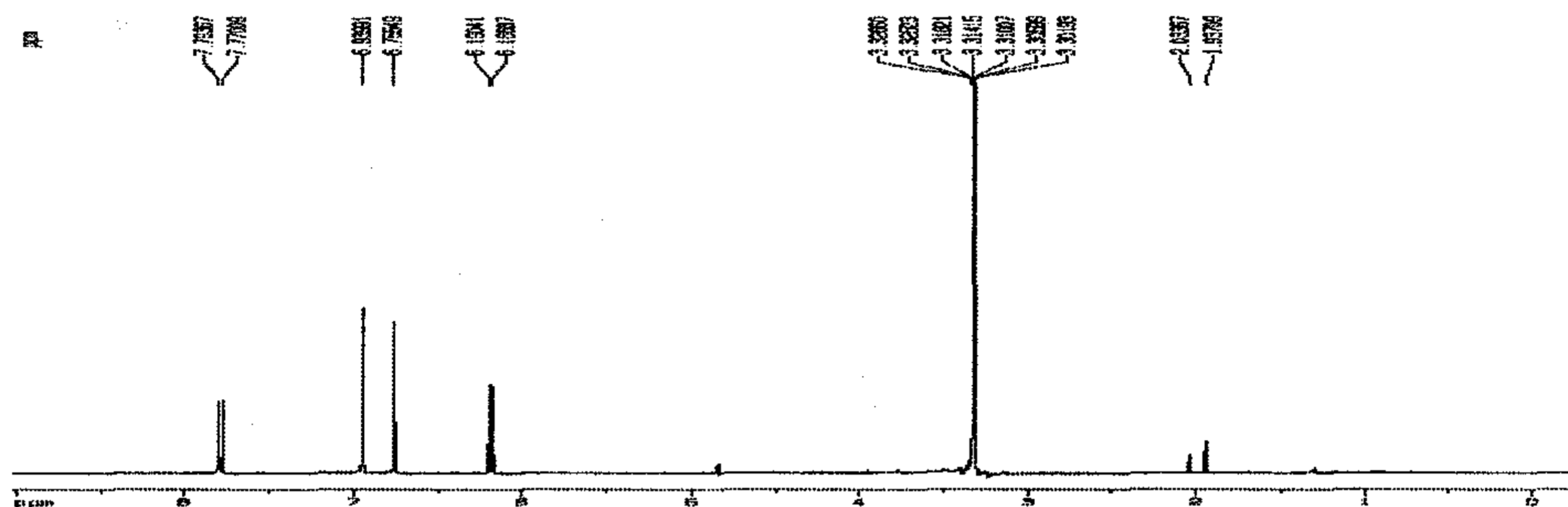


Fig. 10.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of the compound 3 isolated from *G. japonicum*

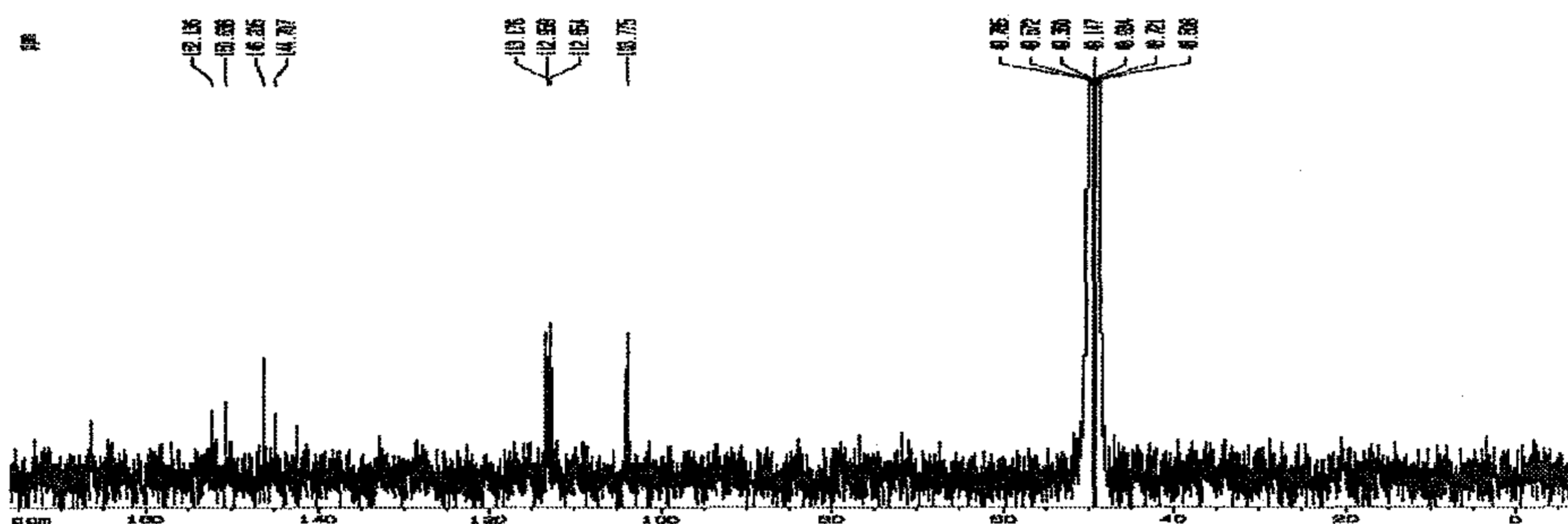


Fig. 11.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of the compound 3 isolated from *G. japonicum*

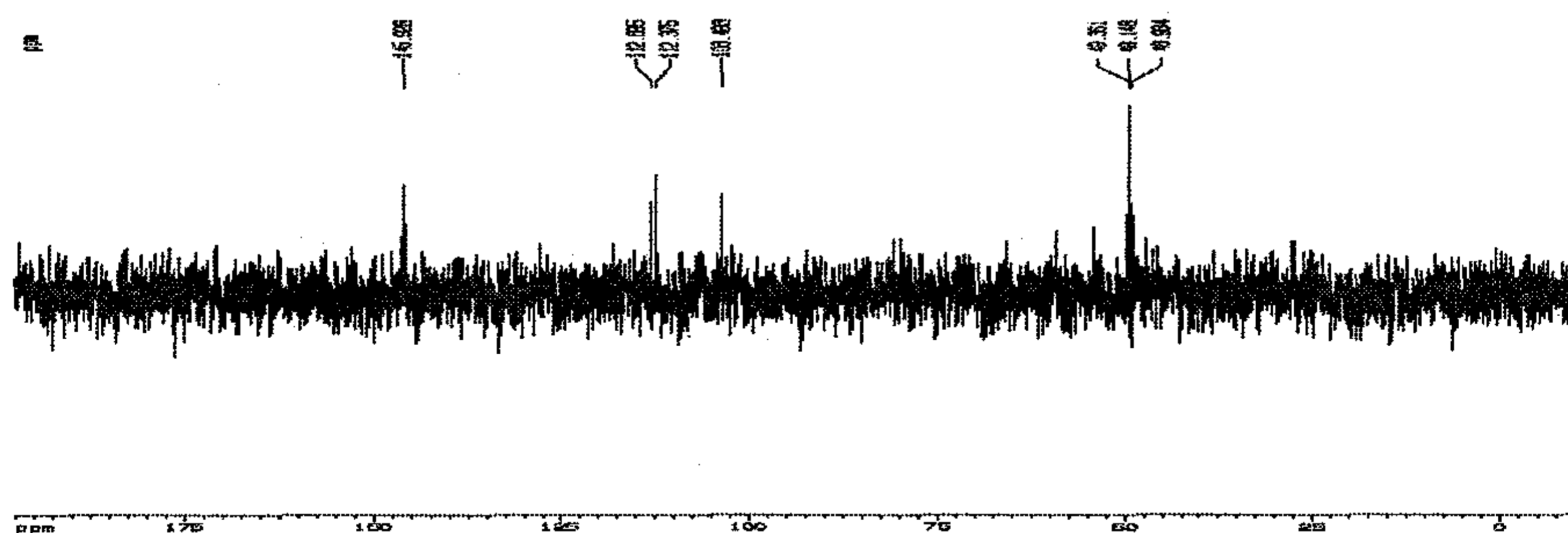


Fig. 12. DEPT NMR spectrum of the compound 3 isolated from *G. japonicum*



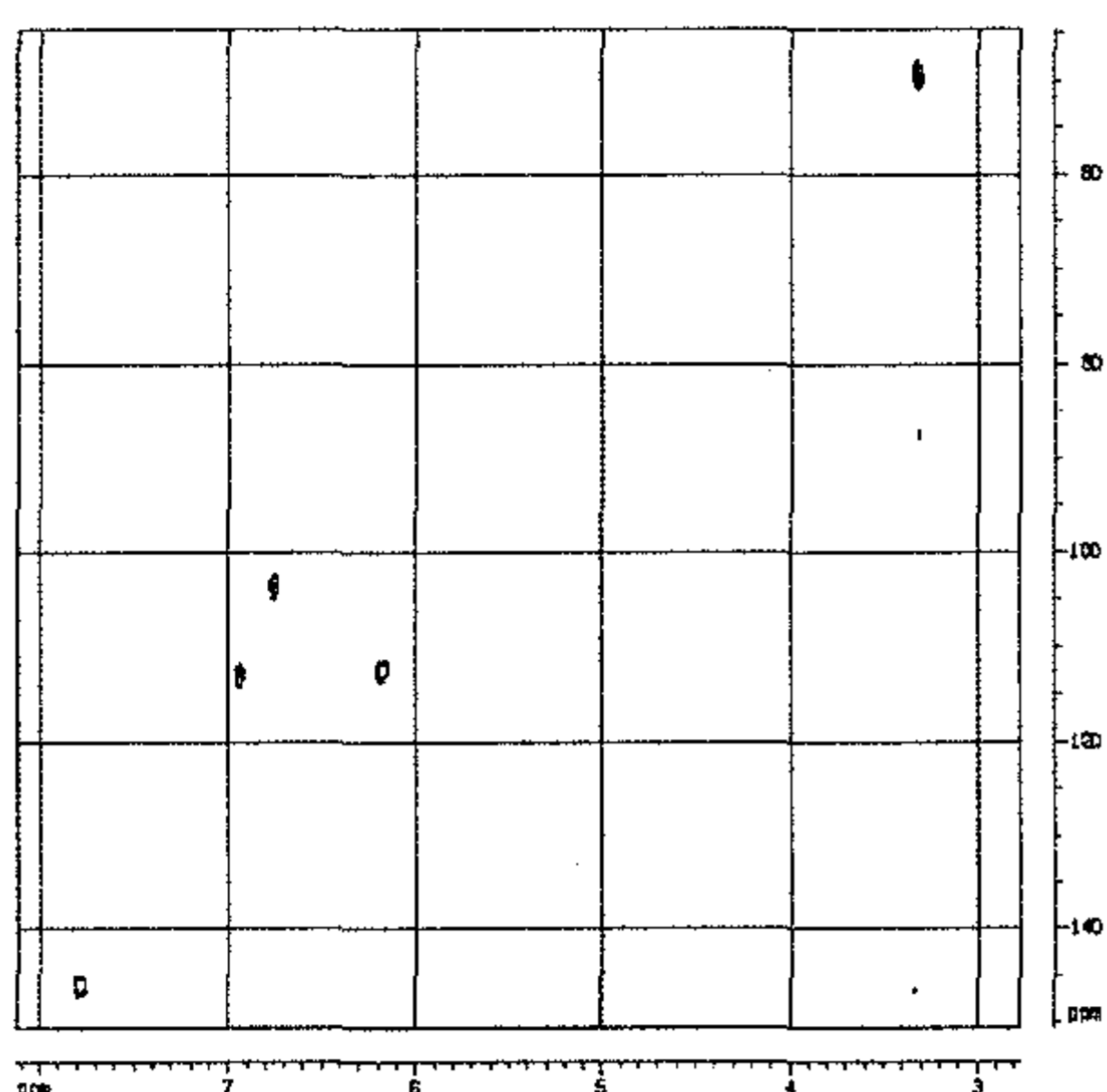


Fig. 13. HMQC NMR spectrum of the compound 3 isolated from *G. japonicum*

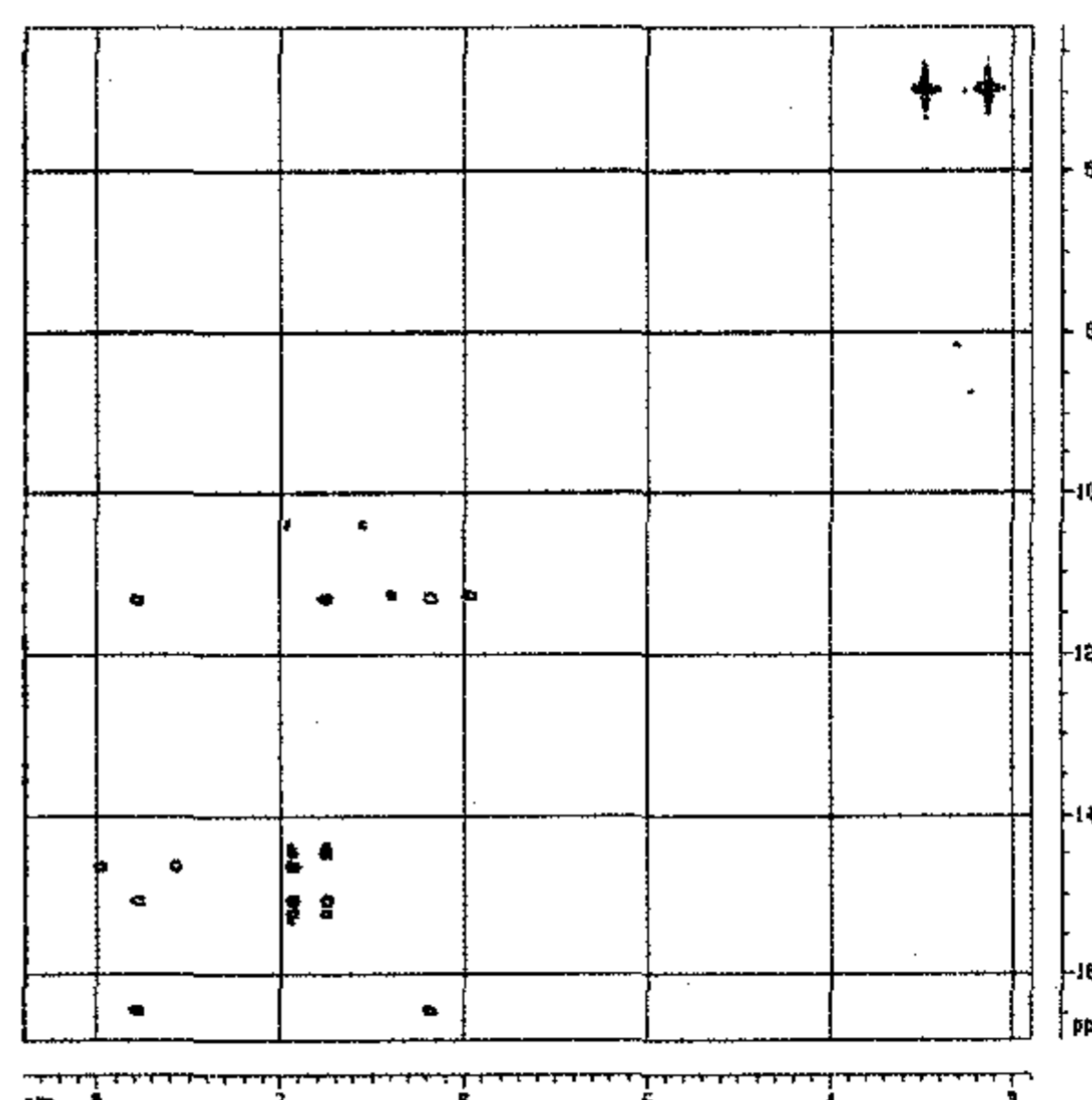


Fig. 14. HMBC NMR spectrum of the compound 3 isolated from *G. japonicum*

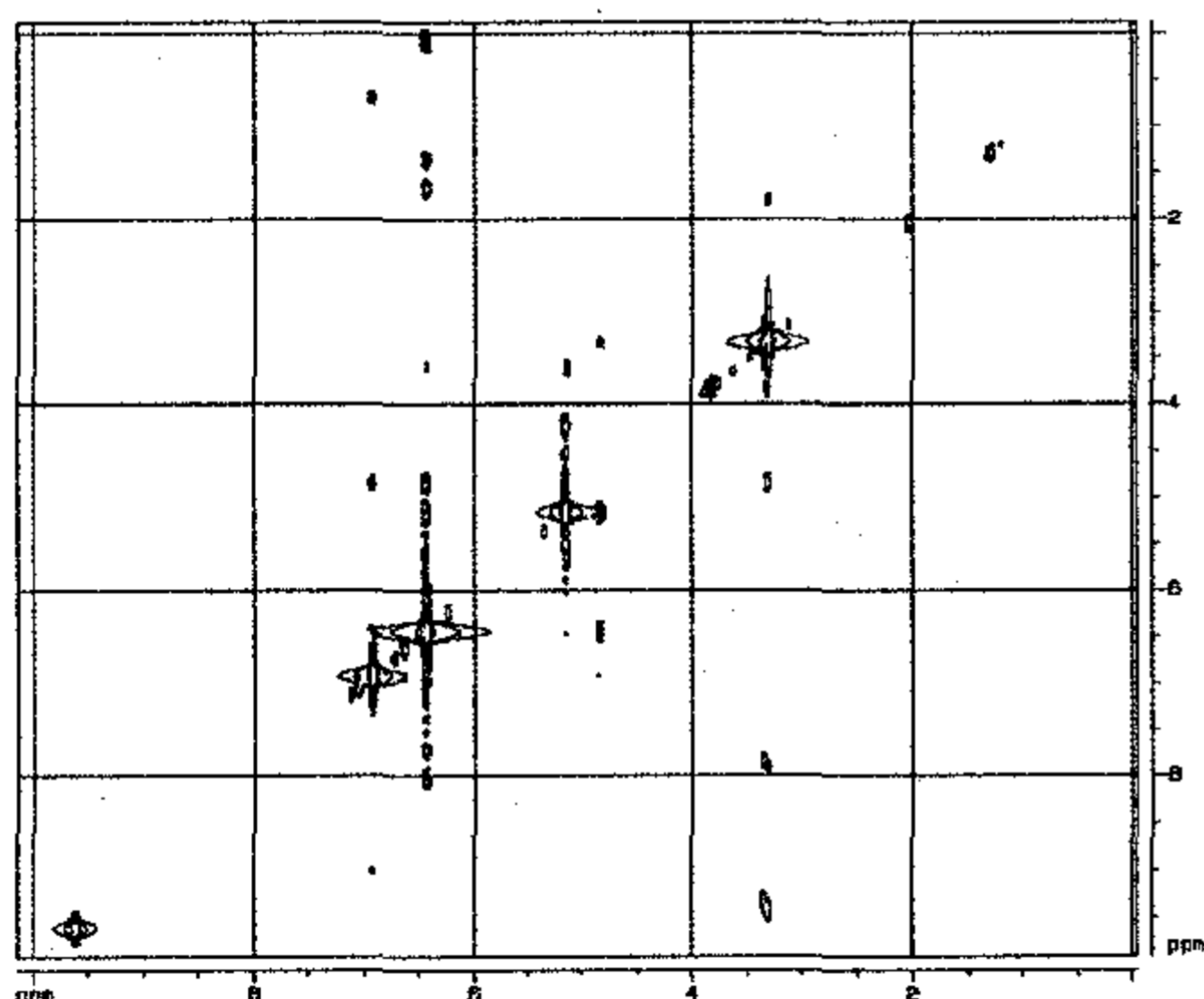


Fig. 15. COSY NMR spectrum of the compound 3 isolated from *G. japonicum*

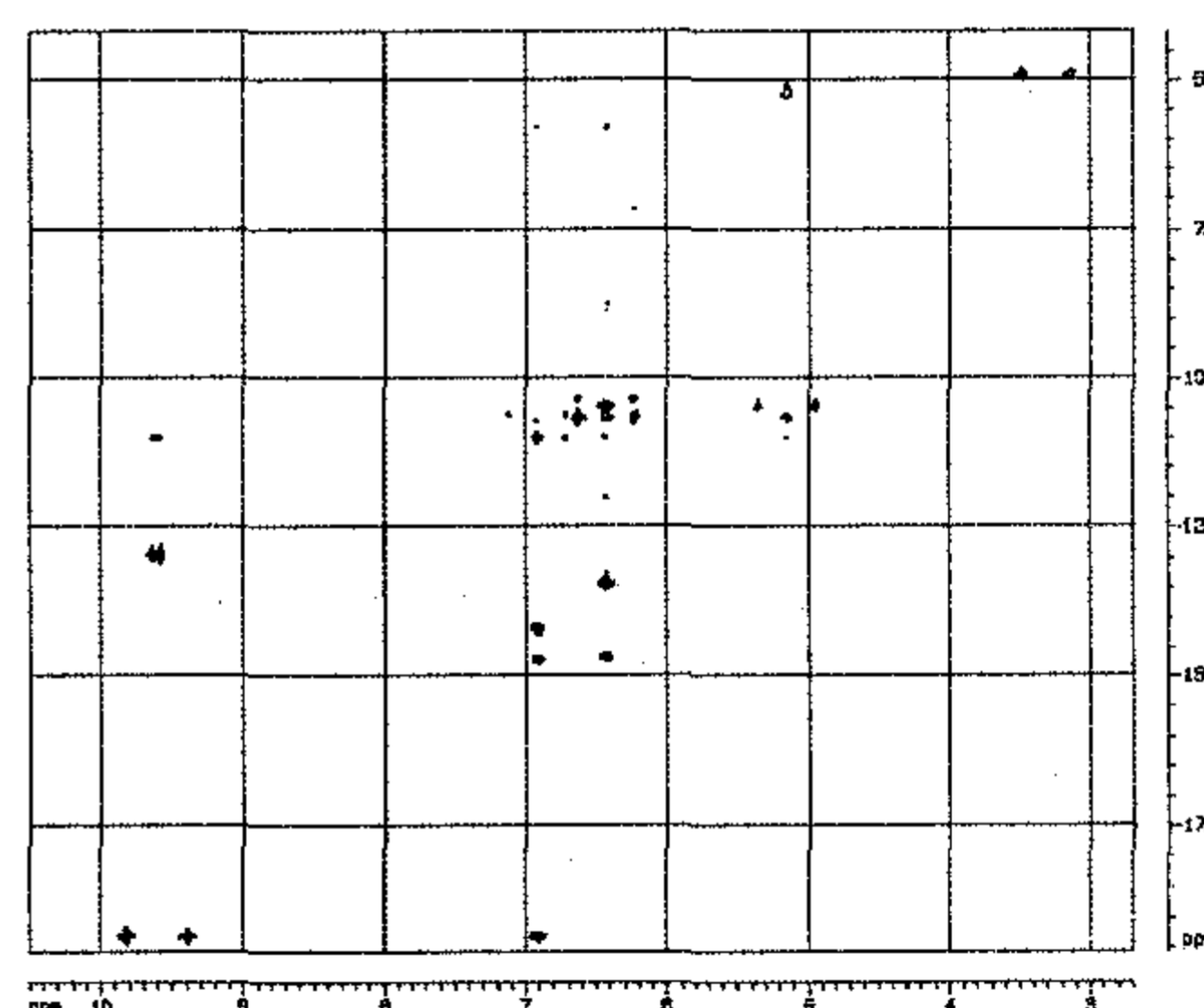
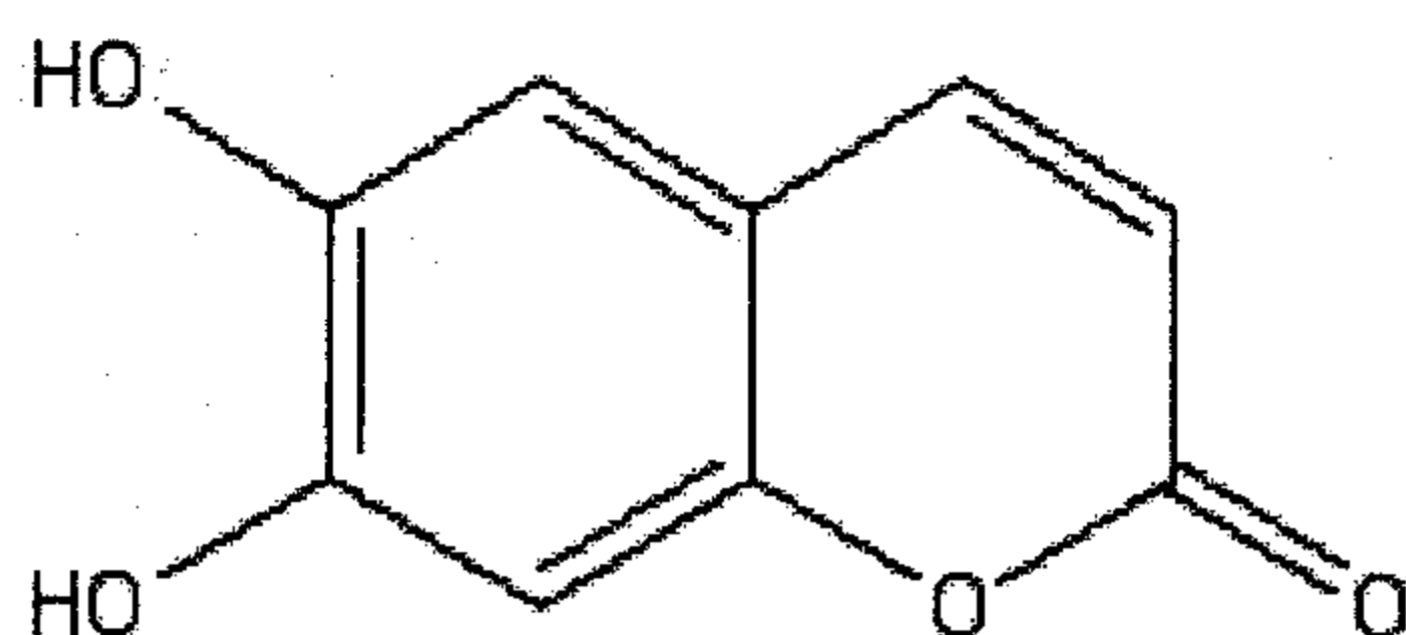


Fig. 16. TOCSY NMR spectrum of the compound 3 isolated from *G. japonicum*

Table 7. Assignment of the compound 3 isolated from *G. japonicum*

	$\delta$ of $^{13}\text{C}$	$\delta$ of $^1\text{H}$	HMBC	COSY	TOCSY
2	164	-	H4, H3	-	
7	152.1	-	H5, H8	-	
9	150.6	-	H4, H5, H8	-	
4	146.2(CH)	7.7(d)	H5	H4-H3	H4-H3
6	144.7	-	H5, H8	-	
5	113.1(CH)	6.93(s)	H4	-	
10	112.9	-	H3, H8	-	
3	112.6(CH)	6.1(d)	-	H3-H4	H3-H4
8	103.7(CH)	6.75(s)	-	-	



6,7-dihydroxy-2H-chromen-2-one

Fig. 17. Chemical structure of compound 3 isolated from *G. japonicum*

### 3) compound 1의 구조분석

$^{13}\text{C}$ -NMR spectrum에서 193.4ppm에서 peak가 관찰되기 때문에 이 화합물은 aldehyde기를 가지고 있음을 예측할 수 있다. 그리고 147.3-129.6ppm 사이에서 5개의 peak들이 관찰됨으로써 benzene ring을 가지고 있음을 예측할 수 있다. HMQC spectrum에서 193.4, 110.3, 106.9, 104.9ppm의  $^{13}\text{C}$  peak들이 각각 9.61, 6.91, 6.42, 5.15ppm의  $^1\text{H}$  peak들과 correlated된 것을 관찰할 수 있다. DEPT spectrum에서 193.4, 110.3, 106.9, 104.9ppm의 탄소들은 CH로 이루어졌음을 확인하였다. HMBC NMR spectrum에서 193.4, 147.3, 141.9ppm의 탄소 peak들은 6.91ppm의 수소와 correlate하고, 110.3ppm의 탄소와 129.6ppm의 탄소는 9.61ppm의 수소와 서로 correlation하는 것을 관찰할 수 있다. 147.3ppm의 탄소 peak를 ketone기 탄소로 추정할 수 있기 때문에 110.3ppm의 탄소 위치를 예상할 수 있고, 따라서 aldehyde기 탄소인 193.4ppm의 탄소 위치 또한 예측할 수 있다. COSY spectrum에서는 peak들 사이의 correlation을 발견할 수 없고, TOCSY spectrum에서 6.42ppm의 수소와 5.15ppm의 수소간의 correlation을 관찰할 수 있다. 그리고 106.9ppm의 탄소와 104.9ppm의 탄소는 HMBC spectrum에서 서로간의 correlation을 관찰할 수 있고, 134.5ppm의 탄소는 6.42ppm의 수소와 강하게 correlation하기 때문에 그 위치를 예측할 수 있다. 134.5ppm 탄소는 6.42ppm의 수소와 HMBC에서 correlation이 확인되었기 때문에 그 위치를 예측할 수 있다. Nuclear Overhauser enhancement(NOESY) 2D spectrum에서 9.61, 6.91ppm의 수소들이 가까이 존재하고, 6.42, 5.15ppm의 수소들이 가까이 있음을 알 수 있다. 화합물의  $^1\text{H}$ -NMR data,  $^{13}\text{C}$ -NMR data, DEPT data, HMQC data,

HMBC data, COSY data, TOCSY data, NOESY data는 아래 그림과 같고 각 proton과 carbon의 assignment table은 아래 표시하였다. 결국 compound 1은 6,8-dihydroxy-2-oxo-2H-chromene-4-carbaldehyde 이다. 이 구조는 현재까지 알려지지 않은 것으로 신규성을 갖는다고 할 수 있으나 조금 더 넓은 범위의 신규성 확인 절차가 필요하다.

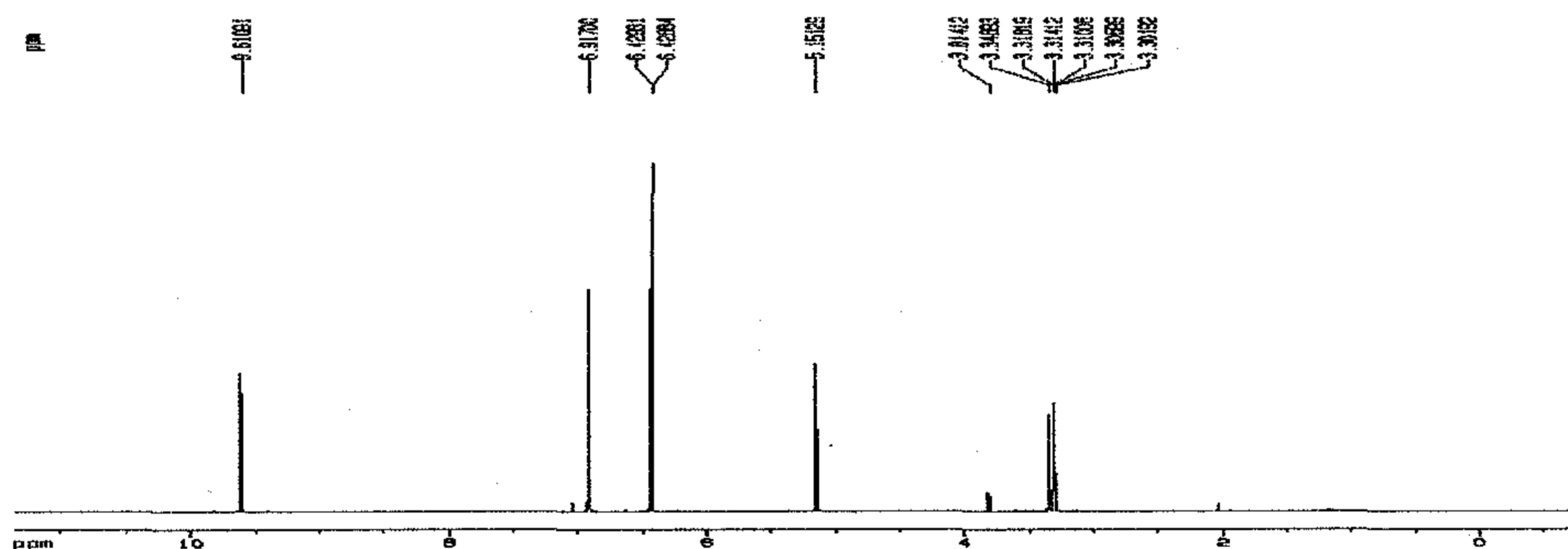


Fig. 18.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of compound 1 isolated from *G. japonicum*

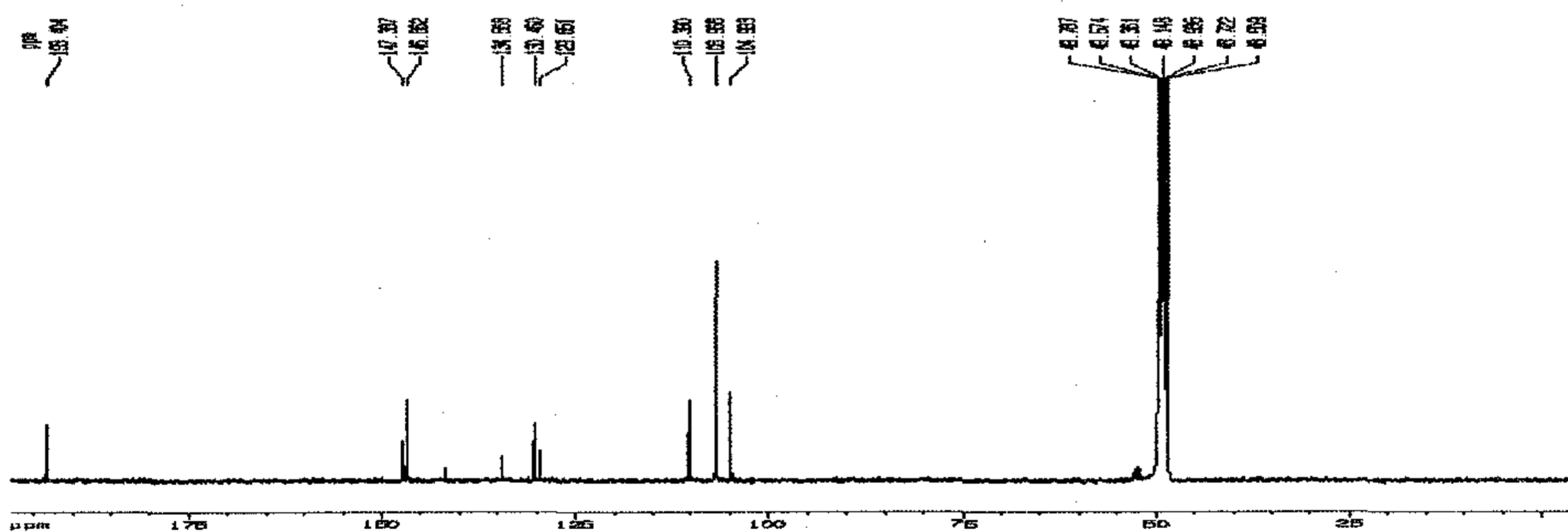


Fig. 19.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of compound 1 isolated from *G. japonicum*

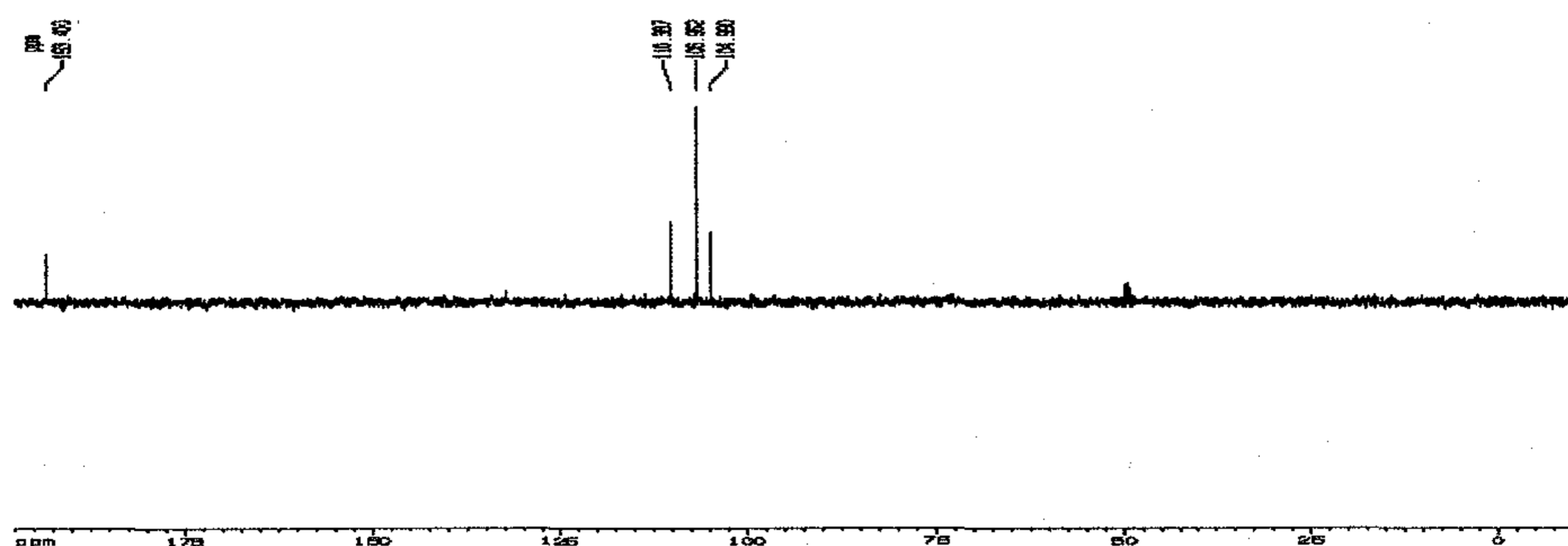


Fig. 20. DEPT NMR spectrum of compound 1 isolated from *G. japonicum*

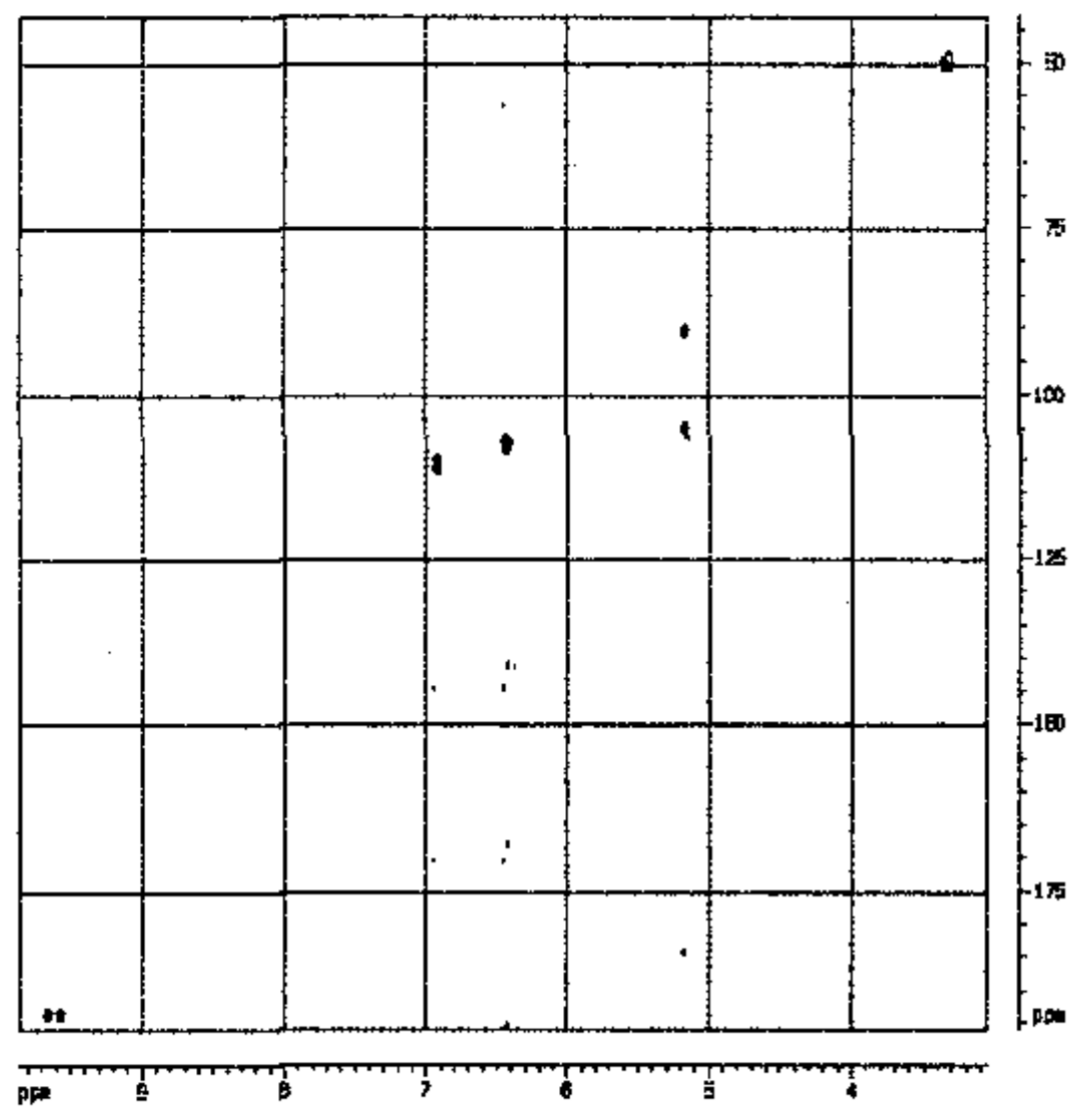


Fig. 21. HMQC NMR spectrum of compound 1 isolated from *G. japonicum*

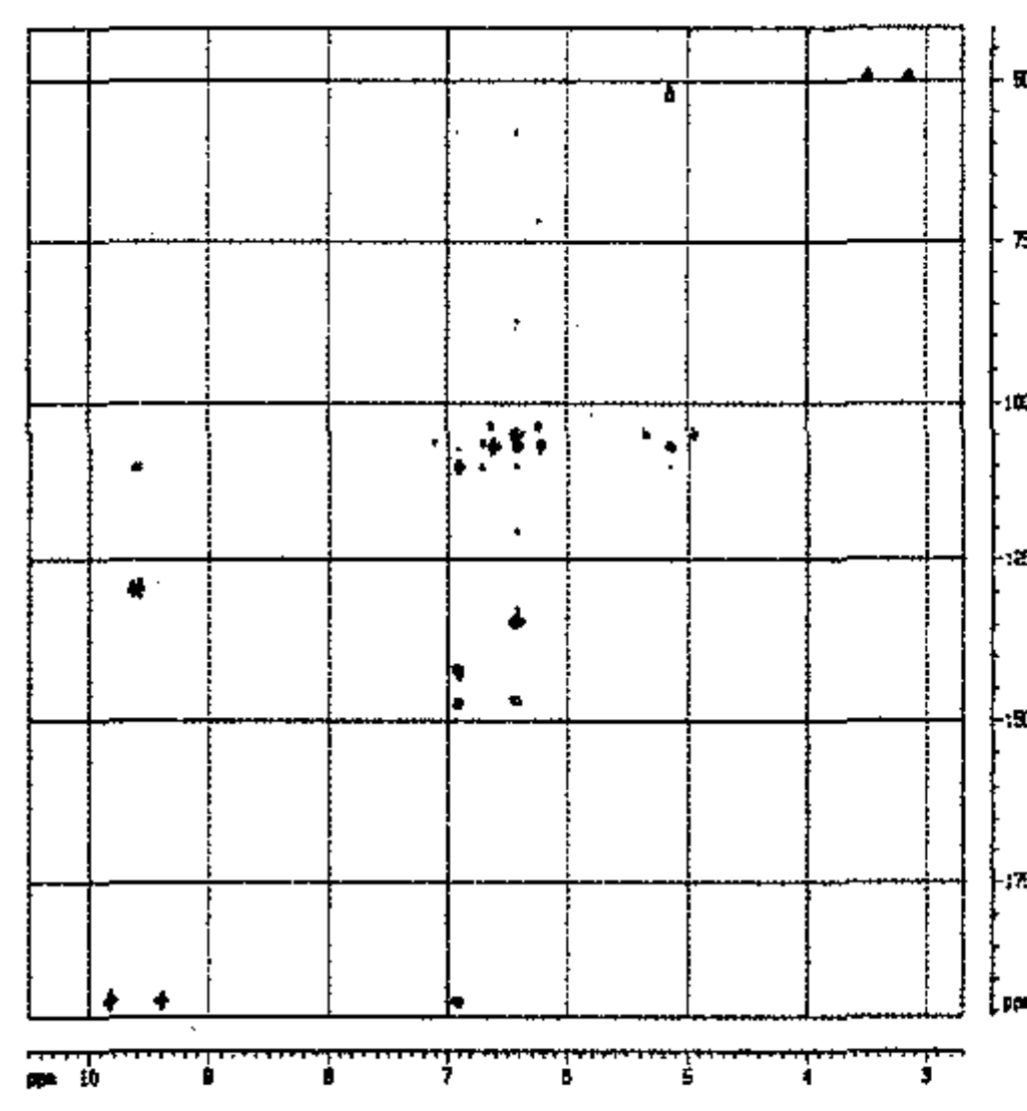


Fig. 22. HMBC NMR spectrum of compound 1 isolated from *G. japonicum*

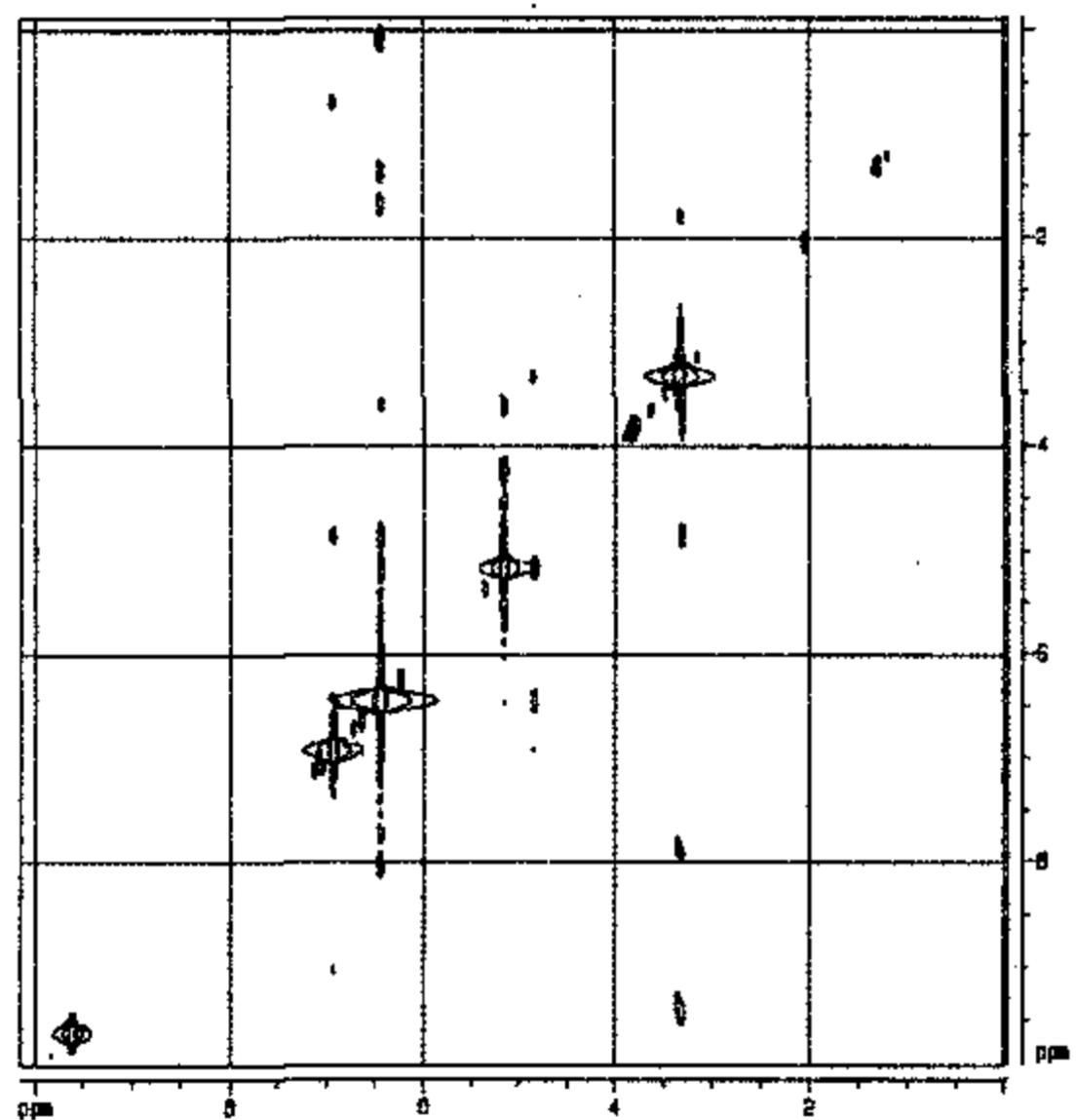


Fig. 23. COSY NMR spectrum of compound 1 isolated from *G. japonicum*

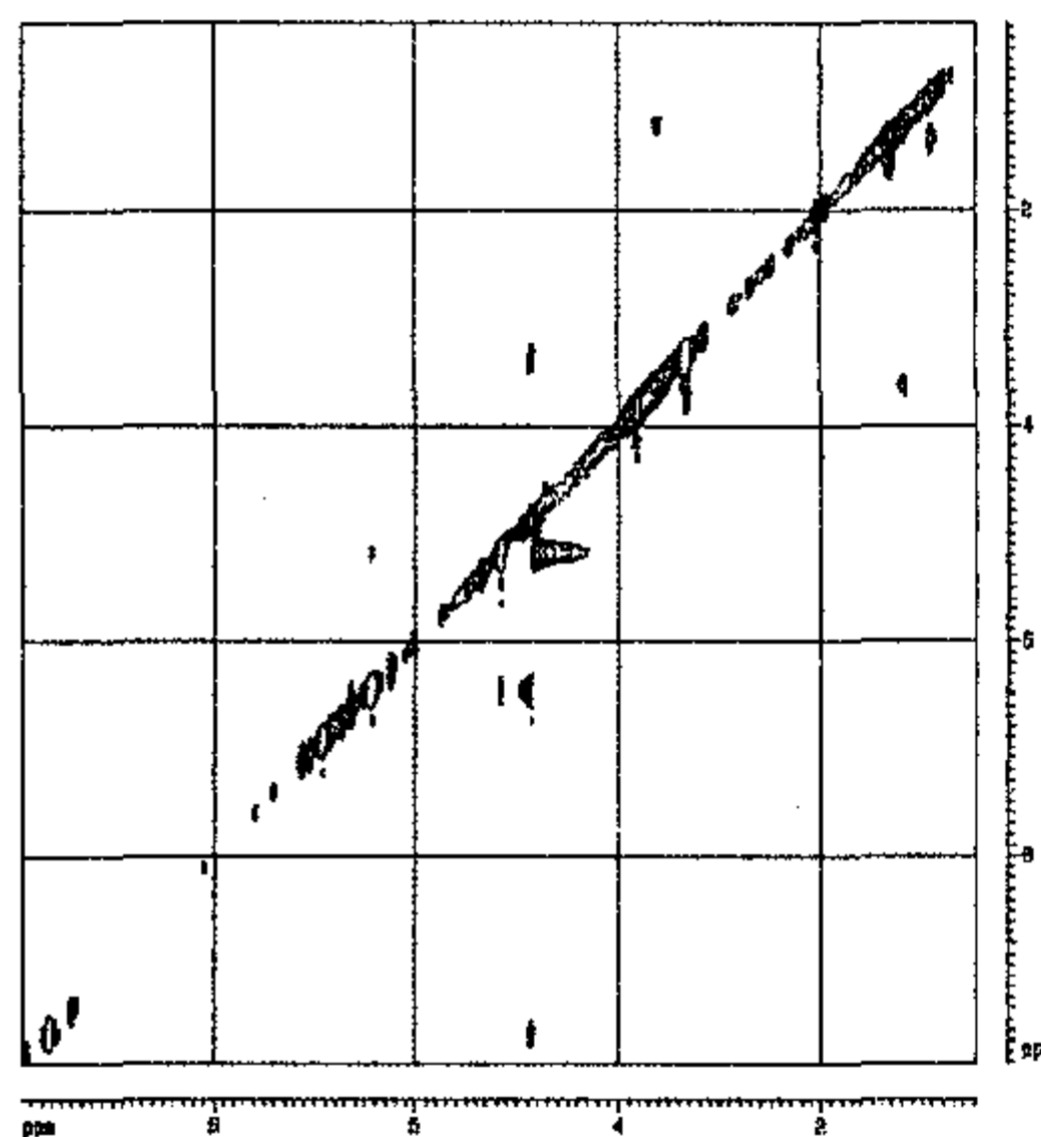


Fig. 24. TOCSY NMR spectrum of compound 1 isolated from *G. japonicum*

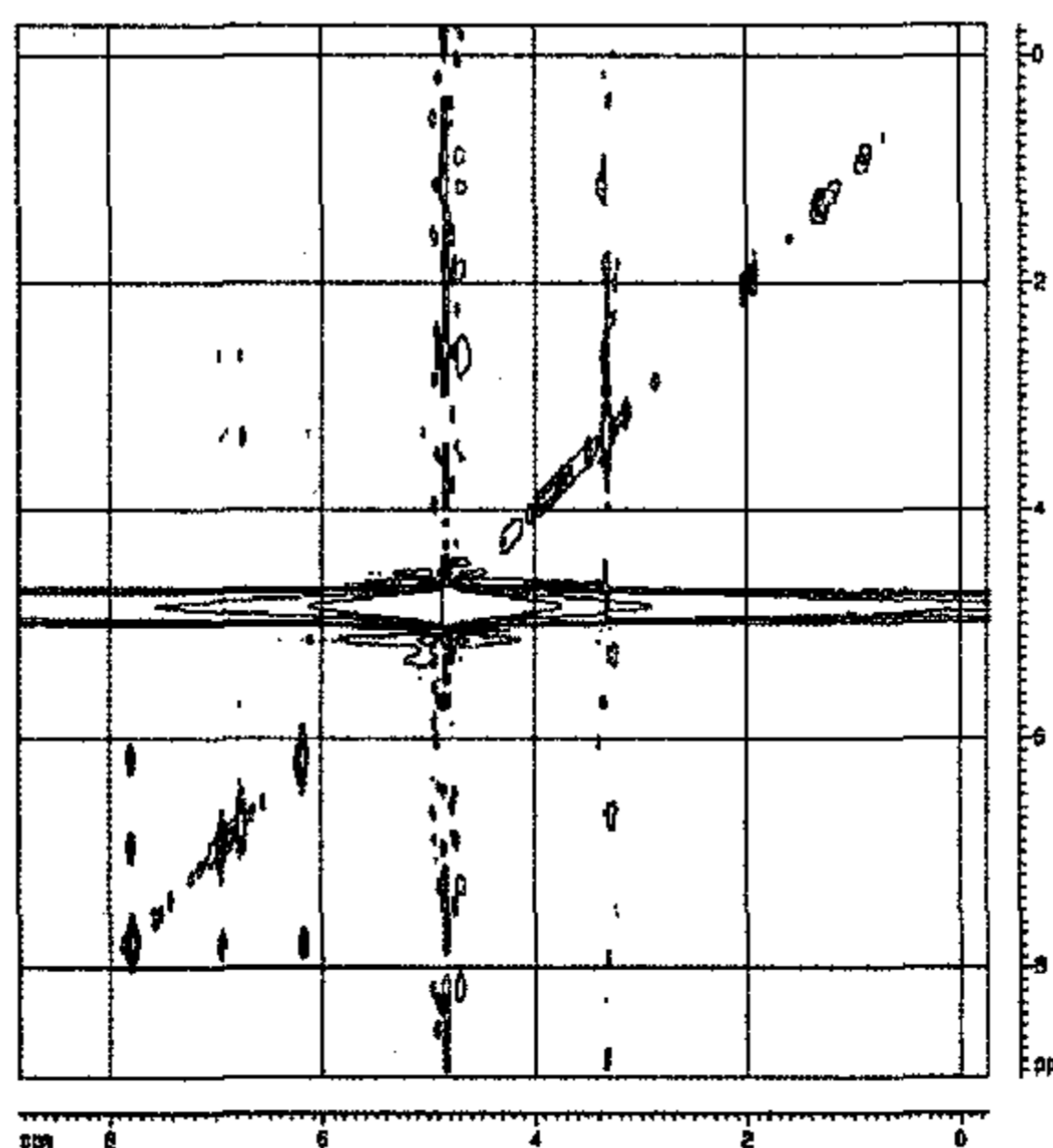
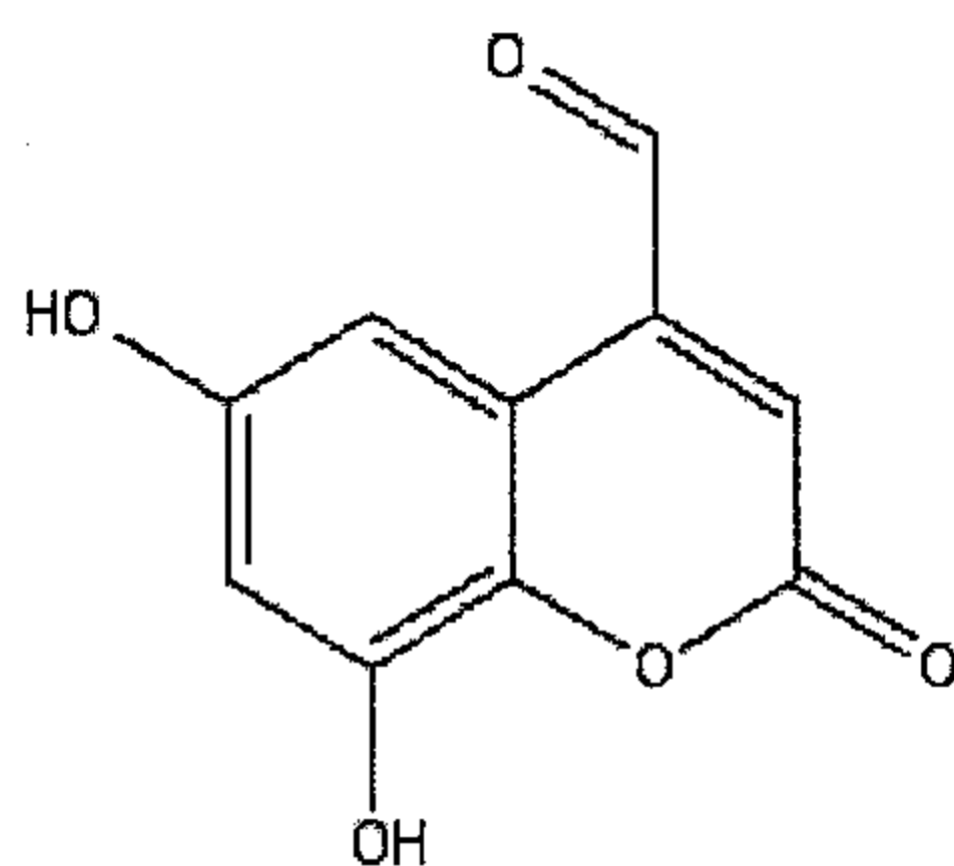


Fig. 25. NOESY NMR spectrum of compound 1 isolated from *G. japonicum*



Table 8. Assignment of compound 1 isolated from *G. japonicum*

	$\delta$ of $^{13}\text{C}$	$\delta$ of $^1\text{H}$	HMBC	TOCSY	NOESY
2	147.3	-	H3	-	-
3	110.3(CH)	6.91(s)	H7	-	H3-H4'
4	141.9	-	H3	-	-
4'	193.4(CH)	9.61(s)	H3	-	H4'-H3
5	106.9(CH)	6.42(s)	H7	H5-H7	H5-H7
6	146.8	-	H5	-	-
7	104.9(CH)	5.15(s)	H5	H7-H5	H7-H5
8	130.4	-	-	-	-
9	134.5	-	H5	-	-
10	129.6	-	H4'	-	-



6,8-dihydroxy-2-oxo-2H-chromene-4-carbaldehyde

Fig. 26. Chemical structure of compound 1 isolated from *G. japonicum*

#### 다. 배암차즈기에서 분리된 활성물질의 구조분석 및 동정

배암차즈기에서 분리한 활성물질을 동정한 결과는 다음과 같다.

SPE-2 (10.5g) 분획 중, 5.6g을 CH<sub>3</sub>Cl-MeOH-H<sub>2</sub>O = 15 : 3 : 1의 혼합 용매로 용출을 시작하여, 점차 극성을 높여서 13 : 3 : 1, 9 : 3 : 1, 6 : 4 : 1의 혼합 용매를 용출 용매로 사용하여, silica gel c.c.를 수행하여, 총 10개의 분획 (SPE-2-1~SPE-2-10)을 얻었다. 10개의 분획 중에서, SPE-2-2 (101.8mg)와 SPE-2-6 분획은 TLC 확인 결과, 단일 화합물로 확인되어 NMR 측정을 수행하였다. SPE-2-8 (1.46g) 분획 중, 512mg을 Sephadex LH-20를 resin으로 하고, 용출 용매로 CH<sub>3</sub>Cl-MeOH-H<sub>2</sub>O = 6 : 4 : 1를 이용하여, c.c를 수행하였고, 총 4개의 분획을 나누어서, 순수한 SPE-2-8-2 (261mg)를 분리 할 수 있었다. 이 분획에 대하여서도 NMR 측정을 수행 하였다.

NMR spectrum 분석 결과, SPE-2-2는 luteolin 7-O- $\beta$ -glucopyranoside (화합물 1)로, SPE-2-6은 hispidulin 7-O- glucopyranoside(화합물 2)로, SPE-2-8-2는 **rosmarinic acid**(화합물 3)로 동정 되었다. 상기 분리된 hispidulin 7-O-glucopyranoside는 Liwei Gu & Xinchu Weng(2001, Food Chemistry, 299-305)가 발표한 hispidulin의 7번에 glucopyranoside가 결합된 형태로써, 당이 가수분해되기 전 상태로 추정된다.

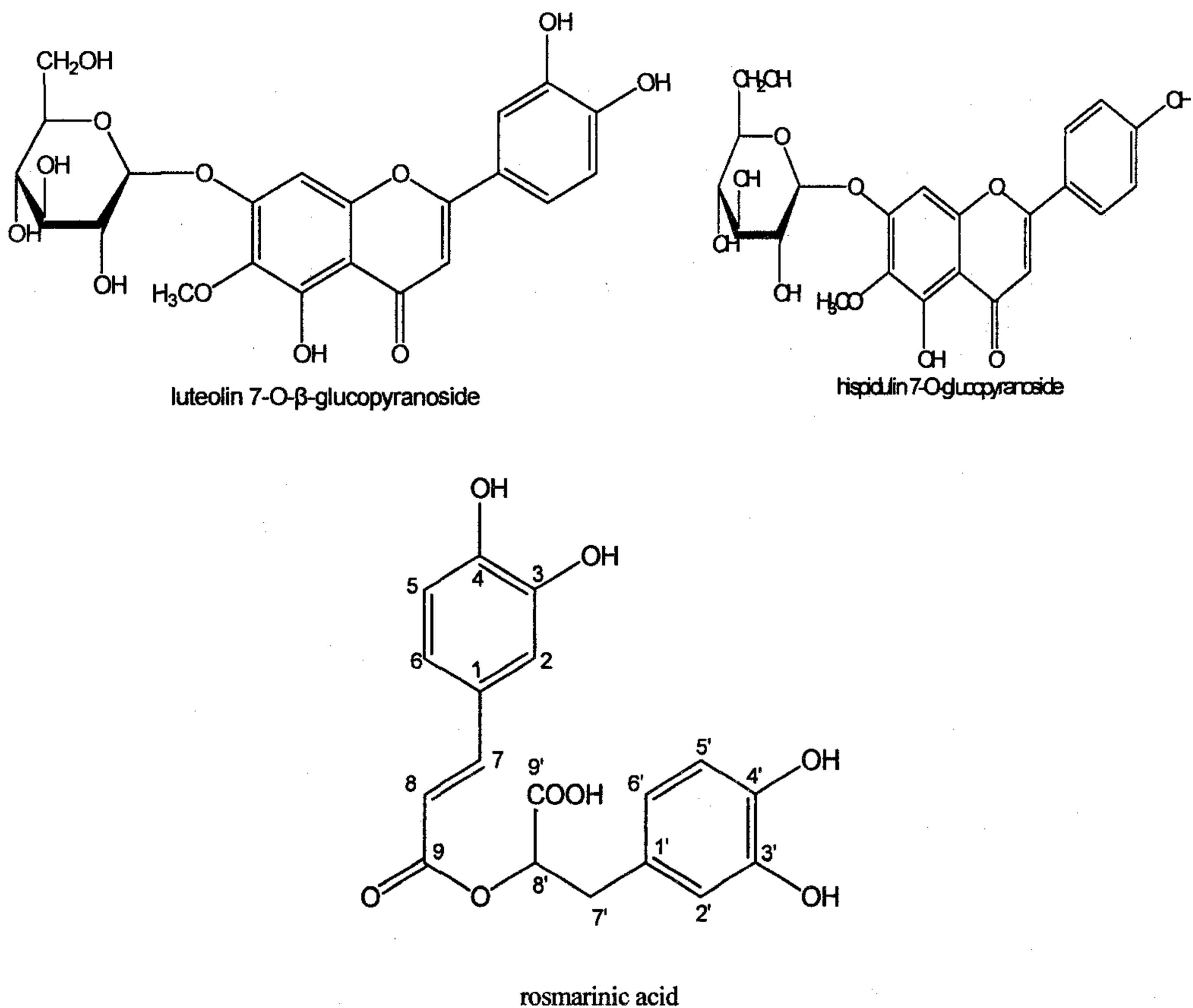


Fig. 27. Chemical structure of compounds isolated from *Salvia plebeia* R. Br.

**hispidulin 7-O-glucopyranoside;**

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz,  $\delta$ , pyridine-*d*<sub>5</sub>) 7.86 (2H, d, J=8.8 Hz, H-3',5'), 7.36 (1H, s, H-8), 7.18 (2H, d, J=8.8 Hz, H-2',6'), 6.90 (1H, s, H-3), 5.90 (1H, d, J=7.2 Hz, H-1''), 4.61 (1H, d, J=10.4 Hz, H-6a''), 4.44 (1H, dd, J=7.6, 7.6 Hz, H-5''), 4.42 (1H, dd, J=7.6, 7.6 Hz, H-2''), 4.36 (1H,

dd, J=7.6, 7.6 Hz, H-4''), 4.33 (1H, dd, J=10.4, 7.6 Hz, H-6b''), 4.28 (1H, dd, J=7.6, 7.6 Hz, H-3''), 4.04 (3H, s, H-OMe), ;

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz,  $\delta$ , pyridine-d<sub>5</sub>) 183.0 (C-4), 164.9 (C-2), 163.0 (C-4'), 157.3 (C-7), 153.9 (C-5), 153.0 (C-9), 133.7 (C-6), 128.9 (C-2',6'), 121.8 (C-1'), 116.9 (C-3',5'), 106.9 (C-10), 103.4 (C-3), 101.9 (C-1''), 95.0 (C-8), 79.3 (C-3''), 78.5 (C-5''), 74.7 (C-2''), 71.1 (C-4''), 62.4 (C-6''), 60.9 (C-OMe)

### rosmarinic acid

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz,  $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>) 7.82(1H, d, J=16 Hz, H-8), 7.03(1H, d, J=2.3 Hz, H-2), 6.92(1H, dd, J=2.3, 8.3 Hz, H-6), 6.76(1H, d, J=8.3 Hz, H-5), 6.77(1H, d, J=2.3, H-2'), 6.67(1H, d, J=8.3 Hz, H-5'), 6.62(1H, dd, J=2.3, 8.3 Hz, H-6'), 6.25(1H, d, J=16 Hz, H-7), 6.62(1H, dd, J=3, 9.8 Hz, H-8'), 3.10(1H, dd, J=3, 14.3 Hz, H-7 alpha), 2.93(1H, dd, J=9.8, 14.3 Hz, H-7 beta)

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz,  $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>) 38.36(C-7'), 77.24(C-8'), 114.82(C-8), 115.08(C-2), 116.10(C-5), 116.32(C-5'), 117.38(C-2'), 121.65(C-6'), 122.85(C-6), 127.46(C-1), 130.43(C-1'), 144.32(C-4'), 145.37(C-3'), 146.13(C-7), 146.84(C-4), 148.89(C-3), 168.98(C-9), 177.21(C9')

### 라. 뱀무 및 배암차즈기에서 분리된 활성물질의 TLC 및 항산화활성

뱀무와 배암차즈기에서 분리한 화합물들을 TLC(Fig. 28)와 HPLC( data is not shown)로 분리해 본 결과 대부분 순수하게 분리되었음을 확인할 수 있었으며, 각 화합물들의 항산화 활성을 DPPH 방법으로 free radical 소거능을 측정한 결과 Table 9에서 보는 바와 같이 뱀무에서는 3,4,5-trihydroxybenzaldehyde가 항산화표준물질인 BHT, BHA,  $\alpha$ -Tocopherol보다 현저히 높은 free radical 소거능을 보였다. 배암차즈기에서는 rosmarinic acid가 BHA와 BHT보다 항산화활성이 높음을 확인할 수 있었다.



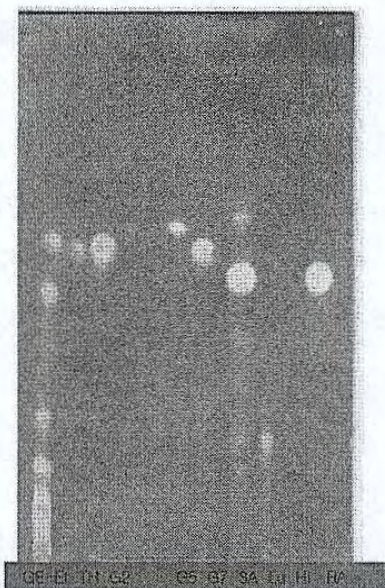


Fig. 28. TLC chromatogram of the compounds isolated from *G. japonicum* and *S. plebeia*

GE-Et : Ethyl acetate fraction of *G. japonicum*, TH : 3,4,5-trihydroxybenzaldehyde(Sigma product)

G2 : 3,4,5-trihydroxybenzaldehyde isolated from *G. japonicum*, G5: Compound 5 isolated from *G. japonicum*, G7 : Compound 7 isolated from *G. japonicum* , SA : Ethyl acetate fraction of *S. plebeia*

Lu : luteolin 7-O- $\beta$ -glucopyranoside, Hi : hispidulin 7-O-glucopyranoside

RA : rosmarinic acid isolated from *S. plebeia*

Table 9. Antioxidative activity of the compounds isolated from *Salvia plebeia* R. Br.and *Geum japonicum* THUNBERG

	Sample	SC <sub>50</sub> <sup>J</sup> ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )
<i>Salvia plebeia</i> R. Br.	SPE-2-2(luteoline)	75.60
	SPE-2-6(hispidulin)	982.30
	SPE-2-8-2(rosmarinic acid)	40.51
<i>Geum japonicum</i> THUNBERG	GE-compound 2(THBA)	18.90
	GE-4	901.19
	GE-compound 3	176.12
	GE-compound 1	64.06
Standard substance	BHT	233.22
	BHA	56.07
	$\alpha$ -Tocopherol	35.75

J) Concentration of antioxidant required scavenging 50% of free radical(DPPH) in a reaction solution



### 3. 뱀무 및 배암차즈기 추출물 및 유효성분에 대한 생리활성 검정

#### 가. 뱀무와 배암차즈기의 항염증 활성

##### 1) Nitrite 정량과 활성 측정

대식세포인 Raw 264.7 세포주를 이용하여 96well plate에 well당  $5 \times 10^4$  cell/ml의 농도로  $80 \mu\text{l}$ 씩 분주한 뒤 염증반응을 촉진하는  $10 \mu\text{g/ml}$ 농도의 LPS( $10 \mu\text{l}$ )를 가하고 시료를 처리하여 산화질소(Nitric oxide, NO)의 생성정도를 알아보았다. 측정 결과 Fig. 29에서 보여주듯이 배암차즈기와 뱀무의 에칠 아세테이트 분획이 NO의 생성을 억제시켜 항염증 활성이 있음이 나타났다.

대식세포는 비특이적 면역반응으로 숙주에 침입한 이 물질을 1차적으로 방어하는 세포이며 LPS에 의하여 염증을 일으키는 여러 사이토카인을 분비하게 한다. 특히 NO와 PGE2 생성이 증가하면서 암세포 증식, 침윤성, 세포사의 지연을 초래하므로 이들 사이토카인 생성을 감소시키는 신소재에 많은 관심이 집중되고 있다. 염증반응이 일어나는 동안 산화질소(NO)가 많이 생성되는데 뱀무 추출물에 의하여 NO의 생성량을 감소할 수 있었음은 항염증활성 효과가 있음을 의미한다.

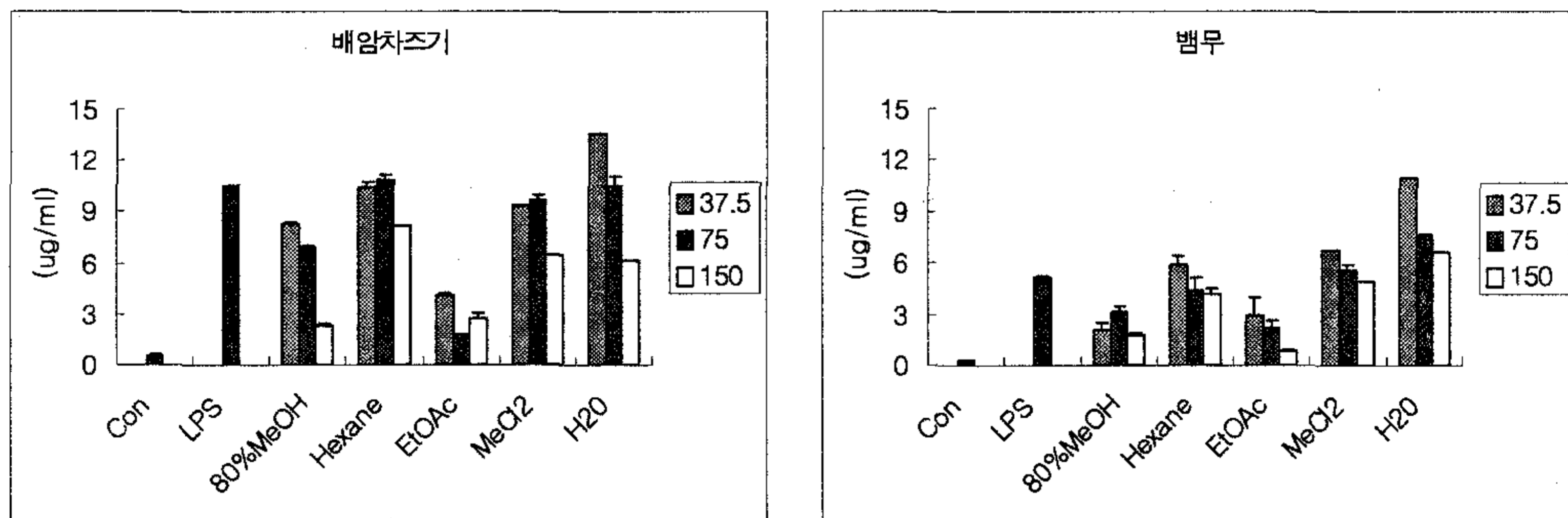


Fig. 29. Nitrite concentration of the solvent fractions and methanol extracts derived from *Salvia plebeia* R. Br. and *Geum japonicum* THUNBERG with various concentrations. Results are presented as Mean  $\pm$  SEM.

##### 2) MTT assay

$\text{H}_2\text{O}_2$ 로 산화 스트레스를 주어서 세포사멸을 유도한 다음 세포의 생존율 (%)을 비교한 결과는 Fig. 30에서 보는 바와 같이 배암차즈기는 Whole 층인 80% MeOH과  $\text{H}_2\text{O}$  층에서 가장 생존율이 높았고 뱀무는 EtOAc 층과  $\text{H}_2\text{O}$  층에서 가장 생존율이 높게 나타났다.

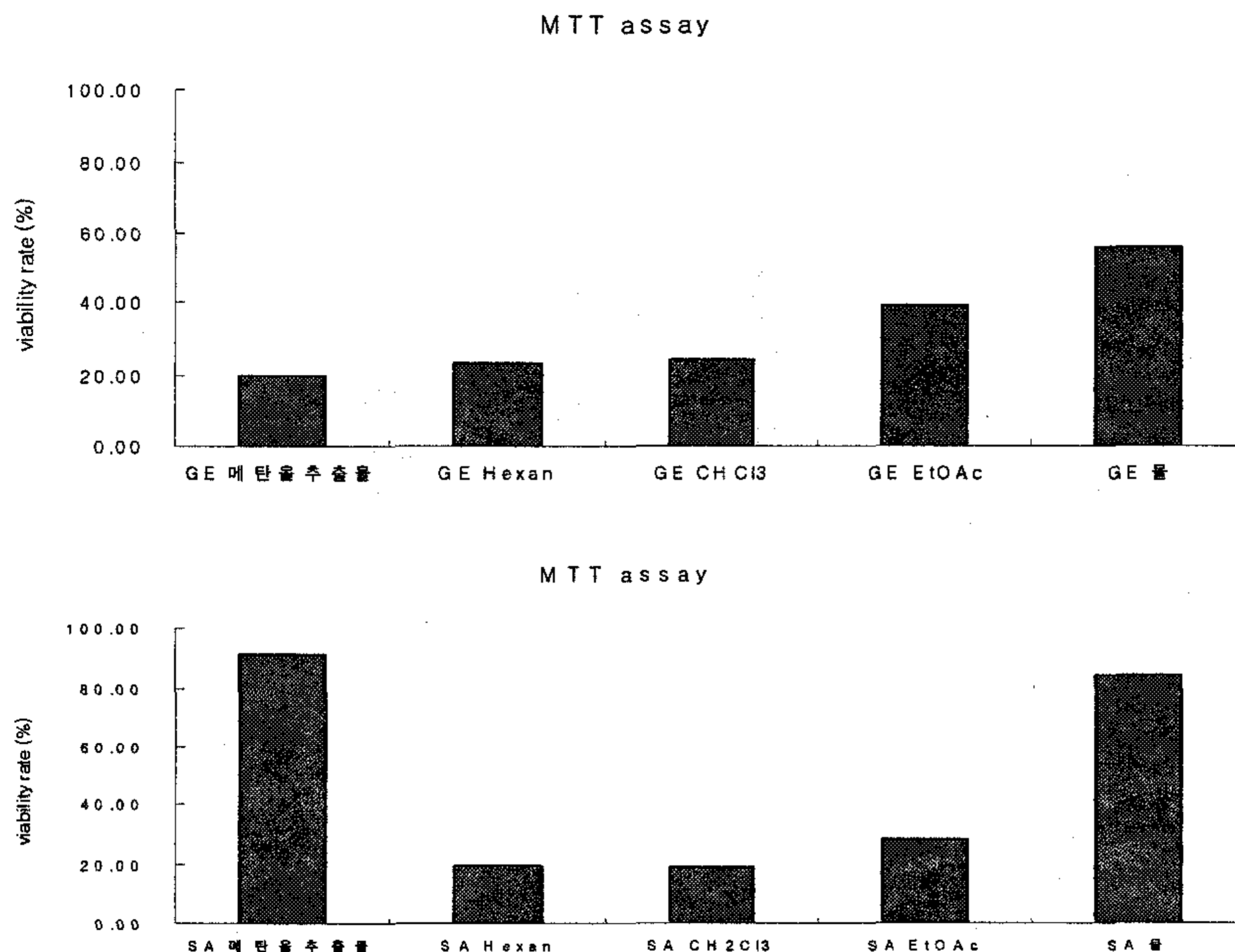


Fig. 30. Cytotoxicity effects of the solvent fractions and methanol extracts derived from *Salvia plebeia* R. Br. and *Geum japonicum* THUNBERG by MTT assay

## 나. 뱀무와 배암차즈기의 세포사멸 효과 결과

### 1) SRB평가법에 의한 Cytotoxicity 검정

Human lung adenocarcinoma cell인 A549 cell을 이용하여 SRB평가법으로 시료의 Cytotoxicity를 관찰한 결과 뱀무의 *n*-Hexane layer(I,N)가 cytotoxicity가 가장 높게 나타났다. 뱀무의 경우 H<sub>2</sub>O layer또한 농도의존성 있게 결과를 나타내었으며 80% MeOH layer에서 1000농도의 결과가 튀는 것을 볼 수 있는데 이는 실험상의 실수로 생각되어 재 실험이 요구된다, 하지만 이 두 개의 layer모두 *n*-Hexane layer의 효과보다는 떨어지는 것을 볼 수 있다.

또한, 배암차즈기 추출물의 Cytotoxicity를 관찰한 결과도 *n*-Hexane layer(I,N)가 가장 A549 cell에 대해 Cytotoxicity가 높은 것으로 보인다. 80% MeOH layer 또한 활성을 보였지만 역시 *n*-Hexane layer의 효과보다는 떨어지는 것을 볼 수 있었다. 이 결과로 *n*-Hexane layer의 분획별 활성을 살펴보기로 하였다.

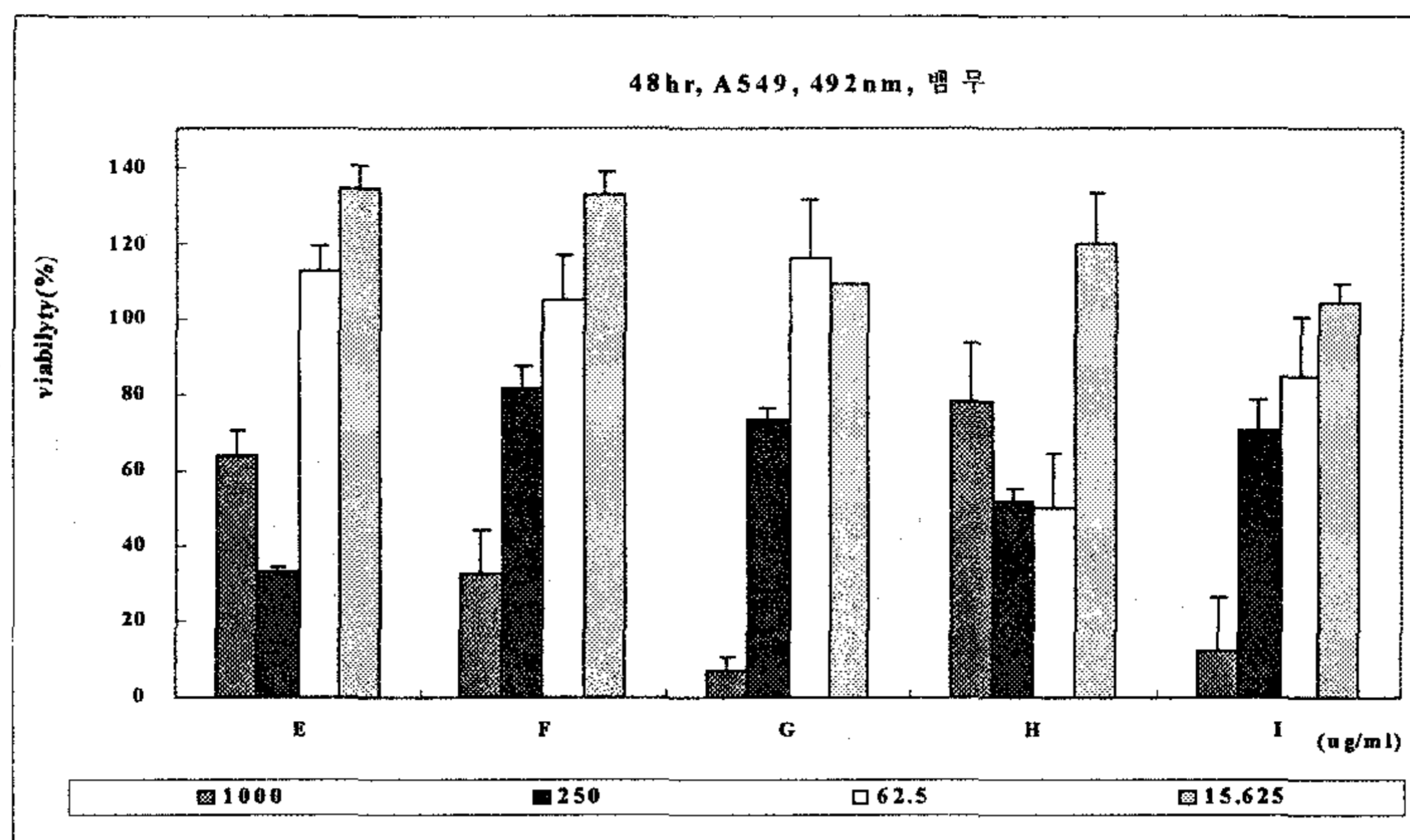


Fig. 31. Cytotoxicity effects of the solvent fractions and methanol extracts derived from *Geum japonicum* on A549 cell line, with various concentrations through SRB assay. Results are presented as Mean  $\pm$  SEM.

E : GE 80% MeOH layer, F : GE H<sub>2</sub>O layer, G : GE MeCl<sub>2</sub> layer,  
H : GE EtOAc layer, I : GE *n*-Hexane layer

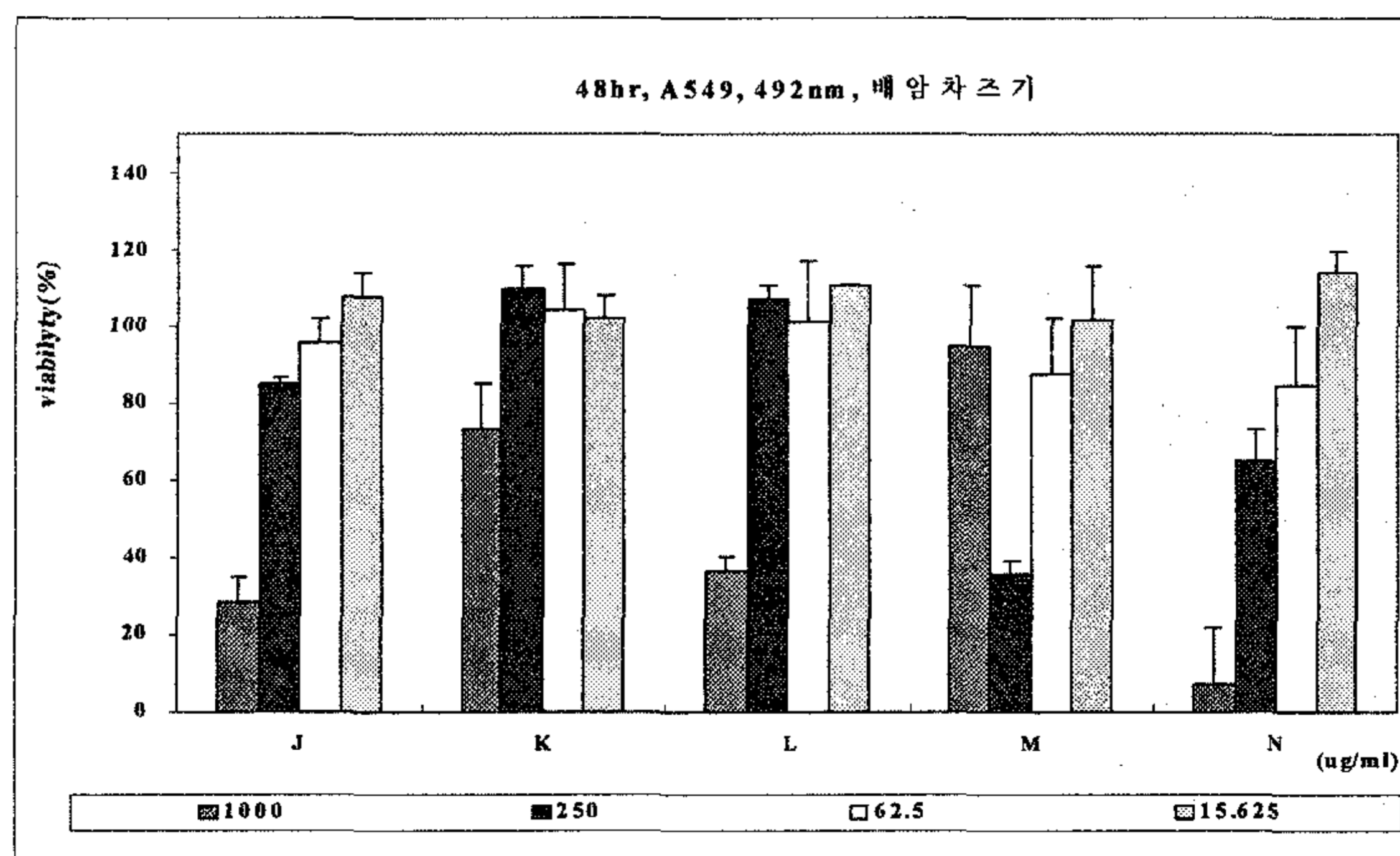


Fig. 32. Cytotoxicity effects of the solvent fractions and methanol extracts derived from *Salvia plebeia* R. Br. on A549 cell line, with various concentrations through SRB assay. Results are presented as Mean  $\pm$  SEM.

J : SA 80% MeOH layer, K : SA H<sub>2</sub>O layer, L : SA MeCl<sub>2</sub> layer, M : SA EtOAc layer, N : SA *n*-Hexane layer



## 2) Hexane 분획별의 Cytotoxicity 검정 (492nm, A549, 48hr)

뱀무, 배암차즈기 *n*-Hexane fraction(무게가 100mg이상인 것을 택하여 실험)을 human lung adenocarcinoma cell인 A549 cell 을 이용하여 SRB 평가법 시행해 시료의 Cytotoxicity 를 관찰하였다. 각각의 시료는 1000, 500, 250, 125 ( $\mu\text{g/ml}$ )의 농도로 최종 DMSO의 농도가 0.25%가 되게 하여 한 well당 10  $\mu\text{g}$ 씩 처리하여 48, 72hr을 관찰하였다.

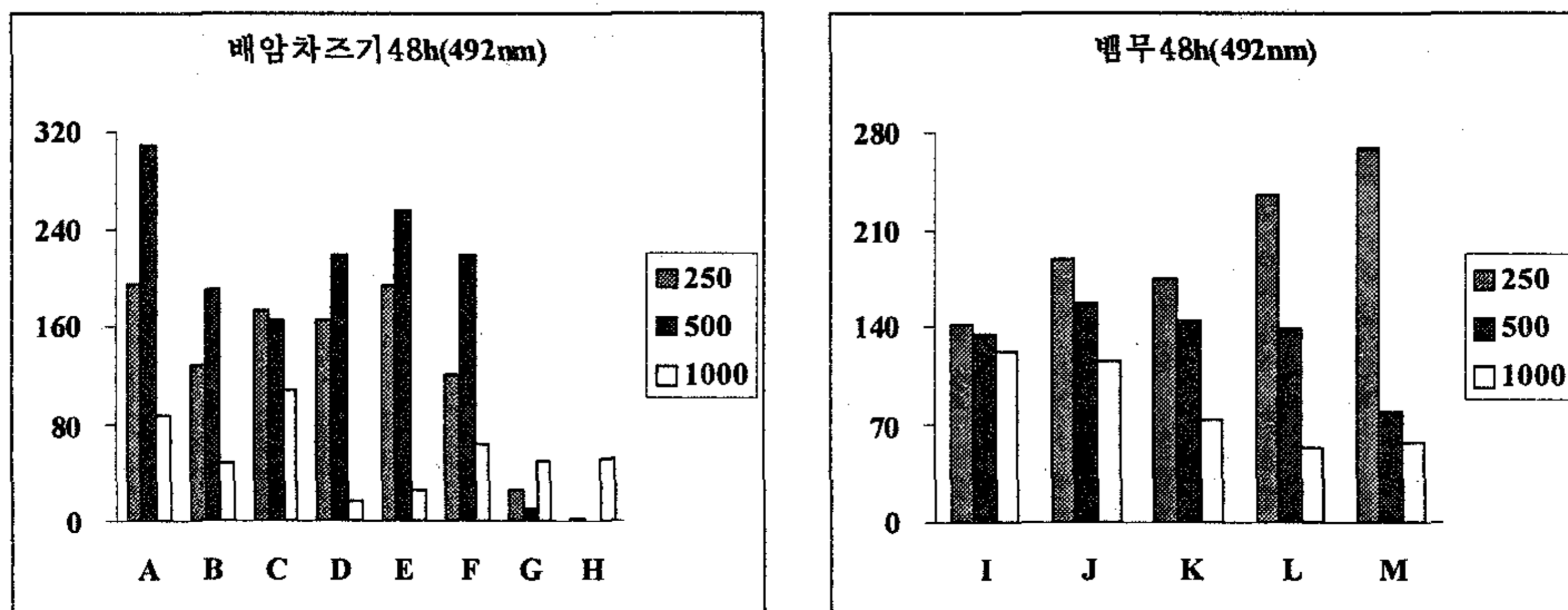
Fig. 33에서 보는 바와 같이 뱀무와 배암차즈기 중 뱀무의 *n*-Hexane fraction이 A549에 대해 Cytotoxicity를 보였고, 배암차즈기는 거의 농도 의존성과 시간 의존성이 나타나지 않는데 이는 시료를 DMSO에 녹일 때 뱀무보다 거의 녹지 않았기 때문이라고 추측되며 실험 시 다른 용매의 사용을 고려해야겠다.

배암차즈기는 48h에서는 C fraction이 농도 의존적으로 감소하였으나, 72h에서는 A, B, D, F의 fraction에서 감소하는 경향을 보였으므로 72h에서 더 효과를 나타냄을 볼 수 있었다.

뱀무는 거의 대부분의 fraction이 농도 의존적으로 Cytotoxicity를 나타냈으나 이중 특히 L fraction이 가장 좋은 효과를 나타냈다. 또한 배암차즈기와 마찬가지로 48h보다는 72h에서 더 효과가 좋은 것을 볼 수 있었다. 125 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도는 결과에는 첨가하지 않았지만 Cytotoxicity가 나타나지 않는 것으로 보아 너무 저농도임을 추측할 수 있었다.

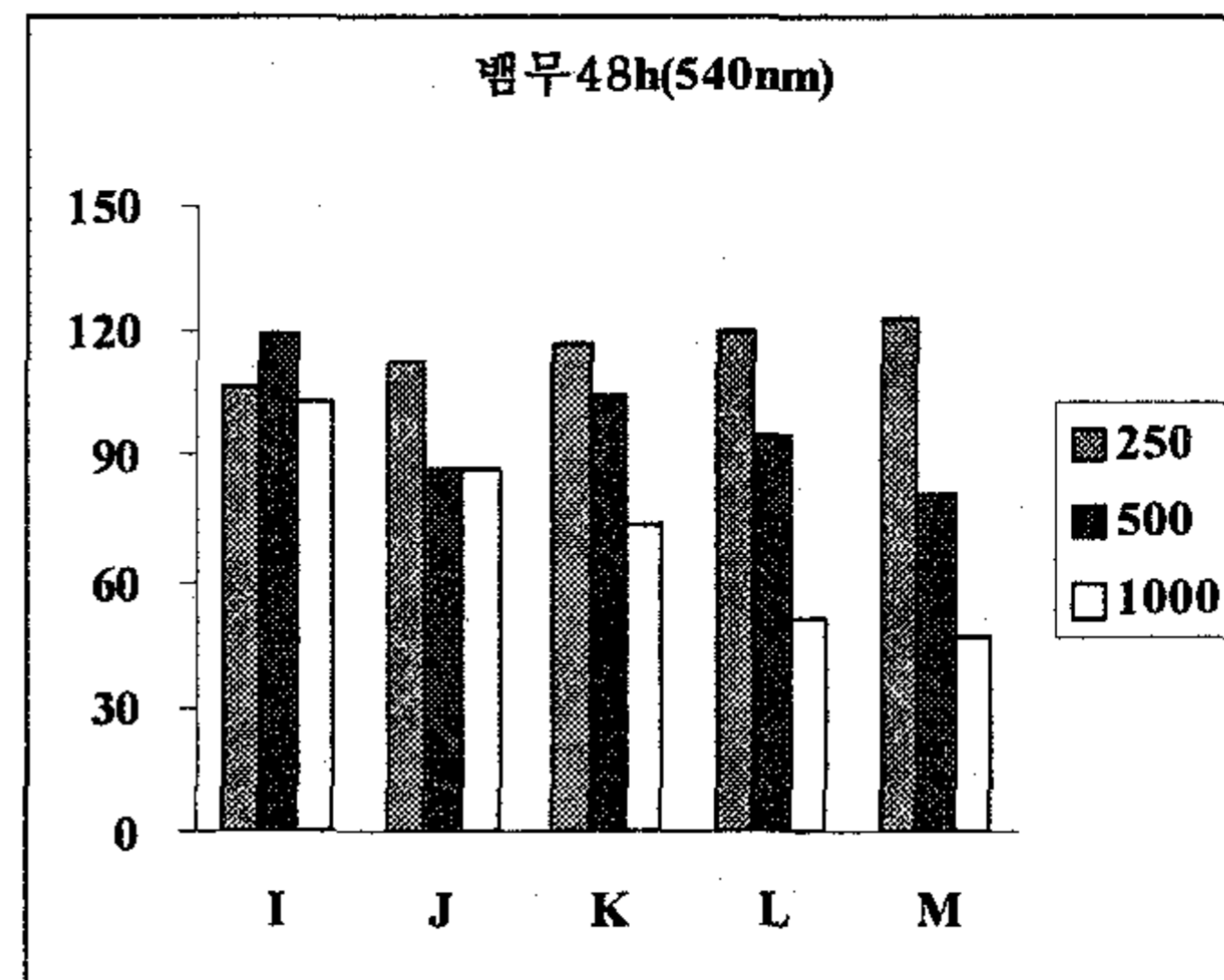
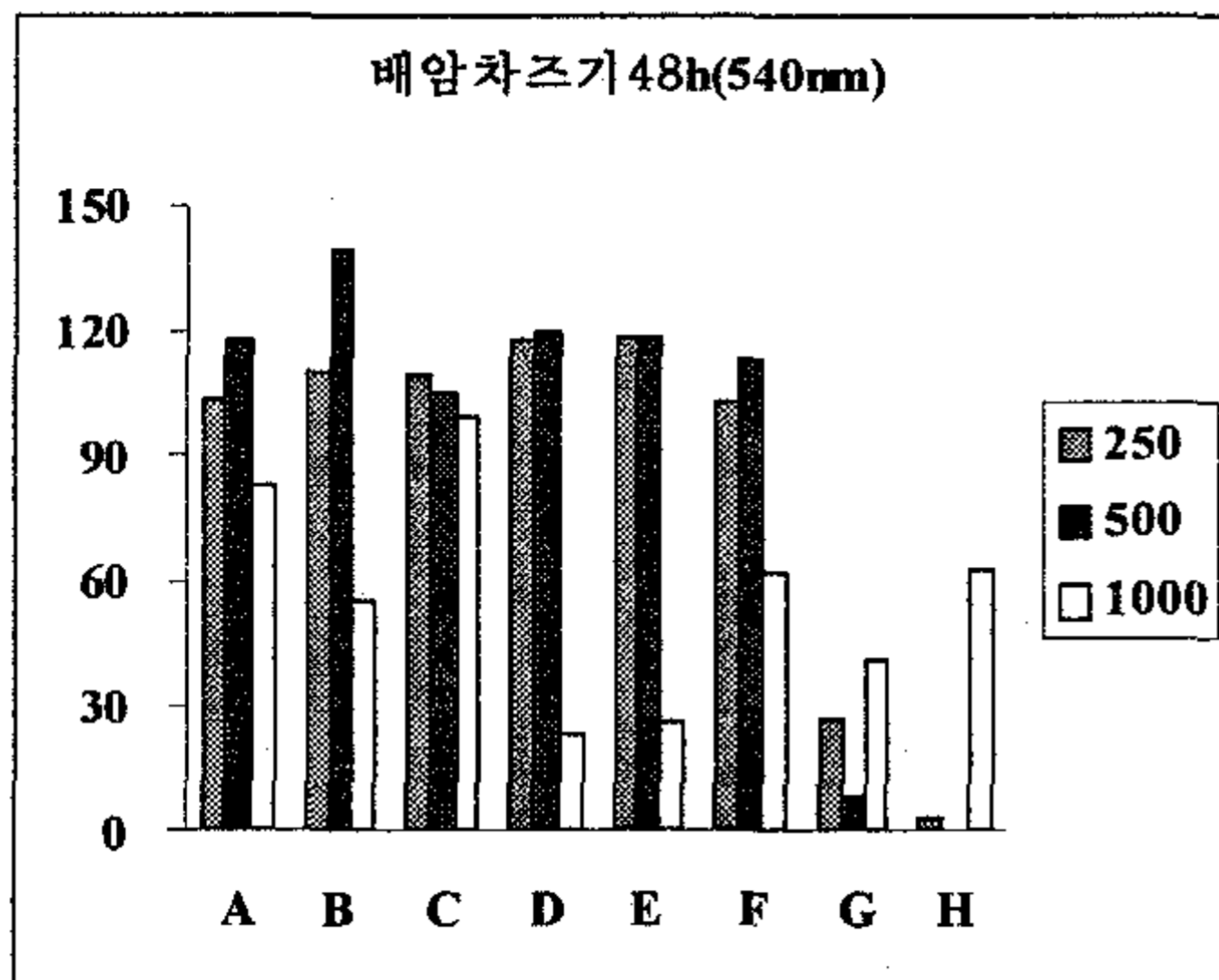
따라서, 배암차즈기와 뱀무 모두 72h을 기준으로 실험을 진행하는 것이 좋으며 배암차즈기 용해를 위한 다른 용매의 선택이 필요하다.

\* 48h(492nm)

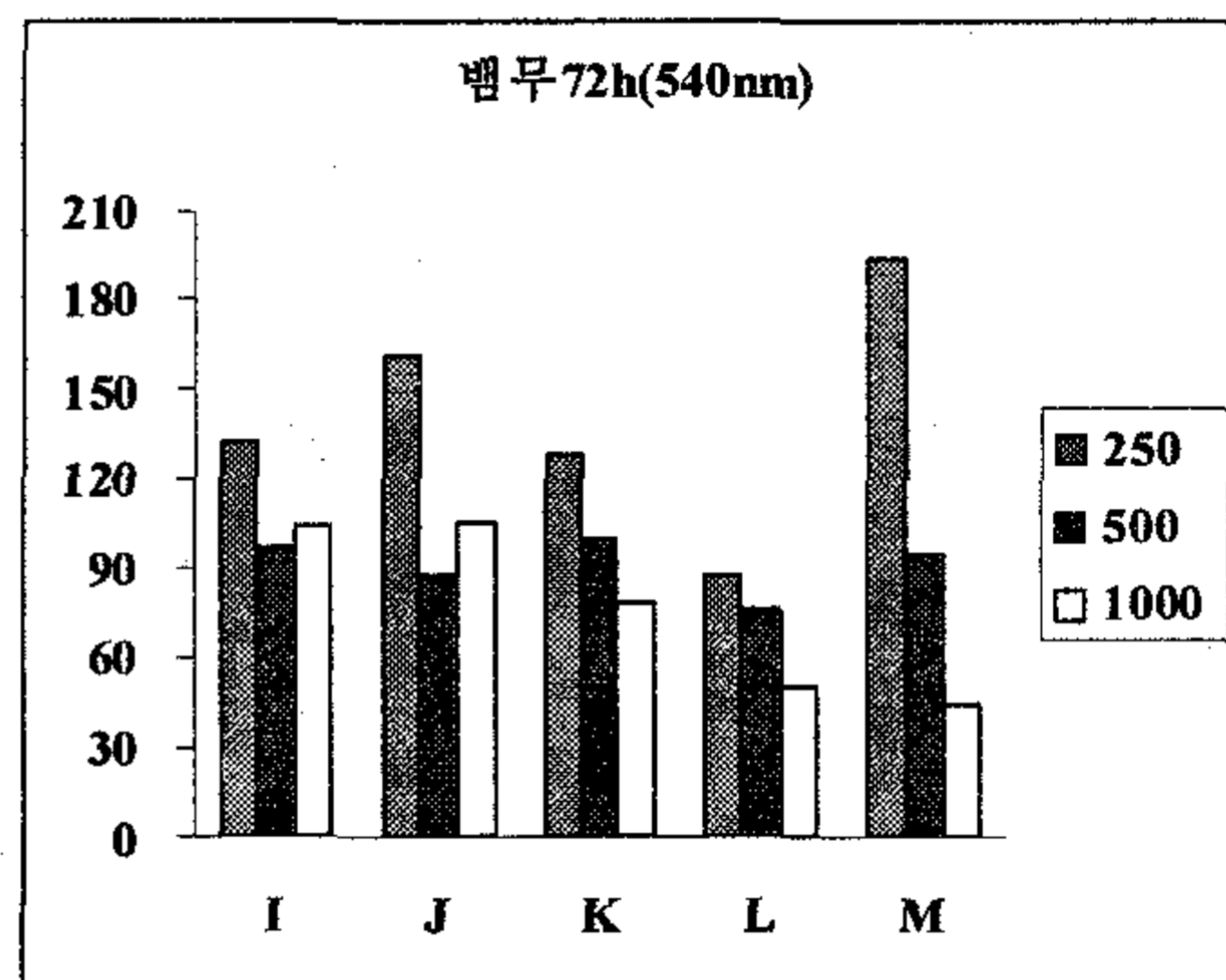
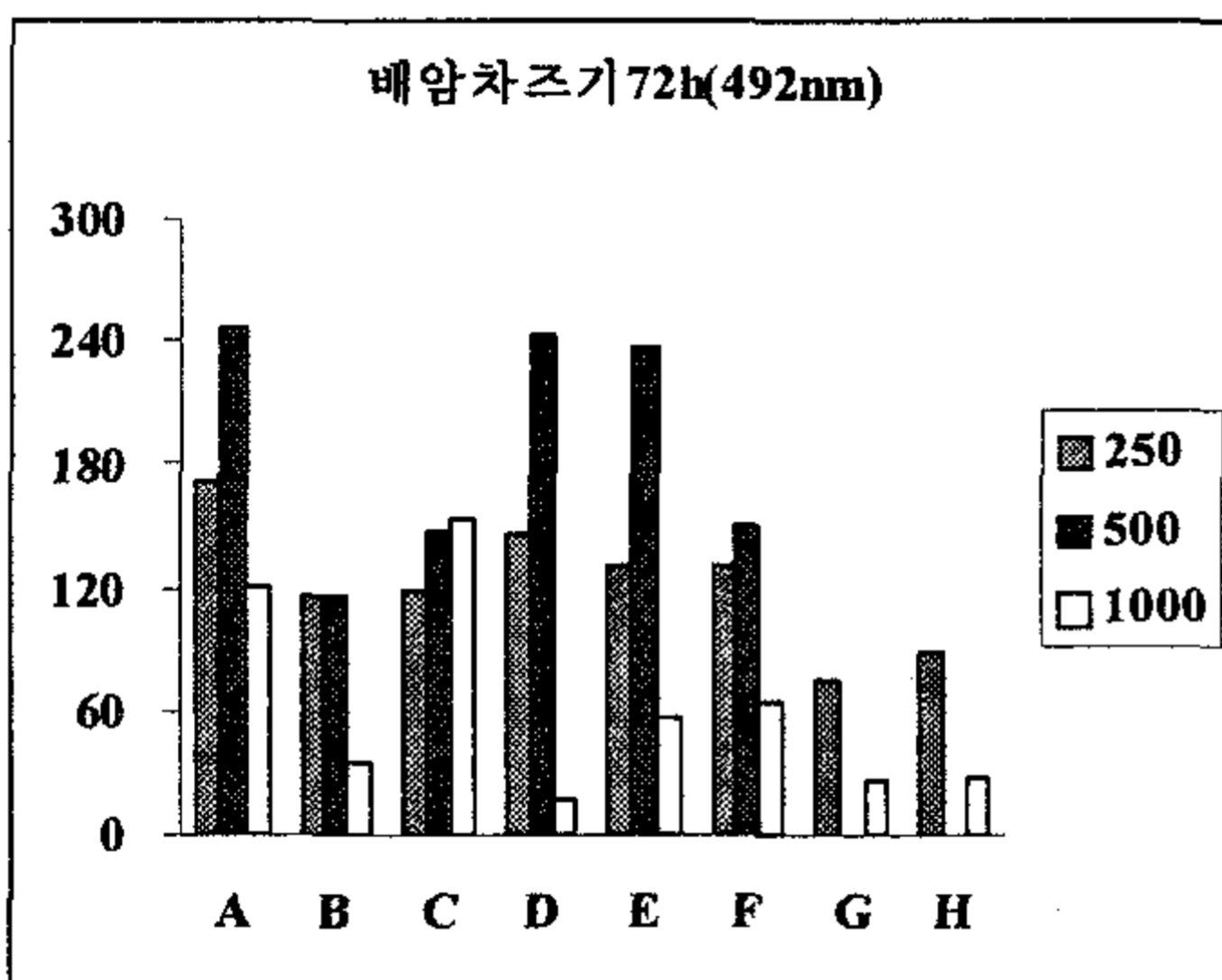




\* 48h(540nm)



\* 72h(492nm)



\* 72h(540nm)

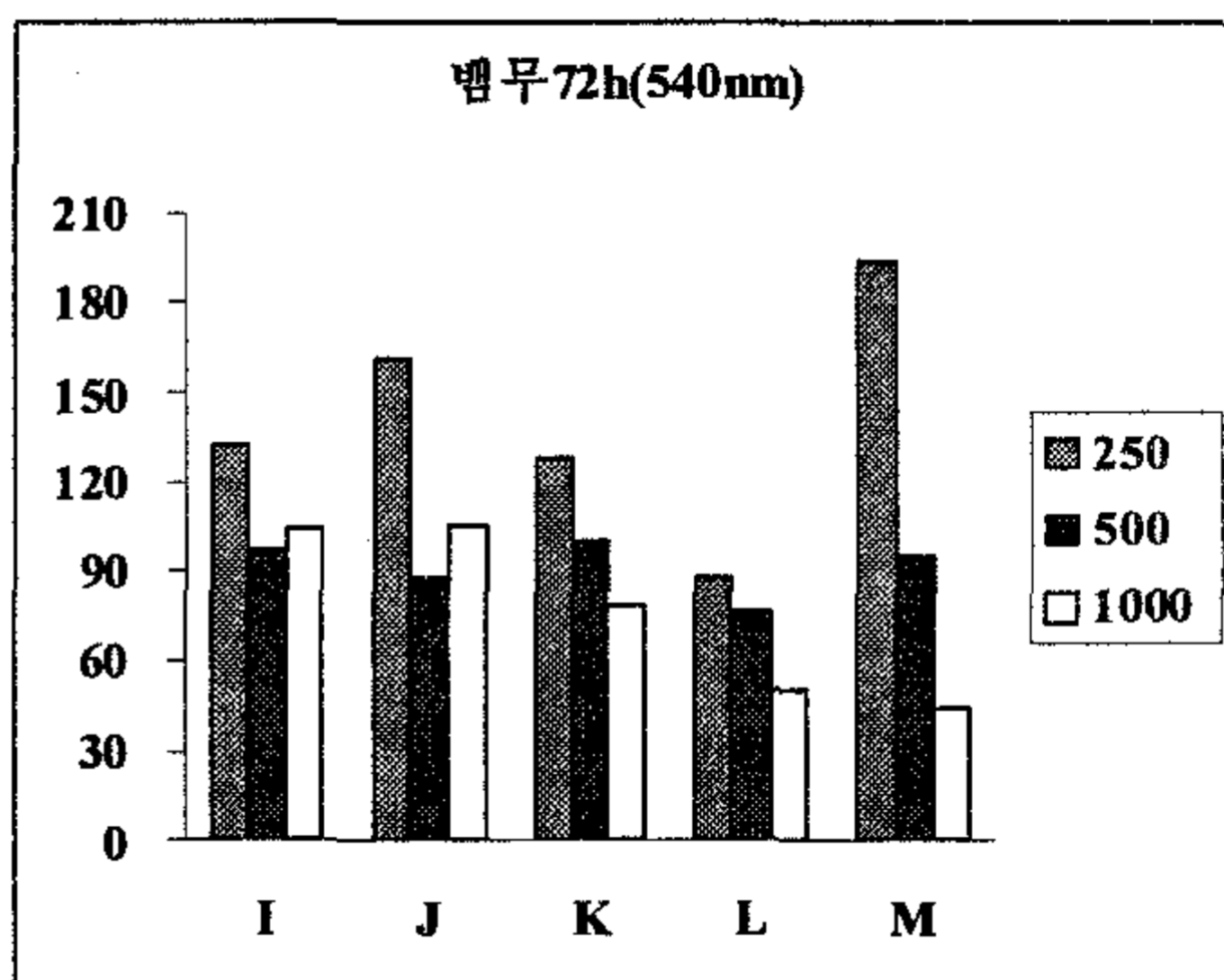
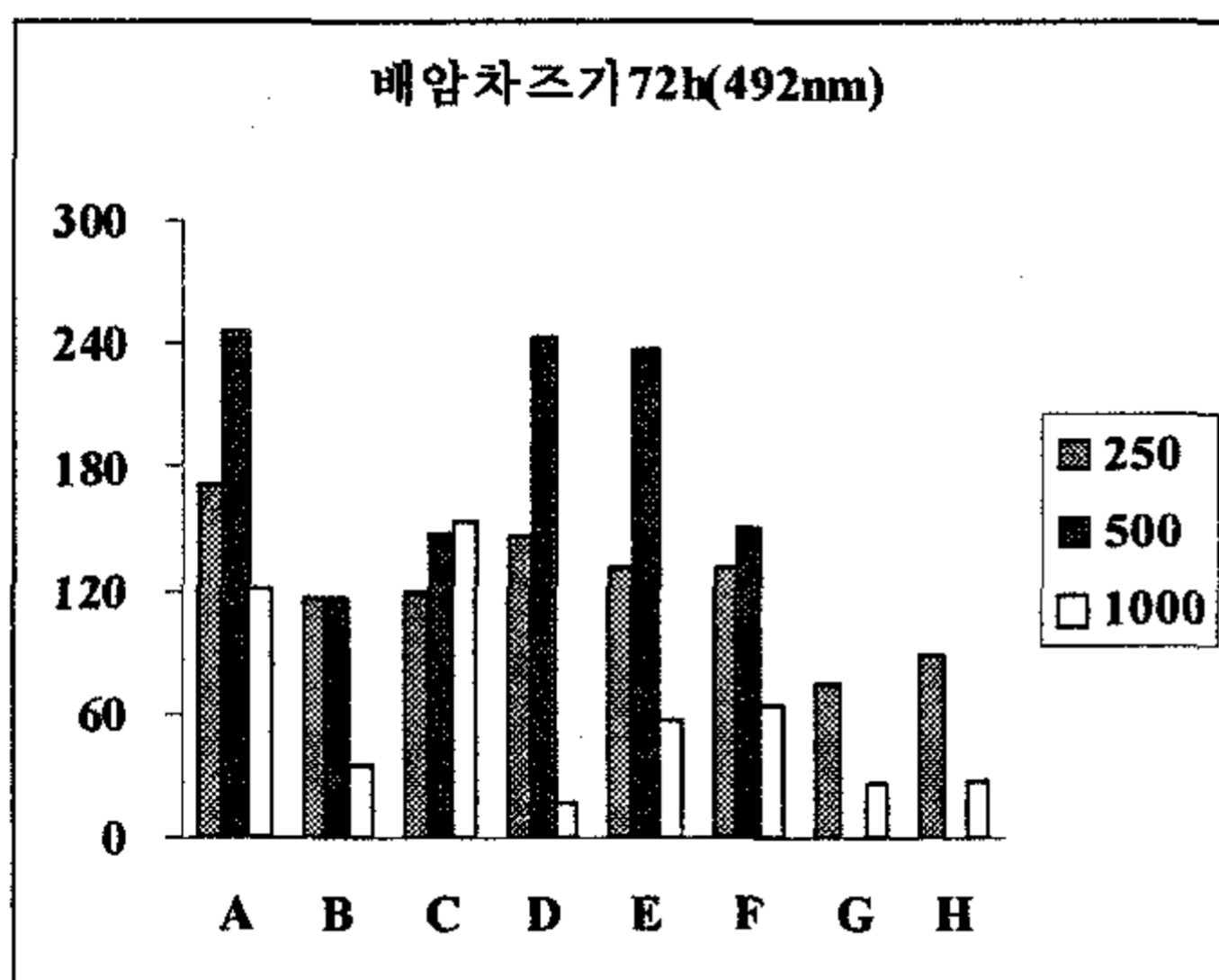


Fig. 33. Cytotoxicity effects of the solvent fractions and methanol extracts derived from *Salvia plebeia* R. Br. and *Geum japonicum* on A549 cell line, with various concentrations, temperature and absorbance through SRB assay. Results are presented as Mean  $\pm$  SEM.

A: SA fr.1, B; SA fr.2, C; SA fr.3, D; SA fr.4, E; SA fr.5, F SA fr.6, G; SA fr.7, H; SA fr.8, I; GE fr.1, J; GE fr.2, K; GE fr.6, L; GE fr.7, M; GE fr.8

### 3) Cox2 promoter assay

Cox2 는 위암과 관련된 유전자로 이 유전자의 활성을 측정함으로써 위암의 억제효과를 알 수 있는 물질을 검색할 수 있다. 본 실험은 Cox2의 promoter 부분을 이용하여 luciferase activity를 측정함으로써 유전자의 expression pattern을 보고자 하였다. 뱀무는 에틸아세테이트 분획의 활성이 높게 나타났으며 배암차즈기는 메탄올 분획과 물층이 활성이 높게 나타났다(Fig. 34).

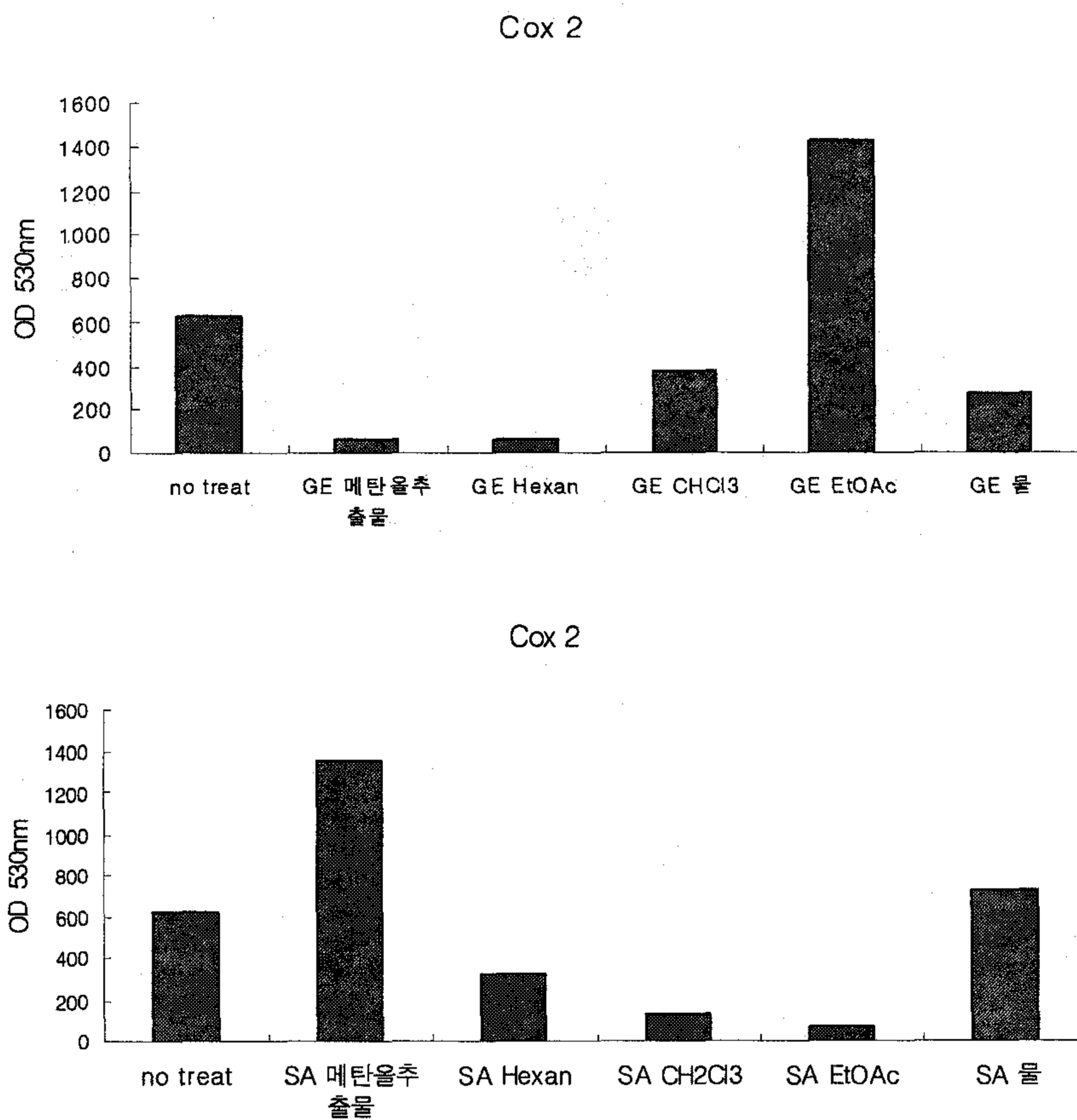


Fig. 34. Cox2 activity of the solvent fractions and methanol extracts derived from *Salvia plebeia* R. Br. and *Geum japonicum* THUNBERG.

## 다. 뱀무와 배암차즈기 분획물의 지방합성 억제효과

### 1) 뱀무 Triglyceride accumulation 저해 효과

뱀무의 MeOH과 H<sub>2</sub>O 분획이 TG(Triglyceride) 축적 저해 효과가 있는 것으로 나타났다. MeOH 추출물은 0.5mg/ml에서 TG의 축적이 최고 약 90%정도까지 억제되는 효능을 나타냈다. EtOAc분획도 0.1mg/ml에서 TG의 축적이 현저하게 저해되었으며 0.5mg/ml 농도에서는 완전히 저해되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 35).

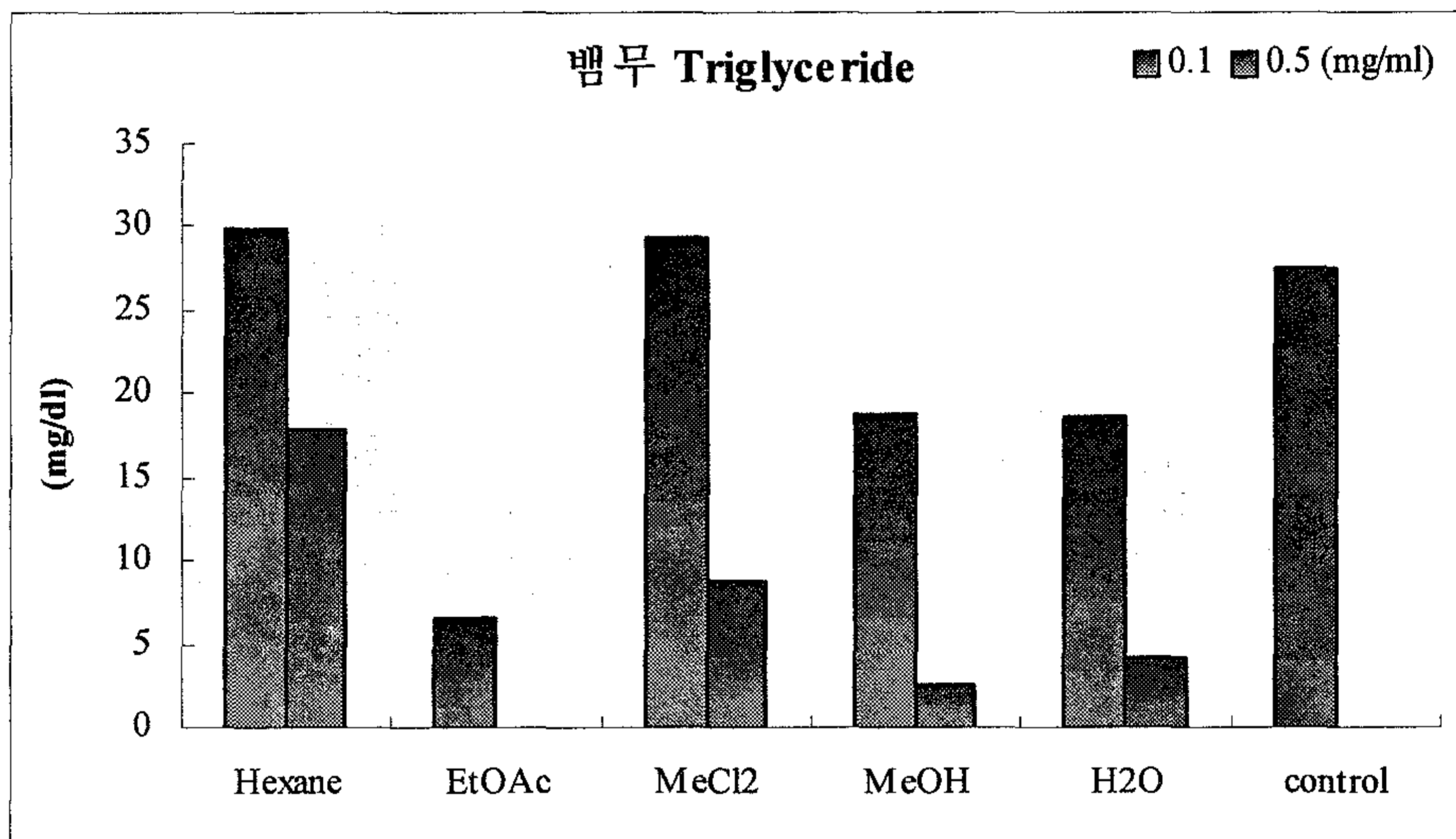


Fig. 35. Triglyceride concentration of the solvent fractions and methanol extracts derived from *Geum japonicum* THUNBERG on 3T3-L1 cell line, with various concentrations.

### 2) 뱀무 GPDH activity 활성

MeOH 추출물과 H<sub>2</sub>O분획이 GPDH activity에 효과가 있는 것으로 나타났다. MeOH 추출물은 0.1mg/ml에서 GPDH activity가 약 46%, 0.5mg/ml에서 GPDH activity가 최고 약 93%, H<sub>2</sub>O층은 0.5mg/ml에서 GPDH activity가 최고 약 85%까지의 효능을 나타냈다. EtOAc 분획 또한 0.1mg/ml에서 GPDH activity가 78%로 저해됐으며, 특히 0.5mg/ml 농도에서는 현저하게 저해되었다(Fig. 36).

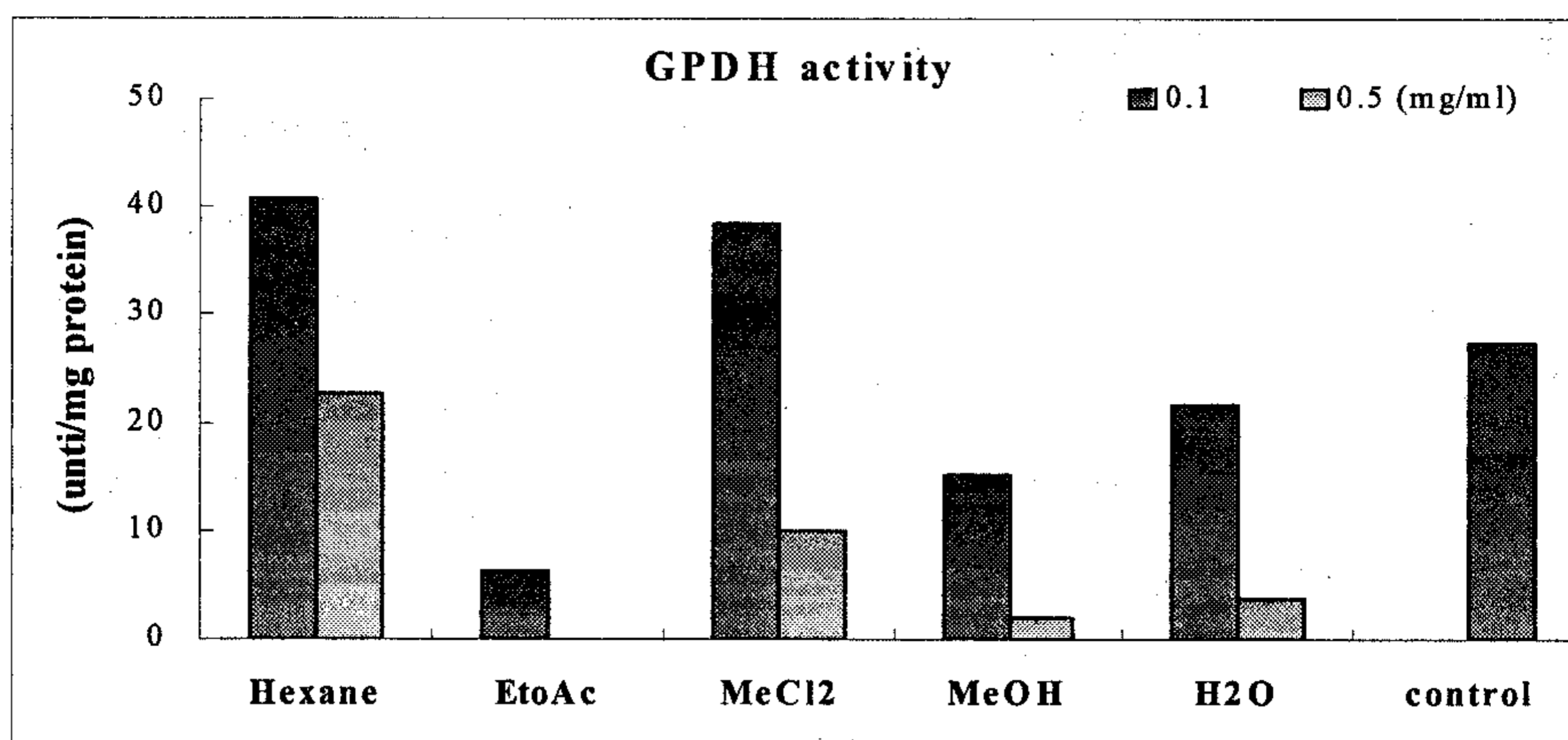


Fig. 36. GPDH activity of the solvent fractions and methanol extracts derived from *Geum japonicum* THUNBERG on 3T3-L1 cell line, with various concentrations.

### 3) 배암차르기 Triglyceride 축적저해 효과

땀무와 비슷한 결과로 MeOH 추출물과 H<sub>2</sub>O 분획이 TG 축적 저해 효과가 있으나, 농도에 따라 큰 차이가 있었다. MeOH 추출물은 0.5mg/ml에서 Triglyceride 축적이 최고 약 82%, H<sub>2</sub>O 분획은 0.5mg/ml에서 Triglyceride 축적이 최고 약 79%까지의 효능을 나타냈다. EtOAc 분획 또한 0.1mg/ml에서 TG의 축적이 60%로 저해되었으며, 0.5mg/ml 농도에서는 현저하게 저해됨을 볼 수 있었다(Fig. 37).

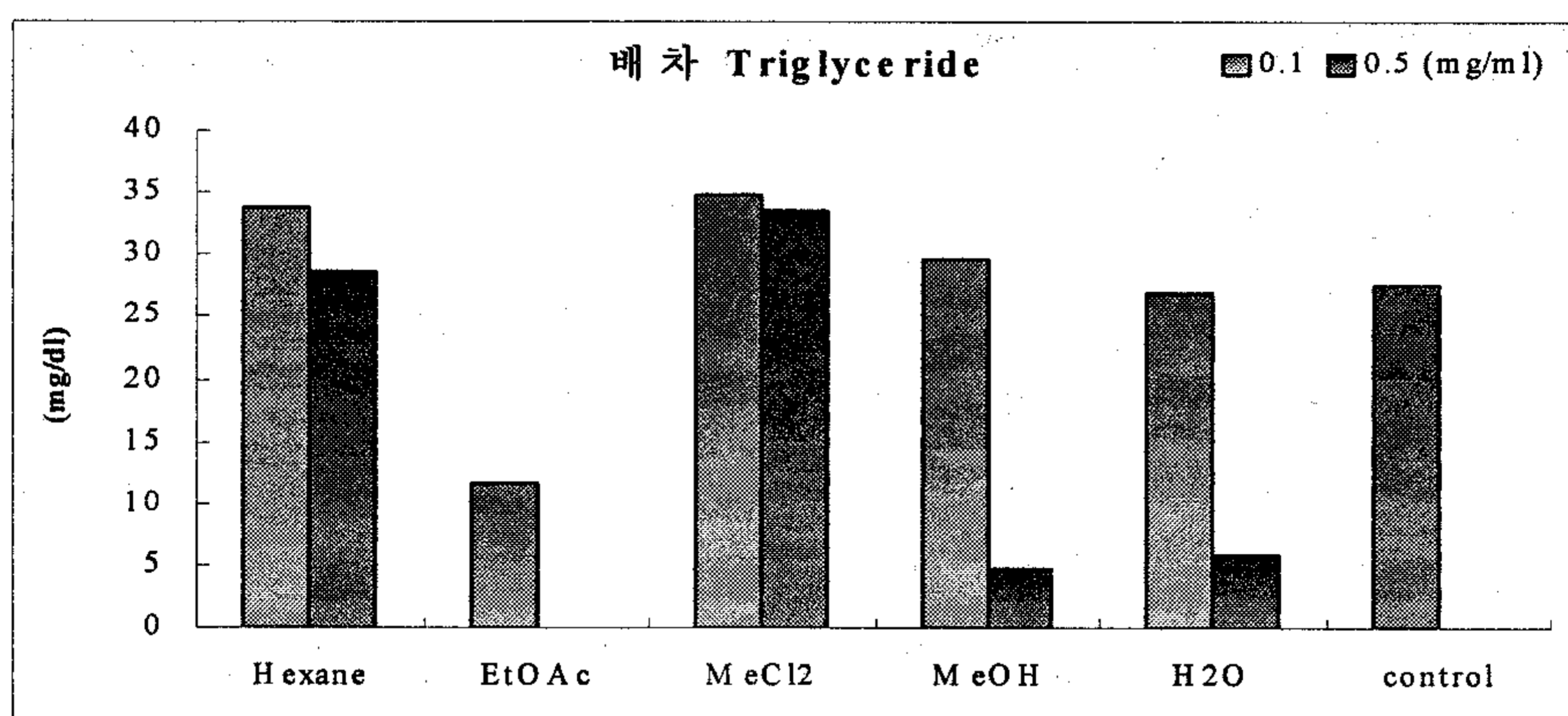


Fig. 37. Triglyceride concentration of the solvent fractions and methanol extracts derived from *Salvia plebeia* R. Br. on 3T3-L1 cell line, with various concentrations.



#### 4) 배암차즈기 GPDH activity

뱀무와 비슷한 결과로 MeOH과 H<sub>2</sub>O층이 GPDH activity에 효과가 있으나, 농도에 따라 큰 차이가 있었다. MeOH 추출물은 0.5mg/ml에서 GPDH activity가 최고 약 82%, H<sub>2</sub>O분획은 0.5mg/ml에서 GPDH activity가 최고 약 82%까지의 효능을 나타냈다. EtOAc층 또한 0.1mg/ml에서 GPDH activity가 61%로 저해되었으며, 0.5mg/ml 농도에서는 현저하게 저해됨을 볼 수 있었다(Fig. 38).

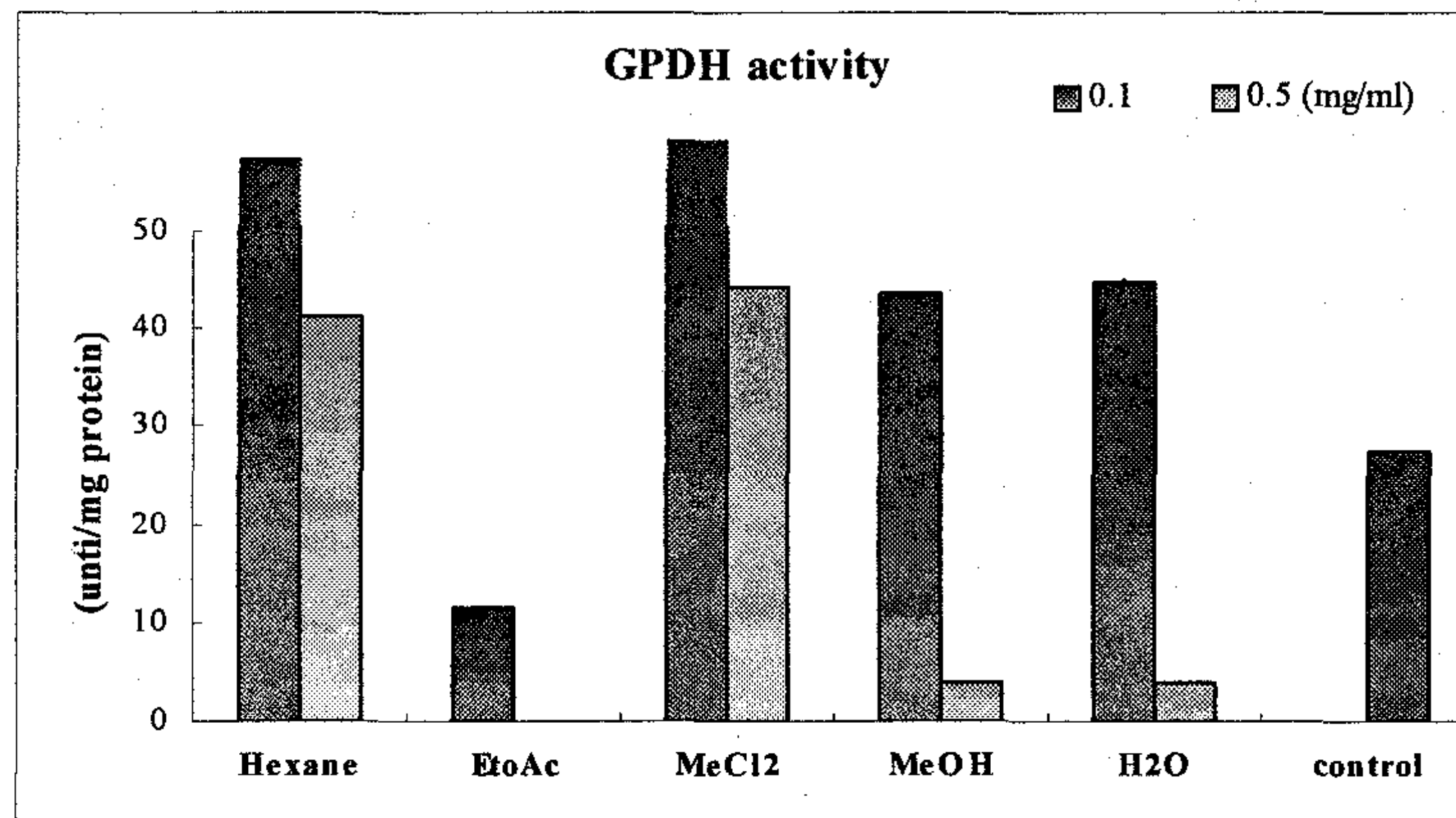


Fig.38. GPDH activity of the solvent fractions and methanol extracts derived from *Salvia plebeia* R. Br. on 3T3-L1 cell line, with various concentrations.

#### 라. 실험동물들을 이용한 뱀무와 배암차즈기 추출물 및 유효성분에 대한 생리활성 검정

##### 1) 식이 섭취, 체중 증가량 및 식이효율

실험동물의 식이 섭취량, 체중 증가량, 식이 효율의 결과는 Table 10과 같다. 식이 섭취량은 각 실험군간에 차이를 보이지 않았고, 체중 증가량과 식이효율은 정상 대조군에 비해 고지방 식이군에서 통계적으로 유의하게 높게 나타났으며 5% SP군은 체중증가의 낮은 경향성은 보였으나 유의적인 결과는 아니고 5% GJ군은 유의하게 낮은 결과를 보였다. 또한 THBA 투여군에서도 유의적인 체중감소의 효과를 보였으나 5% GJ 군과는 식이 효율에서 차이를 보였다. 이는 5% GJ 투여군과 THBA군은 고지방식이에 의한 체중증가를 감소하는 효과를 보였다.

Table 10. Daily food intake, weight gain and food efficiency ratio (FER)<sup>1)</sup>

	Food intake(g/day)	Weight gain (g/day)	FER
Normal	18.05±2.18	5.98±2.82 <sup>c</sup>	0.43±0.36 <sup>b</sup>
High fat	22.03±1.65	10.11±2.32 <sup>a</sup>	0.74±0.05 <sup>a</sup>
High fat + 5% SP	20.17±2.73	9.89±3.56 <sup>ab</sup>	0.77±0.48 <sup>ab</sup>
High fat + 5% GJ	21.11±2.98	7.07±3.78 <sup>b</sup>	0.68±0.33 <sup>ab</sup>
THBA	18.56±3.01	6.85±2.93 <sup>b</sup>	0.50±0.17 <sup>b</sup>

1) Values are Mean±SD

2) Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Duncan's Multiple Range test. Values within a column with different superscript letters are significantly different from each other at  $p < 0.05$  by Duncan's Multiple Range Test.

## 2) 지방 조직의 무게

백무, 배암차즈기 공급에 따른 식이 지방과 부고환지방, 내장 지방, 무게를 비교한 결과는 Table 11과 같으며 각 지방 조직 모두 단위 체중에 대한 조직무게로 환산하여 표시하였다. 부고환 지방 무게는 고지방 식이에 의해 유의적으로 2배 증가를 하였고, 내장지방은 고지방식이에 의하여 유의적으로 3배 증가하는 것을 보였다. 고지방 식이에 의해 정상 대조군보다 증가한 내장 지방 무게는 1% GJ군에서는 유의한 차이는 없었으나 5% GJ군에서 유의적으로 감소함을 볼 수 있었고 이러한 효과는 1% GJ군보다 5% GJ군에서 더 크게 나타났다. 부고환 지방 무게는 정상 대조군 ( $1.75 \pm 0.98 \text{g}/100 \text{g B.W.}$ )보다 고지방 대조군 ( $3.72 \pm 0.71 \text{g}/100 \text{g B.W.}$ )이 컸으며 5% GJ군이 고지방 대조군보다 유의적으로 적었다. 내장지방 무게는 정상 대조군 ( $1.56 \pm 0.97 \text{g}/100 \text{g B.W.}$ )보다 고지방 대조군 ( $4.04 \pm 1.01 \text{g}/100 \text{g B.W.}$ )이 컸으며 5% GJ군 혹은 5% SP 군에서 고지방 대조군보다 유의하게 적었다. THBA 군에서도 부고환지방은 유의적 변화는 아니었으나 감소하였고, 내장지방은 고지방 군보다 유의적인 감소가 있었다.

Table 11. Effect of *Geum japonicum* and *S. plebeia* feeding on adipose tissue mass. (g organ/100g B.W.)

	Epididymal fat	Visceral fat
Normal	1.75±0.98 <sup>b</sup>	1.56±0.97 <sup>c</sup>
High fat	3.72±0.71 <sup>a</sup>	4.04±1.01 <sup>a</sup>
High fat + 5% SP	3.45±0.78 <sup>ab</sup>	3.27±1.03 <sup>b</sup>
High fat + 5% GJ	3.03±0.66 <sup>b</sup>	3.04±0.58 <sup>b</sup>
THBA	3.35±1.01 <sup>ab</sup>	2.99±0.83 <sup>b</sup>

1) Values are Mean±S.D.

2) Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Duncan's Multiple Range test. Values within a column with different superscript letters are significantly different from each other at  $p < 0.05$  by Duncan's Multiple Range Test.

### 3) 지방 세포의 크기

내장 지방 조직에서 지방 세포를 분리하여 크기를 측정하였을 때 뱀무 추출물 투여에 의한 체지방 감소와 비슷한 결과를 나타내어 고지방 식이에 의해 증가한 지방 세포 크기 증가가 뱀무 투여군에서 감소한 것을 볼 수 있었다(Fig. 39). 배암차즈기 투여에 의한 지방세포의 크기는 감소하는 경향성을 보였으나 뱀무보다는 효과가 적었다.

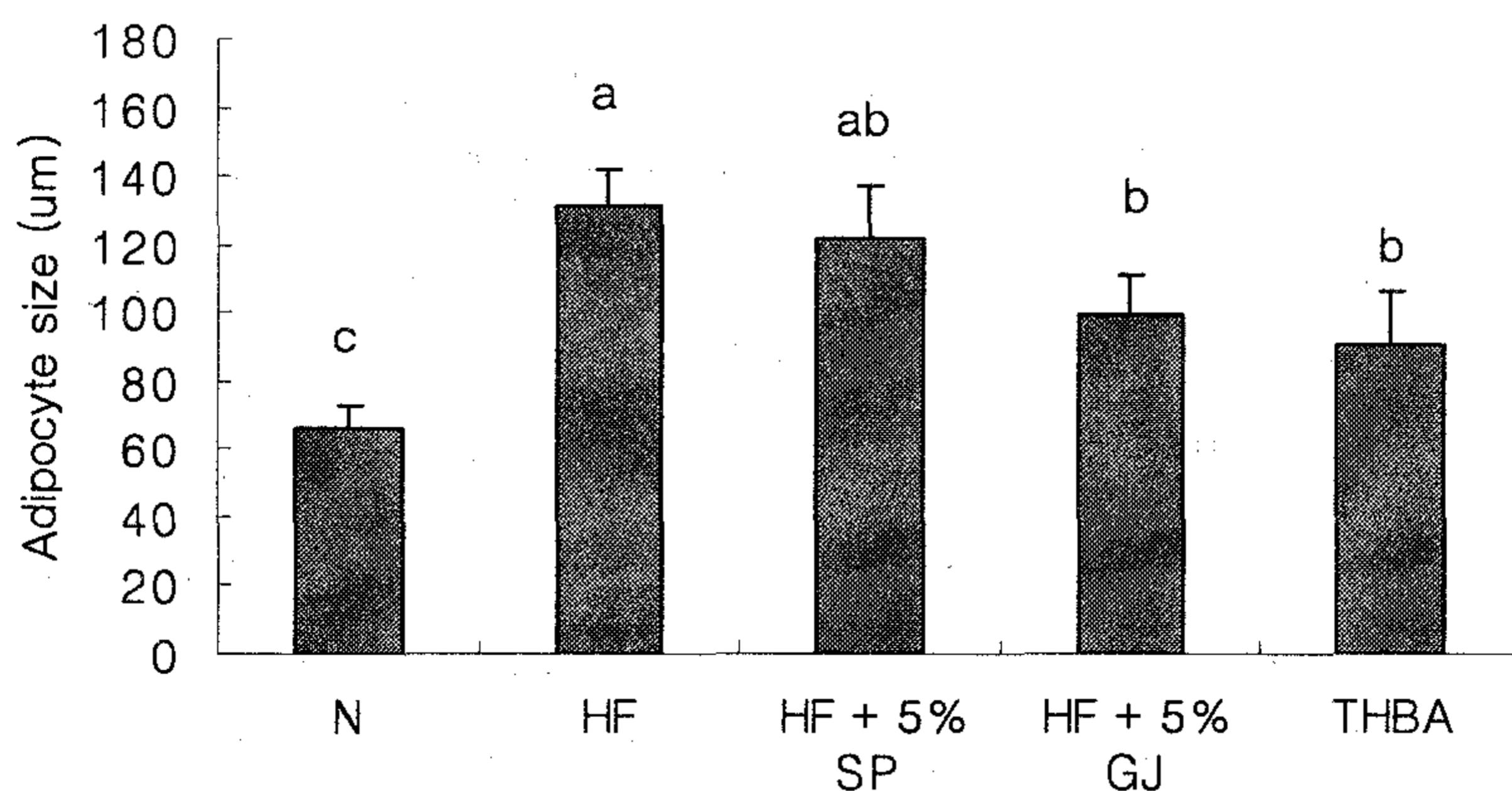


Fig. 39. Effect of dietary *Geum japonicum* and *S. plebeia* on visceral fat isolated adipocyte size. Adipocyte was isolated by collagenase-treatment from visceral fat pad and adipocyte size was determined. Values are mean±SD. Different letters indicate significant difference ( $p < 0.05$ ) between groups by Duncan's Multiple Range Test. N; normal diet group, HF; high fat diet group, HF-5% SP; high fat + 5% *S. plebeia*, HF-5%GJ; high fat + 5%*Geum Japonicum*. THBA: 3,4,5-Trihydroxybenzaldehyde



#### 4) 혈중 지질 함량

혈중 총 콜레스테롤 함량은 실험군간 차이가 없었으나 HDL 콜레스테롤은 고지방 대조군이 정상 대조군보다 낮았고, 뱀무 투여군이 고지방 대조군보다 유의적으로 증가하였다. 혈중 중성지방은 고지방 대조군이  $79.62 \pm 23.12 \text{mg/dl}$  로 정상 대조군의  $50.49 \pm 8.11 \text{mg/dl}$  에 비해 상당히 증가한 반면, 뱀무를 공급한 군에서는 큰 폭으로 감소하여 5% GJ 군은  $44.26 \pm 10.81 \text{mg/dl}$ , THBA 군은  $47.11 \pm 8.37 \text{mg/dl}$  로 고지방 대조군에 비하여 유의적으로 감소함을 보였다. 그러나 배암차즈기 공급 군은 감소 경향성은 보였으나 유의적인 결과는 아니었다. (Table 12).

Table 12. Effect of *Geum japonicum* and *S. plebeia* on serum total cholesterol, HDL cholesterol and triglyceride level

	Total cholesterol (mg/dl)	HDL cholesterol (mg/dl)	Triglyceride (mg/dl)
Normal	$64.33 \pm 9.54$	$38.82 \pm 7.42^a$	$50.49 \pm 8.11^b$
High fat	$67.51 \pm 6.71$	$22.86 \pm 3.90^c$	$79.62 \pm 23.12^a$
High fat + 5% SP	$65.01 \pm 9.38$	$25.35 \pm 9.94^{bc}$	$60.34 \pm 11.78^{ab}$
High fat + 5% GJ	$65.93 \pm 11.67$	$32.59 \pm 10.05^b$	$44.26 \pm 10.81^b$
THBA	$64.22 \pm 9.41$	$30.34 \pm 9.15^b$	$47.11 \pm 8.37^b$

1) Values are Mean $\pm$ SD

2) Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Duncan's Multiple Range test. Values within a column with different superscript letters are significantly different from each other at  $p < 0.05$  by Duncan's Multiple Range Test.

#### 5) 혈중 렙틴 함량

혈중 렙틴 함량은 고지방 대조군에 비해 5% GJ군에서 유의적으로 낮은 값을 보여, 5% GJ 식이에 의해 고지방대조군 ( $3.44 \pm 0.93 \text{ng/ml}$ )의 41% 수준( $1.18 \pm 0.52 \text{ng/ml}$ )으로 감소하였고 거의 정상대조군 수준으로 감소함을 나타냈다. (Fig. 40). THBA 투여 시에도 유의적으로 감소하여 5% GJ군과 차이가 없었으며 배암차즈기 투여 군은 유의적인 차이를 보이지 않았다.



## 6) Adiponectin 발현

실험동물에서 분리한 혈청 중 존재하는 adiponectin의 발현을 western blotting에 의하여 실험한 결과 고지방식이에 의하여 감소하였던 발현이 땀무를 투여한 군에서 증가하는 것을 볼 수 있었다(Fig. 41). 또한 THBA 투여군에서도 증가함을 보였다.

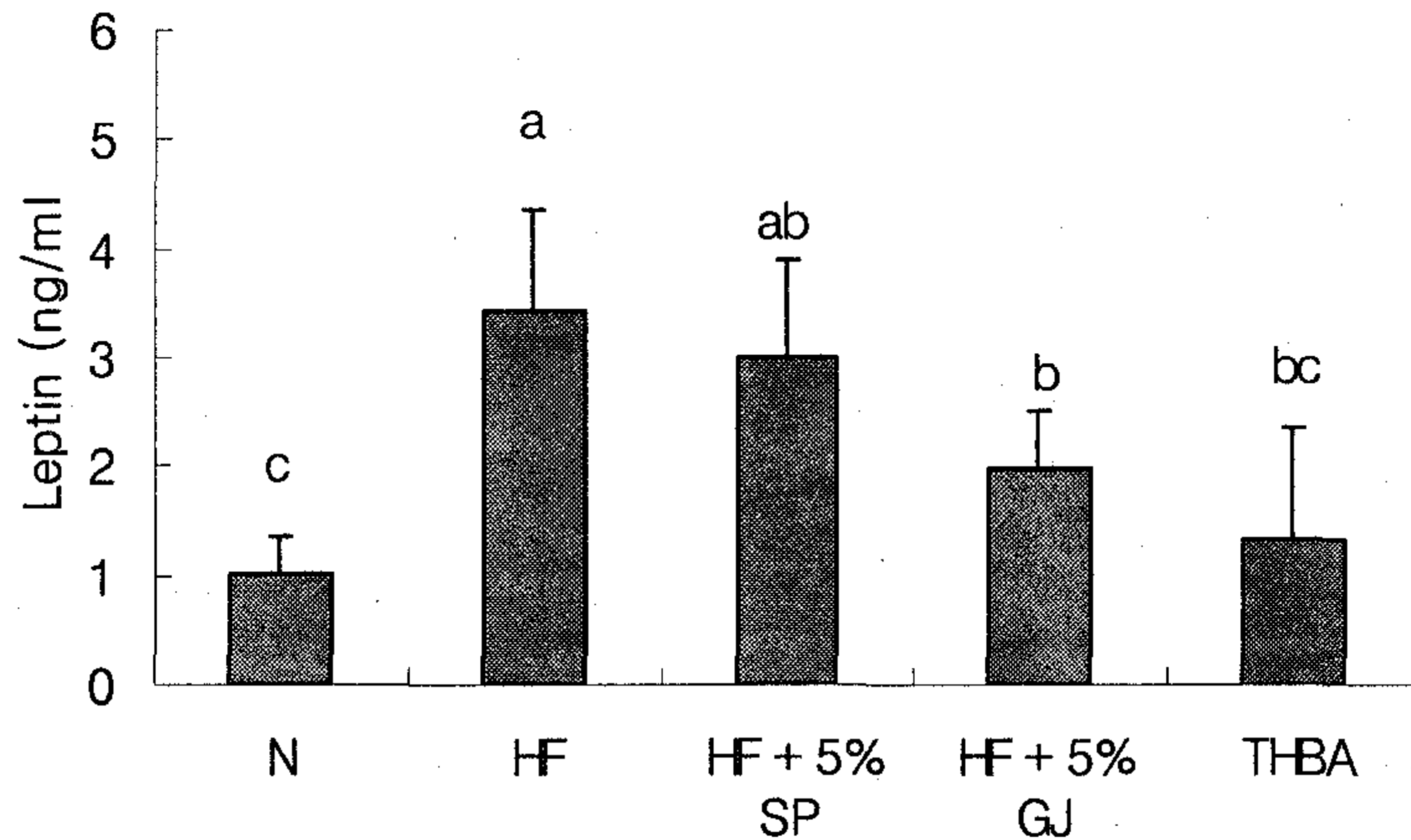


Fig. 40. Effect of *Geum japonicum* ethyl acetate fraction and THBA on serum leptin levels. Values are mean±SD. Different letters indicate significant difference ( $p < 0.05$ ) between groups by Duncan's Multiple Range Test. N; normal diet group, HF; high fat diet group, HF-5% SP; high fat+5% *S. plebeia*, HF-5%GJ; high fat+ 5%*Geum jJaponicum*. THBA: 3,4,5-Trihydroxybenzaldehyde

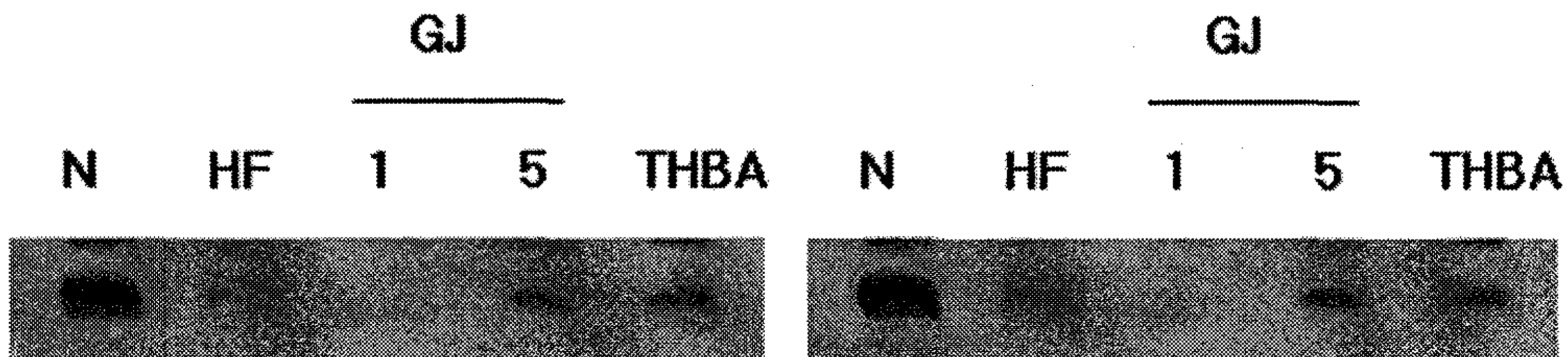


Fig. 41. Adiponectin expression in serum by western blotting. N; normal diet group, HF; high fat diet group, HF-1%GJ; high fat+1% *Geum Japonicum*, HF-5%GJ; high fat+ 5%*Geum japonicum*. THBA: 3,4,5-Trihydroxybenzaldehyde

## 7) UCP mRNA 발현

실험동물에서 분리한 백색 지방 조직의 UCP 발현량을 RT-PCR을 이용하여 측정된 결과는 Fig. 42와 같았다. 부고환지방의 UCP1 mRNA 함량은 뱀무투여에 의하여 증가하는 경향을 보였다.

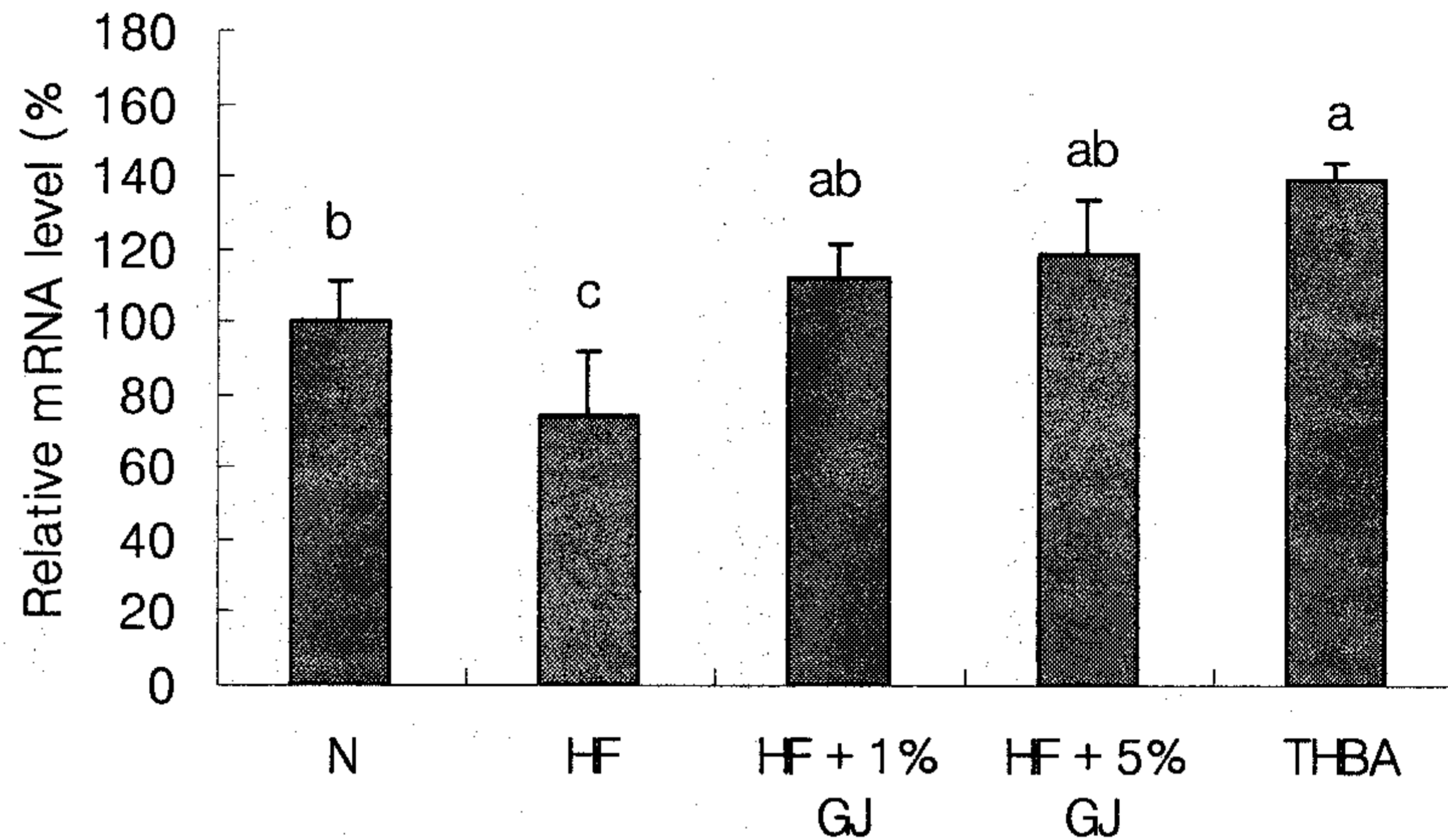


Fig. 42. Changes in UCP mRNA expression in WAT by *Geum japonicum*. Quantitative RT-PCR was used for the mRNA determination. N; normal diet group, HF; high fat diet group, HF-1%GJ; high fat+1% *Geum Japonicum*, HF-5%GJ; high fat+ 5%*Geum japonicum*. THBA: 3,4,5-Trihydroxybenzaldehyde. Levels of mRNA were calculated as a percentage of the values of the normal diet group. Each value is mean±SE. for 9 rats. Different letters indicate significant difference ( $p < 0.05$ ) by Duncan's Multiple Range Test. a,b,c; significance between groups.

### 마. 뱀무에서 분리한 THBA 화합물의 동맥경화 예방 효과

#### 1) 사람 동맥평활근 세포(HASMC)에 대한 독성

뱀무 추출물에서 분리한 THBA(3,4,5-trihydroxybenzaldehyde)의 사람 동맥평활근 세포 (HASMC)에 대한 독성은 키트를 사용하여 HASMC cells ( $5 \times 10^4$ 세포/웰)를 20시간 동안 96-웰 마이크로플레이트로 다양한

THBA 농도(0, 10, 50, 200, 500  $\mu\text{g/ml}$ )에서 측정하였다. 그 결과 세포 독성은 미약하였다(Fig. 43). THBA는 사람 동맥평활근 세포(HASMC)에 대해 500  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 정상세포에 대비하여 65.6%의 세포 사멸 효과가 있어서 독성이 미약하므로 인체에 해가 없을 것으로 보인다.

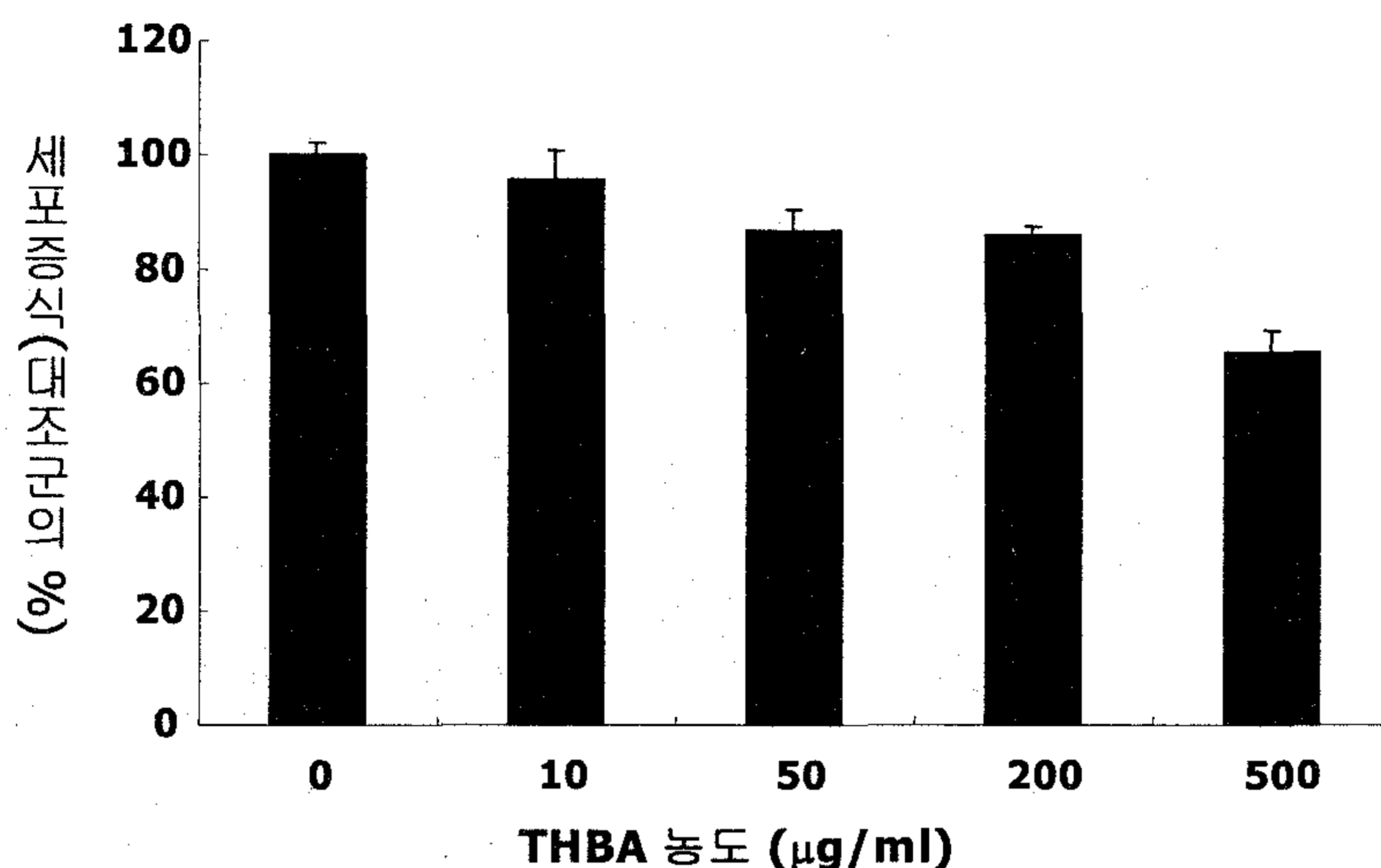


Fig. 43. Inhibition profile of THBA on cell proliferation. HASMC was plated in 96-well plate and the media was changed with serum free DMEM at about 70-80 % confluence, and then THBA were treated as 0, 10, 50, 200 and 500  $\mu\text{g/ml}$  concentrations. The XTT solution was added at 20 hours later. After 24 hours the 490 nm wave length was measured. 500  $\mu\text{g/ml}$  THBA treated HASMC was showed 65.6 % growth ratio comparing to non-treated.

## 2) MMP-9 저해 활성 및 세포의 이주능

TNF- $\alpha$ 를 처리한 HASMC, LPS를 처리한 raw 264.7 세포, MMP-9이 상시 발현되는 Hep3B 세포에서 MMP-9에 대한 THBA의 저해효과를 검정하기 위하여 젤라틴 SDS-PAGE에서 전기영동하였다. MMP-9을 함유한 젤을 THBA 농도별로 처리하여 37°C에서 24시간 항온 배양한 다음 Coomassie Brilliant blue로 염색하여 효소의 저해정도를 검정한 결과 그림 44에서 보는 바와 같이 THBA에 의한 MMP-9 저해활성은 세포 종류별로 차이는 있었지만 50에서 500  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 활성이 거의 소멸되었다.



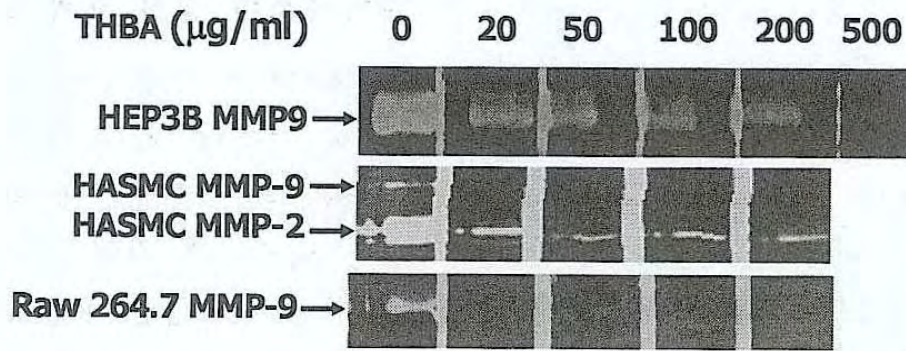


Fig. 44. THBA inhibits MMP-9 activity in gelatin zymography.

We used 24 hours cultured-supernatants from three different cell lines; precisely HASMC stimulated with TNF-, raw 264.7 macrophage cell lines stimulated with 1 g/ml LPS and non-treated Hep3B cell lines in 6-well plate. Each 16 of supernatants in HASMC and raw 264.7 cell cultures and 4 l of supernatant in Hep3B cell culture were used in gelatin SDS-PAGE. Various concentrations of THBA were introduced in incubation buffers for 24 hours and CBB was used to stain gelatin SDS-PAGE.

TNF- $\alpha$ 로 유발된 동맥 평활근 세포의 이주능을 시험한 결과, 그림 45에서 보는 바와 같이 여과지 안으로 침윤한 세포수가 THBA의 첨가에 의해서 농도 의존적으로 크게 감소하였으며 대조로 사용한 에피갈로카테킨(EGCG)과 대등한 효과를 보였다. 이러한 결과는 뱀무 추출물에서 분리한 THBA가 사람 동맥평활근 세포의 침윤-이주능을 효과적으로 억제함을 제시한다.

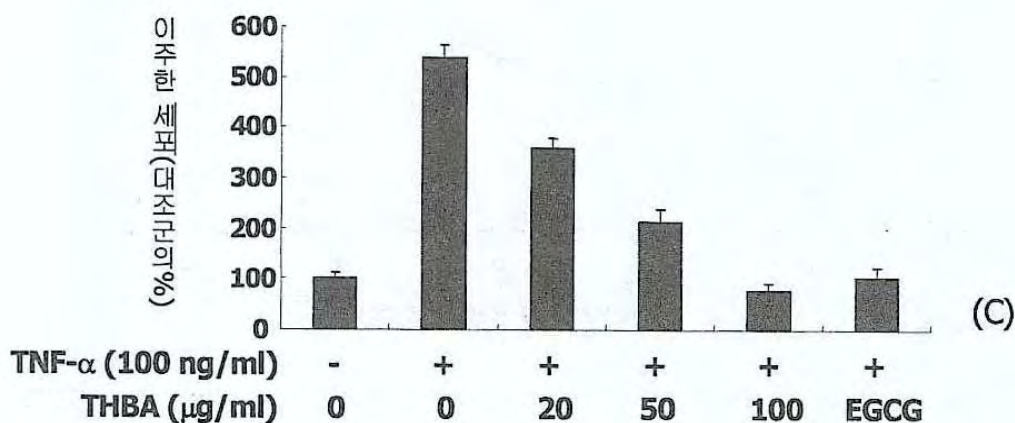


Fig. 45. THBA inhibited MMP-9 expression and HASMC migration.

In matrigel invasion assay, TNF-induced cell migration was suppressed by THBA. 8 m pore of membranes in transwell were coated with matrigel and HASMC with various concentrations of TNF- $\alpha$  and THBA



바. 실험동물을 이용한 뱀무 추출물의 에너지소비 증진 효과 검증

1) 식이 섭취, 체중 증가량 및 식이효율

실험동물의 체중의 변화는 Fig. 46에서, 식이 섭취량, 체중 증가량, 식이 효율의 결과는 Table 13과 같다. 식이 섭취량은 각 실험군간에 차이를 보이지 않았고, 체중 증가량과 식이효율은 정상 대조군에 비해 고지방 식이군에서 통계적으로 유의하게 높게 나타났으며 1% GJ군은 체중증가의 낮은 경향성은 보였으나 유의적인 결과는 아니고 3% GJ 군은 누여 후 2주 후부터 유의하게 감소하여 낮은 결과를 보였고, 5% GJ군은 유의하게 낮은 결과를 보였다. 또한 THBA 투여군에서도 유의적인 체중감소의 효과를 보였으나 5% GJ 군과는 식이효율에서 차이를 보였다. 이는 5% GJ 투여군과 THBA군은 고지방식이에 의한 체중증가를 감소하는 효과를 보였다.

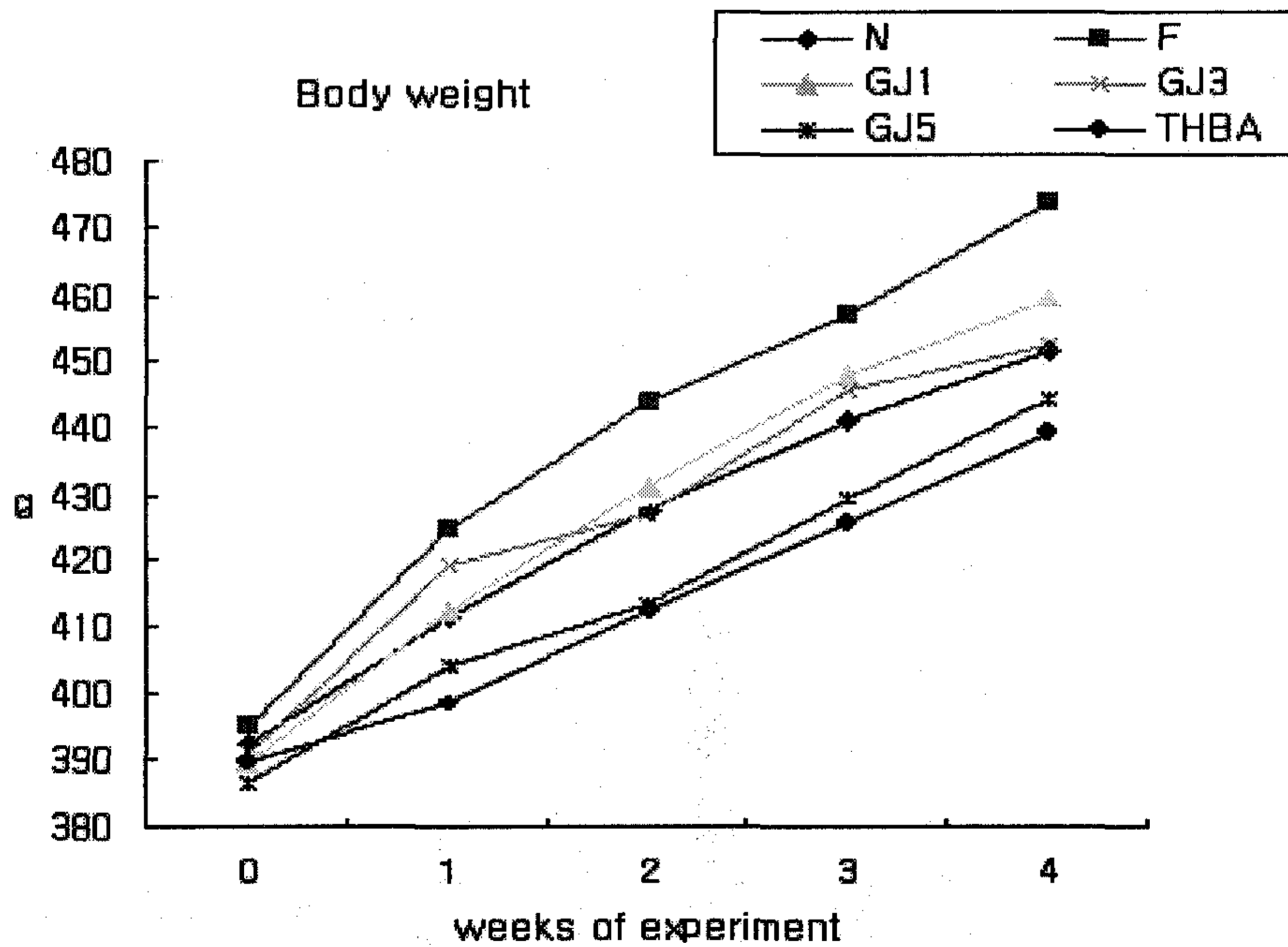


Fig. 46. Changes of body weight after *Geum japonicum* extract and THBA feeding.

Table 13. Daily food intake, weight gain and food efficiency ratio (FER)<sup>1)</sup>

	Food intake(g/day)	Weight gain (g/day)	FER
HF	21.98±2.08	12.34±1.07 <sup>a</sup>	0.59±0.04 <sup>a</sup>
HF + 1% GJ	22.23±2.77	10.67±0.63 <sup>ab</sup>	0.50±0.03 <sup>ab</sup>
HF + 3% GJ	20.81±1.72	9.89±1.23 <sup>ab</sup>	0.51±0.02 <sup>ab</sup>
HF + 5% GJ	21.67±1.69	7.11±0.81 <sup>b</sup>	0.38±0.03 <sup>b</sup>
THBA	21.01±2.85	6.57±0.48 <sup>b</sup>	0.30±0.02 <sup>b</sup>

1) Values are Mean±SD

2) Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Duncan's Multiple Range test. Values within a column with different superscript letters are significantly different from each other at  $p < 0.05$  by Duncan's Multiple Range Test.

## 2) 지방 조직의 무게

식이 지방과 뱀무 공급에 따른 부고환지방, 내장 지방, 무게를 비교한 결과는 Fig. 47과 같으며 각 지방 조직 모두 단위 체중에 대한 조직무게로 환산하여 표시하였다.

갈색지방조직은 고지방 식이에 의하여 유의하게 증가하였고 5% GJ 식이에 의하여 감소하였으나 1 혹은 3%에서는 변화가 없었다. 부고환 지방 무게는 고지방 식이에 의해 유의적으로 1.8배 증가를 하였고, 내장지방은 고지방식이에 의하여 유의적으로 2.9배 증가 증가, 복막지방은 유의적으로 1.7배 증가하는 것을 보였다. 고지방 식이에 의해 정상 대조군보다 증가한 내장 지방 무게는 1% GJ군에서는 유의한 차이는 없었으나 3%와 5% GJ 군에서 유의적으로 감소함을 볼 수 있었고 이러한 효과는 3% GJ군보다 5% GJ군에서 더 크게 나타났다. 부고환 지방 무게는 고지방식이에 의하여 증가하였고 3% GJ군은 유의한 감소가 없었으나, 5% GJ군이 유의적으로 감소하였다. 복막지방 무게는 고지방식이에 의하여 증가한 무게가 3% GJ군과 5% GJ군이 유의하게 감소함을 보였다. THBA 군은 부고환지방, 내장지방, 복막지방의 무게를 유의적으로 감소시켰다.

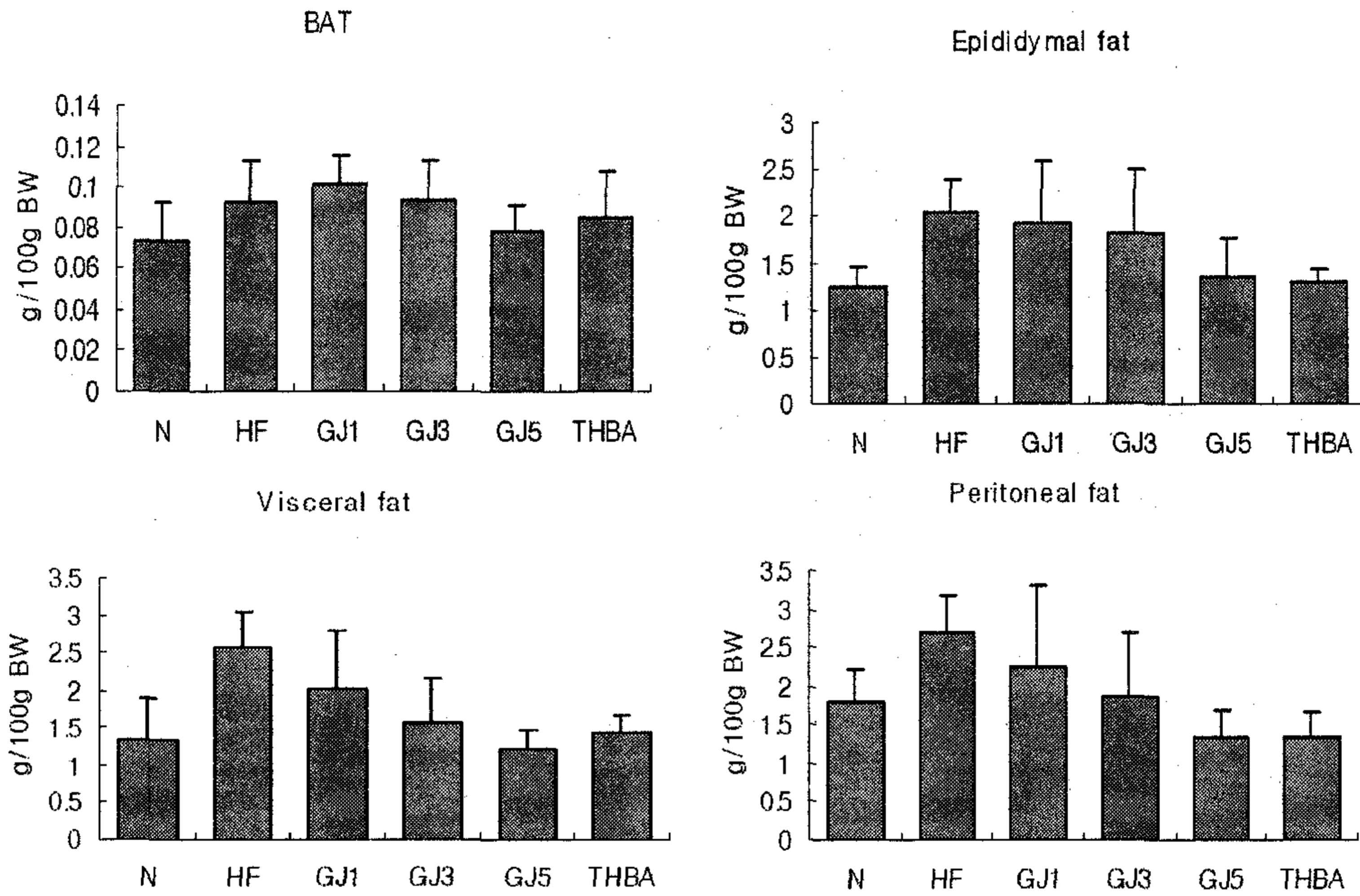


Fig.47. Effect of *Geum japonicum* feeding on adipose tissue mass. (g organ/100g B.W.) Values are mean±SD. Different letters indicate significant difference (p<0.05) between groups by Duncan's Multiple Range Test. N; normal diet group, HF; high fat diet group, HF-1% GJ; high fat + 1% *Geum Japonicum*, HF-5%GJ; high fat + 3% *Geum Japonicum*, HF-3%GJ; high fat + 5%*Geum Japonicum*. THBA: 3,4,5-Trihydroxybenzaldehyde

### 3) 지방 세포의 크기

내장 지방 조직에서 지방 세포를 분리하여 크기를 측정하였을 때 뱀 무투여에 의한 체지방 감소와 비슷한 결과를 나타내어 고지방 식이에 의해 증가한 지방 세포 크기 증가가 뱀무 투여군에서 감소한 것을 볼 수 있었다 (Fig. 48).

### 4) 혈중 지질 함량

혈중 총 콜레스테롤 함량은 실험군간 차이가 없었으나 HDL 콜레스테롤은 고지방 대조군이 정상 대조군보다 낮았고, 뱀무 투여군이 고지방 대조군 보다 유의적으로 증가하였다. 혈중 중성지방은 고지방 대조군이 99.42±18.09mg/dl 로 정상 대조군의 50.49±8.11mg/dl 에 비해 상당히 증가



한 반면, 뱀무를 공급한 군에서는 큰 폭으로 감소하여 5% GJ 군은  $54.20 \pm 11.14 \text{ mg/dl}$ , THBA 군은  $50.22 \pm 7.97 \text{ mg/dl}$  로 고지방 대조군에 비하여 유의적으로 감소함을 보였다. (Table 14).

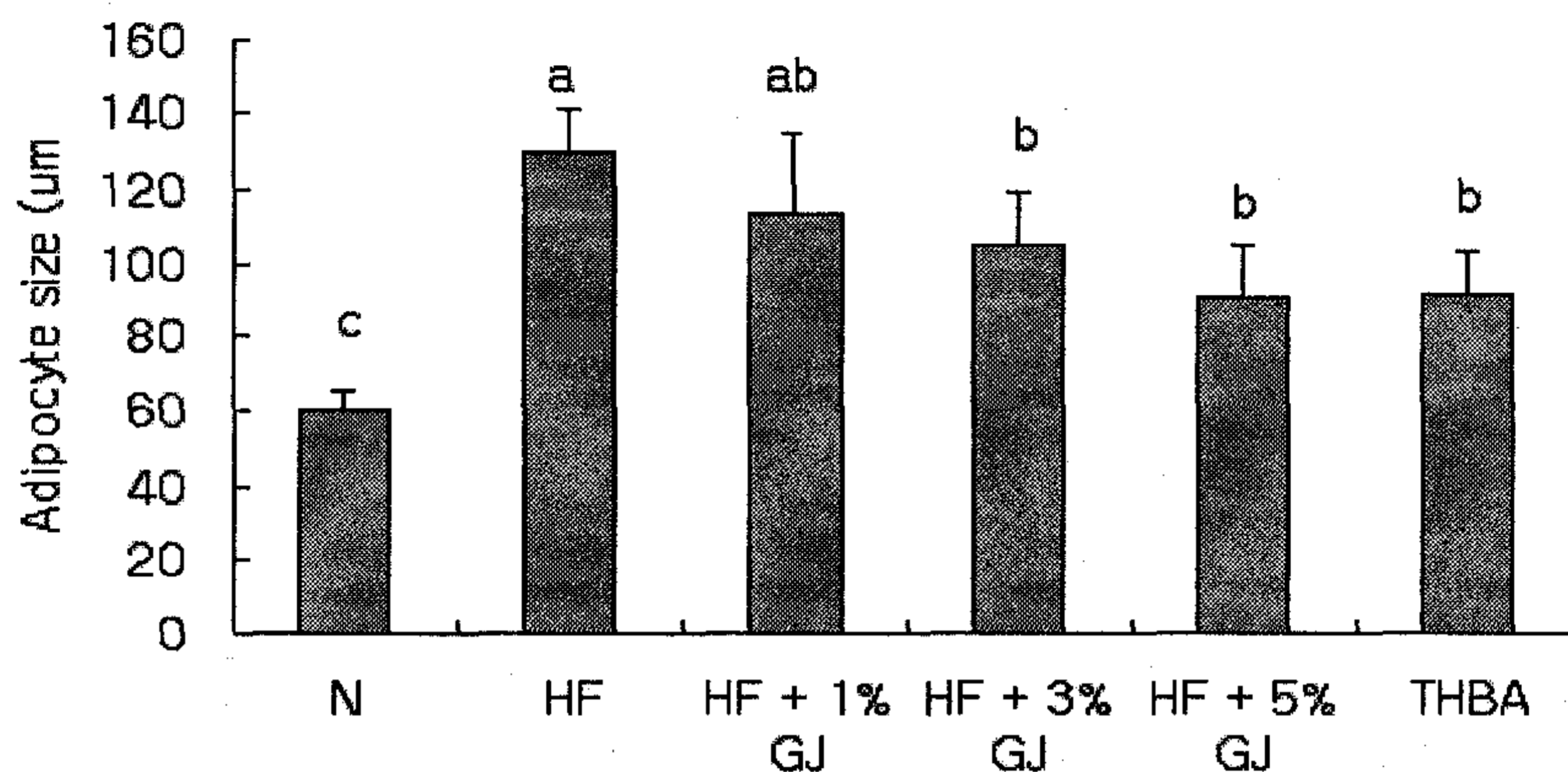


Fig. 48. Effect of dietary *Geum japonicum* on visceral fat isolated adipocyte size. Adipocyte was isolated by collagenase-treatment from visceral fat pad and adipocyte size was determined. Values are mean $\pm$ SD. Different letters indicate significant difference ( $p < 0.05$ ) between groups by Duncan's Multiple Range Test. N; normal diet group, HF; high fat diet group, HF-1% GJ; high fat + 1% *Geum Japonicum*, HF-5%GJ; high fat + 3% *Geum Japonicum*, HF-3%GJ; high fat + 5%*Geum Japonicum*. THBA: 3,4,5-Trihydroxybenzaldehyde

Table 14. Effect of *Geum japonicum* on serum total cholesterol, HDL cholesterol and triglyceride level

	Total cholesterol (mg/dl)	HDL cholesterol (mg/dl)	Triglyceride (mg/dl)
HF	$76.85 \pm 5.17$	$24.86 \pm 3.90^b$	$99.42 \pm 18.09^a$
HF + 1% GJ	$72.23 \pm 7.25$	$27.50 \pm 8.94^{ab}$	$88.84 \pm 10.21^{ab}$
HF + 3% GJ	$73.44 \pm 10.50$	$29.59 \pm 5.0^{ab}$	$72.51 \pm 9.35^b$
HF + 5% GJ	$68.15 \pm 9.16$	$34.59 \pm 4.05^a$	$54.20 \pm 11.14^c$
THBA	$68.14 \pm 9.42$	$35.34 \pm 5.15^a$	$50.22 \pm 7.97^c$

1) Values are Mean $\pm$ SD

2) Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Duncan's Multiple Range test. Values within a column with different superscript letters are significantly different from each other at  $p < 0.05$  by Duncan's Multiple Range Test.



### 5) 혈중 렙틴 함량

혈중 렙틴 함량은 고지방 대조군에 비해 3% 와 5% GJ군에서 유의적으로 낮은 값을 보여, 3% 혹은 5% GJ 식이에 의해 고지방대조군 51% 수준으로 감소하였고 THBA 군에서도 유의적으로 감소하여 3%, 5% GJ 군과 유의적 차이가 없이 비슷한 효과를 보였다. (Fig. 49).

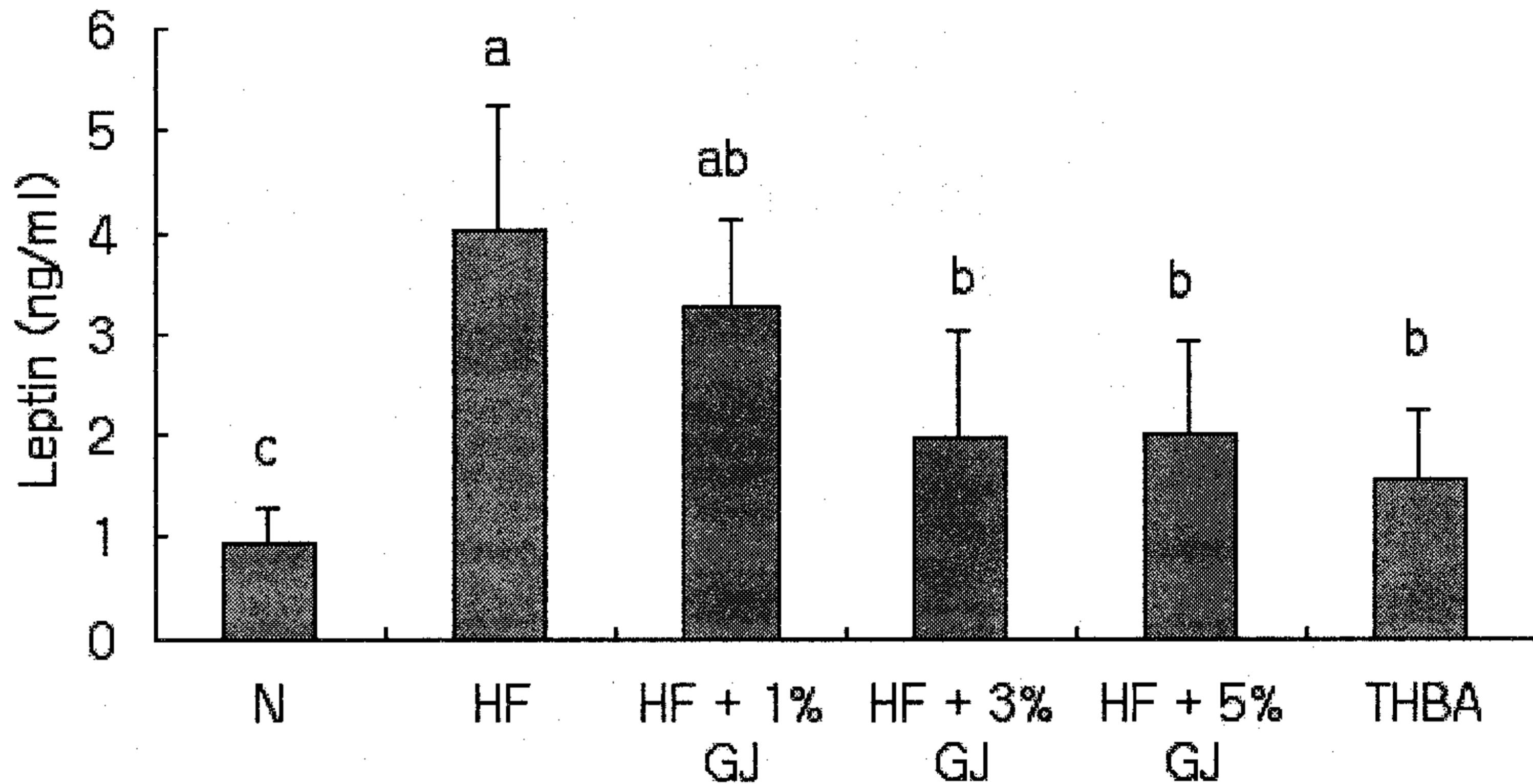


Fig. 49. Effect of *Geum japonicum* on serum leptin levels.

Values are mean±SD. Different letters indicate significant difference ( $p < 0.05$ ) between groups by Duncan's Multiple Range Test. N; normal diet group, HF; high fat diet group, HF-1%GJ; high fat+1% *Geum Japonicum*, HF-1%GJ; high fat+1% *Geum Japonicum*, HF-5%GJ; high fat+ 5%*Geum Japonicum*. THBA: 3,4,5-Trihydroxybenzaldehyde

### 6) Adiponectin 발현

실험동물에서 분리한 혈청 중 존재하는 adiponectin의 발현을 western blotting에 의하여 실험한 결과 고지방식이에 의하여 감소하였던 발현이 뱀무를 투여한 군에서 증가하는 것을 볼 수 있었다(Fig. 50). 또한 THBA 투여군에서도 증가함을 보였다.

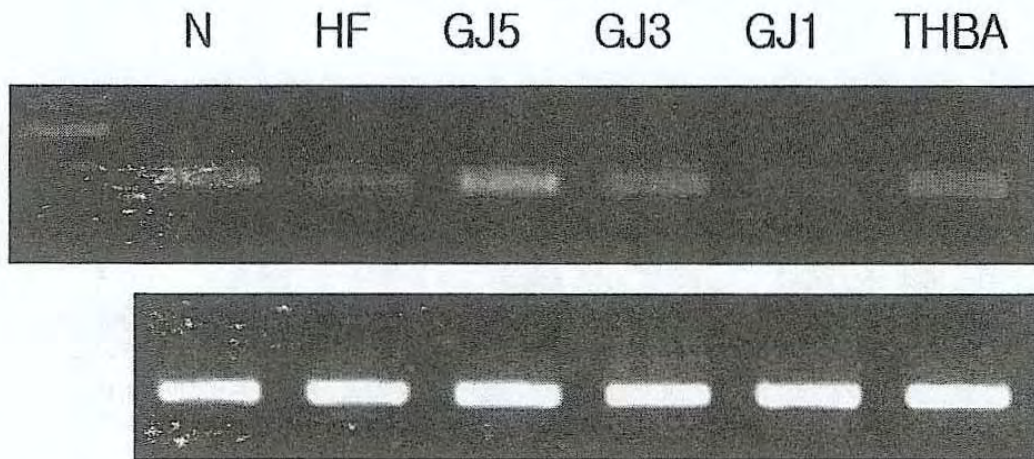


Fig. 50. Adiponectin expression in serum by western blotting. N; normal diet group, HF; high fat diet group, HF-1%GJ; high fat+1% *Geum japonicum*, HF-3% GJ; high fat+ 3%*Geum Japonicum*., HF-5%GJ; high fat+ 5%*Geum Japonicum*. THBA: 3,4,5-Trihydroxybenzaldehyde

### 7) UCP mRNA 발현

에너지 소비 단백질의 발현을 보기 위하여 실험동물에서 분리한 백색 지방 조직의 UCP 발현량을 RT-PCR을 이용하여 측정한 결과는 Fig. 51 과 같다. 내장지방의 UCP1 mRNA 함량은 뱀무 투여에 의하여 증가하는 경향을 보였다.

### 8) NPY 발현

렙틴은 지방세포에 의해 생성되는 단백질로 식욕을 억제하고 에너지 소 모를 증가시키는 역할을 하는 반면 뇌 에서 분비되는 신경펩타이드 Y(Neuropeptide Y : NPY)는 식욕을 자극하는 화학물질이다. 실험동물에 서 분리한 뇌 절편을 hybridization 하여 염색을 한 후 식욕 자극신호의 역 할을 하는 NPY의 발현(Fig. 52)을 보았을 때 고지방 식이에 의하여 식욕 을 촉진하는 인자의 발현이 증가하였다가 GJ의 1%에서는 감소하는 경향 성을 보이다가 3%와 5%에서는 유의하게 감소하는 것을 볼 수 있었고 THBA 투여군에서는 정상수준까지 감소하는 것을 볼 수 있었다.



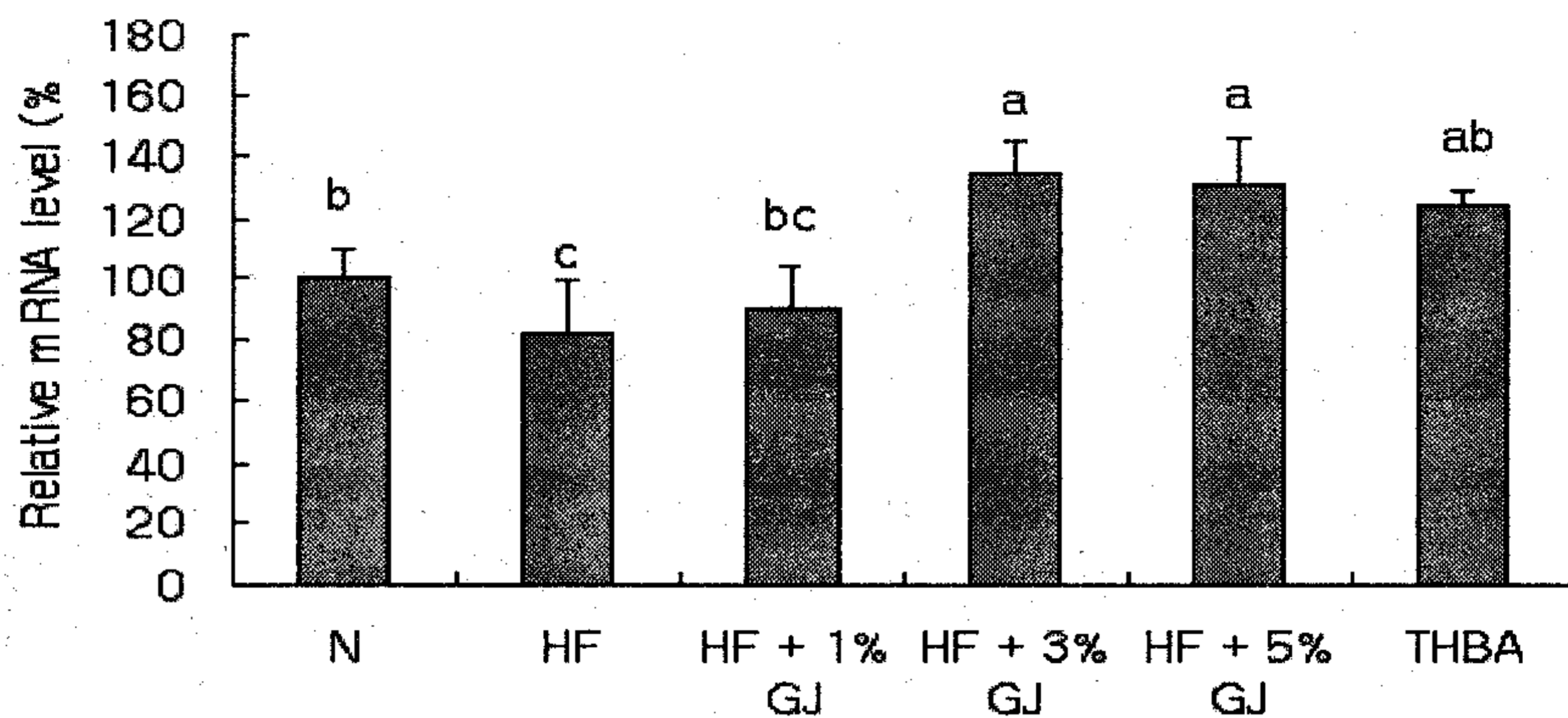


Fig. 51. Changes in UCP mRNA expression in WAT by *Geum japonicum*. Quantitative RT-PCR was used for the mRNA determination. N; normal diet group, HF; high fat diet group, HF-1%GJ; high fat+1% *Geum Japonicum*, HF-1%GJ; high fat+1% *Geum Japonicum*, HF-5%GJ; high fat+ 5%*Geum Japonicum*. THBA: 3,4,5-Trihydroxybenzaldehyde. Levels of mRNA were calculated as a percentage of the values of the normal diet group. Each value is mean±SE. for 9 rats. Different letters indicate significant difference ( $p < 0.05$ ) by Duncan's Multiple Range Test. a,b,c; significance between groups.

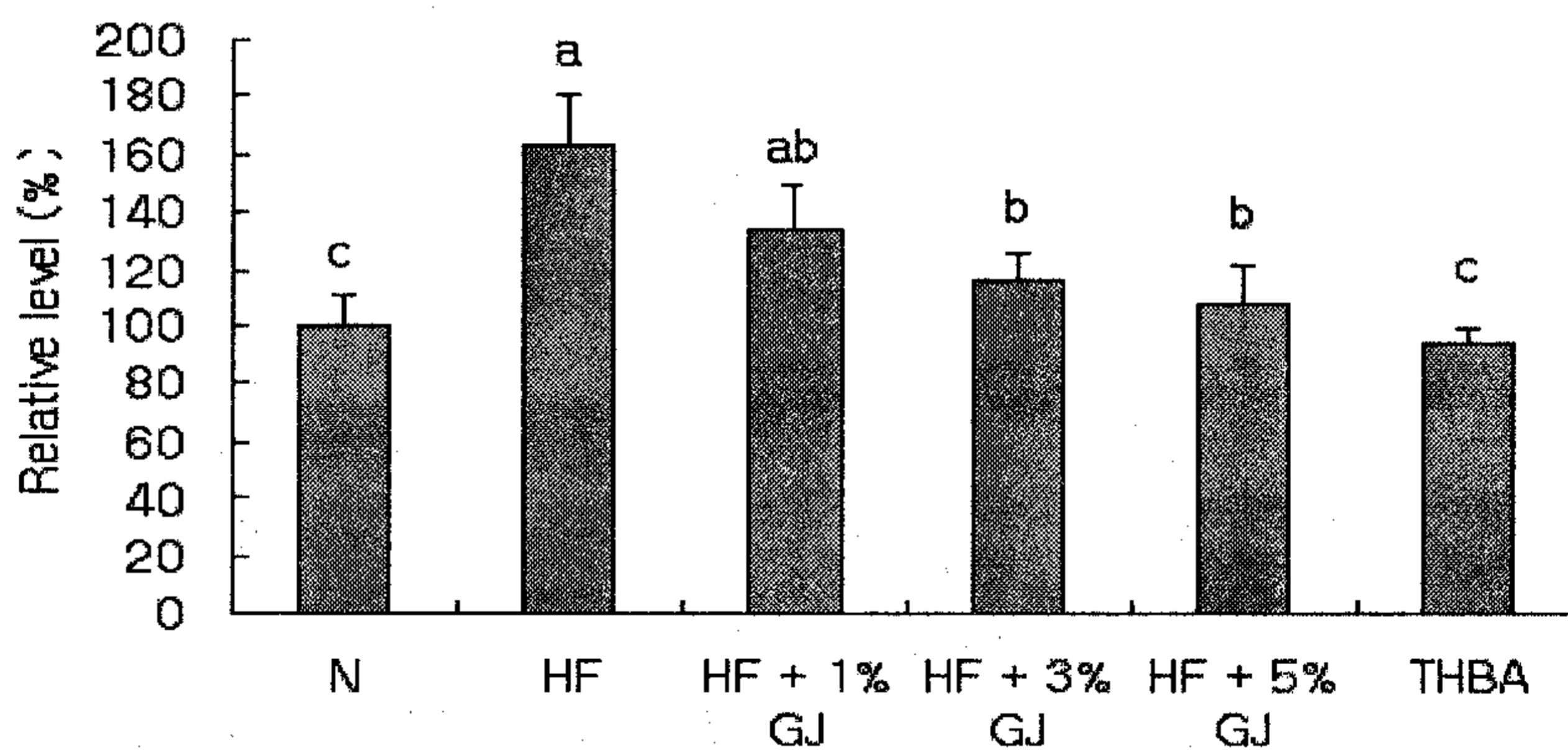


Fig. 52. Changes in NPY expression in brain by *Geum japonicum*. N; normal diet group, HF; high fat diet group, HF-1%GJ; high fat+1% *Geum japonicum*, HF-3%GJ; high fat+3% *Geum Japonicum*, HF-5%GJ; high fat+ 5%*Geum Japonicum*. THBA: 3,4,5-Trihydroxybenzaldehyde. Each value is mean±SE. for 9 rats. Different letters indicate significant difference ( $p < 0.05$ ) by Duncan's Multiple Range Test. a,b,c; significance between groups.

### 3. 기능성 식품 소재화를 위한 응용기술 연구

#### 가. 뱀무 생리활성 물질의 최적 추출방법

##### 1) 메탄올 농도별 추출과 sonication에 의한 추출 효과

메탄올 농도별, 추출횟수 및 sonication에 의한 뱀무의 주 생리활성 물질인 THBA를 지표물질로 하여 회수율을 비교한 결과 그림 53에서 보는 바와 같이 먼저 sonication 한후 메탄올로 3회 추출한 것이 THBA의 추출 효율이 비교적 높았으며 메탄올의 농도별로는 80%에서 추출 효율이 가장 높았다. 페놀 화합물은 추출 방법 간에는 차이가 경미하였으며 메탄올 농도도 60%에서 가장 낮았으며 70% 이상에서는 농도간 추출 효율에 큰 차이가 없었다.

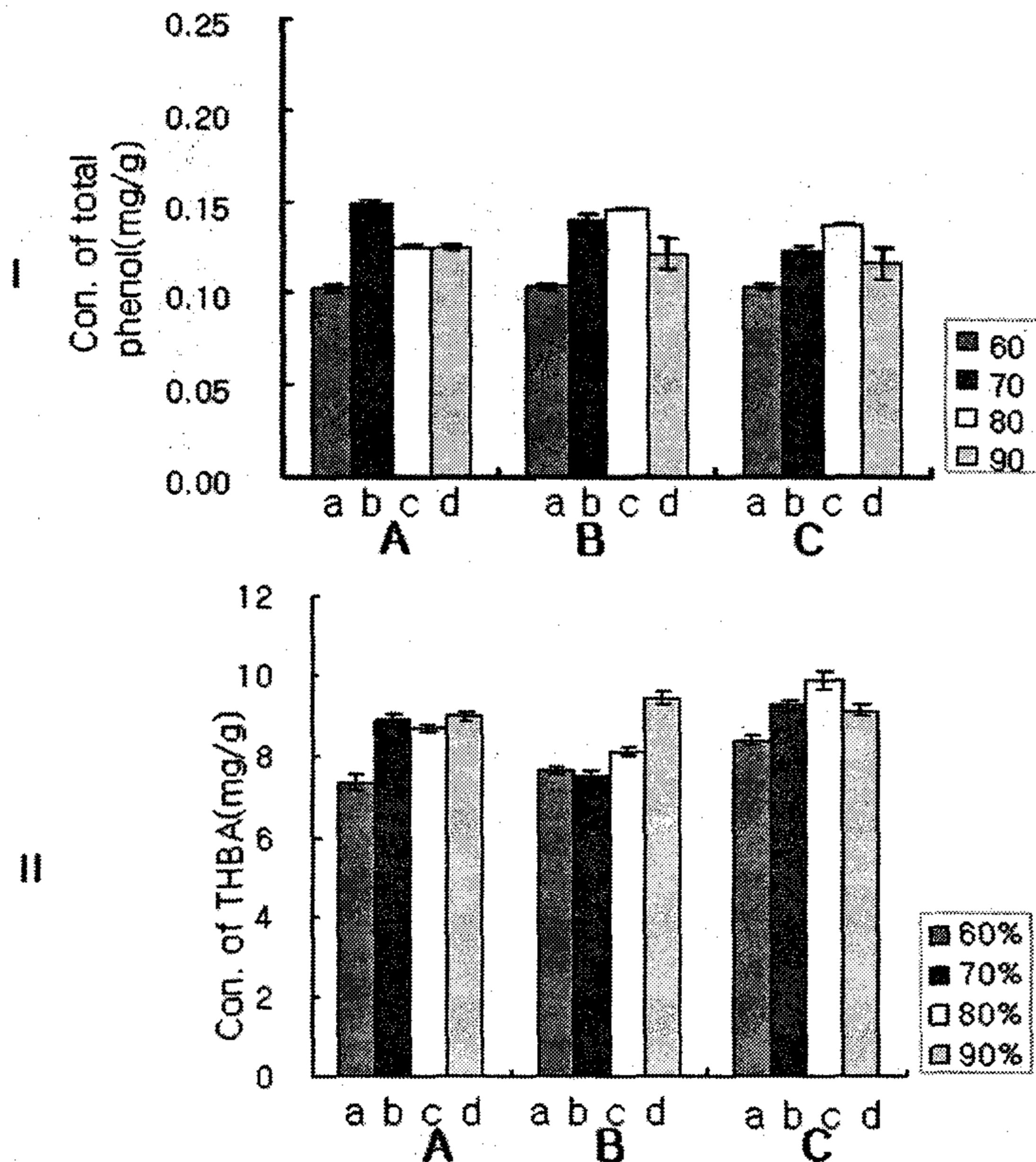


Fig. 53. Efficiency of extract condition and methanol concentration on the yield of THBA and phenolic compound.

A: MeOH extraction for one time, B: MeOH extraction for three times, C: sonicate for 1 hour and then methanol extraction for three times.



## 2) 주정 농도별 추출효율

식품 공정시 공업용 메탄올의 사용을 금지하기 때문에 주정을 이용하여 pH4, 7, 10 조건하에서 주정 농도별로 뱀무 식물체를 추출하여 지표물질인 THBA의 함량을 분석하여 추출효율을 조사하였다. 주정 농도와 pH별 추출물 중 THBA 함량은 그림 54에서 보는 바와 같이 추출시 pH4, 80% 주정 농도일 때 가장 많은 THBA가 용출되어졌고, pH,7, 10에서는 주정 농도가 높을수록 THBA의 함량이 다소 떨어지는 것을 볼 수 있었다. 따라서 sonication을 1시간 처리하고 pH를 4로 맞춘 약산성 조건하의 80% 주정 농도에서 지표물질인 THBA 함량이 가장 높아서 추출 효율이 가장 좋을 수 있었다.

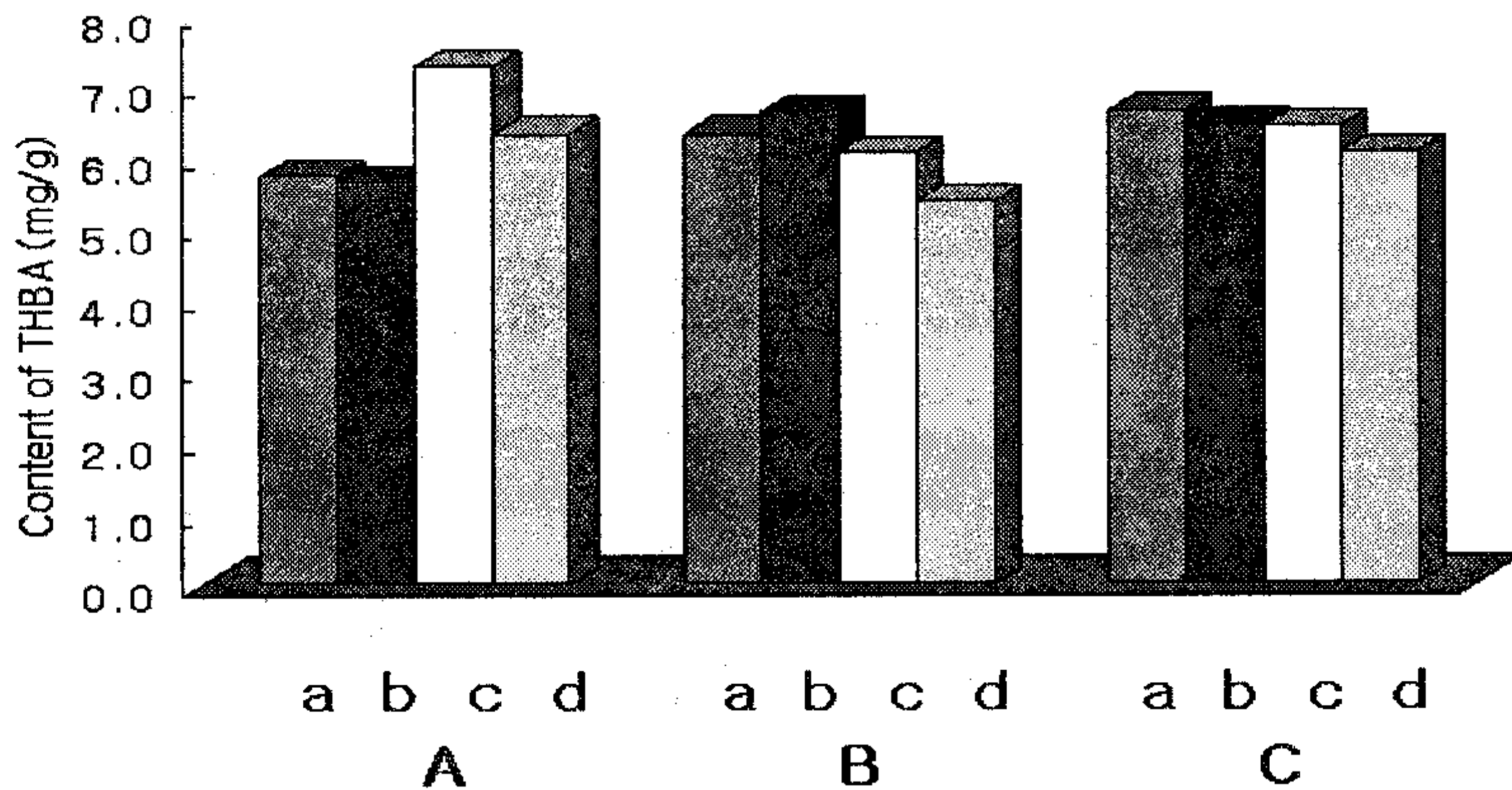


Fig. 54. Efficiency of alcohol concentration and pH on the yield of THBA.

A: pH 4, a: 60%, b: 70%, c: 80%, d: 90% alcohol

B: pH 7, a: 60%, b: 70%, c: 80%, d: 90% alcohol

C: pH10, a: 60%, b: 70%, c: 80%, d: 90% alcohol

## 3) Hexane처리 후 주정 추출 효율

건강기능성 식품 소재로 뱀무 추출물의 활용시 추출물 중의 생리활성 물질의 순도를 높이기 위하여 헥산으로 식물체 시료를 탈지시킨 후 주정 농도별로 추출 효율을 조사한 결과 그림 55에서 보는 바와 같이 헥산으로 탈지 시킨 후 주정 70%, 80%로 추출시 THBA 함량이 탈지 안한 추출물에 비하여 각각 27%, 46.4% 증가되었으나 주정 90% 추출시에는 탈지 효과가 경미하였다.

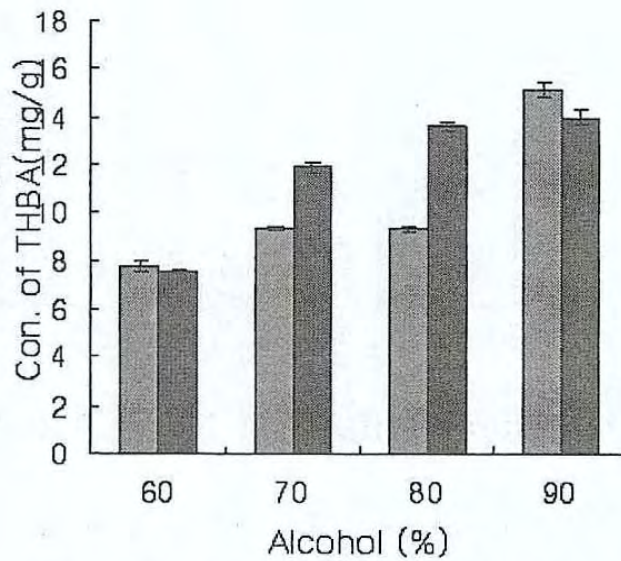


Fig. 55. Changes the extraction yield of THBA affected by alcohol concentration after hexane treatment

- : Sample was extracted with alcohol only
- : Sample was extracted with alcohol after hexane treated.

## 나. 뱀무 주정 추출물의 저장 안정성

### 1) pH별 안정성

뱀무 주정 추출물의 식품 가공시 THBA의 손실을 최소화하고 항산화 활성을 유지하기위한 기초 실험으로서 pH 안정성 실험을 수행한 결과, 그림 56에서 보는 바와 같이 뱀무 추출물 중의 THBA는 산성과 중성 조건하에서 상대적으로 안정하다는 것을 알 수 있었고 알칼리 조건에서는 산성조건에 비해 THBA 함량이 약 15% 감소되었다. 합성 THBA는 pH6.5에서 7.7%, pH9.5에서는 12.9% 감소되었다. 뱀무의 THBA는 합성 THBA에 비해 중성과 산성 pH 조건하에서 안정성이 높음을 알 수 있었다.

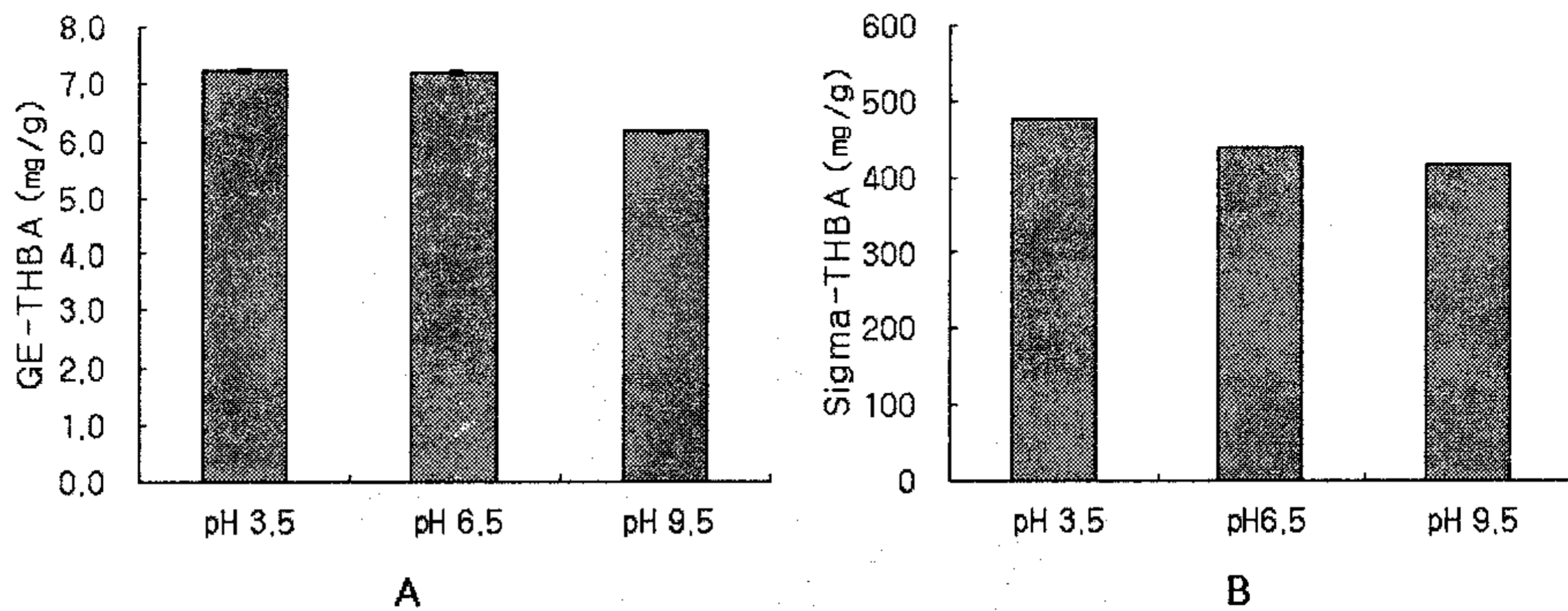


Fig. 56. Stability of natural THBA and Sigma THBA in 80% alcohol with different pH.

A: THBA in *G. japonicum* extract, B: THBA purchased from Sigma.

Samples were left in 38°C-water bath for 4hrs under various pH conditions(pH3.5, 6.5, 9.5)

## 2) 온도 안정성

뱀무 추출물의 온도에 대한 안정성 조사는 50mM sodium phosphate (pH 6.5) 완충액에 처리되어 80°C, 2시간 처리시 감소되어지는 THBA 함량으로서 나타내었다(그림 57). 80°C에서 1시간 처리까지는 뱀무 추출물의 THBA는 약 95% 이상 유지되어 합성 THBA에 비하여 상대적으로 높은 열 안정성을 보여 주었으나, 2시간 후에는 뱀무 추출물 중 THBA는 25.2% 감소되었고, 합성 THBA(sigma)는 34% 감소되었다. 따라서 뱀무 추출물의 가공처리시 가열 시간은 1시간 이하로 설정하는 것이 바람직하다고 사료 된다.

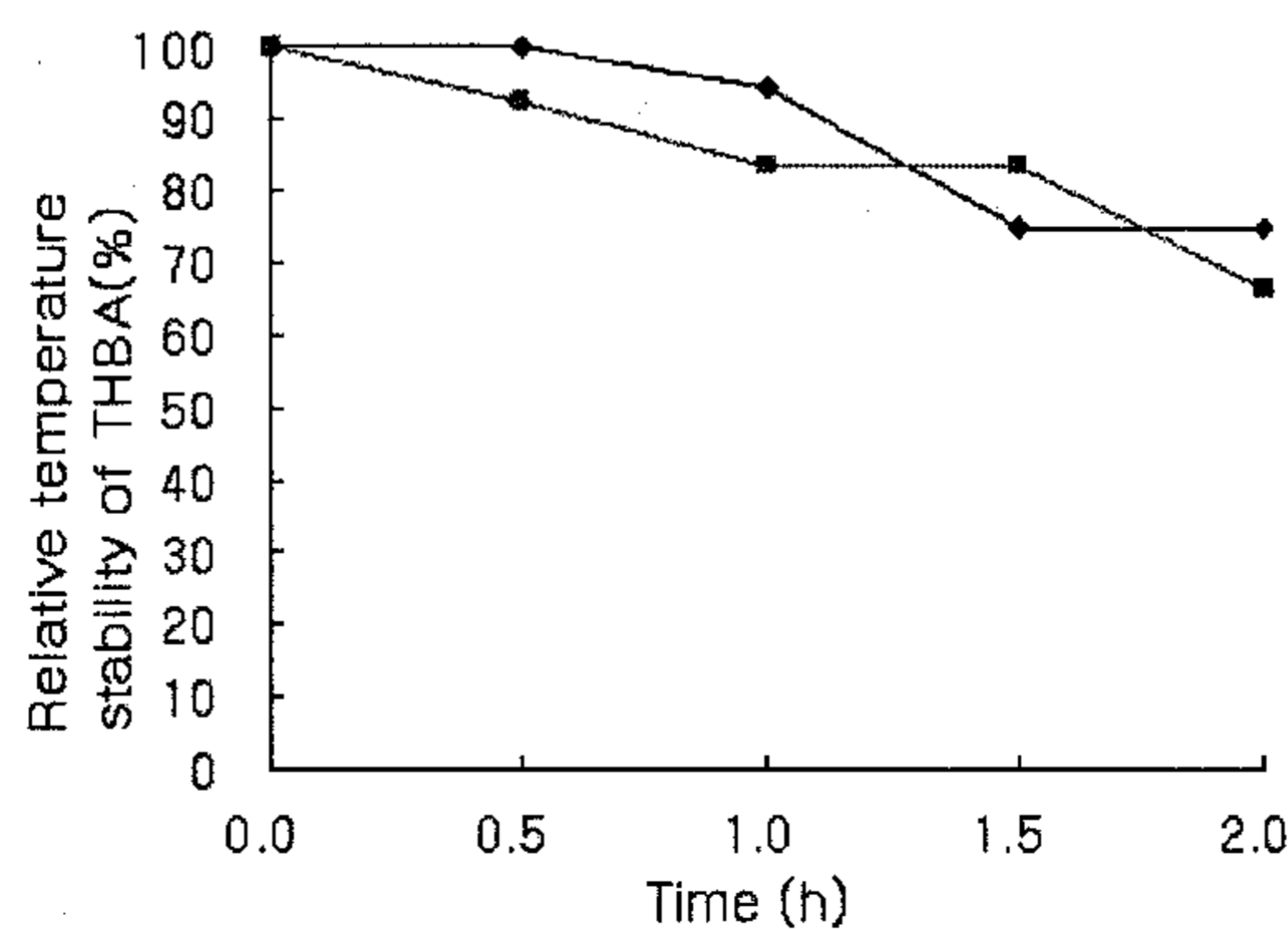


Fig. 57. Stability of natural THBA and Sigma THBA at 80°C for 2 hrs.

-◆-: natural THBA, -■-: Sigma THBA



또한 저장 중 뱀무 추출물 중의 THBA 안정성을 조사하기 위해, 70%(pH4), 90%(pH4) 주정으로 추출한 시료를 메탄올에 녹여(2.5mg/ml) 6개월간 실온에 방치한 것과 -20℃에서 6개월 방치한 시료를 HPLC 분석을 통해 THBA 농도를 측정하여 상대적인 안정성을 조사하였다. 실온에서 보존한 70%, 90%(pH4), 주정 추출물 중의 THBA의 함량은 6개월 후에 52%, 43.8%씩 감소되었고 -20℃에서 6개월 보존한 pH4, 70%, pH4, 90%, 주정 추출물 중의 THBA도 약 30%, 18%정도로 감소되었다(그림 58). 따라서 뱀무 추출물의 장기 보존은 냉동하여 보존하는 것이 바람직하였다.

또한, 고온에서 물질의 변화를 모니터링 하기 위해 LC/MS/MS chromatogram을 통해 고온 처리된 뱀무 추출물의 THBA와 합성 THBA를 분석한 결과, 100ppm 합성 THBA(UVmax 235, 300)는 80℃에서 2시간 처리하면 심하게 갈변이 되고 9.5분에 새로운 peak(UVmax 235, 285)이 나타났으며 열처리 시간이 경과함에 따라 이 peak의 area 값이 증가되었다(그림 59). 그러나 뱀무 추출물의 THBA는 갈변이 덜 일어났으며, 9.5분에 새로운 peak(UVmax 235, 285)이 나타나지 않았다. 고온과 알칼리 조건 하에서 합성 THBA로부터 생성되어지는 이 새로운 peak(UVmax 235, 285)에 해당되는 물질은 단일물질로 분리되지 않아서 물질의 분자량은 알 수 없었다.

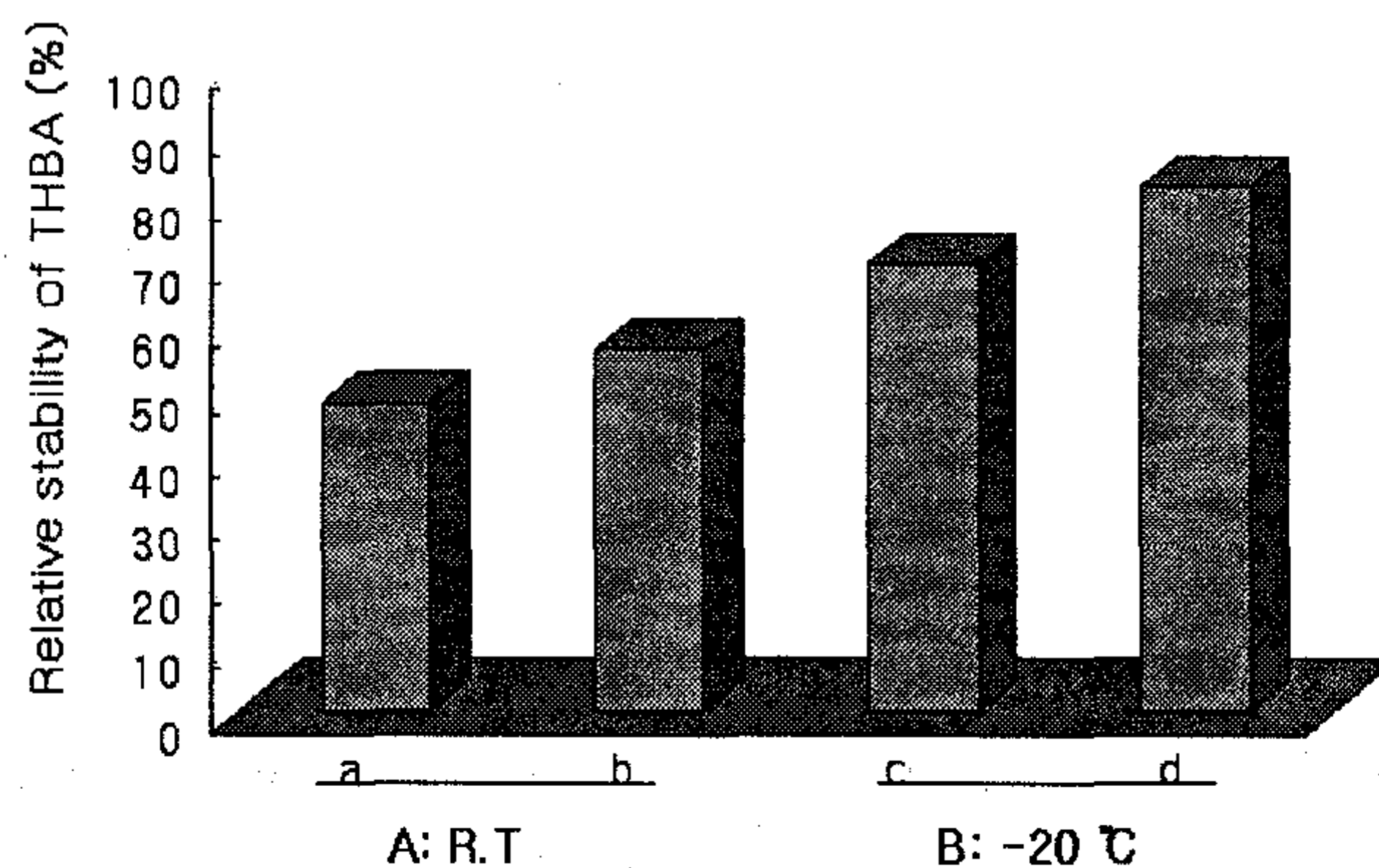


Fig. 58. Stability of THBA during storage at room temperature and -20°C for 6 months.

A: room temperature condition, B : -20°C condition

a: the concentration of THBA extracted by 70% alcohol with pH4

b: the concentration of THBA extracted by 90% alcohol with pH4, pH4



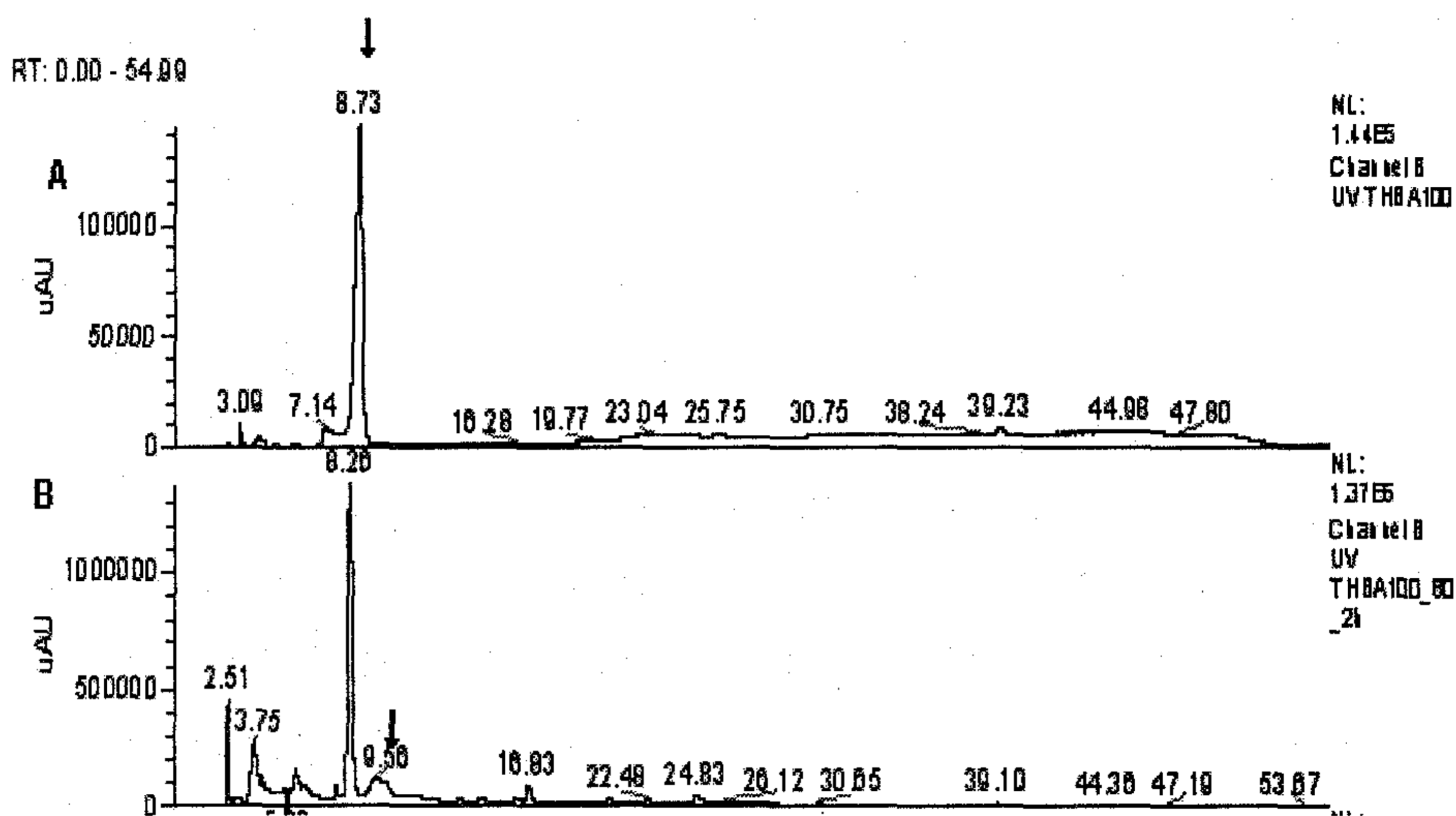


Fig. 59. HPLC chromatogram of THBA after storage at 80°C for 2hours.  
 A: chromatogram of synthesized THBA, B: chromatogram of synthesized THBA, which was treated at 80°C for 2hours.

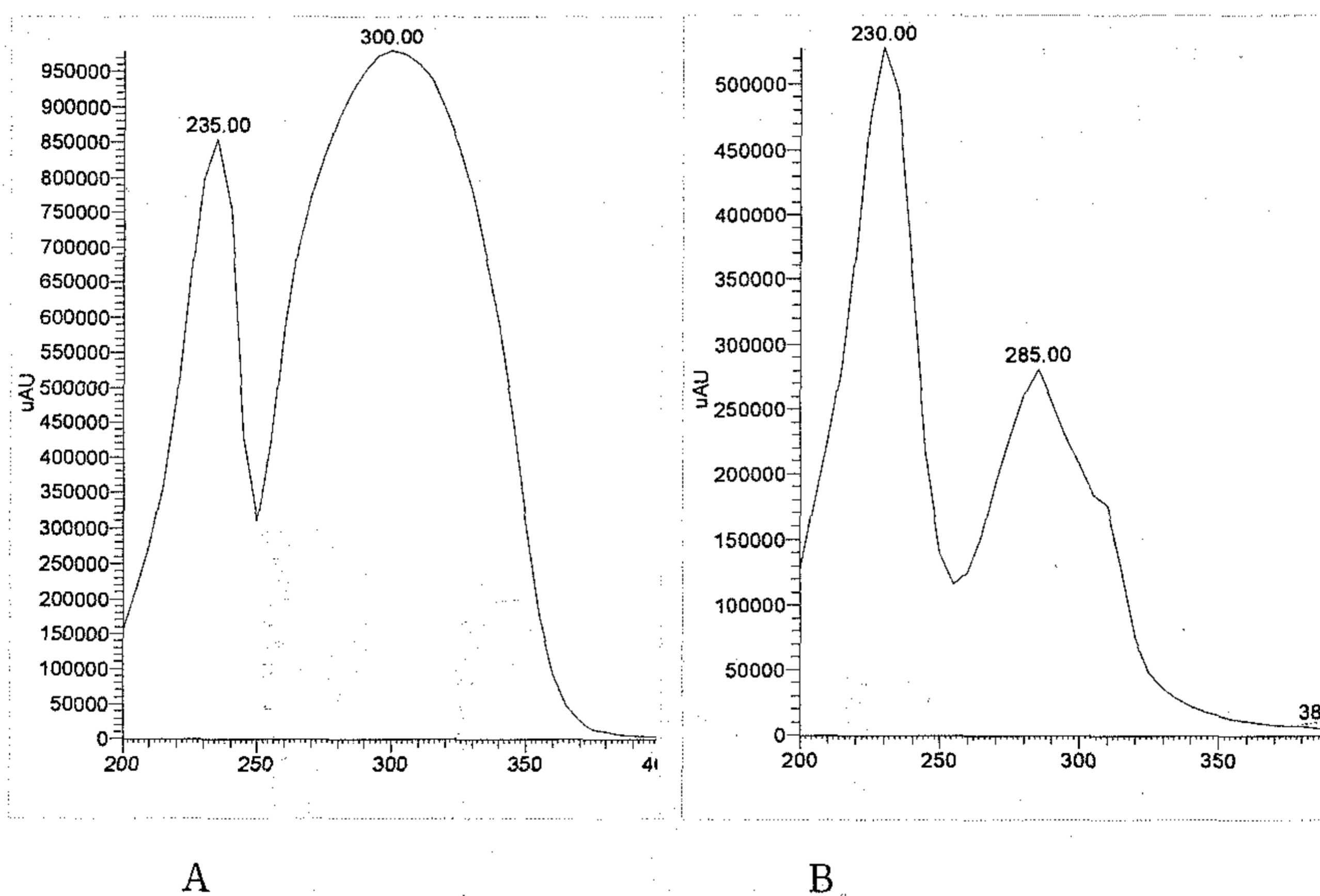


Fig. 60. UV spectrum of synthesized THBA and a compound derived from THBA after heat treatment (80°C, 2hours) .  
 A: Synthesized THBA  
 B: A compound derived from THBA after heat treatment (80°C, 2hours)

다. ICR계 마우스에 대한 뱀무추출물의 급성 경구 독성시험

1) 폐사율

마우스에 대한 경구투여 시 대조군 및 뱀무 50, 100, 200 mg/kg 투여군에서 시험물질 투여 후 1일부터 14일까지 시험 전 기간을 통하여 사망한 예는 관찰되지 않았다 (Table 15).

Table 15. Mortality of ICR mice treated orally with GJ

Sex	Dose (mg/kg)	Days after treatment															Final Mortality <sup>a)</sup>
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
male	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/10
	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/10
	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/10
	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/10

a) Values are expressed as dead number/total number of animals.

2) 체중변화

모든 시험군에서 투여 후 꾸준히 체중이 증가하였으며, 6일째 50 mg/kg 와 2400 mg/kg 투여군에서 약간의 체중감소를 보였으나 14일째에는 모두 정상적인 체중증가가 관찰되었다.

마우스에 대한 뱀무 3개 용량으로 경구투여한 군에서 대조군에 비하여 유의성있는 차이를 나타내지 않았다. 또한 투여 용량군 사이의 체중변화는 용량의존성을 나타내지 않았다 (Table 16).

Table 16. Body weights of ICR mice treated orally with GJ

Sex	Dose (mg/kg)	No. of animals	Days after treatment(g)					
			0	3	6	9	12	14
Male	0	10	30.1±1.2	30.4±2.1	30.8±2.4	30.6±2.0	31.8±1.5	31.6±1.8
	50	10	29.9±1.5	29.3±1.6	28.8±2.9	31.8±2.2	32.1±1.9	32.2±1.5
	100	10	30.2±1.7	30.5±1.4	30.9±1.8	31.6±1.5	32.6±2.1	33.6±1.8
	200	10	30.5±1.3	30.2±1.5	29.2±1.7	29.0±3.8	29.8±3.6	29.9±2.5

### 3) 일반증상

마우스에 대한 뱀무추출물의 투여 후 대조군에 비해 특이적으로 관찰된 일반증상의 변화는 없었다 (Table 17).

Table 17. Clinical signs in ICR mice treated orally with GJ

Sex	Dose (mg/kg)	Signs observation					
		Appears normal	Prone position	Decrease of locomotive activity	Decreased respiration rate	Lacrimation	Death
Male	0	10/10 <sup>a)</sup>	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	50	10/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	100	10/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	200	10/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10

a) Number of animals with the sign/total number of animals examined.

### 4) 육안적 해부소견

마우스에 대한 뱀무 추출물의 투여에 기인한다고 사료되는 어떠한 유의할 만한 병변을 관찰하지 못하였다 (Table 18).

Table 18. Organ weights in ICR mice treated orally with GJ

Sex	Dose (mg/kg)	Organ(g)		
		Liver	Kidney	Testis
Male	0	1.67±0.09	0.20±0.03	0.12±0.02
	50	1.73±0.11	0.29±0.03**	0.16±0.01**
	100	1.88±0.12*	0.28±0.03**	0.13±0.03
	200	1.52±0.15	0.24±0.02	0.14±0.01*

All values are expressed as mean ± S.D. \* Significantly different from the control value (\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ )

### 5) 결론

이상의 결과를 종합하여 볼 때 시험물질인 뱀무 추출물은 경구투여 시 마우스에서 아무런 급성독성을 나타내지 않았고, LD<sub>50</sub> 값은 마우스에서 경구 투여 최고용량 200 mg/kg 이상일 것으로 사료된다.

## 라. 뱀무 추출물의 SD계 흰쥐에 대한 아급성경구독성시험

### 1) 일반증상 및 사망동물

시험 전 기간 동안 대조군을 포함한 뱀무추출물 투여군 모두에서 사망한 동물은 없었다 (Table 19). 또한 모든 동물에서 시험물질 투여 후 자발적인 운동 및 호흡율의 증가 등과 같은 특이할 만한 임상증상은 관찰되지 않았으며 최종투여일에 실시한 안구검사에서 특이한 안구부위의 이상소견은 관찰되지 않았다 (Table 20).

Table 19. Mortality in rats orally treated with GJ for 14 days

Sex	Dose (mg/kg)	Days after treatment															Final Mortality <sup>a)</sup>
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
male	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/10
	500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/10

a) Values are expressed as dead number/total number of animals.

Table 20. Clinical signs in rats orally treated with GJ for 14 days

Sex	Dose (mg/kg)	Signs observation					
		Appears normal	Prone position	Decrease of locomotive activity	Decreased respiration rate	Lacrimation	Death
Male	0	10/10 <sup>a)</sup>	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	500	10/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10

a) Number of animals with the sign/total number of animals examined.

### 2) 체중변화

시험물질을 투여한 후 14 일 동안 체중 변화를 관찰하였을 때, 대조군 및 시험물질 투여군에서 시간이 경과함에 따라 모두 정상적인 체중증가가



관찰되었다 (Table 21). 시험물질 투여군은 대조군에 비하여 체중이 증가하였으나, 이는 뱀무추출물의 치료 효과로 인정되며 시험물질의 부작용으로 인정되지 않았다. 시험물질 투여에 따른 외견상의 임상소견은 발견되지 않았으며 사료섭취량과 음수량도 대조군과 유의성 있는 차이를 나타내지 않았다.

Table 21. Body weight of rats orally treated with GJ for 14 days

Sex	Dose (mg/kg)	No. of animals	Days after treatment (g)					
			0	3	6	9	12	14
Male	0	5	161.6	183.5	187.8	194.3	189.8	186.7
			±6.2	±6.1	±10.5	±19.5	±28.6	±19.4
	500	5	162.3	184.4	197.2	201.3	204.1	205.6
			±4.9	±4.2	±7.9	±20.3	±22.7	±20.1

All values are expressed as mean ± S.D.

### 3) 혈액생화학적 검사

시험물질에 의한 혈액생화학적검사 결과를 Table 22에 요약하였다. 모든 혈액생화학적 검사 항목에서 투여군과 대조군 사이에 통계학적으로 유의한 차이를 나타내지 않았다 (Table 22).

### 4) 혈액학적 검사

혈액학적 검사 소견은 Table 23에 요약하였다. 적혈구 용적을 제외한 모든 혈액학적 검사 항목에서 투여군과 대조군 사이에 통계학적으로 유의한 차이를 나타내지 않았다 (Table 23).

Table 22. Levels of serum biochemical analysis in rats orally treated with GJ for 14 days

Sex	Dose (mg/kg)	Protein (g/dL)	ALB (g/dL)	BUN (mg/dL)	Creatinine (mg/dL)	Globulin (g/dL)	A/G Ratio	AST (IU/L)	ALT (IU/L)	ALP (U/L)
Male	0	5.5	2.9	17.1	0.5	2.1	1.4	83.1	30.9	218.1
		±0.9	±0.6	±3.1	±0.2	±0.5	±0.2	±20.8	±10.5	±55.7
	500	5.2	2.9	16.5	0.5	2.2	1.3	82.7	29.7	199.3
		±0.4	±0.4	±2.9	±0.1	±0.2	±0.2	±13.7	±10.3	±34.9

All values are expressed as mean ± S.D.

Table 23. Levels of hematological analysis in rats orally treated with GJ for 14 days

Sex	Dose (mg/kg)	WBC	RBC	Hb	HCT	MCV	MCH	MCHC	PLT
Male	0	12.1	7.2	14.9	45.9	63.1	19.9	30.9	799.5
		±3.8	±0.7	±1.31	±3.7	±1.9	±0.6	±1.3	±149.2
	500	12.9	6.9	14.5	43.1	60.6	21.3	32.3	748.7
		±4.1	±0.3	±0.9	±2.4	±1.7	±0.5	±0.9	±112.1

All values are expressed as mean ± S.D.

WBC, white blood cell count ( $10^3/\text{mm}^3$ ); RBC, red blood cell count ( $10^6/\text{mm}^3$ ); HB, hemoglobin (g/dl); HCT, hematocrit (%); MCV, mean corpuscular volume (fl); MCH, mean corpuscular hemoglobin (pg); MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration (%); PLT, platelet ( $10^6/\text{mm}^3$ )

### 5) 육안소견 및 장기중량의 변화

시험물질 투여에 의한 육안 소견상 이상이 있는 개체는 관찰되지 않았다. 모든 투여 군에서 시험물질 투여에 의한 변화는 인정되지 않았다 (Table 24).

Table 24. Organ weights in rats orally treated with GJ for 14 days

Sex	Dose (mg/kg)	Organ(g)		
		Liver	Kidney	Testis
Male	0	8.01±1.10	0.79±0.06	1.55±0.07
	500	7.79±0.78	0.78±0.07	1.56±0.03

All values are expressed as mean ± S.D.

### 6) 결론

이상과 같이 뱀무추출물에 대한 아급성독성시험에서 체중, 일반증상, 사료섭취량, 음수량, 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사, 육안적 소견, 장기중량, 병리조직학적 검사 등에서 특이한 독성병변은 관찰되지 않았으며, 본 시험조건에서 뱀무추출물의 SD계 흰쥐에 대한 14일간 반복 경구 투여 시 무관찰 부작용량은 500 mg/kg 이상인 것으로 인정되었다.

#### 4. 땀무 및 배암차즈기 안전 생산기술 개발

##### 가. 배암차즈기 유전자원 수집 및 특성 평가

배암차즈기(*Salvia plebeia* R. Br.)는 꿀풀과(Labiatae)에 속한 1년생 혹은 2년생 直立草本으로 높이 15-90cm로 자라며, 우리나라 전지역의 개울가 황무지 혹은 길가에서 자생하는 것으로 알려져 있다. 우량 자원을 선발하기 위하여 경남북 일원에서 식물체를 수집하였으며, 자생지의 환경과 생육특성을 조사한 결과 Table 25, 26, 27와 같았다. 배암차즈기는 주로 고도가 낮은 구릉지 혹은 평야지의 햇빛이 잘 드는 남향 쪽 논과 밭 두렁에 부분적으로 밀생하고 있었다. 수집당시 생육상황은 Table 28 과 같으며 생육시기가 달라서 일률적으로 비교하기는 어렵다. 그러나 시험 포장에 이식한 후 개화기에 생육조사를 한 결과 Table 29에서 보는 바와 같이 수집지역에 따라서 초장, 화수대 등에서 차이를 보였다. 그러나 이러한 생육특성 차이는 이식 당시 식물체의 영양 상태와 생육 일수에 따라서 영향을 받았을 수 있으므로 차년도에 재배방법별로 생육상황을 조사하였다.

Table 25. 배암차즈기 자생지의 지리적 위치

수집지역	수집일 (월/일)	고도 (m)	위치좌표 (위도, 경도)	
경산시 중방동	3/26	63.9	N35° 49'46''	E128° 44'36''
합천군 야로면	3/26	115	N35° 42'36.8''	E128° 10'11.1''
함양군 안의면	3/29	205	N35° 37'53''	E127° 49'26''
진주시 주약동	3/29	39.2	N35° 10'06''	E128° 05'36''
사천시 서포면	3/29	22.8	N35° 02'11.2''	E128° 03'59.9''
남해군 이동면	3/29	8.5	N34° 47'59''	E127° 57'57''
하동군 진교면	3/29	21.3	N35° 02'02''	E127° 54'29''
고령군 쌍림면	3/31	66.2	N35° 40'25.2''	E128° 12'40''
창녕군 대합면	3/31	22.1	N35° 34'22.8''	E128° 26'21.9''
의령군 궁유면	3/31	22.6	N35° 22'41.9''	E128° 19'49.5''
의령군 대의면	3/31	87.5	N35° 21'59.7''	E128° 06'57''
산청군 생초면	3/31	126	N35° 28'22.9''	E127° 51'17.6''

수집지역	수집일 (월/일)	고도 (m)	위치좌표 (위도, 경도)	
김해시 한림면	4/6	5.1	N35° 11'34''	E128° 53'56''
진영읍 우동리	4/6	29.2	N35° 16'35''	E128° 43'07''
순창읍 남산리	4/7	122	N35° 21'32''	E127° 08'33''
광주시 송암동	4/7	53.2	N35° 05'58''	E126° 52'46''
나주시 왕곡면	4/7	32.2	N34° 58'43''	E126° 42'21''
해남군 송지면	4/7	18.3	N34° 19'03''	E126° 31'21''
보성군·읍 대야리	4/7	179	N34° 45'12''	E127° 01'56''
순천시 서면	4/7	46.5	N35° 00'05''	E127° 28'56''
거창군 고제면	4/8	250	N35° 44'58''	E127° 56'22''

Table 26. 배암차즈기 자생지 토양 및 환경 특성

수집지	토양	방향	주변재배작물	광지
경산시 중방동	사질양토	남서	논	양지
합천군 야로면	점질양토	남서	논	반양지
함양군 안의면	점질양토	남동	논	양지
진주시 주약동	사질양토	남서	논	양지
사천시 서포면	사질양토	남동	논	양지
남해군 이동면	사질양토	남동	논	양지
하동군 진교면	사질양토	남서	밭	양지
고령군 쌍림면	사질양토	남남	밭	양지
창녕군 대합면	사질양토	남남	밭	양지
의령군 궁유면	점질양토	남동	논	양지
의령군 대의면	점질양토	남동	밭	양지
산청군 생초면	점질양토	남서	논	양지
김해시 한림면	점질양토	남동	논	양지
진영읍 우동리	사질양토	남동	논	양지
순창읍 남산리	점질양토	남동	논	양지
광주시 송암동	사질양토	남	밭	양지
나주시 왕곡면	점질양토	남	논	양지
해남군 송지면	미사질양토	남서	밭	양지
보성군·읍 대야리	점질양토	남동	논	양지
순천시 서면	점질양토	남동	밭	양지
거창군 고제면	점질양토	남동	논	양지



Table 27. 배암차즈기 자생지 토양의 화학적 특성

수 집 지	pH (1:5)	OM (g/kg)	Av.P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (mg/kg)	Ex. Cation(Cmol+/kg)		
				K	Ca	Mg
경산시 중방동	6.2	30.2	125	0.28	7.7	2.2
합천군 야로면	6.3	25.5	310	0.18	4.2	0.7
함양군 안의면	6.4	24.8	258	0.34	5.2	0.9
진주시 주약동	6.6	26.3	239	0.26	6.2	1.4
사천시 서포면	6.4	23.6	61	0.46	6.3	1.5
남해군 이동면	6.8	40.1	136	0.38	10.5	1.8
하동군 진교면	6.5	22.7	123	0.33	5.7	1.1
고령군 쌍림면	6.5	22.8	300	0.32	5.1	1.0
창녕군 대합면	6.4	22.6	137	0.20	5.8	1.4
의령군 공유면	6.5	25.5	100	0.30	7.0	1.6
의령군 대의면	6.2	35.2	240	0.32	7.7	1.6
산청군 생초면	6.5	26.5	298	0.57	7.8	1.3
김해시 한림면	6.8	30.4	320	0.44	12.9	1.4
진영읍 우동리	6.4	26.9	32	0.35	5.7	1.5
순창읍 남산리	6.7	22.8	249	0.43	6.7	2.4
광주시 송암동	7.8	14.1	50	0.18	15.4	1.2
나주시 왕곡면	7.5	18.1	60	0.25	17.2	1.5
해남군 송지면	6.9	28.8	144	0.43	8.5	2.2
보성군·읍 대야리	5.9	35.4	83	0.98	5.6	1.2
순천시 서면	7.3	26.5	182	0.42	8.8	0.8
거창군 고제면	6.9	30.2	202	0.33	5.0	1.2

Table 28. 수집당시 자생지에서 배암차즈기의 생육상황

수집지	초장 (cm)	엽장 (mm)	엽폭 (mm)	엽색 <sup>1</sup> (SPAD)	엽수 (개/주)	엽요철 (개/m <sup>2</sup> )	1차분지수 (개/주)	근장 (cm)	근경 (mm)	병해 <sup>2</sup> (0-9)
경산시	52.7±	29.7±	14.7±	35.4±	17.7±	29.0±	7.0±	69.3±	4.8±	3.1±
중방동	15.7 <sup>3</sup>	8.6	6.1	5.3	14.6	4.8	1.4	28.6	2.4	0.9
합천군	62.0±	38.0±	21.0±	36.7±	30.7±	27.5±	9.5±	59.7±	3.6±	1.5±
야로면	32.0	6.1	0.8	11.1	34.0	2.7	2.1	33.6	2.4	1.9
함양군	59.3±	48.3±	29.0±	44.2±	74.3±	26.0±	16.7±	92.5±	7.4±	5.0±
안의면	36.1	27.2	16.2	5.9	71.0	2.2	10.0	31.0	2.5	7.4
진주시	140.6±	30.8±	21.2±	35.5±	25.6±	25.0±	9.0±	78.4±	3.3±	5.0±
주약동	47.0	11.5	4.7	7.3	22.6	6.2	4.2	23.5	1.7	3.9
사천시	96.2±	1.9±	1.1±	38.5±	9.6±	32.8±	0	71.6±	2.0±	1.2±
서포면	17.3	0.2	0.3	6.6	0.9	10.2	0	10.0	0.9	0.4
남해군	168.9±	55.0±	21.9±	33.3±	22.3±	16.1±	0	92.9±	4.3±	3.1±
이동면	65.6	3.0	8.4	5.3	17.5	7.9	0	52.0	1.7	1.6
하동군	217.3±	53.5±	26.0±	41.5±	100.0±	19.5±	15.0±	133.0±	11.6±	11.0±
진교면	27.6	3.5	1.4	2.8	25.5	2.1	0.0	4.2	5.2	2.8
고령군	60.0±	36.7±	20.8±	37.8±	16.3±	32.0±	0	90.5±	3.5±	3.2±
쌍림면	17.6	9.0	5.9	7.4	12.7	4.0	0	39.2	1.9	0.8
창녕군	72.2±	39.6±	22.6±	37.7±	35.6±	24.6±	10.4±	105.2±	5.3±	3.0±
대합면	24.0	9.6	6.6	6.7	47.3	1.1	4.2	40.4	4.0	1.8
의령군	82.0±	42.4±	23.0±	31.1±	21.4±	29.0±	5.5±	109.6±	4.6±	3.0±
궁유면	41.9	20.6	9.8	5.2	20.2	5.1	2.1	25.1	3.1	2.0
의령군	63.0±	36.3±	23.0±	32.1±	28.6±	24.1±	9.0±	96.6±	4.0±	2.1±
대의면	21.5	9.9	7.2	3.8	29.7	6.2	4.2	22.1	2.2	1.3
산청군	64.5±	33.7±	18.3±	32.5±	19.7±	29.7±	9.1±	86.8±	3.6±	2.5±
생초면	24.9	13.3	7.4	6.8	17.8	2.4	3.2	30.1	2.3	1.6
김해시	54.3±	19.3±	18.0±	33.2±	14.0±	26.8±	3.8±	79.3±	5.3±	2.3±
한림면	13.4	13.8	1.9	8.1	6.3	1.0	3.4	33.4	3.4	1.0
진영읍	61.3±	31.2±	17.3±	30.9±	15.3±	27.5±	3.5±	98.8±	4.9±	3.3±
우동리	28.2	13.3	6.6	7.7	8.9	1.4	3.9	82.2	2.5	0.8
순창읍	71.5±	34.8±	19.8±	23.7±	16.3±	24.8±	3.5±	71.3±	4.3±	3.0±
남산리	45.3	2.2	1.7	2.9	3.9	2.2	3.3	49.0	2.6	1.4
광주시	63.5±	34.3±	15.8±	33.2±	20.8±	25.8±	3.0±	63.7±	4.8±	2.8±
송암동	18.0	5.2	6.9	5.4	7.6	1.5	3.6	15.1	1.8	1.3
나주시	67.8±	25.6±	15.6±	21.7±	16.0±	24.4±	4.4±	144.6±	3.6±	3.0±
왕곡면	16.6	9.4	5.8	5.1	10.2	1.1	6.5	161.0	0.6	0.7
해남군	88.0±	40.5±	23.8±	32.0±	15.5±	26.5±	4.5±	39.8±	6.0±	3.5±
송지면	18.2	7.0	3.9	2.4	2.4	2.1	4.4	39.7	1.7	0.6
보성군	74.3±	31.8±	16.3±	25.4±	14.7±	26.0±	3.3±	58.7±	4.2±	2.3±
대야리	37.5	4.9	8.8	4.7	5.4	1.8	3.8	70.6	1.4	0.5
순천시	160.3±	38.5±	21.2±	29.5±	15.0±	24.7±	4.3±	73.0±	4.8±	2.7±
서면	55.1	16.4	8.0	5.5	6.8	0.8	5.5	27.1	3.3	1.4
거창군	108.0±	50.6±	21.1±	34.0±	23.8±	27.0±	8.3±	89.8±	5.0±	3.3±
고제면	46.8	18.3	12.8	3.5	9.2	1.4	2.8	31.8	1.5	1.5

<sup>1</sup> SPAD : 광학 농도차 측정방식, Soil & Analyzer Development.

<sup>2</sup> 잎마름병(0-9) : 0 : 병 없음, 1 : 1%이하 2 : 2~10%, 4 : 11~20%, 6 : 21~40%, 8 : 41%이상

<sup>3</sup> Mean±SD

Table 29. 배암차즈기 이식재배후 개화기의 생육상황

수집지	분지수(개/주)			초장 (mm)	엽수 (개/주)	엽장 (mm)	엽폭 (mm)	엽색 <sup>1</sup> (SPAD)	경경 (mm)	화수대 (개/주)
	2차	3차	4차							
경산시 중방동	20.8± 1.6	60.6± 20.7	0	398.8± 96.1	176.4± 36.9	44.4± 5.1	24.1± 1.5	41.7± 2.0	5.7± 1.1	81.0± 25.2
합천군 야로면	29.2± 4.1	101.2± 39.3	0	570.0± 37.4	266.4± 71.1	45.1± 3.2	20.2± 1.9	38.4± 3.9	9.1± 0.5	146.6± 43.1
함양군 안의면	27.6± 4.7	85.2± 16.0	0	576.0± 47.2	294.8± 50.4	51.2± 2.9	22.2± 1.8	34.2± 2.7	9.0± 0.6	180.4± 47.0
진주시 주약동	22.8± 1.8	38.4± 11.1	0	560.0± 65.2	215.4± 34.4	52.9± 3.4	25.5± 2.5	39.3± 2.0	8.2± 0.6	85.8± 36.7
사천시 서포면	19.8± 1.8	46.8± 23.1	0	516.0± 49.3	233.6± 99.2	45.0± 3.6	22.2± 1.1	38.2± 4.8	8.2± 2.6	61.8± 19.3
남해군 이동면	21.2± 4.4	64.6± 28.0	0	424.0± 41.6	252.6± 58.3	52.6± 3.5	21.9± 1.9	36.5± 3.1	9.6± 2.5	98.0± 31.2
하동군 진교면	27.6± 4.0	88.8± 41.2	1.0± 0.6	466.0± 73.0	260.6± 86.5	47.9± 5.5	23.1± 2.9	34.4± 2.2	8.0± 1.8	161.4± 81.8
고령군 쌍림면	22.4± 1.7	74.0± 36.1	0	572.0± 62.2	247.4± 54.4	55.3± 5.3	25.4± 2.0	44.9± 3.0	8.7± 1.8	93.0± 26.1
창녕군 대합면	26.4± 2.6	96.4± 18.4	0	578.0± 27.7	347.7± 63.6	57.7± 7.4	25.0± 1.5	39.8± 2.5	8.6± 0.9	184.6± 42.0
의령군 궁유면	27.6± 5.0	98.0± 32.3	32.0± 5.7	510.0± 35.4	262.2± 88.5	49.7± 6.1	21.5± 1.6	36.9± 2.4	7.8± 1.0	203.6± 111.8
의령군 대의면	24.4± 2.5	84.8± 34.8	0	616.0± 55.5	262.8± 72.7	65.6± 7.9	32.0± 4.5	45.8± 4.1	10.5± 1.5	141.2± 34.7
산청군 생초면	27.6± 5.7	70.8± 28.3	0	518.0± 72.9	274.1± 51.9	46.5± 3.2	22.6± 3.3	38.5± 2.0	35.3± 63.0	87.8± 31.9
김해시 한림면	21.8± 5.6	49.6± 31.5	0	516.0± 86.5	233.0± 106.7	45.5± 2.8	21.0± 2.0	40.4± 1.9	9.1± 2.3	69.6± 31.5
진영읍 우동리	22.0± 3.2	83.2± 18.6	2.8± 6.3	516.0± 74.7	258.2± 103.4	53.1± 3.5	24.8± 1.7	40.5± 2.7	8.2± 0.7	138.4± 54.0
순창읍 남산리	23.6± 1.7	88.0± 14.8	0	562.0± 13.0	261.0± 61.6	53.8± 4.9	23.5± 2.4	35.0± 3.0	9.4± 0.7	135.2± 40.6
광주시 송암동	26.6± 5.5	134.4± 36.5	32.8± 10.9	540.0± 46.9	360.4± 136.6	54.9± 5.6	22.9± 1.6	36.5± 1.7	9.7± 2.4	242.8± 73.2
나주시 왕곡면	22.5± 1.9	85.0± 17.6	2.0± 4.0	502.5± 47.9	250.8± 60.6	54.4± 4.9	25.6± 1.5	38.1± 2.6	8.8± 1.1	109.8± 16.4
해남군 송지면	30.0± 5.8	115.8± 47.7	8.6± 13.2	550.0± 79.7	309.2± 145.4	55.5± 2.0	31.8± 3.8	35.8± 2.7	8.6± 1.7	220.4± 102.9
보성군 대야리	24.2± 2.2	105.2± 13.4	5.2± 2.7	618.0± 22.8	434.8± 49.7	65.1± 6.2	28.1± 3.1	40.4± 1.6	9.2± 0.6	167.4± 16.3
순천시 서면	26.8± 4.1	110.0± 45.5	2.4± 1.4	546.0± 42.8	278.6± 78.1	60.1± 3.8	28.7± 3.0	37.9± 4.9	9.8± 2.0	196.2± 75.1
거창군 고제면	23.6± 1.7	131.2± 25.8	9.2± 2.8	568.0± 63.8	296.4± 77.1	58.2± 8.1	28.2± 4.0	43.8± 2.8	9.6± 0.7	260.6± 66.1

## 나. 뱀무 유전자원 수집 및 특성 평가

뱀무(*Geum japonicum* THUNBERG)는 우리 나라 울릉도, 남부지방, 중부지방의 산야지 초원 및 길가 언덕 등에 자생하는 다년생 초본이다. 우량 자원을 선발하기 위하여 경남북 일원에서 식물체를 수집하였으며, 자생지의 환경과 생육특성을 조사한 결과 Table 30, 31와 같았다. 뱀무는 주로 고도가 높은 계곡주변의 반음지나 습한 곳에 자생하고 있었다. 수집당시 생육상황은 Table 33 과 같으며 생육시기가 달라서 일률적으로 비교하기는 어렵다. 그러나 시험 포장에 이식한 후, 선발된 자생종에 대한 재배방법 시험에서 생육상황을 조사하고자 한다.

Table 30. 뱀무 자생지의 지리적 위치

수집지역	수집일 (월/일)	고도 (m)	위 치 좌 표 (위도,경도)
평창군 진부면(오대산)	7/28	823	N37° 41'48.7'' E128° 30'18.2''
단양군 대강면(황정산)	7/27	585	N36° 48'40.5'' E128° 15'49.1''
무주군 설천면(덕유산)	7/28	1580	N35° 51'23.7'' E127° 41'58.3''
제천시 백운면(삼봉산)	7/26	740	N36° 05'39.2'' E127° 44'58.3''
함양군 백전면(백운산)	8/14	637	N35° 36'05.6'' E127° 40'23.7''
거창군 위천면(기백산)	8/14	477	N35° 40'56.4'' E127° 46'01.2''
합천군 가야면(가야산)	10/9	368	N35° 46'38.2'' E128° 07'39.3''

Table 31. 뱀무 자생지 토양 및 환경 특성

수집지	토양	방향	자생지 특징
평창군 진부면(오대산)	사질양토	남동	계곡주변 습한 곳
단양군 대강면(황정산)	사질양토	정남	계곡 옆 반음지
무주군 설천면(덕유산)	사질양토	북동	계곡주변 습한 곳
제천시 백운면(삼봉산)	사질양토	남서	계곡주변 활엽수 반음지
함양군 백전면(백운산)	사질양토	남동	계곡주변 습한 곳
거창군 위천면(기백산)	사질양토	남서	계곡주변 잡목 초본식생지
합천군 가야면(가야산)	사질양토	정남	계곡주변 습한 곳



Table 32. 뱀무 자생지 토양의 화학적 특성

수 집 지	pH (1:5)	OM (g/kg)	Av.P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (mg/kg)	Ex. Cation(Cmol <sup>+</sup> /kg)		
				K	Ca	Mg
평창군 진부면(오대산)	6.5	56.4	93	0.48	5.5	1.1
단양군 대강면(황정산)	7.0	40.6	102	0.55	4.8	1.5
무주군 설천면(덕유산)	6.5	48.6	99	0.48	3.8	1.4
제천시 백운면(삼봉산)	6.8	66.2	39	0.66	5.9	1.4
함양군 백전면(백운산)	6.1	39.5	143	0.36	3.5	0.6
거창군 위천면(기백산)	7.3	35.6	22	0.44	3.8	0.3
합천군 가야면(가야산)	7.2	25.7	79	1.09	11.8	0.9

Table 33. 수집당시 자생지에서 뱀무의 생육상황

수집지	초장 (mm)	엽장 (mm)	엽폭 (mm)	엽수 (개/주)	경경 (mm)	경수 (개/주)	가지수 (개/주)	가지길이 (mm)
오대산	387.3± 5.2	69.7± 6.1	87.0± 4.5	26.3± 10.8	4.3± 0.6	2.3± 0.9	7.3± 3.1	146.3± 10.2
황정산	382.5± 63.0	108.5± 17.1	131.8± 14.1	23.5± 10.1	4.3± 1.1	1.8± 0.8	9.5± 4.6	130.2± 57.2
덕유산	720.0± 215.7	95.0± 23.7	120.0± 65.1	27.0± 11.8	5.6± 3.7	1.0± 0.2	12.0± 2.5	168.0± 6.4
삼봉산	528.8± 173.7	118.0± 69.7	80.4± 30.4	69.0± 31.9	5.4± 0.6	1.6± 0.9	20.5± 4.9	150.1± 85.6
백운산	753.3± 220.3	101.7± 9.9	124.0± 19.1	89.3± 40.3	5.7± 1.3	3.3± 2.1	18.7± 9.2	207.7± 38.0
기백산	495.0± 35.4	112.0± 42.4	134.0± 58.0	22.5± 7.8	5.9± 1.2	1.0± 0.0	2.0± 0.0	224± 42.8
가야산	236.6± 48.9	236.6± 48.9	89.0± 10.5	5.4± 1.7	9.0± 2.8	1.2± 0.4	9.7± 4.8	121.0± 47.2

## 다. 뱀무 및 배암차즈기 재배방법

### 1) 배암차즈기 재배방법

배암차즈기의 최적 생산을 위한 재배기술을 개발하기위하여 파종기 및 재식거리 시험을 함양에 있는 경남농업기술원 약초시험장 포장에서 실시하였다. 파종기를 4월1일, 4월11일, 4월20일, 4월30일로하여 생육최성기인 6월8일에 생육조사를 한 결과, Table 34에서 보는 바와 같이 4월 11일 파종구에서 단위면적당 생체중과 건체중이 가장 높았다. 또한 재식거리 시험에서도 30×20, 30×30, 30×40 cm로 3개 처리구로 하여 4월 11일 파종하여 수확기에 생육조사를 한 결과 Table 35에서 보는 바와 같이 30×20cm 구에서 초장이나 엽수 등은 다른 처리구에 비하여 다소 떨어지지만 단위면적당 생체중과 건체중은 가장 높았다. 따라서 배암차즈기는 파종기는 4월 11일. 재식거리는 30×20 cm로 재배하는 것이 가장 최적 재배방법이었다.

Table 34. 배암차즈기 파종기별 수확기 생육상황

파종기 (월.일)	초장 (mm)	엽장 (mm)	엽폭 (mm)	요철수 (개/cm <sup>2</sup> )	엽수 (개/m <sup>2</sup> )	생체중 (g/m <sup>2</sup> )	건체중 (g/m <sup>2</sup> )
4. 1	175.6± 1.3	136.3±4.4	63.5±1.9	6.4±0.2	113.4±6.2	1415	281
4.11	173.6±4.2	134.6±0.6	63.5±1.4	6.4±0.3	80.5±2.7	1910	385
4.20	162.9±3.4	122.3±3.1	60.9±1.1	6.5±0.5	66.2±5.8	1836	364
4.30	163.2±2.4	126.1±5.0	61.8±1.4	6.4±0.1	60.8±2.8	1570	312

Table 35. 배암차즈기 재식거리별 수확기 생육상황

재식거리 (cm)	초장 (mm)	엽장 (mm)	엽폭 (mm)	요철수 (개/cm <sup>2</sup> )	엽수 (개/m <sup>2</sup> )	생체중 (g/m <sup>2</sup> )	건체중 (g/m <sup>2</sup> )
30×20	169.2±5.8	127.7±5.8	59.8±5.0	6.5±0.3	103.8±7.3	1910	274
30×30	168.4±9.4	135.3±8.4	64.1±1.9	6.9±0.3	108.2±6	1340	264
30×40	190.5±13.4	149.0±5.1	66.4±2.9	6.2±0.2	122.3±14.5	1140	222

### 2) 뱀무 재배방법

뱀무의 최적 생산을 위한 재배기술을 개발하기위하여 파종기 및 재식거리 시험을 함양에 있는 경남농업기술원 약초시험장 포장에서 실시하였다.

파종기를 4월20일, 4월30일, 5월10일로 40×30cm로 재배하여 생육최성기인 8월31일에 생육조사를 한 결과, Table 36에서 보는 바와 같이 5월 10일 파종구에 비하여 4월 20일 파종구와 4월30일 파종구에서 생육상황이 양호하였으나, 4월20일 파종구와 4월 30일 파종구 간에는 생육 차이가 크게 나지 않았으나 4월20일 파종구가 다소 양호하였다. 또한 재식거리 시험에서도 40×30, 40×40, 40×50 cm로 3개 처리구로 하여 4월 20일 파종하여 수확기에 생육조사를 한 결과 Table 37에서 보는 바와 같이 40×30cm 구에서 초장이나 가지 길이 등이 다른 처리구에 비하여 다소 길었으나, 40×40 구에서 엽장, 엽폭, 2차 분지주 등이 많아서 수량이 제일 많았다. 따라서 뱀무는 파종기는 4월20일, 재식거리는 40×40 cm로 재배하는 것이 좋을 것으로 생각된다.

Table 36. 뱀무 파종기별 성숙기 생육상황(40×30으로 재배)

파종기 (월.일)	초장 (mm)	엽수 (개/주)	엽장 (mm)	엽폭 (mm)	경태 (개/주)	1차분지주 (개/주)	2차분지주 (개/주)	가지 길이 (mm)	경수 (개/주)	화수 (개/주)	수량 (kg/10a)
4. 20	427± 49.6	89± 23.4	117.4± 8.2	89.3± 6.5	4.3± 1.1	13.9± 6.1	23.8± 15.5	290.6± 88.2	3.2± 0.8	5.7± 3.7	2,835
4.30	311.3± 48.5	89.3± 14.9	127.2± 8.3	101.7± 10.3	3.8± 0.6	12.4± 3.5	34.3± 10.1	228.3± 31.3	2.6± 0.8	4.8± 3.0	1,815
5.10	244± 38.1	54.5± 15.2	110.9±1 6.0	89.5± 7.2	3.0± 0.6	7.6± 2.8	19.7± 11.8	162.3± 32.2	1.9± 1.0	3.5± 2.5	1,815

Table 37. 뱀무 재식거리별 성숙기 생육상황

재식 거리 (cm)	초장 (mm)	엽수 (개/주)	엽장 (mm)	엽폭 (mm)	경태 (개/주)	1차분 지주 (개/주)	2차분지 주 (개/주)	가지 길이 (mm)	경수 (개/주)	화수 (개/주)	수량 (kg/10a)
40×30	427± 49.6	89± 23.4	117.4± 8.2	89.3± 6.5	4.3± 1.1	13.9± 6.1	23.8± 15.5	290.6± 88.2	3.2±0.8	5.7±3.7	2,200
40×40	342.4 ±44.5	108.7± 22.4	120.4± 10.4	100.4± 10.5	4.0± 0.7	13.3± 4.1	45± 30.6	246.3± 33.7	2.5±0.7	5.8±3.8	2,940
40×50	352.4 ±38.3	111.3± 20.4	132.5± 13.2	107.4± 10.4	4.1± 0.7	14.4± 5.1	44.6± 21.1	290.9± 41.0	2.6±0.7	6.3±5.8	2,340

라. 뱀무 생육 시기별, 부위별 생리 활성물질의 함량 변화

1) 생육 시기별 THBA와 phenol 함량

뱀무 식물체를 영양생장기, 개화기, 수확기에 채집하여 THBA 함량을 조사한 결과 그림 61에서 보는 바와 같이 수확기가 가장 높았으며, 개화기, 영양 생장기 순으로 높게 나왔다. 따라서 뱀무 시기별 시료 채취는 THBA 함량과 항산화 활성이 상대적으로 높은 수확기가 적당하다고 사료되었다. pH4, 80% 주정으로 추출 시 뱀무 생육 시기별 g당 phenol 화합물의 함량은 개화기가 상대적으로 높았고 영양 생장기, 수확기 순 이었다.

2) 뱀무 부위별 무기성분, phenol 및 THBA 함량

뱀무 지상부와 지하부의 무기성분 함량은 표 38과 같이 나타났다. 지상부 식물체와 뿌리 중 전 질소와 인산 함량은 큰 차이가 없었으며, 칼리와 칼슘의 함량은 지상부 식물체가 뿌리보다 높게 나타났으며 중 금속류의 함량은 뿌리에서 높게 나타났다. pH4, 80% 주정으로 추출시 뱀무 시료 시기별 phenol 화합물의 함량은 g당 지상부는 4.9mg/g, 지하부는 6.6mg/g였고, HPLC를 이용한 THBA함량을 측정한 결과 지상부에는 14.4mg/g 으로 나타났지만 지하부에서는 같은 retention time에서 THBA peak이 검출되지 않았고 flavonoid를 검출할 수 있는 Natural reagent를 뿌려 발색했을 때 지상부와는 달리 THBA band를 관찰할 수 없었다(데이터미제시).

Table. 38. Element analysis, total phenol and total THBA contents of *Geum japonicum*

	T-N	CaO	K <sub>2</sub> O	MgO	Na <sub>2</sub> O	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	Fe	Mn	Cu	Zn	Total phenol	THBA
	(% )						(mg/kg <sup>1</sup> )				(mg/g)	
Aerial part	1.51	3.34	2.38	0.98	0.02	0.71	459	53	56	82	4.9	14.4
Root	1.67	1.86	1.85	1.13	0.18	0.80	1659	100	164	107	6.6	ND

ND: not detected



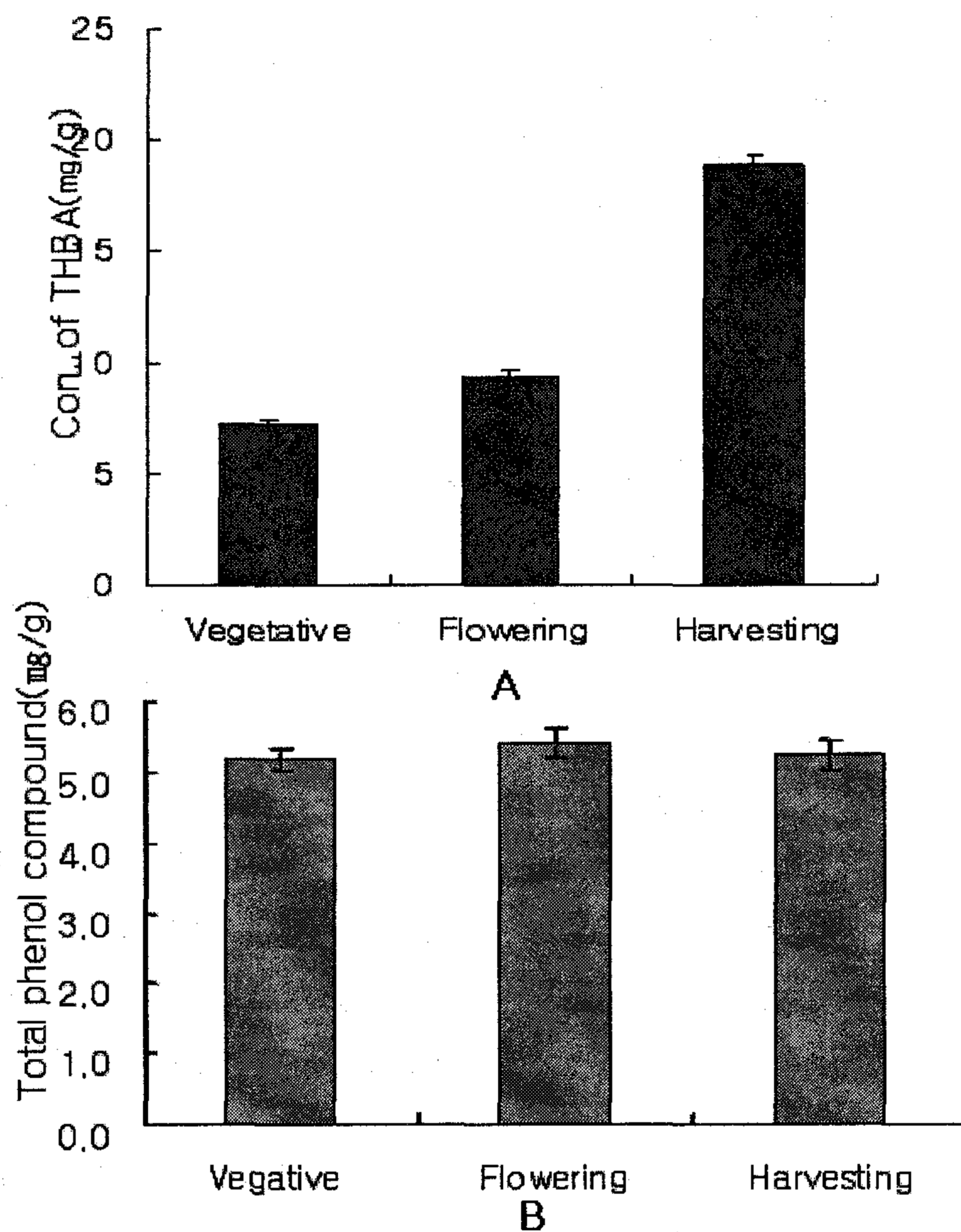


Fig. 60. Changes the content of THBA and phenolic compounds at different growth stages of *Geum japonicum*.

A: Concentration of THBA in the alcohol extracts derived from different growth stages of *Geum japonicum*.

B: Concentration of total phenol compounds in the alcohol extracts derived from different growth stages of *Geum japonicum*.

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

본 연구의 최종목표는 국내산 뱀무와 배암차즈기로부터 항산화성, 항비만, 항염증, 고지혈증 및 동맥경화 예방 등 성인병을 예방할 수 있는 소재를 개발하여 기능성 식품화를 할 수 있는 응용기술을 개발하는 것이다. 이를 위하여 1차 년도에는 뱀무와 배암차즈기 식물체에서 메탄올 추출물을 조제하여 용매의 극성별로 분리한 다음, 이 추출물에 대하여 DPPH assay, FRAP: Ferric reducing antioxidant power(FRAP) assay, Hydroxyl radical 소거 활성, Linoleic acid에 대한 항산화 활성 등을 조사하였으며, 또한 RAW 264.7 cell 증식율의 효과에 조추출물과 용매 분획물의 효과를 검증하여 1차적으로 면역능력과 항염증 활성이 있는 분획을 선별하였고, Human lung adenocarcinoma cell인 A549 cell을 이용하여 조추출물 및 용매분획물의 세포사멸효과를 검증하여 시료의 cytotoxicity가 있는 분획을 선별하였다. 또한 미성숙 지방세포를 이용하여 뱀무와 배암차즈기 용매 분획들이 지방합성과 관련된 효소들의 활성 저해능, 중성지방의 생성량에 미치는 효과들을 검증하여 항비만 효과가 있음을 확인하였다. 그리고 국내 자생 뱀무와 배암차즈기의 자생지 환경을 조사하고 수집된 식물을 포장에 이식하여 생육특성을 조사하였다.

2차 년도에는 1차 년도에 이어 뱀무와 배암차즈기에서 항산화 활성물질을 각종 칼럼 크로마토그래피로 각 3종을 순수하게 분리하여 LC/MS/MS와 NMR을 이용하여 구조분석하여 화합물을 동정하였다. 그리고 1차년도에 세포주를 이용한 실험 결과 뱀무 추출물이 배암차즈기 추출물에 비하여 세포사멸 효과와 항염증 효과 더 우수하여서 뱀무의 에칠아세테이트 분획과 주 활성물질로 확인된 3,4,5-trihydroxybenzaldehyde(THBA)에 대한 고지혈증, 동맥경화 개선 효과 및 항비만 효과 등을 검증하였다. 고지방식이로 유도된 비만 동물모델에서 체지방, 혈중 지질 함량 등을 검정한 결과 뱀무의 주 활성물질인 THBA가 혈중 중성지방의 함량을 낮추어 주고 혈중 고밀도지방(HDL)의 수준을 높여 줌을 확인하였다. 그리고 전년도에 선별된 뱀무와 배암차즈기에 대한 파종기와 재식거리 구멍을 위한 재배방법 시험을 통하여 최적 재배조건을 구명하였다. 3차 년도에는 비만 동

물 모델을 이용하여 분리된 활성물질의 효과를 확인하였으며, 사람 동맥평활근 세포(HASMC)를 이용하여 동맥경화와 관련된 MMP-9 효소가 THBA에 의해서 저해되었으며, THBA가 사람 동맥평활근 세포의 침윤-이주능을 효과적으로 억제함을 확인하였다. 이로서 뱀무 추출물과 주 활성물질인 THBA가 고지혈증과 동맥경화증을 예방할 수 있음을 확인하였다. 또한 뱀무 추출물의 건강기능식품 소재화를 위하여 독성 검정, pH, heat, 저장 안전성 등 응용기술을 조사하였다. 따라서 본 연구에서 계획한 목표는 100%을 달성하였다고 생각된다.

이상의 결과로 국내산 뱀무와 배암차즈기로부터 항산화, 항비만, 고지혈증 및 동맥경화를 예방할 수 있는 건강기능성 선도물질 또는 후보 추출물이 3종 이상 특허출원 되었고, health-claim을 하기 위한 기초 자료가 확보된 것으로 보인다. 기술적으로는 항비만 관련 실험 모델, 각종 기능성 검정 방법, 식물체에서 활성물질의 분리 및 구조분석 기술, 생리활성 물질의 작용기작 연구방법 등 기반 기술이 축적되게 하는데 기여하였다. 또한 국내 자생식물 자원의 수집과 재배방법 시험 등을 통하여 앞으로 소득작물화 하는 기반을 구축하였다. 특히 노령화 되는 산업화 사회에서 가장 문제시되는 각종 성인병의 시작이 되는 비만과 고지혈증, 동맥경화를 예방하는 건강기능식품 시장은 계속 성장할 것으로 예측되고 있어 효과에 대해 건강기능성 식품 소재로서 개별인정(health-claim)을 받을 수 있는 품목을 개발하는 기반을 확립함으로써 국내 건강기능성 식품 시장을 활성화하고 건전성을 부여하며 나이가 국민의 삶의 질 향상에 크게 기여할 것으로 전망된다.

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

본 연구개발 결과의 활용계획은 다음과 같다.

1. 본 연구에서 얻어진 연구결과 중에서 1개는 “항지방화, 항비만 및 면역기능 증진 효과가 있는 뱀무 추출물”이라는 제목으로 특허등록이 결정되었으며, 2개는 “뱀무 추출물 및 분획물을 함유하는 동맥경화증의 예방 또는 치료용 조성물”과 “항산화, 항지방화 및 항비만 효과가 있는 배암차즈기 추출물”로 특허 출원하였다. 나머지 제품화 및 성인병 예방 효과와 관련된 기술에 대해서도 계속적으로 산업재산권을 확보해 나갈 예정이다.
2. 본 연구를 통하여 얻어진 학술적 성과에 대해서는 국내 학술지에 논문 1건이 게재되었으며, 관련 연구 성과에 대한 특허출원과 동시에 SCI 등재 학술지에 2건이 투고되었으며, 미발표 결과에 대해서는 향후 계속적으로 학술지에 투고함으로써 보다 강도 높은 health-claim을 할 수 있는 근거로 활용할 계획이다.
3. 건강기능법률이 실시됨에 따라 본 연구에서 축적된 항비만, 동맥경화증 예방 등 대사증후군 예방 관련 효과 평가방법은 향후 예상되는 기능성 평가 수요에 능동적으로 대응할 수 있는 기반기술로 활용할 것이다.
4. 본 연구에서 확보된 연구결과를 활용하여 추가적으로 요구되는 물질의 분리 및 동정, 생리 생화학적 작용기작 연구, 생리활성물질을 포함한 추출물질을 이용한 식품소재화 연구, 인체에서의 효과, 활성물질을 생산하는 식물의 경제적 생산방법, 개별인정형 절차의 보완을 위한 영양적 생리활성 및 독성 연구 등에 관한 후속 연구를 수행할 계획이다.
5. 본 연구를 통하여 얻은 특허 기술 등을 실용화 할 수 있는 소재 및 기술에 대해서는 산업계에 기술이전을 추진하여 실용화를 유도할 계획이다.



## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

### 1. 식물생성 폴리페놀화합물의 최근 연구동향

2006년 8월 22일부터 8월25일까지 캐나다 마니토바주 위니펙시 페어몬트 호텔에서 “23th International Conference on Polypenols”가 개최되었다. 이 학술대회는 식물체에서 생산되는 주요 기능성 물질인 폴리페놀계 화합물의 생합성, 식물체내에서의 기능성, 관련 유전자의 분리 및 조작, 식품으로서의 영양학적 기능, 건강기능성 물질로서의 기능성 등을 연구하는 세계 각국의 연구자들이 2년마다 정보교류 및 연구결과를 발표하는 국제적 행사이다. 본 연구과제와 관련하여 이 학술대회에 참석하여 향후 연구에 필요한 자료 및 정보를 수집하였다. 이 학술 대회 에서 발표된 주요 내용들을 소개하면 다음과 같다.

#### 가. 학술대회 주요 발표내용

폴리페놀 학술회는 5개의 주제로 분류하여 초청 및 구두 발표, 포스터 발표를 하였다.

1주제는 페놀 및 폴리페놀 화학

2주제는 페놀 및 폴리페놀 생합성과 유전자 조작

3주제는 식물 페놀화합물의 생태학 및 생리학

4주제는 식품과 영양

5주제는 페놀화합물과 건강으로서

이상의 5주제와 세부 주제에 대하여 발표한 내용을 요약하면 다음과 같다.

#### 1) 초청발표자의 발표내용 요약

가) 생체내에서 거대분자 리그닌 축합과정의 해부 : 최종 미개척분야  
(Norman G. Lewis 교수, 미국 워싱턴 주립대학 생물화학 연구소)

루이스 박사는 식물체내의 리그닌 생합성 연구의 세계적인 권위자로서 이 분야에 수많은 논문을 저명 학술지에 발표한 학자이다. 본 강연에서 생체내에서 리그닌 화합물의 생합성 경로와 관련 효소와 유전자의 기능에 대해서 현재까지 연구결과와 금후 연구내용에 대해서 강연을 하였다.

일반적으로 리그닌(lignin)은 3종의 monoligonal(p-coumaryl alcohol, coniferyl alcohol, sinapyl alcohol)이 연결되어 거대분자인 리그닌을 형성한다. 이 과정에서 많은 효소들이 관여하며, 효소의 종류에 따라서 다양한 형태의 폴리페놀 화합물이 생성되며, 최종적으로 세포벽을 구성 하는 리그닌이 된다. 리그닌 생합성 경로에서 페놀화합물의 무작위 혹은 주기적 결합과 관련한 생합성 효소의 확인은 최근 연구의 목적이었다. 식물 세포벽이 어떻게 형성되어지는 해석할 수 있는 가장 큰 쟁점 분야이다. 리그닌 생합성에서 주된 당면 연구과제 중 하나는 페놀화합물의 주된 연결 고리를 이어주는 연속 과정을 해석하는 일이다. 이러한 과정을 이해하기 위해서 생합성 관련 유전자를 형질전환하여 리그닌 함량과 조성이 다른 형질 전환체를 육성하였다. 이 형질전환체 중에는 p-coumaryl, coniferyl, sinapyl alcohol의 함량이 특별히 높은 개체를 얻었으며 유전자의 기능을 해석할 수 있게 되었다. 금후 기본 페놀화합물의 연결 조절과 연속된 다중 결합의 조절이 어떻게 일어나는지, 리그닌 화합물 생성의 연속성을 설명할 수 있는 생화학 과정이 연구되어야 할 것이다.

나) 폴리페놀 화학 및 생물학적 연구(Alan P. Kozikowski, 미국 일리노이주립대 시카고 분교, 약리화학과)

코코아 생성물질 중 폴리페놀화합물의 화학 및 생물학적 연구결과를 발표하였다.

최근 흑색 초크렛이 맛뿐만 아니라 영양성면에서도 우수한 효과를 보여주는 연구결과들이 발표되고 있다. 초크렛은 항산화성 플라보노이드인 procyanidin, epicatechin과 catechin이 풍부하다. 많은 약리효과도 연구되어서 혈중 플라보노이드는 심장병, 폐암, 전립선암 및 제2유형 당뇨병에 대한 위험을 감소시켜준다. Epicatechin에서 procyanidin 생합성 과정을 연구하기 위해서 4-[(benzothiazolyl)thio] 화합물을 이용하여 epicatechin이 중합되어가는 중간 다량체(pentamer)를 확인할 수 있었으며 HPLC 분석 조건을 확립하였다. 폐암 세포주를 이용한 Procyanidin 화합물의 항암성 연구결과 세포증식 과정에서 cell cycle 조절단백질의 특정부위의 탈인산화 작용을 유도하여 세포증식을 억제하는 것을 증명하였다.

다) 관상식물에서 폴리페놀 생합성의 분자생물학적 최근 연구동향  
(Kevin M. Davies, 뉴질랜드 작물 및 식품연구소)

꽃 색소의 주성분인 안소시아닌 색소 생합성은 식물의 생장, 환경에 의해서 조절되며, 이 과정에서 전사조절인자(Transcription factors, TFs)가 중요한 역할을 한다. 이 TFs 중에서 MYB과 bHLH 형의 전사조절인자와 보조 조절인자인 WD-40이 중요한 anthocyanin 조절인자이며, 세포내 여러 신호전달인자 즉 개화조절, 빛, 탄수화물 또는 생화학물질 등에 의해서 발현 양상이 다르며 이에 따른 화색 변화가 일어난다. 이러한 전사조절인자와 anthocyanin 생합성 경로상의 F3'5H, F3'H 효소 유전자들을 이용하여 형질전환체를 만들어 기능을 밝혔으며, 노란색 색소 생합성 조절은 가능하였으나 청색 색소 생합성 조절은 어려웠다. 아직 유사한 전사조절인자들의 기능이 동일한 기능을 가지는지, 어떻게 특정 세포기관에 가장 높은 수준의 신호전달 인자가 무엇인지는 금후 풀어야 될 과제이다.

라) 병 저항성 유도발현 개시와 페놀화합물(Ray Hammerschmidt, 미국 미시건 주립대 식물병리학과)

식물 페놀화합물은 항균성과 세포벽의 구성성분으로서 병 방어기능을 가진다. 감염 식물 조직에서 폴리페놀계 화합물의 축적이 일어남이 확인되었다. 예를 들면 감자 괴경에서 상처 조직에서 chlorogenic acid의 축적이 일어난다. 병원균 침입시 항균성 물질로 알려진 phytoalexin이 생성되는데 coniferyl alcohol 등 플라보노이드 화합물들이 밝혀졌다. 식물 방어반응 중 병원균 침입시 감염부위에 빠른 괴사가 일어나는데 이를 과민반응이라 하며 이는 폴리페놀 화합물의 산화 결과로 조직색이 갈색으로 변한다. 또한 병원균에 의해서 유도된 과민반응된 괴사조직 주위에는 즉시 항산화성 anthocyanin이 축적되는 것을 볼 수 있다. 이러한 병 방어반응은 식물체내에서 일어나는 체계적 유도저항성(SAR)이라 부르며, salicylic acid의 축적에 의해서 일어난다. SAR 반응 유도물질일 페놀계 화합물의 발현양상과 다양한 병 저항성과의 관계를 구명하였다.



마) 유전자 발견을 위한 기능 및 구조 유전체학과 페닐프로파노이드 생합성 경로의 대사공학(Richard A. Dixon, 미국 Samuel Roberts Noble Foundation)

식물체에서 생합성되는 화합물 구조의 다양성은 수산화 반응, 글리코실화, 메틸화 등에 의해서 화합물의 구조 변환이 대부분 일어난다. 이러한 변환과정에 관여하는 특정 효소가 유전체학의 발전으로 그 실체가 밝혀지기 시작하고 있다. 이러한 화합물 구조변환에 관여하는 유전자를 탐색하기 위하여 *Medicago truncatula*, 대두 등의 방대한 EST 자원이 유용하게 활용되고 있으며, 특히 *Medicago*의 전체 염기서열이 꼭 밝혀져서 유용하게 활용될 수 있을 것이다. 모상체나 분비샘 같은 특정 조직의 염기서열은 천연물질의 생합성 경로상의 전사물질 생성을 이해하는데 큰 도움을 줄 것이다. 페닐프로파노이드계 천연물질의 변환에 관여하는 거대 유전자 집단(예를 들면 cytochrome P450s, O-methyltransferase, glycosyltransferase)들의 생체내 기능을 확인하는 것이 현재의 큰 문제점이다. 대사공학에 있어서 특정 효소의 생체내 기능 해석만으로는 실제 요구되는 촉매 반응산물을 조절할 수 없으며, 구조 생물학이 페닐프로파노이드 생합성 효소들의 유전자 구조와 기능과의 관계를 제공할 수 있다. 최근까지 연구된 페닐프로파노이드 천연물질의 대사공학 연구를 요약하면 플라보노이드 다량체인 Proanthocyanins(PAs)의 생합성량을 증대시키기 위하여 전구물질인 cyanidin이 epicatechin으로 변환시키는 효소인 anthocyanidin reductase 유전자 탐색을 위한 유전체 연구가 이루어지고 있으며, 대두에서 생성되는 isoflavone phytoestrogen을 타작물에서 생산하기 위하여 관련 유전자의 변환과 조절 인자를 연구하고 있다.

바) 식품 중 ellagic acid와 관련 폴리페놀 화합물의 생리활성, 대사 및 생물학적 유용성(E.A. Tomas-Barberan, 스페인 CEBAS)

Ellagic acid와 ellastannins은 다양한 식품 중에 존재하며 특히 과일이나 견과류에 많이 존재한다. 항산화성 페놀화합물은 소화관내에서 각종 병해 및 종양에 대한 치료효과가 연구되고 있으며, 대부분 장내에서 대사되어 최종 urolithins A와 B 형태로 소변으로 배출된다. 페놀화합물 대사산물의 인체내 기관별 흡수 양상이 조사되었으며 특히 장내 혈관에 많이 축적된



다. 형태는 유리 형태보다는 메칠기나 glucuronyl 잔기가 붙은 형태로 흡수 이용된다. 식품 중 ellagic acid와 ellastinnin의 생리활성은 장내 세균에 의한 대사산물인 urolithins A나 B들에 의해서 주로 일어나며, 이 화합물의 장내 작용기작과 관련된 유전자의 발현양상을 구명한 결과들을 보고하였다.

사) 폴리페놀 대사물질의 화학합성과 생리활성에 대한 최근 연구동향  
(Dennis Barron, 스위스 네슬러)

식품 중 페놀화합물은 대부분 체내에서 소화 흡수되거나 위내에서 procyanidins 화합물의 안전성은 아직 분명치 않다. 플라본 화합물인 hesperdin은 산성조건하에서 가수분해 되지 않는다. 비록 anthocyanin과 chlorogenic acids가 효과적으로 장내흡수가 일어남이 동물실험에서 증명되었지만 주된 폴리페놀 화합물의 흡수는 소장내에서 이루어진다. 대부분의 glucosides는 장내 효소에 의해서 그것들의 aglycon 형태도 분해된다. 이 aglycons들은 소장내에서 흡수되거나 축합된다.

장내 흡수된 페놀화합물은 혈액을 통하여 순환되어 대사산물로 된다. 예를 들면 caffeic acid, ferulic acid, dihydroferulic acid 등으로 대사된다. 체내에서 폴리페놀 화합물의 대사산물의 이동과 축적, 기능을 이해하기 위해서는 많은 연구가 필요하며, 생리활성 검정을 위해서는 많은 양의 대사산물이 요구된다.

## 2) 구두 발표자의 발표내용

가) 파슬리에서 플라보노이드 합성효소의 주된 촉매 아미노산 서열 결정과 분자 진화(Gebhardt, 독일 필립 대학교)

Flavones과 Flavonol 생합성에 관여하는 3종의 2-oxoglutarate dependent dioxygenase계 효소인 FNS1, FHT 그리고 flavonol 합성효소 (FLS)을 파슬리에서 클로닝하여 효모에서 이종발현(heterologous expression) 방법으로 특성을 조사하였다. 3종 효소의 유전자 염기서열을 비교하였으며, 효모에서 이들 유전자의 발현양상을 분석하였으며, 부분적 유전자 돌연변이체를 이용하여 상호 친화관계, 활성부위의 핵심 아미노산 서열을 구명한 결과, FNS1은 FHT의 유전자 중복체에서 유래됨을 확인하였다.

나) 미생물에서 플라보노이드 생합성의 대사공학적 연구(Matheos Koffas, 미국 뉴욕 주립대)

플라보노이드 생합성 효소 유전자들을 변형하여 *E. coli*와 *Saccharomyces cerevisiae*(효모)에 형질전환하여 플라보노이드 생합성 양상을 구명하였다. Acetate synthase, acetyl-CoA carboxylase, biotin ligase를 결합하여 과다 발현 시킨 *E. coli*에서 플라보노이드 합성량이 100배나 증가됨을 확인하였다.

다) 스트레스 받은 포도나무에서 새로운 폴리페놀 화합물인  $\gamma$ -viniferin 분리(Julien B. Jean-Denis, 스위스 Neuchated 대학)

UV처리한 *itis vinifera* 앞에서 새로운 stibenic 화합물로서 항균성 기능을 가진 trans - $\gamma$ -viniferin을 분리하여 구조와 화학적 특성을 구명하였다.

라) *Medicago truncatula*에서 flavonoid glycosyltransferase의 생화학적 특성(Luzia V. Modolo, 미국 The Samuel Roberts noble Foundation)

Glycosyltransferase는 대부분 생물체내에서 존재하는 효소로서 특정 공여자나 수여자(주로 2차대사산물)로부터 당분자를 전이하는 기능을 갖는다. 비친수성 분자단의 글라이코실화는 이들 분자물질들의 안전성에 매우 중요하다. 따라서 glycosyltransferase가 어떻게 작용하는지를 이해한다는 것은 특정 천연물질의 대사과정을 이해하는데 매우 중요하다. 따라서 *Medicago truncatula*에서 재조합 flavonoid-glycosyltransferase을 이용하여 생화학적인 특성을 조사하였다.

마) 인체내에서 catechin, epicatechin과 proanthocyanidin의 미생물대사 (Anna-Marja Aura, 프랑스)

시험관내에서 Flavono-3-ols 화합물인 catechin, epicatechin과 proanthocyanidin의 미생물 대사과정을 연구한 결과, 이 화합물들의 미생물에 의한 변환은 이 화합물이 생산된 재료의 특성에 따라서 차이를 보였으며, 특히 catechin은 일차적 분해로 3,4-dihydroxyphenylpropionic acid로 변화 되었으나 epicatechin은 그렇지 않았다. 이는 catechin 등 페놀화합물의 공급원인 식물의 구성성분과 구조에 따라서 분해작용이 상이함을 보여준 결과로 해석된다.

바) *Linum album* 식물 모상근을 이용한 리그난 화합물의 유전공학적 생산 (Elisabeth Fuss, 이란 Heinrich-Heine 대학교)

*Linum album*에서 유래된 pinoresinol-lariciresinol reductase(PLR) 유전자를 형질전환한 모상근에서 methoxypodiphyllotoxin(6MPTOX) 화합물 생산량을 현저히 증가시켰다. 또한 PLR 유전자를 RNAi 벡터로 형질전환시켰을 때 6MPTOX 함량을 현저히 감소시킴을 확인하였다.

### 3) 포스터 발표내용

포스터 발표는 총 222편이 발표되었으며, 주제별로 발표 건수와 내용을 요약하면 다음과 같다.

#### 가) 제 1주제 : 페놀 및 폴리페놀 화학

이 주제에서 발표된 내용들을 요약하면, 플라보노이드 화합물의 이성체와 그 구조를 측정하는 방법, anthocyanidin과 이의 당 결합체 화합물의 화학적 특징, 분리 및 분석방법, 과일, 채소 등에서 생성되는 플라보노이드 화합물의 분리 및 최적 분석방법, 플라보노이드 화합물과 금속 이온들과의 상호반응 및 이들 결합체의 생리활성 구명, 색소를 생성하는 과일, 영양체 등에서 전구체인 페놀화합물의 중합과 합성 경로 구명, 신규 anthocyanidin 계 화합물의 분리 및 구조분석, 신규 페놀성 화합물의 분리 및 동정 등 총 79편의 포스터가 발표되었다.

#### 나) 제 2주제 : 생합성과 유전자 조작

이 주제에서는 페놀 및 폴리페놀계 화합물의 생합성 기작 구명과 생합성에 관여하는 유전자의 탐색 및 분리, 기능분석 연구 결과 주로 발표되었다. 애기장대 돌연변이체를 이용한 proanthocynidin 생합성 유전자 분리, 포도의 항산화성물질인 resveratrol 생합성 유전자를 형질전환한 토마토에서 유전자 기능분석, Anthocyanidin 생합성에 관여하는 효소들의 다중 기능성 분석 및 유전자 분리, Flavonol 합성효소 유전자를 형질전환하여 기능분석, 생물 및 비생물적 스트레스 조건하에서 플라보노이드 생합성 관련 효소들의 활성변화와 그 생산물 변화, 각종 작물에서 플라보노이드 생합성 유전자 분리 및 기능분석 등 총 17건이 발표되었다.



다) 제 3주제 : 식물 페놀화합물의 생리 및 생태

식물체에 병원균 침입시 유도되는 페놀계 화합물의 기능, 작물에 methyl jasmonate 처리시 유도되는 페놀화합물의 동정, 환경조건에 따른 페놀계 화합물의 조성 및 함량 변화, 유채 품종별 페놀계 화합물의 함량과 병원균과의 상호관계, 병원균 감염시 유도되는 유전자와 생성되는 페놀화합물 등과 관련한 연구결과가 총 32편이었다.

라) 제 4주제 : 식품과 영양

딸기 과실 중 폴리페놀 화합물의 조성과 항산화 활성과의 관계, 가지과 식물 유전자원의 항산화성 화합물의 변이, 베리계 과실을 이용한 기능성 식품 및 항산화성 영양소 제조, 사과 등 과실류의 가공식품 제조시 플라보노이드 함량의 변화, 과실과 채소 중의 플라본과 플라보놀 화합물의 영양가와 인체 건강에 미치는 효과, 환경변화가 과실중 페놀계 화합물의 생성에 미치는 영향, 과실 주스와 녹차류에서 생산되는 플라보노이드 화합물의 함량, 인체내 내장기관에서 플라보노이드 및 anthocyanidin 화합물의 흡수와 대사, 과실주에 들어있는 페놀화합물의 종류 및 함량 분석 방법, 각종 과실 및 채소류 추출물의 생리활성 기능, 나라별, 지역별 재배환경에 따른 각종 과실류와 채소류에서 생산되는 페놀계 화합물의 종류와 함량, 신규 폴리페놀 화합물의 분리와 이의 항산화성 등에 관한 연구결과가 52편 발표되었다.

마) 제 5주제 : 페놀화합물과 건강

폴리페놀계 화합물의 일종인 큐마린이 동물실험에서 암세포의 증식에 미치는 영향, anthocyanidin과 그 유도체들의 구조와 항산화성 정도, 페놀계 화합물의 종류와 항염증 활성과의 관계, 폴리페놀 화합물의 항세균성, 플라보노이드를 생산하는 약용식물을 이용한 약리효과 탐색, Hydroxycinnamic acid와 그 유도체 화합물의 항암활성 및 항염증 효과, 새로운 우수 항산화성 물질 생성 자원식물 탐색, 종양세포를 이용한 각종 과실 추출물의 세포 증식 억제 기작 연구, 녹차류에서 항미생물 활성물질 분리 및 동정 등에 관한 연구결과 42편이 발표되었다.



## 나. 관찰 및 평가

최근 식물체내에서 생합성되어 식품으로 섭취시 인체건강에 도움을 주는 화합물을 Phytochemical이라 하여 세계적으로 많은 연구가 이루어지고 있다. 이 Phytochemical 중에서 가장 많이 연구되고 생리활성이 우수한 화합물 그룹이 폴리페놀계 화합물이다. 이 폴리페놀 화합물 중에서 가장 많이 연구되고 있는 것이 anthocyanidin과 그 유도체, 식물 호르몬 화합물로 알려진 이소플라본계 화합물, 녹차류에서 가장 많이 생성되는 플라보노이드계 화합물과 그 유도체들이다. 금번 학술발표회에서도 이들 화합물의 생합성과 관련한 효소와 유전자, 이를 이용한 형질전환 작물 개발, 인체내에서 생리활성 효과 및 흡수대사 과정, 각종 식물자원 및 농산물에서 이들 화합물의 함량 및 조성 등에 관한 연구결과 발표가 주류를 이루고 있었다.

국내에서도 최근 이러한 생리활성 기능이 우수한 특정 페놀계 화합물을 대량생산 하기위한 유전자 탐색 및 형질전환 작물 개발 연구들이 수행되고 있으며, 항산화성 등 생리활성이 우수한 페놀계 화합물 탐색연구가 수행되고 있다. 금후 생리활성이 우수한 폴리페놀계 화합물의 탐색과 관련 우리 고유 유전자 개발을 통하여 건강보조 식품 소재로 활용할 수 있는 우수 농산물을 생산하는 작물개발에 더욱 집중할 필요가 있다.

## 제 7 장      참고문헌

1. Abbasi F, McLaughlin T, Lamendola C, Kim HS, Tanaka A, Wang T, Nakajima K, Reaven GM. High carbohydrate diets, triglyceride-rich lipoproteins, and coronary heart disease risk. *Am J Cardiol.*, 85(1):45-48 (2000)
2. Berk PD, Zhou S, Kiang C, Stump DD, Fan X, Bradbury MW. Selective up-regulation of fatty acid uptake by adipocytes characterizes both genetic and diet-induced obesity in rodents. *J Biol Chem.* 274(40):28626-28631 (1999)
3. Bond, M., R.P. Fabunmi, A.H. Baker, and A.C. Newby, Synergistic upregulation of metalloproteinase-9 by growth factors and inflammatory cytokines: an absolute requirement for transcription factor NF-kappa B. *FEBS Lett.* 435 : 29-34. (1998)
4. Cha, B.Y., C.J. Park, D.G. Lee, Y.C. Lee, D.W. Kim, J.D. Kim, W.G. Seo, and C.H. Kim, Inhibitory effect of methanol extract of *Euonymus alatus* on matrix metalloproteinase-9. *J Ethnopharmacol.* 85:163-7. (2003)
5. Cha, SH., Fukushima A, Sakuma K, Kagawa Y. Chronic docosahexaenoic acid intake enhances expression of the gene for uncoupling protein 3 and affects pleiotropic mRNA levels in skeletal muscle in aged C57BL/6NJcl mice. *J Nutr* 131: 2636-264. (2001)
6. Cheung, W.L., L. Cheng, H. Liu, X. Gu, and M. Li, The dual actions of angiogenesis and anti-apoptosis induced by an isolated fraction from *Geum japonicum* repair muscle ischemia. *Arch Biochem Biophys* (2006).
7. Cheung, WL., P.C. Leung, and A.S. Wong, Gonadotropin-releasing hormone promotes ovarian cancer cell invasiveness through c-Jun NH2-terminal kinase-mediated activation of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9. *Cancer Res.* 66 : 10902-10. (2006)

8. Cho, A. and M.A. Reidy, Matrix metalloproteinase-9 is necessary for the regulation of smooth muscle cell replication and migration after arterial injury. *Circ Res.* 91: 845-51. (2002)
9. Cho, A., J. Graves, and M.A. Reidy, Mitogen-activated protein kinases mediate matrix metalloproteinase-9 expression in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20 : 2527-32. (2000)
10. Chung, M.S. Composition and color of *Codonopsis lanceolata* affected by cultivation methods. *Korean J. Dietary Culture* 14 : 529-534, (1999)
11. Chung T.W., S.K. Moon, Y.C. Lee, J.G. Kim, J.H. Ko, and C.H. Kim, Enhanced expression of matrix metalloproteinase-9 by hepatitis B virus infection in liver cells. *Arch Biochem Biophys* 408 : 147-54. (2002)
12. Chung, T.W., S.K. Moon, Y.C. Chang, J.H. Ko, Y.C. Lee, G. Cho, S.H. Kim, J.G. Kim, and C.H. Kim, Novel and therapeutic effect of caffeic acid and caffeic acid phenyl ester on hepatocarcinoma cells: complete regression of hepatoma growth and metastasis by dual mechanism. *Faseb J.* 18 : 1670-81.(2004)
13. Clapham, J.C. , Arch JR, Chapman H, Haynes A, Lister C, Moore GB, Piercy V, Carter SA, Lehner I, Smith SA et al. Mice overexpressing human uncoupling protein-3 in skeletal muscle are hyperphagic and lean. *Nature* 406: 415-418, (2000)
14. Commins SP, Watson PM, Padgett MA, Dudley A, Argyropoulos G, Gettys TW. Induction of uncoupling protein expression in brown and white adipose tissue by leptin. *Endocrinology* 140(1):292-300 (1999)
15. Dagogo JS, Fanelli C, Parmore D, Brother J, Landt M. Plasma leptin and insulin relationship in obese and nonobese humans. *Diabetes* 45(5):695-698 (1996)
16. Dollery, C.M., J.R. McEwan, and A.M. Henney, Matrix metallo-

- proteinases and cardiovascular disease. *Circ Res.* 77 : 863-8. (1995)
17. Dong, H., S.X. Chen, R.M. Kini, and H.X. Xu, Effects of tannins from *Geum japonicum* on the catalytic activity of thrombin and factor Xa of blood coagulation cascade. *J Nat Prod* 61 : 1356-60. (1998)
  18. Gong, DW, Monemdjou S, Gavrilova O, Leon LR, Marcus-Samuels B, Chou CJ, Everett C, Kozak LP, Li C, Deng C et al. Lack of obesity and normal response to fasting and thyroid hormone in mice lacking uncoupling protein-3. *J Biol Chem* 275:16251-16257, (2000)
  19. Guerre-Millo M. Regulation of *ob* gene and overexpression in obesity. *Biomed & Pharmacother* 51: 318-323. (1997)
  20. Han E.G. and Cho, S.Y. Effect of *Codonopsis lanceolata* water extract on the activities of antioxidative enzymes in carbon tetrachloride treated rats. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 26 : 1181-1186, (1997)
  21. Han E.G., Sung, I.S., Moon, H.G. and Cho, S.Y. Effect of *Codonopsis lanceolata* water extract on the water extract on the level of lipid in rats fed high fat diet. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 27 : 940-944, (1998)
  22. Han, JA., SA Kang, RW Choue et al. Free radical scavenging effect of *Diospyros kaki*, *Laminaria japonica* and *Undaria pinnatifida*. *Fitoterapia* 73:710-712. (2002)
  23. Havel PJ. Role of adipose tissue in body-weight regulation. mechanisms regulating leptin production and energy balance. *Proc Nutr Soc* 59(3):359-371. (2000)
  24. Huang, H.C., H.R. Wang, and L.M. Hsieh, Antiproliferative effect of baicalein, a flavonoid from a Chinese herb, on vascular smooth muscle cell. *Eur J Pharmacol* 251: 91-3. (1994)
  25. Huiqing Lu, Zhengbo D, Craig H, KL Catherine J, Anne Buisson, Joseph CD. Obesity due to high fat diet decreases the sympathetic



- nervous and cardiovascular responses to intracerebroventricular leptin in rats. *Brain Res* 47(4):331-335. (1998)
26. Hong, KH., Kang SA, Kim SH, Choue RW. Effects of high fat diet on serum leptin and insulin level and brown adipose tissue UCP 1 expression in rats. *Korean J Nutr* 34(8): 865-871, (2001)
  27. Kang, SA., Hong KH, Jang KH, Kim SH, Jang EK, Kim CH, Choue RW. Effects of low level of levan feeding on serum lepids, adiposity and UCP expression in rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 31(5):788-795, (2002)
  28. Kim, B.J., Y.K. Kim, W.H. Park, J.H. Ko, Y.C. Lee, and C.H. Kim, A water-extract of the Korean traditional formulation Geiji-Bokryung- Hwan reduces atherosclerosis and hypercholesteremia in cholesterol-fed rabbits. *Int Immunopharmacol.* 3 : 723-34.(2003)
  29. Kim, J.B., J.B. Kim, K.J. Cho, G.M. Konig, and A.D. Wright, Antioxidant activity of 3,4,5-trihydroxybenzaldehyde isolated from *Geum japonicum*. *Journal of Food and Drug Analysis* 14 : 190-193. (2006)
  30. Kim J.H. and Chung, M.H. Pharmacognostianl studies on *Codonopsis lanceolata*. *Korean J Pharmacog.* 6 : 43-47, (1975)
  31. Kotnic V, Fleischmann WR Jr. A simple and rapid method to determine hematopoietric growth factor activity. *J Immunol Methods* 129 : 23, (1990)
  32. Mason, D.P., R.D. Kenagy, D. Hasenstab, D.F. Bowen-Pope, R.A. Seifert, S. Coats, S.M. Hawkins, and A.W. Clowes, Matrix metalloproteinase-9 overexpression enhances vascular smooth muscle cell migration and alters remodeling in the injured rat carotid artery. *Circ Res* 85 : 1179-85. (1999)
  33. Mistry, AM. Swcik AG, Romsos DR. Leptin rapidly lowers food intake and elevates metabolic rates in lean and ob/bo mice. *J Nutr* 127:2065-2072, (1997)
  34. Miquel, J., Quintanilha, A. T. and Weber, H. CRC handbook of free radicals and antioxidants in biomedicine, Vol. I -III, CRC Press, Florida.

35. Oliver P, Pico C & Palou A. Differential expression of genes for uncoupling proteins 1, 2 and 3 in brown and white adipose tissue depots during rat development. *Cell Mol Life Sci (CMLS)* 58(3):470-476 (2001)
36. Kang, SA., Hong KH, Kim SH, Jang KH, Kim CH, Choue RW. Effects of dietary levan on adiposity, serum leptin and UCP expression in obese rats fed high fat. *Korean J Nutr* 35(9): 903-911, (2002)
37. Kang, SA., KH Hong, KH Jang, SH Kim, KH Lee, BI Chang, CH Kim, RW Choue. Anti-Obesity and Hypolipidemic Effects of Dietary Levan in High Fat Diet- Induced Obese Rats. *J Microbiol Biotechnol* 14:796-804. (2004)
38. Kang, SA., KH Hong, KH Jang, YY Kim, R Choue, YH Lim. Altered mRNA Expression of Hepatic Lipogenic Enzyme and PPAR in rats fed Dietary Levan from *Zymomonas mobilis* *J Nutr Biochem* 17:419-424. (2006)
39. Lim, BO., K Yamada, BG Cho, T Jeon, AG Hwang, T Park, SA Kang, DK Park. Comparative study on the modulation of IgE and cytokine production by *Phellinus linteus* grown on germinated brown rice, *Phellinus linteus* and germinated brown rice in murine splenocytes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68(11);353-356. (2004)
40. Maeda, K., M. Kuzuya, X.W. Cheng, T. Asai, S. Kanda, N. Tamaya-Mori, T. Sasaki, T. Shibata, and A. Iguchi, Green tea catechins inhibit the cultured smooth muscle cell invasion through the basement barrier. *Atherosclerosis* 166 : 23-30. (2003)
41. Maeng YS, Park HK. Antioxidant activity of ethanol extract from Dodok(*Codonopsis lanceolata*). *Korean J Food Sci Technol* 23(3) : 311-316, (1991)
42. Moon, S.K., G.O. Cho, S.Y. Jung, S.W. Gal, T.K. Kwon, Y.C. Lee, N.R. Madamanchi, and C.H. Kim, Quercetin exerts multiple inhibitory effects on vascular smooth muscle cells: role of ERK1/2,

- cell-cycle regulation, and matrix metalloproteinase-9. *Biochem Biophys Res Commun* 301 : 1069-78. (2003)
43. Moon, S.K., B.Y. Cha, and C.H. Kim, In vitro cellular aging is associated with enhanced proliferative capacity, G1 cell cycle modulation, and matrix metalloproteinase-9 regulation in mouse aortic smooth muscle cells. *Arch Biochem Biophys* 418 : 39-48. (2003)
44. Moon, S.K., B.Y. Cha, and C.H. Kim, ERK1/2 mediates TNF- $\alpha$ -induced matrix metalloproteinase-9 expression in human vascular smooth muscle cells via the regulation of NF- $\kappa$ B and AP-1: Involvement of the ras dependent pathway. *J Cell Physiol* 198 : 417-27. (2004)
45. Orbalan MS, Margareto J, Martinez JA & Marti A. High-fat feeding reduced muscle uncoupling protein 3 expression in rats. *J Physiol Biochem* 55(2):67-72 (1999)
46. Rippe, C., Berger K, Boeirs C, Ricquier D, Erlanson AC. Effect of high-fat diet, surrounding temperature, and enterostatin on uncoupling protein gene expression. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279(2):E293-E300, (2000)
47. Schwartz MW, Woods SC, Porte Jr. D, Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature* 404: 661-671, (2000)
48. Spurlock M.E., Vidwell C.A., Housecknecht K.L, Kuske J.L., Camacho-Rea C., Frank G.R. & Willis G.M. Nutritionally induced adipose hypertrophy in young pigs is transient and independent of changes in the expression of the *obese* and peroxisome proliferation activated receptor genes. *J Nutr Biochem*. 13:112-120. (2002)
49. Suh, S.J., U.H. Jin, H.J. Choi, H.W. Chang, J.K. Son, S.H. Lee, S.J. Jeon, K.H. Son, Y.C. Chang, Y.C. Lee, and C.H. Kim, Cryptotanshinone from *Salvia miltiorrhiza* BUNGE has an inhibitory effect on TNF- $\alpha$ -induced matrix metalloproteinase-9 production and HASMC migration via down-regulated NF- $\kappa$ B and AP-1.



- Biochem Pharmacol 72 :1680-9. (2006)
50. Xu, H.X., F.Q. Zeng, M. Wan, and K.Y. Sim, Anti-HIV triterpene acids from *Geum japonicum*. *J Nat Prod* 59 : 643-5. (1996)
  51. Yamamoto, Y., Takahashi Y, Kawano M, Iizuka M, Matsumoto T, Saeki S, Yamaguchi H. *In vitro* digestibility and fermentability of levan and its hypocholesterolemic effects in rats. *J Nutr Biochem* 10: 13-18, (1999)
  52. Young, M.E., Patil S, Ying J, Depre C, Ahuja HS, Shipley GL, Stepkowski SM, Davies PJA, Taegtmeyer H. Uncoupling protein 3 transcription is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  in the adult heart. *FASEB J* 15:833-845, (2001)
  - 53.. 김종대, 이상영, 김성완. 야생초추출물에 의한 간장내 활성산소생성과 항산화 효소계 조절에 관한 연구. *생약학회지* 28(1), 48-53. (1997)
  54. 이상윤, 식품산업에서 생약자원의 활용과 전망, *식품산업과 영양*, 5(3), p.21-26, (2000)
  55. 박종철 등, 한방생약자원의 기능성식품 소재 개발, *식품산업과 영양*, 5(3): 27-37, (2000)
  56. 차배천, 이성규, 이혜원, 이은, 최무영, 임태진, 박희준. 국내유용식물의 항산화 효과. *생약학회지* 28(1), 15-20. (1997)
  56. (주) 풀무원. 천연식물소재 추출물을 이용한 항혈전 및 고지혈증 억제 조성물, 특허등록 번호 : 10-0319397. (2002)
  57. 영남대학교 산학협력단. 단삼 추출물 및 분획물을 함유하는 동맥경화 증의 예방 또는치료용 조성물, 특허등록번호 10-2006-0111857. (2006)
  58. 한국디디에스제약 . 항비만 및 항콜레스테롤 효과를 나타내는 보이차 조성물. 특허등록번호 10-0443116. (2004)
  59. 주식회사 엠디바이오알파. 항비만 및 항당뇨효과를 보이는 자생식물 추출물. 특허 등록10-2004-0016578. (2004)