

발 간 등 록 번 호

11-1543000-000572-01

기능성 들깨잎 추출물을 이용한 간보호 건강기능식품  
소재 등록 및 제품화 기술개발

(Certification of functional *Perilla Frutescens* extract as  
hepatic protective raw material and its health functional food  
product development)

제 1 세부: 기능성 들깨잎의 제형 및 건강기능식품 등록화  
연구

(Certification and development of functional *perilla frutescens*  
extract)

제 1 협동: 기능성 들깨잎 추출 및 기능성 검증

(Research of functional *perilla frutescens* extract as hepatic  
protective raw material)

(주)바이오버드

농 립 축 산 식 품 부

# 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “기능성 들깨잎 추출물을 이용한 간보호 건강기능식품 소재 등록 및 제품화 기술개발” 과제의 보고서로 제출합니다.

2014 년 09 월 18 일

주관연구기관명 : 바이오버드  
주관연구책임자 : 서 문 영  
1세부연구책임자 : 서 문 영  
연 구 원 : 김 종 탁  
연 구 원 : 한 희  
연 구 원 : 김 진 우  
연 구 원 : 우 용 제  
연 구 원 : 김 용 현  
연 구 원 : 윤 상 욱  
1협동연구기관명 : 고려대학교 산학협력단  
1협동연구책임자 : 이 광 원  
연 구 원 : 홍 충 의  
연 구 원 : 구 윤 창  
연 구 원 : 남 미 현  
연 구 원 : 양 성 용  
연 구 원 : 강 정 한  
연 구 원 : 정 하 영  
연 구 원 : 설 혜 민  
연 구 원 : 양 재 언  
연 구 원 : 정 혜 립  
연 구 원 : 김 세 욱  
연 구 원 : 이 화

# 요 약 문

## 기능성 들깨잎 추출물을 이용한 간보호 건강기능식품 소재 등록 및 제품화 기술개발

### 제 1 세 부 : 바이오버드

#### I. 제 목

기능성 들깨잎의 제형 및 건강기능식품 등록화 연구

#### II. 연구개발의 목적

기존의 깻잎보다 기능성이 강화된 기능성 깻잎을 이용하여 간 보호 효과로 인정되는 건강기능식품개발을 위한 연구를 진행한다. 또한 개별인정형 건강기능식품 기능성원료 등록 신청은 안전성과 기능성이 바탕이 되어야 하기에 이에 대한 사전 자료 연구가 필요하다. 기능성 깻잎의 간 보호 건강기능식품 개발을 통하여 농가의 신소득원과 함께 소비자의 이용 증대를 기할 수 있는 새로운 제품군 연구를 진행한다.

#### III. 연구개발 내용 및 범위

기능성 들깨잎 제품화 연구를 위하여 생산공정, 최적화 확립, 최적 제형연구를 진행하였다. 대량 생산 공정 확립을 위하여 추출, 농축, 건조, 보관 조건 확립과 분말화, 액상 제형, 과립 제형, 환 제형에 따른 최적 제형 조건을 설정하였다. 기능성 들깨잎 추출물의 간 보호 기능성 확인을 위하여 최적의 바이오마커를 선정하고, protocol, Investigator's Brochure (IB) 작성 등 인체적용시험을 위한 관련 서류를 작성한 후 인체시험윤리위원회의 승인을 받았다. 개별인정형 건강기능식품 기능성 원료 등재를 위해서는 안정성과 기능성에 관한 자료 조사와 정리가 필요하며 이를 바탕으로 간 보호 개별인정형 건강기능식품 기능성 원료 등재 신청서를 작성해 한국식품의약품안전처에 신청 진행을 한다.

#### IV. 연구개발결과

기능성 들깨잎 관련 논문, 보고서, 전문서적 및 온라인 전문검색 사이트를 이용하여 기능성, 안전성 및 섭취근거 자료를 얻었으며 이는 개별인정형 건강기능식품 기능성 원료 등록 신청시 필수 자료로 이용된다. 또한, 제품화를 위한 대량 생산 조건 확립을 위하여 추출, 농축, 건

조 등 생산 조건을 확립하였으며, 기능성 들깨잎 추출물을 활용한 다양한 제형 연구를 통하여 최적 제형을 선정하였다. 현재 인체적용시험을 통하여 간보호 기능성을 확인 중에 있으며, 최종적으로 기능성 들깨잎 추출물을 개별인정형 건강기능식품 기능성 원료로 등록될 수 있도록 신청서류를 준비 하고 있다.

## V. 연구성과 및 성과활용 계획

기능성 들깨잎 추출물을 이용한 제품화 개발을 위하여 최적 제형 설정 및 대량 생산 공정의 최적화를 확립하였으므로 산업 현장에 조건을 제공하여 경제적 이익 창출에 이바지 할 것으로 기대된다. 또한, 기능성 들깨잎 추출물이 간보호 기능성을 지닌 개별인정형 건강기능식품 기능성 원료로 등록되면 기업의 이득 창출과 소비자의 건강증진, 수출을 통한 외화 증대에 기여할 것이라 기대한다.

### 제 1 협동 : 고려대학교 이광원

#### I. 제 목

기능성 들깨잎의 추출 및 기능성 검증

#### II. 연구개발의 목적

기능성 들깨잎의 최적 추출 조건 설정 및 간 보호 기능성을 검증하여 개별인정형 건강기능식품 기능성 원료로 등록 신청을 하고자 한다. 이를 위하여 기능성 들깨잎 추출물의 간 보호 활성을 다양한 *in vitro*, *in vivo* 실험을 통하여 검증하고 기능 성분의 표준화 및 기준 규격을 설정하고자 한다.

#### III. 연구개발 내용 및 범위

기능성 들깨잎 추출물의 추출 연구를 통하여 간 보호 기능성을 지니는 물질의 최적 추출 조건을 설정하고 *in vitro* 실험을 통하여 간 보호 활성을 확인한다. 또한 다양한 스트레스를 통하여 유도된 간 손상에 대하여 기능성 들깨잎 추출물의 보호 활성을 *in vivo* 상에서 혈청 생화학적, 조직 생화학적 방법을 통하여 확인한다. 또한, 기능성 들깨잎의 지표 물질 표준화 및 기준 규격 설정도 실시한다.

#### IV. 연구성과 및 성과활용 계획

기능성 들깨잎 열수 추출물에서 간 보호 기능을 지니는 지표 물질인 caffeic acid와 rosmarinic acid임을 검증하였다. in vitro 실험으로 간 세포주를 이용하여 검증을 실시한 결과 기능성 들깨잎 추출물과 지표 물질의 간 보호 활성을 확인하였다. 또한 랫드를 이용한 in vivo 모델 실험에서도 기능성 들깨잎 추출물 투여 그룹은 다양한 간 손상 스트레스에 대하여 높은 간 보호 활성을 나타냈다. 기능성 들깨잎 추출물을 개별인정형 건강기능식품 기능성원료 등록 신청을 위해 일반성분, 칼로리, 중금속, 농약, 미생물에 대한 기준규격을 설정하였다.

## V. 연구활용 계획

본 연구에 관한 이론을 기초로 “랫드에서 t-BHP 유발 산화스트레스에 대한 기능성 들깨잎 열수 추출물의 간 보호 효과”의 제목으로 “한국식품위생안전성학회지”에 게재 하였으며, 해외 저널(SCI/SCIE)에 2 편의 논문이 투고 중에 있으며 2 편 더 투고 준비 중이다. 기능성 들깨잎의 간보호 활성에 대한 특허로 “기능성 들깨잎 추출물을 함유하는 간 보호 및 간 질환 예방 및 치료용 조성물”이 특허 등록(10-1317551)되었다. 또한, 본 연구 결과를 해외 학회에 참석하여 총 6회 학술 발표하였다.

본 연구 결과를 바탕으로 건강기능식품 소재 등록을 통한 간보호 건강기능식품 제품화를 한다면 농가에 부가가치를 창출 할 수 있으며, 더불어 국가경쟁력을 제고 시킬 수 있을 것으로 사료된다.

## SUMMARY

<Certification of functional *Perilla Frutescens* extract as hepatic protective raw material and its health functional food product development>

### Part 1 : Biobud, Young Seomun

#### **I . The title of study**

Certification and development of functional *perilla frutescens* extract

#### **II . The purpose of the study**

In this research, the certification and development of functional *perilla* leaf as hepatic protective effect are given. In addition, for enrollment of functional *perilla* leaf extract as health functional food, related study is needed to establish safety and functionality. This research is focused on the functional *perilla* leaf of which it is expected to bring a new source of incomes for agricultural producer, meanwhile, the consumption is going to be raised.

#### **III . The content and the scope of the study**

We research the optimizing production process of functional *perilla* leaf extract as well as optimum condition based on extraction, concentration, drying and storage conditions. In addition, we tested the stability of various formulations such as powder, liquid dosage forms, tablet and capsule. To evaluate the hepatic protective effect of functional *perilla* leaf, we chose optimal biomarker. This study was approved by Institutional Review Board of Ewha Woman University after development of protocol and Investigator's brochure. Enrollment of raw material of health functional food ingredients is prepared and applied to Ministry of Food and Drug Safety.

#### **IV. The result**

Using papers, reports, specialty publications and online professional search sites about functional perilla leaf, we obtain functionality, safety and intake-based data. These data are essential factor for enrollment of functional perilla leaf extract as raw material of health functional food. Also, we choose the optimal condition of extraction, concentration and drying to develop the health functional food. Finally, we applied for enrollment of functional perilla leaf extract as raw material of health functional food in Ministry of Food and Drug Safety for proceeding formal enrollment.

#### **V. The outcome of the study and further plans**

We expect to contribute to create economic benefits by providing conditions to industry because of established optimization of process and dosage form of functional perilla leaf extract. In addition, we expected that if functional perilla leaf extract is enrolled as raw material of health functional food as hepatic protective effect, which will contribute to create the benefit of agriculture industries and health of consumers.

### **Part 2 : Korea University, Lee Kwang Won**

#### **I. The title of study**

Research of functional perilla frutescens extract as hepatic protective raw material

#### **II. The purpose of the study**

This research is to apply for functional perilla leaf extract as functional ingredient for hepatic protection health functional food. Hepatic protective effect of functional perilla leaf extract will be veriflicated *in vitro* and *in vivo* and standardized the functional compound in perilla leaf.

#### **III. The content and the scope of the study**

We established the optimal extract condition of hepatic protective compound in perilla to research the extraction process and confirmed the hepatic protective effect of functional perilla leaf extract *in vitro*. We measured the protective effect of functional perilla leaf extract using serum and tissue biochemical method on various material-induced hepatic

stress in rat liver. In addition, functional compound of functional perilla leaf was established and standardized.

#### **IV. The result**

We verified that the active compounds of functional perilla leaf extract, which are caffeic acid and rosmarinic acid by HPLC-MS. In vitro hepatic protection activities of the major compound in functional perilla leaf were measured, and the compounds had high hepatic protection activities. Also, in vivo experiments, functional perilla leaf extract administration group showed the protective effect against various hepatic stress compared with the non-treated group. In addition, the standards of general composition, calories, heavy metal content, agricultural pesticides content and microorganism about functional perilla leaf extract were established for the enrollment of raw material of health functional food ingredients.

#### **V. The outcome of the study and further plans**

The theory of this research was published at "Journal of Food Hygiene and Safety, 29(2), 146-151, (2013)" with the title "Protective Effect of Functional *Perilla frutescens* Hot-water Extract Against *tert*-butyl hydroperoxide-Induced Liver Oxidative Damage in Rats", and paper with title "*Perilla frutescens* Modulates CYP1A1/2 and HO-1 and Activates Nrf2 in Oxidative Stress-induced Hepatotoxicity" was submitted to "Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry" and "Caffeic acid inhibits the uptake of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine by inducing the efflux transporters expression in Caco-2 cells" was submitted to "Biological and Pharmaceutical Bulletin". In addition, the patent of this research is registration of a license with the title "Liver protection, liver disease prevention and treatment composition which contains functional *perilla* extract" (10-1317551).

Based on the results of this study, these data will help register raw material of health functional food. And finally, we expect that functional perilla leaf extract which has hepatic protective effect, contribute to promoting national health by preventing life style diseases.



# CONTENTS

<b>Chapter 1 Outline of the Study</b> .....	<b>10</b>
Section 1. Objectives of the Research .....	10
Section 2. Needs of the Research .....	10
1. Technology Aspect .....	10
2. Industry and Economic Aspect .....	12
Section 3. Research Scope .....	15
<b>Chapter 2 Status of Technology Development at Home and Aboard</b>	<b>16</b>
Section 1. The Domestic and Abroad Standards .....	16
Section 2. Analysis of Patent .....	16
Section 3. Analysis of Paper .....	18
Section 4. Analysis of Products and Market .....	19
<b>Chapter 3 Research Content and Results</b> .....	<b>21</b>
Section 1. Certification and development of functional <i>perilla frutescens</i> extract .....	21
Section 2. Research of functional <i>perilla frutescens</i> extract as hepatic protective raw material .....	44
<b>Chapter 4 Goal Achievement and Contribution to Related Industries</b>	<b>94</b>
Section 1. Achievements of Goals and Contributions .....	94
Section 2. Technology Aspect .....	96
Section 3. Industry and Economic Aspect .....	96
Section 4. Social and Cultural Aspect .....	97
<b>Chapter 5 Result of the Study and Application Plan</b> .....	<b>98</b>
Section 1. A Patent Registration .....	98
Section 2. Paper .....	99
Section 3. Academic Presentation .....	101
Section 4. Other Application Plans .....	103
<b>Chapter 6 International Science and Technology Information Gathered     in the Process of the Study</b> .....	<b>104</b>
<b>Chapter 7 References</b> .....	<b>126</b>

# 목 차

<b>제 1 장</b>	<b>연구개발과제의 개요</b> .....	<b>10</b>
제 1 절	연구개발의 목적 .....	10
제 2 절	연구개발의 필요성 .....	10
1. 기술적 측면	.....	10
2. 경제 · 산업적 측면	.....	12
제 3 절	연구개발의 범위 .....	15
<b>제 2 장</b>	<b>국내외 기술개발 현황</b> .....	<b>16</b>
제 1 절	연구관련 국내외 기술수준 비교 .....	16
제 2 절	특허 분석 .....	16
제 3 절	논문 분석 .....	18
제 4 절	제품 및 시장 분석 .....	19
<b>제 3 장</b>	<b>연구개발수행 내용 및 결과</b> .....	<b>21</b>
제 1 절	기능성 들깨잎의 제형 및 건강기능식품 등록화 연구 .....	21
제 2 절	기능성 들깨잎 추출 및 기능성 검증 .....	44
<b>제 4 장</b>	<b>목표달성도 및 관련분야에의 기여도</b> .....	<b>94</b>
제 1 절	연구개발의 달성도 및 기여도 .....	94
제 2 절	기술적 측면 .....	96
제 3 절	경제 · 산업적 측면 .....	96
제 4 절	사회 · 문화적 측면 .....	97
<b>제 5 장</b>	<b>연구개발 성과 및 성과활용 계획</b> .....	<b>98</b>
제 1 절	특허 등록 .....	98
제 2 절	논문 .....	99
제 3 절	학술 발표 .....	101
제 4 절	인력 양성 .....	102
제 5 절	연구개발결과의 활용방안 .....	103
<b>제 6 장</b>	<b>연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보</b> .....	<b>104</b>
<b>제 7 장</b>	<b>참고문헌</b> .....	<b>126</b>

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1 절 연구개발의 목적

연구개발 최종목적 : 기능성 들깨잎 추출물을 이용한 간보호 건강기능식품 개발	
기능성 들깨잎 추출물 제형 및 건강기능식품 등록화 연구	<ul style="list-style-type: none"> <li>▣ 기능성 들깨잎 추출물 원료의 안정성 확인</li> <li>▣ 최적 제형 연구 및 안정성 검증</li> <li>▣ 인체실험을 통한 소재의 기능성 확인</li> <li>▣ 건강기능식품의 기준/규격 인정에 관한 허가 자료 작성</li> </ul>
기능성 들깨잎 추출 및 기능성 검증	<ul style="list-style-type: none"> <li>▣ 기능성 들깨잎 추출물의 대량생산을 위한 최적 추출조건 정립</li> <li>▣ 기능성 들깨잎 추출물의 간보호 기능성 검증</li> <li>▣ 기능성 들깨잎 유효성분의 표준화 및 기준규격 설정</li> <li>▣ 건강기능식품의 기준/규격 인정에 관한 허가 자료 작성</li> </ul>

## 제 2 절 연구개발의 필요성

### 1. 기술적 측면

▣ 기능성 물질 발굴 및 이용 기술은 차세대 핵심사업인 바이오산업의 원천소재 확보와 다양한 농업자원의 추출물 이용을 통한 신규 산업제품 창출이 가능하여 시장 잠재력이 매우 높다.

### ▣ 천연물 소재 시장의 급부상

- 천연물소재는 예로부터 약초로서 치료나 약술 등 평소에 마시는 음료에도 포함된다. 국내에서도 천연물 소재에 대한 소비자 선호도가 증가하고 있지만 아직까지 대부분 수입에 의존하고 있고 우리나라 자생식물을 이용한 연구 및 제품화는 극히 제한되어 있어 이에 대한 기술개발이 요구된다.

- 국내 자생식물의 항산화력은 물론, 간보호, 지질대사 조절 등의 다양한 효과가 알려지고 있어서 새로운 약리기능을 가진 소재로서도 주목을 받고 있으나, 최근 사회적으로 큰 문제가 되는 성인병 질환에 대한 예방 효과를 가지고 있는 기능성 소재에 대한 연구는 거의 전무한 실정이므로 항산화, 지방간보호, 지질대사조절 등의 성인병 질환에 대한 효능과 안전성을 검증하면 식의약품 천연소재로 개발할 수 있을 것으로 예상

된다.

- 기능성 물질 발굴 및 이용 기술은 차세대 핵심사업인 바이오산업의 원천소재 확보와 다양한 산림자원의 추출물 이용을 통한 신규 산업제품 창출이 가능하여 시장 잠재력이 매우 높다.

■ 인체의 간은 영양소 및 물질 대사와 해독을 담당하는 중요한 장기로 지질과산화, 식품의 독소, 항생물질, 간독성 약물 등의 영향을 크게 받는다.

- 많은 화학물질은 세포 내에서 에너지를 생산하는 미토콘드리아를 손상시킨다. 미토콘드리아의 기능 장애는 과도한 산화제를 방출하며 또한, CYP2E1과 같은 시토크롬 P-450 내부의 일부 효소가 활성화되어 산화스트레스를 초래한다. 간세포의 손상은 간 내부의 담즙산을 축적시키며, 이로부터 간 손상이 촉진된다.

■ 간염, 간경화, 간암 등의 간질환은 한국인에 있어서 암, 당뇨병과 함께 가장 발생빈도가 높은 것으로 알려져 있으며 특히 간암에 의한 사망률은 세계에서 가장 높은 것으로 조사되었다.

■ 간보호 개선용 건강기능식품 개발 연구의 필요성

- 우리나라는 간 질환으로 인한 의료비 지출 및 사망률이 매우 높다. 간 병변이 있는 사람들을 48개월간 추적 조사한 연구결과에 의하면 지방간 소지자의 30%, 간 경변 환자의 50%, 간 경변과 알코올성 간염을 가진 환자의 2/3가 사망하였다(Chedid et al. (1991) Prognostic factors in alcoholic liver disease. *Am J Gastroenterol* 86:210~216). 이 수치는 다양한 조직에서의 암보다도 심각한 것으로 보이나 그 심각성에 비해 간과되고 있는 현실이다.
- 현재 사용되고 있는 대부분의 치료제는 일반적인 고지혈증 치료제로서 알콜성 지방간 또는 대사질환 개선에 특이하게 초점을 맞춘 제품은 개발된 바가 없다.

■ 건강기능식품의 원료의 소재개발은 미흡하여 다양한 제품 개발이 어렵고, 다양한 질병 발생에 대한 현재 고시형 제품으로는 그 다양성을 극복하기 어려우므로, 다양한 천연물 소재를 발굴하여 개별인증 품목을 확대하려는 연구투자가 필요하다.

■ 들깨는 꿀풀과의 일년생 초본이며, 원산지는 한반도를 포함한 동부아시아 고원지대이다. 농사집요(農桑輯要, 1273년)에 처음으로 기록되었고 참깨보다도 재배역사가 오래며, 고서에는 임(荏), 임자(荏子), 수임(水荏), 수소마(水蘇麻), 유마(油麻), 지마(脂麻) 등으로 불렸다.

■ 들깨는 우리 민족 전통식품으로 들기름, 들깨묵, 들깨잎 등은 우리들의 건강을 지켜왔고, 독특한 향미를 주는 들깨의 잎은 우리 민족이 가장 즐겨 애용하는 대표식품이며 세계에

자랑할 수 있는 훌륭한 기능성식품이라 할 수 있으나 단순히 생식으로만 소비되고 있는 소비형태와 수확시기의 잉여품에 대한 저장성의 문제로 저가 소득 작목으로 인식되고 있다.

- 들깨잎의 주요 성분물질로 로즈마리닉산(rosmarinic acid), 안토시아닌, 카페인산(caffeic acid) 등이 보고된 바 있음. 이들 성분은 수용성 성질이 높기 때문에 섭취하였을 경우 높은 체내 이용률을 기대할 수 있으며 특히 카페인산은 섭취하였을 경우 소장 흡수율이 95% 이상이다.
- 본 연구진은 선행연구를 통해 들깨잎의 주요 성분인 카페인산의 추출·정제에 관한 특허를 가지고 있으며, 들깨잎 추출물의 간보호 효과에 대한 논문을 발표하였다. 또한 선행과제(iPET: 고기능성 깻잎 개발 및 기능성 제품개발, 종료일: 2011.06.24)를 통하여 밀양시 농업기술센터와 연계를 통하여 고기능성 들깨잎 재배 방법 연구를 진행하였으며, 일반 들깨잎에 비해 항산화 능력, 간보호 활성이 뛰어난 것을 확인하였다.
- 따라서 본 연구진은 간보호 활성이 높아 산업화 가능성이 뛰어난 기능성 들깨잎을 이용하여 간보호 기능성 성분 증가 및 안전성을 확보하고 기업체의 제품개발 참여로 개발기술을 산업화시켜 기능성식품 개별인정형 원료 승인을 통한 실용화를 시키고자 한다.

## 2. 경제·산업적 측면

- 기능성·안전성 원천 기술이 확보된 식물성 가공 소재를 이용한 개별인정형 건강기능성 식품의 개발은 농업발전과 국민 건강 증진에 이바지 할 수 있다.
- 건강기능성식품 시장은 건강을 추구하는 소비자 욕구 반영으로 인해 다양한 상품이 계속 출시되어 확대될 전망이다.
- 천연물 소재의 추출물은 항산화, 항치매, 신경안정, 항균, 항바이러스 등의 다양한 생리활성 효과가 있어 새로운 약리기능을 가진 선도 물질로서도 주목받고 있다.
- 국내 농산물을 이용한 고기능 고부가가치 기능성 식의약 소재개발 필요성이 증가하고 있다.
  - WTO 체제 및 FTA 협정에 따른 국제적 경쟁시대에 국내 자생 식물의 기능성·안전성 확보 연구가 중요해졌다. 선진국형화 되고 있는 국민의 생활패턴에 부합하기 위해서도 국내 농산자원을 활용한 우수 건강기능소재 생산은 필요한 분야임에도 불구하고 연구(기초 및 응용)가 거의 이루어지고 있지 않은 실정이다.

- 2004년 건강기능식품법이 발효되면서 상품의 건전성은 개선되었으나 시장진입은 다소 어려운 상태로 차별성 있는 연구주제 및 기법의 도입이 필요하다.
- 이미 성숙기에 도달한 선진국의 건기식 산업이 국내 시장으로 진입함에 따라 이들과도 경쟁해야하는 상태이다. 기존의 효능 위주의 연구 개발에서 벗어나 오믹스 기술 등의 최첨단 기법을 이용한 연구개발은 국제 경쟁력을 높이고 향후 국내 건기식 관련 산업이 살아남을 수 있는 대응책이 될 수 있다.

■ 우리나라는 OECD (경제협력개발기구) 34개 회원국 가운데 술을 가장 많이 마시는 나라인 것으로 조사됐으며 소주 등 독주의 소비량은 한국을 제외한 나머지 OECD 회원국 평균 소비량의 5.6배에 이른다. 이 음주 때문에 발생하는 연간 경제 사회적 손실 규모 또한 수 조 원으로 추산된다.

■ 최근 음주 문화의 사회적 추세와 신약 개발에 대한 관심의 고조에 부응하여 음주 후 발생하는 숙취를 감소 및 제거하고자 몇몇 의약품이 개발되었으나 이들 자체의 독성이나 부작용이 나타남으로 보다 안전한 천연물을 이용한 건강기능식품의 개발에 많은 관심이 모아지고 있다.

■ 2006년 국내 숙취해소 음료시장 규모는 2005년 720억원에서 27% 증가한 약 920억원 대를 기록하였다.

- 1992년 첫 출시된 「컨디션」이 2006년 말에 490억원의 매출을 올려 70%에 가까운 시장점유율을 보이며 1위를 차지하였고, 그레미의 「여명808」이 290억원의 매출을 올려 2위, 그리고 동아제약의 「모닝케어」가 140억원 매출로 3위를 차지하였다.

■ 국내외에서 숙취해소 음료 제품들이 개발되어 판매되어 왔으나, 이들 식품소재의 정확한 작용기전, 그리고 장기 섭취 시 영양소균형에 미치는 영향에 관한 연구는 매우 미비한 실정이다.

■ 현대인들의 서구적인 식생활 패턴의 변화는 여러 가지 만성질환 및 성인병의 발생을 증가시켰으며, 활성산소는 이런 질병의 주원인으로 주목받고 있다. 또한 산업의 발달로 인하여 과거에 비하여 유해 화학 물질 또는 독성 물질에 노출되는 경우가 많다. 이에 적응하여 생존하도록 인체는 간의 해독 작용과 면역력을 지니고 있다.

■ 인체의 대부분의 해독작용은 간에서 이루어지며 다양한 물질에 의한 산화스트레스로부터 노출되기 때문에 간 보호에 대한 관심이 증가하고 있는 실정이다.

■ 현재 국내에 자생하는 식물로부터 분리·정제한 간 보호의 생리활성 물질은 고부가가치

를 갖는 생물 산업에서 세계적인 경쟁력을 가지고 있다.

- ▣ 간 손상 치료제는 장기간 복용이 필수적이고 약물 작용부위가 손상된 간이므로 유기 합성 품보다는 부작용이 적은 천연물 유래의 기능성 신소재 개발이 전략적으로 유리하다. 또한, 적절히 치료되지 않은 만성 간질환의 대부분은 간암으로 발전하게 되므로 이들 간손상 억제 활성 물질이 간암과 같은 만성 간질환의 예방에 매우 효과적일 것으로 예상된다. 그리고 한국인에게 높은 빈도로 발생하는 간 질환의 손상 억제 및 예방 기능을 갖는 소재 개발은 시급히 해결해야할 중대한 과제다.

### 제 3 절 연구개발의 범위

<p>기능성 들깨잎 추출물 제형 및 건강기능식품 등록화 연구</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 문헌 및 데이터베이스를 통한 기능성 들깨잎 기초 자료 수집</li> <li>■ 최적 제형을 위한 기능성 들깨잎 추출물의 물리·화학적 특성 확인 및 기초 제형 설정</li> <li>■ 각 제형에 따른 온도, 열, pH 등의 환경요인에 대한 안정성 연구 진행</li> <li>■ 기능성 유지 및 유효성분의 최대 확보를 목적으로 추출 공정별 조건을 표준화</li> <li>■ 유효성 평가자료를 기초로 한 인체적용시험 설계 및 IRB 승인</li> <li>■ 간보호 기능성 바이오마커의 측정을 통한 임상수준에서 기능성 검증</li> <li>■ 기능성 들깨잎 추출물을 이용한 제형에 따른 건강기능식품 시작품 제작</li> <li>■ 개별인정형 건강기능식품의 신청에 필요로 하는 자료의 작성</li> </ul>
<p>기능성 들깨잎 추출 및 기능성 검증</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 용매와 시간 등의 변수를 달리하여 들깨잎으로부터 간보호 기능을 가지는 물질을 대량추출하는 최적 추출조건 확립</li> <li>■ 간보호 기능성 효과와 기능성 들깨잎 추출물 투여량과의 유효성 확인</li> <li>■ 간세포의 세포주인 HepG2를 이용하여 들깨잎 추출물이 산화스트레스, 알코올성 스트레스에 대한 보호정도를 세포 수준에서 검증</li> <li>■ 밀양시 농업기술센터와의 연계를 통한 기능성 들깨잎을 확보하고 기능성과 안전성 시험에 필요한 기능성 추출물 확보</li> <li>■ 랫드를 이용하여 들깨잎 추출물이 알콜성 손상으로부터 간보호 효과를 혈액학적 조직학적 검사를 통한 검증</li> <li>■ 지표물질의 농도별 HPLC 분석을 통한 지표물질 표준화 및 대량 정제법의 수율 확립, 잔류농약, 잔류 중금속, 잔류용매 측정, 미생물 검사</li> </ul>



## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 1 절 연구관련 국내외 기술수준 비교

개발기술명	관련기술 최고보유국	현재 기술수준		기술개발 목표수준	비고
		우리나라	연구신청팀		
기능성 들깨잎 추출물의 제형 및 건강기능식품 등록화 연구	미국	40%	80%	100%	
기능성 들깨잎 추출 및 기능성 검증	미국	60%	80%	100%	

### 제 2절 특허분석

#### 1. 특허분석 범위

대상국가	국내, 국외(미국, 중국)
특허 DB	특허정보원 DB( <a href="http://www.kipris.or.kr">www.kipris.or.kr</a> )
검색기간	최근 5년간
검색범위	제목 및 초록

2. 특허분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

개발기술명		깻잎 추출물을 이용한 간보호 활성 물질 확보	간보호 활성을 지니는 소재 개발
Keyword		깻잎	hepatoprotective, plant
검색건수		202	313
유효특허건수		5	62
핵심특허 및 관련성	특허명	깻잎 추출물을 포함하는 비만 예방 및 치료용 약학적 조성물 및 기능성 식품	구기자로부터 분리된 간보호 활성을 갖는 신규 피롤유도체 및 이를 함유한 조성물
	보유국	대한민국	대한민국
	등록년도	2006.11.3	2005.3.10
	관련성(%)	30%	40%
	유사점	깻잎 추출물을 유효량으로 포함하는 기능성 식품	구기자로부터 분리된 화합물을 통한 간질환 치료 및 예방에 유용한 약학 조성물로서 사용 가능
	차이점	비만 예방에 관한 조성물을 확인하였지만, 간보호에 관련된 활성을 확인하지 않음	깻잎으로부터 간기능 보호 효과를 확인한 것이 아님
핵심특허 및 관련성	특허명	들깻잎으로부터 $\gamma$ -GCS의 활성을 증가시키는 카페인산을 제조하는 방법, 그로부터 제조된 카페인산, 및 상기 카페인산을 포함하는 식품 조성물 및 약학 조성물	헛개나무 목질부로부터 분리된 간 보호활성을 갖는 저급알콜 불용성 추출물, 이로부터 분리된 다당체 및 이를 함유하는 조성물
	보유국	대한민국 (본연구팀)	대한민국
	등록년도	2009.12.02	2003.10.23
	관련성(%)	70%	50%
	유사점	$\gamma$ -GCS의 활성을 증가시켜 간 기능을 향상시키며 강력한 항산화 효능을 갖는 카페인산을 제조하고 카페인산을 포함하는 식품 및 약학 조성물을 제공	간염, 지방간, 간경화와 같은 간질환, 간독성 및 피로 해소와 숙취의 치료 및 예방을 위한 약학 조성물 및 건강보조식품으로서 유용하게 사용
	차이점	Diaion-HP20 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 활성물질의 추출 수율을 높이는 것이 필요함.	깻잎으로부터 간기능 보호 효과를 확인한 것이 아님

### 제 3 절 논문분석

#### 1. 논문분석 범위

대상국가	대한민국, 미국, 중국, 유럽
논문 DB	pubmed DB( <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">www.ncbi.nlm.nih.gov</a> ), 국회도서관( <a href="http://www.nanet.go.kr">www.nanet.go.kr</a> )
검색기간	최근 5년간
검색범위	제목, 초록 및 키워드

#### 2. 논문분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

개발기술명	갯잎 추출물을 이용한 간보호 활성 물질 확보	간보호 활성을 지니는 소재 개발	
Keyword	Perilla frutescens	hepatoprotective, plant extract	
검색건수	72	373	
유효논문건수	19	228	
핵심논문 및 관련성	논문명	Protective effect of aqueous extract of Perilla frutescens on tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative hepatotoxicity in rats  Hepatoprotective effect of Hypericum japonicum extract and its fractions	
	학술지명	Food and Chemical Toxicology  Journal of Ethnopharmacology	
	저자	Min-Kyung Kim, Huyn-Sun Lee, Eun-Jin Kim, Nam-Hee Won, Young-Min Chi, Byoung-Chul Kim and Kwang-Won Lee (본 연구진)  Wang N, Li P, Wang Y, Peng W, Wu Z, Tan S, Liang S, Shen X, Su W.	
	게재년도	2007	2007
	관련성(%)	80%	40%
	유사점	갯잎 열수추출물이 간세포인 HepG2 cell line을 이용하여 간의 산화 스트레스를 감소시키는 것을 확인.	Hypericum japonicum의 열수추출물은 항 간독성, 항 콜레스테롤 효과를 입증함. 간보호 활성을 갖는 주요 물질은 astilbin, quercetrin, isoquercetrin, cynanchocerin, quercetin임.
	차이점	지표물질을 밝혀 내지는 않음	갯잎으로부터 간기능 보호 효과를 확인한 것이 아님

## 제 4 절 제품 및 시장 분석

### 1. 생산 및 시장현황

#### 가. 국내 제품생산 및 시장 현황

- 국내 깻잎 생산량은 밀양이 50%를 차지하며 금산과 대구에서도 재배되고 있으나, 겨울철에는 밀양에서 전체 생산량의 90%를 차지하고 있다.(밀양시 깻잎연합회)
- 최근 급등하는 원자재 가격과 고유가로 인하여 깻잎재배 농가에서 해외로 수출을 하고 있는 추세이며, 우수농산물관리제도(GAP) 인증을 받아 해외 시장으로 진출하기 위한 까다로운 검역절차와 상품성 유지 문제를 해결하였다.(국립농산물품질관리원)
- 깻잎은 대부분 찜과 같이 생채소로 섭취하고 있고 국내에서 생산되고 있는 깻잎 제품으로는 김치, 장아찌, 면 등의 밑반찬이 있으며 깻잎 통조림 제품이 시중에 출시되어 있다.
- 깻잎의 기능성을 활용한 제품은 없는 것으로 보이며 2009년 식약처에서 깻잎 추출물(PF501)이 체지방을 감소에 도움을 준다고 인정(인정번호 제 2009-83호)하였으나 이를 이용한 제품은 아직 개발되지 않았다.
- 최근 들어서 급격한 환경오염, 불규칙한 식사, 스트레스, 피로 및 식습관의 서구화로 인한 영양섭취의 불균형으로 면역력이 저하되고 있고, 특히 약물과 이물질의 대사과정을 통해 생성되는 독성물질로부터 신체를 보호하는 간의 기능이 손상되어 만성간염, 간경변 및 간암 등이 현대인들에게 큰 위협이 되고 있어 간보호에 대한 관심이 높아지고 있다.
- 식약처의 개별인정 받은 건강 기능성 식품으로는 알콜성 손상으로부터 간보호 효과에 탁월하다는 헛개나무 열매(제2008-55호, 제2009-86호) 뿐 아니라 복분자나 표고버섯 균사체들도 간보호 효과를 인정받고 있고, 음료나 차, 의약품 등 다양한 간보호 제품이 출시되고 있으며 이 중 차, 의약품, 숙취해소 음료, 유산균 음료에 이르기까지 헛개나무 열매를 이용한 간보호 제품이 가장 많이 출시되고 있다.(식약처)

#### 나. 국외 제품생산 및 시장 현황

- 깻잎은 일본 내 생산이 미미한 수준이기 때문에 국내에서 생산되는 깻잎을 수입하고 있으며, 이는 우리나라 신선채소류 대일수출의 1/6을 차지하고 있으며 수출액이 2006년에 373천불, 2007년에 126천불, 2008년엔 2007년 대비 약 20%정도 수출이 확대되었다.

- 중국이나 일본에서도 깻잎이 생산되고 있으나 대부분 향신료로 사용하고 있으며, 국외에서 판매되고 있는 깻잎 제품은 국내에서 수출된 깻잎 장아찌가 있으며 이는 한국식품점에서 판매되고 있다.
- 국외 역시 다양한 천연식품들로부터 간보호 활성을 확인한 논문이 많이 보고되고 있으며, 간보호 제품으로는 아티초크추출물이 함유된 의약품이나 중국의 영지버섯 차 등 다양한 간보호 제품이 출시되고 있다.

## 2. 개발기술의 산업화 방향 및 기대효과

### 가. 산업화 방향

- 깻잎의 주된 산지는 밀양이며 맛과 향, 영양소가 뛰어나고 가격이 저렴하여 한국인이 즐겨 먹는 채소 중의 하나임. 깻잎을 이용한 제품보다는 신선채소로서의 이용률이 높으며 항산화, 항염증, 항암효과 등에 관한 연구들이 보고되었으나, 이들 기능성에 대한 개별인정형 등록에 관한 건은 아직 없다.
- 다양한 천연 추출물을 이용한 간기능 개선 및 보호 제품이 많이 출시되고 있으나 깻잎을 이용한 간보호 건강기능 식품은 없다.
- 깻잎의 간보호 활성에 관한 연구는 아직 미비한 실정임. 본 연구진은 이전에 깻잎의 간보호 활성에 관한 연구를 진행해왔으며, 선행연구결과를 기반으로 하여 깻잎으로부터 간보호 활성을 지니는 물질의 추출법을 개발·확립하여 제품화를 기대하며 개별인정형 등록을 하고자 한다.

# 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

## 제 1 절 : 기능성 들깨잎의 제형 및 건강기능식품 등록화 연구

(제1세부: 바이오버드 서문영)

### 1. 문헌 및 데이터베이스를 이용한 기능성 들깨잎 기초자료 수집

#### 가. 섭취 근거 자료 (식품원재료 검색엔진)

12. 8. 1.

☞ 식품원재료 검색 ☜

식품원재료  
SEARCH ENGINE 2004

식품원재료 검색엔진

<b>원재료명(영문명)</b>	<b>들깨</b>
<b>이명</b>	백소, 수염, 아염, 일자, perilla
<b>학명</b>	<i>Perilla frutescens</i> Britton var. <i>japonica</i> Hara
<b>생약명</b>	한자(漢字)-한자
<b>기형</b>	
<b>식용가능여부</b>	가능
<b>관련용제여부</b>	사용가능임료
<b>용도(비용부위)</b>	식용(비엿)
<b>용·식물 분류</b>	식물

<b>식용 근거</b>	1. 식품안전 원재료분류에 유지식물류도 분류
<b>분포 및 특성</b>	한국·중국·인도·일본 등지에서 재배하고 있다. 인도의 고지(高地)와 말라카 반도 등이 원산지이며, 한국에는 울진·신라시대에 걸쳐와 함께 들깨를 재배한 기록이 있는 것으로 보아 옛날부터 전국적으로 재배된 것으로 보인다. 낮은 지대의 엷가 근초에 아열으로 자란다. 높이는 40~80cm이다. 말기는 네모지고 곧게 서며 간 밑에 있다. 잎은 마주나고 대강 모양 결실으로 보색하여 밑부분은 둥글다. 잎은 길이 7~12cm, 너비 5~8cm로 끝이 가 있고 환형은 녹색이지만 뒷면에는 자줏빛이 든다. 꽃은 8~9월에 수상꽃차례를 이루고 흰색이며 작은 엷술 모양의 통꽃이 많이 핀다. 꽃받침은 길이 3~4mm이고 위쪽은 5개로, 아래쪽은 2개로 갈라진다. 화관은 길이 4~5mm로 아랫입술꽃잎이 약간 길며 4개의 수술 통 8개가 있다. 열매는 분과(分果)로서 꽃받침 안에 들어 있으며 둥글고 지름 2mm 정도로 밑에 그물무늬가 있다. 확실히 통통은 있으나 열매의 형태와 특성에 따라 열매로 나누는데, 한국에서는 거의 갈색통을 재배하고 있다. 유로라클로 재배하여, 잎이 특이한 냄새가 있으며 식용한다. 향기에 서 재닌 기름은 용도가 많다. 이렇게도 특이한 니스라클로 인체용량으로 양수용구일과의 혼용, 고마드레누 통해 킬로로 쓰인다. 또 특이한 기름을 먹어 유지 증진제로 쓰기도 한다. 맛은 사료와 비료가 된다. 열매에는 40% 정도의 건실유가 들어 있다. 열매는 0.8% 정도의 휘발성 기름이 들어 있는데 그 주성분은 페닐라테론 C13H14O2로서 특이한 냄새가 난다.
<b>주요성분(부위별)</b>	식물성 섬유인 L-페릴알데하이드(L-perillaldehyde), L-리모넨(L-limonen), 페닐라테론(perillalbetone) 등이 0.3~0.8%나 들어 있어서 특이한 향기를 낸다. 각각 비타민도 풍부하여 유리 아미노산이 12종 가량 들어 있다. 열매의 통실 때에는 40~45%의 지방이 함유되어 있고, 이 지방은 리놀렌산(linolenic acid(20%)), 리놀레산(linoleic acid(50%)), 올레산(oleic acid(11%))으로 구성되어 있으며 건실유에 속한다. 아미노산 중에 아르가닌(arginine)과 레시틴(lecithin)이 다량 함유되어 있으므로 리신(lysine)이 부족한 함백색의 종근대씨가 된다.
<b>특성</b>	
<b>근거자료</b>	1. 두산세계대백과 편찬사 2. 안락균, 흰색향료본초도감, 고학사, (1999) 3. 미영노, 흰색향료식물도감, 고학사, (1999) 4. 미수영, 흰색향료식물도감, 아카데미서적, (1999) 5. 이창복, 대백과사전도감, 영남사, (1999) 6. 권매현, 한국식물도감, 신지사, (1999) 7. 손계환은우리나를, 현암사, 99p(2001) 8. <a href="http://www.jhmpost.co.kr/082.htm">http://www.jhmpost.co.kr/082.htm</a> 9. <a href="http://www.gve.or.kr/min/da/02-1.htm">http://www.gve.or.kr/min/da/02-1.htm</a>
<b>기타</b>	1. 들깨에서 짜낸 기름은 용도가 많다. 이밖에도 케린르스리놀롤·인체용량으로 양수용구일과의 혼용, 포마드레누 통해 열로 쓰인다. 또 백지에 기름을 먹어 유지 증진제로 쓰기도 한다. 열매는 사료와 비료가 된다. 2. 들깨겨름은 구이지역에서는 주로 공업용으로, 우리 나라에서는 향기용의 대용이나 튀김용으로 쓰이며, 그밖에 유제품, 와인, 화나스, 기화용으로 쓰인다. 열매는 L-페릴 알데하이드(L-perilla aldehyde), L-리모넨(L-limonen), 페닐라테론(perilla betone) 등이 0.3~0.8% 들어 있어 특이한 향기를 내어 부식용으로 이용된다. 한편 맛은 사료로서 소와말이 늘고 비료로서도 필요하게 쓰인다.
<b>묘도그래프</b>	
<b>허용수용성</b>	2000-05-21 17:10

**나. 해당 지표성분 또는 관련 물질에 대한 안전성 정보자료**

깻잎(*Perilla frutescens* Britton var. *japonica* Hara)에 대한 안전성 자료 검색 결과는 다음과 같다.

- Published period : ~ 2014. 8
- Keyword : *Perilla frutescens* Britton var. *japonica* Hara., *perilla frutescens*, 깻잎

No.	검색DB	안전성자료 검색결과
1	Pubmed	0
2	KISS(Koreanstudies Information Service System)	0
3	Expanded Commission E online	0
4	Natural Medicine Comprehensive Database	0
5	PDR for Nutritional Supplements (Physicians'Desktop Reference)	0
6	Toxline(Toxnet)	0
7	WHO monographs on selected medicinal plants	0
8	Tox-Info	0

안전성과 관련된 자료 나타나지 않았으며, 기능성을 확인한 다양한 자료에서 또한 안전성에 관한 언급은 없었다.

U.S. National Library of Medicine 에 따르면 고농도의Caffeic acid (식이의 1~2%) 섭취는 랫드에서 forestomach papillomas를 유발할 수 있다고 되어있다. 하지만 깻잎의 caffeic acid 함량 수율을 고려하여 환산하여 보면 하루에 약 4.8 kg의 깻잎을 섭취할 경우 안전성에 문제가 될 소지가 있는 것으로 계산된다. 하지만 본 실험에서 제안하는 정도의 섭취량은 랫드에서 tongue carcinogenesis를 억제한다는 보고를 비롯한 안전성에는 문제가 없으며 오히려 다양한 기능성을 나타낸다는 연구 보고가 있다.

다. 영양평가, 생물학적 유용성, 인체적용시험 자료

다음과 같은 데이터 베이스를 참고하여 문헌 및 자료를 확보하였다.

데이터베이스	웹사이트 주소
Institute of Medicine(IOM)	<a href="http://www.iom.edu/">http://www.iom.edu/</a>
Agency for Healthcare Research and Quality(AHRQ)	<a href="http://www.ahrq.gov/clinic/tp/garlictpt.htm">http://www.ahrq.gov/clinic/tp/garlictpt.htm</a>
European Scientific Cooperative on Phytotherapy(ESCOP)	<a href="http://www.escop.com/publications.htm">http://www.escop.com/publications.htm</a>
German Commission E	<a href="http://www.salisbury.edu/nursing/herbalremedies/German%20Comm.htm">http://www.salisbury.edu/nursing/herbalremedies/German%20Comm.htm</a>
Natural Medicine Comprehensive Database	<a href="http://www.naturaldatabase.com/">http://www.naturaldatabase.com/.</a>
Natural Standard. com	<a href="http://www.naturalstandard.com/">http://www.naturalstandard.com/</a>
Physician's Desk Reference for Nutritional Supplement	<a href="http://www.pdrhealth.com">http://www.pdrhealth.com</a>
American Herbal Pharmacopoeia(AHP)	<a href="http://ww.herbal-ahp.org/mission.html">http://ww.herbal-ahp.org/mission.html</a>
U.S. Pharmacopoeia-National Formulary(USP-NP)	<a href="http://www.usp.org/USPNF/">http://www.usp.org/USPNF/</a>
Toxline	<a href="http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen">http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen</a>
EMBASE	<a href="http://www.elsevier.nl/homepage/sah/site/locate_embase.html">http://www.elsevier.nl/homepage/sah/site/locate_embase.html</a>
Metabolism and Transport Drug Interaction Database	<a href="http://depts.washington.edu/didbase/">http://depts.washington.edu/didbase/</a>
FDA Poisonous Plant Database	<a href="http://www.cfsan.fda.gov/~djw/plantox.html">http://www.cfsan.fda.gov/~djw/plantox.html</a>
한국학술문헌정보센터(KISS)	<a href="http://kiss.kstudy.com/">http://kiss.kstudy.com/</a>
TradiMed	<a href="http://www.tradimed.com/">http://www.tradimed.com/</a>
National Toxicology Program(NTP)	<a href="http://ntp-server.niehs.nih.gov/">http://ntp-server.niehs.nih.gov/</a>
과학기술학회마을	<a href="http://society.kisti.re.kr/">http://society.kisti.re.kr/</a>
ScienceDirect	<a href="http://www.sciencedirect.com">http://www.sciencedirect.com</a>
국립독성과학원 독성물질정보DB	<a href="http://www.nitr.go.kr/">http://www.nitr.go.kr/</a>
식품위해평가 자료 통합·검색 시스템	<a href="http://safefood.kfda.go.kr/safefood_search/search_main.jsp">http://safefood.kfda.go.kr/safefood_search/search_main.jsp</a>



표제	Phenolic compounds protect HepG2 cells from oxidative damage: Relevance of glutathione levels
저자	Cristovao F. Lima, Manuel Fernandes-Ferreira, Cristina Pereira-Wilson
게재지	Life Sciences, 2006, 79(21), 2056-2068
요지	Phenolic compounds인 caffeic acid와 rosmarinic acid의 <i>t</i> -BHP 산화스트레스에 대한 보호 활성을 <i>in vitro</i> 수준에서 HepG2 간세포를 이용하여 확인하였다. caffeic acid와 rosmarinic acid 모두 <i>t</i> -BHP에 대한 보호 활성이 있으며, 이는 세포 독성을 측정하여 확인하였다.
방법	결과
Cytotoxicity	<i>t</i> -BHP를 이용하여 cell death를 유발시킬 때, caffeic acid와 rosmarinic acid를 모두 100 $\mu$ M 처리하였을 때 세포 생존률이 증가하는 것을 확인한 결과 독성이 없는 것으로 확인하였다.

표제	Efficacy of caffeic acid in preventing nickel induced oxidative damage in liver of rats
저자	L. Pari, A. Prasath
게재지	Chemico-Biological Interactions, 2008, 173(2), 77 - 83
요지	Caffeic acid는 과일, 곡물 등에 존재하는 가장 일반적인 phenolic acid로서, 간 내에서 산화 스트레스로 유도되는 Ni에 대해 보호 효과가 있는 것을 <i>in vivo</i> 수준에서 확인하였다.
방법	결과
Caffeic acid 경구 투여 후 안전성 확인	caffeic acid를 15, 30, 그리고 60 mg/kg body weight 으로 랫드에 20일 동안 경구 투여한 결과 별다른 특이점을 발견할 수 없었다.

표제	Studies on the protective effects of caffeic acid and quercetin on chemical-induced hepatotoxicity in rodents
저자	K.H. Janbaza, S.A. Saeedb, A.H. Gilani
게재지	Phytomedicine 2004, 11(5), 424 - 430
요지	phenolic compounds로 알려진 caffeic acid와 quercetin은 유도되는 paracetamol과 CCl <sub>4</sub> 에 의해 유도되는 간조직 손상에 대항하여 보호효과를 가지는 것을 <i>in vivo</i> 수준에서 확인하였다.
방법	결과
paracetamol에 대한 caffeic acid의 독성유무 확인	mice에 paracetamol을 1g/kg로 투여하면 치사율이 100%인데, caffeic acid을 6 mg/kg를 이전에 투여한 뒤, paracetamol을 동일한 농도로 투여하면, 80%, 70%의 생존율을 보임을 확인함으로써, paracetamol에 대한 보호효과가 있는 것을 확인하는 동시에 caffeic acid에 대한 독성을 관찰할 수 없었다.

표제	Effect of Caffeic Acid on Tert-butyl Hydroperoxide-Induced Oxidative Stress in U937
저자	MIRELLA NARDINI, PAOLA PISU, VINCENZO GENTILI, FAUSTA NATELLA, MAURIZIO DI FELICE, ENZA PICCOLELLA,, CRISTINA SCACCINI
게재지	Free Radical Biology & Medicine, 1998, 25(9), 1098 - 1105
요지	항산화 능력을 가지는 phenolic acid 중의 하나인 caffeic acid의 <i>t</i> -BOOH에 의한 산화스트레스에 대한 보호효과를 <i>in vitro</i> 수준에서 human monocytic cell인 U937을 이용하여 확인하였다.
방법	결과
Caffeic acid 처리 후 세포 생존율 확인	human monocytic cell인 U937에 caffeic acid를 10 - 400 μM를 처리한 결과 세포 독성이 관찰되지 않음.

표제	Comparative effects of perilla and fish oils on the activity and gene expression of fatty acid oxidation enzymes in rat liver
저자	Takashi Ide, Hideyuki Kobayashi
게재지	Biochimica et Biophysica Acta, 2000, 1485(1), 23-35
요지	깻잎과 어유를 섭취한 rat의 간의 지방산 산화, 합성과 그와 관련된 유전자의 발현정도를 실험하였을 때, palmitoyl-CoA reductase과 같은 효소를 발현시켜 지방산의 산화를 도우며, pyruvate kinase와 같은 지방산 합성을 유발하는 인자의 발현을 억제시키는 것을 확인하였다.
방법	결과
깻잎 추출 오일 급여 후 독성 확인	깻잎 추출 오일을 랫드에 19.1-19.9 g/day로 자유급여로 복용시켰을 때, 별다른 부작용이 관찰되지 않음.
표제	Effects of perilla extract on productive performance, serum values and hepatic expression of lipid-related genes in Shaxing ducks
저자	W.M. LIU, J. ZHANG
게재지	British Poultry Science, 2011, 52(3), 381-387
요지	깻잎 추출물을 200 mg/kg의 농도로 오리에게 50일간 투여하였을 시에, 혈장의 HDL을 증가시키며 LDL을 감소시키는 경향을 나타내며, 간의 지질합성과 관련된 FAC, ACC, MA, SREBP-1과 같은 유전자를 억제함을 확인하였다.
방법	결과
깻잎 추출물식이 후 부작용 관찰	깻잎 추출물을 28주령의 duck에게 200 mg/kg의 농도를 기초사료에 첨가하여 50일간 먹인 결과 별다른 부작용을 관찰 할 수 없었음.

데이터 베이스를 통하여 깻잎 추출물의 안전성에 관련된 자료를 검색한 결과 다양한 세포 및 동물 시험을 통해 안전성을 확인하였다.

그러나 인체 시험은 현재 안전성과 기능성 부분에서 연구가 미비하며 단 한 건의 연구 결과도 나타나지 않았다. 따라서 깻잎 추출물에 대한 안전성 결과에는 문제가 없는 것으로 확인하였다.

**라. 들깨잎 섭취량 평가**

섭취량 분석을 위한 자료로는 “국민건강영양조사 원시자료, 제5기 1차년도(2010)”을, 통계분석은 SAS 프로그램 (Ver. 9.2)을 이용하였다. 섭취량 산출에 이용한 식품명과 코드는 다음과 같다.

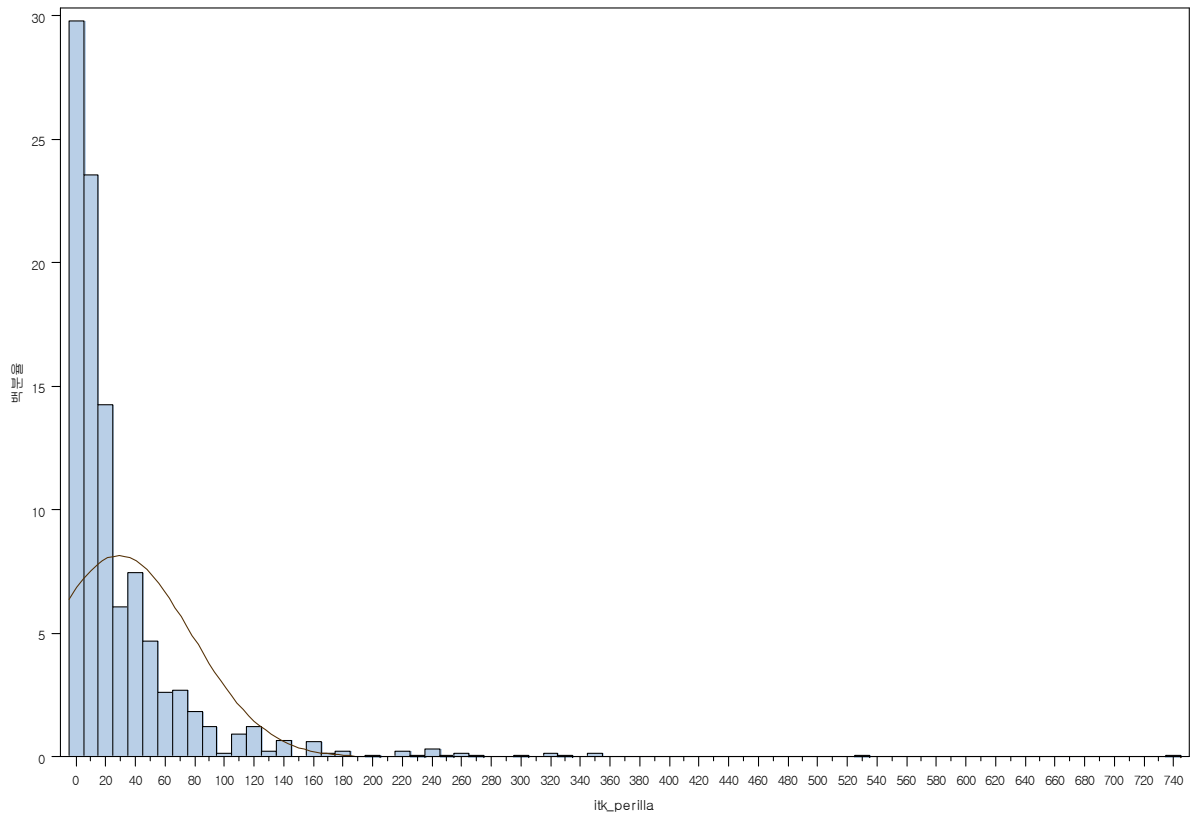
(1) 식품명, 코드

식품코드	식품명	2차식품코드	2차식품명	3차식품코드	3차식품명
06071	들깨잎,생것	06071	깨잎	06071	깨잎
50297	방아잎	06071	깨잎	06071	깨잎
06072	들깨잎, 데친것	06071	깨잎	06071	깨잎
06073	들깨잎,찢것	06071	깨잎	06071	깨잎
06074	들깨잎,통조림	06074	깨잎 /콩잎,장아찌	06071	깨잎
06075	깨나물 (깨잎나물), 생것	06071	깨잎	06071	깨잎
21002	깨잎,깨잎마당( 동원F&B)	06074	깨잎 /콩잎,장아찌	06071	깨잎
50307	콩잎장아찌	06074	깨잎 /콩잎,장아찌	06071	깨잎

(2) 깨잎의 총 섭취량

깨잎의 총 섭취량은 들깨잎(생 것), 방아잎, 들깨잎(데친 것), 들깨잎(찢 것), 들깨잎(통조림), 깨나물(깨잎나물, 생 것), 콩잎장아찌, 깨잎,깨잎마당(동원F&B)의 섭취량을 합친 것으로 1세 이상 전인구(n=8019)에서 평균섭취량±표준오차가 4.832±0.632g/day인 것으로 나타났으며, 최소 섭취량은 0g, 최대 섭취량은 737.6409g으로 확인되었다.

총 깨잎 섭취량의 histogram은 다음과 같다.



### (3) 연령별 섭취량

연령(세) 식품명	age ≥ 1 (n=8019)	1-2 (n=243)	3-5 (n=351)	6-11 (n=779)	12-18 (n=702)	19-29 (n=692)	30-49 (n=2251)	50-64 (n=1613)	65 ≤ (n=1388)	age ≥ 19 (n=5944)
들깨잎, 생것	1.893±	0.082±	0.283±	0.805±	0.341±	1.611±	2.428±	3.149±	1.306±	2.279±
	0.472	0.046	0.114	0.346	0.074	0.525	0.548	1.192	0.631	0.599
방아잎	0.001±	0.000±	0.000±	0.000±	0.000±	0.000±	0.000±	0.002±	0.001±	0.001±
	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.001	0.001
들깨잎, 데친것	0.048±	0.000±	0.003±	0.013±	0.000±	0.000±	0.082±	0.012±	0.155±	0.060±
	0.015	0.000	0.003	0.012	0.000	0.000	0.034	0.007	0.07	0.019
들깨잎, 찜것	0.006±	0.000±	0.000±	0.000±	0.000±	0.000±	0.004±	0.000±	0.041±	0.007±
	0.004	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.004	0.000	0.030	0.005
들깨잎, 통조림	1.758±	0.306±	0.237±	0.503±	0.626±	1.474±	2.164±	2.392±	2.247±	2.094±0
	0.230	0.195	0.087	0.162	0.325	0.380	0.267	0.434	0.661	264
깨나물 (깨잎나물), 생것	0.005±	0.000±	0.000±	0.000±	0.000±	0.000±	0.012±	0.004±	0.000±	0.006±
	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.010	0.004	0.000	0.004
깨잎, 깨잎마당	0.000±	0.000±	0.000±	0.000±	0.000±	0.000±	0.000±	0.000±	0.000±	0.000±
	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
콩잎 짬아찌	0.021±	0.009±	0.016±	0.035±	0.000±	0.004±	0.043±	0.013±	0.001±	0.023±
	0.008	0.009	0.016	0.028	0.000	0.004	0.019	0.006	0.001	0.008
깨잎, 총	4.832±	0.601±	0.715±	1.725±	1.353±	4.005±	6.111±	7.063±	5.064±	5.775±
	0.632	0.317	0.195	0.441	0.559	0.811	0.680	1.409	1.392	0.771

## 2. 기능성 들깻잎의 대량 재배

### 가. 재배 방법

- (1) 재배지 : 경상남도 밀양시 상동면 안인리
- (2) 재배자 : 상동깻잎원예영농조합법인
- (3) 재배량 : 673kg
- (4) 재배 방법: 깻잎 수확 3일전에 6% 설탕물로 관수, 관수 3일 후 깻잎 수확. 동일한 방법으로 3회 연속 수확
- (5) 재배 후 건조 : 전기 건조기를 이용하여 3일간 건조



그림 1. 기능성 들깻잎 대량 재배 및 건조기



그림 2. 건조 완료된 기능성 들깻잎

나. 기능성 들깨잎 추출물 가공공정도

JNR 가 공 공 정 도									
회사명	바이오버드	형태	생일	입고일	2012.06.18	계	담당	정보	승인
품명	갯잎	무게	31.49kg	출고일	2012.07.05	재	이승혁	김민	김영호
공정명	투입 전		작업 조건				기타	결과물	
	형태	무게	용매	배수	온도	시간			
선별 / 세척	건엽	31.49 kg						갯잎 파우더 : 21.99kg 수율 : 69.8% 포장 : 펠트용기	
건조									
추출			정제수	10배수	100°C	4시간			
농축					50°C	5시간			
동결건조					-45~-50°C	72시간			
= 참고사항 1. 보관 유통 상의 주의사항 : 냉장보관 2.									
작성일 : 2012년 07월 05일					작업자 : 박세준				
(재) 전라남도생물산업진흥원 천연자원연구원 (인)									

그림 3. 기능성 들깨잎 추출 가공공정도

다. 대량추출에 따른 지표물질 함량 측정

기능성 들깨잎 대량추출 시 지표 물질 함량은 다음 표와 같았다. 추출 수율을 고려하여 기능성 들깨잎 1 mg의 건물에 포함되어 있는 caffeic acid와 rosmarinic acid의 함량이며 각 추출 batch 마다 3개의 sample을 이용하여 측정하였다.

	caffeic acid ( $\mu\text{g}/\text{mg DM}$ )	rosmarinic acid ( $\mu\text{g}/\text{mg DM}$ )
지표 물질 함량	$1.61 \pm 0.03$	$33.72 \pm 0.82$

### 3. 기능성 들깨잎 추출물 원료의 안정성 측정

#### 가. 실험 재료 및 방법

기능성 들깨잎을 100℃ 열수로 3시간동안 환류냉각 추출한 후, 동결건조하여 추출물 시료를 제조하였다. 또한 기능성 들깨잎 추출물을 6개월, 12개월간 보관하면서 추출물 형태와 외관의 변화를 확인하였으며, 추출물의 지표 물질 함량을 HPLC를 이용하여 측정하였다.

Instrument	Varian Prostar
Column	Waters Xterra RP18 5 µm ODS2 (3.9×150 mm)
Mobile phase	A : 0.05% trifluoroacetic acid B : MeOH
Retention time	0 min : Sol. A / Sol. B (100/0), 40min : Sol. A / Sol. B (0/100)
Flow rate	1 mL/min

#### 나. 결과 및 고찰

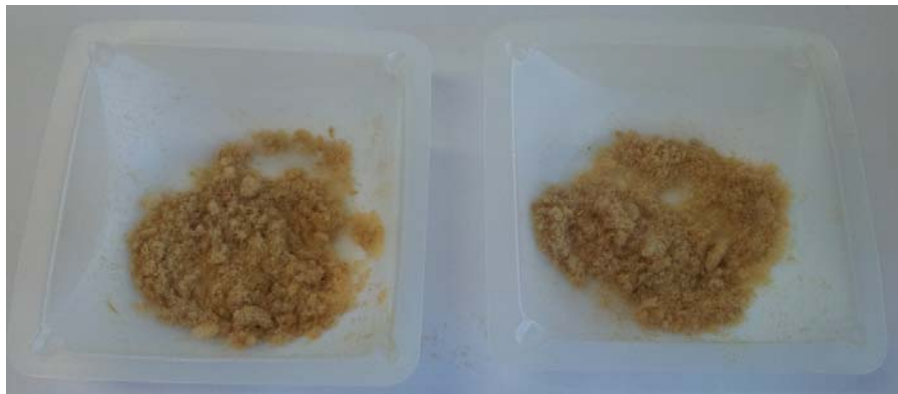


그림 4. 기능성 들깨잎 추출 직후(좌) 및 6개월 실온 보관(우) 사진

	추출 직후	6개월 보관	12개월 보관
Caffeic acid	1.32 ± 0.06 µg / mg	1.45 ± 0.14 µg / mg	1.29 ± 0.25 µg / mg
Rosmarinic acid	28.64 ± 2.18 µg / mg	32.71 ± 1.92 µg / mg	34.03 ± 2.37 µg / mg

추출물을 추출 직후와 6개월, 12개월간 실온에서 보관하였을 때 외관상의 다른 점은 나타나지 않았다. 또한, 추출물이 굳거나 뭉치는 형태도 발견되지 않았으며, 이취의 발생도 관찰되지 않았다. 또한 추출물에 포함된 주요 성분인 caffeic acid와 rosmarinic acid 함량을 확인하였을 때, 두 물질의 함량이 유의적인 차이를 나타내지 않았음.

따라서 12개월간 보관하였을 때 추출물의 형태적 안정성과 함유된 지표물질의 변화가 나타나지 않았으며, 이를 통하여 기능성 들깨잎 추출물의 안정성을 확인하였다. 특히 간 보호 기능을 나타내는 중요 지표인 지표 물질의 함량은 추출 직후와 12개월 보관 후를 비교하였을 때 유의적인 차이가 나타나지 않았으며 어떠한 변화도 관찰되지 않았다.



#### 4. 기능성 들깨잎 추출물 원료의 기초 제형 연구

##### 가. 실험 방법

주식회사 굿씨드에 의뢰하여 기능성 들깨잎 추출물을 이용한 대표적인 3가지 제형(과립, 정제, 환)에 대한 제형 연구를 시행하였다. 각 제형별로 제조 후 3개월 동안 성상, 이물, 수분, 대장균균, 봉해도 등 각 제형에 대한 시험 항목을 측정하여 제형의 안정성을 확인하였다.

##### 나. 실험 결과

###### (1) 과립 제형

시험 항목	기 준	결 과
성 상	고유의 색택, 향미를 가지고 이 미, 이취가 없어야 함	이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 연갈색의 과립
이 물	불검출	불검출
수 분	10% 이하	4.1%
대장균균	음 성	음 성
가속실험	변화없음	4주간 변화 없음

###### (2) 정제 제형

시험 항목	기 준	결 과
성 상	고유의 색택, 향미를 가지고 이 미, 이취가 없어야 함	이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있 는 연갈색의 정제
이 물	불검출	불검출
수 분	10% 이하	최고 4.5%
대장균균	음 성	음 성
일반세균	1g당 100,000 이하	적 합
봉 해 도	30 분 이하	21분

###### (3) 환 제형

시험 항목	기 준	결 과
성 상	고유의 색택, 향미를 가지고 이 미, 이취가 없어야 함	이미,이취가 없고 고유의 향미가 있는 연갈색의 환
이 물	불검출	불검출
수 분	10% 이하	3.8%
대장균균	음 성	음 성
일반세균	1g당 100,000 이하	적 합
봉 해 도	30 분 이하	19분



그림 5. 들깨잎 추출물의 제형 (환, 과립, 액상, 왼쪽부터)

인체적용시험에 사용될 복용량을 기능성 들깨잎 추출물 5g/day로 설정함에 따라 사용가능한 제형을 확인하였을 때, 환 제형이 가장 유력하였다. 따라서 우선적으로 환 제형의 지표물질 안정성을 확인하였다.

제형 (10 mg 당)	42°C ± 2°C	
	생산직 후	3개월 후
환 제형	8.04 ± 0.36 µg	7.91 ± 0.84 µg

기능성 들깨잎 추출물의 환 제형을 실온에서 3개월 간격으로 1년간 rosmarinic acid 지표물질의 함량을 HPLC를 이용하여 측정하였을 때 다음 표와 같은 함량을 측정하였다. 생산직 후와 3개월 간격으로 지표물질의 함량을 비교하였을 때, 지표물질의 함량은 유의적인 차이를 나타내지 않았으며, 이는 환 제형을 1년간 보관하였을 때 지표물질의 변화가 나타나지 않았음을 의미한다.

## 5. 기능성 들깨잎 추출물의 제품화를 위한 제형연구

### 가. 실험 방법

기능성 들깨잎 추출물을 이용하여 다양한 제형의 시제품을 만든다. 제형에 따른 장단점을 비교하여 최종적으로 인체적용시험에 사용할 제형의 종류를 선별하고 인체적용시험에 사용할 시료로 생산한다.

### 나. 실험 결과

기능성 깻잎 추출물을 이용한 건강기능식품의 제형을 위하여 대량 추출된 깻잎추출물을 가지고 액상, 환 및 과립 제형 시제품을 생산함.

제형 연구에 있어서 처음에 고려되었었던 정제 및 캡슐 제형은 본 깻잎 추출물로 정제 및 캡슐 제형을 만들 때 기술적인 어려움이 발생하여서 위의 두 제형은 제외하기로 하였다. 상기 제형 중에서 액상 제형은 매일 섭취시 정확한 분량을 매번 정량하여 섭취해야 하는 불편함과 액체 특유의 보관 및 관리의 어려움이 발생하였다. 또한 과립 제형의 경우는 보관에 크게 어려움이 없으나 섭취 선호도가 다른 제형에 비해서 떨어지고, 환 제형에 비해서 관리의 어려움이 있었다. 마지막으로 환 제형은 제형의 생산적인 측면에서 다른 제형에 비해 손쉽게 만들 수 있고 섭취도 비교적 간단하여 **환 제형을 최종 제형으로 선정**하였다.

환 제형을 기반으로 인체적용 시험에 사용할 시험제품 및 위약의 시제품을 생산하였고 차후에 인체적용 시험이 시작되는 시점에 시험용 시험제품과 위약을 생산하였다.



그림 6. 기능성 들깨잎 추출물 시험식품(왼쪽) 과 위약(오른쪽)

## 6. 기능성 들깨잎 추출물의 임상 시험 계획 및 설계

기능성 들깨잎 추출물의 인체적용 시험을 위하여 이화여자대학교의 권오란 교수팀에 의뢰하여 임상적용 시험에 필요한 protocol 및 시험 디자인을 계획하였다.

㈜바이오버드  
Protocol No. Perilla\_Biobud  
Version No. 1.0

*Confidential*

# 인체적용시험 계획서

## 깨잎추출물의 섭취가 간건강 및 항산화능에 미치는 영향과 안전성을 평가하기 위한 인체적용시험

Protocol No. : Perilla\_Biobud  
Version No. : 1.0  
Version Date : 2013. 5. 28

### Confidential

본 인체적용시험 계획서에 포함된 정보는 ㈜바이오버드의 독점자산이며 시험기관장, 인체적용시험 책임자 및 담당자, 관련 행정기관, 시험기관의 기관생명윤리위원회(IRB)를 위한 것입니다. 본 계획서는 인체적용시험을 실시 또는 평가하기 위한 목적으로만 사용할 수 있으며, ㈜바이오버드의 동의가 없을 경우 내용의 사용, 공개, 출판 및 기타 발표를 할 수 없습니다.

◎ 인체적용시험계획서 요약

인체적용시험 제목	갯잎추출물의 섭취가 간건강 및 항산화능에 미치는 영향과 안전성을 평가하기 위한 인체적용시험
인체적용시험 의뢰자	㈜바이오버드
인체적용시험 책임자	분당차병원 외과 권성원 교수
인체적용시험 공동연구자	이화여자대학교 식품영양학과 권오란 교수 분당차병원 소화기내과 박하나 교수 분당차병원 가정의학과 김문종 교수 서울과학기술대학교 식품공학과 김지연 교수 단국대학교 약학과 김규봉 교수
인체적용시험 담당자	이화여대 바이오푸드 네트워크 박지은
인체적용시험 실시기관명 및 주소	분당차병원 (경기도 성남시 야탑동 351 번지) 이화여자대학교 식품영양학과 (서울시 서대문구 대현동 11-1)
시험기간	IRB 승인일로부터 12개월
시험대상	간기능이 저하된 성인
인체적용시험 목적	갯잎추출물의 섭취가 간건강과 항산화능에 미치는 영향과 안전성 평가
디자인	10주간, 무작위배정, 이중맹검, 평행설계, 대조식품 비교 실험
시험식품	13.5g/d (갯잎추출물로서 5g/d, 제형: 환)
대조식품	Placebo
시험/대조식품 섭취 방법 시험방법	<p>시험식품 또는 대조식품을 1일 3회, 1회 1포씩 섭취</p> <p>The diagram illustrates the trial timeline. It starts with a 'Pre-Screening' phase (visit -2wk) and a 'Screening' phase (visit 1/-1wk) where screening and safety assessments are performed. This is followed by a 'Randomization' phase (visit 2/0wk) where randomization and safety assessments occur. The 'Intervention period' begins at visit 2/0wk and continues through visit 3/5wk (safety assessment) to visit 4/10wk (completion, safety assessment). At the top, two groups are shown: '대조군 (Placebo) n=30' and '시험군 (갯잎추출물) n=30'.</p> <p>스크리닝 방문 전에 전화로 적합성 항목 (체질량지수 등)을 사전 확인 후, 첫 방문 전 1 주일 이상 정해진 식사 및 생활습관 지침을 준수하도록 한다. 자의에 의해 인체적용시험 동의서에 서명한 지원자가 본 인체적용시험에 등록되면 방문평가를 통하여 선정/제외기준 적합여부를 최종 판정한 뒤, 등록된 순서에 따라 대조군 (placebo) 또는 시험군 (갯잎추출물) 중 한군으로 무작위 배정한다.</p>

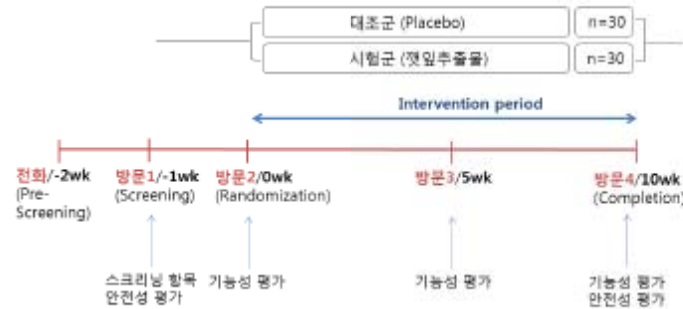
◎ 인체적용시험 진행 일정표

Period		Screening	Intervention		
Visit		1	2	3	4
Week		-1 <sup>1)</sup>	0	5	10
Window period				±5	±3
서면동의서		√			
인구학적 조사(성별, 생년월일, 연령)		√			
병력 및 선행약물 조사		√			
흡연력 조사		√			
식이/음주량/활동량 조사 <sup>2)</sup>		√	√	√	√
식사/음주/활동량 지침 교육		√	√	√	
적합성 스크리닝	BMI	√			
	ALT, AST	√ <sup>3)</sup>			
	HBs Ag, HBs Ab, HCV Ab	√			
	임신반응검사 <sup>4)</sup>	√			
안전성 평가	활력징후(맥박, 혈압, 체온)	√	√	√	√
	임상병리검사 <sup>5)</sup>	√			√
기능성 평가	AST, ALT, GGT		√ <sup>6)</sup>	√	√ <sup>7)</sup>
	Fatty liver index <sup>8)</sup>		√		√
	신체계측 <sup>9)</sup>	√	√	√	√
	기타 기능성 지표 <sup>10)</sup>		√		√
적합성 평가		√			
무작위배정			√		
시험식품 및 대조식품 배부			√	√	
반납식품 회수/순응도 확인				√	√
의약품 복용력 및 병용요법 변화 확인			√	√	√
이상반응 확인				√	√

- 1) 방문 2 (0주)는 방문 1 (스크리닝)과 1주 이상 간격을 두고 수행한다.
- 2) 방문 1(스크리닝)에는 평상시의 식사섭취패턴, 음주력, 활동량을 조사하고, 방문 2(0주), 3(5주), 4(10주)에는 피험자가 기록해온 식이, 음주량, 활동량을 분석하도록 한다.
- 3) 임상병리검사에 포함되어 있으므로 별도 측정하지 않는다.
- 4) 폐경(무월경이 24개월 이상)이 확인된 피험자를 제외한 가임기 여성에 한해 스번으로 실시한다.
- 5) 피험자는 재합하기 전날 12시간 금식상태로 내원하여 다음의 항목을 검사한다.  
다만, 스크리닝 방문 8주 이내에 건강검진 결과가 있는 피험자에 한하여 검사를 생략할 수 있다.  
 시험자의 판단에 따라 비정상적인 결과에 대한 임상병리검사를 시행할 수 있다.
  - ① 혈액학적 검사: WBC, RBC, Hb, Hct, PLT, MCV, MCH, MCHC, Differential count(Neutrophils, Eosinophils, Basophils, Lymphocytes, Monocytes)
  - ② 혈액화학적 검사: AST, ALT, GGT, Alkaline phosphatase, BUN, Creatinine, Total bilirubin, Uric acid, Total protein,

## 7. 인체적용시험 방법

### 7.1 인체적용시험의 설계



본 인체적용시험은 10 주간, 평행비교, 무작위배정, 이중맹검, 대조식품 비교 시험으로 디자인되었다. 스크리닝 방문 전에 전화로 적합성 항목(체질량지수 등)을 사전 확인 후, 첫 방문 전 1 주일 이상 정해진 식사 및 생활습관 지침을 준수하도록 한다. 자의에 의해 인체적용시험 동의서에 서명한 지원자가 본 인체적용시험에 등록되면 방문평가를 통하여 선정 및 제외기준 적합여부를 판정한 뒤, 등록된 순서에 따라 대조군(placebo), 시험군(꺾잎추출물) 중 한군으로 무작위 배정한다. 시험식품의 기능성을 평가하기 위해서 대조식품 또는 시험식품을 10 주 섭취 후 기능성 평가 지표들의 변화를 확인한다.

### 7.2 섭취량, 섭취방법 및 섭취기간

#### 7.2.1 1일 섭취량 및 섭취방법

- 대조군(placebo): 대조식품 3포(99환)/day (꺾잎추출물 미함유)
- 시험군: 시험식품 3포(99환)/day (꺾잎추출물 5g/day)

#### 7.2.2 섭취방법

1일 3회, 1회 1포(33환)씩 섭취

#### 7.2.3 섭취기간

10주(70일)

## 7. 인체적용시험을 위한 시험식품과 대조식품의 제조

시험식품과 대조식품을 제조하였으며, 하루 3번 섭취를 10주간 할 예정이므로 3포씩 묶음 포장에 중박스에 1주일 분을, 다시 대박스에 5주분과 여유분으로 구성하였다.

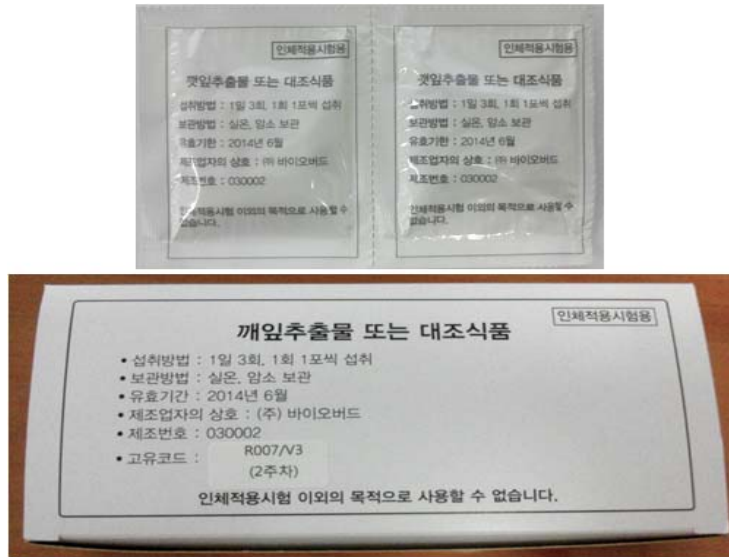


그림 7. 시험식품과 대조식품의 개별 포장 및 중박스 포장

### 생산 및 합격 완료 보고서

제 품 명	제 조 번 호	생 산 수 량	제 조 일 자
Bud Nool P 대조약	030002	7.800톤	2013. 08. 24
<b>생산팀</b> 위와 같이 생산이 완료되었음을 통보합니다. <div style="text-align: right;">2013년 08월 28일</div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 10px;"> <div style="text-align: center;">                       생산 담당자                 </div> <div style="text-align: center;">                       포장 담당자                 </div> <div style="text-align: center;">                       생산부 책임자                 </div> </div> 위 제품은 품질관리팀의 시험결과 및 품질보증팀의 검토에 의거 적합한 제품임을 통보합니다. <div style="text-align: right;">2013년 09월 11일</div>			
<b>품질관리팀</b>			
 이화학시험팀	 기기분석팀	 미생물시험팀	 확인자
<b>품질보증팀</b>			
 담당자		 확인자	 책임자
<b>물류팀</b>			
 담당자			 공장장
 확인자			인수일: 2013년 09월 16일

익수제약주식회사

### 생산 및 합격 완료 보고서

제 품 명	제 조 번 호	생 산 수 량	제 조 일 자
Bud Nool P	030002	7.800톤	2013. 08. 19
<b>생산팀</b> 위와 같이 생산이 완료되었음을 통보합니다. <div style="text-align: right;">2013년 08월 21일</div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 10px;"> <div style="text-align: center;">                       생산 담당자                 </div> <div style="text-align: center;">                       포장 담당자                 </div> <div style="text-align: center;">                       생산부 책임자                 </div> </div> 위 제품은 품질관리팀의 시험결과 및 품질보증팀의 검토에 의거 적합한 제품임을 통보합니다. <div style="text-align: right;">2013년 09월 04일</div>			
<b>품질관리팀</b>			
 이화학시험팀	 기기분석팀	 미생물시험팀	 확인자
<b>품질보증팀</b>			
 담당자		 확인자	 책임자
<b>물류팀</b>			
 담당자			 공장장
 확인자			인수일: 2013년 09월 04일

익수제약주식회사



## 8. 인체적용시험을 통한 기능성 및 안전성 평가

인체 적용시험 계획서 제출 및 기능성 들깨잎의 간 보호 기능성 확인을 위한 인체 적용 시험을 진행하였다. 기능성 들깨잎 추출물을 함유하는 제형은 환으로 결정하였으며, 하루 13.5g의 양을 섭취하며, 10주간 섭취한다. 실험군은 기능성 들깨잎 추출물과 그에 대한 플라시보 실험군으로 결정 후 실험을 진행하였다.

**의학연구윤리심의위원회(IRB)**  
 차의과학대학교 분당차병원  
 경기도 성남시 분당구 야탑동 351 분당차병원  
 연락처 : 031-780-5302, (FAX : 031-780-5305)

승인날짜(date) : 2013.06.18

**승인 통지서 (CERTIFICATE OF APPROVAL)**

귀하가 신청하신 연구계획서에 대하여 의학연구윤리심의위원회에서 심의.검토하여 다음과 같이 결정하였음을 통지합니다.

과제번호 (Protocol No)	연구 과제명(Title)	연구책임자 (Name of PI)
BD2013-070D	깨잎추출물의 섭취가 간경강 및 항산화능에 미치는 영향과 안전성을 평가하기 위한 인체적용시험	권성원
승인문서 (Documents approved)	초기심의신청서-(2013-06-10) 1.임상연구 초기 심의 신청서 2.연구 계획서 ver 1.0 3.연구자 윤리준수 서약서 4.이해상충보고서 5.임상 연구과제 Self Check List 6.연구자의 이력서 7.연구자의 GCP관련 교육 이수증 8.인체유래물 연구 동의서(법정서식) 9.중례기록서 양시(e-CRF) [Version: 1.0] 10.임상시험자 자료집(IB) [Version: 1.0] 11.피해자 보상에 대한 규약 [Version: 1.0] 12.피험자 모집 절차(광고 등을 포함) [Version: 1.0] 13.식약청 승인서/식약청 승인 제외사유서 14.연구비 산정 내역서	
중간보고 주기 (Frequency of continuing review)	[12] 개월 마다(Every [12] Months)	승인 종료일 (Expiry of ERC Approval) 2014-06-17


**승인 후 연구책임자의 의무(Post Approval Responsibilities) :**

- 1) 본 위원회는 KGCP 및 ICH-GCP를 준수하며 생명윤리 및 안전에 관한 법률 등 관련법규를 준수합니다.
- 2) 위원회 SOP 제4장 4.1.2에 의거하여 시정 승인 또는 보완된 임상시험 계획서는 보완자로 또는 이의에 관한 자료 등을 제출함으로써 심사위원회의 재심사를 받을 수 있습니다.
- 3) 승인된 서류의 모든 개정은 수행 전 승인을 받기 위하여 위원회에 제출되어야 합니다.
- 4) 본원에서 발생한 SAE는 7일 이내에 위원회에 보고되어야 합니다.
- 5) 연구승인기간은 IRB 승인일 이후부터 최대 1년 까지이며, 연구책임자는 승인기간 종료예정일로부터 30일 이내에 중간보고를 제출하여야 합니다. 중간보고를 하지 않은 경우에는 위원회에서 연구를 중단시킬 수 있습니다.
- 6) 연구 종료 후 1개월 이내에 종료보고를 하여야 하며, 종료보고 승인 후 6개월 이내에 최종결과보고를 하여야 합니다.
- 7) 피험자의 동의설명문은 반드시 본 위원회의 천공날인을 받은 후 사용해야 하며, 본 위원회에서 최종 승인된 버전이어야 합니다.
- 8) 위원회는 필요 시 연구를 점검할 수 있습니다.

CHAIRB\_BD\_V.3.3\_F011 (2013-07-01)

9) 연구책임자 및 연구담당자(해당 연구관련자 포함)가 위원회 경우 해당위원은 투표권 및 발언권이 없으며, 관련 임상 연구심의회에 참여하지 않습니다.

10) 헬싱키선언에 따라 모든 임상시험은 첫 피험자 모집하기 전 공개적으로 접근이 가능한 임상연구등록시스템 (Primary Registry)에 등록하여 이를 공개하여야 하며, 예를 들어, 질병관리본부에서 운영하는 임상연구정보서비스 (CRIS, <http://cris.cdc.go.kr>)를 이용하실 수 있습니다.

**의학연구윤리심의위원회**  


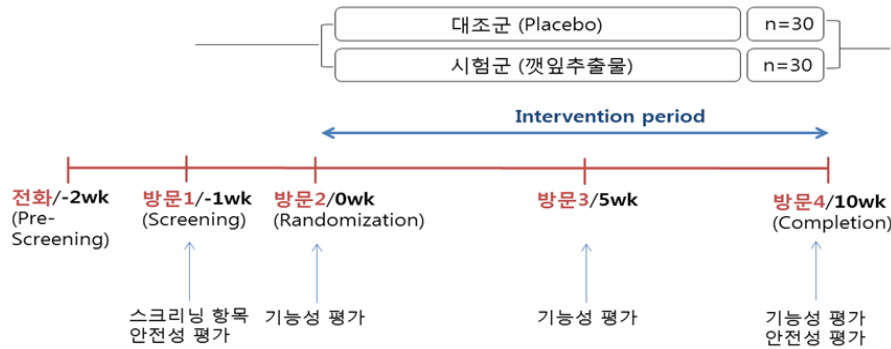
**가. 시험 개요**

**(1) 시험 제목**

갯잎추출물의 섭취가 간건강 및 항산화능에 미치는 영향과 안전성을 평가하기 위한 인체적용시험

**(2) 시험대상 :** 간기능이 저하된 성인

**(3) 시험 설계 :** 10주간, 무작위배정, 이중맹검, 평행설계, 대조식품 비교시험



**(4) 시험/대조식품 섭취방법**

시험식품 또는 대조식품(placebo)을 1일 3회, 1회 1포씩 섭취

**(5) 피험자수**

대조군과 시험군의 목표 피험자 수는 각각 24명으로 탈락률(20%)을 고려하여 선정기준에 적합한 대상자를 각각 30명씩 총 60명 등록

**(6) 기능성 평가**

간건강 지표(AST, ALT, GGT 등), 신체계측 지표(체중, BMI, 허리둘레, 엉덩이둘레 등), 기타 기능성 지표(지질 profile, 염증지표, 항산화지표 등)

**(7) 안전성 평가**

이상반응, 활력징후, 임상병리검사 실시. 방문 종료 4주 후 이상반응 모니터링

**나. 진행 현황 및 향후 일정**

총 93명 스크리닝 하였고, 목표피험자 60명 등록하여 45명이 방문 완료하였고, 6명이 시험/대조식품 섭취 중에 있다.

Screening	Screening failure	Run-in	Randomization	Ongoing	Drop-out	Completion
93명	33명	0명	60명	6명	9명	45명

2014년 10월 3일 마지막 피험자 마지막 방문 완료 후 e-CRF 검토 및 IRB 종료보고, 연내에 통계분석 완료 예정이다.

## 9. 개별인정형 건강기능 식품 원료, 성분 인정 신청서 작성

### 가. 건강기능식품기준·규격 인정신청서 작성

[별지 제1호서식]

건강기능식품 기능성 원료 인정 신청서		처리기간		
		120일	60일	
신청인	대표자	서 문 영		
	업체명	바이오비드	영업허가/ 신고번호	제조업
				수입업
	업체 소재지	경기도 성남시 분당구 대왕판교로 700 B동 904호		
		전화번호	031-628-0800	Fax
수입건강 기능식품	수리번호			
	수출국			
	제조회사			
	소재지			
원료명	기능성 들깨잎 추출물			
「건강기능식품 기능성 원료 및 기준·규격 인정에 관한 규정」 제5조에 따라 건강기능식품 기능성 원료 인정을 신청합니다.				
식품의약품안전처장 귀하		2014년 8월 31일 신청인 서 문 영 (서명 또는 인)		
※ 구비서류 1. 제출자료 1부 2. 제출자료 수록 CD 1개 3. 제품 또는 시제품 4. 기능성분(또는 지표성분) 표준품 5. 국내·외 검사기관이 발행한 시험성적서		수수료		
		100,000원		
※ 제출자료 1. 제출자료 전체의 총괄 요약본 2. 기원, 개발경위, 국내·외 인정 및 사용현황 등에 관한 자료 3. 제조방법에 관한 자료 4. 원료의 특성에 관한 자료 5. 기능성분(또는 지표성분)에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료 6. 유효물질에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료 7. 안전성에 관한 자료 8. 기능성 내용에 관한 자료 9. 섭취량, 섭취 시 주의사항 및 그 설정에 관한 자료 10. 의약품과 같거나 유사하지 않음을 확인하는 자료				

210mm×297mm[일반용지 60g/m<sup>2</sup>(재활용품)]

### 나. 제출 자료 목차

제출 자료 전체의 총괄 요약본

제품의 기원, 개발 경위, 외국에서의 인정, 사용현황 등에 관한 자료

제조 방법 및 그에 관한 자료

원료의 특성에 관한 자료

기능성분(또는 지표성분)에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료

유해물질에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료  
안전성에 관한 자료  
기능성 내용에 관한 자료  
섭취량, 섭취 시 주의사항 및 그 설정에 관한 자료  
의약품과 같거나 유사하지 않음을 확인하는 자료

상기의 제출 서류를 기반으로 서류들을 작성하고 있으며, 인체적용시험의 결과가 나오면 바로 식약처에 서류 접수를 할 예정이다.

## 제 2 절 : 기능성 들깨잎 추출 및 기능성 검증

(제 1협동 : 고려대학교 이광원)

### 1. 기능성 들깨잎 추출물의 대량생산을 위한 최적 추출 조건 정립

#### 가. 실험 방법

들깨잎 추출물의 최적 추출 조건 선정을 위하여 먼저 용매를 선정하기 위하여 열수, 25% 주정, 50% 주정, 70% 주정, 100% 주정을 사용하여 최적 추출 용매 조건을 선정하였다. 그리고 선별된 용매로 1~3시간 동안 추출하여 최적 추출 시간을 선정하였다.

들깨잎의 주요 성분 물질인 caffeic acid와 rosmarinic acid는 간보호 활성을 나타내는 것을 선행연구를 통하여 확인하였으며, 들깨잎의 주요 성분 물질이 최대량 추출되는 조건을 최적 추출 조건으로 선정하였다. 기능성 들깨잎 추출물에 들어있는 caffeic acid와 rosmarinic acid의 함량은 HPLC(Varian Prostar)를 이용하여 측정하였다.

표 1. Caffeic acid, rosmarinic acid의 HPLC 분석 조건

Instrument	Varian Prostar
Column	Waters Xterra RP18 5 μm ODS2 (3.9×150 mm)
Mobile phase	A : 0.05% trifluoroacetic acid B : MeOH 0 min : Sol. A / Sol. B (100/0), 40min : Sol. A / Sol. B (0/100)
Retention time	14.5 min(caffeic acid), 25.8min(rosmarinic acid)
Flow rate	1 mL/min
Detector	340 nm

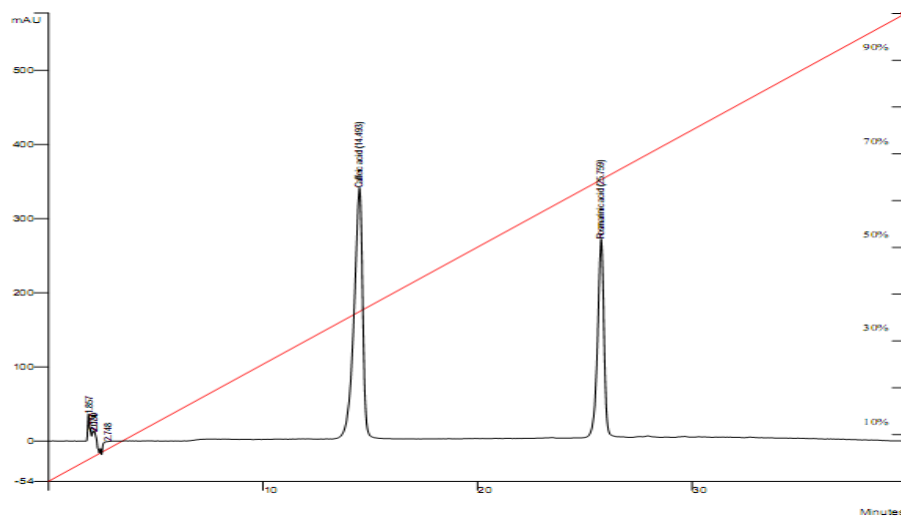


그림. Caffeic acid, rosmarinic acid의 크로마토그래피

## 나. 실험 결과

### (1) 용매의 종류에 따른 추출 조건 선정 연구

간보호 활성을 확인한 선행연구에서는 열수로 추출하였으나, 본 연구에서는 최적 추출 조건을 선정해야하므로 다양한 용매를 이용하여 최적의 수율을 지니는 조건을 선정하기로 하였다. 따라서 열수, 25%, 50%, 70%, 100% 주정을 이용하여 추출하여 수율을 확인하였다.

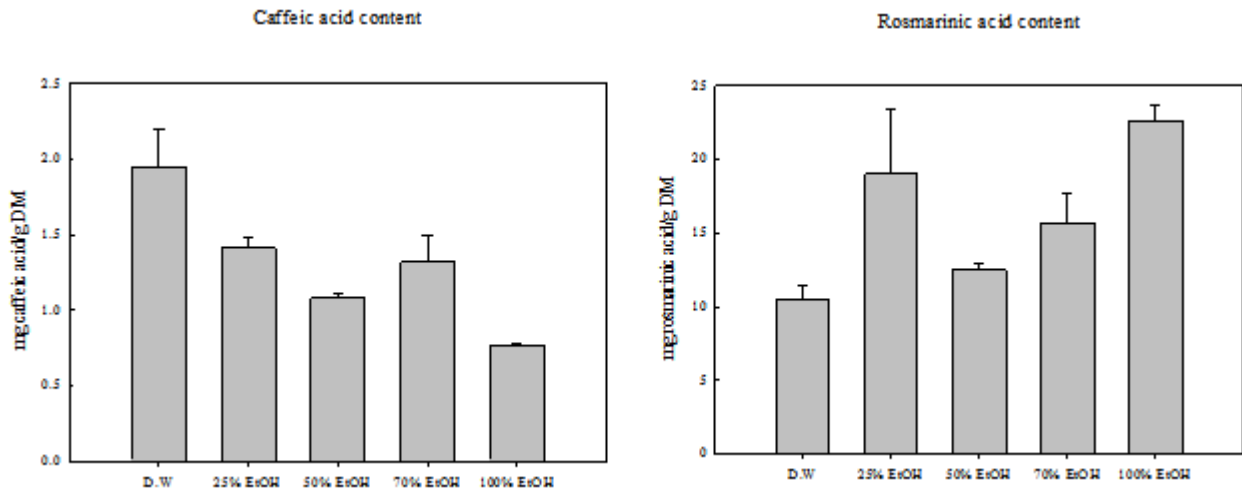


그림. 용매에 따른 caffeic acid, rosmarinic acid 함량 측정

각 용매별로 caffeic acid와 rosmarinic acid의 함량을 측정하였을 때, caffeic acid는 열수 추출에서 rosmarinic acid는 25%와 100% EtOH 일 때 가장 높게 나타났다. 대량 추출을 할 경우, EtOH는 생산 비용의 문제가 생길 수 있으므로, rosmarinic acid는 25% EtOH로 선정하였다. 따라서 열수 추출물과 25% EtOH 추출물의 간보호 활성을 세포 수준에서 확인 후 가장 높은 활성을 나타내는 용매를 선정하였다.

### (2) 추출 시간에 따른 최적 추출 조건 선정

추출 시간을 1, 2, 3 시간으로 나눠 추출 후 기능성 들깨잎의 주요 성분인 caffeic acid와 rosmarinic acid를 HPLC를 이용하여 분석하였다. 추출 수율을 이용하여 caffeic acid와 rosmarinic acid의 함량을 계산하였다.

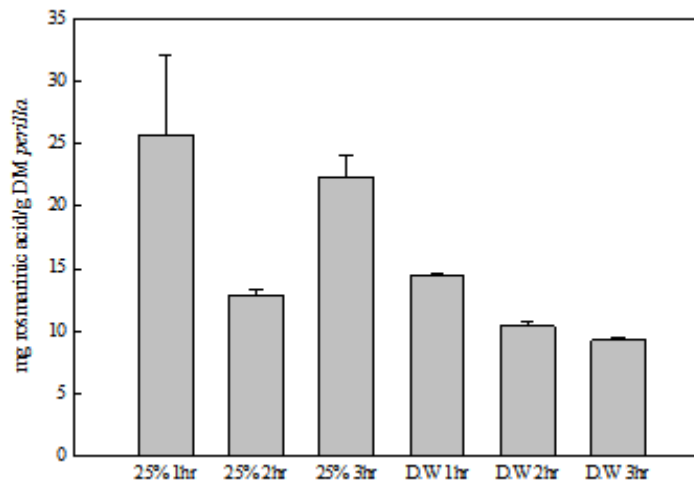
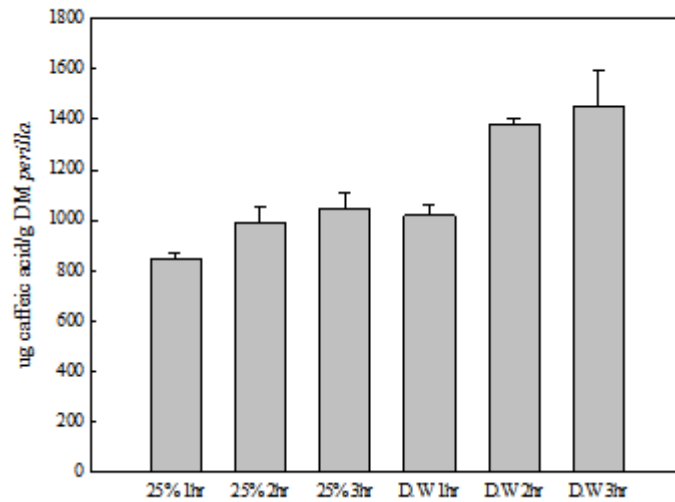


그림. 추출 시간에 따른 caffeic acid, rosmarinic acid 함량 측정

기능성 들깨잎을 시간 별로 추출하여 HPLC로 caffeic acid와 rosmarinic acid를 분석하였을 때, caffeic acid는 열수 추출 3시간에서 가장 높은 함량을 나타냈으며, rosmarinic acid는 25% EtOH 1시간에서 가장 높게 나타났다. 따라서 caffeic acid와 rosmarinic acid가 가장 많은 추출물을 이용하여 간보호 활성을 측정하고 가장 높은 활성을 나타내는 추출물을 최적 추출 조건으로 선정하였다.

### (3) 기능성 들깨잎 추출물의 세포보호효과와 항산화 활성 측정

3시간 열수 추출물과 25% EtOH 1시간 추출물의 세포 보호효과와 항산화 활성을 측정하였다. *tert*-BHP를 이용하여 간세포주에 산화스트레스를 유발시킨 후 기능성 들깨잎 추출물의 세포보호효과를 측정하였으며, 항산화 활성은 세포 내 존재하는 항산화 물질인 Glutathione (GSH)의 함량을 측정하여 확인하였다.

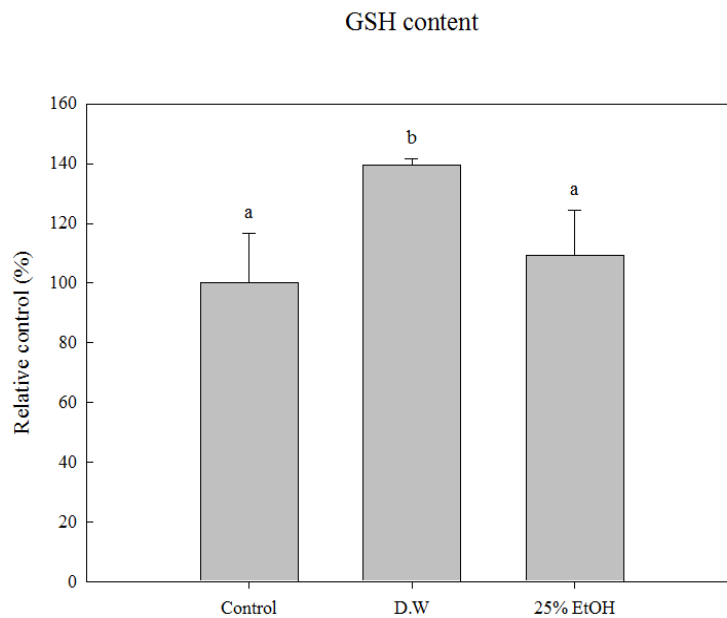
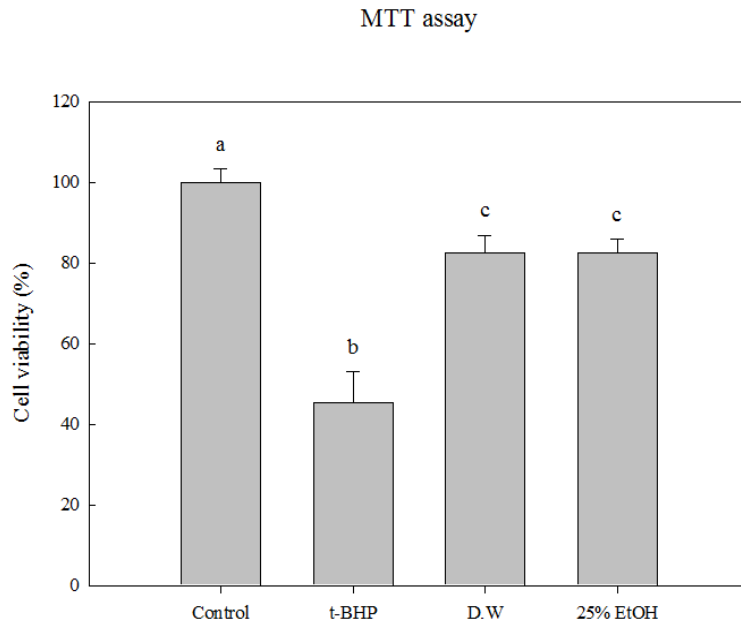


그림. 기능성 들깨잎 추출물에 따른 세포 보호효과 및 항산화 활성 측정

세포 생존률은 두 가지 추출물이 모두 비슷하게 산화스트레스를 억제시키는 것을 확인할 수 있었다. 하지만 GSH는 경우 열수 추출물을 간세포주에 처리하였을 때 더 많은 함량을 가지고 있는 것으로 나타났다.

또한, 세포 내 항산화 물질인 GSH는  $\gamma$ -Glutamylcysteine synthetase( $\gamma$ -GCS)에 의하여 생합성되므로, 기능성 들깨잎 추출물에 의한  $\gamma$ -GCS의 효소 활성과 유전자 발현을 측정하여 최적의 추출 조건을 선정하였다.



### γ-GCS enzyme activity

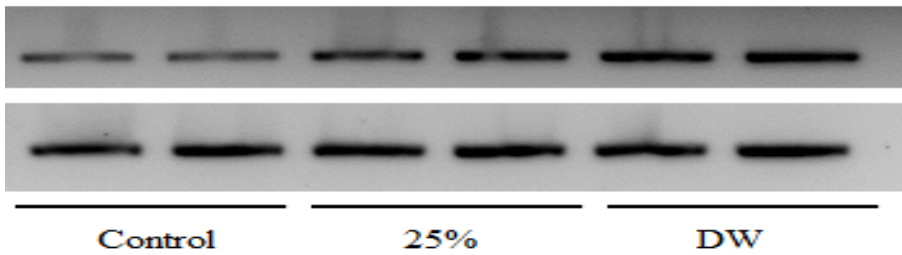
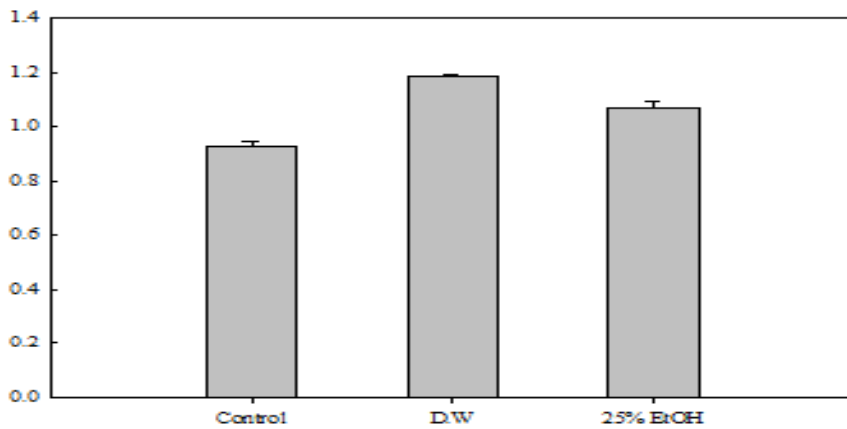
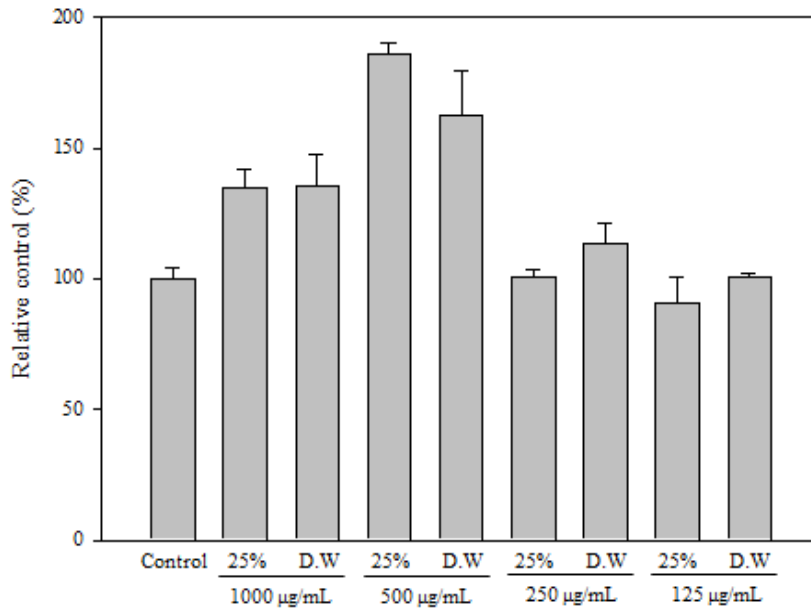


그림. γ-GCS 효소 활성 및 유전자 발현 측정

간보호 활성과 관련된 효소인 γ-GCS의 효소 활성과 유전자 발현을 측정하였다. 효소 활성은 열수 추출물과 25% 주정 추출물이 모두 대조군에 비하여 증가하였지만 두 실험군은 비슷하게 나타났다. 하지만 유전자는 열수 추출물에서 더 많이 발현되는 것을 확인하였다. 따라서 본 연구에서 기능성 들깨잎 최적 추출 방법은 열수 추출 3시간으로 선정하였다.

## 2. 기능성 들깨잎 추출 조건 validation 연구

### 가. 실험 방법

기능성 들깨잎의 주요 성분 물질인 caffeic acid와 rosmarinic acid 분석 방법의 검정 및 검출한계를 확인하였다. Caffeic acid와 rosmarinic acid의 표준품을 사용하였으며, HPLC를 이용하여 각 물질의 peak를 확인한 후, 검출 한계와 정량 한계를 측정하였다.

### 나. 실험 결과

들깨잎의 주요 성분 물질인 caffeic acid와 rosmarinic acid 분석 방법의 검정 및 검출한계를 확인하였다. 각 표준품에 대한 크로마토그램과 UV 흡수파장 그래프는 다음 그림과 같다.

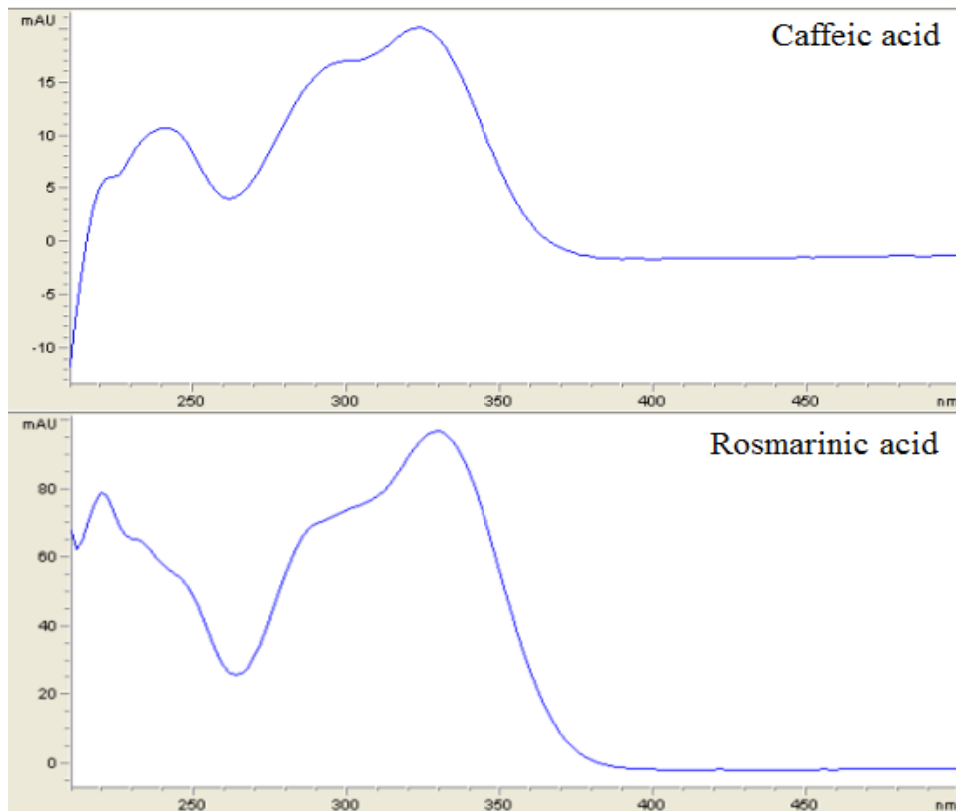
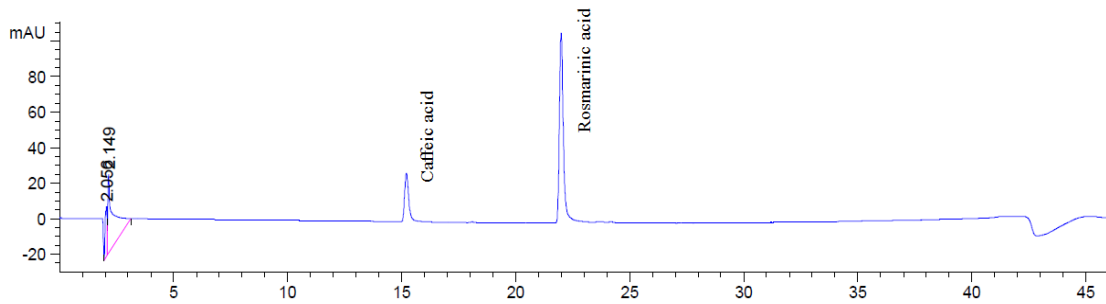
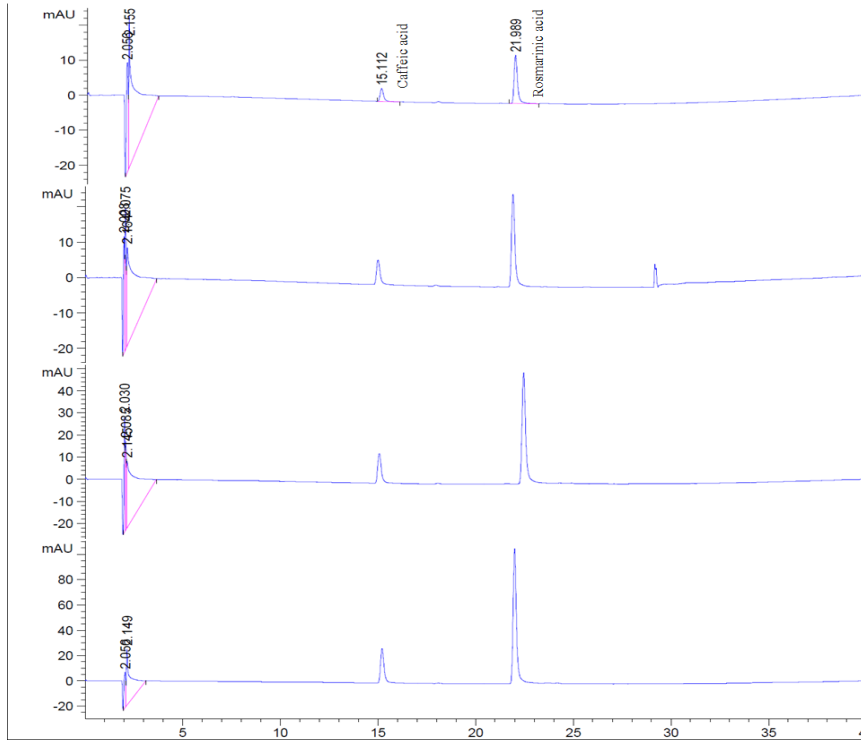
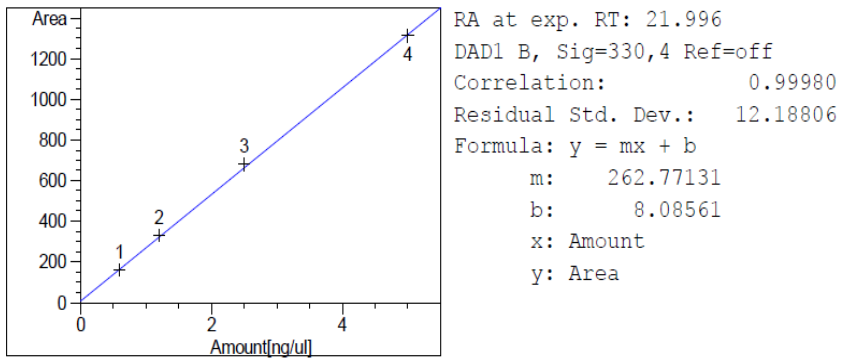


그림. caffeic acid와 rosmarinic acid의 크로마토그램 및 스펙트럼



=====  
 Calibration Curves  
 =====



=====  
 Calibration Curves  
 =====

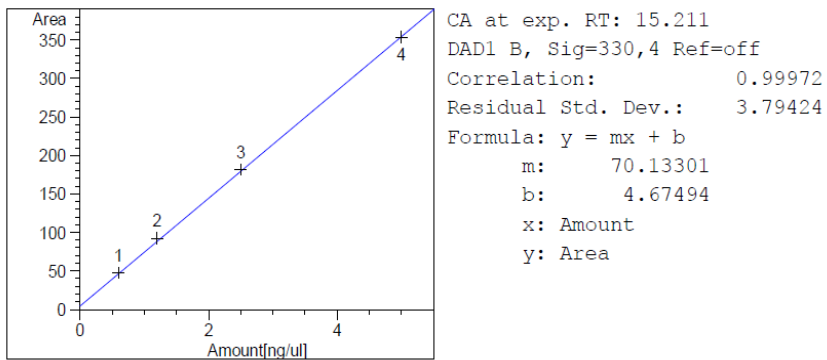


그림. 농도별 표준품의 크로마토그램 및 표준 정량 직선

Caffeic acid와 rosmarinic acid 표준물질 5 mg/kg의 분석 크로마토그램은 그림과 같다. caffeic acid의 retention time은 15.112 분이었으며, rosmarinic acid는 21.989 분이였다. 이들은 여러 농도에서 비슷한 피크 유지시간을 보였고 분리능도 우수하였다. 또한 직선성을 나타내는 상관계수( $R^2$ )는 표준용액을 주입하여 얻어진 피크의 각 농도별 면적 비를 구하여 검토하였는데 0.99 이상으로 만족할 수준이었다. caffeic acid와 rosmarinic acid의 분석 정량 한계와 검출 한계는 다음 표와 같다.

표. Caffeic acid와 rosmarinic acid 표준품의 분석 검출한계 및 분석 정량한계

	Caffeic acid	Rosmarinic acid
분석 정량 한계	0.03 $\mu\text{g}/\text{kg}$	0.07 $\mu\text{g}/\text{kg}$
분석 검출 한계	0.01 $\mu\text{g}/\text{kg}$	0.02 $\mu\text{g}/\text{kg}$

### 3. 기능성 들깨잎 추출물의 표준화 연구

#### 가. 실험 방법

##### (1) 기능성 들깨잎 추출물의 지표 물질 함량 측정

기능성 들깨잎 추출물에 대한 표준화 연구를 진행하기 위하여 기능성 들깨잎을 총 3회 열수 추출한 후, 동결건조하여 3 lot의 들깨잎 추출물을 제조한다. 각각 lot에서 3회씩 추출물을 1 mg/mL의 농도로 제조한 후, HPLC를 이용하여 지표 물질을 분석한다.

Instrument	Agilent 1200 series
Column	YMC-Triart C18 (250 × 4.6 mm, 5 μm)
Mobile phase	A : 0.05% trifluoroacetic acid B : MeOH 0 min : Sol. A / Sol. B (100/0), 40min : Sol. A / Sol. B (0/100)
Retention time	25.8 min
Flow rate	1 mL/min
Detector	340 nm

##### (2) 기능성 들깨잎 추출물의 지표 물질 확인

HPLC-MS를 이용하여 기능성 들깨잎 추출물의 지표 물질인 rosmarinic acid를 분자량으로 확인한다.

Instrument	LTQ Orbitrap (Thermo Electron corporation)
Column	Thermo Fisher Scientific BDS Hyperil C18 (150 × 2.1 mm, 5 μm)
Mobile phase	A : 0.05% trifluoroacetic acid B : MeOH 0-15 min : 5-60% Sol. B, 16-20 min : 60% Sol. B
Retention time	29.47
Flow rate	0.25 mL/min
Spray voltage	4.2 kV
Capillary temp.	230 °C
Capillary voltage	2 V
Mass resolution	60,000

## 나. 실험 결과

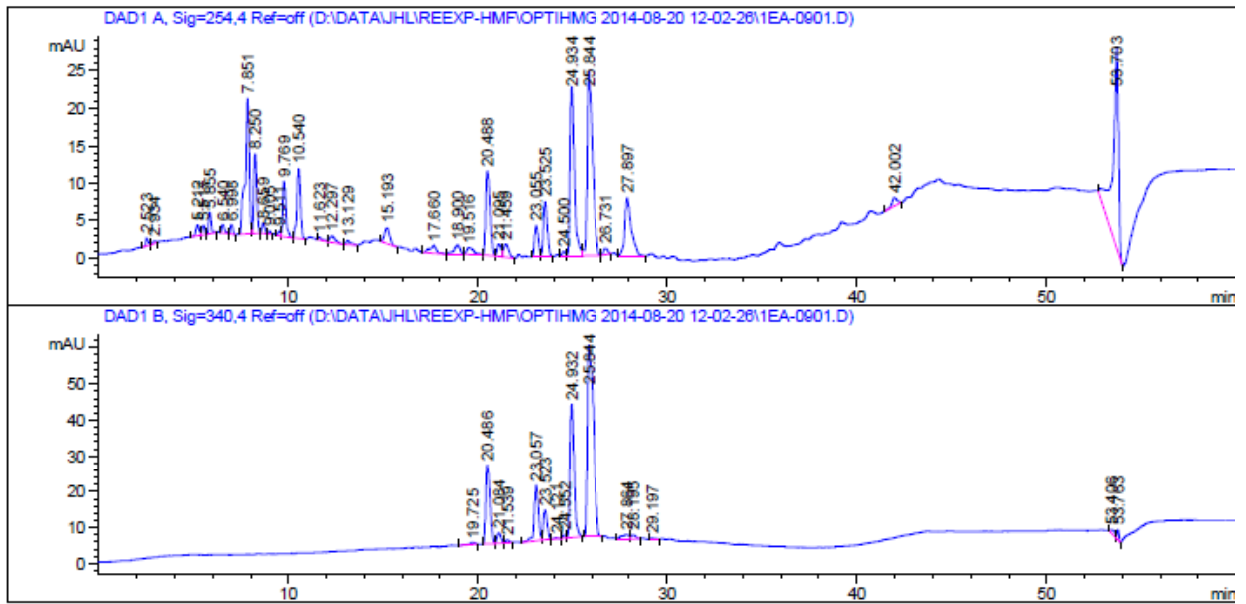
### (1) 기능성 들깨잎의 지표 물질 함량 측정

Data File D:\DATA\JHL\REEXP-HMF\OPTIHMG 2014-08-20 12-02-26\1EA-0901.D  
 Sample Name: Lot #1-1

```

=====
Acq. Operator   : HR                               Seq. Line :    9
Acq. Instrument : Instrument 1                     Location  : P1-E-01
Injection Date  : 8/20/2014 8:10:33 PM          Inj       :    1
                                                    Inj Volume: 20.0 µl

Acq. Method    : D:\DATA\JHL\REEXP-HMF\OPTIHMG 2014-08-20 12-02-26\CA AND RA.M
Last changed   : 8/20/2014 12:02:23 PM by HR
Analysis Method: D:\METHODS\HCO\MRP(G+L)\MRP-30MIN.M
Last changed   : 9/15/2014 4:08:01 PM by HR
                (modified after loading)
  
```



#### Area Percent Report

```

Sorted By      :      Signal
Multiplier:    :      1.0000
Dilution:      :      1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
  
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=254,4 Ref=off

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	2.523	BV	0.1358	9.01278	1.01316	0.3091
2	2.934	VB	0.1644	3.97775	3.21277e-1	0.1364
3	5.212	BV	0.2009	17.56333	1.41450	0.6024
4	5.517	VB	0.1608	12.70172	1.26839	0.4357
5	5.855	BB	0.1544	26.81255	2.83278	0.9197

Instrument 1 9/15/2014 4:09:56 PM HR

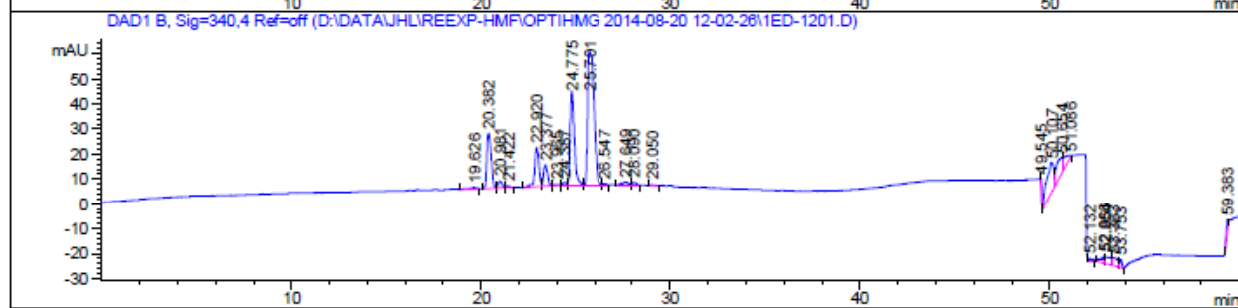
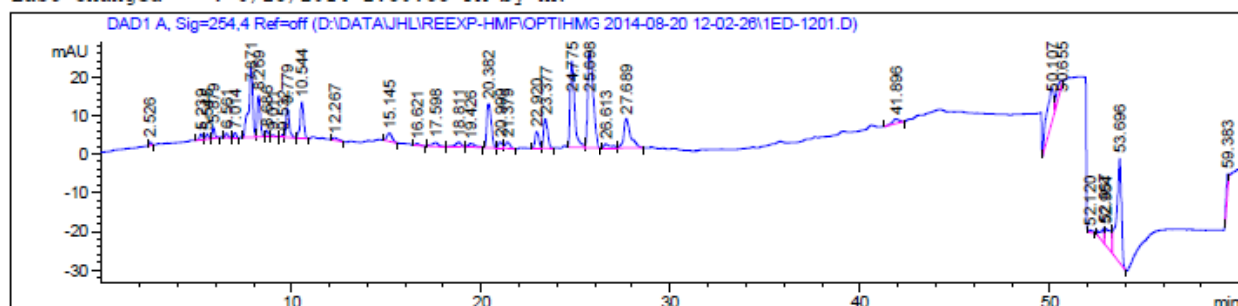
Page 1 of 3

Create PDF files without this message by purchasing novaPDF printer (<http://www.novapdf.com>)

```

=====
Acq. Operator   : HR                               Seq. Line : 12
Acq. Instrument : Instrument 1                       Location  : Pl-E-04
Injection Date  : 8/20/2014 11:13:31 PM           Inj       : 1
                                                    Inj Volume: 20.0 µl

Acq. Method     : D:\DATA\JHL\REEXP-HMF\OPTIHMG 2014-08-20 12-02-26\CA AND RA.M
Last changed    : 8/20/2014 12:02:23 PM by HR
Analysis Method : D:\METHODS\HCO\MRP(G+L)\MRP-30MIN.M
Last changed    : 8/23/2014 2:50:55 PM by HR
  
```



=====  
 Area Percent Report  
 =====

```

Sorted By      :      Signal
Multiplier:    :      1.0000
Dilution:      :      1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
  
```

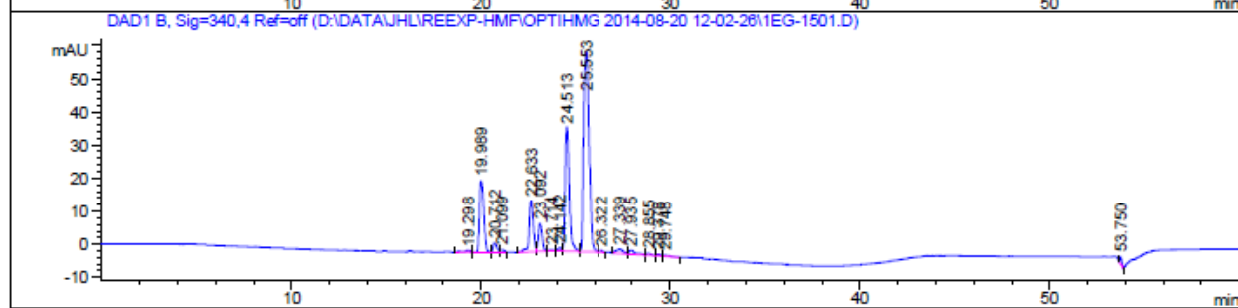
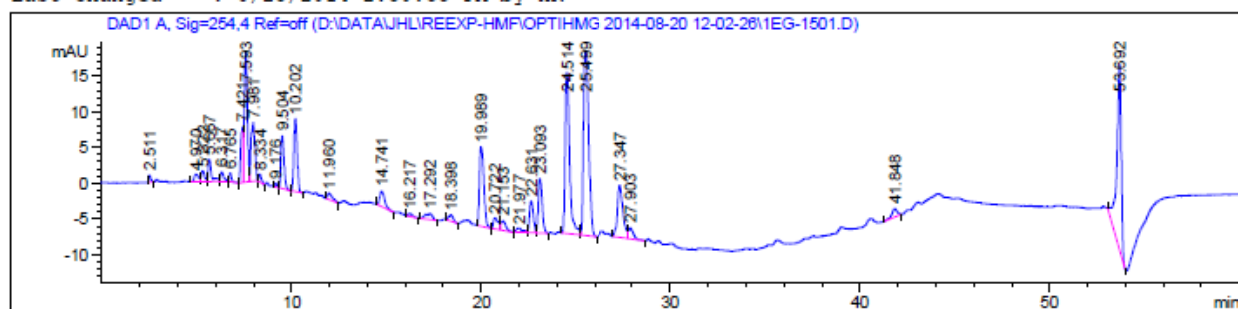
Signal 1: DAD1 A, Sig=254,4 Ref=off

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	2.526	BB	0.1047	7.29937	9.60258e-1	0.2171
2	5.239	BV	0.1851	17.66692	1.50393	0.5256
3	5.545	VB	0.1566	13.30161	1.33062	0.3957
4	5.879	BB	0.1510	26.66967	2.80411	0.7934
5	6.561	BV	0.1622	11.32670	1.08121	0.3370
6	7.014	VB	0.1485	11.67364	1.30369	0.3473

```

=====
Acq. Operator   : HR                               Seq. Line : 15
Acq. Instrument : Instrument 1                     Location  : Pl-E-07
Injection Date  : 8/21/2014 2:16:30 AM           Inj       : 1
                                                    Inj Volume: 20.0 µl

Acq. Method    : D:\DATA\JHL\REEXP-HMF\OPTIHMG 2014-08-20 12-02-26\CA AND RA.M
Last changed   : 8/20/2014 12:02:23 PM by HR
Analysis Method: D:\METHODS\HCO\MRP(G+L)\MRP-30MIN.M
Last changed   : 8/23/2014 2:50:55 PM by HR
  
```



=====  
 Area Percent Report  
 =====

```

Sorted By      :      Signal
Multiplier:    :      1.0000
Dilution:      :      1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
  
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=254,4 Ref=off

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	2.511	BB	0.1211	7.61981	9.98172e-1	0.2810
2	4.970	BV	0.2546	16.95638	1.03769	0.6252
3	5.322	VV	0.1940	20.15723	1.56795	0.7432
4	5.667	VV	0.1865	38.98000	3.10517	1.4373
5	6.317	VB	0.1864	15.64208	1.28110	0.5768
6	6.765	BB	0.1454	10.99234	1.21630	0.4053



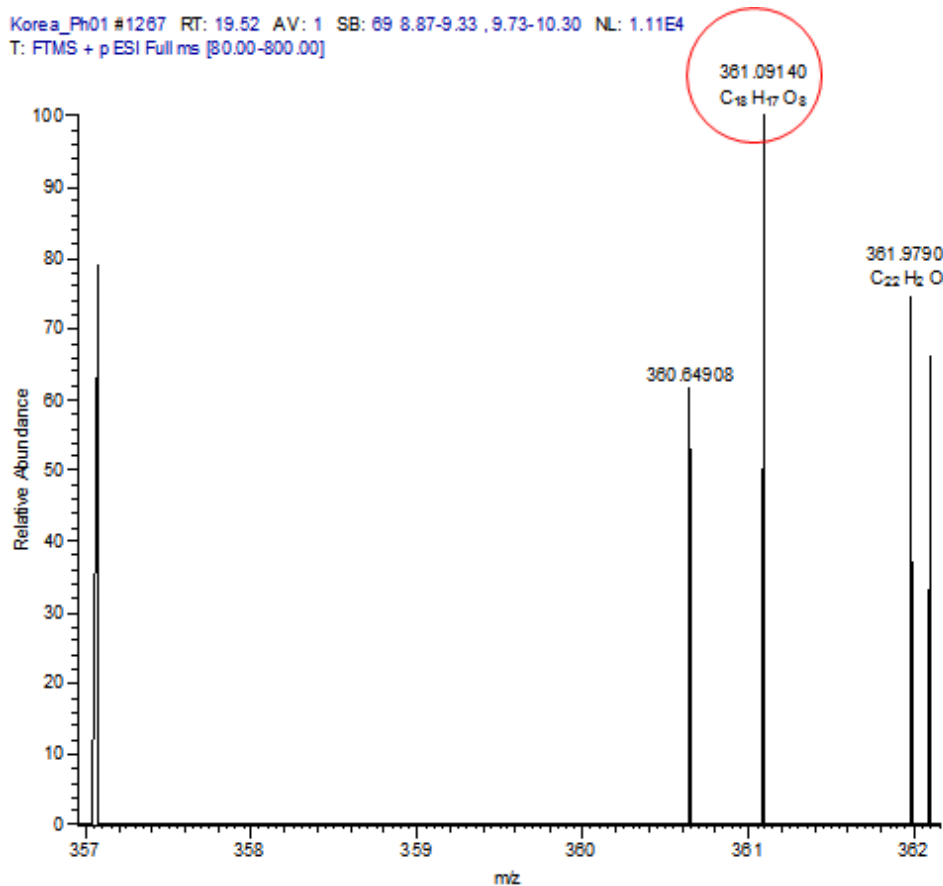
각 lot별 크로마토그램은 다음과 같으며, 25.8분에 동일하게 rosmarinic acid peak가 관찰되었다. 또한 각 lot별 rosmarinic acid의 함량은 다음 표와 같다.

Lot number	Rosmarinic acid 함량
#1	27.19 ± 1.08 µg/mg DM
#2	28.42 ± 0.44 µg/mg DM
#3	28.55 ± 0.21 µg/mg DM

각 lot에 따른 rosmarinic acid 함량의 차이는 나타나지 않았으며, 기능성 들깨잎 추출물은 27~28 µg/mg DM 수준의 rosmarinic acid를 포함하는 것을 확인할 수 있었다.

## (2) 기능성 들깨잎 추출물의 지표 물질 확인

HPLC-MS를 이용하여 기능성 들깨잎 추출물의 지표물질인 rosmarinic acid를 확인하였다. rosmarinic acid 표준 물질을 이용하였을 때, 19.47분에서 peak가 관찰되었으며, 기능성 들깨잎 추출물에서도 같은 시간대에 peak가 관찰되었다. 또한 분자량도 361로 나타났다.



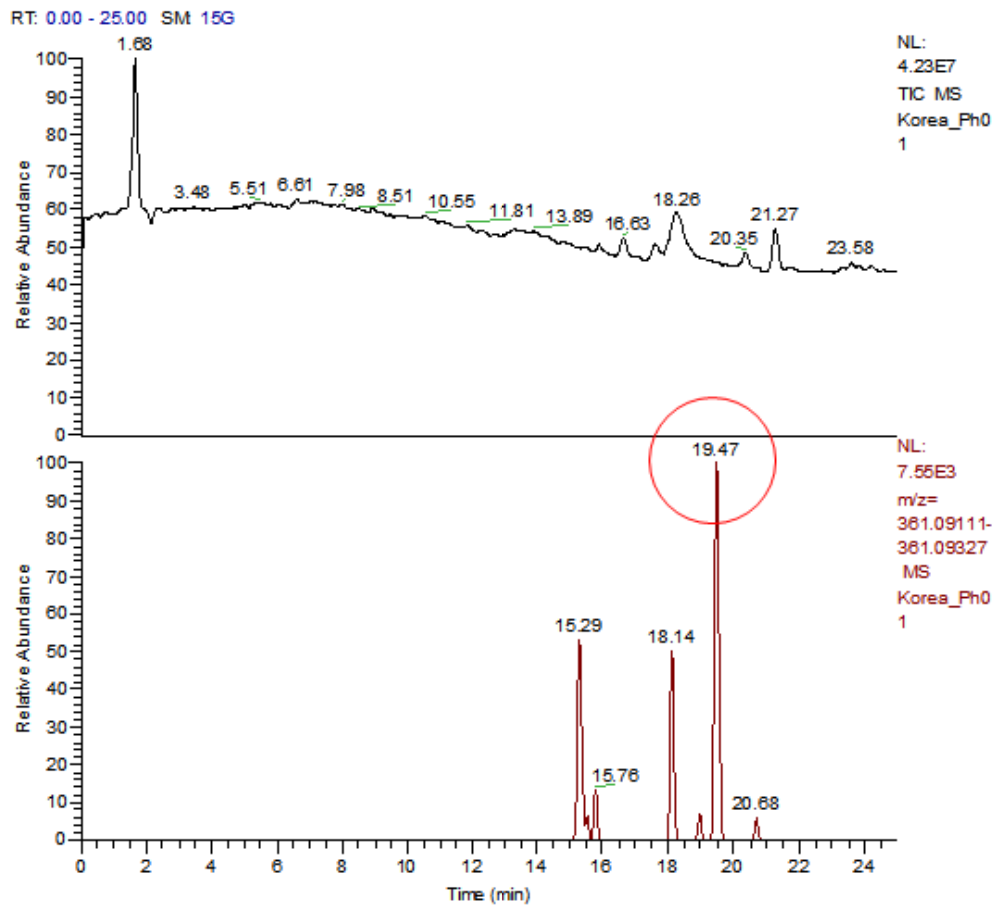


그림. Rosmarinic acid 표준품의 크로마토그램

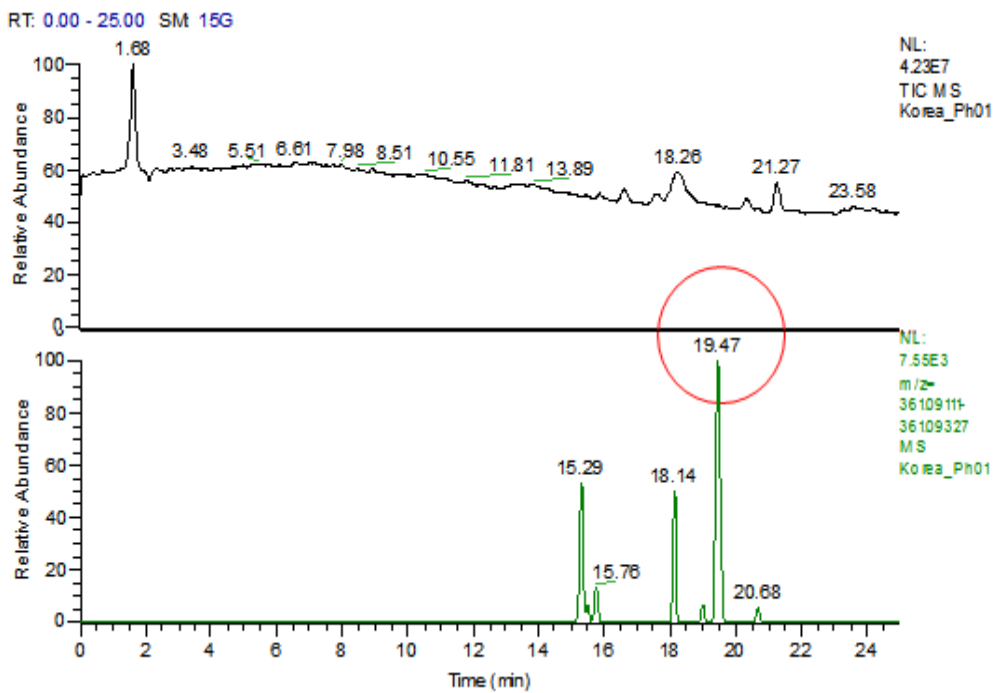


그림. 기능성 들깨잎 추출물의 크로마토그램

## 4. 기능성 들깨잎 추출물의 간보호 유효성 검증

### 가. 실험 방법

#### (1) 실험 동물

실험 동물은 체중 약 200g정도 되는 6주령 Sprague-Dawley Rat 수컷을 (주)샘타고로부터 분양받아 일주일간 적응 사육시킨 후 체중에 따른 난피법에 의하여 control 군 5마리, *tert*-butyl hydroperoxide (*t*-BHP) 처리군 7마리, 깻잎 추출물 농도별 처리군 (250mg/kg, 500mg/kg, 1000mg/kg) 각각 10마씩 3군으로 나누어 총 1주 동안 사육하였다. 동물사육실의 온도는 0~22℃, 습도 50%, 채광은 12시간 명암 조명(07:00~19:00)을 유지하였으며, 물과 식이는 자유급식을 시켰다.

#### (2) *tert*-butyl hydroperoxide (*t*-BHP)에 의한 간 독성 유발 및 동물처리

본 실험은 *tert*-butyl hydroperoxide (*t*-BHP)에 의해 유도된 랫드의 간 독성에 대한 고기능성 깻잎의 보호효과를 살펴보기 위해 진행하였다. 즉, 산화스트레스를 유발하는 *t*-BHP의 간보호 효과를 조사하기 위해 1일 1회 5일간 일정시간에 경구 투여법으로 고기능성 깻잎 추출물을 농도별로 각각 250 mg/kg, 500 mg/kg, 1000 mg/kg b.w 투여한 후, 마지막 날 0.5 mmol/kg b.w. *t*-BHP를 복강 주사하여 급성 간 독성을 유발하였다. 복강 주사한지 18시간 후, 에테르로 마취시켜 혈액 생화학적 분석을 위하여 복대 정맥으로부터 채혈하였고, 간은 생리식염수로 닦은 후 무게를 재고 조직학적 분석을 위해 10% 포르말린 용액에 고정시켰다. 나머지 간 조직은 생화학적 분석을 위해 액체 질소로 급속 냉동 후 -70℃에 저장하였다. 채취한 혈액은 3000 rpm, 4℃, 15 분간 원심분리하여 혈청을 분리하고 장기와 혈청시료는 분석 전까지 -70℃에 보관하였다.

#### (3) 혈청 생화학적 수치 검사

혈액 샘플을 진공 채혈관에 수거한 후 원심분리하여 혈청만을 모아 효소 활성을 측정한다. 효소 활성도 측정은 Bayer(USA)사의 AST reagent kit, ALT reagent kit, LDH reagent kit을 ADVIA(Japan) 분석기를 사용하여 혈청에서 측정하였다.

#### (4) 간 조직병리학적 병소 억제 평가

Hematoxylin & Eosin staining을 일반 염색이라 부르며, 가장 기본적인 조직 진단법으로서 사용되었다. 병리학적 영향을 측정하기 위하여 채취된 간을 10% 포르말린을 이용하여 고정 후, 24시간 동안 탈수 과정을 거쳐 조직을 투명화하여 paraffin을 침투하여 포매한다. 완성된 블록은 5 μm로 절편을 만들어 슬라이드에 도말, 건조한 후, xylene으로 paraffin을 제거한다. Hematoxylin은 염기성이므로 핵산에 결합하여 핵을 자주색으로 염색, Eosin은 약산성이므로 염기성을 가진 단백질에 결합하여 세포질을 분홍색으로 대조 염색한다. 질병에 의해 일어난 조직의 변화는 광학 현미경으로 검사하였다.

#### (5) 혈청 생화학적 수치 검사

*t*-BHP에 노출이 되면 생체메커니즘에 의해 산화반응이 일어나 그렇지 않은 정상군에 비해

많은 지질과산화물을 생성하게 되고, 이렇게 생성된 지질과산화물은 다시 생체메커니즘에 관여하여 많은 산화생성물을 생성하여 생명체에 나쁜 영향을 주게 된다.

TBARs 측정은 외부의 산화 스트레스에 의해 생성되는 carbonyl 화합물 중 malonaldehyde (MDA)의 생성에 근거를 둔 것으로서 MDA는 두 분자의 TBA와 한 분자의 MDA가 반응하여 적자색의 복합체를 형성하는 것을 측정하는 방법이다.

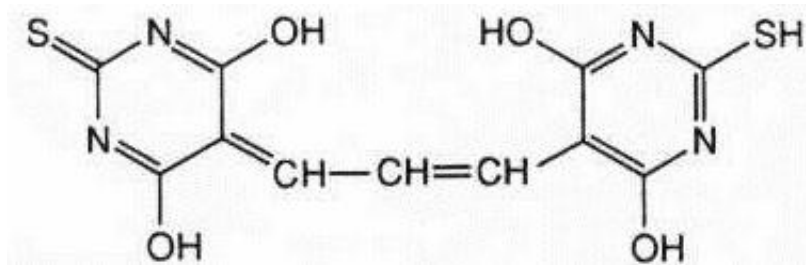


그림 6. TBA-MDA 복합체의 구조식

간 조직을 homogenizer를 이용하여 1.15 M KCl buffer에서 잘 마쇄 한 다음, 그 상등액 0.5 mL에 trichloroacetic acid (TCA) buffer (0.25 N HCl, 15% trichloroacetic acid, 0.375% thiobarbituric acid, 0.01% butyl hydroxytoluene) 0.5 mL을 첨가하여 상등액과 배양액을 합쳐서 95°C 수조에서 30분 동안 끓인 후 상온으로 식혀서 n-butanol을 넣고 격렬히 흔든다. 원심 분리 (800 rpm, 10 min) 후 상층액은 excitation 515 nm와 emission 552 nm에서 형광분석기를 이용하여 측정한다. thiobarbituric acid reactive substance (TBARs)는 1,1,3,3-tetraethoxypropane (TEP)의 산에 의한 가수분해로 얻어진 malondialdehyde (MDA) equivalent의 표준곡선을 작성한 다음, 이에 의거한 측정치를 MDA 농도 (pmol/mg protein)로 표기한다.

#### (6) 조직 내 glutathione 함량 측정

GSH는 매우 작은 단백질 펩타이드로 세포내에서 자연적으로 생성된다. 이는 글루타메이트, 글리신, 시스테인의 세가지 아미노산이 결합한 하나의 트리펩타이드로 세포 내 항산화 물질로 세포의 생존에 필수적인 물질이다. 특히 간 세포내의 GSH는 ROS에 의한 산화스트레스로부터 간 세포를 보호하는 역할을 하여 그 중요성이 매우 큰 것으로 알려져 있다.

적출한 간 조직 100 mg을 1 mL의 50 mM N-Ethylmaleimide (NEM)을 혼합한 후 ultrasonicator를 이용하여 균질화 한다. 균질화된 용액에 perchloric acid (PCA)를 5%의 농도로 첨가하고 1000 rpm, 4°C에서 원심분리를 실시한다. 상등액을 1 mL의 0.01 M iodoacetic acid (IAA) 100  $\mu$ L를 첨가한 후, NaHCO<sub>3</sub>을 이용하여 중성화 한다. 그 후, 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene (FDNB)을 이용하여 유도체화하여 HPLC를 이용하여 glutathione 함량을 측정한다.

#### (7) 통계 분석

통계처리는 SigmaStat(Systat Software Inc., Point Richmond, CA, USA)을 사용하여 ANOVA one-way로 유의차(p<0.05) 검정을 실시하였다.

## 나. 실험 결과

### (1) 실험 기간 중 몸무게의 변화와 식이 섭취량

몸무게, 식이량 그리고 음수량의 각 그룹 간에 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 실험 기간 중 몸무게는 모든 그룹에서 증가하는 경향을 나타냈으며, 각 그룹간의 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 식이량과 음수량 또한 6일간 각 실험군의 유의적인 차이는 나타내지 않았다.

### (2) 각 처리군에 따른 장기 무게

간이나 신장의 조직 무게 측정 결과 7 g 과 2 g 내외로 비슷한 무게를 보였으며, 위 결과를 토대로 그룹 간에 기능성 들깨잎 추출물의 농도별 투여에 의해 성장이나 발육에 영향을 미치지 않았음을 확인 할 수 있다.

### (3) 혈청 생화학적 수치 검사

혈청 중 ALT (alanine aminotransferase)와 AST (aspartate aminotransferase)는 간세포 내에 있는 효소로 간독성으로 인한 간세포의 괴사와 간 조직의 파괴가 진행함에 따라 aminotransferase가 혈중으로 유리되어 높은 활성을 나타내는 것으로 간 손상의 지표로 사용되고 있다. LDH는 lactate dehydrogenase라는 당분해과정의 마지막 단계에 작용하는 효소로 이 LDH는 간, 근육, 골격, 뇌, 신장, 적혈구, 심장 등에 많이 분포하는 효소임. 따라서 간이 손상될 경우 LDH 수치는 증가하게 된다.

혈청 중 ALT와 AST는 간세포 내에 있는 효소로 GPT (glutamic pyruvic transaminase)와 GOT (glutamic oxaloacetic transaminase)라고 한다. 이 효소들은 거의 모든 장기에 존재하며, 이 중 AST는 심장, 간, 골격, 혈구 내에 주로 존재하고, 80%가 세포 내의 미토콘드리아에 존재한다. 이에 비해 ALT는 주로 간에 분포하고 세포질에 존재한다. Fig. 2, 3에서 보는 바와 같이 ALT, AST는 *t*-BHP 투여 이후 혈청생화학 수치가 대조군에 비해 각각 71.0 (U/L), 264 (U/L)로 약 2.9배, 1.74배의 증가를 나타냈다. 고기능성 깻잎 추출물 투여군은 250 mg/kg, 500 mg/kg, 1000 mg/kg 군에서 ALT 활성이 각각 52.0 (U/L), 43.7 (U/L), 37.0 (U/L) 으로, AST 활성이 각각 215.7 (U/L), 213.0 (U/L), 192.0 (U/L)으로 나타났다. 또한 LDH의 경우 일반 깻잎과 고기능성 깻잎 추출물 투여군은 1000 mg/kg 군에서 활성이 각각 3540 (U/mL)와 1933 (U/mL)으로 *t*-BHP 투여군에 비해서 월등히 효소의 활성을 감소시키는 효과를 보여 *t*-BHP에 의한 간 독성에 대한 보호 효과가 있는 것으로 나타났다. 또한 기능성 들깨잎 추출물에서 저농도에 비해 고농도에서 더 높은 *t*-BHP에 의한 간 독성에 대한 보호 효과가 나타났다.

### AST

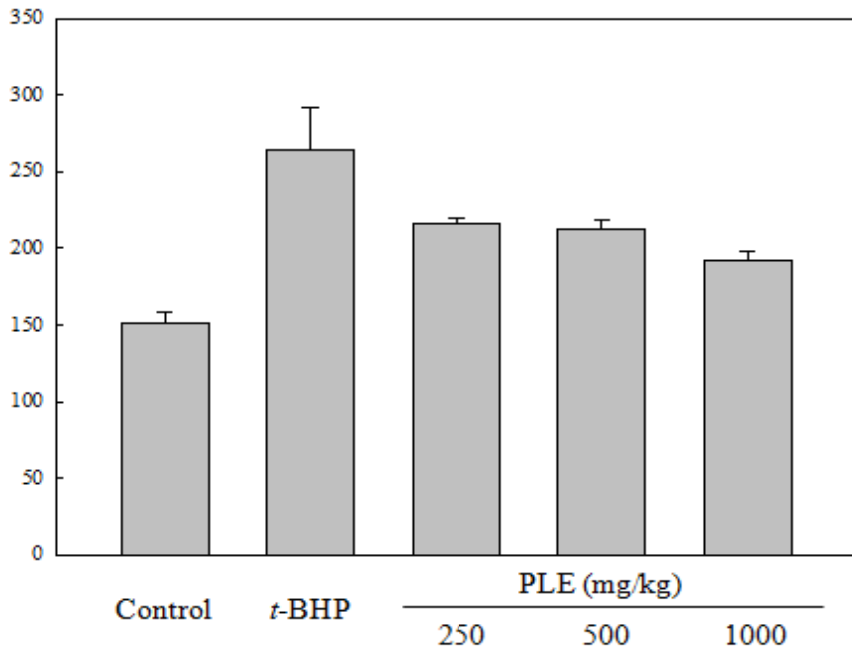


그림. 기능성 들깨잎 추출물에 의한 AST 측정

### ALT

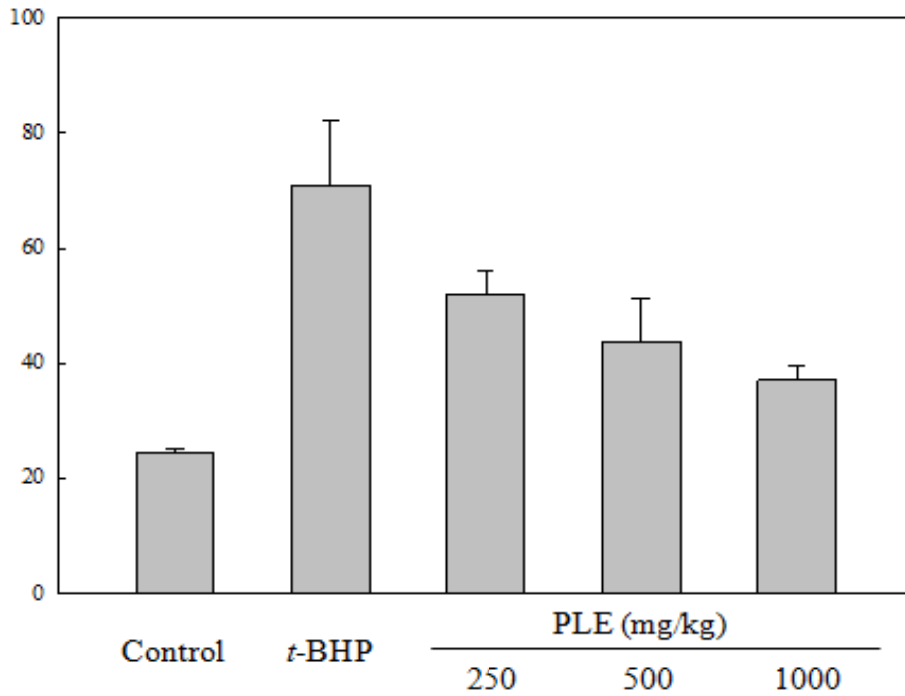


그림. 기능성 들깨잎 추출물에 의한 ALT 측정

#### (4) 지질과산화의 억제활성 평가

이 실험은 세포막 손상 정도와 관련된 것으로 세포 내 reactive oxygen species (ROS)가 발생하면 인지질 막에 다량 함유되어 있는 불포화지방산 수소원자를 제거하게 된다. 이로써 지질과산화의 연쇄반응이 유발되고 지방산 사슬에서 peroxy radical과 alkoxy radical이 생성된다. 이것들은 수소원자와 결합하여 lipid hydroperoxide를 생성하는데 이는 분해되어 malondialdehyde (MDA) 등의 aldehyde를 생성하게 됨. 이렇게 생성된 지질과산화물은 세포막의 투과성을 증가시키고 체액의 손실을 일으켜 단백질 변화를 유발시킨다. 이로 인해 암이나 동맥경화, 고혈압 등의 각종 질병을 일으키게 된다. 본 실험에서는 TBARs 법에 의해 지질과산화의 생성지표인 malondialdehyde (MDA)를 측정하였다. TBARs 법에서는 thiobarbituric acid와 불포화지방산이 반응하여 malondialdehyde를 생성하며 이것은 붉은 빛을 띠게 된다. 이 붉은 빛을 띠는 물질을 excitation 515 nm/emission 552 nm에서 측정한다.

처리 그룹은 control과 *t*-BHP 만 처리한 그룹, 그리고 *t*-BHP와 고기능성 깻잎 추출물을 농도별로 250 mg/kg, 500 mg/kg, 1000 mg/kg b.w. 을 투여한 그룹으로 나누었으며, *t*-BHP은 간독성을 일으키는 물질로 간에 산화스트레스를 유발하여 간독성에 관여되어 있다.

실험 결과 *t*-BHP 만 처리한 그룹은 control 그룹보다 lipid peroxidation을 많이 일으켜 많은 MDA를 생성한 것을 나타내고 있지만, 고기능성 깻잎 추출물을 투여한 그룹은 모두 MDA 생성을 감소시킨 것을 나타내고 있다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 고기능성 깻잎 추출물을 250 mg/kg, 500 mg/kg, 1000 mg/kg의 농도별로 투여한 그룹은 *t*-BHP를 처리한 그룹에 비하여 각각 약 1.2배, 1.4배, 2배 감소한 것으로 나타나 월등히 높은 MDA 생성을 줄여 *t*-BHP에 의한 간 독성에 대한 보호 효과가 있음을 나타냈다. 또한 고기능성 깻잎 추출물에서 고농도가 저농도에 비해 더 높은 MDA 생성을 줄여 *t*-BHP에 의한 간 독성에 대한 보호 효과가 더 큼을 확인하였다.

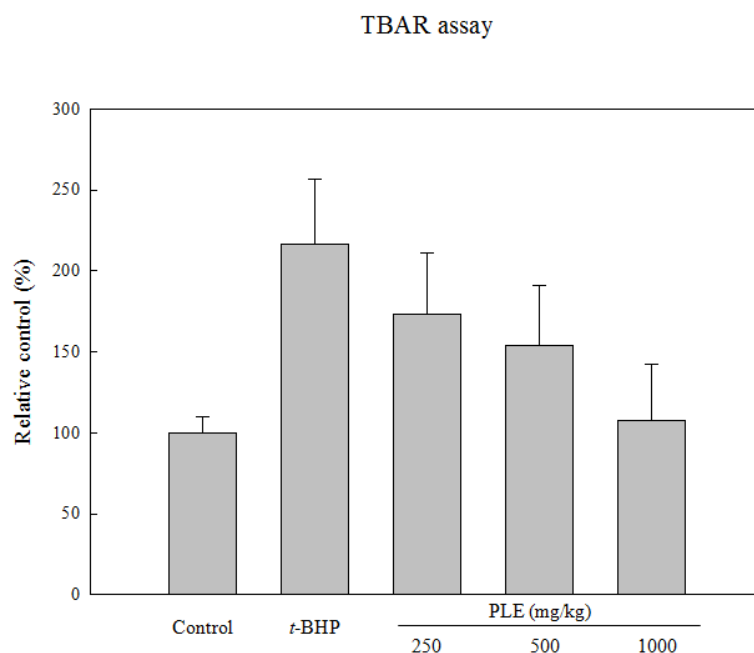


그림. 기능성 들깻잎 추출물에 의한 지질과산화 측정

### (5) 조직 내 Glutathione 함량 측정

실험군은 대조군과 *t*-BHP 0.5 mmol/kg b.w. 처리군, 고기능성 깻잎 추출물 1000, 500, 250 mg/kg b.w.과 *t*-BHP 0.5 mmol/kg b.w. 같이 처리한 실험군으로 나뉘어진다. *t*-BHP 0.5 mmol/kg b.w. 을 처리한 실험군은 대조군에 비하여 glutathione 함량이 약 85% 정도 수준으로 감소하는 것을 나타내지만, 고기능성 깻잎 추출물을 농도별로 처리하였을 때 GSH의 함량이 증가하는 것을 확인하였으며 특히 1000 mg/kg b.w. 을 *t*-BHP 0.5 mmol/kg b.w. 과 같이 처리하였을 때 대조군에 비하여 약 130% 정도 증가하는 결과를 나타냈다.

고기능성 깻잎 추출물을 처리하였을 경우 유의적인 차이를 나타내며 *t*-BHP에 의한 간 손상으로부터 간 보호 효과를 나타냄을 확인하였다.

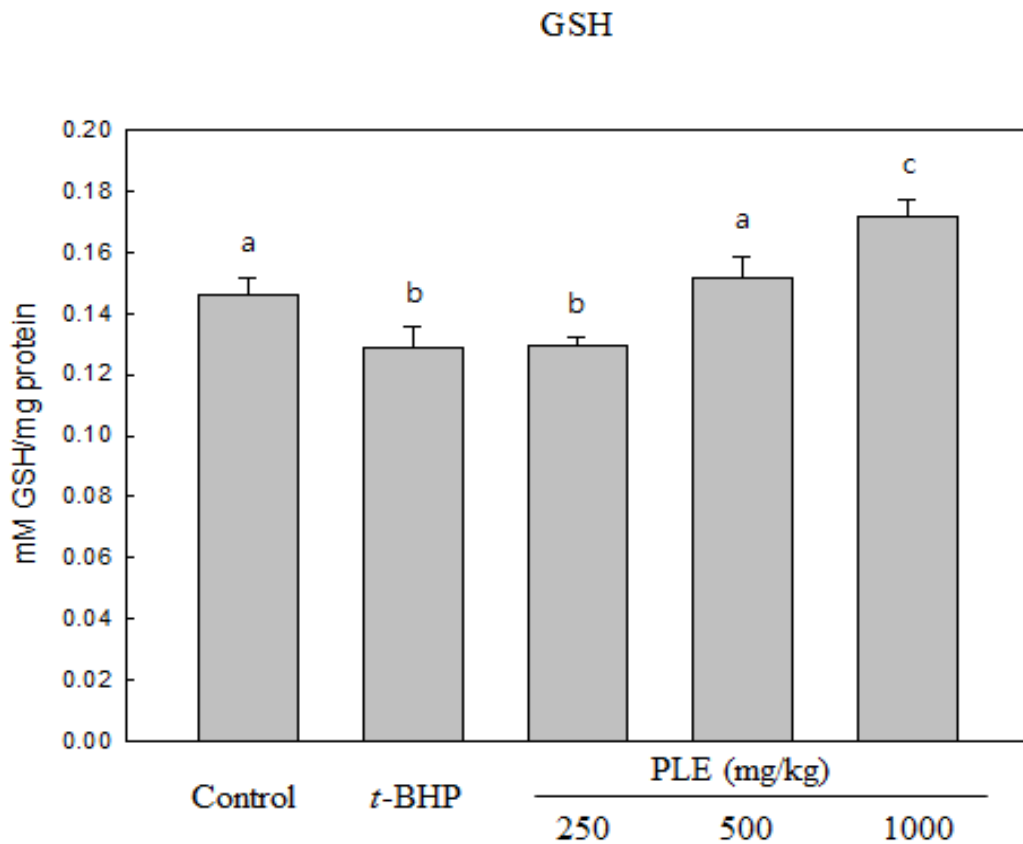


그림. 기능성 들깻잎 추출물에 의한 간 조직 내의 GSH 함량 측정



### (6) 조직병리학적 측정

간의 조직학적 검정은 생체의 형태 및 기능의 변화를 확인하여 질병의 원인, 발병 기전, 형태적 변화 및 기능적 장애를 관찰하여 질병의 진단과 예후 판정을 하는 것이다. Fig. 13에서 보는 바와 같이 대조군(A)은 정상세포로서 핵이 뚜렷이 보이며 그 간격이 일정하고, 잘 짜여진 소엽구조를 관찰할 수 있으며, t-BHP 처리군(B)은 세포 괴사(화살표)가 관찰되었다. 고기능성 들깨잎 추출물 투여군(C, D, E)은 대조군과 비교하였을 때 간세포의 necrosis 염증소견의 차이는 보이지 않아 t-BHP에 의한 간 손상을 회복되었음을 확인할 수 있다.

따라서 *in vivo* 수준의 결과를 보면 고기능성 들깨잎을 처리하였을 경우 혈액학적, 조직병리학적으로 산화스트레스에 대한 간 손상을 억제하는 효능이 뛰어난 것을 확인하였다.

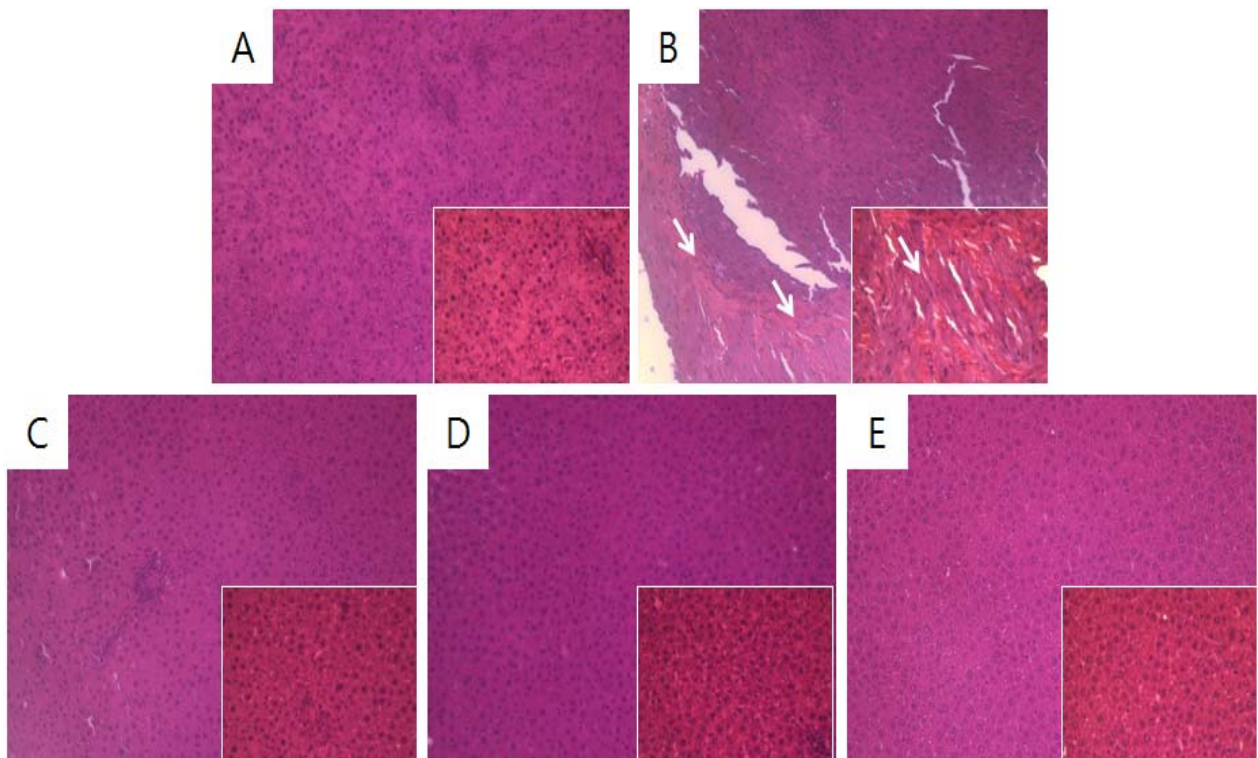


그림. 조직병리학 측정을 이용한 기능성 들깨잎 추출물의 간보호 활성 확인

## 5. 기능성 들깨잎 추출물 간보호 유효성 검증 - CCl<sub>4</sub> 스트레스 동물 모델

### 가. 실험 방법

#### (1) 실험 동물

실험 동물은 체중 약 200 g 정도 되는 6주령 Sprague-Dawley Rat 수컷을 (주)샘타코로부터 분양받아 일주일간 적응 사육시킨 후 체중에 따른 난피법에 의하여 대조군 7마리, carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>) 처리군 7마리, 깻잎 추출물 농도별 처리군 (250 mg/kg, 500 mg/kg, 1000 mg/kg) 각각 10마리씩 3군으로 나누어 총 1주 동안 사육하였다. 동물사육실의 온도는 0~22°C, 습도 50%, 채광은 12시간 명암 조명(07:00~19:00)을 유지하였으며, 물과 식이는 자유급식을 시켰다.

#### (2) Carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>)에 의한 간 독성 유발 및 동물처리

본 실험은 CCl<sub>4</sub>에 의해 유도된 랫드의 간 독성에 대한 기능성 들깨잎의 보호효과를 살펴보기 위해 진행하였다. 즉, 산화스트레스를 유발하는 CCl<sub>4</sub>의 간보호 효과를 조사하기 위해 1일 1회 5일간 일정시간에 경구투여법으로 기능성 들깨잎 추출물을 농도별로 각각 250 mg/kg, 500 mg/kg, 1000 mg/kg b.w 투여한 후, 동물 희생 12, 24시간 전 CCl<sub>4</sub>와 olive oil을 1:1로 혼합한 용액을 1 mL/kg b.w으로 복강 주사하여 급성 간 독성을 유발하였다. 에테르로 마취시킨 후 혈액 생화학적 분석을 위하여 복대 정맥으로부터 채혈하였고, 간은 생리식염수로 닦은 후 무게를 재고 조직학적 분석을 위해 10% 포르말린 용액에 고정시켰다. 나머지 간 조직은 생화학적 분석을 위해 액체 질소로 급속 냉동 후 -70°C에 저장하였다. 채취한 혈액은 3000 rpm, 4°C, 25 분간 원심분리하여 혈청을 분리하고 장기와 혈청시료는 분석 전까지 -70°C에 보관하였다.

#### (3) 혈청 생화학적 수치 검사

혈액 샘플을 진공 채혈관에 수거한 후 원심분리하여 혈청만을 모아 효소 활성을 측정한다. 효소 활성도 측정은 Bayer(USA)사의 AST reagent kit, ALT reagent kit, LDH reagent kit을 ADVIA(Japan) 분석기를 사용하여 혈청에서 측정하였다.

#### (4) 간 조직병리학적 병소 억제 평가

Hematoxylin & Eosin staining을 일반 염색이라 부르며, 가장 기본적인 조직 진단법으로서 사용되었다. 병리학적 영향을 측정하기 위하여 채취된 간을 10% 포르말린을 이용하여 고정 후, 24시간 동안 탈수 과정을 거쳐 조직을 투명화하여 paraffin을 침투하여 포매한다. 완성된 블록은 5 μm로 절편을 만들어 슬라이드에 도말, 건조한 후, xylene으로 paraffin을 제거한다. Hematoxylin은 염기성이므로 핵산에 결합하여 핵을 자주색으로 염색, Eosin은 약산성이므로 염기성을 가진 단백질에 결합하여 세포질을 분홍색으로 대조 염색한다. 질병에 의해 일어난 조직의 변화는 광학 현미경으로 검사하였다.

#### (5) 조직 생화학적 수치 검사

TBARs 측정은 외부의 산화 스트레스에 의해 생성되는 carbonyl 화합물 중 malonaldehyde (MDA)의 생성에 근거를 둔 것으로서 MDA는 두 분자의 TBA와 한 분자의 MDA가 반응하여 적자색의 복합체를 형성하는 것을 측정하는 방법이다.

간 조직을 homogenizer를 이용하여 1.15 M KCl buffer에서 잘 마쇄 한 다음, 그 상등액 0.5 mL에 trichloroacetic acid (TCA) buffer (0.25 N HCl, 15% trichloroacetic acid, 0.375% thiobarbituric acid, 0.01% butyl hydroxytoluene) 0.5 mL을 첨가하여 상등액과 배양액을 합쳐서 95°C 수조에서 30분 동안 끓인 후 상온으로 식혀서 n-butanol을 넣고 격렬히 흔든다. 원심 분리 (800 rpm, 10 min) 후 상층액은 excitation 515 nm와 emission 552 nm에서 형광분석기를 이용하여 측정한다. thiobarbituric acid reactive substance (TBARs)는 1,1,3,3-tetraethoxypropane (TEP)의 산에 의한 가수분해로 얻어진 malondialdehyde (MDA) equivalent의 표준곡선을 작성한 다음, 이에 의거한 측정치를 MDA 농도 (pmol/mg protein)로 표기한다.

### (6) 조직 내 glutathione 함량 측정

GSH는 매우 작은 단백질 펩타이드로 세포내에서 자연적으로 생성된다. 이는 글루타메이트, 글리신, 시스테인의 세가지 아미노산이 결합한 하나의 트리펩타이드로 세포 내 항산화 물질로 세포의 생존에 필수적인 물질이다. 특히 간 세포내의 GSH는 ROS에 의한 산화스트레스로부터 간 세포를 보호하는 역할을 하여 그 중요성이 매우 큰 것으로 알려져 있다.

적출한 간 조직 100 mg을 1 mL의 50 mM N-Ethylmaleimide (NEM)을 혼합한 후 ultrasonicator를 이용하여 균질화 한다. 균질화된 용액에 perchloric acid (PCA)를 5%의 농도로 첨가하고 1000 rpm, 4°C에서 원심분리를 실시한다. 상등액을 1 mL의 0.01 M iodoacetic acid (IAA) 100 µL를 첨가한 후, NaHCO<sub>3</sub>을 이용하여 중성화 한다. 그 후, 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene (FDNB)을 이용하여 유도체화하여 HPLC를 이용하여 glutathione 함량을 측정한다.

### (7) 조직 내 항산화 관련 효소 확인

#### (가) Catalase activity

간 조직을 50 mM phosphate buffer에 넣고 균질화 시킨다. 이를 13,000 g, 4°C에서 15 분간 원심분리 후 상등액을 취한다. 5% K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 수용액을 50 mL 만든 후 150 mL의 glacial acetic acid를 조심스럽게 넣어 200 mL의 reaction solution을 만든다. 또한 표준정량곡선은 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 이용하여 만든다.

반응은 다음 표와 같이 진행한다.

0.2 M H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	800 µL
50 mM phosphate buffer	1000 µL
Enzyme	200 µL
Total	2000 µL

반응 완료 후 끓는 물에서 10분간 끓인 후 570 nm에서 흡광도를 측정한다.

#### (나) Glutathione peroxidase (GPx) activity

간 조직을 50 mM phosphate buffer에 넣고 균질화 시킨다. 이를 13,000 g, 4°C에서 15분간 원심분리 후 상등액을 취한다. 반응은 다음 표와 같이 진행한다.

	Blank	Sample
1 M Tris-HCl	50 µL	50 µL
0.1 M GSH	20 µL	20 µL
1 unit GSH reductase	100 µL	100 µL
1 mM NADPH	150 µL	150 µL
Sample (enzyme)	-	100 µL
H <sub>2</sub> O	660 µL	560 µL
Total	980 µL	980 µL

반응은 37°C에서 1분간 진행하고, 반응 후 3.5 mM *t*-BHP 20 µL를 넣는다. 다시 37°C에서 1분간 반응시킨 후 340 nm에서 흡광도를 측정한다.

#### (다) Superoxide dismutase (SOD) activity

간 조직을 50 mM phosphate buffer에 넣고 균질화 시킨다. 이를 13,000 g, 4°C에서 15분간 원심분리 후 상등액을 취한다. 반응은 다음 표와 같이 진행한다.

	Blank	Sample
1 M potassium phosphate (pH 7.0)	50 µL	50 µL
0.1 M Xanthine	250 µL	250 µL
1 mM NADH	150 µL	150 µL
1 unit LDH enzyme	30 µL	30 µL
5 mM EDTA	100 µL	100 µL
Sample	-	100 µL
H <sub>2</sub> O	400 µL	300 µL
Total	980 µL	980 µL

반응은 23°C에서 1분간 진행하고, 반응 후 1 unit xanthine oxidase 20 µL를 넣는다. 그 후 340 nm에서 흡광도를 측정한다.

#### (8) 조직 내 염증 관련 cytokine 의 mRNA 및 단백질 발현 측정

CCl<sub>4</sub> 간 손상 모델은 이미 오래전부터 많이 사용된 동물 모델로 급성 간 독성을 일으키는 물질로 알려져 있다. CCl<sub>4</sub>에 노출될 경우 간 손상과 더불어 염증과 관련된 cytokine이 발현되

며 특히 Tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ), Interlukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-6, IL-10 등의 바이오마커가 널리 알려져 있다. 따라서 본 연구에서도 위의 바이오마커를 활용하여 기능성 들깨잎 추출물이 간 손상을 보호하며, 염증 관련 cytokine의 저감화에 영향을 미치는 것을 확인하였다. mRNA 유전자 발현을 측정하기 위하여 간 조직 0.1 g을 칭량하여 1 mL의 TRizol solution에 넣는다.

Pestle을 이용하여 간 조직을 균질화 시킨 후 chloform 200  $\mu$ L를 넣고 흔든다. 12,000 rpm, 4°C에서 15분간 원심분리 후 조심히 상등액만 취한다. 상등액과 동량의 isopropanol을 넣고 흔들어 준 후 실온에서 10분간 반응시킨다. 반응 후 다시 12,000 rpm, 4°C에서 10분간 원심분리한다. 상등액을 모두 제거하고 pellet만 남겨놓는 상태에서 1 mL의 75% ethanol을 넣어 washing 한 후 12,000 rpm, 4°C에서 5분간 원심분리 한다. pellet을 DEPC water에 녹인 후 Nanodrop을 이용하여 total RNA의 함량을 측정한다.

cDNA synthesis kit를 이용하여 조직으로부터 뽑아낸 RNA를 cDNA로 역전사하여 합성한 후 taq polymerase를 이용하여 RT-PCR과 qRT-PCR을 수행한다. PCR에 사용되는 primer는 다음과 같다.

Primer	Sequence		Length
GAPDH	Forward	AGT GCC AGC CTC GTC TCA TAG	105 bp
	Reverse	CCT TGA CTG TGC CGT TGA ACT	
TNF- $\alpha$	Forward	GCT CCC TCT CAT CAG TTC CA	184 bp
	Reverse	CCA CCA GTT GGT TGT CTT TG	
IL-6	Forward	CGG AGA GGA GAC TTC ACA G	157 bp
	Reverse	AGT GCA TCA TCG CTG TTC	
IL-10	Forward	GGT TGC CAA GCC TTA TCG GA	190 bp
	Reverse	ACC TGC TCC ACT GCC TTG CT	
IL-1 $\beta$	Forward	GAA GCT GTG GCA GCT ACC TAT GTC	514 bp
	Reverse	CTC TGC TTG AGA GGT GCT GAT GTA	

## 나. 실험 결과

### (1) 실험 기간 중 몸무게의 변화와 식이 섭취량

몸무게, 식이량 그리고 음수량의 각 그룹 간에 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 실험 기간 중 몸무게는 모든 그룹에서 증가하는 경향을 나타냈으며, 각 그룹간의 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 식이량과 음수량 또한 5일간 각 실험군의 유의적인 차이는 나타내지 않았다.

### (2) 각 처리군에 따른 장기 무게

간이나 신장의 조직 무게 측정 결과 7 g 과 2 g 내외로 비슷한 무게를 보였으며, 위 결과를

토대로 그룹 간에 기능성 들깨잎 추출물의 농도별 투여에 의해 성장이나 발육에 영향을 미치지 않았음을 확인 할 수 있다.

### (3) 혈청 생화학적 수치 검사

혈청 중 alanine aminotransferase(ALT)와 aspartate aminotransferase(AST)는 간세포 내에 있는 효소로 간독성으로 인한 간세포의 괴사와 간 조직의 파괴가 진행함에 따라 aminotransferase가 혈중으로 유리되어 높은 활성을 나타내는 것으로 간 손상의 지표로 사용되고 있다. 또한, ALT와 AST는 glutamic pyruvic transaminase(GPT)와 glutamic oxaloacetic transaminase(GOT)라고도 불린다. 이 효소들은 거의 모든 장기에 존재하며, 이 중 AST는 심장, 간, 골격, 혈구 내에 주로 존재하고, 80%가 세포 내의 미토콘드리아에 존재한다. 이에 비해 ALT는 주로 간에 분포하고 세포질에 존재한다. LDH는 lactate dehydrogenase라는 당분해과정의 마지막 단계에 작용하는 효소로 이 LDH는 간, 근육, 골격, 뇌, 신장, 적혈구, 심장 등에 많이 분포하는 효소임. 따라서 간이 손상될 경우 LDH 수치는 증가하게 된다.

다음 결과에서 보는 바와 같이 ALT, AST는 CCl<sub>4</sub> 투여 이후 혈청생화학 수치가 대조군에 비해 매우 높게 증가하는 것을 확인할 수 있다. 하지만 기능성 들깨잎 추출물 투여군은 250 mg/kg, 500 mg/kg, 1000 mg/kg 군에서 ALT와 AST 활성이 CCl<sub>4</sub> 처리군에 비하여 농도 의존적으로 낮아지는 경향을 확인하였다. 따라서 기능성 들깨잎 추출물은 저농도에 비해 고농도에서 더 높은 CCl<sub>4</sub>에 의한 간 독성에 보호 효과를 나타낸다.

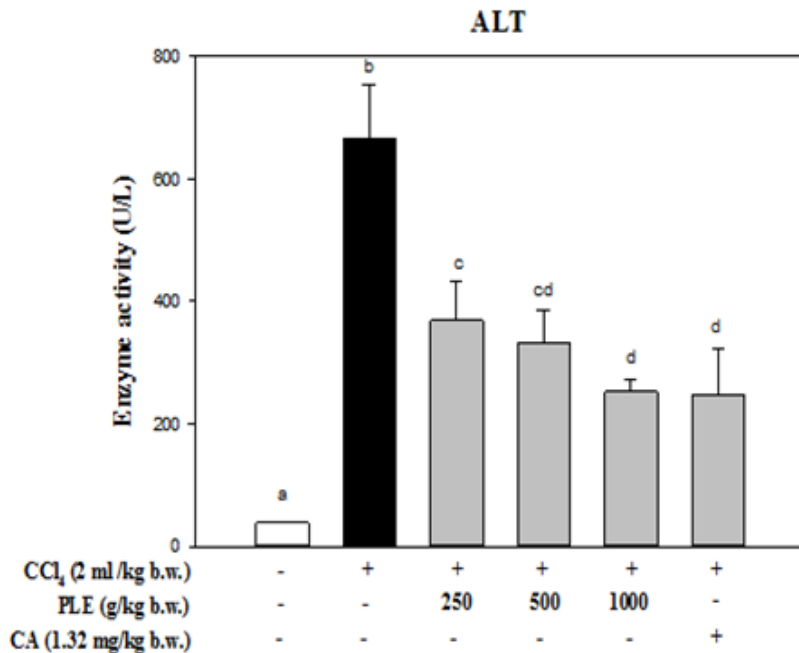


그림. 기능성 들깨잎 추출물에 의한 ALT 활성 측정

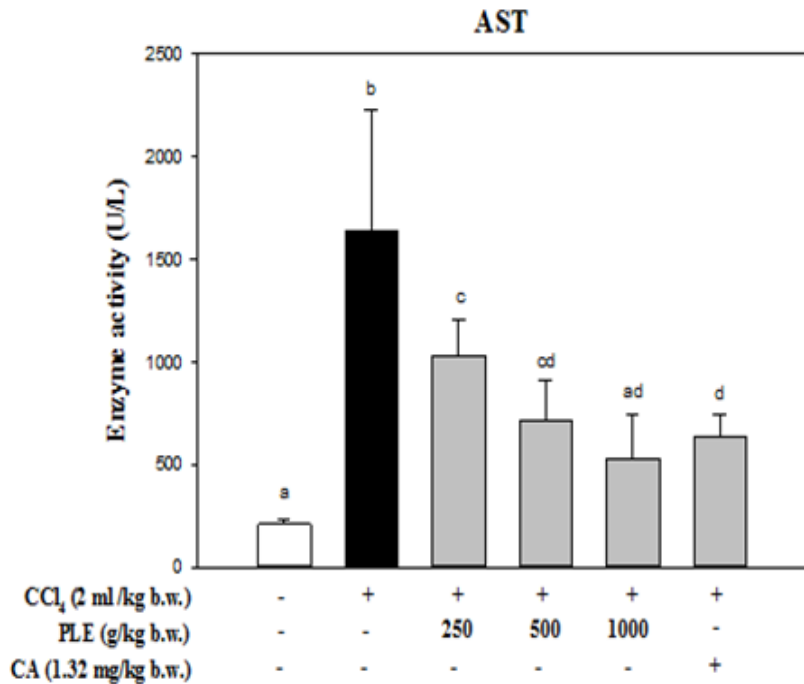


그림. 기능성 들깨잎 추출물에 의한 AST활성 측정

#### (4) 지질과산화의 억제활성 평가

이 실험은 세포막 손상 정도와 관련된 것으로 세포 내 ROS가 발생하면 인지질 막에 다량 함유되어 있는 불포화지방산 수소원자를 제거하게 된다. 이로써 지질과산화의 연쇄반응이 유발되고 지방산 사슬에서 peroxy radical과 alkoxy radical이 생성된다. 이것들은 수소원자와 결합하여 lipid hydroperoxide를 생성하는데 이는 분해되어 MDA 등의 aldehyde를 생성하게 된다. 이렇게 생성된 지질과산화물은 세포막의 투과성을 증가시키고 체액의 손실을 일으켜 단백질 변화를 유발시킨다. 이로 인해 암이나 동맥경화, 고혈압 등의 각종 질병을 일으키게 된다. 본 실험에서는 TBARs 법에 의해 지질과산화의 생성지표인 MDA를 측정하였다. TBARs 법에서는 thiobarbituric acid와 불포화지방산이 반응하여 malondialdehyde를 생성하며 이것은 붉은 빛을 띠게 된다. 이 붉은 빛을 띠는 물질을 excitation 515 nm/emission 552 nm에서 측정한다.

처리 그룹은 control과 CCl<sub>4</sub> 만 처리한 그룹, 그리고 CCl<sub>4</sub>와 기능성 들깨잎 추출물을 농도별로 250 mg/kg, 500 mg/kg, 1000 mg/kg b.w. 을 투여한 그룹으로 나누었으며, CCl<sub>4</sub>는 간 독성을 일으키는 물질로 간에 산화스트레스를 유발하여 간 독성에 관여되어 있다.

실험 결과 CCl<sub>4</sub> 만 처리한 그룹은 control 그룹보다 lipid peroxidation을 많이 일으켜 많은 MDA (1.64배)를 생성한 것을 나타내고 있지만, 기능성 들깨잎 추출물을 투여한 그룹은 모두 MDA 생성을 감소시킨 것을 나타내고 있다. 다음 결과에서 보는 바와 같이 기능성 들깨잎 추출물을 250 mg/kg, 500 mg/kg, 1000 mg/kg의 농도별로 투여한 그룹은 CCl<sub>4</sub>를 처리한 그룹에 비하여 각각 약 1.19배, 1.23배, 1.52배로 감소한 것으로 나타나 월등히 높은 MDA 생성을 줄여 CCl<sub>4</sub>에 의한 간 독성에 대한 보호 효과가 있음을 나타냈다. 또한 기능성 들깨잎 추출물에서 고농도 투여군이 대조군 수준으로 MDA 생성량을 줄여주는 것을 확인하여 저농도 투여군에 비해 CCl<sub>4</sub>에 의한 간 독성에 대한 보호 효과가 더 큼을 확인하였다.

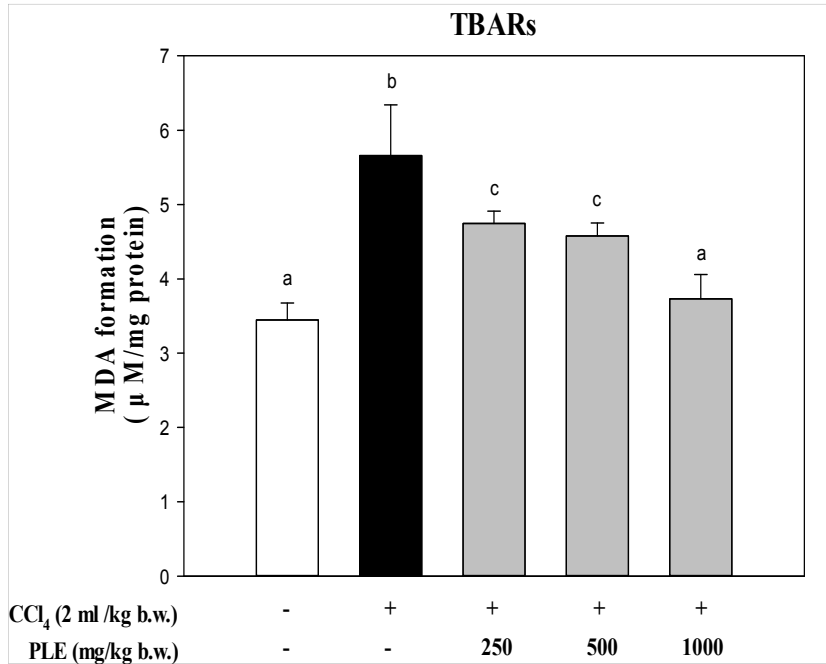


그림. 기능성 들깨잎 추출물에 의한 지질과산화 측정

#### (5) 조직내 Glutathione 함량 측정

실험군은 대조군과 CCl<sub>4</sub> 처리군, 기능성 들깨잎 추출물 1000, 500, 250 mg/kg b.w.과 CCl<sub>4</sub> 같이 처리한 실험군으로 나뉘어진다. CCl<sub>4</sub>를 처리한 실험군은 대조군에 비하여 glutathione 함량이 약 73% 정도 수준으로 감소하는 것을 나타내지만, 기능성 들깨잎 추출물을 농도별로 처리하였을 때 GSH의 함량이 CCl<sub>4</sub> 처리군에 비하여 증가하는 것을 확인하였으며 특히 1000 mg/kg b.w.을 CCl<sub>4</sub>와 같이 처리하였을 때 대조군에 비하여 약 109% 정도 증가하는 결과를 나타냈다.

기능성 들깨잎 추출물을 처리하였을 경우 CCl<sub>4</sub> 스트레스 유발군에 비하여 유의적인 차이를 나타내며 CCl<sub>4</sub>에 의한 간 손상으로부터 간 보호 효과를 나타냄을 확인하였다.

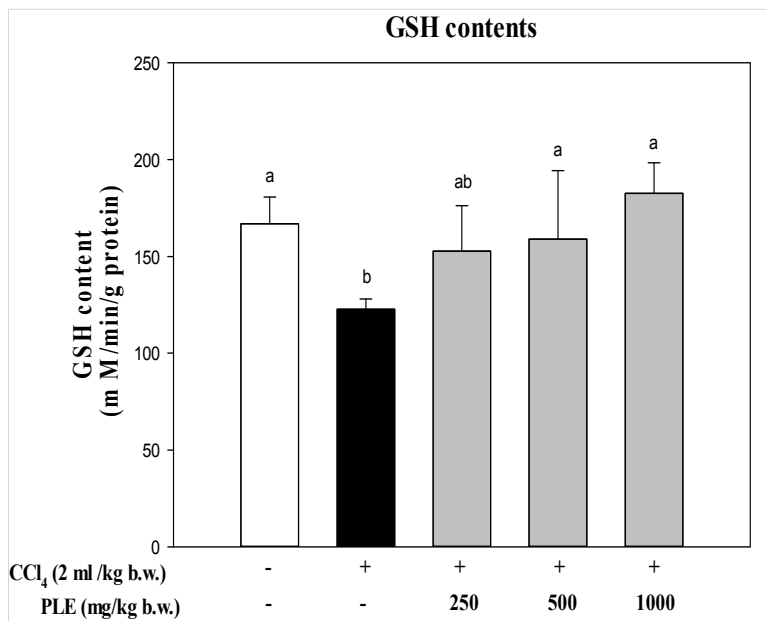


그림. 기능성 들깨잎 추출물에 의한 간 조직 내의 GSH 함량 측정



또한, Glutathione의 산화된 형태인 GSSG를 확인하였을 때, 대조군에 비하여 CCl<sub>4</sub> 처리군에서 함량이 크게 증가하는 것을 확인하였다. 그리고 기능성 들깨잎 추출물을 같이 투여하였을 때 CCl<sub>4</sub> 처리군에 비하여 GSSG의 함량이 감소하는 것을 확인하였다. CCl<sub>4</sub> 처리군에서는 대조군에 비하여 GSSG의 함량이 3.4배 증가하였으나, 기능성 들깨잎 추출물을 250, 500, 1000 mg/kg b.w. 으로 투여하였을 때 2.5, 2.7, 2.6배로 CCl<sub>4</sub> 투여군에 비하여 그 증가량이 감소한 것을 확인할 수 있었다. 따라서 기능성 들깨잎 추출물의 간 보호 활성을 확인할 수 있었다.

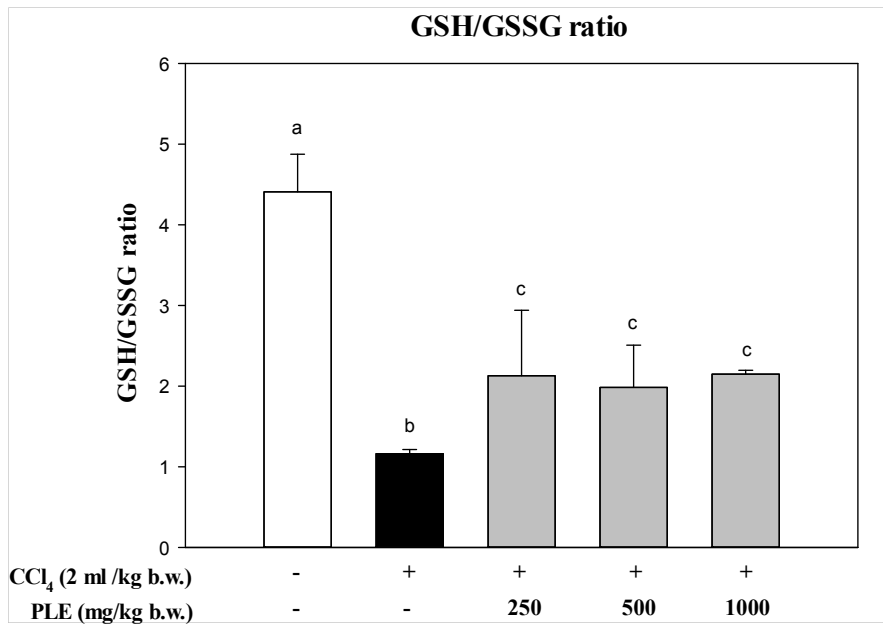


그림. 기능성 들깨잎 추출물에 의한 간 조직 내의 GSH/GSSG 비율 측정

그리고 GSH는 환원력을 지니기 때문에 항산화 활성을 지니지만 GSSG는 산화된 형태이므로 항산화 활성을 지니지 못한다. 따라서 GSH의 양이 많고 GSSG의 양이 적을수록 간 조직이 항산화 활성을 많이 지니게 된다. CCl<sub>4</sub> 투여군을 통하여 GSH와 GSSG의 비율을 확인해봤을 때 대조군에 비하여 CCl<sub>4</sub> 투여군은 GSH/GSSG 비율이 약 26% 정도 수준으로 감소한 것을 확인할 수 있다. 하지만 기능성 들깨잎 추출물을 투여하였을 때, 47% 정도 수준으로 CCl<sub>4</sub> 투여군에 비하여 증가한 것을 확인할 수 있다. 따라서 기능성 들깨잎 추출물이 간 조직 내에서 GSH의 생성을 증가시킴으로 CCl<sub>4</sub>에 의한 간 손상을 보호함을 확인할 수 있다.

## (6) 조직 내 항산화 관련 효소 확인

### (가) Catalase activity

간 조직 내 Catalase 효소의 활성을 측정함으로써  $\text{CCl}_4$  투여군에 의한 항산화 능력을 확인하기 위하여 실험을 진행하였다.

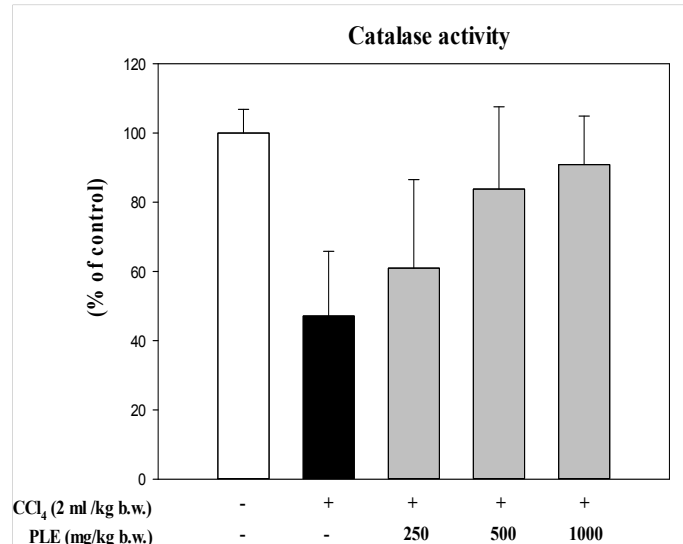


그림. 기능성 들깨잎 추출물에 의한 간 조직 내의 catalase 활성 측정

결과에서 보는 바와 같이 대조군에 비하여  $\text{CCl}_4$  처리군에서 catalase 효소의 활성이 크게 감소하는 것을 확인할 수 있으나, 기능성 들깨잎 추출물을 농도별로 투여하였을 때 catalase 효소의 활성이 점점 증가하는 것을 확인할 수 있다.

### (나) Glutathione peroxidase activity

또한 Glutathione peroxidase (GPx)는 산화된 GSH인 GSSG를 환원된 상태인 GSH로 변환시키는 효소로써 이를 통하여 GSH가 형성되어 산화스트레스로부터 보호 활성을 지니게 된다. 따라서 GPx의 효소 활성을 측정함으로써  $\text{CCl}_4$ 에 의한 스트레스로부터 기능성 들깨잎 추출물이 간 보호 활성을 나타냄을 확인하였다.

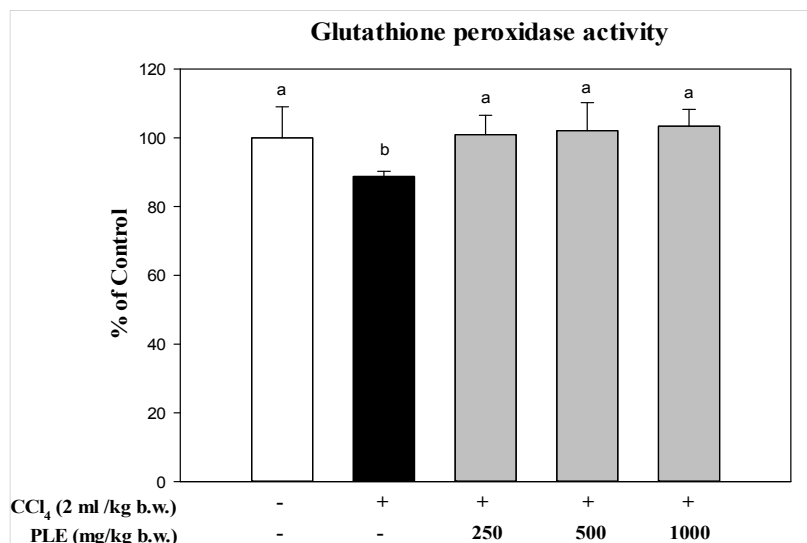
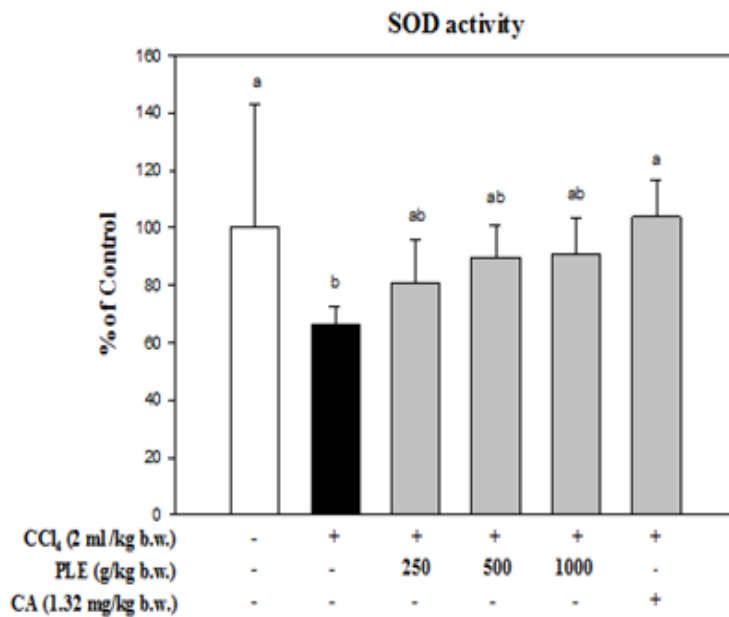


그림. 기능성 들깨잎 추출물에 의한 간 조직 내의 glutathione peroxidase 활성 측정

위의 결과에서 보는 바와 같이 대조군에 비하여 CCl<sub>4</sub> 처리군에서 GPx의 활성이 유의적으로 감소하였으나, 기능성 들깨잎 추출물을 농도별로 투여하였을 때 GPx의 활성이 대조군과 비슷한 수준으로 회복되는 것을 확인하였다. 따라서 기능성 들깨잎 추출물이 CCl<sub>4</sub>에 의한 간 손상으로부터 보호 활성을 지님을 확인할 수 있다.

**(다) Superoxide dismutase activity**

Superoxide dismutase (SOD) 효소는 조직 내의 활성산소종을 소거하는 능력을 지니는 효소으로써 조직 내의 산화스트레스로부터 보호 활성을 나타내는 효소이다. 따라서 SOD의 효소 활성을 측정함으로써 CCl<sub>4</sub>에 의한 스트레스로부터 기능성 들깨잎 추출물이 간 보호 활성을 나타냄을 확인하였다.



위의 결과에서 보는 바와 같이 대조군에 비하여 CCl<sub>4</sub> 처리군에서 SOD의 활성이 유의적으로 감소하였으나, 기능성 들깨잎 추출물을 농도별로 투여하였을 때 SOD의 활성이 대조군과 비슷한 수준으로 회복되는 것을 확인하였다. 따라서 기능성 들깨잎 추출물이 CCl<sub>4</sub>에 의한 간 손상으로 부터 보호 활성을 지님을 확인할 수 있다.

**(7) 조직내 cytokine 발현 측정**

**(가) RT-PCR**

CCl<sub>4</sub>에 의하여 손상된 간에서 나타날 수 있는 염증 마커인 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ 의 유전자 발현을 확인하였다. RT-PCR과 qRT-PCR을 이용하여 확인하였으며, PCR 조건은 다음과 같다.

Gene name	Annealing Temperature	Cycle
GAPDH	59.3°C	27
TNF- $\alpha$	59.3°C	30
IL-6	59.3°C	30
IL-1 $\beta$	63.4°C	27

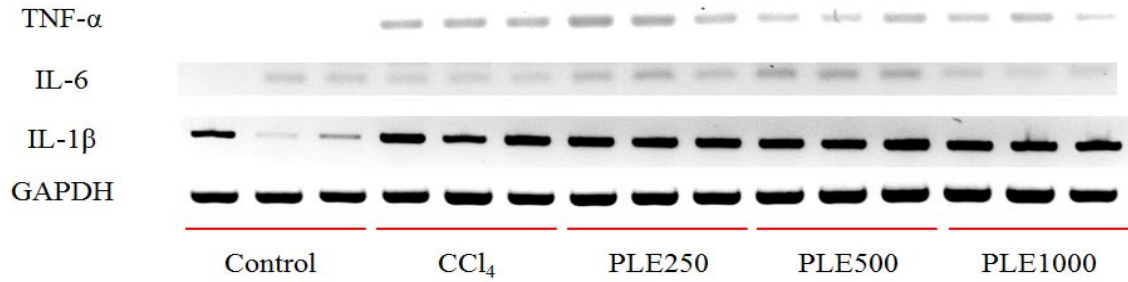


그림. TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ 의 유전자 발현 측정

대조군에서는 염증 마커의 발현이 CCl<sub>4</sub> 처리군에 비하여 감소하는 것을 확인할 수 있다. 또한 기능성 들깨잎 추출물의 투여 농도가 증가할수록 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ 의 유전자 발현이 감소하는 것을 확인할 수 있으며, GAPDH는 house keeping 유전자로써 모든 실험군에서 비슷한 수준으로 발현하는 것을 확인할 수 있다.

#### (나) Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)

같은 염증 발현 마커를 이용하여 qRT-PCR을 실시하였다. qRT-PCR은 RT-PCR을 계량한 것으로 증폭되는 핵산의 양을 정량적으로 검출하기 어려운 RT-PCR의 단점을 보완하여 증폭되는 핵산에 형광 물질을 붙이고 이 형광을 지속적으로 검출하는 방식으로 이루어진다. 본 실험에서는 SYBR green 형광 물질을 이용하여 실험을 진행하였으며, PCR 조건은 위의 RT-PCR과 동일한 조건을 사용하였다.

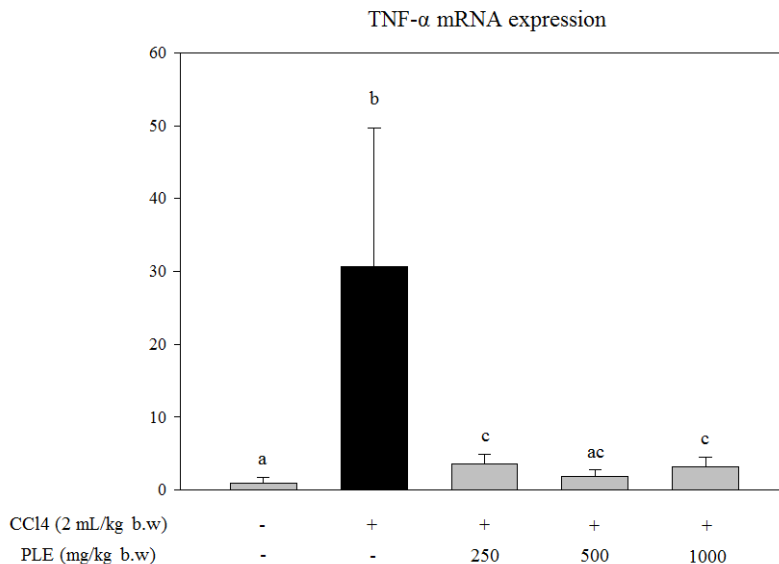
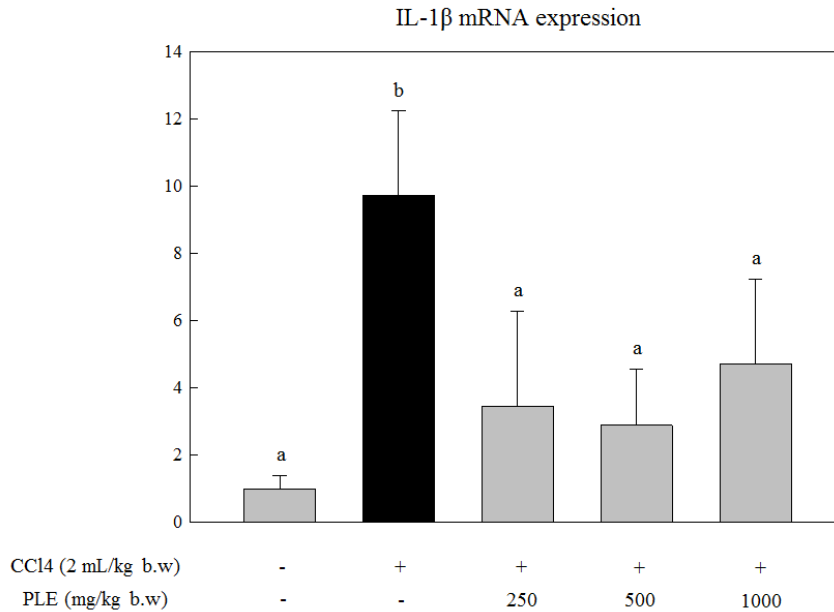


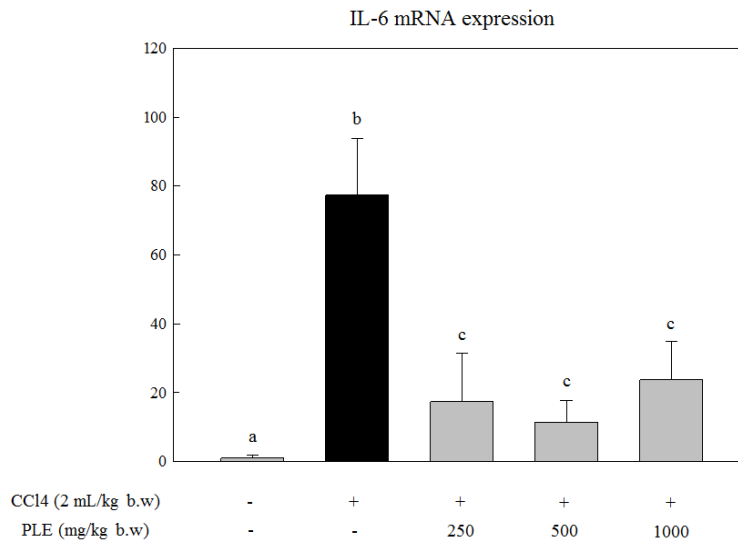
그림. TNF- $\alpha$  유전자 발현 측정

초기 염증 발현 마커인 TNF- $\alpha$ 의 경우 다음과 같이 CCl<sub>4</sub> 처리군에서 대조군에 비하여 높은 증가를 나타냈으나 기능성 들깨잎 추출물을 투여함에 따라 유전자 발현이 억제됨을 확인할 수 있었다. 농도에 따른 감소 경향은 나타나지 않았으나 기능성 들깨잎 추출물 투여군 사이의 유의적 차이는 나타나지 않고 모두 CCl<sub>4</sub> 투여군과 유의적인 차이를 나타내며 감소하였다.



**그림. IL-1 $\beta$  유전자 발현 측정**

염증 반응 마커인 IL-1 $\beta$ 의 경우에도 TNF- $\alpha$ 와 마찬가지로 CCl<sub>4</sub> 투여군에서 가장 높은 유전자 발현을 나타내었으며, 기능성 들깨잎 추출물을 처리하였을 때 감소하는 경향을 나타내었다. 기능성 들깨잎 농도에 따른 유의적인 차이는 나타나지 않았으며, 대조군과 비교하였을 때에도 기능성 들깨잎 투여군과 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 따라서 기능성 들깨잎 추출물 투여군은 대조군 수준으로 염증 반응 마커를 감소시키는 것을 확인할 수 있다.



**그림. IL-6 유전자 발현 측정**

IL-6 바이오마커 또한 대조군에 비하여 CCl<sub>4</sub> 처리를 하였을 때 크게 증가하는 것을 확인할 수 있다. 또한 기능성 들깨잎 추출물을 투여하였을 때 CCl<sub>4</sub> 처리군에 비하여 감소하는 것을 확인할 수 있으나, 위의 IL-1 $\beta$ 와 같이 대조군 수준으로 감소시키지는 못하였다. 하지만 CCl<sub>4</sub>에 비하여 크게 감소하는 것을 보아 기능성 들깨잎 추출물이 간의 염증 반응에 대하여 저해하는 효과가 있음을 확인할 수 있다.

## 6. 기능성 들깨잎 추출물 간보호 유효성 검증 - Fe-NTA 스트레스 동물 모델

### 가. 실험 방법

#### (1) 실험 동물

실험 동물은 체중 약 200 g 정도 되는 6주령 Sprague-Dawley Rat 수컷을 (주)샘타코로부터 분양받아 일주일간 적응 사육시킨 후 체중에 따른 난피법에 의하여 대조군 7마리, Ferric nitrilotriacetate (Fe-NTA) 처리군 7마리, 깻잎 추출물 농도별 처리군 (250 mg/kg, 500 mg/kg, 1000 mg/kg) 각각 10마씩 3군으로 나누어 총 1주 동안 사육하였다. 동물사육실의 온도는 0~22°C, 습도 50%, 채광은 12시간 명암 조명(07:00~19:00)을 유지하였으며, 물과 식이는 자유급식을 시켰다.

#### (2) Ferric nitrilotriacetate (Fe-NTA)에 의한 간 독성 유발 및 동물처리

본 실험은 Fe-NTA에 의해 유도된 랫드의 간 독성에 대한 기능성 들깨잎의 보호효과를 살펴보기 위해 진행하였다. Fe-NTA는 철 이온과 NTA의 복합체로 NTA는 산업체에서 킬레이트 화합물로 사용하거나 회토류 금속을 분리할 때 등 많은 분야에서 쓰고 있으며, 병원 또는 일반 가정에서 사용하는 세제 속에 많이 포함되어 상수도 오염의 주범이 된다. 이런 NTA는 물에 잘 녹을 뿐 아니라 중성의 pH에서 여러 금속이온들과 반응하여 다양한 복합체를 형성한다. 특히 철 복합체인 Fe-NTA는 간 독성 물질로서 마우스와 랫드에서 복강 주사시 간에서 산화스트레스를 유발하여 간 조직의 손상과 피사를 일으키는 것으로 널리 알려져 있다.

본 실험에서는 산화스트레스를 유발하는 Fe-NTA에 대한 간보호 효과를 조사하기 위해 1일 1회 5일간 일정시간에 경구 투여법으로 기능성 들깨잎 추출물을 농도별로 각각 250 mg/kg, 500 mg/kg, 1000 mg/kg b.w 투여한 후, 동물 희생 18시간 전 Fe-NTA는 Ferric nitrate (0.24 mmol/kg body weight (b.w.)) 용액을 농도가 4배 높은 NTA(0.96 mmole/kg b.w.) 용액과 혼합 후 sodium bicarbonate로 pH를 7.4로 보정하여 13.6 mg/kg b.w.으로 복강 주사하여 급성 간 독성을 유발하였다. 에테르로 마취시킨 후 혈액 생화학적 분석을 위하여 복대 정맥으로부터 채혈하였고, 간은 생리식염수로 닦은 후 무게를 재고 조직학적 분석을 위해 10% 포르말린 용액에 고정시켰다. 나머지 간 조직은 생화학적 분석을 위해 액체 질소로 급속 냉동 후 -70°C에 저장하였다. 채취한 혈액은 3,000 rpm, 4°C, 25 분간 원심분리하여 혈청을 분리하고 장기와 혈청시료는 분석 전까지 -70°C에 보관하였다.

#### (3) 혈청 생화학적 수치 검사

혈액 샘플을 진공 채혈관에 수거한 후 원심분리하여 혈청만을 모아 효소 활성을 측정한다. 효소 활성도 측정은 Bayer(USA)사의 AST reagent kit, ALT reagent kit, LDH reagent kit을 ADVIA(Japan) 분석기를 사용하여 혈청에서 측정하였다.

### 나. 실험 결과

#### (1) 실험 기간 중 몸무게의 변화와 식이 섭취량

몸무게, 식이량 그리고 음수량의 각 그룹 간에 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 실험 기간

중 몸무게는 모든 그룹에서 증가하는 경향을 나타냈으며, 각 그룹간의 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 식이량과 음수량 또한 5일간 각 실험군의 유의적인 차이는 나타나지 않았다.

### (2) 각 처리군에 따른 장기 무게

간이나 신장의 조직 무게 측정 결과 7 g 과 2 g 내외로 비슷한 무게를 보였으며, 위 결과를 토대로 그룹 간에 기능성 들깨잎 추출물의 농도별 투여에 의해 성장이나 발육에 영향을 미치지 않았음을 확인 할 수 있다.

### (3) 혈청 생화학적 수치 검사

혈청 중 alanine aminotransferase(ALT)와 aspartate aminotransferase(AST)는 간세포 내에 있는 효소로 간독성으로 인한 간세포의 괴사와 간 조직의 파괴가 진행함에 따라 aminotransferase가 혈중으로 유리되어 높은 활성을 나타내는 것으로 간 손상의 지표로 사용되고 있다. 또한, ALT와 AST는 glutamic pyruvic transaminase(GPT)와 glutamic oxaloacetic transaminase(GOT)라고도 불린다. 이 효소들은 거의 모든 장기에 존재하며, 이 중 AST는 심장, 간, 골격, 혈구 내에 주로 존재하고, 80%가 세포 내의 미토콘드리아에 존재한다. 이에 비해 ALT는 주로 간에 분포하고 세포질에 존재한다. LDH는 lactate dehydrogenase라는 당분해과정의 마지막 단계에 작용하는 효소로 이 LDH는 간, 근육, 골격, 뇌, 신장, 적혈구, 심장 등에 많이 분포하는 효소임. 따라서 간이 손상될 경우 LDH 수치는 증가하게 된다.

다음 결과에서 보는 바와 같이 ALT, AST는 Fe-NTA 투여 이후 혈청생화학 수치가 대조군에 비해 매우 높게 증가하는 것을 확인할 수 있다. 하지만 기능성 들깨잎 추출물 투여군은 250 mg/kg, 500 mg/kg, 1000 mg/kg 군에서 ALT 활성이 Fe-NTA 처리군에 비하여 농도 의존적으로 낮아지는 경향을 확인하였다. AST의 경우 기능성 들깨잎 추출물 250 mg/kg, 500 mg/kg 투여군에서는 Fe-NTA 처리군과 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 하지만 1000 mg/kg 투여군에서는 유의적인 차이를 나타내며 감소하여, AST의 경우 기능성 들깨잎 추출물 고농도 처리군에서만 유의적인 간보호 효과를 확인할 수 있었다. 따라서 기능성 들깨잎 추출물은 저농도에 비해 고농도에서 더 높은 Fe-NTA에 의한 간 독성에 보호 효과를 나타낸다.

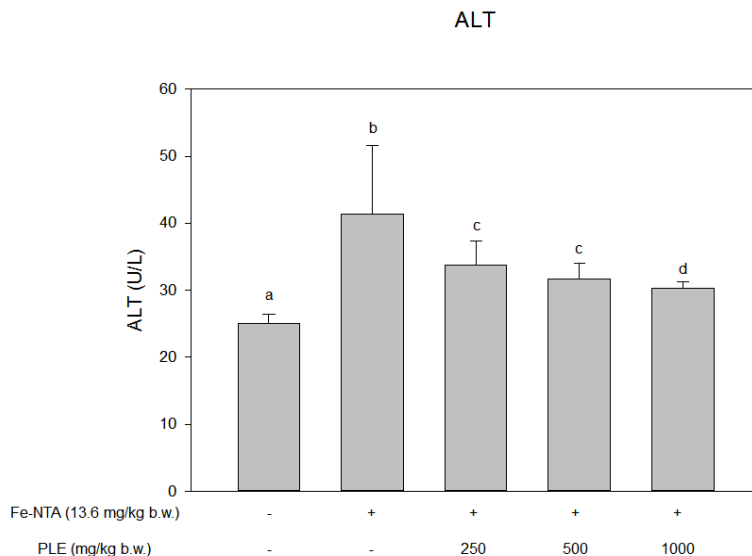


그림. 기능성 들깨잎 추출물에 의한 ALT 측정

### AST

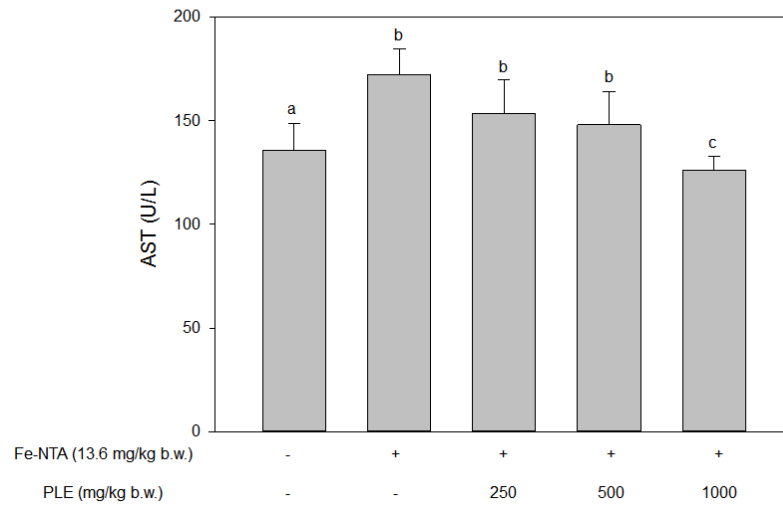


그림. 기능성 들깨잎 추출물에 의한 AST 측정



## 7. 기능성 들깨잎 추출물 간보호 유효성 검증 - Alcohol 급성 독성 동물 모델

### (1) 실험 동물

실험 동물은 체중 약 200 g 정도 되는 6주령 Sprague-Dawley Rat 수컷을 (주)샘타코로부터 분양받아 일주일간 적응 사육시킨 후 체중에 따른 난피법에 의하여 대조군 7마리, Ferric nitrilotriacetate (Fe-NTA) 처리군 7마리, 깻잎 추출물 농도별 처리군 (250 mg/kg, 500 mg/kg, 1000 mg/kg) 각각 10마씩 3군으로 나누어 총 1주 동안 사육하였다. 동물사육실의 온도는 0~22°C, 습도 50%, 채광은 12시간 명암 조명(07:00~19:00)을 유지하였으며, 물과 식이는 자유급식을 시켰다.

### (2) Ethanol (EtOH)에 의한 급성 간 독성 유발 및 동물처리

본 실험은 알콜에 의해 유도된 랫드의 간 독성에 대한 기능성 들깨잎의 보호효과를 살펴보기 위해 진행하였다. 알콜에 의해 유도되는 간 손상은 간 세포 내에 지방이 증가하는 현상을 동반하며 fat infiltration에 의해서 야기되며 간에서의 지방산의 합성과 분비의 균형이 알콜에 의해 저해됨으로써 나타나는 것으로 알려져 있다. 지방간이 진행되면서 간비대화가 나타나며 간괴사, 간경화 등으로 진전된다. 뿐만 아니라 고용량의 일회 섭취에 의해서도 알콜성 간 손상은 유도될 수 있다. 따라서 본 실험에서는 산화스트레스를 유발하는 Ethanol에 대한 간보호 효과를 조사하기 위해 1일 1회 5일간 일정시간에 경구투여법으로 기능성 들깨잎 추출물을 농도별로 각각 250 mg/kg, 500 mg/kg, 1000 mg/kg b.w 투여한 후, 동물 희생 6시간 전 6 g/kg b.w으로 경구투여하여 급성 알콜성 간 독성을 유발하였다. 에테르로 마취시킨 후 혈액 생화학적 분석을 위하여 복대 정맥으로부터 채혈하였고, 간은 생리식염수로 닦은 후 무게를 재고 조직학적 분석을 위해 10% 포르말린 용액에 고정시켰다. 나머지 간 조직은 생화학적 분석을 위해 액체 질소로 급속 냉동 후 -70°C에 저장하였다. 채취한 혈액은 3,000 rpm, 4°C, 25 분간 원심 분리하여 혈청을 분리하고 장기와 혈청시료는 분석 전까지 -70°C에 보관하였다.

### (3) 혈청 생화학적 수치 검사

혈액 샘플을 진공 채혈관에 수거한 후 원심분리하여 혈청만을 모아 효소 활성을 측정한다. 효소 활성도 측정은 Bayer(USA)사의 AST reagent kit, ALT reagent kit, LDH reagent kit을 ADVIA(Japan) 분석기를 사용하여 혈청에서 측정하였다.

## 나. 실험 결과

### (1) 실험 기간 중 몸무게의 변화와 식이 섭취량

몸무게, 식이량 그리고 음수량의 각 그룹 간에 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 실험 기간 중 몸무게는 모든 그룹에서 증가하는 경향을 나타냈으며, 각 그룹간의 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 식이량과 음수량 또한 5일간 각 실험군의 유의적인 차이는 나타내지 않았다.

### (2) 각 처리군에 따른 장기 무게

간이나 신장의 조직 무게 측정 결과 7 g 과 2 g 내외로 비슷한 무게를 보였으며, 위 결과를 토대로 그룹 간에 기능성 들깨잎 추출물의 농도별 투여에 의해 성장이나 발육에 영향을 미치지 않았음을 확인 할 수 있다.

### (3) 혈청 생화학적 수치 검사

혈청 중 alanine aminotransferase(ALT)와 aspartate aminotransferase(AST)는 간세포 내에 있는 효소로 간독성으로 인한 간세포의 괴사와 간 조직의 파괴가 진행함에 따라 aminotransferase가 혈중으로 유리되어 높은 활성을 나타내는 것으로 간 손상의 지표로 사용되고 있다. 또한, ALT와 AST는 glutamic pyruvic transaminase(GPT)와 glutamic oxaloacetic transaminase(GOT)라고도 불린다. 이 효소들은 거의 모든 장기에 존재하며, 이 중 AST는 심장, 간, 골격, 혈구 내에 주로 존재하고, 80%가 세포 내의 미토콘드리아에 존재한다. 이에 비해 ALT는 주로 간에 분포하고 세포질에 존재한다. LDH는 lactate dehydrogenase라는 당분해과정의 마지막 단계에 작용하는 효소로 이 LDH는 간, 근육, 골격, 뇌, 신장, 적혈구, 심장 등에 많이 분포하는 효소임. 따라서 간이 손상될 경우 LDH 수치는 증가하게 된다.

다음 결과에서 보는 바와 같이 ALT, AST는 EtOH 투여 이후 혈청생화학 수치가 대조군에 비해 매우 높게 증가하는 것을 확인할 수 있다. 하지만 기능성 들깨잎 추출물 투여군은 250 mg/kg, 500 mg/kg, 1000 mg/kg 군에서 ALT와 AST 활성이 EtOH 처리군에 비하여 농도 의존적으로 낮아지는 경향을 확인하였다. 기능성 들깨잎 추출물 500 mg/kg과 1000 mg/kg 투여군에서 통계학적 유의적 차이는 나타나지 않았으나 감소하는 경향은 지속적으로 관찰되었다. 따라서 기능성 들깨잎 추출물은 저농도에 비해 고농도에서 더 높은 EtOH에 의한 간 독성에 보호 효과를 나타낸다.

### ALT

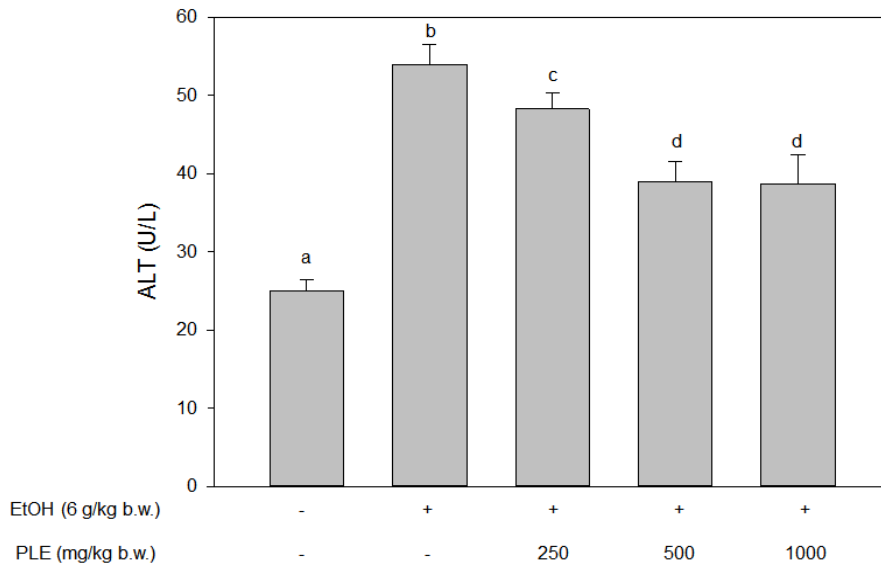


그림. 기능성 들깨잎 추출물에 의한 ALT 측정

### AST

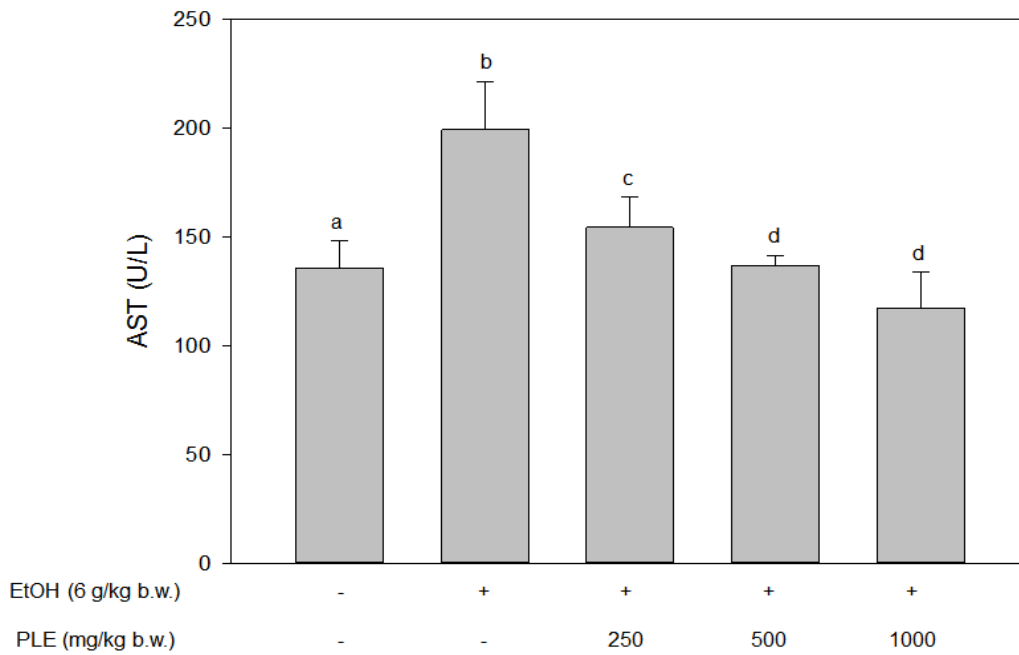


그림. 기능성 들깨잎 추출물에 의한 AST 측정

## 8. 기능성 들깨잎 추출물의 기준규격 설정

### 가. 실험 방법

#### (1) 잔류농약 검사

식품공전의 “다중 농약 다성분 분석법(제2법)”을 이용한다. 이 방법은 곡류, 서류, 콩류, 견과종실류, 과실류, 채소류, 버섯류 등 식품에 적용하는 방법으로 검체를 아세트니트릴로 추출한 다음, 기체크로마토그래프(GC) 측정농약은 후로리실 카트리지로 정제하여 기체크로마토그래프로 측정하고 액체크로마토그래프(LC) 측정농약은 아미노-프로필 카트리지로 정제하여 액체크로마토그래프로 측정한다.

Instrument	GC	GC
Column	HP-5 30m × 0.320mm × 0.25 $\mu$ m	HP-5 30m × 0.250mm × 0.25 $\mu$ m DB-17 30m × 0.250mm × 0.25 $\mu$ m
Detector	ECD	$\mu$ -ECD
Carrier gas	N <sub>2</sub> 1 mL/min	N <sub>2</sub> 1 mL/min, 1.5 mL/min
Injector	280 $^{\circ}$ C	280 $^{\circ}$ C / 260 $^{\circ}$ C
Oven	140 $^{\circ}$ C (2mins)→5 $^{\circ}$ C/min→170 $^{\circ}$ C (5mins) →3 $^{\circ}$ C/min	150 $^{\circ}$ C (2min)→5 $^{\circ}$ C/min→170 $^{\circ}$ C (5min) →4 $^{\circ}$ C/min→200 $^{\circ}$ C (4min)→230 $^{\circ}$ C (4mi)→10 $^{\circ}$ C/min→280 $^{\circ}$ C (16min)

Instrument	GC	GC
Column	SPB-608 30m × 250 $\mu$ m × 0.25 $\mu$ m	DB-5 30m × 0.250mm × 0.25 $\mu$ m DB-17 30m × 0.25mm × 0.25 $\mu$ m
Detector	NPD (temp 320 $^{\circ}$ C)	NPD (temp 280 $^{\circ}$ C)
Carrier gas	N <sub>2</sub> 1.5 mL/min	N <sub>2</sub> 1 mL/min
Injector	280 $^{\circ}$ C, splitless modes(purge time 0.75min)	260 $^{\circ}$ C, splitless modes(purge time 0.9min)
Oven	100 $^{\circ}$ C (3mins)→15 $^{\circ}$ C/min→170 $^{\circ}$ C (3min) →5 $^{\circ}$ C/min→200 $^{\circ}$ C (5min)→10 $^{\circ}$ C/min→ 280 $^{\circ}$ C (8min)	80 $^{\circ}$ C (2mins)→7 $^{\circ}$ C/min→250 $^{\circ}$ C→5 $^{\circ}$ C /min→280 $^{\circ}$ C (15min)→10 $^{\circ}$ C/min→30 0 $^{\circ}$ C (10min)

Instrument	GC
Column	HP-5MS 30m × 0.25mm × 0.25µm
Detector	MSD
Carrier gas	He 1 mL/min
Injector	260℃
Oven	70℃(2mins)→25℃/min(130℃)→2℃/min(220℃)→10℃/min→280℃(5mins)
Mode	SIM

Instrument		LC-MS/MS					
HPLC	Column	SP Column MG 2.0mm × 150.0mm 5µm				Oven temp.	40℃
	Mobile phase	Time	A (10% ACN in 10% ammonium acetate)			B (90% ACN in 10% ammonium acetate)	
		1	80			20	
		4	0			100	
		6.5	0			100	
		7	80			20	
		12	80			20	
Flow rate	200 µl/min			Injection Vol.	3µl		
MS / MS	Ionization type	ESI(positive ion mode)					
	Source	Turboionspray source					
	Curtain gas	15	Collison Gas	5	Ion source Gas 1,2	50, 60	
	Voltage	5200			Temperature	550℃	
		Precursor Ion	Product Ion	DP	CE	CXP	
	Methomyl	163	88		71	15	18
		163	106		76	15	14
	Carbofuran	222	165		71	17	24
		222	123		56	29	16
	Fluquin-conazole	376	349		71	17	24
376		307		56	29	16	

시약은 다음 등급을 사용한다.

- 용매 : 잔류농약 시험용 또는 이와 동등한 것
- 후로리실(Florisil) 및 아미노-프로필(Amino-propyl) 카트리지 : 후로리실(500 mg) 및 아미노-프로필(1 g) 고정상이 충전되어 있는 일회용 카트리지(용량 3 mL)
- 표준원액 : 각 농약의 표준품을 유기용매에 녹여 표준원액으로 사용한다.
- 표준용액 : 표준원액을 사용하여 적당한 농도로 혼합, 희석하여 사용한다.
- 기타시약 : 특급 또는 이와 동등한 것

본 시험법을 이용하여 분석한 대상 농약은 다음과 같다.

---

비펜스린(ppm)	클로로타로닐(ppm)
클로르헥나피르(ppm)	클로르피리포스-메틸(ppm)
클로르피리포스(ppm)	싸이피메쓰린(ppm)
싸이할로쓰린(ppm)	싸이프로디닐(ppm)
다이아지논(ppm)	디디티(ppm)
디코플(ppm)	디크로보스(ppm)
엔도설판(ppm)	디메토에이트(ppm)
에토프로포스(ppm)	이피엔(ppm)
페니트로치온(ppm)	페나리몰(ppm)
펜치온(ppm)	펜프로파스린(ppm)
후루디옥소닐(ppm)	펜발러레이트(ppm)
이마자릴(ppm)	플루퀸코나졸(ppm)
이소프로치오란(ppm)	이프로디온(ppm)
메소밀(ppm)	말라치온(ppm)
파클로부트라졸(ppm)	메치다치온(ppm)
파라티온-메틸(ppm)	파라치온(ppm)
피메쓰린(ppm)	펜디메타린(ppm)
포스메트(ppm)	펜토에이트(ppm)
피리미카브(ppm)	포스파미돈(ppm)
피라조포스(ppm)	프로시미돈(ppm)
터브포스(ppm)	퀸토젠(ppm)
트리아디메폰(ppm)	테트라불검출디폰(ppm)
트리아조포스(ppm)	트리프루미졸(ppm)
프로클로라즈(ppm)	빈클로졸린(ppm)
비에치씨(ppm)	카보후란(ppm)

---

## (2) 잔류중금속 검사

식품공전의 “중금속 시험법”의 유도결합플라즈마법과 원자흡광광도법을 이용하여 잔류 중금속 검사를 실시한다.

### (가) 유도결합플라즈마법

이 방법은 아르곤 가스에 고주파를 유도결합방법으로 걸어 방전되어 얻어진 아르곤 플라즈마에 시험용액을 주입하여 목적원소의 원자선 및 이온선의 질량값을 측정하여 시험용액 중의 목적원소의 농도를 구하는 방법이다. 표준용액과 시험용액 및 공시험용액을 ICP(유도결합플라즈마)에 주입하여 시험용액의 농도를 구한다. 이 플라즈마는 양이온과 음이온이 결합하지 않고 서로 떨어져 있으면서도 그 이온의 농도가 같기 때문에 전체적으로 중성을 유지하고 이는 약 6000~10000K 의 높은 온도를 사용하기 때문에 ppb 이하의 매우 좋은 검출 한계를 얻을 수 있다.

Instrument	ICP	
Wavelength	Pb : 220.353 nm	Cd : 226.502nm
RF Power	1300 W	
Nebulizer gas	0.75 L/min	

Instrument	ICP	
Wavelength	As : 193.759 nm	
RF Power	1450 W	
Nebulizer gas	0.60 L/min	

기능성 들깨잎 추출물 검체와 비교할 표준품은 납과 카드뮴의 경우 납, 카드뮴 상용 표준품(1000ppm)을 0.05 mL, 0.25 mL 그리고 0.5 mL를 각각 취하여 이온이 제거된 초 순수물 100 mL로 희석하여 0.5, 2.5 그리고 5 ppm으로 칼리브레이션 한다. 기능성 들깨잎 추출물 검체는 탄화와 회화(550℃) 후에 염산 3 mL 와 초순수물을 섞어주고 가열 및 농축한 후에 100 mL로 부피를 맞춰준 후 측정한다. 비소의 경우 비소 상용 표준품(1000 ppm)을 초 순수물 100 mL로 희석하여 0.05, 0.1 그리고 0.2 ppm으로 칼리브레이션 한 후 검체를 탄화와 회화(550℃) 후에 염산 3 mL 와 초순수물을 섞어주고 가열 및 농축한 후에 100 mL로 부피를 맞춰준 후 측정한다.

### (나) 원자흡광광도법

이 방법은 기능성 들깨잎 추출물 시료 중 수은을 금아말감으로 포집하여 냉원자흡광법으로 측정한다. 시료의 연소에서 금아말감에 의한 포집, 냉원자흡광법에 의한 측정까지를 자동화한 수은 측정장치를 쓴다.

수은분석기	
첨가제	M (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> : Ca(OH) <sub>2</sub> =1:1)
	B (Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )
Carrier Gas	Purified dry air
	Combustion gas 0.5 ℓ/min
	Low gas 0.5 ℓ/min
Mercury Atomizer	Low mode (850℃)
Wavelength	253.7 nm

수은표준용액을 0.001% L-시스테인용액으로 희석하여 0~20 µg/mL로 하여 만들고 첨가제 (a) 산화알루미늄과 수산화칼슘 + 탄산나트륨(1 : 1 혼합물, 950℃에서 30분간 활성화시켜놓은 것), 그리고 균질화한 시료를 10~300 mg을 첨가제 (a) 약 0.5 g (b) 약 1 g을 차례로 고르게 퍼 층을 이루게 한다. 도가니를 연소부에 넣고 공기 또는 산소를 0.521 L/min를 통과하면서 850℃로 가열하여 수은을 유지시켜 포집관에 수은을 포집한다. 포집관을 약 700℃로 가열하여 수은증기를 냉원자흡광분석장치에 보내고, 흡광도를 측정하여 A로 한다. 따로 도가니에 첨가제만을 취해 같은 조작을 되풀이하여 흡광도를 측정하여 Ab로 한다. 다음 수은표준용액을 써서 같은 조작을 되풀이하여 얻어진 흡광도에서 검량선을 작성하여 A-Ab 값을 검량선으로부터 시료 중의 수은량을 산출한다.

### (3) 미생물 검사

유당배지를 이용한 대장균군의 정성시험은 추정시험, 확정시험, 완전시험의 3단계로 나눈다.

#### (가) 추정시험

시험용액을 접종한 유당배지를 35~37℃에서 24±2시간 배양한 후 발효관내에 가스가 발생하면 추정시험 양성이다. 24±2시간 내에 가스가 발생하지 아니하였을 때에 배양을 계속하여 48±3시간까지 관찰한다. 이 때까지 가스가 발생하지 않았을 때에는 추정시험 음성이고 가스발생이 있을 때에는 추정시험 양성이며 다음의 확정시험을 실시한다.

#### (나) 확정시험

추정시험에서 가스 발생한 유당배지발효관으로부터 BGLB 배지에 접종하여 35~37℃에서 24±2시간 동안 배양한 후 가스발생 여부를 확인하고 가스가 발생하지 아니하였을 때에는 배양을 계속하여 48±3시간까지 관찰한다. 가스발생을 보인 BGLB 배지로부터 Endo 한천배지 또는 EMB 한천배지에 분리 배양한다. 35~37℃에서 24±2시간 배양 후 전형적인 집락이 발생되면 확정시험 양성으로 한다. BGLB배지에서 35~37℃로 48±3시간 동안 배양하였을 때 배지의 색이 갈색으로 되었을 때에는 반드시 완전시험을 실시한다.

#### (다) 완전시험

대장균군의 존재를 완전히 증명하기 위하여 위의 평판상의 집락이 그람음성, 무아포성의 간균임을 확인하고, 유당을 분해하여 가스의 발생 여부를 재확인한다. 확정시험의 Endo 한천배



지나 EMB한천배지에서 전형적인 집락 1개 또는 비전형적인 집락 2개 이상을 각각 유당배지 발효관과 보통한천배지에 접종하여 35~37℃에서 48±3시간동안 배양한다. 이때 가스를 발생한 발효관에 해당되는 한천배지의 집락에 대하여 그람음성, 무아포성 간균이 증명되면 완전시험은 양성이며 대장균군 양성으로 판정한다.

**(4) 일반성분 검사 (수분, 조지방, 조단백 조회분, 탄수화물, 열량, 나트륨)**

열량은 수분, 회분, 조단백, 그리고 조지방의 함량을 식품공전의 기준 규격 방법에 따라 구한 후 탄수화물의 함량을 계산하고 조단백과 조지방의 함량과 더불어 계산한다.

**(가) 수분계산 (상압가열건조법(105℃))**

식물성 식품의 성질에 따라서 기능성 들깨잎을 물의 비점보다 약간 높은 온도 105℃에서 상압 건조시켜 그 감소되는 양을 수분량으로 하는 방법으로서 장치는 칭량접시(상부직경 55 mm, 하부직경 50 mm, 높이 25 mm, 중량은 약 25 g의 알루미늄으로 만들어진 것을 이용), 유리봉(해사 20 g을 칭량접시에 옆으로 삽입했을 때 적어도 1.5 cm이상 해사로부터 나와 있으며 뚜껑을 닫을 수 있는 정도의 길이), ±1℃이내의 온도조절이 가능한 자동조절기가 달린 건조기를 이용했다. 미리 가열하여 항량으로 한 칭량접시에 기능성 들깨잎 검체 3-5 g을 정밀히 달아 뚜껑을 약간 열어 놓고 105℃의 건조기에 넣어 3~5시간 건조한 후 데시케이터 중에서 약 30분간 식히고 무게를 다다. 다시 칭량접시를 1~2시간 건조하여 항량이 될 때까지 같은 조작을 반복한다. 이렇게 측정된 무게를 다음의 계산방법에 따라 수분량을 구한다.

$$\text{수분(\%)} = \frac{b - c}{b - a} \times 100$$

- a : 칭량접시의 무게(g)
- b : 칭량접시와 검체의 무게(g)
- c : 건조 후 항량이 되었을 때의 무게(g)

**(나) 회분계산 (회화법(600℃))**

회화는 검체를 도가니에 넣고 직접 550~600℃의 온도에서 완전히 회화처리 하였을 때의 회분의 양을 말한다. 즉 식품을 550~600℃로 가열하면 유기물은 산화, 분해되어 많은 가스를 발생하고 타르모양으로 되며 점차로 탄화한다. 탄소는 더욱 산화되어 탄산가스(CO2)로 되어 방출되지만, 인산이 많은 검체에서는 강열하면 양이온과 결합하지 않고 용융상태로 되며, 또한 산소의 공급이 불충분하게 되어 오히려 회화의 진행이 어렵게 된다. 일부의 식품에서는 무기질의 연소이온(Cl-)등 휘발성 무기물은 휘산되기도 하고, 양이온의 일부는 공존하는 음이온과 반응하여 인산염, 황산염 등으로 되기도 하며, 유기물 기원의 탄산염으로 되기 때문에 조회분이라고 한다. 먼저, 깨끗한 도가니를 전기 또는 가스버너에서 600℃이상으로 여러 시간 강하게 가열한 후 데시케이터에 옮겨 실온으로 식힌 다음 곧 화학천칭으로 칭량한다. 다시 2시간 강하게 가열하여 건조 칭량하고 이 조작을 항량이 될 때까지 반복한다. 기능성 들깨잎은 식품공전의 전처리가 필요하지 않은 검체로써, 전처리 없이 진행한다. 검체를 도가니에 넣은 것을 회화로에 옮겨 550~600℃에서 여러 시간 가열하여 백색-회백색의 회분이 얻어질 때까지 계속한다. 회화가 끝난 후, 가열을 그치고 그대로 식혀 온도가 약 200℃로 되었을 때 데시케이터에

옮겨 식힌 후 실온으로 되면 곧 칭량하여 검체의 회분량(%)을 다음식에 따라 산출한다.

$$\text{회분(\%)} = \frac{W_1 - W_0}{S} \times 100$$

W0 : 항량이 된 도가니에 무게(g)

W1 : 회화 후의 도가니와 회분의 무게(g)

S : 검체의 채취량(g)

#### (다) 조단백질 (연소법(AOAC,Dumas Method))

Dumas법은 질소의 화합물을 전부 질소가스로 변화시킨 표준조건 아래에서 체적으로부터 질소량을 구하는 원소분석법이다. Dumas법에서는 시료를 분말 산화구리(II)와 혼합하여 연소관에 넣고 강열하면 이산화탄소, 물, 질소 및 적은양의 질소산화물들이 만들어진다. 이 생성물들은 이산화탄소 기류로 운반하여 뜨거운 구리 충전물을 통과시켜서 질소 산화물을 원소상태의 질소로 환원시킨다. 그 다음이 혼합물을 진한 수산화칼륨으로 채워진 뷰렛 속으로 통과시킨다. 염기가 흡수하지 않은 유일한 성분은 질소이므로 그 부피는 직접 측정할 수 있다.

#### (라) 조지방 (산분해법)

이 법은 물에 녹지 않고 산분해에 의해서 액상으로 되는 식육, 어육 및 수산식품, 소맥분 빵류, 마카로니등 곡류가공품과 기타 다른 방법에 적용되지 않는 식품에 적용한다. 먼저 기능성 들깨잎 추출물 검체에 염산 10 mL 혼합후 70~80°C 수욕조상에서 약 60분간 가온한다. 이 후 실온에서 냉각하여 석유에테르, 에테르(1:1) 혼액 50 mL로 추출하고 여과①, 다시 석유에테르, 에테르(1:1) 혼액 30 mL로 추출 후 여과과정을 두 번 반복한 후(②,③) 총 추출액(①,②,③)의 용매 휘발 후 100±2°C 1시간 건조 후에 2시간을 방냉한 후에 비이커 무게를 측정한다.

#### (마) 나트륨 (ICP분석법(유도결합플라즈마법))

이 방법은 아르곤 가스에 고주파를 유도결합방법으로 걸어 방전되어 얻어진 아르곤 플라즈마에 시험용액을 주입하여 목적원소의 원자선 및 이온선의 질량값을 측정하여 시험용액 중의 목적원소의 농도를 구하는 방법이다. 표준용액과 시험용액 및 공시험용액을 ICP(유도결합플라즈마)에 주입하여 시험용액의 농도를 구한다. 이 플라즈마는 양이온과 음이온이 결합하지 않고 서로 떨어져 있으면서도 그 이온의 농도가 같기 때문에 전체적으로 중성을 유지하고 이는 약 6000~10000K 의 높은 온도를 사용하기 때문에 ppb 이하의 매우 좋은 검출 한계를 얻을 수 있다. 이번 실험에서의 ICP 기기 조건은 Wavelength Na : 589.592, RF Power 1300W, Nebulizer gas 0.75 L/min을 사용하고, 검체와 비교할 표준품은 나트륨 상용 표준품(1000 ppm)을 0.3 mL, 1 mL 그리고 3 mL를 각각 취하여 이온이 제거된 초 순수물 100 mL로 희석하여 3, 10 그리고 30 ppm로 칼리브레이션 한다. 기능성 들깨잎 추출물 검체는 탄화와 회화(500°C) 후에 염산 3 mL 와 초 순수물을 섞어주고 가열 및 농축한 후에 100 mL로 부피를 맞춰준 후 측정한다.

#### (바) 통계 분석

통계처리는 SigmaStat(Systat Software Inc., Point Richmond, CA, USA)을 사용하여 ANOVA one-way로 유의차(p<0.05) 검정을 실시하였다.

## 나. 실험 결과

기능성 들깨잎 추출물의 기준규격 설정을 위한 잔류농약, 잔류중금속, 일반성분, 미생물 검사를 진행하였으며, 이는 공인된 식품위생검사기관인 “에스푸드가디언스”를 통하여 검사하였다.

### (1) 잔류농약 검사

기능성 들깨잎 추출물의 잔류농약 59종 검사에서 아족시스트로빈은 8.087 ppm으로 검출되었으며, 그 외 나머지 58종 검사에서 모두 불검출 되었다. 아족시스트로빈은 비록 분석검사서 검출되었으나, 식품의 기준 및 규격에 고시되어있는 기준 “깨잎 20 ppm 이하”에 적합한 수준으로 나왔다. 또한 최근 개정된 “수입식품등검사지침”에 아족시스트로빈의 검사항목은 존재하지 않으므로, 잔류농약 함량은 모두 기준치를 만족시키는 것으로 확정하였다.

### (2) 잔류 중금속 검사

기능성 들깨잎 추출물의 잔류 중금속(비소, 납, 카드뮴)에 대한 분석 시험을 진행하여 모두 불검출임을 확인하였다. 따라서 기능성 들깨잎 추출물의 잔류 중금속 기준 규격은 모두 불검출로 설정되었다.

### (3) 미생물 검사

기능성 들깨잎 추출물의 미생물 시험 중 대장균 정량시험에서는 음성(결과 0)으로 나와 기능성 들깨잎 추출물의 미생물 기준 규격은 대장균 음성으로 기준규격이 설정되었다.

### (4) 일반성분 검사

기능성 들깨잎 추출물의 일반성분은 식품공전법의 일반성분 분석법에 따라 다음과 나타났다. 기능성 들깨잎 추출물의 일반성분 기준규격은 다음 표와 같다.

성분	함량
수분(%)	8.55
회분(%)	20.31
열량(kcal/100g)	285.01
탄수화물(g/100g)	56.91
조단백질(g/100g)	14.14
조지방(g/100g)	0.09
나트륨(mg/100g)	139.64



## 검 사 성 적 서


발급번호	제 R-41306-0020 호	접수번호	R-41306-0020	
제품명	갯잎추출물	제조일자 (LOT번호)	-	
		유통기한	-	
의뢰인	업소명	고려대학교산학협력단	성명	김상식
	소재지	서울 성북구 안암동6가 고려대학교 cj 식품안전관 203호		
접수일자	2013-06-18	검사완료일	2013-07-01	
검사목적	참고용			

### 시험항목 및 결과

시험항목	다이아지논, 디디티, 디코폴, 디크로보스, 말라치온, 에소밀, 에톡시케노자이드, 메티다치온, 보스칼리드, 비에치시, 비벤스린, 싸이퍼에스린, 싸이프로디닐, 아세타미프린드, 아족시스트로빈, 아트라진, 에치온, 엔도실판, 이마자릴, 이소프로치오란, 이프로디온, 이프로발리카브, 카바릴, 카보후란, 캄판, 퀴토젠, 클로로타로닐, 클로르피리포스, 클로르피리포스-에틸, 클로르헥나피르, 톨크로포스-에틸, 트리아디메폰, 트리아조포스, 트리플루루분, 트리플루미졸, 티아메복삼, 파라치온, 파라티온-에틸, 과클로부트랄졸, 퍼에스린, 페나리몰, 페니트로치온, 펜발러레이트, 펜토테이트, 펜프로파스린, 펜헥사미드, 포스메트, 프로시미돈, 프로클로라즈, 프로페노포스, 플루벤디아미드, 플루페녹수론, 피라프로스트로빈, 피리메타닐, 피리미카브, 피리미포스-에틸, 헥사플루루분, 후루디옥소닐, L-사이할로스린	
시험결과	상기 관류농약 68항목 불검출, 1항목 검출	
	검출된 항목 (단위 mg/kg)	아족시스트로빈 : 8.067

비고 : 1. 상기 내용은 의뢰인이 제출한 검체에 대한 결과이며, 검체의 명칭은 의뢰인이 제시한 것임.  
 2. 이 시험성적서는 승인 없이 복사 사용을 금지하며, 용도 이외의 사용을 금함.

2013년 07월 01일

(주)에스푸드가디언스 대표이사 

발급번호	제 R-11306-1038 호	접수번호	R-11306-1038	
제품명	갯일추출물	제조일자 (LOT번호)	-	
		유통기한		
의뢰인	업소명	고려대학교산학협력단	성명	김상식
	소재지	서울 성북구 안암동5가 고려대학교 oj 식품안전관 203호		
접수일자	2013-06-18	검사완료일	2013-06-27	
유형	Sample			
검사목적	참고용(영양성분)			

## 시험항목 및 결과

시험항목	기준 규격	결과	단위	항목 판정
수분	-	8.55	%	-
회분	-	20.61	%	-
열량	-	285.01	kcal/100g	-
탄수화물	-	56.91	g/100g	-
조단백질	-	14.14	g/100g	-
조지방	-	0.08	g/100g	-
나트륨	-	168.64	mg/100g	-
- 이하여백 -				
판정	-			

비고 :

2013년 06월 27일



(주)에스푸드가디언스 대표이사



비고 : 1. 상기 내용은 의뢰인이 제출한 검체에 대한 결과이며, 검체의 명칭은 의뢰인이 제시한 것임.  
2. 이 시험성적서는 승인 없이 복사 사용을 금지하며, 용도 이외의 사용을 금함.

(주)에스푸드가디언스

서울특별시 성북구 안암동5가 고려대학교 CJ식품안전관  
Tel. 02)953-6568 Fax. 02)953-6570

시험검사책임자	강성란 	접수팀	허현미 
검사원	박미선, 손운주, 최태연, 황서연		

발급번호	제 R-11306-1039 호	접수번호	R-11306-1039	
제품명	갯일추출물	제조일자 (LOT번호)	-	
		유통기한		
의뢰인	업소명	고려대학교산학협력단	성명	김상식
	소재지	서울 성북구 안암동5가 고려대학교 ij 식품안전관 203호		
접수일자	2013-06-18	검사완료일	2013-06-24	
유형	Sample			
검사목적	참고용			

## 시험항목 및 결과

시험항목	기준 규격	결과	단위	항목 판정
대장균(정량)	-	0	CFU/g	-
비소	-	불검출	ng/kg	-
납	-	불검출	ng/kg	-
카드름	-	불검출	ng/kg	-
	- 이하여편 -			
판정	-			

비고 :

2013년 06월 24일

(주)에스푸드가디언스 대표이사



비고 : 1. 상기 내용은 의뢰인이 제출한 검체에 대한 결과이며, 검체의 명칭은 의뢰인이 제시한 것임.  
2. 이 시험성적서는 승인 없이 복사 사용을 금지하며, 용도 이외의 사용을 금함.

(주)에스푸드가디언스

서울특별시 성북구 안암동5가 고려대학교 CJ식품안전관  
Tel. 02/953-6568 Fax. 02/953-6570

시험검사책임자	강성란 	접수팀	허현미 
검사원	문소영, 우진경		

## 제 4 장 목표 달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제 1 절 연구개발의 달성도 및 기여도

연차	목표 및 평가의 착안점	목표달성도	기여도
1차년도	기능성 들깨잎 추출물을 이용한 최적 제형 연구 및 임상시험 계획 설계	<p>기능성 들깨잎 추출물을 다양한 제형에 적용하여 제작하고, 각 제형에 대한 안정성을 확인하였다.</p> <p>제형의 안정성과 섭취량을 고려하여 최적 제형은 환 제형으로 선정하였으며, 인체적용시험을 위하여 IRB 승인 신청서를 제출하였다.</p> <p>따라서 1차년도에 계획하였던 목표를 100% 수행하였다.</p>	<p>기능성 들깨잎 추출물의 최적 제형을 선정하였으며, 간보호 임상시험 계획을 설계하였다.</p>
제 1 세 부 2차년도	기능성 들깨잎 추출물의 대량생산 체계 확립 및 간보호 임상 시험	<p>기능성 들깨잎 추출물의 대량생산 체계를 확립하였으며, 추출 공정을 표준화 하였다.</p> <p>또한 최적 제형으로 선정된 환 제형의 유통기한 선정을 위한 연구를 진행하였다.</p> <p>또한 IRB 승인 후, 이화여대 바이오푸드네트워킹 사업단, 분당 차병원과 연계하여 인체적용시험을 진행하였다.</p> <p>따라서 2차년도에 계획하였던 목표를 100% 수행하였다.</p>	<p>기능성 들깨잎 추출물의 대량생산 체계를 확립하였으며, 인체적용시험을 시작하였다.</p>
3차년도	기능성 들깨잎 추출물을 이용한 간보호 건강기능식품 시제품 제작 및 개별인정형 건강기능식품 등록 신청 준비	<p>환 제형의 간보호 건강기능식품 시제품을 제작하여 인체적용시험을 진행하였다. 하지만 인체적용시험 과정 중 피시험자 모집 기간이 길어져 현재 인체적용시험이 진행중에 있다. 인체적용시험이 완료되면 개별인정형 건강기능식품 등록을 진행할 예정이다.</p>	<p>기능성 들깨잎 추출물을 이용한 간보호 건강기능식품 시제품을 제작하였다.</p>

연차	목표 및 평가의 착안점	목표달성도	기여도
제 1 협 동	1차년도 기능성 들깨잎 추출물 의 대량생산을 위한 최적 추출 조건 정립 및 간보호 기능성 유효성 검증	기능성 들깨잎의 최적 추출 조건을 선정하였으며, 세포 수준에서 간보호 기능을 재검토 하였다. 동물 실험을 통하여 간보호 기능성 효과와 기능성 들깨잎 추출물 투여량의 유효성을 확인하였다. 따라서 1차년도에 계획하였던 목표를 100% 수행하였다.	기능성 들깨잎 추출물 중 기능성 물질이 고함유되어 있는 최적 추출법을 제안하였으며, 기능을 나타내는 유효 섭취량을 제시하였다.
	2차년도 기능성 들깨잎 추출물의 기준규격 설정 및 기능성 검증	다양한 스트레스로부터 유래할 수 있는 간 손상에 대하여 기능성 들깨잎 추출물의 보호 효과를 동물 실험을 통하여 검증하였다. 기능성 들깨잎 추출물의 기준 규격 설정 및 표준화를 완료하였다. 따라서 2차년도에 계획하였던 목표를 100% 수행하였다.	기능성 들깨잎 추출물의 기준규격을 설정하였으며, 동물실험을 통하여 간보호 활성의 기전을 증명하였다.
	3차년도 기능성 들깨잎 추출물의 기능성 검토 및 개별인정형 건강기능식품 등록 신청 준비	동물실험을 통하여 기능성 들깨잎 추출물의 간보호 활성을 재검증하였으며, 개별인정형 건강기능식품 등록 신청 준비를 진행하였다. 하지만 인체적용시험 과정 중 피시험자 모집기간이 길어져 현재 인체적용시험이 진행 중에 있다. 인체적용시험이 완료되면 개별인정형 건강기능식품 등록을 진행할 예정이다.	다양한 스트레스로 인하여 발생하는 간 손상에 대하여 기능성 들깨잎 추출물의 보호 활성을 증명하였다.



## 제 2 절 기술적 측면

- 경제적으로 실현 가능하며 기능성 성분의 함량을 높일 수 있는 재배 방법을 농가에 적용하여 기능성 들깨잎을 대량 생산함으로써 농가에 적용 가능성이 높음을 확인하였다.
- 기능성 물질을 증가시키는 재배 방법을 직접 적용함으로써 화훼산업과 과수산업에 집중되어있는 생장조절제의 시장을 확장할 수 있는 계기가 될 것으로 예상된다.
- 소비자나 생산자가 거부하는 유전자 재조합 방식이 아닌 친환경적 공법을 이용하여 고부가가치 작물을 생산하는 식물 생장 조절제를 개발하여 다른 작물에서의 활용도를 높일 수 있다.
- 식물체 내에 존재하는 2차 대사산물을 증가시키는 재배 방법은 다양한 품종의 들깨잎에 적용 가능할 것이며 이를 통하여 간보호 활성 뿐만 아닌 다른 항산화, 항염증 기능성의 개발에도 활용 가능할 것으로 예상된다.

## 제 3 절 경제 · 산업적 측면

- 깻잎의 주된 산지는 밀양이며 맛과 향, 영양소가 뛰어나고 가격이 저렴하여 한국인이 즐겨먹는 채소 중의 하나임. 깻잎을 이용한 제품보다는 신선채소로서의 이용률이 높으며 항산화, 항염증, 항암효과 등에 관한 연구들이 보고되었으나, 이들 기능성에 대한 개별인정형 등록에 관한 건은 아직 없음
- 다양한 천연 추출물을 이용한 간기능 개선 및 보호 제품이 많이 출시되고 있으나 깻잎을 이용한 간보호 건강기능 식품은 없음
- 깻잎의 간보호 활성에 관한 연구는 아직 미비한 실정임. 본 연구진은 이전에 깻잎의 간보호 활성에 관한 연구를 진행해왔으며, 선행연구결과를 기반으로 하여 깻잎으로부터 간보호 활성을 지니는 물질의 추출법을 개발·확립하여 제품화를 기대하며 개별인정형 등록을 함

■ 산업화를 통한 기대효과

(단위 : 백만원)

항 목 \ 산업화 기준	1차년도	2차년도	3차년도	계
직접 경제효과	80	100	150	330
경제적 파급효과	100	120	180	400
부가가치 창출액	40	60	100	200
합 계	220	280	430	930

### 제 4 절 사회 · 문화적 측면

- 동아시아에서 주로 재배되며, 세계적으로 섭취량이 점점 증가하는 들깨잎을 고부가가치 건강기능식품 원료로 활용함으로써 인해 건강기능식품 생산이 촉진되어 들깨잎의 소비가 증가함으로써 국내 들깨잎 농가 소득이 크게 증대할 수 있음
- 기능성 들깨잎을 이용한 고부가가치 웰빙 기능성 식·의약 소재 개발로 농업분야에 있어 주변 국가와의 경쟁에서 차별성과 우월성을 확보하여 농가 발전 도모를 기대할 수 있다.
- 들깨잎의 경우 예로부터 꾸준히 섭취되어 왔으나 주로 생야채로 섭취될 뿐 가공관련 기술개발, 상품개발이 미흡한 상태이므로 시기적절한 연구로 기능성, 안전성이 검증된 부가가치 높은 상품을 개발할 수 있음
- 기능성 들깨잎의 우수한 생리적 안전성, 기능성이 검증 및 이용으로 국민보건 향상과 국가 위상 제고에 역할을 할 것으로 기대된다.

# 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

## 제 1 절 특허 등록

특허명	기능성 들깨잎 추출물을 함유하는 간보호 및 간질환 예방 및 치료용 조성물
등록일자	2013. 10. 04
등록번호	10-1317551
출원인	고려대학교 산학협력단 출원
발명자	이광원, 양성용, 홍충의, 남미현, 이지영



### 특 허 증

CERTIFICATE OF PATENT

특 허 제 10-1317551 호 (PATENT NUMBER)      출원번호 (APPLICATION NUMBER)      제 2011-0040273 호  
 출원일 (FILING DATE:YY/MM/DD)      2011년 04월 28일  
 등록일 (REGISTRATION DATE:YY/MM/DD)      2013년 10월 04일

발명의명칭 (TITLE OF THE INVENTION)  
 기능성 들깨잎 추출물을 함유하는 간 보호 및 간 질환 예방 및 치료용 조성물

특허권자 (PATENTEE)  
 고려대학교 산학협력단(114471-0\*\*\*\*\*)  
 서울 성북구 안암동5가 1

발명자 (INVENTOR)  
 등록사항란에 기재

위의 발명은 「특허법」에 따라 특허등록원부에 등록되었음을 증명합니다.

(THIS IS TO CERTIFY THAT THE PATENT IS REGISTERED ON THE REGISTER OF THE KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE.)

2013년 10월 04일



특 허 청 장 김 영      印  
 COMMISSIONER, THE KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE




연차등록료 납부일은 실정등록일 이후 4년차부터 매년 10월 04일까지이며 등록원부로 권리관계를 확인바랍니다.

## 제 2 절 논문

저널명	한국식품위생안전성학회지
저자	양성용, 강정한, 이광원
제목	랫드에서 <i>t</i> -BHP 유발 산화스트레스에 대한 기능성 들깨잎 열수 추출물의 간 보호 효과
게재 년도	2013
볼륨	28(2)
페이지	146-151

pISSN 1229-1153 J. Fd Hyg. Safety  
Vol. 28, No. 2, pp. 146-151 (2013)  
<http://dx.doi.org/10.13103/JFHS.2013.28.2.146>

 **Journal of Food Hygiene and Safety**  
Available online at <http://www.foodhygiene.or.kr>

### 랫드에서의 *t*-BHP 유발 산화스트레스에 대한 기능성 들깨잎 열수 추출물의 간 보호 효과

양성용 · 강정한 · 이광원\*  
고려대학교 생명과학대학 식품공학부

#### Protective Effect of Functional *Perilla frutescens* Hot-water Extract Against *tert*-butyl hydroperoxide-Induced Liver Oxidative Damage in Rats

Sung-Yong Yang, Jeong-Han Kang and Kwang-Won Lee\*

Division of Food Bioscience & Technology, College of Life Sciences and Biotechnology, Korea University  
(Received October 31, 2012/Revised March 3, 2013/Accepted May 8, 2013)

**ABSTRACT** - *Perilla frutescens* usually dieted in East Asian country such as Korea and Japan. Antioxidant, anti-inflammatory and anticancer activities of *perilla* leaves have been founded. In previous study, we confirmed that caffeic acid, major compound of *perilla*, was accumulation by sucrose aqueous solution and thus antioxidant effect of *perilla* was enhanced. In this study, we investigated the protective effect of functional *perilla* leaves extract (PLE) against *tert*-butyl hydroperoxide(*t*-BHP) induced-oxidative hepatotoxicity. The pretreatment with PLE (250, 500 and 1000 mg/kg b.w.) for 5 days before a single dose of *t*-BHP (i.p.; 0.5 mmol/kg) significantly lowered the serum levels of aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase and lactate dehydrogenase dose-dependently. And we confirmed that the indicators of oxidative stress were remarkably reduced in the liver, such as the glutathione contents and malondialdehyde, marker of lipid peroxidation. Pathological histology of the rat livers tissues showed that PLE reduced the hepatocyte degeneration and neutrophilic infiltration of liver induced by *t*-BHP. These results suggest that functional *perilla frutescens* has the protective effect of liver against *t*-BHP-induced oxidative hepatic stress in rats.

**Key words:** functional *perilla frutescens*, liver, *tert*-butyl hydroperoxide, oxidative damage, protective effect

#### 서 론

들깨(*Perilla frutescens* Britton var. *japonica* Hara)는 꿀꿀과의 일년생 초로 동아시아 지역, 특히 일본과 한국에서 많이 섭취되고 있다<sup>1)</sup>. 특히 최근에는 헬빙에 대한 관심과 더불어 첨채소로써 소비량이 증가하고 있으며, 재배 기술의 발달을 통하여 다양한 품종의 보급과 연중 생산이 가능해졌다<sup>2)</sup>.

본 연구진은 선행연구를 통하여 들깨잎 열수 추출물을 이용하여 산화스트레스에 의한 랫드의 간 손상 보호 효과를 확인 하였으며<sup>3)</sup> 들깨잎 추출물로부터 caffeic acid (CA)를 분리·동정 하였으며 CA가 세포 내의 항산화 물질인 glutathione (GSH)를 생합성하는  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase ( $\gamma$ -GCS) 효소의 활성을 증가시키고, 간 세포 내 GSH 함

량을 증가시킴으로써 산화스트레스에 대한 보호 활성을 확인하였다<sup>4)</sup>. CA는 phenolic compound로 다양한 식물체에 존재하며 항산화<sup>5)</sup>, 항암<sup>6)</sup>, 항염증<sup>7)</sup> 효과도 나타내는 것으로 알려져 있다. 또한 신탄물 처리로 재배한 기능성 들깨잎은 일반적으로 재배한 들깨잎에 비하여 caffeic acid 함량이 증가하며 GSH의 증가를 통하여 산화스트레스에 대한 간 보호 활성이 증가함을 확인하였다<sup>8)</sup>.

산화스트레스는 빠르게 변화하는 현대 사회를 살아가는 인간에게 나타나는 대표적인 질병의 원인이 되는 것으로 공해물질 및 오염물질, 잘못된 식습관 또는 정신적 스트레스 등에 의하여 유발된다. 특히 *tert*-butyl hydroperoxide (*t*-BHP)는 산화스트레스를 직접적으로 유발하는 물질로 널리 알려져 있으며<sup>9)</sup>, 세포 내에서 활성산소종(reactive oxygen species; ROS)을 생성하고<sup>10)</sup> 이는 다양한 질병들의 기본적인 원인으로 작용하여 노화, 암<sup>11)</sup>, 면역저하<sup>12)</sup>의 매개자 역할을 한다. 최근 ROS에 대하여 다양한 연구들이 보고되고 있으며, 특히 간, 신장 등의 인체 기관에 미치는 산화스트레스에 대한 연구는 많이 이루어지고 있다<sup>13,14)</sup>.

\*Correspondence to: Kwang-Won Lee, Division of Food Bioscience & Technology, College of Life Sciences and Biotechnology, Korea University, Anam-dong 5-ga, Sungbuk-gu, Seoul 136-701, Korea  
E-mail: kwangwon@korea.ac.kr

저널명	Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry (투고 중)
저자	Jeong Han Kang, Sung-Yong Yang, Jaeho Ha, Kwang-won Lee
제목	<i>Perilla frutescens</i> Modulates CYP1A1/2 and HO-1 and Activates Nrf2 in Oxidative Stress-induced Hepatotoxicity
게재 년도	
볼륨	
페이지	

저널명	Biological and Pharmaceutical Bulletin (투고 중)
저자	Yun-Jin Hong, Sung-Yong Yang, Mi-Hyun Nam, Kwang-Won Lee
제목	Caffeic acid inhibits the uptake of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine by inducing the efflux transporters expression in Caco-2 cells
게재 년도	
볼륨	
페이지	

저널명	Toxicology (투고 준비 중)
저자	Sung-Yong Yang, Jeong Han Kang, Kwang-Won Lee
제목	Protective effects of <i>perilla frutescens</i> against Oxidative liver damage : Modulation of NF- $\kappa$ B, cytokine production and oxidative stress
게재 년도	
볼륨	<i>in press</i>
페이지	

저널명	Food Science and Biotechnology (투고 준비 중)
저자	Sung-Yong Yang, Jeong Han Kang, Young Seomun, Kwang-Won Lee
제목	Caffeic acid induces glutathione synthesis through JNK/AP-1-mediated $\gamma$ -glutamylcysteine ligase catalytic subunit induction in HepG2 and primary hepatocytes
게재 년도	
볼륨	<i>in press</i>
페이지	

### 제 3 절 학술발표

#### 1. 국제 학술발표

학회명	Experimental Biology 2011
저자	Sung-Yong Yang, Chung-Oui Hong, Yun-Chang Koo, YUANYUAN MA, Yun-Jin Hong, Young-Min Ha, Kwang-won Lee
제목	The involvement of transcription factor, AP-1 on glutathione synthesis enhanced by caffeic acid, a major component of <i>Perilla frutescens</i>
발표 일자	2011.04 (program No. 722.16)
학회명	Experimental Biology 2012
저자	Sung-Yong Yang, Chung-Oui Hong, Yun-Chang Koo, Mi-Hyun Nam, Kwang-won Lee
제목	Protective Effect of <i>Perilla</i> Leaf Extract and its Constituents on <i>t</i> -BHP-induced Oxidative Stress in Liver
발표 일자	2012.04 (Program No. 145.11)
학회명	IUFoST 2012
저자	Sung-Yong Yang and Kwang-Won Lee
제목	Caffeic Acid, A Major Compound of <i>Perilla frutescens</i> , is an Selective Inhibitor of CYP1A1 Enzyme Activity and Its Gene Expression in HepG2 Human Hepatoma Cells
발표 일자	2012.08
학회명	Experimental Biology 2013
저자	Jeong Han Kang, Sung-Yong Yang, Jae Eon Yang, Hae Min Seol and Kwang-Won Lee
제목	Effects of <i>Perilla frutescens</i> Extract on Cytochrome P450 Expression in Oxidative Stress-induced Liver of Rat
발표 일자	2013.04 (Program No. LB 61)

학회명	Experimental Biology 2013
저자	Sung-Yong Yang, Jeong Han Kang and Kwang-won Lee
제목	Regulation of Phase I and Phase II Enzyme Gene Expression and Its Activities by Caffeic acid, Major Compound of <i>Perilla frutescens</i>
발표 일자	2013.04 (Program No. 1007.6)

학회명	Experimental Biology 2013
저자	Jeong Han Kang, Sung-Yong Yang and Kwang-Won Lee
제목	Effects of <i>Perilla frutescens</i> on Modulations of CYP1A1/2, HO-1 and Activation of Nrf2 in Oxidative Stress-induced Hepatotoxicity
발표 일자	2013.04 (Program No. 647.19)

## 2. 국내학술발표

학회명	한국식품과학회 2013
저자	Jeong Han Kang, Sung-Yong Yang, Hwa Lee, Se-Wook Kim and Kwang-Won Lee
제목	Protective Effects of Functional <i>Perilla frutescens</i> against Liver Damage Induced by Carbon Tetrachloride
발표 일자	2013.08

## 제 4 절 인력 양성

박사	0 명
석사	11 명 (남자 4명, 여자 7명)
총	11 명

## 제 5 절 연구개발결과의 활용방안

### ■ 기능성 들깨잎의 간 보호 건강기능식품 소재화

- 예로부터 많이 섭취되어 왔으며 친숙한 들깨잎으로부터 얻어낸 간 보호 활성을 지니는 기능성 물질을 개별인정형 건강기능식품 기능성 원료로 등록 신청
- 들깨잎의 부가가치를 증가시키며, 들깨잎의 최대 산지인 밀양시와 협력하여 농가소득의 향상을 꾀함

### ■ 기능성 들깨잎의 간 보호 개별인정형 건강기능식품 제품화

- 간 보호 기능성을 가진 건강기능식품을 제품화하여 현대인에게 높은 추세로 증가하고 있는 간 질환을 예방함으로써 국민건강의 증진에 기여

### ■ 기능성을 증가시키는 재배법의 보급화

- 경제적으로 부담이 크지 않으며 농가에서도 충분히 적용 가능한 작물의 기능성을 증가시키는 재배법을 농가에 보급함으로써 고부가가치 작물 생산을 가능하게 함
- 고부가가치 작물의 재배와 생산은 농가소득의 증대로 이어질 수 있음

### ■ 기능성 들깨잎 추출물의 논문 게재

- 기능성 들깨잎을 통한 간 보호 활성에 관한 연구는 아직 미흡한 수준이며, 특히 간 보호 활성을 나타내는 들깨잎의 주요 지표 물질에 대한 연구는 거의 전무하다. 따라서 본 연구과제에서 도출된 기능성 들깨잎의 간 보호 활성과 그에 대한 메카니즘을 규명하여 해외 저널에 논문을 게재할 예정임



# 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

<자료 1>



Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

ScienceDirect

Life Sciences 79 (2006) 2056–2068

Life Sciences

[www.elsevier.com/locate/lifescie](http://www.elsevier.com/locate/lifescie)

## Phenolic compounds protect HepG2 cells from oxidative damage: Relevance of glutathione levels

Cristovao F. Lima, Manuel Fernandes-Ferreira, Cristina Pereira-Wilson\*

Department of Biology, Centre of Biology, School of Sciences, University of Minho, 4710-057 Braga, Portugal

Received 1 March 2006; accepted 30 June 2006

### Abstract

In the present work, the potential hepatoprotective effects of five phenolic compounds against oxidative damages induced by *tert*-butyl hydroperoxide (*t*-BHP) were evaluated in HepG2 cells in order to relate *in vitro* antioxidant activity with cytoprotective effects. *t*-BHP induced considerable cell damage in HepG2 cells as shown by significant LDH leakage, increased lipid peroxidation, DNA damage as well as decreased levels of reduced glutathione (GSH). All tested phenolic compounds significantly decreased cell death induced by *t*-BHP (when in co-incubation). If the effects of quercetin are given the reference value 1, the compounds rank in the following order according to inhibition of cell death: luteolin (4.0) > quercetin (1.0) > rosmarinic acid (0.34) > luteolin-7-glucoside (0.30) > caffeic acid (0.21). The results underscore the importance of the compound's lipophilicity in addition to its antioxidant potential for its biological activity. All tested phenolic compounds were found to significantly decrease lipid peroxidation and prevent GSH depletion induced by *t*-BHP, but only luteolin and quercetin significantly decreased DNA damage. Therefore, the lipophilicity of the natural antioxidants tested appeared to be of even greater importance for DNA protection than for cell survival. The protective potential against cell death was probably achieved mainly by preventing intracellular GSH depletion. The phenolic compounds studied here showed protective potential against oxidative damage induced in HepG2 cells. This could be beneficial against liver diseases where it is known that oxidative stress plays a crucial role.

© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Phenolic compounds; Liver; Oxidative stress; HepG2 cells; *tert*-butyl hydroperoxide; Antioxidants

### Introduction

An overall increase in cellular levels of reactive oxygen species (ROS) above the cells' defenses results in oxidative stress that can ultimately cause cell death. Oxidative stress has been recognized to be involved in the etiology of several age-related and chronic diseases such as cancer, diabetes, neurodegenerative and cardiovascular diseases (Tiwari, 2004; Cui et al., 2004; Ceriello and Motz, 2004; Klaunig and Kamendulis, 2004; Willcox et al., 2004; Ballinger, 2005; Gibson and Huang, 2005). In particular with respect to liver diseases such as hepatocellular carcinoma, viral and alcoholic hepatitis and non-alcoholic steatosis, it is known that ROS and reactive nitrogen species play a crucial role in disease induction and progression (Adachi and Ishii, 2002; Loguercio and Federico, 2003; Vitaglione et al.,

2004). The liver is particularly susceptible to toxicants since the portal vein brings blood to this organ after intestinal absorption. The absorbed drugs and xenobiotics in a concentrated form can cause ROS- and free radical-mediated damage that may result in inflammatory and fibrotic processes (Jaeschke et al., 2002).

Because oxidative stress plays a central role in liver diseases pathology, dietary antioxidants have been proposed as therapeutic agents to counteract liver damage (Vitaglione et al., 2004). This same idea has also been suggested for other oxidative stress-based chronic diseases (Tiwari, 2004; Willcox et al., 2004). In fact, several epidemiological studies have shown that diets rich in fruit and vegetables and other plant foods (including tea and wine) are associated with a decreased risk of premature death and mortality from chronic diseases, such as cardiovascular diseases and some types of cancer (Stanner et al., 2004; Scalbert et al., 2005). Phenolic compounds (PhC), and in particular polyphenols, are believed to be, at least in part, responsible for such effects. Results from some human clinical trials support the role of these

\* Corresponding author. Tel.: +351 253604318; fax: +351 253678980.  
E-mail address: [cpereira@bio.uminho.pt](mailto:cpereira@bio.uminho.pt) (C. Pereira-Wilson).

표제	Phenolic compounds protect HepG2 cells from oxidative damage: Relevance of glutathione levels
저자	Cristovao F. Lima, Manuel Fernandes-Ferreira, Cristina Pereira-Wilson
게재지	Life Sciences, 2006, 79(21), 2056-2068
요지	Phenolic compounds인 caffeic acid와 rosmarinic acid의 t-BHP 산화스트레스에 대한 보호 활성을 in vitro 수준에서 HepG2 간세포를 이용하여 확인함. caffeic acid와 rosmarinic acid 모두 t-BHP에 대한 보호 활성이 있으며, 이는 세포 독성과 GSH 함량, lipid peroxidation을 측정하여 확인 하였음.
방법	결과
Cytotoxicity (MTT assay)	t-BHP를 이용하여 cell death를 유발시킬 때, caffeic acid와 rosmarinic acid를 처리하여 cell death를 막아주는 것을 확인하였음. caffeic acid와 rosmarinic acid 모두 100 $\mu$ M 처리하였을 때 세포 생존률이 증가하는 것을 확인함.
Lipid peroxidation	t-BHP를 처리하였을 때 지질과산화가 증가하는 것을 확인하였으며, caffeic acid와 rosmarinic acid를 처리하였을 때 지질과산화 정도가 약 50% 정도 감소하는 것을 확인하였으며, caffeic acid가 조금 더 감소시키는 것을 확인함. GSH가 산화되었을 때 생성되는 GSSG를 측정하여 산화 스트레스에 대한
Glutathione 측정	보호 활성을 측정하였음. t-BHP를 처리하였을 때 GSSG의 생성량이 증가하지만 caffeic acid와 rosmarinic acid를 같이 처리하였을 때 생성량을 감소시켰. GSSG의 경우 rosmarinic acid가 좀 더 나은 효과를 나타내었음.



Contents lists available at ScienceDirect

Phytomedicine

journal homepage: www.elsevier.de/phyomed



## *In vitro* and *in vivo* antifibrotic effects of rosmarinic acid on experimental liver fibrosis

Gui-Sheng Li<sup>a,1</sup>, Wang-Lin Jiang<sup>a,b,1</sup>, Jing-Wei Tian<sup>a</sup>, Gui-Wu Qu<sup>b</sup>, Hai-Bo Zhu<sup>b</sup>, Feng-Hua Fu<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> School of Pharmacy, Yantai University, 32# Qingquan Road, Laishan District, Yantai 264003, PR China

<sup>b</sup> Shandong Engineering Research Center for Nature Drug, Yantai 264003, PR China

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Liver fibrosis  
Rosmarinic acid  
Transforming growth factor- $\beta$ 1  
Connective transforming growth factor  
*In vitro*  
*In vivo*

### ABSTRACT

This study was carried out to investigate whether rosmarinic acid (RA) has antifibrotic effect on experimental liver fibrosis *in vitro* and *in vivo* and its possible mechanism. Culture of hepatic stellate cells (HSCs) determine proliferation and expression of transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1), connective transforming growth factor (CTGF) and  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA). In carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>)-induced rat liver fibrosis model, determined biochemical indicator, liver fibrosis grade and histopathological changes, immunohistochemical detected liver TGF- $\beta$ 1 and CTGF expression. The results indicated that RA could inhibit HSCs proliferation, inhibit TGF- $\beta$ 1, CTGF and  $\alpha$ -SMA expression in cultured HSCs. It has marked evident in reducing fibrosis grade, ameliorating biochemical indicator and histopathological morphology, reducing liver TGF- $\beta$ 1 and CTGF expression in CCl<sub>4</sub>-induced liver fibrosis. These findings suggest that RA has potentially conferring antifibrogenic effects.

© 2009 Elsevier GmbH. All rights reserved.

### Introduction

Hepatic fibrosis occurs as the consequence of a sustained wound healing response of liver to toxic, infectious or metabolic agents and is characterized by excessive accumulation of extracellular matrix (ECM) leading to ultimate liver dysfunction and irreversible cirrhosis (Friedman 2003).

HSCs activation lead to retinoid storage, remodeling of ECM and production of growth factors and cytokines (Li and Friedman 1999; Tsukada et al. 2006). Suppression of HSC activation has been proposed as a therapeutic target against hepatic fibrosis (Wu and Zem 2000; Bataller and Brenner 2005; Lee et al. 2008). Transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) is generally accepted to be the main pro-fibrotic factor in liver fibrosis, several studies have reported that TGF- $\beta$  is upregulated and induced matrix accumulation. Inhibition of TGF- $\beta$  or blocking its downstream signalling pathway resulted in prevention of the fibrotic process in liver fibrosis (Leask and Abraham 2004). However, TGF- $\beta$  also has important antiproliferative and anti-inflammatory effects, inhibi-

tion of TGF- $\beta$  may be a double-edged sword. Therefore, alternative targets for therapeutic intervention are needed to treat liver fibrosis. Recent evidence supported a prominent role for connective tissue growth factor (CTGF) in the pathogenesis of liver fibrosis. CTGF acts as a downstream mediator of TGF- $\beta$ 1 induced fibrosis, the level of CTGF mRNA is markedly increased in cultured HSCs and in fibrotic liver. Activated HSCs is the main source of CTGF production (Paradis et al. 1999, 2002; Williams et al. 2000). Inhibition of CTGF resulted in a potent reduction of fibrosis (Li et al. 2006). Now, CTGF is a potential target for antifibrotic strategies in liver fibrosis therapy.

Rosmarinic acid ( $\alpha$ -O-caffeoyl-3,4-dihydroxyphenyl lactic acid; RA) is a naturally occurring hydroxylated compound. Many bioactivities of RA have been reported, anti-inflammatory (N Osakabe et al. 2004; Jiang et al. 2009), antiangiogenic (Huang and Zheng 2006), antitumor (McKay and Blumberg 2006), and HIV-1-inhibiting properties (Dubois et al. 2008). The aim of this study was to investigate the antifibrogenic effect and mechanisms of RA in rat HSCs with TNF- $\alpha$  as the activator to determine  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA), TGF- $\beta$ 1 and CTGF expression, HSCs proliferation and carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>)-induced liver fibrosis animal model.

### Materials and methods

#### Chemicals

RA (Formula: C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>O<sub>6</sub>, molecule weight: 360) (Fig. 1) was obtained from Shandong Engineering Research Center for Nature

Abbreviations: RA, rosmarinic acid; TGF- $\beta$ 1, transforming growth factor- $\beta$ 1; CTGF, connective transforming growth factor; HSCs, hepatic stellate cells;  $\alpha$ -SMA,  $\alpha$ -smooth muscle actin; CCl<sub>4</sub>, carbon tetrachloride; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; FBS, fetal bovine serum; HA, hyaluronic acid; LN, laminin; PCIII, collagen types III; ALB, serum albumin; GIB, globulin; ALT, alanine aminotransferase; AST, glutamate-pyruvate transaminase; HYP, hydroxyproline; SII, silymarin

\* Corresponding author. Tel.: +86 535 2103222; fax: +86 535 6706060.

E-mail address: Fenghua@lyjye-pharm.com (F.-H. Fu).

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work and should be considered co-first authors.

표제	In vitro and in vivo antifibrotic effects of rosmarinic acid on experimental liver fibrosis
저자	Gui-Sheng Lia, Wang-Lin Jianga, Jing-Wei Tian, Gui-Wu Qu, Hai-Bo Zhu, Feng-Hua Fu
게재지	Phytomedicine, 2010, 17(3-4), 282-288
요지	Rosmarinic acid의 antifibrosis 효과를 세포 수준과 동물 모델에서 확인하였음. Hepatic stellate cell (HSC)과 rat liver에서 fibrosis의 마커인 TGF- $\beta$ 1, CTGF, $\alpha$ -SMA를 측정하였음. 또한 histopathological morphology를 확인하여 liver fibrosis가 줄어듦을 확인하였음
방법	결과
HSC proliferation	Rosmarinic acid를 처리하였을 때 HSC의 proliferation을 억제하는 것을 확인하였음. 이는 간섬유화 세포의 증식 속도를 억제함으로써 간의 섬유화를 억제한다고 볼 수 있음.
biomarker assay	Fibrosis가 진행되면서 나타나는 biomarker 들의 생성정도를 RT-PCR과 western blot을 통하여 확인함. Rosmarinic acid를 처리하였을 때 HSC에서 TGF- $\beta$ 1, CTGF, $\alpha$ -SMA가 모두 감소하는 것을 확인하였음
Serum enzyme measurement	간 섬유화 동물 모델인 CCl4를 투여하였을 때, 간의 섬유화가 진행됨을 확인하였으며 rosmarinic acid를 같이 투여하였을 때 간 손상 지표인 AST, ALT가 감소하는 것을 확인하였음. 즉, 간 손상으로부터 rosmarinic acid가 보호하는 것을 확인함.
Immunohistochemical detection	Rat의 간을 적출 후 staining을 통하여 간의 fibrosis를 확인하였을 때, rosmarinic acid가 간의 섬유화를 억제함을 확인함



## Protective effect of aqueous extract of *Perilla frutescens* on *tert*-butyl hydroperoxide-induced oxidative hepatotoxicity in rats

Min-Kyung Kim <sup>a</sup>, Huyn-Sun Lee <sup>a</sup>, Eun-Jin Kim <sup>a</sup>, Nam-Hee Won <sup>b</sup>,  
Young-Min Chi <sup>c</sup>, Byoung-Chul Kim <sup>a</sup>, Kwang-Won Lee <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Food Science, College of Life Sciences and Biotechnology, Korea University, Seoul, Republic of Korea

<sup>b</sup> Department of Pathology, College of Medicine, Korea University, Seoul, Republic of Korea

<sup>c</sup> Division of Biotechnology of Genetic Engineering, College of Life Sciences and Biotechnology, Korea University, Seoul, Republic of Korea

Received 21 June 2006; accepted 12 March 2007

### Abstract

The leaves of perilla [*Perilla frutescens* (L.) Britt. var. *japonica* (Hask.) Hara] are often used in Asian gourmet food. The object of this study was to evaluate the protective effects of an aqueous extract of perilla leaves on the *tert*-butyl hydroperoxide (*t*-BHP)-induced oxidative injury observed in rat livers. The treatment of the hepatocytes with the perilla leaf extract (PLE) significantly reversed the *t*-BHP-induced cell cytotoxicity and lipid peroxidation. In addition, PLE exhibited ferric-reducing antioxidant power and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical scavenging activities. The *in vivo* study showed that the pretreatment with PLE (1000 or 3000 mg/kg) for 5 days before a single dose of *t*-BHP (i.p.; 0.2 mmol/kg) significantly lowered the serum levels of aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase, reduced the indicators of oxidative stress in the liver, such as the glutathione disulfide content and lipid peroxidation level in a dose-dependent manner, and remarkably increased the activity of hepatic  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase. Histopathological examination of the rat livers showed that PLE reduced the incidence of liver lesions induced by *t*-BHP. Based on the results described above, it is suggested that PLE has the potential to protect liver against *t*-BHP-induced hepatic damage in rats.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Perilla leaf; Antioxidant; Hepatotoxicity; Oxidative stress; *tert*-Butyl hydroperoxide

### 1. Introduction

Hepatocytes, which make up the majority of the liver structure, are very active in the metabolism of exogenous chemicals, and this is one of the major reasons why the

liver is a target for toxic substances (Timbrell, 2001). During the detoxification of xenobiotics, reactive oxygen species (ROS) are generated which cause oxidative stress (Kohen and Nyska, 2002). In recent studies, aging and related diseases, such as cancer and coronary heart disease and neurodegenerative disorders such as Alzheimer's disease were found to be related to oxidative and free-radical-mediated reactions (Smith et al., 1996; Ames et al., 1993; Weinbrenner et al., 2003). The tipping of the balance towards prooxidant status results in oxidative stress-induced damage to cellular and extracellular macromolecules, such as proteins, lipids and nucleic acids (Halliwell and Gutteridge, 1999; Schafer and Buettner, 2001), and affects the immune function (Hughes, 1999). Endogenous or dietary factors play a major role in the antioxidative defenses of the organism against the ROS generated during

**Abbreviations:** ALT, alanine aminotransferase; AST, aminotransferase; BSA, bovine serum albumin; DPPH, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; DM, dry matter; MTT, (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide); FRAP, ferric-reducing antioxidant power; GAE, gallic acid equivalents;  $\gamma$ -GCS,  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase; GSH, glutathione; GSSG, oxidized GSH; H&E, hematoxylin and eosin; LDH, lactate dehydrogenase; MDA, malondialdehyde; PBS, phosphate-buffered saline; PLE, perilla leaf extract; ROS, reactive oxygen species; *t*-BHP, *tert*-butyl hydroperoxide; TP, total polyphenol.

\* Corresponding author. Tel.: +82 2 3290 3027; fax: +82 2 925 1970.  
E-mail address: kwangwon@korea.ac.kr (K.-W. Lee).

표제	Protective effect of aqueous extract of <i>Perilla frutescens</i> on
저자	tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative hepatotoxicity in rats Min-Kyung Kim, Huyn-Sun Lee, Eun-Jin Kim, Nam-Hee Won,
게재지	Young-Min Chi, Byoung-Chul Kim, Kwang-Won Lee Food and Chemical toxicology, 2007, 45(9), 1738-1744
요지	깨잎 추출물의 항산화 기능을 확인하고, Rat에 경구 투여하여 간 보호 가능성을 확인함. 깨잎 추출물은 1000, 3000 mg/kg b.w.로 경구 투여하였으며 혈액의 AST, ALT는 t-BHP를 처리하였을 때보다 감소하였으며, lipid peroxidation과 GSH 함량은 증가하였으며, GSSG는 감소하였음. 또한 조직 병리학적으로도 간 손상 병변이 줄어드는 것을 확인하였음.
방법	결과
Cytotoxicity (MTT assay)	Rat의 간을 primary culture로 간 세포를 얻었으며, t-BHP에 의한 세포 사멸로부터 깨잎 추출물을 처리하였을 때 보호하는 효과를 확인하였음. 또한 LDH도 감소하는 것을 확인하였음.
Lipid peroxidation	깨잎 추출물이 t-BHP에 의한 지질과산화로부터 보호하는 효과를 Rat primary culture hepatocyte와 경구투여 후 간 조직에서 확인하였음.
Serum enzyme measurement	깨잎 추출물을 경구 투여하였을 때 혈액에서 간 손상 marker인 AST, ALT 모두 감소하는 것을 확인하였음.
Immunohisto-chemical detection	Rat의 간을 적출 후 H&E staining을 통하여 간의 손상 정도를 확인하였을 때, 깨잎 추출물이 간 손상 억제 활성을 나타냄을 확인함.



Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/foodchem](http://www.elsevier.com/locate/foodchem)



## Isolation of caffeic acid from *Perilla frutescens* and its role in enhancing $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase activity and glutathione level

Ho-Young Park<sup>a</sup>, Mi-Hyun Nam<sup>a</sup>, Hyun-Sun Lee<sup>a</sup>, Woojin Jun<sup>b</sup>, Suzanne Hendrich<sup>c</sup>, Kwang-Won Lee<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Division of Food Bioscience and Technology, College of Life Sciences and Biotechnology, Korea University, Seoul 136-713, Republic of Korea

<sup>b</sup>Department of Food and Nutrition, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Republic of Korea

<sup>c</sup>Department of Food Science and Human Nutrition, Iowa State University, Ames, IA 50011, USA

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 29 March 2009

Received in revised form 18 June 2009

Accepted 13 July 2009

#### Keywords:

*Perilla frutescens*

Caffeic acid

$\gamma$ -Glutamylcysteine synthetase

Glutathione

HepG2 cells

### ABSTRACT

*Perilla frutescens* is an annual herbaceous plant native to Asia, where its leaves are used in Asian gourmet food. Our previous study showed that the inhibition of  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase ( $\gamma$ -GCS) activity was remarkably recovered by pretreatment with perilla leaf extract (PLE). The objective was to fractionise PLE, and to identify the active component that is responsible for the enhancement of  $\gamma$ -GCS activity and glutathione (GSH) concentration. Among the five fractions from PLE, PLE-III of the ethyl acetate fraction showed the highest  $\gamma$ -GCS activity in a HepG2 cell experiment, and was further chromatographed. The purified compound, which enhanced  $\gamma$ -GCS activity, was finally identified as caffeic acid. We first report the enhancement of  $\gamma$ -GCS activity and GSH level in HepG2 cells by caffeic acid obtained from PLE. Our results suggest that caffeic acid may be a key factor in the chemopreventive potential of perilla leaf components by increasing *de novo* synthesis of GSH.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

It is well recognised that oxidative and free-radical-mediated reactions contribute to aging and related diseases, such as cancer, coronary disease, and neurogenerative disorders (Smith et al., 1996; Weinbrenner et al., 2003). Endogenous or dietary factors play an important role in the antioxidative defenses of organisms against the reactive oxygen species (ROS) generated during normal cellular aerobic respiration (Kohen & Nyska, 2002). Current epidemiological data support that increased intakes of dietary antioxidants may help the tipping of the balance towards a proper antioxidant status (Halliwell, Murcia, Chirico, & Aruoma, 1995).

**Abbreviations:**  $\gamma$ -GCS,  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase; GSH, glutathione; PLE, perilla leaf extract; *t*-BHP, *tert*-butyl hydroperoxide; MEM, minimum essential medium; FBS, fetal bovine serum; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium; ATP, adenosine 5'-triphosphate; PPi, phospho(enol)pyruvate; NADH,  $\beta$ -nicotinamide adenine dinucleotide reduced dipotassium salt; BSA, bovine serum albumin; EtOAc, ethyl acetate; BuOH, *n*-butanol; MeOH, methanol; BSO, buthionine sulfoxide.

\* Corresponding author. Address: Laboratory of Food Biochemistry and Toxicology, Division of Food Bioscience and Technology, College of Life Sciences and Biotechnology, Korea University, Seoul 136-713, Republic of Korea. Tel.: +82 2 3290 3027; fax: +82 2 953 0737.

E-mail address: [lwangwon@korea.ac.kr](mailto:lwangwon@korea.ac.kr) (K.-W. Lee).

As a candidate dietary source, our research group has focused on *Perilla* [*Perilla frutescens* (L.) Britt. var. *japonica* (Hassk.) Hara]. This plant is an annual herbaceous plant native to Southeast Asian countries. Its leaves are often used in sushi, garnishes, and soups, and to wrap and eat cooked foods. The antioxidative, anti-allergic, anti-inflammatory, and anti-tumor promoting substances contained in perilla plants have earned considerable attention (Banno et al., 2004; Kim et al., 2007; Makino et al., 2003; Ueda, Yamazaki, & Yamazaki, 2002, 2003). Our previous *in vivo* study showed a protective effect of aqueous perilla leaf extract (PLE) on *tert*-butyl hydroperoxide (*t*-BHP)-induced oxidative hepatotoxicity (Kim et al., 2007). While the administration of *t*-BHP significantly decreased glutathione (GSH) level, the pretreatment of PLE remarkably increased GSH to an even higher level compared to that of the untreated control. Also, we observed a significant increase in hepatic  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase ( $\gamma$ -GCS) activity by the PLE treatment.

GSH is a ubiquitous molecule that plays an important role in intracellular free radical metabolism as well as xenobiotic detoxification (Biaglow et al., 1989). The enzyme catalysing the first and rate-limiting step in *de novo* GSH synthesis is  $\gamma$ -GCS (Dringen, 2000). To the best of our knowledge, the active component of PLE that is responsible for enhancing hepatic  $\gamma$ -GCS activity and GSH concentration has not been identified. Therefore, this research aimed to identify the functional compound of aqueous PLE possessing the aforementioned activities using the human hepatocellular cell line HepG2.

표제	Isolation of caffeic acid from <i>Perilla frutescens</i> and its role in enhancing $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase activity and glutathione level
저자	Ho-Young Park, Mi-Hyun Nam, Hyun-Sun Lee, Woojin Jun, Suzanne Hendrich, Kwang-Won Lee
게재지	Food Chemistry, 2010, 119(2), 724-730
요지	갯잎 추출물이 세포내 GSH를 합성하는 $\gamma$ -GCS 효소 활성을 증가시키는 것을 확인함. 또한 이를 증가시키는 갯잎 추출물의 주요 지표 물질은 caffeic acid임을 HPLC와 NMR로 구조 동정함.
방법	결과
Extraction	갯잎 열수 추출물을 분획별 용매를 이용하여 분리한 후, 이를 다시 Diaion HP-20 column을 이용하여 분리함. 이를 다시 Sephadex LH-20 column으로 분리한 후 caffeic acid를 HPLC와 NMR로 구조 동정함.
$\gamma$ -GCS activity	갯잎 추출물을 HepG2에 농도별, 시간별로 처리하였을 때 GSH 생합성과 관련된 $\gamma$ -GCS 효소 활성이 증가함을 확인하였음. 또한 각 분획별 추출물을 처리하였을 때 $\gamma$ -GCS 효소 활성이 증가하는 분획층을 찾아 구조 동정함. Caffeic acid를 HepG2에 처리하였을 때 GSH와 $\gamma$ -GCS 효소 활성이 농도에 따라 유의적으로 증가하는 것을 확인함.





Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/foodchem](http://www.elsevier.com/locate/foodchem)



## Protective effect of extracts of *Perilla frutescens* treated with sucrose on *tert*-butyl hydroperoxide-induced oxidative hepatotoxicity *in vitro* and *in vivo*

Sung-Yong Yang<sup>a</sup>, Chung-oui Hong<sup>a</sup>, Hojoung Lee<sup>b</sup>, Sang-yul Park<sup>c</sup>, Byung-gyu Park<sup>d</sup>, Kwang-Won Lee<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Division of Food Bioscience and Technology, College of Life Science & Biotechnology, Korea University, Seoul 136-713, South Korea

<sup>b</sup> Division of Life and Genetic Engineering, College of Life Science & Biotechnology, Korea University, Seoul 136-713, South Korea

<sup>c</sup> Miryang City Agricultural Technology Center, Miryang-si, Gyeongsangnam-do 627-911, South Korea

<sup>d</sup> Nutraceutical & Functional Food Center, CJ Cheiljedang Co., Seoul 152-051, South Korea

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 16 August 2011

Received in revised form 16 November 2011

Accepted 16 January 2012

Available online 28 January 2012

#### Keywords:

*Perilla frutescens*

Caffeic acid

Sucrose

Oxidative stress

Hepatotoxicity

### ABSTRACT

*Perilla frutescens* leaves are often used in East Asian gourmet food. In this study, we investigated the hepatoprotective effects of *P. frutescens* leaves grown in different concentrations of sucrose (0, 115, 175 and 235 mM sucrose) leading to four samples of perilla leaf extracts (PLEs). Based on caffeic acid level and antioxidant activities, further experiments were conducted using perilla leaf extracts treated with 6% sucrose compared with non-treated perilla leaf extracts as a control. Oral intubation with non-treated perilla leaf extracts or perilla leaf extracts treated with 6% sucrose (1000 mg/kg b.w. rat) for 5 days was conducted before treatment with a single dose of *tert*-butyl hydroperoxide (0.5 mmol/kg b.w., i.p.) led to a significant reduction of hepatic toxicity in the perilla leaf extracts treated with 6% sucrose. We demonstrated that *P. frutescens* with higher contents of caffeic acid was produced, and that sucrose could play a role in the induction of this secondary metabolite. Sucrose-treated perilla leaves, which had better antioxidant activities than untreated leaves, can be used as a potential dietary source.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

*Perilla frutescens* (L.) Britt. var. *japonica* (Hassk.) Harais is an annual herbaceous plant native to Southeast Asian countries. The leaves of this plant are often used in sushi, garnish, soups, and to wrap and eat cooked food. Our previous *in vivo* study showed that aqueous perilla leaf extract (PLE) had antioxidant activities against *t*-butyl hydroperoxide-induced oxidative hepatotoxicity (Kim et al., 2007). In another study, our group demonstrated that caffeic acid (CA) isolated from aqueous PLE caused a significant increase in intracellular  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase ( $\gamma$ -GCS) activity in hepatocytes, and that this elevation appears to result in *de novo* elevation of the levels of the endogenous antioxidant, glutathione (GSH) content (Park et al., 2010). CA is a dietary non-flavonoid phenolic compound that is naturally occurring in a large number of vegetables and medicinal herbs (Marques & Farah, 2009). This phytochemical also possesses antioxidant, immunomodulatory, carcinogenic, and anti-inflammatory activities (Fesen et al., 1994;

Johnson, Marchand, & Pommier, 2004; Nardini, Natella, Gentili, DiFelice, & Scaccini, 1997).

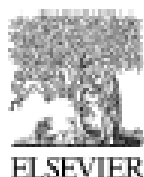
It was recently reported that sucrose treatment increased secondary phenylpropanoid metabolites, such as anthocyanins in grapevine cells and *Arabidopsis* seed cultures (Ferri, Righetti, & Tassoni, 2011; Kwon et al., 2011). It has long been known that, in addition to providing energy and serving as a structural unit, sucrose also generates physiological signals that regulate the expression of genes involved in both primary and secondary metabolism in plants (Rolland, Moore, & Sheen, 2002; Smeekens, 2000). Moreover, the synthesis of rosmarinic acid (RA), an ester of CA found in many medicinal plants including rosmary, mint and perilla, has been shown to be upregulated by elevation of sucrose levels from 1% to 5% (Gertlowski & Petersen, 1993; Petersen, 1991). As CA is a compound produced by the common phenylpropanoid pathway (Croteau, Kutchan, & Lewis, 2000), we proposed that CA biosynthesis in the perilla leaf could be also promoted by increasing the sucrose concentration during cultivation.

In this study, we report for the first time, a method of inducing biosyntheses of CA in *P. frutescens* by treatment with different sucrose levels. These findings indicate that sucrose concentrations can play a role in the induction of CA. Additionally, we investigated the sucrose-treated PLE to determine if it had enhanced effects on liver injury induced by *tert*-butyl hydroperoxide (*t*-BHP) when

\* Corresponding author. Address: 212 CJ Food Safety Hall, Division of Food Bioscience & Technology, College of Life Science and Biotechnology, Korea University, Anam-Dong, Sungbuk-Gu, Seoul 136-701, South Korea. Tel.: +82 2 3290 3027; fax: +82 2 927 1970.

E-mail address: kwangwon@korea.ac.kr (K.-W. Lee).

표제	Protective effect of extracts of <i>Perilla frutescens</i> treated with sucrose on tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative hepatotoxicity in vitro and in vivo
저자	Sung-Yong Yang, Chung-oui Hong, Hojoung Lee, Sang-yul Park, Byung-gyu Park, Kwang-Won Lee
게재지	Food Chemistry, 2012, 133(2), 337-343
요지	설탕 처리를 통하여 간 보호 기능성을 강화시킨 깻잎을 재배하고 세포 수준과 동물 모델에서 간 보호 활성을 측정하였음. 설탕 4~8% 처리하였을 때 항산화 활성과 caffeic acid, rosmarinic acid 함량은 6%에서 가장 크게 증가하였음. 따라서 6% 처리군을 이용하여 간 세포의 GSH, MDA 측정과 경구투여 후 간 조직에서 GSH, MDA를 측정하였을 때 일반 깻잎보다 유의적으로 높은 간 보호 활성을 나타내었음.
방법	결과
Antioxidant activity assay	일반 깻잎과 설탕 처리 깻잎 추출물을 제조한 후, 항산화 효과를 측정하였음. 총 5가지, total polyphenol, total flavonoid, DPPH, FRAP, ABTS assay를 하였을 때 설탕 6% 처리군에서 가장 높은 항산화 활성 증가를 나타내었음.
HPLC analysis	일반 깻잎과 설탕 처리 깻잎 추출물에서 깻잎의 주요 지표 물질인 caffeic acid와 rosmarinic acid를 분석하였을 때, 6% 처리군에서 가장 높은 증가를 나타내었음.
Rat treatment	일반 깻잎과 6% 설탕 처리 깻잎 추출물을 rat에 5일간 1000 mg/kg b.w.로 경구투여 후 t-BHP로 간의 산화 스트레스를 유도하였음. 혈액학적으로 AST, ALT, LDH를 측정하였을 때 설탕 처리군에서 유의적으로 간 보호 활성이 증가함을 확인하였음.
GSH, MDA assay	Rat의 간을 적출한 후 간 조직에서 GSH 함량과 MDA 생성을 측정하였음. 6% 설탕 처리군에서 일반 깻잎보다 유의적으로 높은 간 보호 활성이 나타났으며, H&E staining을 통하여 병리학적으로 간 조직을 관찰하였을 때 간의 병변이 감소하는 것을 확인함.



## Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid)

İlhami Gülçin\*

Faculty of Arts and Sciences, Department of Chemistry, Atatürk University, TR-25240 Erzurum, Turkey

Received 25 August 2005; received in revised form 27 September 2005; accepted 27 September 2005

Available online 21 October 2005

### Abstract

Caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid) is among the major hydroxycinnamic acids present in wine; sinapic acid, which is a potent antioxidant. It has also been identified as one of the active antioxidant. In the present study, the antioxidant properties of the caffeic acid were evaluated by using different *in vitro* antioxidant assays such as 2-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) radical scavenging, 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl free radical (DPPH<sup>•</sup>) scavenging, total antioxidant activity by ferric thiocyanate method, total reductive capability using the potassium ferricyanide reduction method, superoxide anion radical scavenging and metal chelating activities.  $\alpha$ -Tocopherol, trolox, a water-soluble analogues of tocopherol, butylated hydroxyanisole (BHA), and butylated hydroxytoluene (BHT) were used as the reference antioxidant compounds. At the concentrations of 10 and 30  $\mu$ g/mL, caffeic acid showed 68.2 and 75.8% inhibition on lipid peroxidation of linoleic acid emulsion, respectively. On the other hand, 20  $\mu$ g/mL of standard antioxidant such as BHA, BHT,  $\alpha$ -tocopherol and trolox indicated an inhibition of 74.4, 71.2, 34.7 and 20.1% on peroxidation of linoleic acid emulsion, respectively. In addition, caffeic acid is an effective ABTS<sup>•+</sup> scavenging, DPPH<sup>•</sup> scavenging, superoxide anion radical scavenging, total reducing power and metal chelating on ferrous ions activities.

© 2005 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Caffeic acid; 3,4-Dihydroxycinnamic acid; Antioxidant activity; Metal chelating; Reducing power; Radical scavenging

### 1. Introduction

Phenolic compounds are secondary plant metabolites and naturally present in almost all plant materials, including food products of plant origin. These compounds are thought to be an integral part of both human and animal diets (Promiadaou and Tsimidou, 2002). Phenolic acids are simple phenols because of their structure. Hydroxycinnamic acid is the major subgroup of phenolic compounds (Sanchez-Moreno et al., 1998; Sroka and Cisowski, 2003). Hydroxycinnamates are phenylpropanoid metabolites and occur widely in plants (Herrmann, 1989), and plant products (Clifford,

1999). Hydroxycinnamates and their derivatives are bioactive plant food ingredients. They exhibit *in vitro* antioxidant activity, which might have beneficial health impact *in vivo* (Kroon and Williamson, 1999).

Caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid) has been shown to be a  $\alpha$ -tocopherol protectant in low-density lipoprotein (LDL) (Laranjinha et al., 1995). Also, its conjugates such as chlorogenic and caffeic acids were demonstrated to be more powerful antioxidants in a number of different systems (Meyer et al., 1998; Fukumoto and Mazza, 2000). Caffeic acid and its derivatives are good substrates of polyphenol oxidases, and under certain conditions may undergo oxidation in plant tissues or products of plant origin (Kerry and Rice-Evans, 1998; Bassil et al., 2005).

The importance of reactive oxygen species (ROS) and free radicals has attracted increasing attention over

\* Tel.: +90 442 2314444; fax: +90 442 2360948.

E-mail addresses: [igulcin@atauni.edu.tr](mailto:igulcin@atauni.edu.tr), [igulcin@yahoo.com](mailto:igulcin@yahoo.com).

표제	Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid)
저자	Ihami Gulcin
게재지	Toxicology 2006, 217(2-3), 213 - 20
요지	주요 hydroxycinnamic acids 중에 하나인 caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid) 항산화 활성을 가지는 것으로 알려져 있다. BHA, BHT, α-tocopherol 등과 같은 standard antioxidant compounds와 비교하여 ferric thiocyanate method, Total reductive capability, ABTS scavenging, DPPH scavenging, superoxide anions radical scavenging등 과 같은 antioxidant assay 결과 효과적인 항산화 능력을 가지는 것으로 나타났 다.
방법	결과
ferric thiocyanate method	ferric thiocyanate methods는 산화 초기단계에 생성되는 peroxide의 양을 측정하는 방법으로, caffeic acid를 처리 하였을 때 가장 peroxide의 양이 적은 것을 확인하였고, standard인 α-tocopherol과 trolox보다 더 항산화 효과가 있는 것으로 확인함.
Total reductive capability	항산화물질과 같은 reductants가 존재할 때, Fe <sup>3+</sup> /ferricyanide complex가 Fe <sup>2+</sup> 의 형태로 환원이 되고, 그 결과 푸른색을 띠게 되며, 그 색에 대한 흡광도를 측정하여 항산화능력을 측정하는 방법으로, caffeic acid가 BHT, BHA, α-tocopherol과 trolox보다 흡광값이 가장 높게 나타났으므로 항산화력이 가장 좋다는 것을 확인함.
ABTS	ABTS 측정 결과, caffeic acid가 농도 의존적으로 효과적인 ABTS radical scavenging activity를 보이는 것을 확인하였고, 또한 standard인 trolox, α-tocopherol보다 더 효과가 있는 것으로 나타남.
DPPH	caffeic acid가 농도 의존적으로 효과적인 DPPH radical scavenging activity를 보이는 것을 확인함
superoxide anion radical scavenging activity	10 ug/ml의 caffeic acid의 superoxide anion radical scavenging activity 값은 약 61.9%로 나타났고, 같은 농도의 standard인 BHA, BHT, α-tocopherol, trolox는 각각 76.0, 47.3, 71.4, 78.2%으로 나타난 것으로 보아 항산화 효과가 있는 것으로 확인됨.



Contents lists available at ScienceDirect

## Chemico-Biological Interactions

Journal homepage: [www.elsevier.com/locate/chembioint](http://www.elsevier.com/locate/chembioint)



# Efficacy of caffeic acid in preventing nickel induced oxidative damage in liver of rats

L. Pari\*, A. Prasath

Department of Biochemistry and Biotechnology, Faculty of Science, Anna University, Annamalai Nagar 600002, Tamil Nadu, India

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 17 December 2007

Received in revised form 26 February 2008

Accepted 27 February 2008

Available online 6 March 2008

#### Keywords:

Nickel

Caffeic acid

Oxidative stress

Liver

Antioxidants

### ABSTRACT

Nickel (Ni), a major environmental pollutant, is known for its wide toxic manifestations. In the present study caffeic acid (CA), one of the most commonly occurring phenolic acids in fruits, grains and dietary supplements, was evaluated for its protective effect against the Ni induced oxidative damage in liver. In this investigation, Ni (20 mg/kg body weight) was administered intraperitoneally for 20 days to induce toxicity. CA was administered orally (15, 30 and 60 mg/kg body weight) for 20 days with intraperitoneal administration of Ni. Ni induced liver damage was clearly shown by the increased activities of serum hepatic enzymes namely aspartate transaminase (AST), alanine transaminase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), gamma glutamyl transferase (GGT) and lactate dehydrogenase (LDH) along with increased elevation of lipid peroxidation indices (thiobarbituric reactive acid substances (TBARS) and lipid hydroperoxides). The toxic effect of Ni was also indicated by significantly decreased levels of enzymatic (superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) glutathione peroxidase (GPx) and glutathione S-transferase (GST)) and non-enzymatic antioxidants (glutathione (GSH), vitamin C and vitamin E). CA administered at a dose of 60 mg/kg body weight significantly reversed the activities of hepatic marker enzymes to their near normal levels when compared with other two doses. In addition, CA significantly reduced lipid peroxidation and restored the levels of antioxidant defense in the liver. All these changes were supported by histological observations. The results indicate that CA may be beneficial in ameliorating the Ni induced oxidative damage in the liver of rats.

© 2008 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

The toxicity of Nickel (Ni) has become an object of great interest because of widely distributed in environmental occurrence [1]. Humans are exposed to Ni via, food, water and air produced from sources such as mining, extraction, refining, electroplating, food processing and Ni waste disposal [2]. Ni has known multisystem impacts on human health following its exposure and major target organs include liver, kidney, brain, lung and testes [3]. Liver is one of the susceptible organs of Ni toxicity since it plays a major role in its detoxification and also has the ability

to produce metallothionin, a low molecular weight protein having high affinity for Ni [4]. The most possible mechanism that may be operative in Ni toxicity is the generation of reactive oxygen species (ROS), which initiates lipid peroxidation, thereby causing damage to critical macromolecules like proteins or DNA as well as cell damage and death [5]. In addition to that, depletion of glutathione and other endogenous antioxidants may also contribute significantly to the development of Ni induced toxicity oxidative threat [6].

There is an emerging interest in the use of naturally occurring phytochemicals with hepatoprotective and antioxidant activity in Ni intoxication therapy. Caffeic acid (CA, Fig. 1) is a non-flavanoid catecholic compound abundantly present in many plants and occurs in diet as part of fruits, tea, coffee and wine [7]. It is effective as a treating

\* Corresponding author. Tel.: +91 4144 238343; fax: +91 4144 238145.  
E-mail address: [paribalaji@gmail.com](mailto:paribalaji@gmail.com) (L. Pari).

표제	Efficacy of caffeic acid in preventing nickel induced oxidative damage in liver of rats
저자	L. Pari, A. Prasath
게재지	Chemico-Biological Interactions, 2008, 173(2), 77 - 83
요지	caffeic acid는 과일, 곡물 등에 존재하는 가장 일반적인 phenolic acid로서, 간 내에서 산화 스트레스로 유도되는 Ni에 대해 보호 효과가 있는 것을 in vivo 수준에서 확인함. 이를 항산화 효소 분석, 혈청 마커 효소의 활성분석, lipid peroxidation 측정 등을 통해 확인함.
방법	결과
혈청 마커효소의 활성분석	caffeic acid를 경구 투여한 rat과 그렇지 않은 rat에 Ni를 복강투여 하여 rat의 혈청 효소인 AST, ALT, LDH, GGT를 비교함. 혈청 효소의 생화학적 수치는 Ni 투여 이후 대조군에 비해 증가를 나타냈고, caffeic acid 투여군은 효소 활성이 Ni 투여군에 비해 감소시키는 효과를 보여 산화스트레스에 의해 유도되는 Ni에 의한 간 독성 보호 효과가 있는 것으로 확인함.
Lipid peroxidation and non-enzymatic antioxidants	TBARS와 lipidhydroperoxide는 Ni 투여군에 비해 Ni와 caffeic acid를 함께 투여한 군에서 감소하는 것으로 나타났고, vitaminC, vitaminE와 GSH는 증가하는 것으로 나타난 것으로 확인함.
Enzymatic antioxidants	Ni 투여군에서 enzymatic antioxidants (SOD, CAT, GPx, GST)의 활성은 상당히 감소하는 것으로 나타났으나, Ni와 CA 투여군에서는 활성이 증가하는 것으로 나타남.



## Studies on the protective effects of caffeic acid and quercetin on chemical-induced hepatotoxicity in rodents

K.H. Janbaz<sup>a</sup>, S.A. Saeed<sup>b</sup>, A.H. Gilani<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup>Faculty of Pharmacy, Bahauddin Zakariya University, Multan, Pakistan

<sup>b</sup>Department of Biological & Biomedical Sciences, The Aga Khan University Medical College, Karachi 74800, Pakistan

Received 15 February 2003; accepted 8 May 2003

### Abstract

Caffeic acid and quercetin, the well-known phenolic compounds widely present in the plant kingdom, were investigated for their possible protective effects against paracetamol and CCl<sub>4</sub>-induced hepatic damage. Paracetamol at the oral dose of 1 g/kg produced 100% mortality in mice while pretreatment of separate groups of animals with caffeic acid (6 mg/kg) and quercetin (10 mg/kg) reduced the death rate to 20% and 30%, respectively. Oral administration of sub-lethal dose of paracetamol (640 mg/kg) produced liver damage in rats as manifested by the significant ( $P < 0.01$ ) rise in serum levels of aminotransferases (aspartate transaminase (AST) and alanine transaminase (ALT)) compared to respective control values. The serum enzyme values were significantly ( $P < 0.01$ ) lowered on pretreatment of rats with either caffeic acid (6 mg/kg) or quercetin (10 mg/kg). Similarly, the hepatotoxic dose of CCl<sub>4</sub> (1.5 ml/kg; orally) also raised significantly ( $P < 0.05$ ) the serum AST and ALT levels as compared to control values. The same dose of the caffeic acid and quercetin was able to prevent CCl<sub>4</sub>-induced rise in serum enzymes. Caffeic acid and quercetin also prevented the CCl<sub>4</sub>-induced prolongation in pentobarbital sleeping time confirming their hepatoprotectivity. These results indicate that caffeic acid and quercetin exhibited hepatoprotective activity possibly through multiple mechanisms.

© 2004 Elsevier GmbH. All rights reserved.

**Keywords:** Caffeic acid; Quercetin; Hepatoprotective; Paracetamol; CCl<sub>4</sub>; Rodents

### Introduction

Caffeic acid and quercetin are phenolic compounds widely present in plant kingdom (Duke, 1992). These compounds have been extensively studied and are known to share a spectrum of pharmacological activities including anti-inflammatory (Taguchi et al., 1993; Moreira et al., 2000), anti-allergic (Murota and Koshihara, 1985; Kimata et al., 2000), anti-tumor (Li et al.,

1999; Hudson et al., 2000; Soleas et al., 2002), anti-ulcer (Martin et al., 1993; Al-Sereiti et al., 1999), anti-mutagenesis (Wargovich et al., 1985; Karekar et al., 2000), cardioprotective (Kolchin et al., 1991; Cornicelli and Trivedi, 1999) and also immunomodulator (Kato and Murota, 1985; Russo et al., 1999) activities.

The anti-bacterial (Reinders et al., 2001), anti-viral (Thiel et al., 1984; Vlietinck et al., 1998), anti-protozoal (Shapiro et al., 1982), anti-fertility (Zheng et al., 1987), anti-steroidogenesis (Mele et al., 1997) and chemoprotectant (Adzet et al., 1987) activities are known to be exhibited by caffeic acid alone, whereas the anti-prostatitis (Shoskes, 2002) anti-platelets (Pignatelli et al.,

\*Corresponding author. Tel.: +92-21-48994571; fax: +92-21-4934294.

E-mail address: [awwan.gilani@aku.edu](mailto:awwan.gilani@aku.edu) (A.H. Gilani).

표제	Studies on the protective effects of caffeic acid and quercetin on chemical-induced hepatotoxicity in rodents
저자	K.H. Janbaza, S.A. Saeedb, A.H. Gilani
게재지	Phytomedicine 2004, 11(5), 424 - 430
요지	phenolic compounds로 알려진 caffeic acid와 quercetin은 유도되는 paracetamol과 CCl <sub>4</sub> 에 의해 유도되는 간조직 손상에 대항하여 보호효과를 가지는 것을 <i>in vivo</i> 수준에서 확인함.
방법	결과
paracetamol에 대한 caffeic acid와 quercetin의 효과	mice에 paracetamol을 1g/kg로 투여하면 치사율이 100%인데, 두 그룹으로 나누어 한 그룹에는 caffeic acid, 다른 그룹에는 quercetin을 이전에 투여한 뒤, paracetamol을 동일한 농도로 투여하면, 80%, 70%의 생존율을 보임을 확인함으로써, paracetamol에 대한 보호효과가 있는 것을 확인함.
paracetamol에 의해 유도되는 간독성에 대한 caffeic acid와 quercetin의 효과	control (saline+vehicle)군의 혈청에서의 AST와 ALT에 비해 paracetamol 투여군의 혈청 생화학적 수치가 증가 하였고, caffeic acid와 quercetin 투여군은 생화학적 수치가 감소한 것으로 보아, paracetamol에 의한 간 독성에 대한 보호 효과가 있는 것을 확인함.
CCl <sub>4</sub> 에 의해 유도되는 간독성에 대한 caffeic acid와 quercetin의 효과	control (saline+vehicle)군의 혈청에서의 AST와 ALT에 비해 CCl <sub>4</sub> 투여군의 혈청 생화학적 수치가 증가 하였고, caffeic acid와 quercetin 투여군은 생화학적 수치가 감소한 것으로 보아, CCl <sub>4</sub> 에 의한 간 독성에 대한 보호 효과가 있는 것을 확인함.





Original Contribution

EFFECT OF CAFFEIC ACID ON *TERT*-BUTYL HYDROPEROXIDE-INDUCED  
OXIDATIVE STRESS IN U937

MIRELLA NARDINI,<sup>\*</sup> PAOLA PERI,<sup>\*</sup> VINCENZO GENTILI,<sup>\*</sup> FAUSTA NATIELLA,<sup>\*</sup> MAURIZIO DI  
FELICE,<sup>\*</sup> ENZA PICCOLELLA,<sup>†</sup> and CRISTINA SCACCINI<sup>\*</sup>

<sup>\*</sup>Free Radical Research Group, National Institute of Nutrition, Rome, Italy; and <sup>†</sup>Department of Cellular and Developmental Biology, University "La Sapienza," Rome, Italy

(Received 10 April 1998; Revised 22 June 1998; Accepted 23 June 1998)

**Abstract**—Nonvitamin phenolic compounds are ubiquitous in food plants and therefore potentially present in human plasma in a diet-dependent concentration. The aim of this study was to evaluate the ability of caffeic acid, a phenolic acid with antioxidant activity, to affect cellular response in U937 human monocytic cells to *t*-butyl hydroperoxide-induced oxidative stress. In our experimental conditions caffeic acid was incorporated into cells without any cytotoxic effect. Caffeic acid-treated cells showed an increased resistance to oxidative challenge, as revealed by an higher percent of survival and the maintenance of an higher proliferative capacity in respect to control cells. This effect seems to be due to the ability of caffeic acid to reduce glutathione depletion and to inhibit lipid peroxidation during tBOOH treatment. It can be concluded that caffeic acid exerts an antioxidant action inside the cell, responsible for the observed modulation of the cellular response to oxidative challenge. Due to its presence in the diet, therefore, caffeic acid may play a role in the modulation of oxidative processes in vivo. © 1998 Elsevier Science Inc.

**Keywords**—Caffeic acid, U937, *tert*-Butyl hydroperoxide, Oxidative stress, Free radical

INTRODUCTION

The impairment of the antioxidant defense system is considered to be critically involved in a number of pathological conditions including cardiovascular disease, atherosclerosis, cancer, inflammation, and cataracts [1-6]. Diet can contribute to the overall redox balance as a source of natural antioxidants, which are considered major health-protecting factors.

Nonvitamin phenolic compounds are bioactive substances widely occurring in food plants and therefore potentially present in human plasma in a diet-dependent concentration. Among these compounds, caffeic acid (CA) is the most abundant of the hydroxy cinnamic acids and is found naturally in various agricultural products such fruits, vegetables, wine, olive oil, and coffee beans [7,8]. CA is absorbed in humans after oral administration and specific metabolites are detected in the urine [9].

In previous studies we found that CA inhibited *in vitro* human low-density lipoprotein oxidation induced

by different systems [Cu<sup>2+</sup>, 2,2'-azobis(2-amidinopropane) (AAPB) macrophages] by both a transient chelation of the copper catalyst and the scavenging of reactive oxygen species [10,11]. Moreover, CA exhibited a sparing effect toward alpha-tocopherol and beta-carotene [10].

CA has also been reported to inhibit the oxidation of lipoprotein exposed to ferrylmyoglobin and to recycling alpha-tocopherol from alpha-tocopheroxyl radical [11]. An *in vivo* study from our laboratory showed that dietary supplementation of CA in rats resulted in a statistically significant increase of alpha-tocopherol both in plasma and lipoprotein [12]. Moreover, CA was found to be present in postprandial plasma in micromolar concentrations, doubling plasma antioxidant capacity; lipoproteins from CA-fed rats were more resistant than control to *in vitro* oxidation. These results demonstrate the physiological relevance of CA and its antioxidant action *in vivo*.

Monocyte cells, as circulating cells, are easily affected by dietary-derived peroxides and antioxidants present in plasma. Recently it has been reported that supplementation of alpha-tocopherol in humans affects cellular function in monocytes [13]. The report provided evidence for an intracellular effect of alpha-tocopherol in

Address correspondence to: Dr. Mirella Nardini, Istituto Nazionale della Nutrizione, Via Ardeatina 546, 00178 Rome, Italy; Tel: +39-6-5032412; Fax: +39-6-5031592; E-Mail: nardini@inm.ingra.it

표제	EFFECT OF CAFFEIC ACID ON TERT-BUTYL HYDROPEROXIDE-INDUCED OXIDATIVE STRESS IN U937
저자	MIRELLA NARDINI, PAOLA PISU, VINCENZO GENTILI, FAUSTA NATELLA, MAURIZIO DI FELICE, ENZA PICCOLELLA,, CRISTINA SCACCINI
게재지	Free Radical Biology & Medicine, 1998, 25(9), 1098 - 1105,
요지	항산화 능력을 가지는 phenolic acid 중의 하나인 caffeic acid의 t-BOOH에 의한 산화스트레스에 대한 보호효과를 in vitro 수준에서 human monocytic cell인 U937을 이용하여 확인함. GSH, α-tocopherol, TBARS 등을 통한 측정, 세포 생존을 측정 등을 통해 caffeic acid의 항산화 능력을 확인함.
방법	결과
세포 생존에 t-BOOH의 영향 glutathione, alpha-tocopherol, and TBA-RS 함량에서 t-BOOH의 영향	t-BOOH를 100~500 uM으로 cell에 처리 하였을 때 농도의존적으로 cell의 생존율이 감소하는 것을 확인하였고, caffeic acid를 처리하였을 때, t-BOOH에 대해 높은 저항을 보이는 것을 확인함.  t-BOOH 500uM으로 처리된 cell을 control로 하고, 그 control에 caffeic acid를 처리한 결과, GSH 함량은 증가하였으며, GSSG 함량은 감소한 것을 확인함. 또한, α-tocopherol의 함량은 소량 증가하였으며, TBA-RS assay 결과 수치가 현저히 감소한 것을 확인함으로써 t-BOOH에 대한 caffeic acid의 저항력 및 보호 효과를 확인함.



## Comparative effects of perilla and fish oils on the activity and gene expression of fatty acid oxidation enzymes in rat liver

Takashi Ide <sup>a,\*</sup>, Hideyuki Kobayashi <sup>a</sup>, Lakshmikuttyamma Ashakumary <sup>a</sup>,  
Isabelle A. Rouyer <sup>a</sup>, Yoko Takahashi <sup>a</sup>, Toshifumi Aoyama <sup>b</sup>, Takashi Hashimoto <sup>b</sup>,  
Michinao Mizugaki <sup>c</sup>

<sup>a</sup> *Laboratory of Nutrition Biochemistry, National Food Research Institute, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, 2-1-2 Kannondai, Tsukuba Science City 305-8642, Japan*

<sup>b</sup> *Department of Biochemistry, Shinshu University School of Medicine, Nagano 390-8621, Japan*

<sup>c</sup> *Department of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University Hospital, Miyagi 980-8574, Japan*

Received 11 November 1999; received in revised form 15 February 2000; accepted 13 March 2000

### Abstract

The activity and mRNA level of hepatic enzymes in fatty acid oxidation and synthesis were compared in rats fed diets containing either 15% saturated fat (palm oil), safflower oil rich in linoleic acid, perilla oil rich in  $\alpha$ -linolenic acid or fish oil rich in eicosapentaenoic (EPA) and docosahexaenoic acids (DHA) for 15 days. The mitochondrial fatty acid oxidation rate was 50% higher in rats fed perilla and fish oils than in the other groups. Perilla and fish oils compared to palm and safflower oils approximately doubled and more than tripled, respectively, peroxisomal fatty acid oxidation rate. Compared to palm and safflower oil, both perilla and fish oils caused a 50% increase in carnitine palmitoyltransferase I activity. Dietary fats rich in *n*-3 fatty acids also increased the activity of other fatty acid oxidation enzymes except for 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase. The extent of the increase was greater with fish oil than with perilla oil. Interestingly, both perilla and fish oils decreased the activity of 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase measured using short- and medium-chain substrates. Compared to palm and safflower oils, perilla and fish oils increased the mRNA level of many mitochondrial and peroxisomal enzymes. Increases were generally greater with fish oil than with perilla oil. Fatty acid synthase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, and pyruvate kinase activity and mRNA level were higher in rats fed palm oil than in the other groups. Among rats fed polyunsaturated fats, activities and mRNA levels of these enzymes were lower in rats fed fish oil than in the animals fed perilla and safflower oils. The values were comparable between the latter two groups. Safflower and fish oils but not perilla oil, compared to palm oil, also decreased malic enzyme activity and mRNA level. Examination of the fatty acid composition of hepatic phospholipid indicated that dietary  $\alpha$ -linolenic acid is effectively desaturated and elongated to form EPA and DHA. Dietary perilla oil and fish oil therefore exert similar physiological activity in modulating hepatic fatty acid oxidation, but these dietary fats considerably differ in affecting fatty acid synthesis. © 2000 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

표제	Comparative effects of perilla and fish oils on the activity and gene expression of fatty acid oxidation enzymes in rat liver	
저자	Takashi Ide, Hideyuki Kobayashi	
게재지	Biochimica et Biophysica Acta, 2000, 1485(1), 23-35	
요지	<p>깻잎과 어유를 섭취한 rat의 간의 지방산 산화, 합성과 그와 관련된 유전자의 발현정도를 실험하였을 때, palmitoyl-CoA reductase과 같은 효소를 발현시켜 지방산의 산화를 도우며, pyruvate kinase와 같은 지방산 합성을 유발하는 인자의 발현을 억제시키는 것을 확인함.</p>	
방법	결과	
Hepatic fatty acid oxidation enzyme activity RNA analysis by Northern blot hybridization	<p>깻잎 추출 오일을 19.1-19.9 g/day로 자유급여로 복용시켰을 때, 간의 무게가 다른 투여군 보다 증가하며, 그 이유는 palmitoyl-CoA reductase, sorboyl-CoA와 같은 간의 지방산 산화 효소들의 발현이 증가하게 되면서 나타는 현상이라고 언급함.</p>	
fatty acid synthesis	<p>glucose-6-phosphate dehydrogenase와 pyruvate kinase의 효소활성을 낮추며, fatty acid의 합성을 억제 하는 것을 확인함.</p>	
serum and liver lipids	<p>혈장에서 트리글라이세롤, 콜레스테롤, 인지질, 유리지방산이 함량이 깻잎 오일을 섭취하였을 때 떨어지는 것을 확인함.</p>	

## Effects of perilla extract on productive performance, serum values and hepatic expression of lipid-related genes in Shaoxing ducks

W.M. LIU<sup>1,3</sup>, J. ZHANG<sup>2,3</sup>, L.Z. LU<sup>3</sup>, F.X. SHI<sup>1</sup>, D. NIU<sup>4</sup>, D.L. WANG<sup>5</sup>, B. YU<sup>5</sup>, Z.R. TAO<sup>3</sup>, J.D. SHEN<sup>3</sup>, D.Q. WANG<sup>3</sup> AND Y. TIAN<sup>3</sup>

<sup>1</sup>College of Animal Science & Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China, <sup>2</sup>Luozhuang Bureau of Animal Husbandry and Veterinary, Linyi, China, <sup>3</sup>Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou, China, <sup>4</sup>Zhejiang University, Hangzhou, China, and <sup>5</sup>Ningbo Jiangnan Poultry Breeding Limited Company, Ningbo, China

**Abstract** 1. The aim of this study was to identify the effect of perilla extract, a source of polyunsaturated fatty acids, on lipid metabolism and expression of lipid-related genes in livers of Shaoxing ducks.

2. Two hundred and forty 28-week-old laying ducks received a commercial diet with perilla extract added at 0 (control) or 200 mg/kg of feed.

3. Ducks fed on a diet with perilla extract had increased laying rates compared with control ducks.

4. Serum concentrations of triglycerides were reduced by perilla extract, while high-density lipoprotein cholesterol and total serum cholesterol increased.

5. The expression of genes involved in hepatic lipogenesis, sterol regulatory element-binding protein-1, acetyl CoA carboxylase, stearoyl CoA desaturase, fatty acid synthase, apolipoprotein B, and apolipoprotein very low density lipoprotein, were decreased in the perilla group.

6. The mRNA expression of peroxisome proliferators-activated receptor alpha and acyl-coenzyme A oxidase was enhanced following treatment with perilla extract, and a similar tendency was observed in the expression of liver fatty acid-binding protein.

7. The results show that a diet with 200 mg/kg perilla extract regulated fat metabolism of Shaoxing ducks by improving egg laying, altering serum lipid profiles, stimulating lipid catabolic gene expression and inhibiting lipogenic gene expression in the liver.

표제	Effects of perilla extract on productive performance, serum values and hepatic expression of lipid-related genes in Shaxing ducks
저자	W.M. LIU, J. ZHANG
게재지	British Poultry Science, 2011, 52(3), 381-387
요지	갯잎 추출물을 200 mg/kg의 농도로 오리에게 50일간 투여하였을 시에, 혈장의 HDL을 증가시키며 LDL을 감소시키는 경향을 나타내며, 간의 지질합성과 관련된 FAC, ACC, MA, SREBP-1과 같은 유전자를 억제함을 확인함.
방법	결과
performance trait	갯잎 추출물을 28주령의 duck에게 200 mg/kg의 농도를 기초사료에 첨가하여 50일간 먹인 후에 혈장을 검사하였을 때, 알을 낳는 개수는 증가하지만, 알의 무게는 크게 차이 없는 것을 나타냄.
Serum value analysis	갯잎 추출물을 투여한 오리는 대조군에 비교하여 HDL은 증가하였으며 triglyceride와 총 콜레스테롤은 LDL은 감소하는 경향을 나타냄
간의 지질 대사와 mRNA 발현	지질합성을 하는 SREBP-1, MA, ACC, SCD, FAS등과 같은 유전자는 억제하며, 지질을 분해하는 PPAR $\alpha$ , AC0X와 같은 증가시키는 것을 확인하였으며, 간의 지질 합성 매커니즘을 관여하는 FAC, ACC, MA, SREBP-1 유전자들과 연관성을 많이 가지며, 이는 간의 지방 합성억제와 그에 관한 메커니즘을 억제함을 확인함.

## 제 7 장 참고문헌

1. Chen, J. H. and C. T. Ho (1997). Antioxidant activities of caffeic acid and its related hydroxycinnamic acid compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45(7): 2374-2378
2. Nardini, M., F. Natella, V. Gentili, M. DiFelice and C. Scaccini (1997). Effect of caffeic acid dietary supplementation on the antioxidant defense system in rat: An *in vivo* study. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 342(1): 157-160
3. Frankel, E. N., S. W. Huang, R. Aeschbach and E. Prior (1996). Antioxidant activity of a rosemary extract and its constituents, carnosic acid, carnosol, and rosmarinic acid, in bulk oil and oil-in-water emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44(1): 131-135
4. Osakabe, N., A. Yasuda, M. Natsume and T. Yoshikawa (2004). Rosmarinic acid inhibits epidermal inflammatory responses: anticarcinogenic effect of *perilla frutescens* extract in the murine two-stage skin model. *Carcinogenesis* 25(4): 549-557
5. Takano, H., N. Osakabe, C. Sanbongi, R. Yanagisawa, K. Inoue, A. Yasuda, M. Natsume, S. Baba, E. Ichiishi and T. Yoshikawa (2004). Extract of *perilla frutescens* enriched for rosmarinic acid, a polyphenolic phytochemical, inhibits seasonal allergic rhinoconjunctivitis in humans. *Experimental Biology and Medicine* 229(3): 247-254
6. Kim, M. K., H. S. Lee, E. J. Kim, N. H. Won, Y. M. Chi, B. C. Kim and K. W. Lee (2007). Protective effect of aqueous extract of *perilla frutescens* on tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative hepatotoxicity in rats. *Food and Chemical Toxicology* 45(9): 1738-1744
7. Rolland, F., B. Moore and J. Sheen (2002). Sugar sensing and signaling in plants. *Plant Cell* 14: S185-S205
8. Smeekens, S. (2000). Sugar-induced signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 51: 49-81
9. Gertlowski, C. and M. Petersen (1993). Influence of the Carbon Source on Growth and Rosmarinic Acid Production in Suspension-Cultures of *Coleus-Blumei*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 34(2): 183-190

10. Hossain, M. A., S. Kim, K. H. Kim, S. J. Lee and H. Lee (2009). Flavonoid Compounds Are Enriched in Lemon Balm (*Melissa officinalis*) Leaves by a High Level of Sucrose and Confer Increased Antioxidant Activity. *Hortscience* 44(7): 1907-1913
11. Lee H. S., Won N. H., Kim H. H., Lee H. J. Yun W. J. and Lee K. W. (2005). Antioxidant effects of aqueous extract of *Terminalia chebular* *in vivo* and *in vitro*. *Biol. Pharm. Bull.* 28(9); 1639-1644
12. Fenglin, H., Ruili, L., Bao, H., Liang, M. (2004). Free radical scavenging activity of extracts prepared from fresh leaves of selected Chinese medical plants. *Fitoterapia* 75; 14-23
13. Maksimovic, Z., D. Malencic and N. Kovacevic (2005). Polyphenol contents and antioxidant activity of *Maydis stigma* extracts. *Bioresource Technology* 96(8): 873-877
14. Re, R., N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang and C. Rice-Evans (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* 26(9-10): 1231-1237
15. Mallick, S., S. K. Mandal and R. Bhadra (2002). Human placental lipid induces mitogenesis and melanogenesis in B16F10 melanoma cells. *Journal of Biosciences* 27(3): 243-249
16. Hogberg J., Orrenius, S., O'Brien, P.J. (1975). Further studies on lipid-peroxide formation in isolated hepatocytes. *European J. Biochem.* 59; 449-455
17. Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95; 351-353
18. Lee, Y. T., L. Y. Chiang, W. J. Chen and H. C. Hsu (2000). Water-soluble hexasulfobutyl[60]fullerene inhibit low-density lipoprotein oxidation in aqueous and lipophilic phases. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 224(2): 69-75
19. Reed, D. J., J. R. Babson, P. W. Beatty, A. E. Brodie, W. W. Ellis and D. W. Potter (1980). High-Performance Liquid-Chromatography Analysis of Nanomole Levels of Glutathione, Glutathione Disulfide, and Related Thiols and Disulfides. *Analytical Biochemistry* 106(1): 55-62
20. Chau-Jong Wang, Jin-Ming Wang, Wea-Lung Lin, Chia-Yih Chu, Fen-Pi Chou and Tsui-Hwa Tseng, (2000). Protective Extract of Hibiscus Anthocyanins Against



*tert*-butyl Hydroperoxide-induced Hepatic Toxicity in Rats. Food and Chemical Toxicology 38: 411-416

21. Chuen-Lan Liua, Jin-Ming Wangb, Chia-Yih Chub, Ming-Tzong Chengc, Tsui-Hwa Tseng, (2002). *In vivo* protective effect of protocatechuic acid on *tert*-butyl hydroperoxide-induced rat hepatotoxicity. Food and Chemical Toxicology 40: 635-641
22. GOW-CHIN YEN, CHI-TAI YEH, AND YEN-JU CHEN, (2004). Protective Effect of *Mesona procumbens* against *tert*-Butyl Hydroperoxide-Induced Acute Hepatic Damage in Rats. J. Agric. Food Chem, 52: 4121-4127
23. Hyun-Sun LEE, Nam Hee WON, Kyoung Heon KIM, Hojoung LEE, Woojin JUN, and Kwang-Won LEE, (2005). Antioxidant Effects of Aqueous Extract of *Terminalia chebula* in Vivo and in Vitro, Biol. Pharm. Bull. 28(9); 1639-1644
24. Jin-Ming Hwang, Chau-Jong Wang, Feu-Pi Chou, Tsui-Hwa Tseng, Yih-Shou Hsieh, Wea-Lung Lin, Chia-Yih Chu, (2002). Inhibitory effect of berberine on *tert*-butyl hydroperoxide-induced oxidative damage in rat liver. Arch. Toxicol. 76: 664-670
25. Jin-Ming Hwang, Tsui-Hwa Tsengb, Yu-Ying Tsaic, Huei-Jane Leec, Feu-Pi Chouc, Chau-Jong Wangc & Chia-Yih Chub, (2005). Protective effects of *baicalein* on *tert*-butyl hydroperoxide-induced hepatic toxicity in rat hepatocytes. Journal of Biomedical Science 12: 389-397
26. Min-Koung Kim, Hyun-Sun Lee, Eun-Jin Kim, Nam-Hee Won, Young-Min Chi, Byoung-Chul Kim, and Kwang-Won Lee, (2007). Protective effect of aqueous extract of *perilla frutescens* on *tert*-butyl hydroperoxide-induced oxidative hepatotoxicity in rats. Food and Chemical Toxicology. 45: 1738-1744
27. Park B. G., Lee H. S., Jung S. H., Koo Y. C., Hong C. O., LEE S. J. and Lee K. W. (2007). Single & 14-Day Repeated Oral Toxicity Study and Genotoxicological Safety Estimate of Plantamajoside Isolated from *Plantago asiatica*. J.Toxicol.Pub.Health. 23(1): 79-86
28. Park B. G., Lee H. S., Jung S. H., Koo Y. C., Hong C. O., Won H. J., Park H. Y., Ryu Y. S., LEE S. J., Kim K. H., Park H. W. and Lee K. W. (2007). A 90 day repeated oral toxicity study on Plantamajoside concentrate from *Plantago asiatica*. Phytother Res. 21: 1118-1123
29. 식약처. 2005. 의약품 등의 독성 시험 기준, 식품의약품안전처 고시 제2005-60호

30. Fujii T., Saito M. (2009) Inhibitory Effect of Quercetin Isolated from Rose Hip (*Rosa canina* L.) against Melanogenesis by Mouse Melanoma Cells. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 73: 1989–1993
31. Hiroyuki M., Takashi K. (2006) Specific Dual Beam Fluorometry Analysis of Benzo[a]pyrene and Benzo[k]fluoranthene in Diesel Exhaust Particulate Samples. *Environmental Science*. 13: 353–362
32. Gomez-Galera S, Pelacho AM, Gene A, Capell T, Christou P. The genetic manipulation of medicinal and aromatic plants, *Plant cell report*. 26(10): 1689–715 (2007)
33. Meng L, Lozano YF, Gaydou EM, Li B. (2008). Antioxidant activities of polyphenols extracted from *perilla frutescens* varieties, *Molecules*. 14(1): 133–40
35. Yamazaki M, Nakajima J, Yamanashi M, Sugiyama M, Makita Y, Springob K, Awazuhara M, Saito K. (2003). Metabolomics and differential gene expression in anthocyanin chemo-variety forms of *perilla frutescens*. *Phytochemistry*. 62(6): 987–95
36. Yamazaki M. (2002). Molecular biological studies on diversity of secondary metabolism in medicinal plants and application to the production in transgenic plants. *Yakugaku zasshi*. 122(1): 47–56
37. Sung-Yong Yang, Chung-Oui Hong, Hojoung Lee, Sang-yul Park, Byung-gyu Park, Kwang-Won Lee. (2012). Protective effect of extracts of *perilla frutescens* treated with sucrose on *tert*-butyl hydroperoxide-induced oxidative hepatotoxicity *in vitro* and *in vivo*. *Food chemistry*. 133(2): 337–343
38. David J, Pavel K, Miroslava M, Jakub S, Jitka U, Vilim S. (2007). HPLC Analysis of Rosmarinic Acid in Feed Enriched with Aerial Parts of *Prunella Vulgaris* and Its Metabolites in Pig Plasma Using Dual-Channel Coulometric Detection. *Journal of agricultural and food chemistry*. 55: 7631–7637

## 주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농림기술개발연구사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농림기술개발연구사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.