

(뒷면)

(앞면)

발간등록번호

11-1543000-000833-01

레몬, 황칠나무의 체내 중금속 배출, 항산화기능 연구 및 제품개발

레몬, 황칠나무의 체내 중금속 배출, 항산화기능 연구 및 제품개발
(Development and products for heavy metal release, antioxidant effects from lemon, dendropanax morbifera)

주 의
(편집순서 8)

(주)이푸른

농림축산식품부

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “레몬, 황칠나무의 체내 중금속 배출, 항산화기능 연구 및 제품화에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2015년 1월 18일

주관연구기관명 : (주)이푸른

주관연구책임자 : 김 동 우

세부연구책임자 : 황 인 구

세부연구책임자 : 문 승 명

연 구 원 : 김 영 일

연 구 원 : 권 순 기

연 구 원 : 반 정 주

연 구 원 : 배 수 라

연 구 원 : 유 대 영

연 구 원 : 김 중 휘

연 구 원 : 정 효 영

연 구 원 : 용 지 인

요 약 문

I. 제 목

레몬, 황칠나무의 체내 중금속 배출, 항산화기능 연구 및 제품화

II. 연구개발의 목적 및 필요성

레몬을 통한 중금속 배출 관련 상품(레몬디톡스)상품의 규모가 점차 증가하고 있는 반면, 그 효능 및 안전성의 구명은 미미한 상태임. 본 연구에서 신규로 다루고자 하는 후보원료인 황칠나무의 경우 우리나라 남부에서만 자생하는 식물로 고유성이 인정되는 원료이며, 최근 이러한 원료에 대한 관심이 집중되고 있음. 식약처에서는 항산화의 청구항에 중금속배출을 포함시켜 논의를 하고 있으나, 현재까지 디톡스에 대한 열풍에도 불구하고 중금속 배출을 촉진시키는 원료가 전무한 상황임. 따라서 본 연구를 통하여 레몬의 중금속 배출 효능 및 안전성을 확보하며, 또한 의 추출물을 중금속 배출 효능을 검증하여 레몬추출물과 그 효능을 비교, 우수한 원료에 대하여 중금속 배출 관련 제품을 개발하여 시장에 진입, 이로 인하여 기업 및 농가의 수익을 창출하고자 함.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구를 통해서 레몬추출물, 황칠나무(잎, 줄기)추출물을 확보하고, 각 추출물에 대한 미생물 검사, **in vitro**, **in vivo** 독성을 평가하여 시료에 대한 안전성을 확보하였음. 또한 각 추출물의 항산화효능평가 등을 통해 유효농도를 확인하고, **in vitro** 연구를 통해 어떠한 기전에 의해 독성을 억제할 수 있는지에 대한 평가를 실시하였음. 또한 랫드를 통해 4주간 납, 아연, 수은과 레몬추출물, 황칠나무 잎 추출물, 황칠나무 줄기 추출물을 급여하여 동물에서 혈액, 콩팥에서의 중금속 농도를 측정하고, 외부자극에 가장 민감한 뇌부위로 알려진 해마에서 항산화 효능, 단백질의 산화적 스트레스 등을 확인하였음. 레몬추출물, 황칠나무 잎 추출물, 황칠나무 줄기 추출물 중에 효능이 가장 좋다고 판단된 시료인 황칠나무 잎 추출물을 통해 시제품을 만들어 60명의 피시험자를 위약군과 황칠나무 잎 추출물 투약군으로 나누어 2개월간 투약 후에 혈액에서 중금속 농도 및 산화적 손상, 항산화효소의 농도를 확인하였음. 이를 토대로 하여 개별인정 신청을 현재 준비 중에 있음.

IV. 연구개발결과

레몬추출물, 황칠나무 잎 추출물, 황칠나무 줄기 추출물을 각각 얻어 기능이 있는 지표성분

에 대한 분석을 실시하였으며, 시료 자체가 가지고 있는 항산화 활성을 확인하였으며, **in vitro** 상에서는 황칠나무 잎 추출물, 황칠나무 줄기 추출물의 항산화 활성이 가장 강한 것을 확인하였음. 또한 독성이 있는지를 확인하기 위하여 **in vitro** 세포주를 이용하여 확인함과 동시에 랫드를 이용하여 단일독성시험, 13주 반복 독성실험을 실시하였음. 그 결과 독성을 나타내는 개체가 전혀 없어 안전성이 있다는 것을 확인할 수 있었음. 또한 황칠나무 잎 추출물은 **in vitro** 세포주 실험에서 **lipopolysaccharide**로 자극된 산화적 스트레스 및 생존에 관련된 **interleukin cytokine**인 **IL-1 β** , **IL-6**의 활성을 조절하며, **transduction signal**과 관련하여 **mitogen-activated protein kinases**, **c-Jun N-terminal kinases**에도 영향을 미치는 것을 확인할 수 있었음. 한편 **in vivo** 연구에서는 레몬추출물, 황칠나무 잎 추출물, 황칠나무 줄기 추출물의 투여가 납, 카드뮴, 수은의 혈액내 농도를 유의적으로 낮추고, 콩팥에서의 축적도 유의적으로 줄이는 것을 확인할 수 있었음. 그러나 외부의 자극에 가장 민감한 뇌영역인 해마에서의 축적은 큰 감소를 나타내지 못했음. 해마에서의 산화적스트레스는 납, 카드뮴, 수은 등의 중금속에 의해서 유의적으로 증가하였으며, 레몬추출물, 황칠나무 잎 추출물, 황칠나무 줄기추출물의 투여에 의해서 산화적스트레스가 다소 감소하는 것을 확인할 수 있었음. 또한 수은을 제외하고 납, 카드뮴의 투여에 의해 감소된 항산화효소의 해마내 수치를 증진시킴을 확인할 수 있었음. 중금속배출, 항산화효소의 증가, 산화적스트레스의 감소는 황칠나무 잎 추출물 및 황칠나무 줄기 추출물에서 현저한 효과가 관찰되었으며, 레몬추출물의 경우 이러한 효능이 다소 낮게 관찰되었음. **In vitro**와 **in vivo** 결과를 종합하고, 경제성을 고려하였을 때, 황칠나무 잎 추출물이 가장 우수하게 판단되어 황칠나무 잎 추출물을 이용하여 임상시험을 진행하였음. 60명의 피시험자를 모집하여 30명에게는 위약을 30명에게는 황칠나무 잎 추출물을 투약하였으며, 모든 과정은 이중맹검법에 의해 진행되었음. 그 결과 황칠나무 잎 추출물이 카드뮴, 수은의 배출을 촉진시켰으며, 대표적인 항산화효소인 **superoxide dismutase**의 활성을 증진시키는 것으로 확인되었음. 이러한 연구결과를 바탕으로 황칠나무를 대상으로 한 개별인정을 위한 자료 검토에 있음.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

해외에서부터 일명 ‘레몬디톡스’라는 중금속 배출 개념이 들어 왔으나, 이보다 효능이 훨씬 뛰어난 황칠나무 추출물에 대한 연구결과는 **BMC Complement Altern Med**에 2014년 10월에 발표하였음. 황칠나무 추출물의 산화적 손상 억제에 대한 논문은 **J Med Food**에 2014년 11월에 투고하였음. 황칠나무 잎 추출물의 동물실험결과와 임상시험결과를 한꺼번에 합쳐서 현재 논문을 작성 중에 있으며, 이러한 자료를 **SCI**급 잡지에 투고할 예정임. 이를 통해 자생영역이 매우 제한적인 황칠나무의 우수성을 알리고, 중금속 배출 관련 제품화를 진행하여 국내 식물의 우수성을 널리 알리며, 농가의 수익 증대를 기대함. 본 연구결과를 토대로 자체적으로 제품화를 진행하며, 기존 자사에서 유지되고 있는 **ODM** 및 **OEM** 제품화 경로를 통하여 시장에 진출할 예정임.

SUMMARY

I. Title

Development and products for heavy metal release, antioxidant effects form lemon, *Dendropanax morbifera*

II. Purpose and Significance of the Study

The detoxification covers from secretion of heavy metals and antioxidant. The market size for detoxification (especially lemon detoxification) is increasing, but there are few scientific data for its effects and safety. In addition, there are health supplement for excretion of heavy metals including lead, cadmium and mercury. *Dendropanax morbifera* has been focused in recent years for functional foods because this plant is only grown in southwest part of Korea. Development of the health supplement for heavy metal excretion appears to be the most useful and alternative approach of detoxification in body. In addition, the commercialization of *Dendropanax morbifera* extracts increases the incomes of farmer and raises the statue of Korea.

III. Contents and Scope of the study

In order to develop a natural health supplement for heavy metal excretion and antioxidants, animal experiment and human study was performed. The ultimate goal of this study is the development of proto-type product with scientific evidence which will be launched in the market.

First of all, we observed the safety of lemon and *Dendropanax morbifera* extracts based on microbiological test as well as short-term and long-term toxicity test in rats. Secondly, we investigated the effects of lemon and *Dendropanax morbifera* extracts on heavy metal excretion, kidney accumulation, hippocampus accumulation, and the status of oxidative stress and antioxidants in the hippocampus. Third, we developed proto-type of *Dendropanax morbifera* leaf extracts and conducted the human study with 60 people to observe the effects of *Dendropanax morbifera* leaf extracts on heavy metal excretion and the status of oxidative stress and antioxidants in serum.

IV. Results

To collect basic data for the development of a health supplement, we firstly found the standard compounds test of some functions materials in lemon and *Dendropanax morbifera* extracts. We observed the strong antioxidant effects of *Dendropanax morbifera* extracts using ESR spectroscopy compared to that in the lemon extract. In addition, we did not find any cytotoxicity and single or repeated (13 weeks) toxicity of lemon and *Dendropanax morbifera* extracts. In in vitro study, *Dendropanax morbifera* leaf extracts modulated the IL-1 β , IL-6, mitogen-activated protein kinases and c-Jun N-terminal kinases in lipopolysaccharide-induced oxidative stress conditions. In in vivo study, the administration of lemon and *Dendropanax morbifera* extracts with lead, cadmium and mercury to rats for 4 weeks significantly reduced the serum levels of heavy metals, accumulation of heavy metals in kidney, but not in hippocampus. However, the administration of lemon and *Dendropanax morbifera* extracts significantly reduced the lipid peroxidation induced by heavy metals and increased the antioxidants including superoxide dismutase and catalase in the hippocampus. These effects were most prominent in the *Dendropanax morbifera* leaf extract compared to that in the lemon or *Dendropanax morbifera* stem extract. We conducted human study with 60 people (30 placebo and 30 *Dendropanax morbifera* leaf extract). In human study, the supplementation of placebo or *Dendropanax morbifera* leaf extract for 2 months facilitated the excretion of cadmium and mercury in serum and significantly increased the superoxide dismutase levels in the hippocampus.

V. Research result and Expectancy effects

We published the data from the effects of *Dendropanax morbifera* extracts on heavy metal excretion and antioxidants in cadmium exposed rats in October 2014 in BMC Complement Altern Med. In addition, we submitted the manuscript about the effects of *Dendropanax morbifera* extracts on oxidative stress in November 2014 to J Med Food. We plan to contribute this data to SCI-magazine with the results of experimental animal and human. This allows to inform the excellence of the *Dendropanax morbifera* extracts which are grown in very limited areas in South Korea. In addition, the commercialization of *Dendropanax morbifera* extracts increases the incomes of farmer and raises the statue of Korea. Proceed to commercialize the results of this study, based on its own, is scheduled to enter the market through the ODM and OEM commercialization path is being maintained in the company.

CONTENTS

Chapter 1. Overall view of this R&D project	11
§ 1. Needs for R&D	11
1. Status of market about heavy metal research	11
2. Commercialization of functional foods about detoxification	13
3. Excretion of heavy metal using lemon	14
4. Excretion of heavy metal using dendropanax	15
§ 2. Goals and contents of R&D	16
1. Final goals of R&D	16
2. Contents of R&D	16
Chapter 2. Status of domestic and foreign technology	19
§ 1. Status of domestic technology	19
§ 1. Status of foreign technology	20
Chapter 3. Contents and Results	22
§ 1. Results	22
1. Manufacturing lemon and dendropanax extract	22
2. Analysis of Standard compounds	23
3. Safety test	25
4. Cytotoxic test	25
5. Inhibition of NO release	26
6. Scavenge of reactive oxygen species	29
7. Assay of cytokines and signal transduction	32
8. Single and repeated toxicity test in rats	34
9. Serum and tissue accumulation of heavy metals	42
10. Oxidation in hippocampus	47
11. Antioxidant enzymes in hippocampus	62
12. Prototypes of dendropanax extract	65
13. Human study using prototype	72

Chapter 4. Goal Attainment and contribution	85
Chapter 5. R&D performance and its application plan	86
Chapter 6. Overseas Science & Technology Information	88
Chapter 7. References	90

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	11
제 1 절 연구개발의 필요성	11
1. 중금속 관련 연구개발 시장의 현황	11
2. 디톡스 관련 건강기능식품 제품화	13
3. 레몬을 통한 중금속 배출 (레몬디톡스 제품)	14
4. 황칠을 통한 중금속 배출	15
제 2 절 연구개발의 목표 및 내용	16
1. 연구개발의 최종목표	16
2. 연구개발 내용	16
제 2 장 국내외 기술개발 현황	19
제 1 절 국내기술개발 현황	19
제 2 절 국외기술개발 현황	20
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	22
제 1 절 연구수행 결과	22
1. 레몬 및 황칠추출물의 제조	22
2. 레몬 및 황칠추출물의 지표성분 분석	23
3. 레몬 및 황칠추출물의 안전성 확인	25
4. 레몬 및 황칠추출물의 세포독성 확인	25
5. 레몬 및 황칠추출물의 NO 방출 저해 작용	26
6. 레몬 및 황칠추출물의 활성산소 제거능 확인	29
7. 황칠나무 잎 추출물의 산화적 스트레스 및 생존 영향	32
8. 레몬 및 황칠나무추출물의 독성 평가	34
9. 레몬 및 황칠나무추출물의 중금속 배출 효능 평가	42
10. 레몬 및 황칠나무추출물의 해마에서 산화적 스트레스, 항산화 효능 평가	47
11. 레몬 및 황칠나무추출물의 항산화효소 평가	62
12. 황칠나무 잎 추출물의 시제품 제작	65

13. 황칠나무 잎 추출물의 임상시험평가	72
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	85
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	86
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	88
제 7 장 참고문헌	90

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 필요성

◆ 연구 개발의 목적: 현재 레몬을 통한 중금속 배출 관련 상품(레몬디톡스)상품의 규모가 점차 증가하고 있는 반면, 그 효능 및 안전성의 구명은 미미한 상태이다. 본 연구를 통하여 레몬의 중금속 배출 효능 및 안전성을 확보하며, 또한 본 연구에서 신규로 다루고자 하는 후보원료인 황칠나무의 추출물을 중금속 배출 효능을 검증하여 레몬추출물과 그 효능을 비교, 우수한 원료에 대하여 중금속 배출 관련 제품을 개발하여 시장에 진입, 이로 인하여 기업 및 농가의 수익을 창출하고자 한다.

1. 중금속 관련 연구개발 시장의 현황

▶ 급격한 산업발전은 경제적, 사회적 발전을 가져왔지만, 이는 중금속 및 환경호르몬이라 일컬어지는 내분비교란물질 등의 다양한 유해물질을 배출함으로써 환경을 오염시켰다. 이러한 현상에 편승하여 식품의 제조, 가공, 조리 과정중의 오염물질 노출 가능성도 높아졌다. 이에 따라 선진 각국과 OECD 등은 오염물질에 의한 생태계의 변화를 연구하고 내분비계 장애물질 시험, 평가업무 등을 수행하고 있다. 하지만 이러한 노력에도 불구하고 오염원의 종류는 그 다양성과 농도가 증가하고 있는 추세이다. 우리나라는 1985년부터 국립보건원의 식품 내 중금속 조사연구가 이루어지고 있지만 이는 현황 파악에 그치고 있으며 근본적인 해결책은 찾지 못하고 있다.

▶ 2002년 WHO의 조사에 근거한 보고서에 의하면 2000년 기준 세계 60억 인구 중 알츠하이머성 치매환자는 3,700만명, 뇌졸중 환자는 4,100만명으로 보고되었다. 뇌질환의 연구가 가장 활발하다고 할 수 있는 미국의 경우 2000년 PhRMA의 보고서에 의하면, 뇌졸중, 알츠하이머성 치매, 파킨슨병 환자 수는 약 9백만명이며, 이로 인한 의료경비는 200조원으로 예측하였음. 하지만 2030년경에는 전 세계적으로 65세 이상의 노령인구가 두 배 가량 늘어날 것으로 전망되며, 노인성질환인 뇌졸중, 알츠하이머성 치매, 파킨슨병 등의 환자의 수도 배로 늘어날 것으로 전망하고 있다.

수산물 섭취에 따른 체내 수은 현황
(부산시민 175명 단위:ppb)

	평균	최고
먹지않는다	4.19	7.37
주 1회 이하	8.91	28.16
주 2-3회	9.97	44.10
주 4-5회	10.55	17.63
매일 먹는다	13.88	45.81

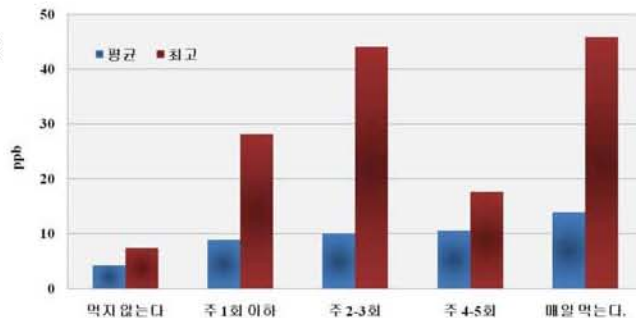


그림 1. 부산지역 시민의 혈액 내 수은농도 측정결과
(동아의대 예방의학과 수은연구실, 2009년)

그림 1.은 부산지역 시민 175명을 대상으로 체내 수은현황을 조사한 결과이다. 수은의 양이 15ppb를 초과한 '고위험군'이 14% (25명)에 달하였다.

▶ 한국 주요 도시의 대기오염도는 아황산가스인 경우 70년대에 급속히 악화되어 서울은 1977년부터 부산, 인천, 대구는 1985년 이래 1990년까지 환경기준인 0.05ppm을 웃돌았다. 대구·울산 등의 대도시는 환경기준을 초과하고 있으며, 서울을 비롯한 기타 대도시는 겨울철에 환경기준을 초과하고 있는 실정이다. 또한 주요 하천인의 오염도 악화되고 있음을 알 수 있다. 4대강 수계의 수질은 2급(BOD 2ppm 이하) 상수원수 내지 이보다 악화된 상태이다. 주요 항구 연해 해수의 오염도 또한 수산생물 서식에 적합한 1등급 (BOD 1ppm 이하) 환경기준에 못 미친다.

▶ 중금속은 철, 아연, 구리 등 인체에 필요한 물질이나 납, 수은, 카드뮴 등은 생물체에 유해할 뿐만 아니라 체내에서 대사되지 않고 축적되는 특징을 가지고 있다. 유해중금속이 체내에 축적되면 호르몬 대사 및 혈관 축적에 영향을 주어 고혈압, 당뇨병, 암 등의 원인이 되고 태아 성장에 바람직하지 않은 영향을 미쳐 국민 건강 측면에서 위해성 문제가 제기되고 있다. 인체에 중금속이 노출될 수 있는 경로는 매우 다양하고 개인마다 흡수 및 대사, 노출시간 등이 다르므로 식품 및 환경에서 직접 정량하는 방법이 생체내 노출량을 반영한다고 보기는 어렵다. 또한 저농도 중금속의 지속적인 노출은 생체 내에서 농축이 되고 이로 인해 건강상의 위해로 나타나게 된다.

▶ 납은 주로 자동차 배기가스와 납 제련, 납 정련, 축전기 제조, 색조 제조, 조선 및 선박수리, 자동차 라디에이터 수리, 인쇄업 등의 여러 산업장을 통해 배출되며, 공기, 물, 토양, 분진, 음식물, 농작물, 생활용구 등 환경에 광범위하게 존재하여 일상생활을 통하여도 노출될 수 있다. 체내 납 축적은 빈혈, 신장손상, 복통, 발작, 뇌병증, 마비를 유발한다. 어린이의 경우 혈중 납 수준이 25 $\mu\text{g}/\text{dl}$ 초과시 빈혈 유병이 증가하며, 25 $\mu\text{g}/\text{dl}$ 미만에서도 신경계 발달에 영향을 미친다고 한다. 성인의 경우 저수준 노출에서도 신장기능이 감소되고 혈압증가와 관련이 있다고 하며 혈중 납 수준이 20-60 $\mu\text{g}/\text{dl}$ 에서 인지 및 신경계에 영향을 미친다고 한다. 또한 여자의 경우 유산증가 및 남자의 경우 정자형성이 감소하였다는 보고가 있다. 국제암연구기관(International Agency for Research on Cancer)과 국가독성프로그램(National Toxicology Program)은 납이 발암물질이 될 수 있을 것이라고 제안하기도 하였다.

▶ 수은은 산업장에서 다양한 용도로 이용되어 특히 혈압계, 온도계 등에 사용되며 유기물질의 산화를 돕기 위한 촉매로 쓰이며 자외선 발생을 위한 광원으로도 이용되고 있다. 수은의 독성은 복잡하고 형태, 유입경로, 용량, 노출시 연령 등의 조건에 따라 그 독성의 정도가 결정된다. 환경으로 배출된 수은 특히 유기수은은 생태계의 먹이연쇄과정을 거치면서 농축되는 성질이 있어 농, 축산물, 수산물의 오염원이 되고 있으며 직업적으로 노출된 적이 없는 경우에도 수은에 오염된 지역에 거주함으로써 수은 중독이 발생되어 미량의 수은이라도 장시간 노출시 인체에 유해한 영향을 주는 환경오염물질로 평가되고 있다. 수은은 중추신경계에 특히 영향을 미치나 신장과 면역계에도 영향을 미친다. 체내에 주로 뇌, 간, 신장에 축적되며 특히 신장에서

가장 높은 농도를 나타내며 수은에 의한 신장독성은 매우 잘 알려져 있다. 과량에 급성적으로 노출시에는 심한 폐렴이 생기며 이보다 저농도인 경우는 떨림, 치은염, 신경행동학적 장애, 불안, 기억력 감소, 피로, 거식증, 불면 등의 증세가 있다. 반면 치과에서 사용하는 아말감이 건강에 미치는 영향은 명확하지 않은 것으로 보고 있다. 무기수은은 주로 신경계, 신장계, 구강건강에 영향을 미치고, 유기수은은 신경계증상을 점차적으로 나타낸다. 즉 사지와 입술의 무감각, 보행실조, 청력소실, 근육강직 등을 나타낸다.

▶ 이러한 상황과 더불어 **Well-being** 붐과 함께 건강에 관한 관심이 늘어가면서 오염원의 체외 배출이 가능한 상품인 디톡스 (**Detoxification**)의 요구가 증가하고 있다. 디톡스란 현대인들의 건강 생활에 가장 큰 적인 스트레스와 몸속의 유해물질을 배출, 제거한다는 의미로 최근 들어 생활 습관, 운동, 먹거리 등 일상 곳곳에서 디톡스 라이프를 추구하는 움직임이 활발해지고 있으며 특히 최근 기능성 식품이 크게 떠오름에 따라 디톡스 식품 등의 기능성 식품이 큰 성장을 이루고 있다. 서양에서는 드링크만 마시는 레몬 디톡스 방법이 널리 알려져 있고, 한국에서는 장청소와 단식이 대표적으로 시행되고 있다. 시중에는 당지수 (**GI**)를 낮춘 식빵을 비롯해 체내 유해성분을 중화시키는 것으로 알려진 알로에베라가 함유된 녹차, 노화방지, 노폐물 배출에 효과적인 **EGCG (Epigallocatechin gallate)**가 들어있는 녹차음료 등 디톡스 관련 제품이 개발되어 있다.

2. 디톡스 관련 건강기능식품 제품화

▶ 한편 사회가 발전함에 따라 식품 산업 역시 크게 발전하고 있다. 식품은 단순히 기본역할인 열량과 에너지 공급원기능 이외에 인간에게 맛과 향의 감각을 충족시키는 기능으로 발전해 왔으며 나아가 식품에서 ‘기능성’이 과학적으로 입증됨에 따라 기능성 식품에 대한 관심과 시장규모가 빠르게 증가하고 있다.

표 1. 세계 식품시장 규모 (단위 : 십억\$)

구분	2007	2008	2009	2010
세계 식품시장	4,639.9	4,793.5	4,931.7	5,089.7
유럽	1,987.4	2,027.4	2,058.0	2,096.3
아시아-태평양	1,288.4	1,361.3	1,430.3	1,509.5
북미	816.7	837.6	852.7	869.3
중남미	429.3	443.8	461.8	480.0
중동-아프리카	118.2	123.4	128.8	134.5

*출처 : Datamonitor interactiver consumer database 2011. Food, Alcoholic beverages, Non-alcoholic beverages, Tobacco, FIS 식품산업통계정보

▶ 이와 함께 국내에서 기능성 식품으로 가장 큰 시장을 가지고 있는 제품분야는 인삼 가공 분야이다. 예로부터 ‘오장육부의 양기가 부족한 데 쓰고, 정신을 안정시키고 기억력을 좋게 하며, 허약하고 손상된 몸을 보강 한다’고 알려져 사람의 생기를 살리고 오장에 두루 좋은 명약

으로 알려져 있으며 또한 식품의약품안전처에서는 피로회복과 면역력증진, 기억력 개선 등의 효능을 인정받아 건강기능식품으로도 큰 시장을 형성하고 있으며 매년 증가추세이다.

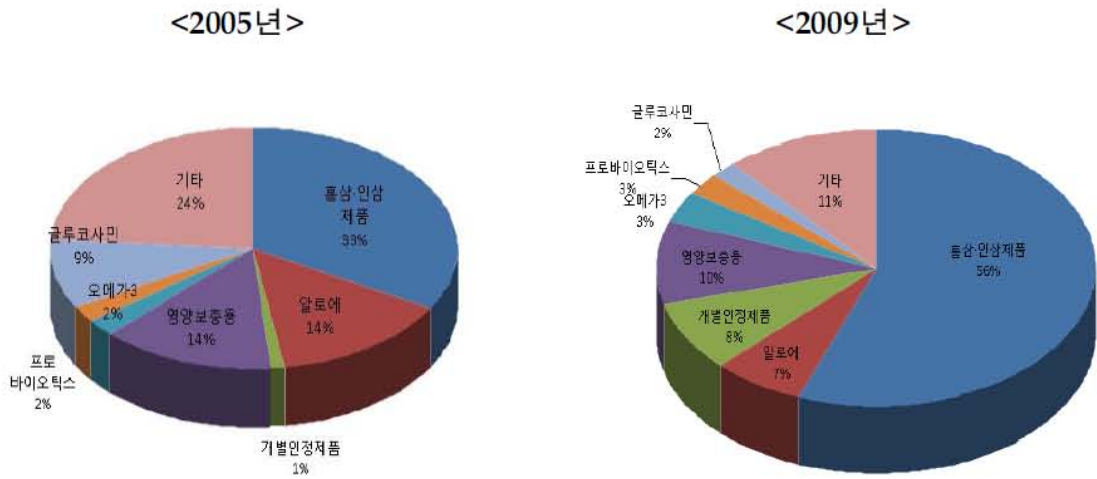


그림 2. 기능식품 제품 유형별 매출액
(출처 : 식품의약품안전처, 국내의 식품산업 모니터링 2011)

▶ 인삼 가공식품에서 기능적, 마케팅적으로 가장 유효한 성분은 사포닌이다. 현재 예로부터 천연 한약재 및 도료, 왕실의 건강식품으로도 사용되어진 황칠나무 추출물이 세계 규격 표준화에 성공함으로써 그 관심이 높아지고 있다. 황칠나무의 학명은 'Dendropanax morbifera', 그리스 어원으로 만병통치약이라는 뜻이다. 황칠나무는 국내 단일 품종이며 추출물에 사포닌이 함유되어 있다고 보고되어 인삼과 함께 디톡스 식품으로 관심이 집중되고 있다.

▶ 국내에서는 많은 디톡스 제품이 시중에 판매되고 있으나 이에 대해서 학술적 근거가 매우 부족한 실정이며 제품의 대부분을 수입하는 현황이다. 때문에 본 사업에서는 현재 나와 있는 디톡스 제품 중 가장 큰 시장을 형성하고 있는 레몬을 활용한 디톡스와 함께 디톡스 제품 상업화에 유리하다고 판단되는 황칠나무 추출물을 디톡스 후보원료로 선정하며, 각 후보 원료의 디톡스 효능의 검증과 함께 제품화를 진행하여 보다 안전하며 효과 있는 디톡스 제품을 개발하려 한다. 또한 레몬의 경우 레몬에 국한 하지 않고, 오렌지 감귤 등의 감귤류 등으로 확대 분석하여 감귤류 추출물에 대한 디톡스 효능을 평가하고자 하였다.

3. 레몬을 통한 증금속 배출 (레몬디톡스 제품)

▶ 가장 최근에는 디톡스를 통한 다이어트 효과를 기대하면서 레몬 디톡스의 인기가 높다. 하지만 레몬 디톡스의 인기를 바탕으로 여러 업체에서 과학적 근거가 없는 검증받지 못한 제품의 출시로, 재료 및 유효성분의 함량미달 등에 의한 디톡스 효과를 기대할 수 없는 상황이다.

▶ 레몬 추출물 (에센셜 오일) 감귤류 원료에 있어서 현재 가장 큰 디톡스 시장을 가지고 있는 레몬의 에센셜 오일에 대하여 확인한 결과 아래(표 2)의 성분을 함유하고 있는 것을 확인하였다.

표 2. 레몬추출물의 성분 분석 (이현주, 2006)

성분	함량 (%)
Limonene	66.57
β-pinene	10
γ-terpinene	9.95
sabinene	1.60
α-pinene	1.95
myrcene	1.59
geranial	1.17
neral	0.87
β-bisabolene	0.59
neryl acetate	0.53
trans-α-bergamotene	0.43
Heranyl acetate	0.35
Terpinolene	0.29
α-terpineol	0.12

추출물의 성분을 확인한 결과 **limonene, sabinene, myrcene** 등 이노작용을 할 수 있는 성분을 다량 함유하고 있으며, 본 성분 등을 함유하는 감귤계 추출물에서 중금속 및 노폐물 배출에 유효할 것으로 기대된다.

4. 황칠을 통한 중금속 배출

▶ 황칠나무는 잎 추출물에서 **Selinene** 등 다량의 테펜류 화합물이 확인되었으며, 녹차와 비슷한 높은 항산화 효능을 가지고 있음을 확인하였다. (문창고, 황칠나무 추출물의 항산화 기능성 연구, 2006) 이는 카드뮴 및 수은등의 세포독성에 있어서 세포의 산화적 손상을 유발한다는 보고가 있어 이러한 항산화 기능성의 확인은 중금속에 의한 세포손상의 방어기전에 유효한 작용을 할 수 있을 것으로 기대된다.

▶ 황칠나무 추출물의 정향성분에 있어서 (표 3)의 성분을 확인하였다. 황칠나무 추출 성분 중에서 높은 함량을 가지는 **Selinene, Cadinene** 등의 성분은 우울증완화, 진정제 등의 약리효과가 보고되어 있어 복합적 약리작용도 기대할 수 있다.

표 3. 황칠나무 추출물의 정향 성분 분석 (최용환, 2006)

성분	함량 (%)
β -Selinene	24.617
(-)- α -selinene	23.494
δ -Cadinene	15.518
α -Elemene	13.512
Germacrene-D	8.764
(-)- β -Elemene	6.258
r-Cadinene	5.520

제 2 절 연구개발의 목표 및 내용

1. 연구개발의 최종목표

▶ 중금속배출 시장의 확대를 인식하여 현재 가장 큰 규모를 차지하고 있는 레몬 및, 신규 중금속 배출 효능의 후보 원료로 기대대는 황칠나무 추출물을 **in-vitro** 및 세포연구, **Rat**를 활용한 동물실험을 통하여 항산화 효능 및 중금속의 산화적 스트레스에 대한 저항, 배출 효능을 검증 및 확인한다. 또한 레몬 및 황칠나무, 단일 혹은 혼합 물질에 대하여 우수한 효능을 나타내는 원료에 대하여 시제품 개발을 진행하며, 체내 중금속의 누적에 가장 큰 영향을 미치는 뇌기능 저하에 대하여 임상시험을 통해 그 보호효과를 확인한다. 최종적으로는 중금속 저항 및 배출에 효능이 있는 레몬 혹은 황칠나무, 그 혼합물에 대한 제품화를 진행하며, 중금속 배출을 통한 체내 산화 방지에 대하여 ‘중금속 배출 및 항산화에 도움을 줄 수 있음’에 대한 개별인정 신청을 진행한다.

2. 연구개발 내용

- 레몬 및 황칠나무 추출물의 확보
 - 부위별, 열수 혹은 주정 추출
 - 지표성분 설정 및 유효성분 분석
- 중금속배출, 항산화 효능 평가 (*in-vitro* 연구단계)
 - 세포독성 평가
 - 항산화능평가
 - 중금속배출관련 세포 인자 확인
 - 동물실험 농도설정근거 마련
- 시제품 개발 진행
 - 제품평가를 통한 제품화 (중금속 배출 관련)
 - 임상시험 진행용 시제품 개발 (중금속 배출 및 항산화 관련)
- 개별인정 신청
 - '중금속 배출에 따른 항산화에 도움을 줄 수 있음'

[주관연구기관] ㈜이주은 김동우박사팀
 원료확보 및 *in-vitro* 단계에서의 효능 연구
 시제품 및 제품개발
 개별인정 신청

- 레몬, 황칠나무 추출물 비임상 독성평가 진행
 - 식약청 '의약품등의 독성시험기준'에 준함
 - 단회투여 독성시험
 - 3개월 반복투여 독성시험
- 중금속 배출 효능 평가 (*in-vivo* 연구단계)
 - 혈액 및 배설물 분석을 통한 중금속 배출 확인
- 항산화 효능 평가 (*in-vivo* 연구단계)
 - 혈액 및 각종 장기에서 활성산소 및 항산화효소 측정

[제 1 협동연구기관] 서울대학교 황인구 교수팀
 원료확보 및 *in-vitro* 단계에서의 효능 연구
 시제품 및 제품개발
 개별인정 신청

- 중금속배출, 항산화력에 대한 임상시험 진행
 - 세부, 협동기관의 상기 연구결과를 통한 IRB 승인 진행
 - 일반인 및 중추신경질환자를 대상
 - 혈액 및 뇨 분석을 중금속 배출 확인
 - 혈액에서 활성산소 및 항산화효소 측정

[제 2 협동연구기관] 한림대학교 문승명 교수팀
 원료확보 및 *in-vitro* 단계에서의 효능 연구
 시제품 및 제품개발
 개별인정 신청

가. 레몬 및 황칠나무 추출물의 확보

- ▶ 레몬 및 황칠나무에 대하여 각 부위별, 열수 혹은 주정 추출 방법 등을 통한 추출물의 확보
- ▶ 지표성분 설정 및 유효성분 분석을 통한 추출 방법 확보

나. 레몬 및 황칠나무 추출물에 대한 항산화 효능 평가

- ▶ 세포독성(MTT Assay)를 통한 추출물의 독성 평가
- ▶ DPPH Assay, ABTS Assay, DNA strand breaks, Analysis of apoptotic cells 방법등을 통한 추출물의 항산화 효능 확인
- ▶ 중금속배출관련 Gene Expression 변화 확인
- ▶ 유효농도 확인을 통한 동물실험 농도 설정 근거 마련

다. 레몬 및 황칠나무 추출물 비임상 독성 평가 진행

- ▶ 단회투여 독성시험
- ▶ 3개월 반복투여 독성시험

라. 동물실험을 통한 중금속 및 후보물질간의 저항 및 배출효능 평가

- ▶ 혈액 및 배설물 분석을 통한 중금속 배출 확인
- ▶ 혈액 및 각종 장기에서 활성산소 및 항산화효소 측정

마. 후보 물질의 중금속 저항효과 및 항산화력에 대한 임상시험 진행

- ▶ 일반인 및 중추신경질환자를 대상으로 임상시험 진행
- ▶ 혈액 및 뇨 분석을 중금속 배출 확인
- ▶ 혈액에서 활성산소 및 항산화효소 측정

바. 시제품 개발 진행

- ▶ 원료 특성 및 마케팅 대상 등을 고려한 제형의 선택을 통한 시제품 개발
- ▶ 시장평 평가를 통한 제품화 진행 (중금속 배출 관련 제품)
- ▶ 임상시험 평가 대상자를 고려한 제형의 선택을 통한 시제품 개발
(임상시험용 제품 개발)

사. 개별인정 신청을 위한 전반적인 자료 수집 및 신청 진행

- ▶ 황칠나무는 식품공전상 제한적 사용 원료 등재
- ▶ 중금속 배출에 따른 중금속의 산화적 영향의 감소에 대하여
'중금속 배출 및 항산화에 도움을 줄 수 있음' 에 대한 개별인정형 진행

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내기술개발 현황

○ 국내는 대부분이 한약재를 이용한 중금속, 특히 수은과 카드뮴을 중심으로 한 배출 작용이나 알코올과 흡연에 의한 세포독성의 완화에 관련된 연구가 진행되고 있다. 국가과제 수행에 있어서도 디톡스 관련 과제는 거의 이루어지지 않은 상태이며, '카드뮴의 해독과 **Metallothionein** 합성에 미치는 식이 **Selenium**의 영향' 카드뮴에 의한 카드뮴의 해독작용 (과학기술부, 1993)'과 '만성 카드뮴 중독 흰쥐에서 카드뮴 축적과 배설에 미치는 **Vitamin E**의 해독효능 및 그 작용기전 (한국학술진흥재단, 개인기초연구지원, 2004)' 이외에는 식품 내 중금속 함량 등의 실태조사가 대부분이다.

○ 2000년 이후에 국내에서 발표된 학술연구결과는 다음과 같다.

- 고삼의 메탄올 추출물에서 HPLC를 통하여 2가지의 성분, **Leachianone A**과 **Sophoraflavone G**를 동정하여 카드뮴에 대한 해독작용을 **MTT assay**와 현미경관찰 등으로 검증하였다. (양희태 등, 한국식품영양학회지, 2002)

- **Nicotine** 및 **dioxin**에 대한 해독효과를 생약재 (삼백초, 흑두, 금은화, 포공령, 감초, 절명자) 40% 에탄올 추출물을 동결건조 한 혼합분말을 **mouse**에 **400mg/주** 투여하여 평가하였다. 생약재 혼합분말의 처리에 의한 마비 및 발작 등의 현상이 완화되었고 간기능도 개선되었다고 보고했다. (박기문 등, 한국식품과학회지, 2003)

○ 레몬

국내 디톡스 시장에서 가장 큰 관심을 받고 있는 분야는 레몬 디톡스 분야이다. 다이어트에 대한 관심과 디톡스에 대한 관심이 맞물리는 동시에 국내·외 유명 연예인들의 레몬 디톡스에 의한 다이어트 성공이라는 사례들이 언론에 발표되면서 일반인들의 관심이 높다. 하지만 레몬 디톡스에 대해서 그 과학적 근거가 부족하여 우려를 표하는 전문가들도 증가하였다. 본 연구를 통한 레몬디톡스 효능에 대하여 효능을 검증 및 체계적인 제품화를 진행함으로써 우수한 효능의 검증된 디톡스 제품을 개발하려 하였음.

○ 황칠나무

- 황칠나무는 예로부터 만병통치약으로 여겨진 식물이다. 황칠나무는 민간요법에서 사용되어져 왔으며 항암, 항균, 면역, 스트레스 등 우수한 효능을 가진 것으로 알려져 왔다. 하지만 황칠나무의 안전성 문제 때문에 실질적으로 황칠나무의 효능을 가지는 제품이 개발단계로 이어지지 못하였다. 하지만 최근 황칠나무의 안전성이 입증됨에 따라 황칠나무를 이용한 약리 제품의 개발이 활발해 질 것으로 판단된다. 본 연구진은 이에 대하여 황칠나무의 디톡스 효능에 중

점을 두고 제품화를 진행 하고자 하였음.

- 황칠나무 추출물 관련 국내 재산권 현황 :

지식재산권명	출원인	출원/등록번호
생리활성이 뛰어난 황칠나무의 종실추출물	제주대학교 산학협력단	등록/10-0663284
항암활성을 가지는 황칠나무 추출물	한구과학 기술연구원	등록/10-0318019
황칠 원액을 이용한 건강음료의 제조방법	황백 외	등록/10-0441645

- 현재 국내에는 항암, 항균, 면역의 방향으로 황칠나무의 약리학적 지식재산권이 진행되어져 있으며, 황칠나무에서 얻은 **rutin**이 파킨슨질환모델 동물에서 **c-Jun N-terminal kinase**와 **p38 mitogen-activated protein kinase** 등의 신호전달계를 활성화하여 도파민세포를 보호한다는 논문이 있음 (Park et al., 2014).
- 한편 종양에 대한 연구에서, 사람의 뼈육골종(osteosarcoma) 세포주를 이용한 연구에서 황칠유래의 **dendropanoxide**가 **extracellular signal-regulated kinase 1 and 2**를 활성화시켜 세포사를 유도한다는 논문이 발표되어 있음 (Lee et al., 2013). 또한 사람의 폐암세포주를 이용한 연구에서 황칠나무 유래의 **oleifolioside B**가 세포사를 유도한다는 보고도 되어 있음 (Jin et al., 2013).

제 2 절 국외기술개발 현황

○ 일본과 중국은 자생식물 유래의 성분을 이용한 중금속, 내분비교란물질(환경호르몬) 등의 연구가 **in vitro**와 **in vivo**에서 연구되어지고 있다.

- 애기똥풀 잎추출물을 클로렐라의 추출물과 **chelidonine alkaloid** 가 카드뮴으로 유래된 콩팥 독성을 줄여준다는 것을 확인 (Koriem et al., 2013)
- 클로렐라의 추출물을 **MeHg**를 섭취시킨 마우스에 3주간 투여하여 해독작용을 확인하였다. (Uchikawa 등, The Journal of Toxicological Sciences, 2011)
- 납, 카드뮴, 니켈 등의 중금속이 오렌지의 껍질의 물추출물의 처리에 의하여 해독되는 기작을 밝혔다. (Feng 등, Journal of Hazardous materials, 2010)
- 곱팡이 유래 물질로 내분비 교란물질인 **Bisphenol A**와 **Nonylphenol**의 해독작용 규명하였다. (Saito 등, Journal of Bioscience and Bioengineering, 2004)
- 식물유래 펩타이드와 **phytochelatin**을 이용한 카드뮴의 해독작용을 **MAPKs pathway**에서 규명하였다. (Takagi 등, Journal of Biochemistry, 2002)

○ 디톡스 치료의 개념을 만들어낸 미국 등의 서구의 연구에서는 **modified citrus pectin (MCP)**의 우수한 **chelation** 작용에 주목하여 해독작용을 연구하고 있고 약품 등의 상품화도 이루어지고 있다. 또한 항산화 작용, 특히 **glutathione**과 연계된 해독작용에 대한 연구도 활발히 이루어지고 있다.

- 식물에서의 **glutathione**을 매개로한 해독작용의 메커니즘이 규명되어져 있다. (Dixon 등, **Current Opinion in Plant Biology, 1998**)
- 식이 **flavonoids**에 의한 **Xenobiotics** (생체이물) 배출과 **Carcinogen** (발암물질) 억제대사의 기전연구가 상당히 진전되어있는 상태이다. (Moon 등, **Toxicology in Vitro, 2006**)
- **ester**화 된 레몬 유래의 **carboxyl group**을 가진 물질의 카드뮴, 크롬, 구리, 니켈, 납, 아연 등과 결합 메커니즘과 강도를 규명하였다. (Arslanoglu 등, **Journal of Hazardous materials, 2009**)

제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과

제 1절 연구수행 결과

1. 레몬 및 황칠추출물의 제조

본 연구에 사용된 황칠은 농업회사법인 (주)황칠코리아에서 공급받았으며, 레몬은 제주레몬 업체에서 공급받았으며, 황칠의 경우 잎과 줄기를 분리하여 사용하였음.

○ 열수추출

레몬 및 황칠나무 줄기, 잎 부위의 이물질을 제거한 뒤 환류(refluxing) 추출장치를 사용하여 가열은 항온수조 100°C에서 4시간을 조건으로 하였다. 그 뒤에 샘플을 원심분리하여 상등액 (supernatant)만을 취하여 동결 건조를 하여 분말을 제조하여 사용하였음.

Table 1. 열수추출 수율

구분	황칠나무 줄기	황칠나무 잎	레몬
수율	34%	28%	24%

○ 에탄올추출

레몬 및 황칠나무 줄기, 잎 부위를 정제수로 이물질을 제거한 뒤에 80°C의 열풍건조기 내에 48시간동안 방치하여 수분을 제거하였음. 그 후 파쇄한 뒤 각 원료를 칭량하고 질량의 7배의 주정에탄올에서 초음파 처리를 한 후 7일간 침지시켜(Fig. 1) 추출하였고, 여과지로 여과한 후 여과액을 회전식 진공 증발기로 감압 농축하여 건조시켜 분말화하여 사용하였음.



레몬 추출물



황칠나무 잎 추출물



황칠나무 줄기 추출물

Fig. 1 레몬, 황칠나무 잎 및 황칠나무 줄기 추출



레몬 추출물



황칠나무 잎 추출물



황칠나무 줄기 추출물

Fig. 2 본 연구에 사용되어진 에탄올 추출물

Table 2. 에탄올 추출 수율

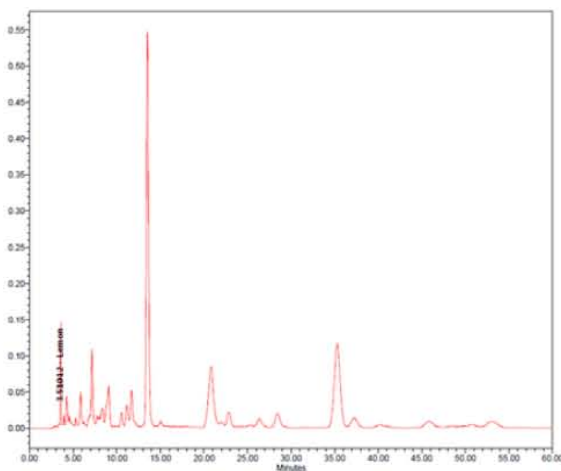
구분	황칠나무 줄기	황칠나무 잎	레몬
수율	36%	30%	26%

2. 레몬 및 황칠추출물의 지표성분 분석

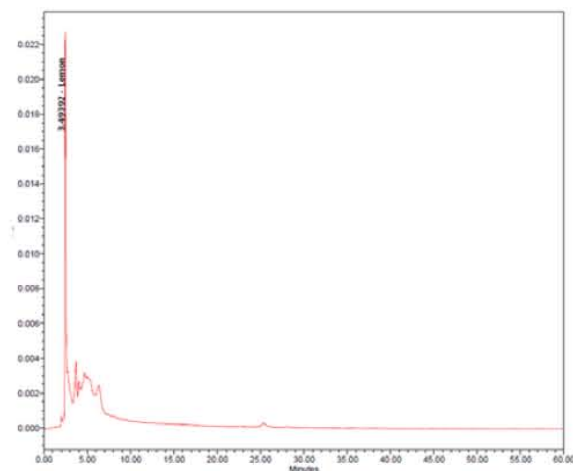
분말화된 레몬과 황칠나무 잎, 줄기 부위의 지표성분 분석을 시행하였다. 레몬 추출물은 **Limonene**, 황칠나무 줄기, 잎 추출물의 경우 **amyrin**으로 확인하였음.

가. 레몬 추출물의 지표성분 분석

레몬 추출물의 10배 중량의 D.W를 첨가한 후 필터링을 하여 HPLC를 이용해 지표성분 **Limonene** 성분을 분석함. 245nm의 흡광도에서 D.W와 ACN의 비율이 각각 56%, 34%인 용매로 하여 선형분석방법을 사용하여 분석하였음.



Limonene 분석 결과

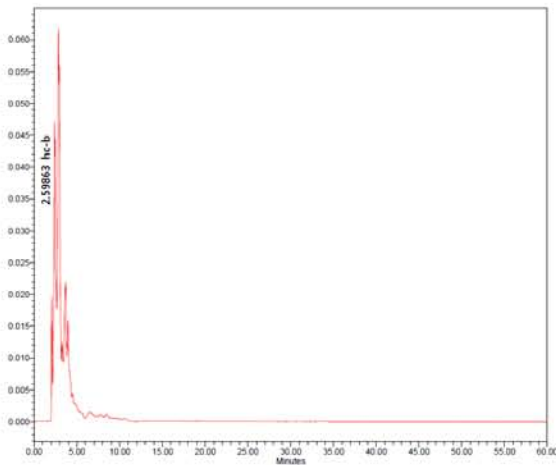


레몬 추출물 분석 결과(RT:3min)

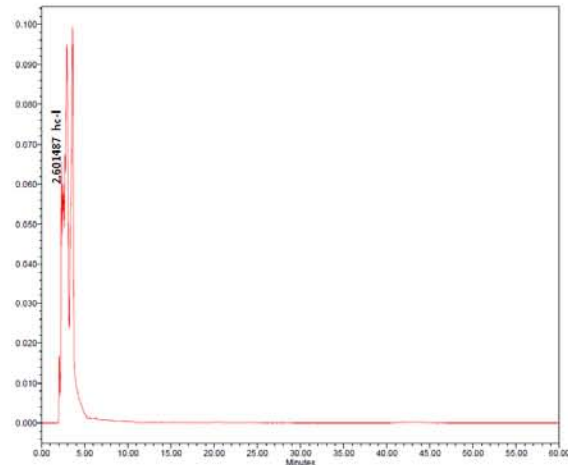
	분석결과	함량
1차	0.49%	0.46%
2차	0.43%	
3차	0.46%	

Fig. 3 레몬 추출물 분석 결과

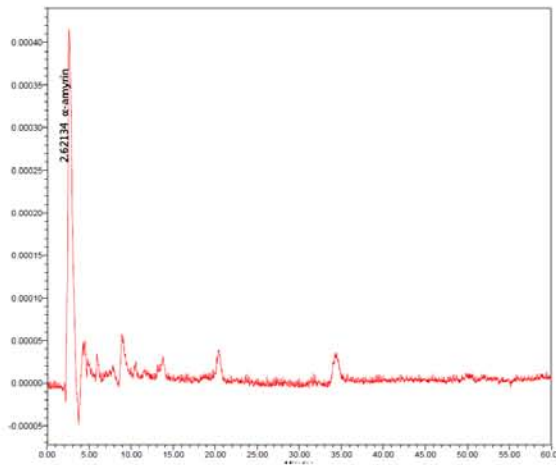
나. 황칠나무 잎, 줄기 추출물의 지표성분 분석



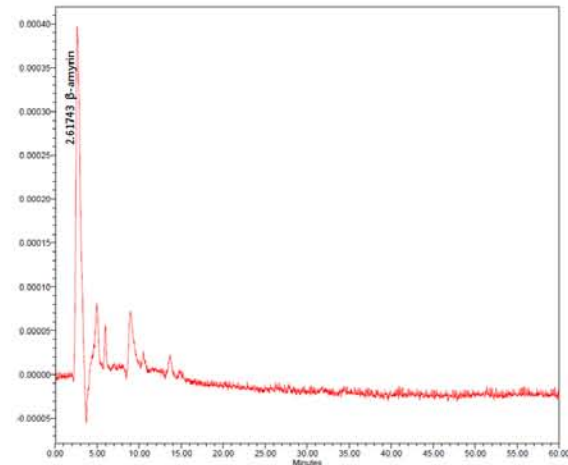
황칠나무 줄기 추출물



황칠나무 잎 추출물



α -amyrin



β -amyrin

황칠나무 줄기	분석결과	함량	황칠나무 잎	분석결과	함량
1차	0.95%	0.92%	1차	0.81%	0.84%
2차	0.90%		2차	0.87%	
3차	0.91%		3차	0.84%	









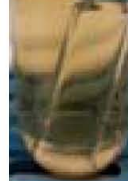



Fig. 4 황칠나무 줄기, 잎 추출물 분석 결과 (RT : 2min)

황칠나무 줄기, 잎 추출물의 10배 중량의 D.W를 첨가한 후 필터링을 하여 HPLC를 이용해 지표성분 α -amyrin, β -amyrin 성분을 분석함. 황칠나무 줄기 와 잎의 경우 거의 비슷한 peak의 DATA를 보였으며, 2종의 amyrin도 역시 비슷한 거의 일치하는 모습을 보였다. 245nm의 흡광도에서 D.W와 ACN의 비율이 각각 56%, 34%인 용매로 하여 선형분석방법을 사용하여 분석하였음. 관련 표준물질에 대한 DATA를 추가로 확보할 것이며, 유통기한 설정에 관한 추가 실험을 진행중에 있다.

3. 레몬 및 황칠추출물의 안전성 확인

레몬, 황칠나무 잎, 줄기 추출물은 모두 건강기능식품으로 사용되어지고 있는 원료들임. 따라서 본 연구를 위해 분말화한 원료들이 미생물 및 중금속등에서 안전한지 식품공전에 따라 시행을 하였음.

Table 3. 미생물 안전성 확인

구 분	레몬	황칠나무 잎	황칠나무 줄기
bacteria group			
fungus group			
bacillus group			
coliform group			

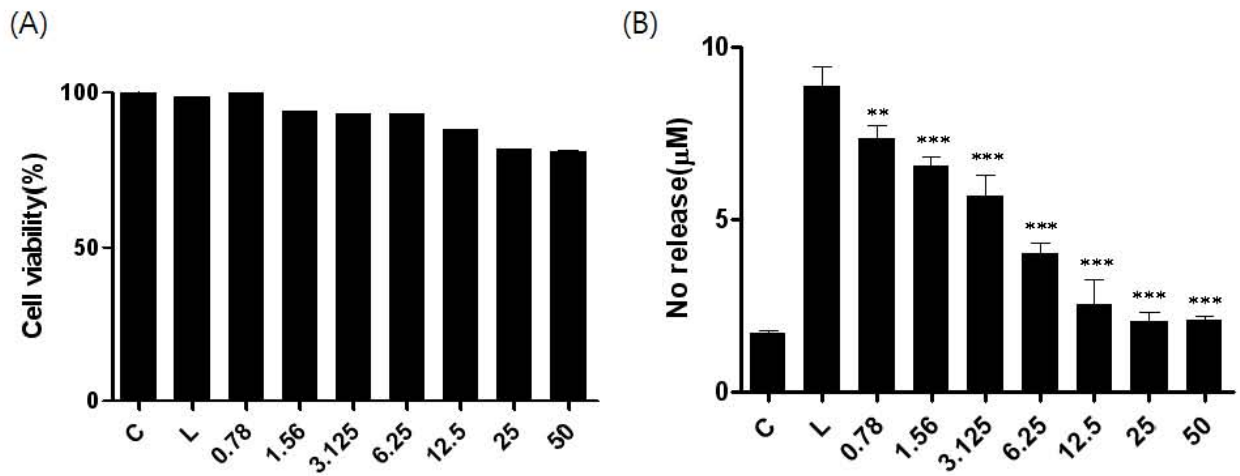
시험결과 bacteria, fungus, bacillus, coliform에 대하여 모두 불검출로 확인이 되었다. 따라서 본 연구에 사용된 추출물 및 추출방법은 미생물에 대한 안전성이 있다고 판단하게 되었음. 중금속 안전성은 Varian사의 Spectra AA 장비를 이용하여 건식회화법을 따라 시행하였으며, 모두 중금속에 대한 안정성을 확인하였음(data not shown).

4. 레몬 및 황칠추출물의 세포독성 확인

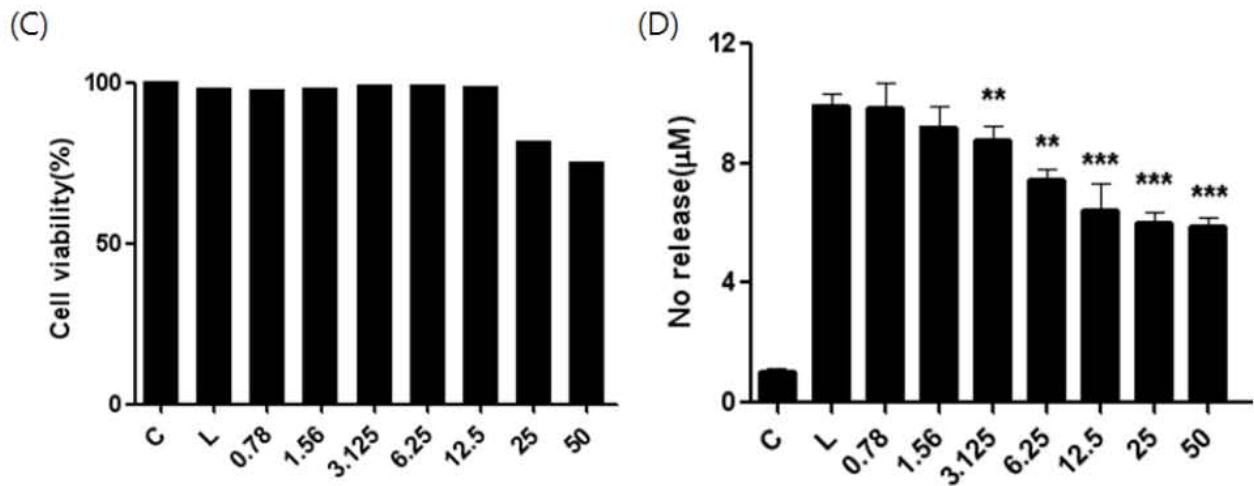
황칠나무 잎, 줄기, 레몬의 주정추출물이 세포 생존에 미치는 영향을 LPS로 자극된 microglia 세포에서 LPS를 포함하여 확인하였다. 세포 독성 검사는 MTT assay를 수행하였으며, MTT 측정 결과 LPS 및 황칠나무 잎, 줄기, 레몬의 주정 추출물 각각 단독으로 또는 같이 처리한 모든 실험군에서 대조군에 비하여 황칠나무 줄기 추출물은 세포 생존율이 변하지 않았으며(Fig. 6A) 황칠나무 잎과 레몬 주정추출물은 최고 농도 50 mg/ml에서 각각 27.38%, 19.61%의 세포독성을 보임을 확인 하였음(Fig. 5A, Fig. 7A). 또한 황칠나무 잎, 줄기, 레몬의 열수 추출물도 주정추출물과 같은 방법으로 세포 독성 검사를 하였으며, 황칠나무 줄기 추출물은 열수 추출물 또한 생존율이 변하지 않았으며(Fig. 6C) 황칠나무 잎과 레몬 열수추출물은 최고농도 50mg/ml에서 각각 25.82%, 17.89%의 세포독성을 나타내었음. (Fig. 5C, Fig. 7C)

5. 레몬 및 황칠추출물의 NO 방출 저해 작용

항염증 효능을 분석하기 위하여 신경염증 유발 인자인 LPS(100ng/ml)로 자극된 microglia 세포에서 생산되는 아질산염(NO)가 농도 의존적으로 저해효능을 보이는지 분석하였다. 아질산염(NO)의 측정은 Griess 시약을 이용한 NO assay를 사용하였다. 황칠나무 잎 주정 추출물을 처리한 세포에서 LPS에 의해서 유도되는 아질산염(NO)은 $8.85 \pm 0.58 \mu\text{M}$ 로 대조군으로 사용한 $1.72 \pm 0.06 \mu\text{M}$ 에 비하여 약 5.2배의 증가를 보였으며, 황칠나무 잎 열수 추출물의 경우에는 $1.14 \mu\text{M}$ 에 비하여 약 8.7배의 증가를 보였다. 실험군으로 황칠나무 잎의 주정추출물을 농도별로 처리한 결과 각각 7.34 ± 0.35 , 6.52 ± 0.27 , 5.7 ± 0.57 , 4.02 ± 0.32 , 2.56 ± 0.72 , 2.05 ± 0.27 , $2.1 \pm 0.1 \mu\text{M}$ 로 아질산염(NO)의 함량이 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인 하였으며, 열수 추출물의 경우도 $9.87 \pm 0.79 \mu\text{M}$, $9.21 \pm 0.67 \mu\text{M}$, $8.78 \pm 0.49 \mu\text{M}$, $7.42 \pm 0.41 \mu\text{M}$, $6.42 \pm 0.87 \mu\text{M}$, $5.98 \pm 0.38 \mu\text{M}$, $5.87 \pm 0.31 \mu\text{M}$ 로 아질산염(NO)의 함량이 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인하였음(Fig. 5B, 5D). 또한 황칠나무 줄기 주정추출물을 처리한 세포에서 LPS에 의해서 유도되는 아질산염(NO)은 $8.68 \pm 0.45 \mu\text{M}$ 로 대조군으로 사용한 $1.82 \pm 0.08 \mu\text{M}$ 에 비하여 약 4.8배의 증가를 보였으며, 황칠나무 줄기 열수추출물을 처리한 경우에는 아질산염(NO)가 $8.23 \pm 0.38 \mu\text{M}$ 로 대조군으로 사용한 $1.07 \pm 0.07 \mu\text{M}$ 에 비하여 7.7배 증가하였음. 실험군으로 황칠나무 줄기 추출물을 농도별로 처리한 결과 각각 8.91 ± 0.98 , 8.79 ± 1.01 , 7.71 ± 0.31 , 7.22 ± 1.01 , 5.69 ± 1.39 , 4.95 ± 1.04 , $1.72 \pm 0.36 \mu\text{M}$ 로 아질산염(NO)의 량이 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인 하였고, 황칠나무 줄기 열수추출물을 농도별로 처리한 결과도 8.12 ± 0.7 , 8.09 ± 0.64 , 7.64 ± 0.42 , 7.42 ± 0.59 , 7.28 ± 0.76 , 6.32 ± 0.54 , $6.11 \pm 0.27 \mu\text{M}$ 로 아질산염(NO)의 함량이 농도의존적으로 감소하였음(Fig. 6B, 6D). 레몬의 주정추출물을 처리한 세포에서 LPS에 의해서 유도되는 아질산염(NO)은 $29.3 \pm 2.54 \mu\text{M}$ 로 대조군으로 사용한 $3.35 \pm 0.41 \mu\text{M}$ 에 비하여 약 8.8배의 증가를 보였으며, 열수추출물을 처리한 세포에서는 LPS에 의해 유도되는 아질산염은 $8.23 \pm 0.42 \mu\text{M}$ 로 대조군으로 사용한 $1.03 \pm 0.1 \mu\text{M}$ 에 비해 약8배의 증가를 보였음. 실험군으로 황칠나무 잎의 주정추출물을 농도별로 처리한 결과 각각 31.75 ± 2.30 , 32.2 ± 2.16 , 25.17 ± 3.09 , 22.87 ± 2.38 , 22.34 ± 2.91 , 22.29 ± 3.12 , $12.64 \pm 1.57 \mu\text{M}$ 로 아질산염(NO)의 량이 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인 하였고, 열수 추출물 또한 8.23 ± 0.78 , 8.12 ± 0.71 , 8.14 ± 0.77 , 7.32 ± 0.78 , 7.03 ± 0.84 , 6.02 ± 0.29 , $5.48 \pm 0.3 \mu\text{M}$ 로 아질산염(NO)의 량이 농도 의존적으로 감소하였음(Fig. 7B).

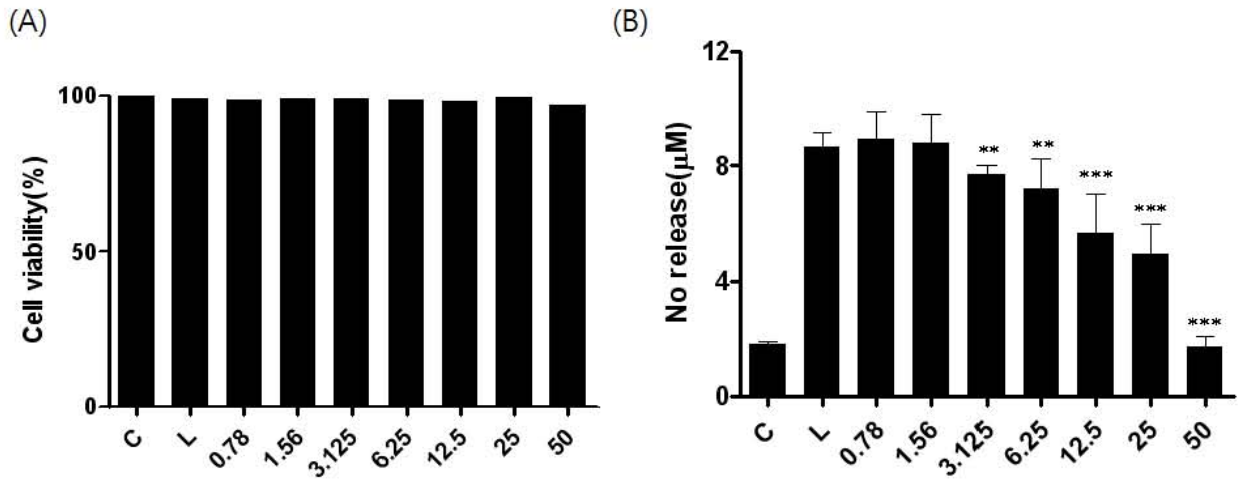


황칠 잎 주정추출물의 세포 생존력 검사 및 NO release 억제능 확인

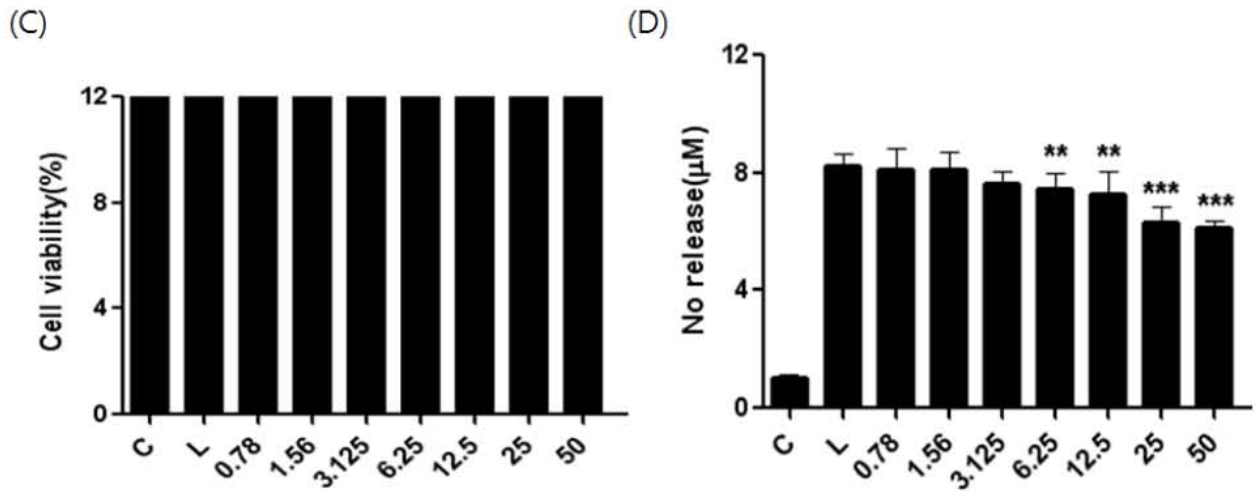


황칠 잎 열수추출물의 세포 생존력 검사 및 NO release 억제능 확인

Fig. 5 LPS로 자극된 **microglia** 세포에서 황칠나무 잎의 주정추출물 및 열수추출물에 대한 세포독성 및 NO방출 저해능 확인. **(A)** 황칠나무 잎 주정추출물이 세포 생존율에 미치는 영향. **(B)** 주정추출물의 NO의 방출 저해 효능. **(C)** 황칠나무 잎 열수추출물이 세포 생존율에 미치는 영향. **(D)** 열수추출물의 NO의 방출 저해 효능.

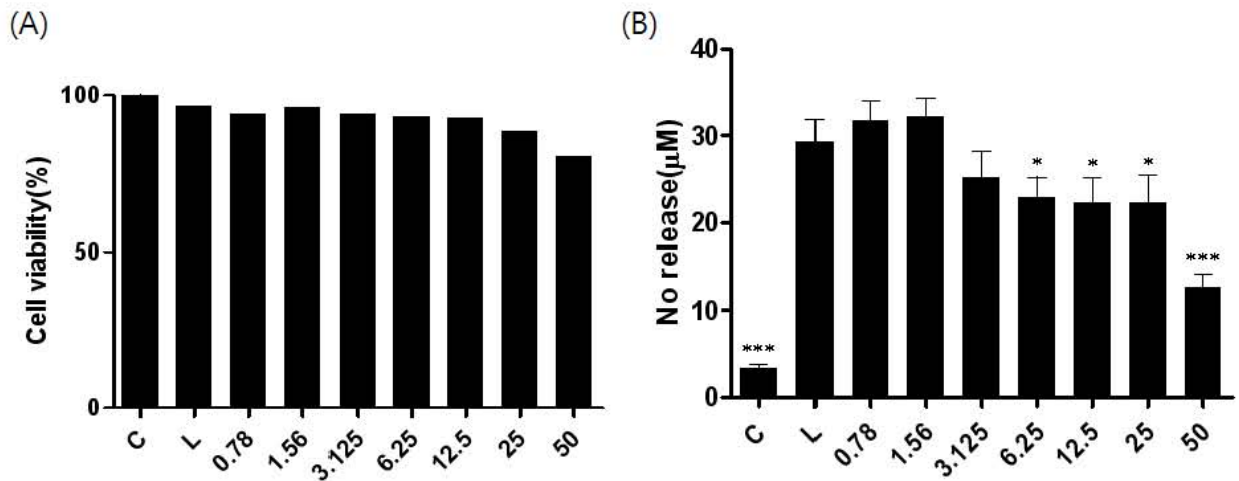


황칠 가지 주정추출물의 세포 생존력 검사 및 NO release 억제능 확인

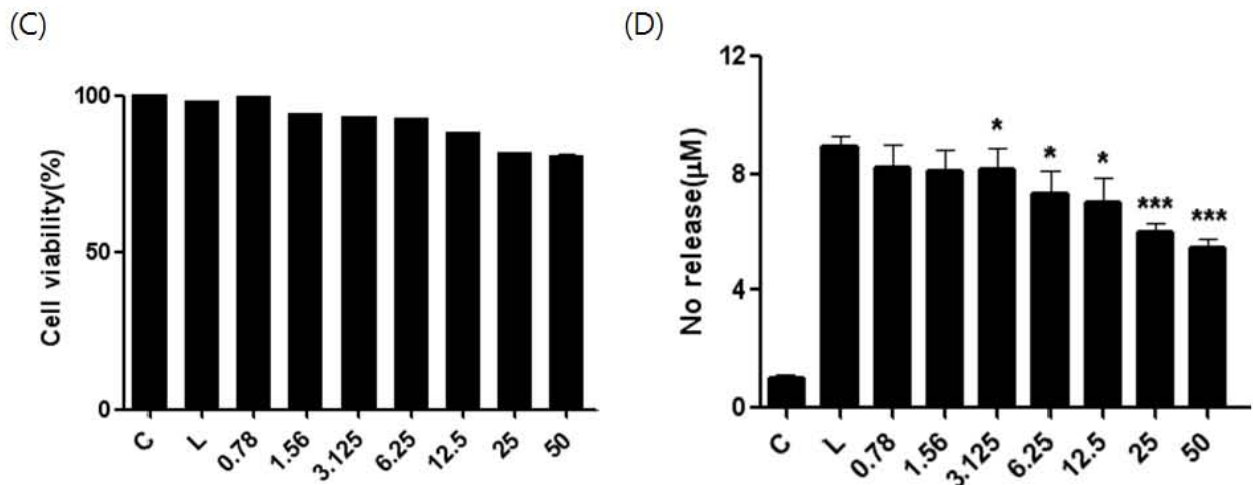


황칠 가지 열수추출물의 세포 생존력 검사 및 NO release 억제능 확인

Fig. 6 LPS로 자극된 *microglia* 세포에서 황칠나무 줄기의 주정추출물 및 열수추출물에 대한 세포독성 및 NO 방출 저해능 확인. (A) 황칠나무 줄기 주정추출물이 세포 생존율에 미치는 영향. (B) 주정추출물의 NO의 방출 저해 효능. (C) 황칠나무 줄기 열수추출물이 세포 생존율에 미치는 영향. (D) 열수추출물의 NO의 방출 저해 효능.



레몬 주정추출물의 세포 생존력 검사 및 NO release 억제능 확인



레몬 열수추출물의 세포 생존력 검사 및 NO release 억제능 확인

Fig. 7 LPS로 자극된 **microglia** 세포에서 레몬의 주정추출물 및 열수추출물에 대한 세포독성 및 NO 방출 저해능 확인. (A) 레몬 주정추출물이 세포 생존율에 미치는 영향. (B) 주정추출물의 NO의 방출 저해 효능. (C) 레몬 열수추출물이 세포 생존율에 미치는 영향. (D) 열수추출물의 NO의 방출 저해 효능.

위의 **cell** 실험의 연구단계에서 독성평가 및 **NO release**를 확인한 결과, 열수 추출물에 비해 주정추출물이 월등히 효과가 좋았음. 따라서 실험비용 절감 및 주정추출물의 실험집중을 위해 이후 실험은 주정추출물을 이용하여 진행하였음.

세포 실험에 의해 측정된 세포독성의 범위는 지속되는 모든 실험들의 독성 범위에 대한 근거가 되는 것을 확인하였음.

6. 레몬 및 황칠추출물의 활성산소 제거능 확인

자유라디칼은 인체 내에서 지질 또는 단백질 등과 결합하여 산화를 일으키기 쉬운데 황칠나무 잎, 줄기, 레몬 추출물의 활성산소 제거능을 확인하기 위하여, **ESR** 스펙트로미터를 이용하

여 자유라디칼 소거능(**free radical scavenging activity**)을 측정하였음.

가. **DPPH radical** 소거능 측정

DPPH는 보라색의 비교적 안정한 자유 라디칼로서 다양한 천연물로부터 항산화 물질을 검색하는데 많이 이용되고 있음. DPPH 라디칼 소거능은 난조 등 (Nanjo et al., 1996)에 기술된 방법을 사용하였음. 구체적으로, 황칠나무 잎, 줄기, 레몬 추출물 **2.0 mg/ml**의 농도를 최고점으로 **1/2**씩 희석해 가면서 DPPH에 넣어준 후 **10초간** 혼합하고, **100 ul** 테플론 모세관에 옮겨 **2분** 후 **ESR** 스펙트로미터로 측정하였음. 이때 측정 조건은 **Central field, 3475 G; modulation frequency, 100kHz; modulation amplitude, 2G; microwave power, 5 mW; gain, 6.3 × 10⁵; temperature, 298 K** 으로 하였다. 그 결과, Fig. 8에서 보는 바와 같이 황칠나무 잎, 줄기 추출물은 **0.125 mg/ml**의 농도에서부터 급격한 **activity**를 확인할 수 있었으며 레몬은 그에 비해 최고 농도인 **2.0 mg/ml**에서의 **activity**가 보이지 않음을 확인하였음. **IC₅₀**은 황칠나무 잎, 줄기 각각 **0.123 mg/ml, 0.3150 mg/ml**이었음(Fig. 8). 이를 통하여 황칠나무의 잎이 DPPH 활성산소의 소거능이 가장 좋은 것을 확인 할 수 있었음.

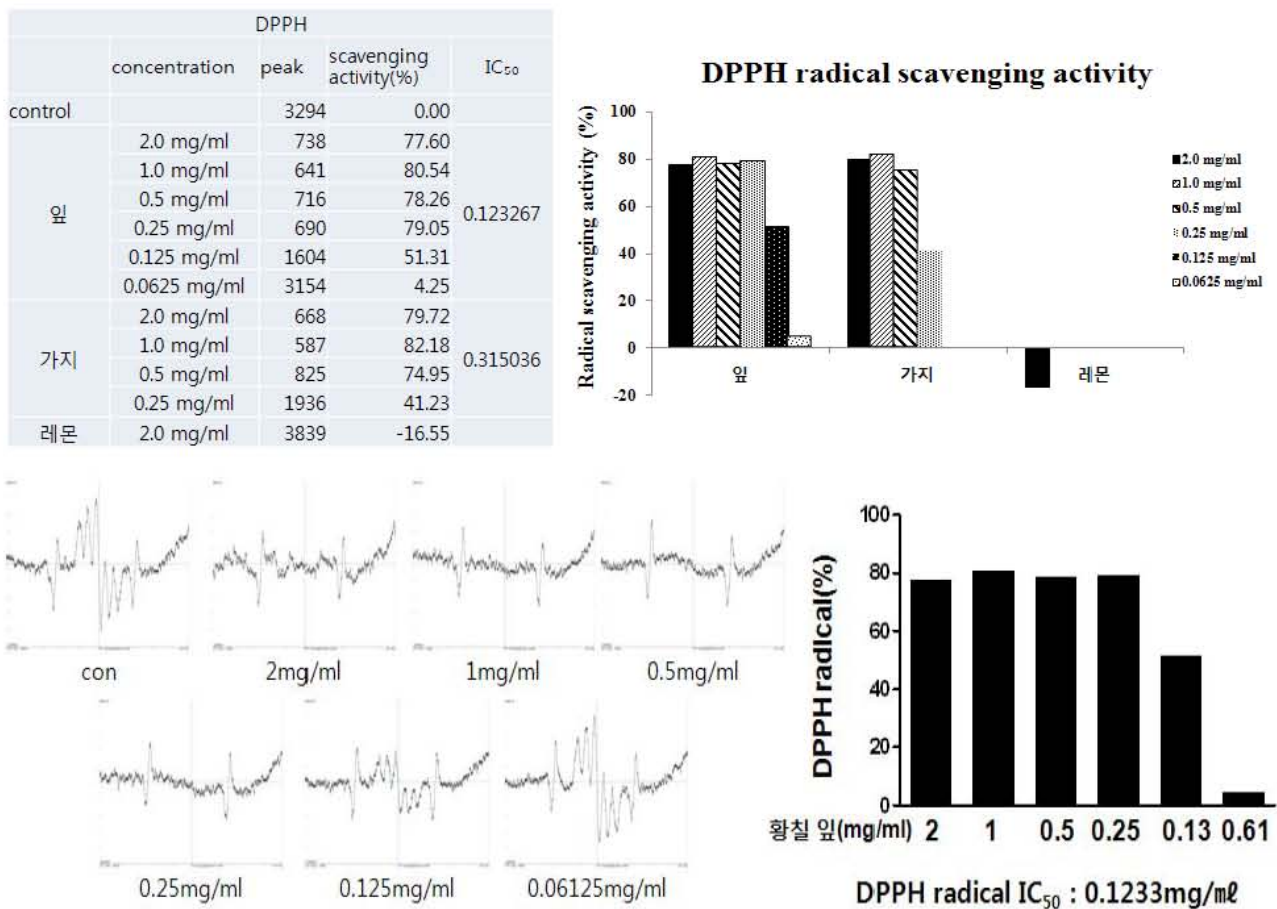


Fig. 8 황칠나무 잎, 줄기, 레몬 추출물의 DPPH radical 활성산소 제거능 확인

나. **Alkyl radical** 소거능 측정

수소탈취에 의해 생긴 **alkyl radical (R·)**은 분자재구성을 통해 **diene** 형태 (파장 **234nm** 부근

에서 흡광도를 나타낸다)로 바뀌고 이것이 다시 산소와 결합하여 **peroxyl radical**을 형성함. 황칠나무 잎, 줄기, 레몬 추출물 **2.0 mg/ml**의 농도를 최고점으로 **1/2**씩 희석하여 **D.W 20 μ l**, 시료 **20 μ l**, **AAPH 20 μ l**, **POBN 20 μ l**를 순차적으로 가한 후 **37 $^{\circ}$ C** 항온수조 (water bath)에서 **30분** 동안 **incubation** 시킨 뒤 **ESR spectrometer**(Jeol Ltd., Tokyo, Japan)로 측정하였음. 이 측정 조건은 **Central field, 3475 G; modulation frequency, 100kHz; modulation amplitude, 2G; microwave power, 10 mW; gain, 6.3 \times 10⁵; temperature, 298 K** 으로 하였다. 그 결과 **Fig. 8**에서 보는 바와 같이 황칠나무 잎, 줄기의 농도에 따라 농도 의존적인 **alkyl radical** 소거능을 확인 할 수 있었으며, 그에 비해 레몬은 최고 농도에서 낮은 활성도를 확인 할 수 있었음. **IC₅₀**은 황칠나무 잎, 줄기 각각 **0.034 mg/ml, 0.044 mg/ml**이었음(**Fig. 9**). 위의 결과와 마찬가지로 황칠나무의 잎에서 가장 좋은 **alkyl** 활성산소의 소거능을 확인 할 수 있었음.

		Alkyl		IC ₅₀
	concentration	peak	scavenging activity(%)	
control		4054	0.00	
잎	1.0 mg/ml	159	96.08	0.034463446
	0.5 mg/ml	242	94.03	
	0.25 mg/ml	398	90.18	
	0.125 mg/ml	573	85.87	
	0.0625 mg/ml	1268	68.72	
	0.03125 mg/ml	2114	47.85	
가지	1.0 mg/ml	267	93.41	0.044632946
	0.5 mg/ml	416	89.74	
	0.25 mg/ml	682	83.18	
	0.125 mg/ml	1219	69.93	
	0.0625 mg/ml	1796	55.70	
	0.03125 mg/ml	2200	45.73	
레몬	1.0 mg/ml	2350	42.03	

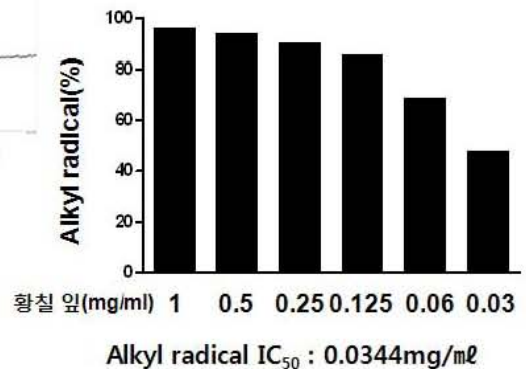
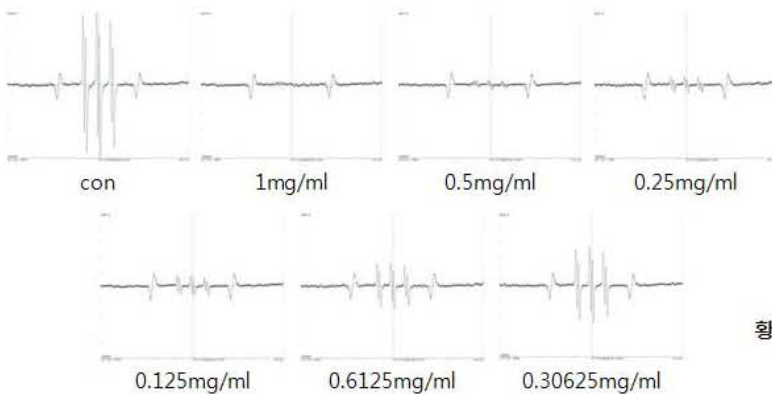
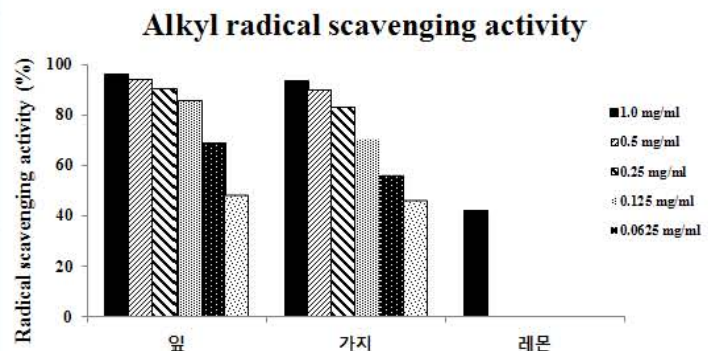


Fig 9. 황칠나무 잎, 줄기, 레몬 추출물의 **Peroxyl radical** 활성산소 제거능 확인

다. Hydroxyl radical 소거능 측정

산소와 수소가 같은 비율로 구성되어 있는 **Hydroxyl radical**은 활성 산소종에서 가장 독성이 심하다고 알려져 있으며, **1/10⁸**의 굉장히 빠른 속도로 최외각전자를 발산시킴. **Hydroxyl**의 측정은 황칠나무 잎, 줄기, 레몬 추출물 시료에 **DMPO (5,5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide)**, **FeSO₄** 및 **H₂O₂**를 **1:1:1:1**의 비율로 차례로 첨가한 후, **10초**간 강하게 교반함. 그 후 반응 혼합물을 **capillary tube**로 옮겨 **ESR spectrometer**에서 측정하였음. 이때 측정 조건은 **Central field,**

3475 G; modulation frequency, 100kHz; modulation amplitude, 2G; microwave power, 1 mW; gain, 6.3×10^5 ; temperature, 298 K (Hyun et al., 2010)하였음. 그 결과 황칠나무 잎, 줄기에서 농도 의존적인 Hydroxyl radical 소거능을 확인할 수 있었고, 레몬의 경우 최고 농도에서 낮은 활성도를 확인할 수 있었음. IC50은 잎이 0.104 mg/ml, 줄기의 경우는 0.159 mg/ml로 확인할 수 있었으며, 황칠나무 잎 추출물에서 가장 좋은 Hydroxyl radical 소거능을 확인할 수 있었음.

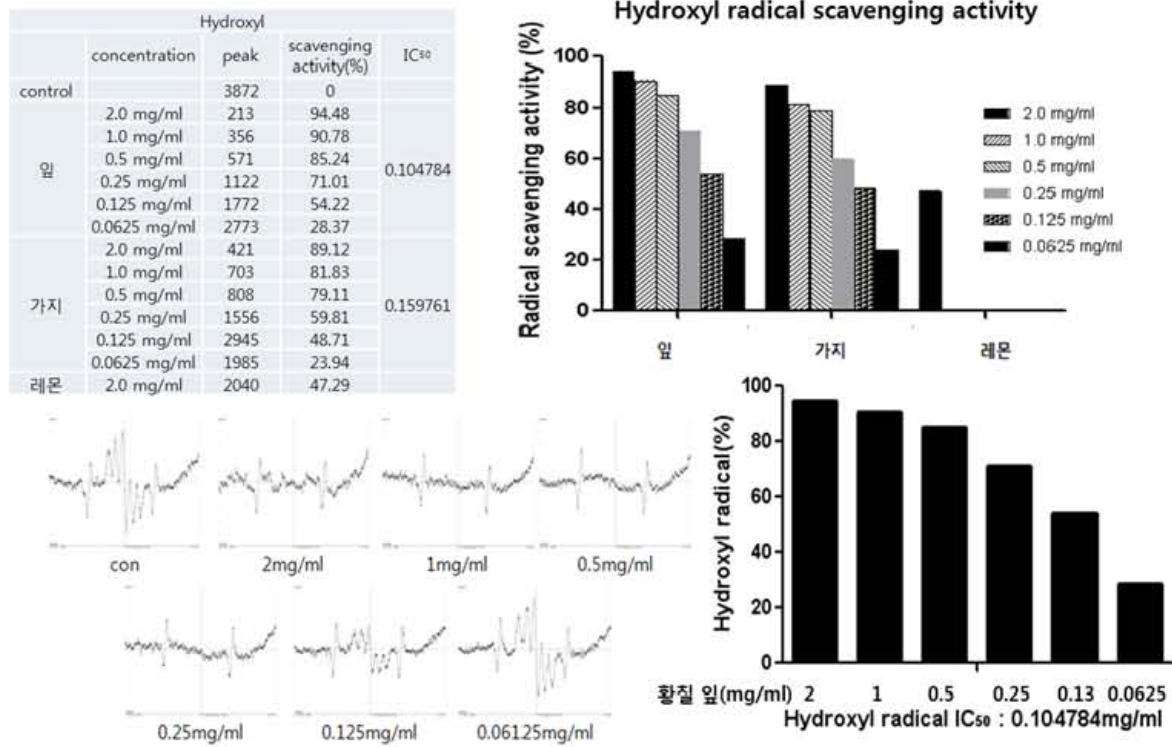


Fig. 10 황칠나무 잎, 줄기, 레몬 추출물의 Hydroxyl radical 활성산소 제거능 확인

7. 황칠나무 잎 추출물의 산화적 스트레스 및 생존 영향

Lipopolysaccharide로 자극받은 cell 에서 황칠나무 잎 주정 추출물의 처리가 세포의 산화적 스트레스 및 생존에 관련된 interleukin cytokine 및 MAPK(mitogen-activated protein kinase) 등의 유전자에서 어떠한 발현 변화를 발생하는지와 더불어 중금속에 의한 세포사멸의 기전 및 후보 원료의 detoxification 작용 기전을 확인하고 있음.

Cytokine 및 MAPKs 에 관련한 실험은 연구비 절감 등의 이유로 선 수행된 실험에서 가장 좋은 효능을 보인 황칠나무 잎 추출물로 실험을 진행하였음.

Interleukin cytokine은 sample을 homogenization 한 후 chloroform으로 phase separation을 시킨 뒤 isopropanol을 이용하여 RNA precipitation을 행하였음. 그리고 75% EtOH로 RNA를 washing을 한 후 DEPC water에 RNA를 넣어 녹였다. 그후 cDNA를 합성하여 RT-PCR을 이용하여 분석을 하여 확인하였음.

LPS로 자극된 세포에 황칠나무 잎 추출물을 농도별로 처리를 하였음. 그 결과 LPS에 의해 유도된 IL-1 β cytokine은 황칠나무 잎 추출물에 의하여 농도 의존적으로 감소하였으며 앞서 수행된 세포독성이 없는 50 ug/mL의 최고 농도에서 가장 큰 저해능을 보였음. 또한 IL-6 cytokine도 마찬가지로 황칠나무 잎 추출물의 농도 의존적으로 감소함을 나타내었으며 50 ug/mL의 농도에서 가장 큰 저해효과를 보였음(Fig. 11).

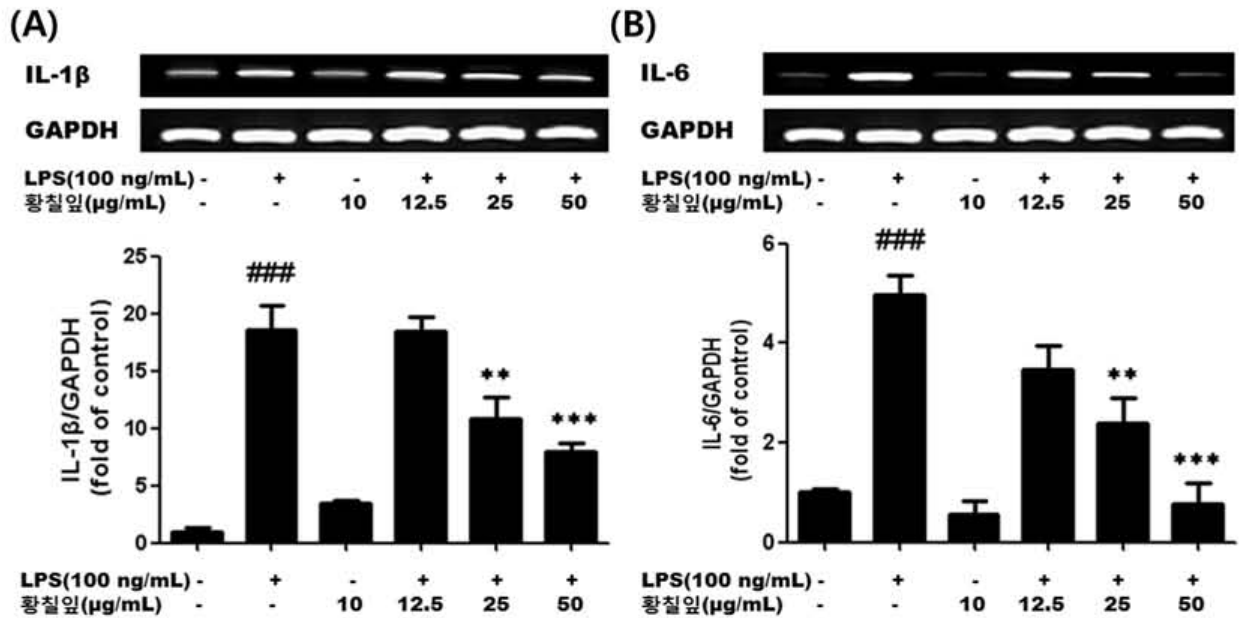


Fig. 11. 황칠나무 잎 추출물이 LPS로 자극된 산화적 스트레스 및 생존에 관련된 interleukin cytokine에 미치는 영향. (A) 황칠나무 잎 추출물이 IL-1 β 에 미치는 영향. (B) 황칠나무 잎 추출물이 IL-6에 미치는 영향.

MAPKs의 확인은 10-14% polyacrylamide gel을 사용한 electrophoresis로 protein을 검사하였음. Protein은 알려진 방법 (Towbin et al, 1992)에 따라 acrylamide로부터 PVDF membrane으로 transfer를 하였으며, blocking buffer에 상온으로 1시간 반응시켰음. 그 이후 0.1% Tween 20을 함유한 TBS-T 용액으로 15 분간 3 회 세척하고 MAPKs antibody를 함유한 blocking buffer에 담귀 -4 $^{\circ}$ C에서 overnight시켜 protein에 붙였으며, horse radish peroxidase와 link된 2차 항체를 함유한 blocking buffer에서 상온으로 1시간 배양하고 0.1% Tween 20을 함유한 TBS-T 용액으로 15 분간 3 회 세척하였음. 세척이 끝난 membrane은 ECL kit로 LAS-3000 (FUJI, Japan)을 이용하여 측정하였음.

LPS로 자극된 세포에 황칠나무 잎 추출물을 농도별로 처리를 하였음. 그 결과 LPS에 의해 유도된 p38은 황칠나무 잎 추출물에 의하여 농도 의존적으로 감소하였으며 앞서 수행된 세포독성이 없는 50 ug/mL의 최고 농도에서 가장 큰 저해능을 보였음. JNK 또한 황칠나무 잎 추출물의 농도 의존적으로 감소함을 나타내었으며 50 ug/mL의 농도에서 가장 큰 저해효과를 보였음 (Fig. 12).

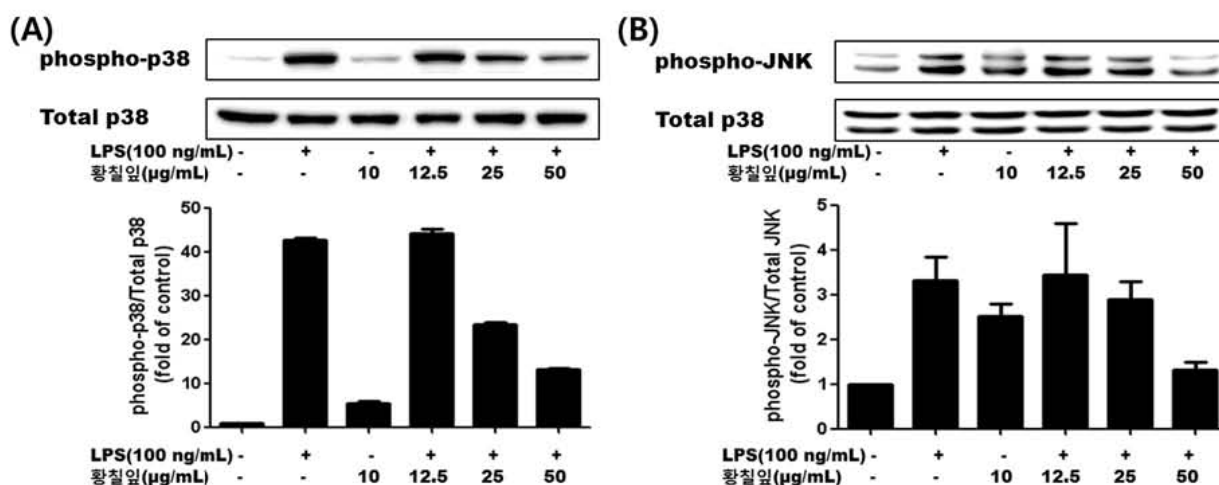


Fig. 12. 황칠나무 잎 추출물이 LPS로 자극된 산화적 스트레스 및 생존에 관련된 MAPKs 에 미치는 영향. **(A)** 황칠나무 잎 추출물이 p38 에 미치는 영향. **(B)** 황칠나무 잎 추출물이 JNK에 미치는 영향.

8. 레몬 및 황칠나무추출물의 독성 평가

주관기관인 (주)이푸른에서 제공 받은 레몬추출물 및 황칠나무 추출물의 독성평가는 「의약품 등의 독성시험기준」(식품의약품안전청 고시 제2012-86호, 2012.08.24.)에 의거하여 실시하였음. 또한 동물의 희생을 최소화하기 위하여 단기독성평가와 3개월 독성평가를 병행하여 실시하였음. 암컷과 수컷 Sprague-Dawley 랫드를 중앙실험동물로부터 구입하여 사용하였으며, 각 추출물당 10마리를 배정하여 총 80마리를 본 실험에 사용하였음. 또한 동물의 희생을 최소화하기 위해, 단기독성과 3개월 독성 평가를 동일한 개체에서 실시하였음.

가. 단기 독성 평가

단기독성평가는 추출물을 투여한 후에 하루 동안 지속적으로 동물을 관찰하였음. 시험물질에 의한 폐사나 자연발생적인 폐사, 투여실수 등에 의한 사고사 등이 관찰되지 않았으며, 어떠한 행동학적 변화 등을 관찰할 수 없었음. 이들 동물을 대상으로 3개월 간 지속적으로 투여하면서 변화 등을 관찰하였음.

나. 3개월 독성 평가

3개월간 장기 투여하면서 매일 1회 이상 동물을 관찰하고 독성징후를 관찰하였으며, 시험물질에 의한 폐사나 자연발생적인 폐사, 투여실수 등에 의한 사고사 등이 관찰되지 않았으며, 어떠한 행동학적 변화 등을 관찰할 수 없었음. 체중은 투여 개시이후부터 매주 측정을 하였으며, 시간에 따른 편차를 줄이기 위해 오전 9-11시에 측정하였으며, 이와 동시에 사료 및 음수 섭취량도 측정하였음. 시간이 가면서 수컷과 암컷 모두에서 지속적으로 증가하였으며, 투여 초기에 일시적인 체중의 정체가 관찰되었으나, 유의성은 확인할 수 없었으며, 물질 투여군과 대조군 모두에서 지속적인 증가를 확인할 수 있었음 (Table 4). 사료섭취량 및 음수량의 경우 일시적

인 감소나 증가 등이 유의적으로 관찰되었으나, 지속적인 감소나 증가 등이 관찰되지 않아, 실험일자에 나타나는 일시적인 실험의 오차라고 판단됨 (Tables 5, 6).

투여 96일이 되는 때에 동물의 체중, 음수량, 사료섭취량을 측정 한 후에 과량의 zoletile을 이용하여 마취를 실시한 다음, 심장을 통해 혈액을 채취한 다음, 일부는 혈액학적 검사를 위해 heparin이 들어 있는 튜브에 보관하였으며, 일부 혈액은 4℃에서 1,500 rpm으로 centrifuge를 실시하여 혈장을 분리하였음. 레몬, 황칠나무 추출물이 혈구세포에 대한 영향을 확인하기 위해 적혈구수, 백혈구 수, 혈소판 수, 혈색소량, 헤마토크리트치, 백혈구백분율 등을 확인하였으며, 간, 콩팥, 뼈 및 대사 등에 대한 영향을 확인하기 위해 ALT, AST, ALP, total bilirubin, cholesterol, triglyceride, glucose, creatinine, BUN, albumin, total protein 등을 확인하였으며, 혈액 내 전해질에 대한 영향을 확인하기 위해 Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^- 농도 등을 확인하였음. 그 결과 혈당을 제외한 대부분의 지표 등에서 지표들의 차이를 관찰할 수 있었으나, 유의성은 확인할 수 없었음. 황칠나무 잎 추출물의 경우는 유의적으로 혈당이 낮게 관찰되었으며, 황칠나무와 당대사와의 연계성에 대한 연구가 필요하다고 생각됨 (Tables 4 and 5).

한편 각 추출물이 동물의 장기에 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위해 대표적인 장기인, 심장, 간, 허파, 지라, 콩팥, 부신, 고환/난소 등을 적출하여 무게를 측정하였음. 그 결과 모든 군에서 장기의 무게 차이는 현저하지 않음을 확인할 수 있었으며 (Table 6), 대체적으로 레몬 추출물 및 황칠나무 추출물을 투여한 군에서 콩팥의 무게가 무겁게 관찰되었으며, 조직학적으로도 큰 차이를 나타내지 않았음.

이상의 결과를 종합해 볼 때, 레몬추출물, 황칠나무 잎 추출물, 황칠나무 줄기추출물은 단기 및 3개월 반복독성의 결과에서 큰 이상적인 소견을 관찰할 수 없었음.

Table 5. Changes of food intake (g) in male and female rats which are treated orally with *Dendropanax morbifera* extract (DME, leaf and stem part, 1 g/kg) and lemon extract (LE, 1 g/kg) for 3 months (means±SD)

Groups		Days										
		D0	D3	D13	D23	D33	D44	D54	D65	D77	D87	D96
Male	Control	24.8 ±2.34	25.8 ±1.89	26.1 ±1.84	27.5 ±1.72	24.6 ±1.38	21.9 ±1.76	22.4 ±2.04	24.7 ±2.24	20.9 ±1.62	29.4 ±3.52	27.6 ±3.12
	LE	24.3 ±2.17	23.2 ±1.72	25.3 ±1.58	26.3 ±1.93	23.0 ±1.53	26.4 ±2.38*	21.8 ±2.41	20.7 ±2.27	27.5 ±2.20*	26.3 ±3.27	31.3 ±4.10
	DME (leaf)	24.5 ±1.86	26.5 ±2.03	24.4 ±1.75	24.0 ±1.64*	19.7 ±1.69*	22.4 ±2.00	23.5 ±1.98	21.9 ±2.47	20.8 ±1.88	28.7 ±2.84	27.9 ±3.20
	DME (stem)	24.6 ±1.98	21.6 ±2.57	25.9 ±1.94	26.2 ±2.08	25.4 ±2.33	20.8 ±2.16	24.4 ±1.94	23.4 ±1.58	26.4 ±2.23*	23.7 ±1.62*	28.9 ±3.45
Female	Control	17.2 ±1.19	18.7 ±1.48	19.4 ±1.62	17.9 ±1.72	16.8 ±1.58	19.3 ±2.05	17.7 ±1.96	19.9 ±2.01	18.9 ±1.88	20.9 ±2.08	22.3 ±2.30
	LE	16.9 ±1.38	18.3 ±1.52	17.7 ±1.91	16.8 ±1.64	17.5 ±1.88	18.9 ±1.77	20.8 ±1.94	20.7 ±1.90	18.7 ±2.24	21.5 ±1.78	18.8 ±2.18
	DME (leaf)	16.5 ±1.48	18.9 ±1.60	20.8 ±2.03	17.4 ±1.50	18.8 ±1.71	19.2 ±1.84	21.5 ±1.90	22.4 ±1.76	18.8 ±1.52	23.5 ±2.62	21.4 ±2.53
	DME (stem)	16.8 ±1.51	16.5 ±1.88	19.9 ±1.92	19.2 ±2.09	18.2 ±1.98	19.9 ±1.72	18.9 ±2.11	21.9 ±2.25	20.4 ±1.94	22.7 ±2.17	23.4 ±2.28

*Significant from control group (P<0.05)

Table 6. Changes of water consumption (mL) in male and female rats which are treated orally with Dendropanax morbifera extract (DME, 1 g/kg) and lemon extract (LE, 1 g/kg) for 3 months (means±SD)

Groups		Days										
		D0	D3	D13	D23	D33	D44	D54	D65	D77	D87	D96
Male	Control	40.9 ±4.11	44.2 ±4.35	42.7 ±3.88	46.2 ±4.60	38.8 ±3.58	47.3 ±4.42	43.1 ±3.83	41.9 ±3.69	38.7 ±5.10	40.8 ±3.52	46.7 ±4.83
	LE	42.5 ±3.64	41.9 ±3.58	40.1 ±4.09	40.6 ±3.91	42.4 ±4.15	39.2 ±3.77	41.3 ±4.20	36.4 ±4.10	40.3 ±3.99	45.8 ±5.75	50.1 ±5.36
	DME (leaf)	37.8 ±3.93	43.1 ±4.11	40.8 ±4.68	42.7 ±4.04	41.0 ±3.98	42.6 ±4.30	39.8 ±3.75	38.5 ±3.97	41.4 ±4.08	44.1 ±4.94	43.6 ±4.37
	DME (stem)	39.5 ±4.23	44.9 ±4.10	41.8 ±4.52	43.8 ±4.23	42.2 ±4.01	42.69 ±3.88	40.6 ±3.74	38.5 ±3.99	40.9 ±4.26	42.4 ±3.88	45.1 ±5.32
Female	Control	22.9 ±2.99	25.4 ±3.34	28.1 ±3.15	27.2 ±3.14	24.6 ±2.89	26.8 ±2.73	23.9 ±2.92	28.3 ±2.64	26.5 ±2.70	25.4 ±2.71	24.4 ±2.66
	LE	24.2 ±3.17	22.9 ±2.70	26.4 ±2.88	21.4 ±2.72	26.2 ±3.28	24.5 ±3.10	27.2 ±3.37	28.9 ±3.38	26.7 ±2.94	26.9 ±2.90	28.7 ±2.85
	DME (leaf)	26.7 ±3.32	26.8 ±2.98	27.6 ±2.68	24.3 ±3.28	23.1 ±2.68	28.4 ±3.04	27.1 ±2.66	25.5 ±2.76	23.4 ±2.18	29.5 ±2.74	26.5 ±2.76
	DME (stem)	25.9 ±2.79	24.3 ±3.10	25.9 ±2.99	28.4 ±3.54	29.5 ±3.14	31.5 ±3.55	28.8 ±2.94	29.7 ±3.09	30.8 ±3.42	32.9 ±2.76*	29.4 ±2.38

*Significant from control group (P<0.05)

Table 7. Changes of hematological parameters in male and female rats which are treated orally with *Dendropanax morbifera* extract (DME, 1 g/kg) and lemon extract (LE, 1 g/kg) for 3 months (means±SD)

Parameters Groups		WBC (10 ³ /µL)	RBC (10 ⁶ /µL)	HGB (g/dL)	PCV (%)	MCV (fl)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	PLT (10 ³ /µL)	NEU (10 ³ /µL)	LYM (10 ³ /µL)	MON (10 ³ /µL)	EOSIN (10 ³ /µL)	BASO (10 ³ /µL)
Male	Control	7.75 ±3.112	8.31 ±0.425	15.1 ±0.62	43.9 ±1.68	52.9 ±1.78	18.3 ±0.61	34.2 ±0.41	985 ±145.8	1.42 ±0.585	6.72 ±2.365	0.229 ±0.118	0.06 ±0.028	0.05 ±0.041
	LE	8.12 ±3.263	8.52 ±0.511	14.8 ±0.51	43.2 ±1.85	54.1 ±1.99	18.4 ±0.58	34.3 ±0.37	945 ±112.4	1.57 ±0.449	6.21 ±2.118	0.198 ±0.087	0.05 ±0.032	0.04 ±0.022
	DME (leaf)	8.35 ±3.320	7.98 ±0.459	14.6 ±0.49	42.4 ±2.08	52.7 ±1.59	18.7 ±0.52	34.5 ±0.44	931 ±108.4	1.48 ±0.492	6.34 ±1.994	0.235 ±0.107	0.08 ±0.041	0.05 ±0.019
	DME (stem)	8.39 ±3.524	8.39 ±0.538	15.4 ±0.72	44.3 ±2.24	51.9 ±2.14	18.5 ±0.72	34.5 ±0.39	957 ±105.7	1.52 ±0.625	6.58 ±2.254	0.218 ±0.098	0.06 ±0.019	0.04 ±0.031
Fe male	Control	6.27 ±2.892	7.29 ±0.458	14.2 ±0.57	40.4 ±1.68	53.9 ±2.14	19.2 ±0.61	35.8 ±0.89	984 ±135.8	0.98 ±0.378	4.53 ±1.856	0.205 ±0.106	0.05 ±0.033	0.06 ±0.029
	LE	5.87 ±3.127	7.50 ±0.398	14.4 ±0.42	41.5 ±1.89	52.8 ±1.82	18.6 ±0.49	34.9 ±0.58	1005 ±129.3	1.10 ±0.422	5.16 ±2.088	0.158 ±0.094	0.06 ±0.024	0.04 ±0.022
	DME (leaf)	5.47 ±3.281	7.72 ±0.447	14.1 ±0.48	42.4 ±2.07	52.4 ±1.69	18.8 ±0.41	35.3 ±0.68	956 ±110.5	0.79 ±0.338	4.86 ±1.963	0.182 ±0.117	0.03 ±0.019	0.03 ±0.024
	DME (stem)	5.98 ±2.968	7.58 ±0.413	14.2 ±0.44	41.8 ±2.18	52.8 ±1.58	19.1 ±0.39	34.8 ±0.62	998 ±109.7	0.84 ±0.398	4.96 ±1.726	0.198 ±0.104	0.05 ±0.019	0.03 ±0.025

Table 8. Changes of serum biochemical parameters in male and female rats which are treated orally with *Dendropanax morbifera* extract (DME, 1 g/kg) and lemon extract (LE, 1 g/kg) for 3 months (means±SD)

Parameters		ALT (U/L)	AST (U/L)	ALP (U/L)	Total bilirubin (mg/dL)	Choleste rol (mg/dL)	Triglyce ride (mg/dL)	Glucose (mg/dL)	Creatinine (mg/dL)	BUN (mg/dL)	Albumin (g/dL)	T. protein (g/dL)	Na ⁺ (mmol/L)	K ⁺ (mmol/L)	Ca ²⁺ (mmol/L)	Cl ⁻ (mmol/L)
Groups																
Male	Contr ol	49.2 ±4.38	88.9 ±11.8	108.9 ±22.7	0.34 ±0.068	105.6 ±18.4	148.6 ±26.8	123.5 ±4.95	1.09 ±0.089	17.6 ±2.55	4.62 ±0.682	7.18 ±0.898	153.8 ±9.22	7.1 ±0.55	8.3 ±0.36	101 ±6.5
	LE	51.3 ±3.94	92.8 ±9.75	116.5 ±14.9	0.36 ±0.072	111.5 ±21.5	114.9 ±15.9	112.8 ±3.37	1.15 ±0.104	17.2 ±2.23	3.98 ±0.772	7.53 ±0.966	159.7 ±8.71	7.3 ±0.81	8.2 ±0.41	98 ±5.4
	DME (leaf)	48.7 ±4.18	94.5 ±12.7	126.5 ±22.4	0.37 ±0.066	118.6 ±22.7	108.4 ±20.4	101.8 ±3.99	1.14 ±0.092	17.0 ±1.96	4.54 ±0.610	6.99 ±1.235	155.1 ±8.80	7.1 ±0.68	8.1 ±0.48	108 ±4.5
	DME (stem)	50.9 ±4.52	95.9 ±14.5	119.8 ±17.5	0.33 ±0.094	101.5 ±18.2	101.1 ±18.7	110.5 ±5.25	1.13 ±0.154	17.3 ±2.08	4.29 ±0.812	7.33 ±1.192	160.8 ±9.62	7.2 ±1.52	8.3 ±0.51	104 ±6.2
Fe male	Contr ol	41.6 ±3.85	104.1 ±12.9	66.9 ±17.3	0.45 ±0.079	108.6 ±17.6	121.5 ±17.5	115.9 ±4.57	1.12 ±0.110	16.8 ±1.84	4.23 ±0.812	6.98 ±0.612	163.7 ±9.96	6.9 ±0.72	7.9 ±0.35	99 ±3.9
	LE	38.7 ±4.27	109.5 ±14.3	73.5 ±12.9	0.49 ±0.062	102.4 ±24.8	96.4 ±14.9	110.2 ±3.08	1.08 ±0.094	16.5 ±2.09	4.47 ±0.530	7.25 ±0.853	167.2 ±10.9	7.2 ±0.63	8.1 ±0.49	100 ±4.4
	DME (leaf)	39.8 ±4.04	111.3 ±9.54	64.8 ±14.9	0.42 ±0.057	116.4 ±18.9	90.5 ±18.6	102.1 ±3.99*	1.09 ±0.102	17.3 ±1.84	3.80 ±0.441	7.41 ±0.915	171.8 ±11.2	7.1 ±0.70	7.6 ±0.37	105 ±5.8
	DME (stem)	41.2 ±5.12	115.2 ±13.1	67.9 ±12.2	0.44 ±0.094	111.7 ±19.9	110.2 ±20.4	112.7 ±4.85	1.11 ±0.117	17.0 ±1.69	4.18 ±0.625	7.22 ±0.885	169.8 ±13.5	7.1 ±0.82	8.2 ±0.51	110 ±8.2

*Significant from CTL group (P<0.05)

Table 9. The organ weight of male and female rats which are treated orally with *Dendropanax morbifera* extract (DME, 1 g/kg) and lemon extract (LE, 1 g/kg) for 3 months (means±SD)

Parameters		Body weight	Adrenal gland	Heart	Liver	Kidney	Lung	Spleen	Testis /Ovary
Group									
Male	Control	580.42 ±37.22	0.07 ±0.02	1.87 ±0.24	14.38 ±1.89	3.99 ±0.23	2.39 ±0.36	0.81 ±0.09	3.59 ±0.28
	LE	571.54 ±33.57	0.07 ±0.03	1.76 ±0.27	13.52 ±1.71	4.18 ±0.19	2.52 ±0.40	0.78 ±0.07	3.47 ±0.32
	DME (leaf)	575.69 ±34.42	0.08 ±0.02	1.82 ±0.25	13.95 ±2.03	4.05 ±0.25	2.35 ±0.33	0.77 ±0.08	3.41 ±0.31
	DME (stem)	590.76 ±33.01	0.08 ±0.03	1.84 ±0.30	14.19 ±1.81	4.22 ±0.27	2.29 ±0.35	0.82 ±0.09	3.57 ±0.27
Female	Control	299.15 ±20.18	0.06 ±0.03	1.10 ±0.15	8.12 ±0.84	1.96 ±0.17	1.68 ±0.27	0.49 ±0.04	0.10 ±0.04
	LE	292.66 ±19.61	0.07 ±0.02	1.15 ±0.21	7.85 ±0.73	2.04 ±0.25	1.72 ±0.24	0.51 ±0.05	0.11 ±0.06
	DME (leaf)	305.08 ±22.91	0.07 ±0.03	1.13 ±0.18	8.38 ±0.98	2.08 ±0.23	1.81 ±0.28	0.52 ±0.04	0.11 ±0.05
	DME (stem)	291.46 ±19.44	0.07 ±0.02	1.12 ±0.19	8.25 ±0.83	2.12 ±0.22	1.77 ±0.24	0.54 ±0.05	0.12 ±0.05

9. 레몬 및 황칠나무추출물의 중금속 배출효능 평가

가. 실험군의 구성

레몬추출물 및 황칠나무추출물이 카드뮴, 납, 수은 등의 중금속을 효과적으로 배출하는지를 확인하기 위해 수컷 **Sprague-Dawley** 랫드를 중앙실험동물로부터 구입하여 사용하였으며, 각 군당 10마리를 배정하여 총 130마리의 동물을 본 실험에 사용하였음. 대조군에는 아무런 물질을 투여하지 않았으며, 중금속, 레몬추출물 및 황칠나무 추출물은 아래와 같은 농도로 매일 투여하였으며, 투여 4주 후에 동물을 희생하여 혈액 및 콩팥을 채취하여 중금속의 혈액 중 농도, 중금속의 축적이 많이 나타나는 콩팥에서의 축적을 확인하였음.

실험군의 구성	
대조군	Control
카드뮴 투여군	Cd (cadmium chloride) - 3 mg/kg, SC)
카드뮴+레몬추출물 투여군	Cd+LE (100 mg/kg, PO)
카드뮴+황칠나무 잎 추출물 투여군	Cd+DME (leaf) (100 mg/kg, PO)
카드뮴+황칠나무 줄기 추출물 투여군	Cd+DME (stem) (100 mg/kg, PO)
납투여군	Pb (lead acetate) - 25 mg/kg, IP
납+레몬추출물 투여군	Pb+LE
납+황칠나무 잎 추출물 투여군	Pb+DME (leaf)
납+황칠나무 줄기 추출물 투여군	Pb+DME (stem)
수은투여군	Hg (dimethylmercury) - 5 ug/kg, IP
수은+레몬추출물 투여군	Hg+LE
수은+황칠나무 잎 추출물 투여군	Hg+DME (leaf)
수은+황칠나무 줄기 추출물 투여군	Hg+DME (stem)

나. 레몬 및 황칠나무 추출물의 중금속 배출 효능 확인 - 혈액 및 콩팥에서의 중금속 농도 측정

중금속 및 추출물을 4주간 투여한 다음, 마지막 투여 2시간 후에 동물을 **zoletile**을 이용하여 과마취를 시킨 후에 혈액 중 납, 수은, 카드뮴의 검출을 위해서 혈청을 위에서 언급한 방법으로 실시하였음. 또한 뇌조직, 간에서 산화적 손상 및 항산화효소의 조직내 분포를 확인하기 위하여 조직을 채취하였음.

납은 원자흡수분광광도법-후연로법을 사용하여, 원자에 높은 열을 가해 원자를 들뜬 상태로 만든 후 **Pb** 원자가 **217.0 nm**에서 광흡수가 이루어지는 것을 이용하여 정량 평가하고, 수은은 **cold vapor generation** 법을 이용하여 원자에 열을 가하지 않고 **Tin(II) chloride dihydrate (SnCl₂)**로 수은을 기체상태 환원시킨 후 광흡수를 보이는 **253.7 nm**에서 정량 평가하였음. 또한

카드뮴은 원자흡광광도-흑연로법 검사법에 의해 원자에 높은 열을 가해 원자를 들뜬 상태로 만든 후 Pb 원자가 228.8 nm에서 광흡수가 이루어지는 것을 이용하여 정량 평가하였음.

그 결과 납은 대조군에서는 혈액 중에 평균 4.72 ug/dL를 관찰할 수 있었으며, 납을 투여한 동물에서는 급격하게 증가하여 납의 농도가 140.37 ug/dL를 나타내었음. 한편 레몬추출물을 투여한 군의 경우 납의 농도가 급격하게 감소하여 75.45 ug/dL를 나타내었으며, 황칠나무 잎 추출물의 경우 65.47 ug/dL, 황칠나무 줄기 추출물의 경우 74.87 ug/dL을 나타내어 황칠나무 잎 추출물의 혈액에서의 배출 효과가 가장 높게 관찰되었으나, 레몬추출물 및 황칠나무 추출물 사이의 유의성을 관찰되지 않았음 (Fig. 13).

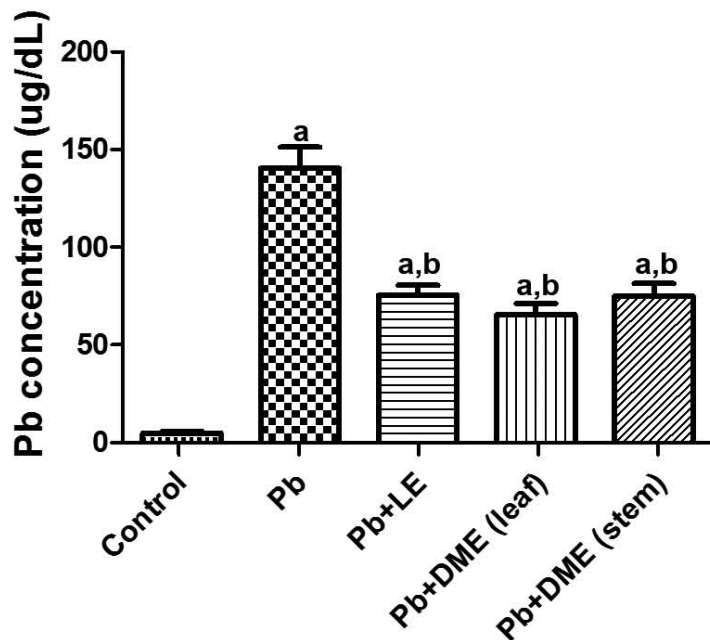


Fig. 13. Serum analysis of lead in control, Pb, Pb+LE, Pb+DME (leaf), and Pb+DME (stem) group (n = 10 per group; ^aP < 0.05 versus control group; ^bP < 0.05 versus Pb-treated group). Data are presented as the mean ± SEM.

납이 콩팥에서의 축적을 확인하기 위하여 콩팥에 대해서 확인한 결과 대조군의 경우 0.017 ug/g의 농도로 관찰된 반면 납을 투여한 동물에서 5.721 ug/g으로 관찰되어 337배나 증가하는 것을 확인할 수 있었음. 레몬추출물을 투여한 경우 납투여군에 비해서 콩팥에서의 납농도는 66.2%로 감소하는 것을 확인할 수 있었음. 또한 황칠나무 잎 추출물 및 황칠나무 줄기 추출물을 투여한 경우도 납투여군에 비해서 각각 62.1%, 68.1%로 관찰되어 납의 콩팥내 축적이 유의적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었음 (Fig. 14).

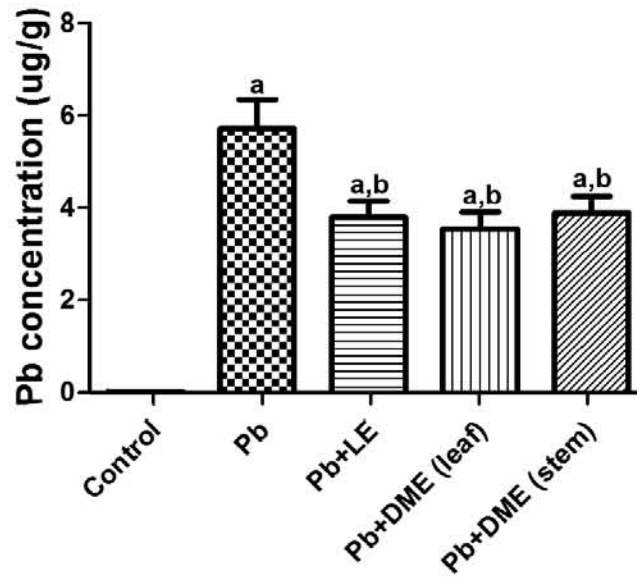


Fig. 14. Kidney tissue analysis of lead in control, Pb, Pb+LE, Pb+DME (leaf), and Pb+DME (stem) group (n = 10 per group; ^aP < 0.05 versus control group; ^bP < 0.05 versus Pb-treated group). Data are presented as the mean ± SEM.

한편 카드뮴은 대조군의 혈액에서는 4.12 ug/dL가 관찰되었음. 한편 카드뮴을 투여한 군의 경우 카드뮴 농도가 급격하게 증가하여, 평균 39.7 ug/dL를 관찰할 수 있었음. 레몬추출물의 경우에는 카드뮴 농도가 감소하여 카드뮴 투여군에 비해 79.8%를 나타냈으며, 황칠나무 잎 추출물의 경우 카드뮴 투여군에 비해 75.1%의 카드뮴이 관찰되었으나, 두군 모두에서 통계적인 유의성은 확인할 수 없었음. 한편 황칠나무 줄기 추출물의 경우 카드뮴 투여군의 67.8%인 26.9 ug/dL의 카드뮴이 관찰되어 카드뮴의 혈액에서의 제거 능력은 황칠나무 줄기 추출물이 통계학적으로도 유의성을 관찰할 수 있었음 (Fig. 15).

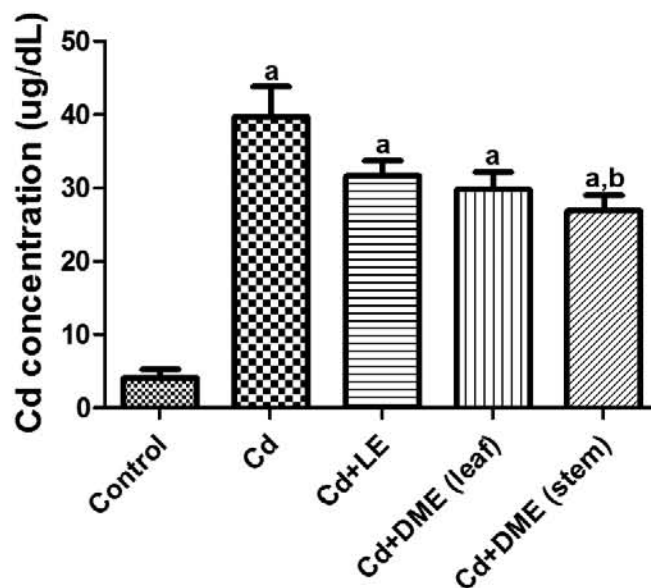


Fig. 15. Serum analysis of cadmium in control, Cd, Cd+LE, Cd+DME (leaf), and Cd+DME

(stem) group (n = 10 per group; ^aP < 0.05 versus control group; ^bP < 0.05 versus Cd-treated group). Data are presented as the mean ± SEM.

이와 더불어 콩팥에서 카드뮴 농도는 대조군의 경우 0.150 ug/dL가 관찰되었음. 카드뮴 투여군의 경우 카드뮴 농도가 급격하게 증가하여, 평균 4.365 ug/dL를 관찰할 수 있어 29.1배의 급격한 증가를 확인할 수 있었음. 레몬추출물, 황칠나무 잎 추출물, 황칠나무 줄기 추출물을 투여한 모든 군에서 카드뮴의 농도가 감소하는 것을 확인할 수 있었으며, 각각 카드뮴 투여군에 비해 카드뮴 농도가 86.8%, 87.6%, 80.7%였으며, 12-19%의 카드뮴이 감소되는 것을 확인할 수 있었으나, 감소에 대한 통계적인 유의성은 모든 군에서 관찰할 수 없었음 (Fig. 16).

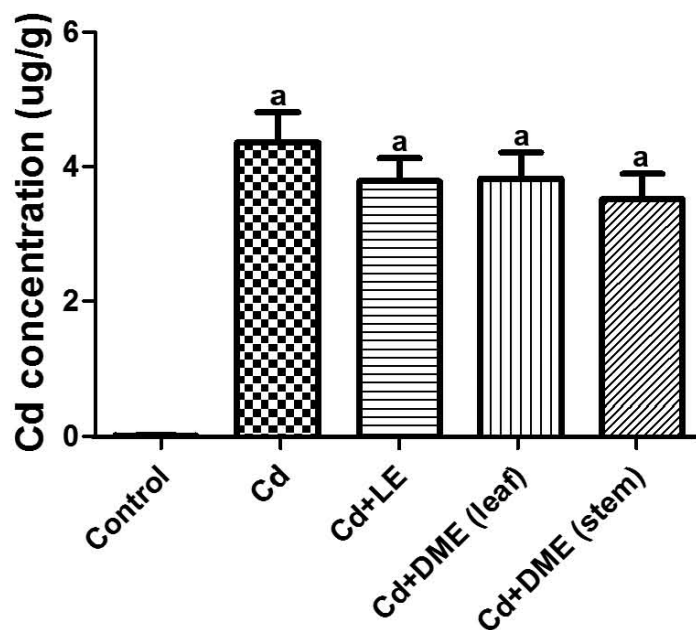


Fig. 16. Kidney tissue analysis of cadmium in control, Cd, Cd+LE, Cd+DME (leaf), and Cd+DME (stem) group (n = 10 per group; ^aP < 0.05 versus control group; ^bP < 0.05 versus Cd-treated group). Data are presented as the mean ± SEM.

수은은 대조군의 혈액에서 평균 0.006 ppm을 관찰할 수 있어, 매우 적은 양이 관찰되었음. 수은을 투여한 군의 경우 평균 1.394 ppm이 관찰되어 농도가 높게 관찰되었으며, 레몬추출물을 투여한 군의 경우 1.136 ppm이 관찰되어 감소를 하였으나, 통계적인 유의성은 확인할 수 없었음. 한편 황칠나무 잎 추출물을 투여한 군의 경우 1.172 ppm이 관찰되어 레몬추출물과 유사한 양상으로 관찰되었음. 황칠나무 줄기 추출물을 투여한 경우 0.889 ppm의 수은이 검출되어 수은을 투여한 군에 비해 유의적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었음 (Fig. 17).

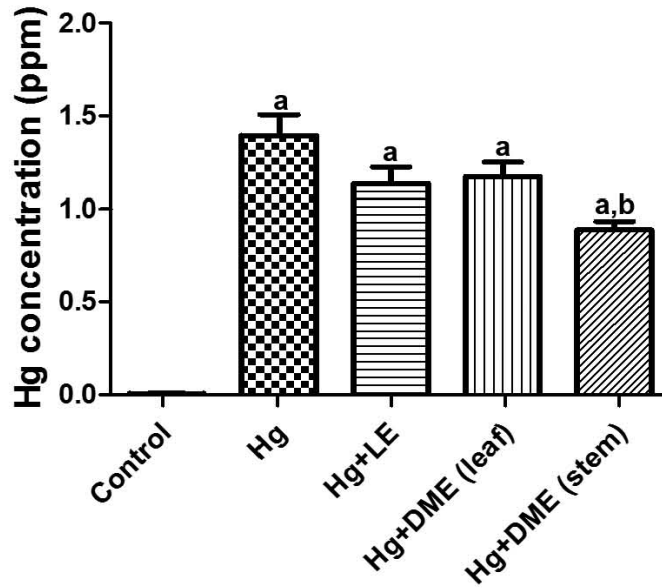


Fig. 17. Serum analysis of mercury in control, Hg, Hg+LE, Hg+DME (leaf), and Hg+DME (stem) group (n = 10 per group; ^aP < 0.05 versus control group; ^bP < 0.05 versus Cd-treated group). Data are presented as the mean ± SEM.

콩팥의 경우 대조군에서 수은 농도는 0.06 ug/g의 농도를 관찰할 수 있었음. 한편 수은 투여군의 경우 콩팥에서의 수은 농도가 급격하게 증가하여 평균 38.24 ug/g을 관찰할 수 있어, 콩팥에서의 수은 농도가 대조군에 비해 637배나 증가하는 것을 확인할 수 있었음. 레몬추출물을 투여한 경우 수은 투여군에 비해 콩팥내 수은 농도가 감소하는 것을 확인할 수 있었으나, 통계적인 유의성은 확인할 수 없었음. 황칠나무 잎 추출물을 투여한 경우 수은 투여군의 63.4%의 수은이 콩팥에서 관찰되었으나, 이에 통계적인 유의성을 확인할 수 없었음. 황칠나무 줄기 추출물의 경우 수은 투여군의 79.0%의 수은이 관찰되어 콩팥내 수은 농도를 감소시켰으나, 이 또한 통계적인 유의성은 없었음. 그러나 레몬추출물, 황칠나무 잎 추출물, 황칠나무 줄기 추출물 모두에서 콩팥의 수은 농도는 감소하였음 (Fig. 18).

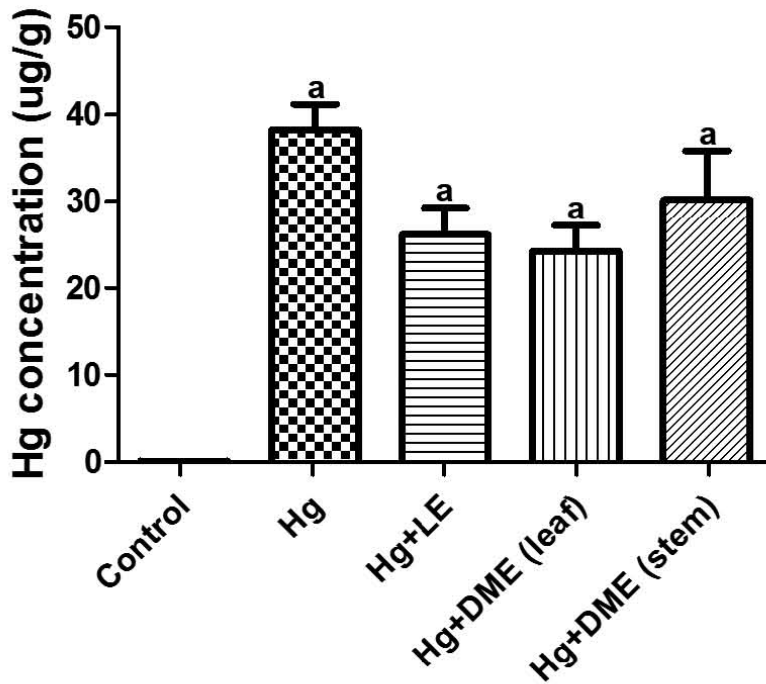


Fig. 18. Kidney tissue analysis of mercury in control, Hg, Hg+LE, Hg+DME (leaf), and Hg+DME (stem) group (n = 10 per group; ^aP < 0.05 versus control group; ^bP < 0.05 versus Cd-treated group). Data are presented as the mean ± SEM.

이상의 결과를 종합해 볼 때, 레몬, 황칠나무 잎 추출물, 황칠나무 줄기 추출물은 납, 카드뮴, 수은과 같은 중금속의 혈액에서의 배출을 촉진시키며, 콩팥에서 축적되는 중금속의 양을 감소시키는 것을 확인할 수 있었으며, 감소 정도는 큰 차이를 확인할 수 없었음.

10. 레몬 및 황칠나무 추출물의 해마에서 산화적스트레스, 항산화 효능 평가

가. 해마(hippocampus)에서 중금속 축적 측정

해마에서 대조군의 경우 납의 농도는 0.015 ug/g의 농도를 관찰할 수 있었음. 납투여군의 경우 납의 농도가 증가하여 0.024 ug/g으로 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, 혈액이나 콩팥에 비해 증가하는 정도가 상당히 낮은 것으로 확인되었음. 레몬추출물, 황칠나무 잎 추출물, 황칠나무 줄기 추출물을 투여한 모든 군에서 해마 내의 납 농도가 감소하는 것을 확인할 수 있었으며, 특히 레몬추출물, 황칠나무 잎 추출물은 납추출물 투여군에 비해 통계학적인 유의성을 확인할 수 있었음 (Fig. 19).

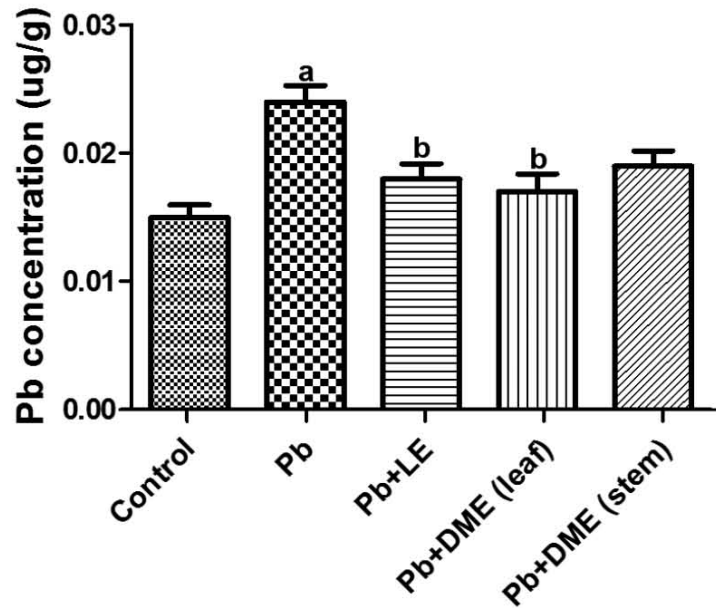


Fig. 19. Hippocampal tissue analysis of lead in control, Pb, Pb+LE, Pb+DME (leaf), and Pb+DME (stem) group (n = 10 per group; ^aP < 0.05 versus control group; ^bP < 0.05 versus Pb-treated group). Data are presented as the mean ± SEM.

대조군에서 카드뮴의 경우 해마에서는 0.014 ug/g의 농도로 관찰할 수 있었음. 카드뮴을 투여한 경우 0.022 ug/g으로 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, 혈액이나 콩팥에 비해 증가하는 정도가 상당히 낮은 것으로 확인되었음. 레몬추출물 및 황칠나무 잎 추출물을 투여한 경우 카드뮴 투여군과 유사한 정도의 카드뮴 농도가 관찰되었으며, 황칠나무 줄기 추출물을 투여한 경우 카드뮴의 농도가 카드뮴 단독 투여군에 비해 86.4%가 관찰되어 일부 감소하는 것을 확인할 수 있었으나 통계적 유의성은 확인할 수 있었음 (Fig. 20).

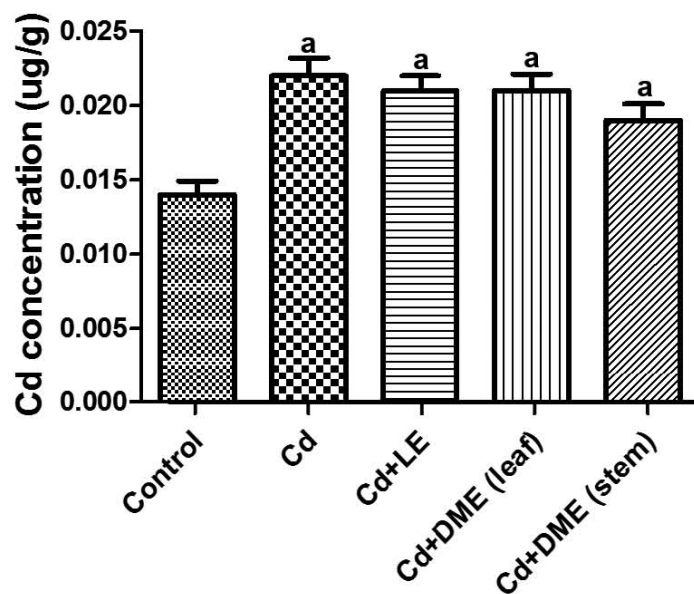


Fig. 20. Hippocampal tissue analysis of cadmium in control, Cd, Cd+LE, Cd+DME (leaf),

and Cd+DME (stem) group (n = 10 per group; ^aP < 0.05 versus control group; ^bP < 0.05 versus Cd-treated group). Data are presented as the mean ± SEM.

대조군 해마에서 수은은 0.007 ug/g의 농도로 관찰할 수 있었음. 수은을 투여하였을 경우 0.039 ug/g으로 5.8배 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, 다른 중금속에 비해 증가하는 정도가 큰 것을 확인할 수 있었음. 레몬추출물을 투여한 경우 수은의 농도가 감소하여 수은투여군의 82.1%가 관찰되었으나, 감소에 대한 통계적인 유의성은 확인할 수 없었음. 그러나 황칠나무 잎 추출물, 황칠나무 줄기 추출물을 투여한 경우 수은 농도가 유의적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었으며, 각각 수은 투여군의 75.4%, 80.8% 정도의 수은이 관찰되었음 (Fig. 21).

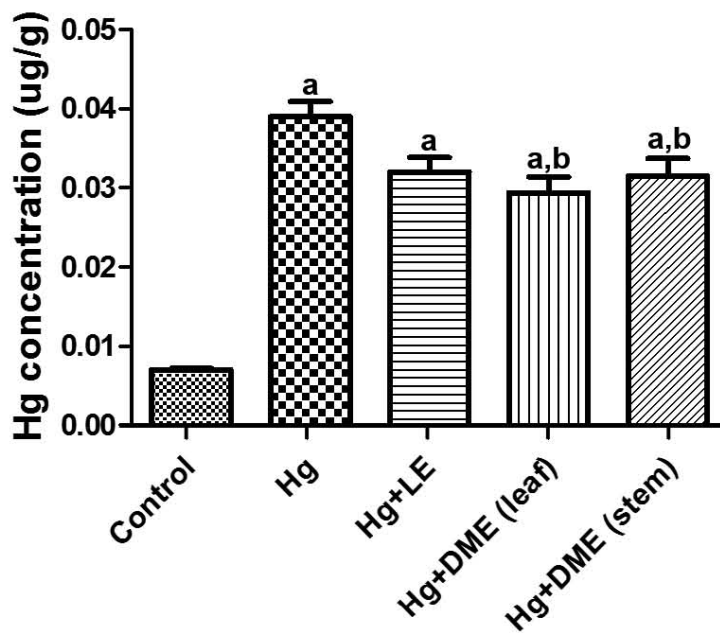


Fig. 21. Hippocampal tissue analysis of mercury in control, Hg, Hg+LE, Hg+DME (leaf), and Hg+DME (stem) group (n = 10 per group; ^aP < 0.05 versus control group; ^bP < 0.05 versus Cd-treated group). Data are presented as the mean ± SEM.

이상의 결과를 종합해 볼 때, 레몬, 황칠나무 잎 추출물, 황칠나무 줄기 추출물은 납, 수은의 해마에서의 축적을 어느 정도 막아주는 것으로 생각되나, 카드뮴의 축적과에 대한 효능은 확인할 수 없었음. 또한 해마에서의 중금속 축적의 효능은 황칠나무 잎 추출물이 가장 좋은 것으로 확인되었음.

나. 해마(hippocampus)에서 활성산소(reactive oxygen species) 생산 측정

해마에서 황칠추출물이 활성산소 생산을 얼마나 줄이는지를 확인하기 위하여 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) 형광 프로브를 이용하여 확인하였음. 세포내에 활성산소는 DCFH-DA를 산화시켜 DCF라는 강한 형광을 나타내는 화합물로 변하는 것을 이용하였

음. 4주간 납, 수은, 카드뮴을 투여한 다음, Zoletile을 이용하여 랫드를 과마취시킨 후 뇌를 적출하고, 해마부위만을 떼어 뇌에서 미토콘드리아만을 분리하였음. Bradford 방법(Bradford, 1976)에 의해서 bovine serum albumin을 표준으로 하여 미토콘드리아내의 단백질을 정량하였음. 각각의 군으로부터 얻은 미토콘드리아 분획 0.5 mg/mL을 37°C에서 60분간 10 uM DCFH-DA와 반응시켰으며, DCF의 형광농도는 488 nm의 흥분파장, 527 nm의 방출파장에서 측정하였음.

납을 투여한 경우 대조군에 비해 DCF 형광수준이 1.97배 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, 레몬추출물을 투여한 경우 납투여군의 69.1%의 DCF 형광수준을 보여 산화적손상이 유의적으로 감소되는 것을 확인하였음. 황칠나무 잎 추출물의 경우 납투여군에 비해 DCF 형광수준이 55.2%만 관찰되어, 활성산소가 유의적으로 낮음을 확인할 수 있었으며, 황칠나무 줄기 추출물의 경우에도 납투여군의 68.4%만이 관찰되어 레몬, 황칠추출물의 투여가 납에 의한 활성산소의 증가를 유의적으로 감소시킴을 확인할 수 있었음 (Fig. 22).

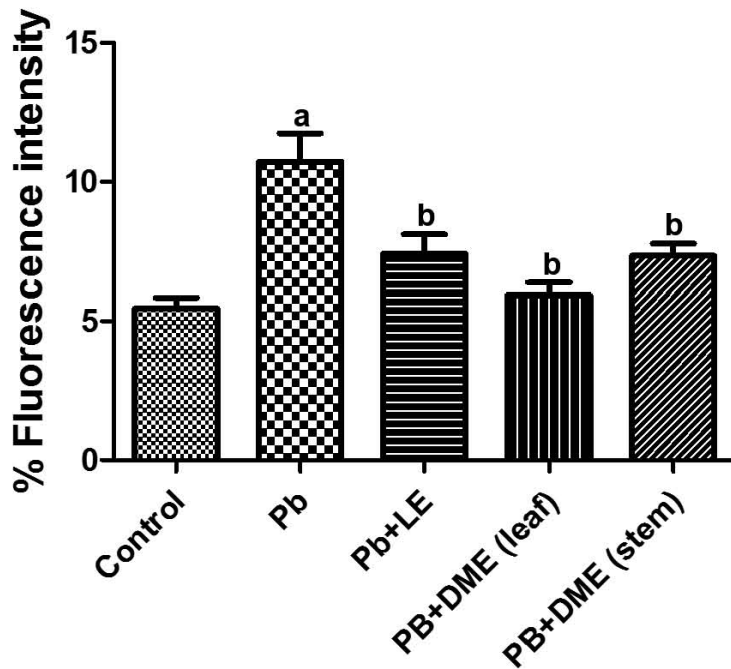


Fig. 22. Levels of intracellular reactive oxygen species production as determined by 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) levels in the hippocampus of control, Pb, Pb+LE, Pb+DME (leaf), and Pb+DME (stem) group (n = 10 per group; ^aP < 0.05 versus control group; ^bP < 0.05 versus Pb-treated group). Data are presented as the mean ± SEM.

한편 카드뮴을 투여한 경우 DCF 형광수준은 정상군에 비해 171.9%가 관찰되었음. 레몬추출물을 투여한 경우 DCF 형광수준이 카드뮴 투여군의 82.4%까지 감소하였으나, 유의성을 확인할 수는 없었음. 또한 황칠나무 잎 추출물을 투여한 경우에도 카드뮴을 투여한 군의 80.8%로 관찰할 수 있었으며, 이 또한 유의성을 확인할 수 없었음. 그러나 황칠나무 줄기 추출물을 투여한 경우 카드뮴 투여군에 비해 69.5%의 DCF 형광수준을 나타내어 유의적인 감소를 확인할 수 있었음 (Fig. 23).

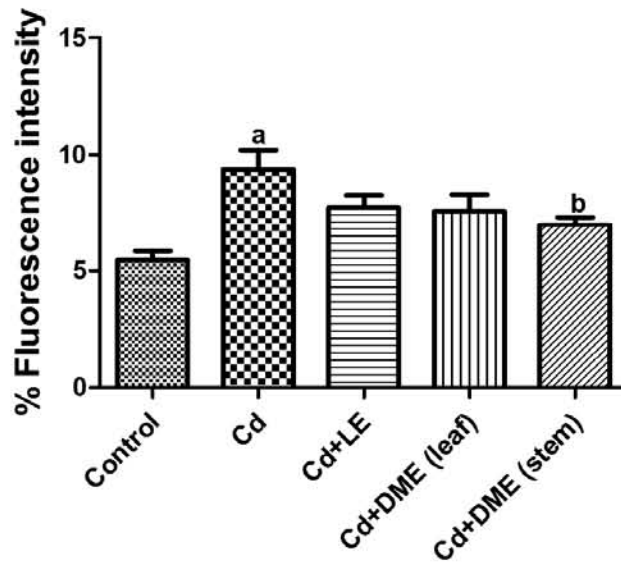


Fig. 23. Levels of intracellular reactive oxygen species production as determined by DCF levels in the hippocampus of control, Cd, Cd+LE, Cd+DME (leaf), and Cd+DME (stem) group (n = 10 per group; ^aP < 0.05 versus control group; ^bP < 0.05 versus Cd-treated group). Data are presented as the mean ± SEM.

수은을 투여한 경우 역시 DCF 형광수준은 정상군에 비해 213.9%를 나타내어 가장 큰 산화적손상을 나타내었음. 한편 레몬추출물을 투여한 경우 수은투여군의 80.8%의 DCF 형광수준을 보였으나 유의성은 확인할 수 없었음. 한편 황칠나무 잎 추출물을 투여한 경우 수은을 투여한 군의 72.6%의 DCF 형광수준을 관찰할 수 있었으며, 유의적인 감소를 확인할 수 있었음. 황칠나무 줄기 추출물을 투여한 경우 수은 투여군에 비해 80.5%의 DCF 형광수준을 나타내어 감소를 확인할 수 있었으나, 유의성은 관찰할 수 없었음 (Fig. 24).

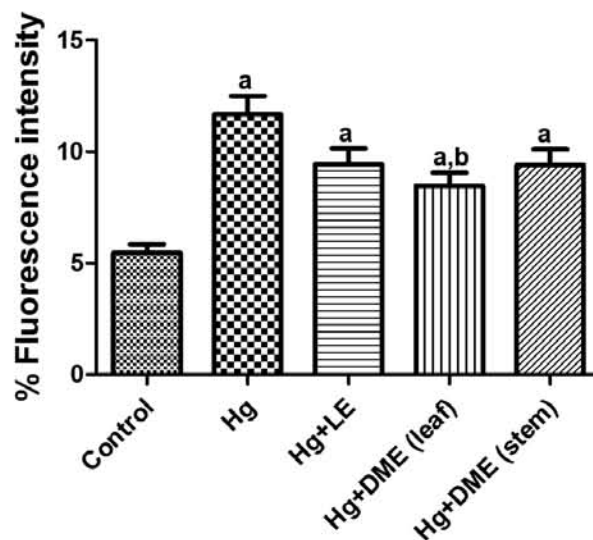


Fig. 24. Levels of intracellular reactive oxygen species production as determined by DCF

levels in the hippocampus of control, Hg, Hg+LE, Hg+DME (leaf), and Hg+DME (stem) group (n = 10 per group; ^aP < 0.05 versus control group; ^bP < 0.05 versus Cd-treated group). Data are presented as the mean ± SEM.

이상의 결과를 종합해 볼 때, 납, 카드뮴, 수은 등의 중금속의 투여는 해마에서 활성산소의 양을 유의적으로 증가시켜 해마의 손상을 가져오는 것을 확인하였음. 한편 레몬추출물, 황칠나무 잎 추출물, 황칠나무 줄기 추출물의 투여는 납에 의한 활성산소의 양을 감소시키며, 카드뮴은 황칠나무 줄기 추출물이 효능이 높게 관찰되었고, 수은의 경우 황칠나무 잎 추출물이 해마에서 활성산소의 양을 유의적으로 감소시키는 것을 확인할 수 있었음.

다. 해마(hippocampus)에서 중금속에 의한 단백질 변성 확인 - protein carbonyl level

해마에서 중금속의 투여에 의한 단백질 변성(protein modification)을 확인하기 위하여 protein carbonyl level을 Levine 등의 방법(Levine et al., 1990)으로 확인하였음. 2 M HCl 에 대한 상층액의 흡광도를 370 nm에서 측정하였으며, molar extinction coefficient ($21 \times 10^3 \text{L/mol cm}$)의 계산식을 적용하여 nmol/mg protein으로 표시하였음.

Protein carbonyl level은 납을 투여한 군의 경우 대조군에 비해서 2.1배 증가하는 것을 확인할 수 있었음. 레몬추출물을 투여한 경우 납투여군의 85.8%가 관찰되었으며, 황칠나무 잎 추출물을 투여한 경우에는 납투여군의 73.6% 만이 관찰되어 protein carbonyl level이 감소하는 것을 확인할 수 있었으나, 유의성을 관찰할 수는 없었음. 한편 황칠나무 줄기 추출물을 투여한 경우 납투여군에 비해 66.2%의 protein carbonyl level을 확인할 수 있었으며, 이는 납투여군에 비해 유의적인 감소를 확인할 수 있었음 (Fig. 25).

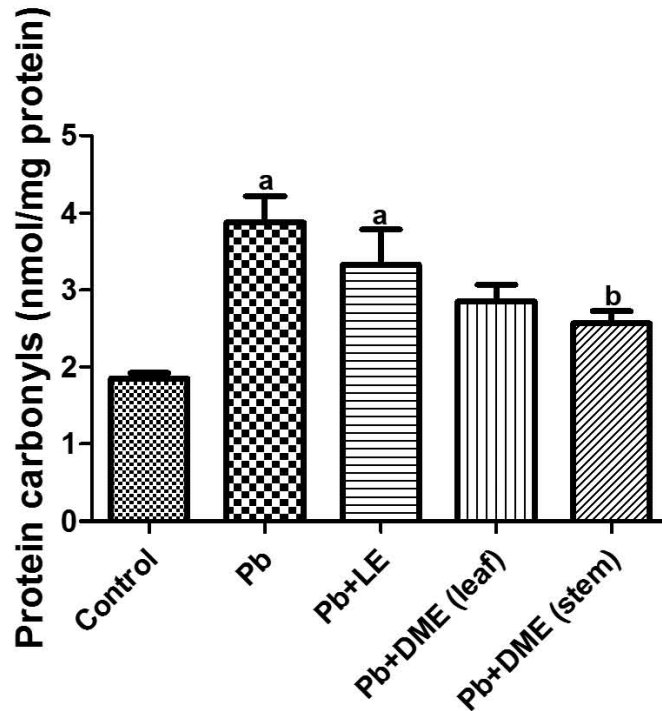


Fig. 25. Protein carbonyl levels in the hippocampus of control, Pb, Pb+LE, Pb+DME (leaf), and Pb+DME (stem) group (n = 10 per group; ^aP < 0.05 versus control group; ^bP < 0.05 versus Pb-treated group). Data are presented as the mean ± SEM.

카드뮴 투여의 경우 **protein carbonyl level**은 대조군에 비해 유의적으로 증가하였으며, 대조군의 **242.6%**의 **protein carbonyl level**을 확인할 수 있었음. 한편 레몬추출물을 투여한 경우 카드뮴 투여군의 **80.4%**의 **protein carbonyl level**을 확인할 수 있었으나, 감소의 유의성은 확인할 수 없었음. 황칠나무 잎 추출물을 투여한 경우 카드뮴투여군의 **70.9%**의 **protein carbonyl level**을 확인하여 유의적인 감소를 확인할 수 있었으며, 황칠나무 줄기 추출물은 더 많이 감소하여 카드뮴의 **57.4%**만을 확인할 수 있어, 활성산소에 의한 단백질의 변성을 유의적이고, 효과적으로 억제함을 확인할 수 있었음 (Fig. 26).

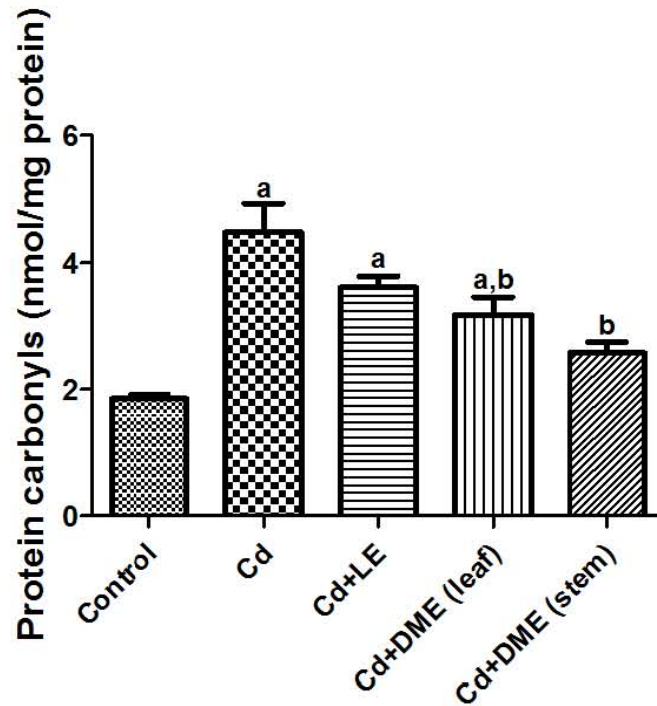


Fig. 26. Protein carbonyl levels in the hippocampus of control, Cd, Cd+LE, Cd+DME (leaf), and Cd+DME (stem) group (n = 10 per group; ^aP < 0.05 versus control group; ^bP < 0.05 versus Cd-treated group). Data are presented as the mean ± SEM.

수은을 투여한 경우 **protein carbonyl level**은 대조군에 비해 유의적으로 증가하였으며, 대조군의 288.0%의 **protein carbonyl level**을 확인할 수 있었음. 한편 레몬추출물을 투여한 경우 수은 투여군의 78.3%의 **protein carbonyl level**을 확인할 수 있었으나, 유의적인 감소는 확인할 수 없었음. 황칠나무 잎 추출물을 투여한 경우에도 수은 투여군에 비해 81.7%의 **protein carbonyl level**을 확인할 수 있었으나, 유의적인 감소는 확인할 수 없었음. 황칠나무 줄기 추출물의 경우 **protein carbonyl level**이 더 많이 감소하여 수은 투여군의 72.5% 만을 확인할 수 있었으나, 큰 표준편차로 인해 유의적인 감소는 확인할 수 없었음 (Fig. 27).

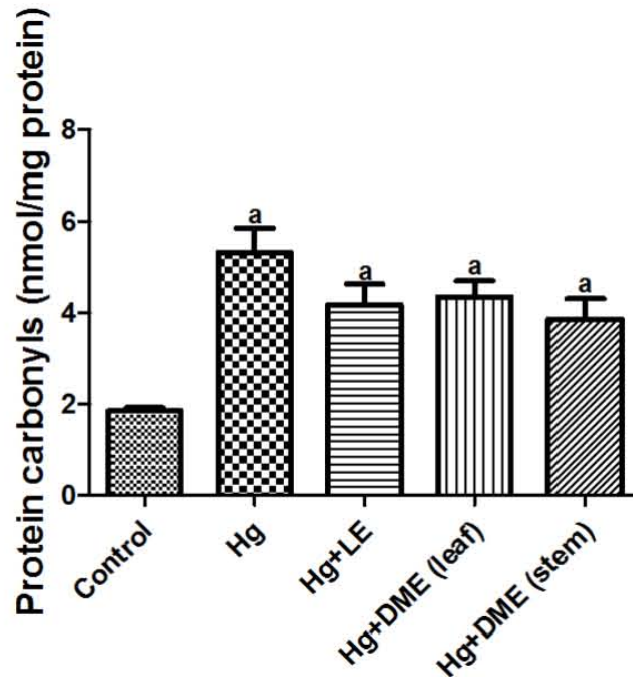


Fig. 27. Protein carbonyl levels in the hippocampus of control, Hg, Hg+LE, Hg+DME (leaf), and Hg+DME (stem) group (n = 10 per group; ^aP < 0.05 versus control group; ^bP < 0.05 versus Hg-treated group). Data are presented as the mean ± SEM.

이상의 결과를 종합해 볼 때, 납, 카드뮴, 수은 등의 중금속의 투여는 해마에서 단백질의 광범위한 변성을 유도하는 것을 확인할 수 있었음. 레몬추출물, 황칠나무 잎 추출물, 황칠나무 줄기 추출물의 투여는 단백질 변성의 감소를 확인할 수 있었으며, 특히 황칠나무 줄기 추출물이 단백질 변성의 감소 능력이 가장 뛰어났으며, 황칠나무 잎 추출물이 그 다음으로 좋았음.

라. 해마(hippocampus)에서 중금속에 의한 항산화 효소의 확인 - total sulfhydryl

해마에서 대조군의 경우 **total sulfhydryl** 농도는 **8.308 ug/mg protein**으로 관찰되었으며, 납 투여군에서는 **total sulfhydryl** 농도가 유의적으로 감소하여 **5.306 ug/mg protein**으로 관찰되어 대조군에 비해 **63.9%**의 수준으로 관찰되었음. 레몬추출물, 황칠나무 잎 추출물, 황칠나무 줄기 추출물을 투여한 경우 **total sulfhydryl** 농도가 증가하는 것을 관찰할 수 있었으며, 각각 납투여군에 비해 **127.1%**, **131.1%**, **132.1%**의 **total sulfhydryl**을 확인할 수 있었음. 그러나 **total sulfhydryl** 증가에 의한 유의성은 확인할 수 없었음 (Fig. 28).

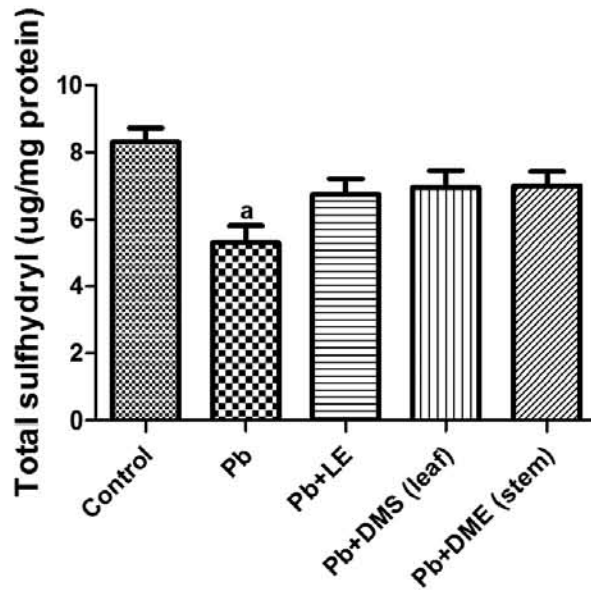


Fig. 28. Total sulfhydryl groups in the hippocampus of control, Pb, Pb+LE, Pb+DME (leaf), and Pb+DME (stem) group (n = 10 per group; ^aP < 0.05 versus control group; ^bP < 0.05 versus Pb-treated group). Data are presented as the mean ± SEM.

카드뮴을 투여한 경우 total sulfhydryl 농도는 대조군에 비해 유의적으로 감소하여 4.442 ug/mg protein으로 관찰되었으며, 대조군의 53.5% 수준에서 확인되었음. 한편 레몬추출물, 황칠나무 잎 추출물, 황칠나무 줄기 추출물을 투여한 경우 total sulfhydryl 농도가 유의적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, 특히 황칠나무 줄기 추출물의 효능이 가장 높게 관찰되었으며, 카드뮴 투여군에 비해 172.9%의 total sulfhydryl 함량을 확인할 수 있었음 (Fig. 29).

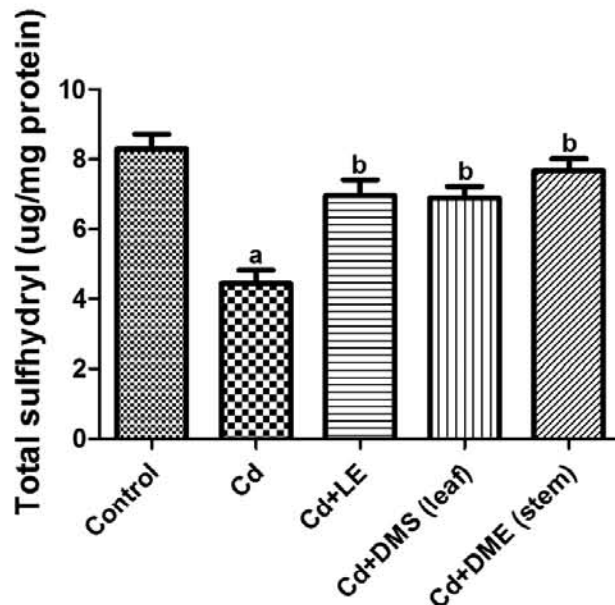


Fig. 29. Total sulfhydryl groups in the hippocampus of control, Cd, Cd+LE, Cd+DME (leaf), and Cd+DME (stem) group (n = 10 per group; ^aP < 0.05 versus control group; ^bP < 0.05 versus Cd-treated group). Data are presented as the mean ± SEM.

수은을 투여한 경우 **total sulfhydryl** 농도는 대조군에 비해 유의적으로 감소하여 **5.306 ug/mg protein**으로 관찰되었으며, 대조군의 **63.9%** 수준에서 확인되었음. 한편 레몬추출물, 황칠나무 잎 추출물, 황칠나무 줄기 추출물을 투여한 경우 **total sulfhydryl** 농도가 수은투여군에 비해 증가하는 것을 확인할 수 있었으나, 통계적인 유의성은 확인할 수 없었음. 그러나 **total sulfhydryl**을 증가시키는 효능은 레몬추출물, 황칠나무 잎 추출물, 황칠나무 줄기 추출물의 순서로 점차 증가하는 것을 확인할 수 있었음 (Fig. 30).

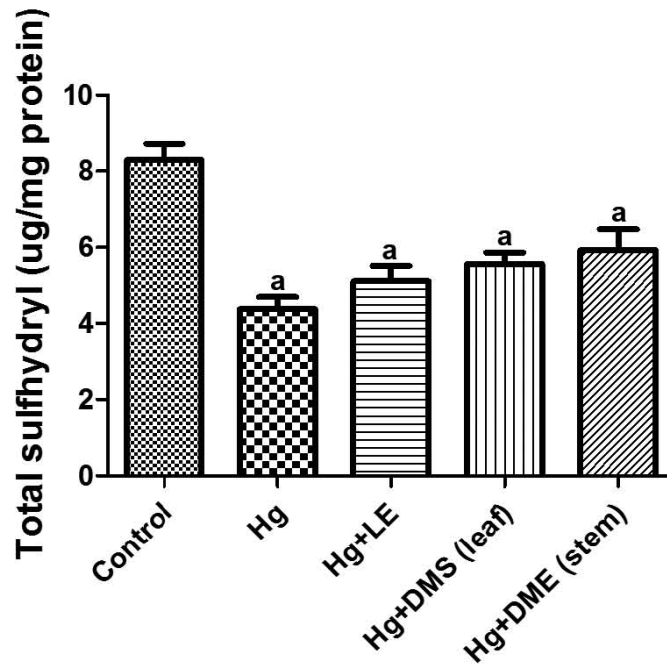


Fig. 30. Total sulfhydryl groups in the hippocampus of control, Hg, Hg+LE, Hg+DME (leaf), and Hg+DME (stem) group (n = 10 per group; ^aP < 0.05 versus control group; ^bP < 0.05 versus Hg-treated group). Data are presented as the mean ± SEM.

이상의 결과를 종합해 볼 때, 납, 카드뮴, 수은 등의 중금속의 투여는 해마에서 환원형태의 단백질에서 나타나는 **sulfhydryl**의 총량을 유의적으로 감소시키는 것을 확인할 수 있었음. 레몬추출물, 황칠나무 잎 추출물, 황칠나무 줄기 추출물의 투여는 카드뮴 투여로 인한 **sulfhydryl**의 총량을 증가시키나, 다른 중금속에는 유의적인 증가를 보이지 않음.

다. 해마(hippocampus)에서 중금속에 의한 항산화 효소의 확인 - **glutathione reductase**

해마에서 대조군의 경우 **glutathione reductase**는 **9.746**의 활성도를 나타냈으며, 납투여군에서는 유의적으로 활성도가 감소하여 **5.636**을 나타내어 대조군에 비해 **57.8%**의 활성도만을 확인할 수 있었음. 한편 레몬추출물을 투여한 경우에는 **7.378**의 활성도를 나타내어 납투여군에 비해 증가하는 것을 확인할 수 있었으나, 대조군에 비해 유의적으로 낮게 관찰되었음. 황칠나무 잎 추출물, 황칠나무 줄기 추출물을 투여한 경우에는 납추출물 투여군에 비해서 **glutathione**

reductase의 활성이 유의적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었음. 특히 황칠나무 줄기 추출물을 투여한 경우 glutathione reductase의 활성도가 9.048까지 상승하여 납투여군 대비 158.8%의 활성을 나타냈음 (Fig. 31).

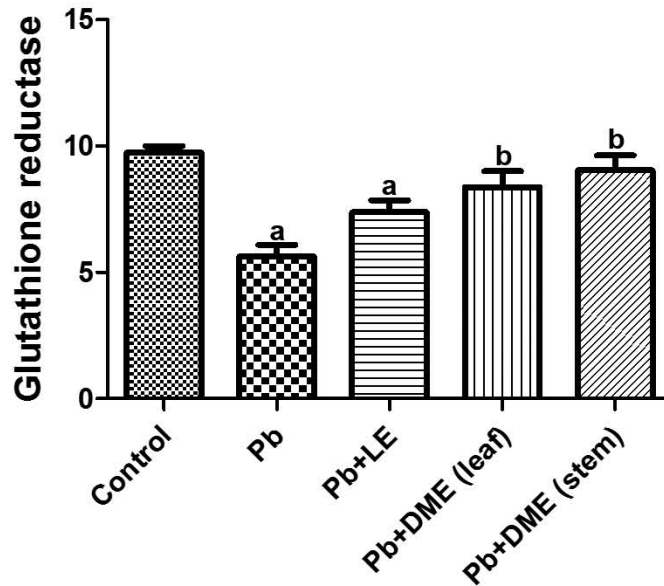


Fig. 31. Activity of glutathione reductase in the hippocampus of control, Pb, Pb+LE, Pb+DME (leaf), and Pb+DME (stem) group (n = 10 per group; ^aP < 0.05 versus control group; ^bP < 0.05 versus Pb-treated group). Data are presented as the mean ± SEM.

카드뮴 투여군에서는 glutathione reductase의 활성도가 유의적으로 감소하여 3.684를 나타내었으며, 대조군에 비해 37.8%의 활성도만을 확인할 수 있었음. 레몬추출물을 투여한 경우 카드뮴 투여군과 큰 차이를 확인할 수 없었던 반면에 황칠나무 잎 추출물, 황칠나무 줄기 추출물을 투여한 경우에는 카드뮴투여군에 비해서 glutathione reductase의 활성이 유의적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, 유사한 수준의 glutathione reductase 활성을 나타내었음 (Fig. 32).

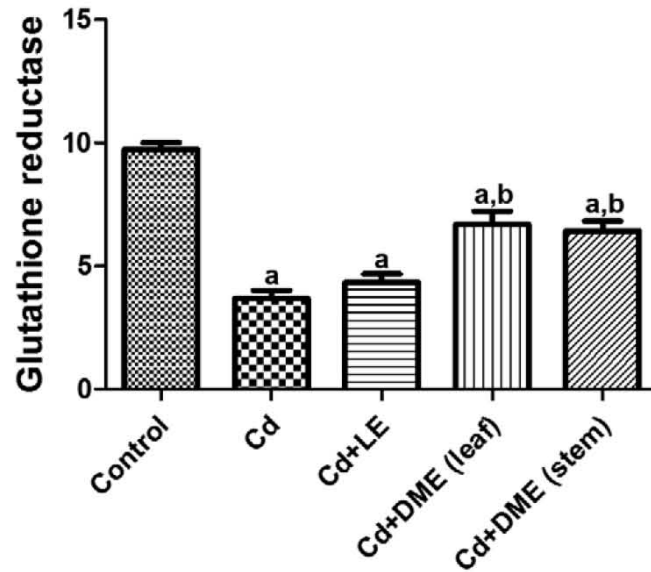


Fig. 32. Activity of glutathione reductase in the hippocampus of control, Cd, Cd+LE, Cd+DME (leaf), and Cd+DME (stem) group (n = 10 per group; ^aP < 0.05 versus control group; ^bP < 0.05 versus Cd-treated group). Data are presented as the mean ± SEM.

수은 투여군에서는 glutathione reductase의 활성도 역시 유의적으로 감소하여 5.012를 나타내었으며, 대조군에 비해 51.4%의 활성을 나타내었음. 한편 레몬추출물 투여군의 경우 수은투여군에 비해 오히려 약간 감소한 glutathione reductase 활성을 나타냈으며, 통계적인 유의성은 확인할 수 없었음. 황칠나무 잎 추출물, 황칠나무 줄기 추출물을 투여한 경우에는 수은투여군에 비해서 glutathione reductase의 활성이 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, 특히 황칠나무 잎 추출물을 투여한 경우 수은투여군에 비해서 유의적인 수준의 증가를 확인할 수 있었음 (Fig. 33).

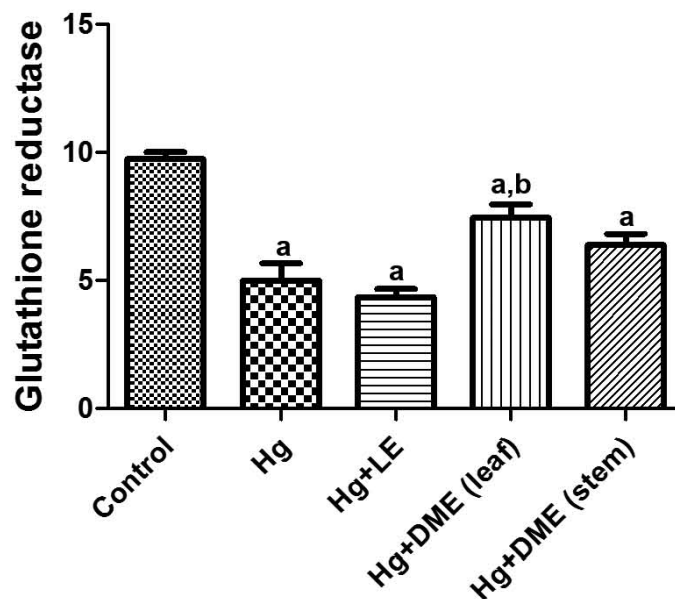


Fig. 33. Activity of glutathione reductase in the hippocampus of control, Hg, Hg+LE, Hg+DME (leaf), and Hg+DME (stem) group (n = 10 per group; ^aP < 0.05 versus control group; ^bP < 0.05 versus Hg-treated group). Data are presented as the mean ± SEM.

이상의 결과를 종합해 볼 때, 납, 카드뮴, 수은 등의 중금속의 투여는 해마에서 **glutathione reductase**의 활성을 억제하는 것을 확인할 수 있었으며, 황칠나무 잎 추출물, 황칠나무 줄기 추출물은 중금속에 의해서 억제된 **glutathione reductase**의 활성을 증진시켜주는 것을 확인할 수 있었으며, 특히 황칠나무 잎 추출물의 효과가 가장 뛰어났음. 그러나 레몬추출물의 경우 **glutathione reductase**의 활성에 큰 영향을 미치지 않는 것을 확인할 수 있었음.

바. 해마(hippocampus)에서 중금속에 의한 항산화 효소의 확인 - **glutathione-S-transferase**

해마에서 중금속의 투여에 의한 **glutathione**관련 효소의 변화를 확인하기 위하여 **Glutathione-S-transferase (GST)** 활성도는 기질로 **1-chloro-2,4-dinitrobenzene**를 이용하여 **Haig** 등(Habig et al., 1984)이 기술한 방법에 의해 측정하였음. **NADPH**를 이용하여 산화된 **glutathione**을 환원된 형태의 **glutathione**으로 변환시키는 **glutathione reductase (GR)**의 농도는 **Horn**과 **Burns**에 의한 방법(Horn and Burns, 1978)으로 측정하였음.

해마에서 대조군의 경우 **glutathione-S-transferase**의 활성은 **8.146**의 활성도를 나타냈으며, 납 투여군에서는 유의적으로 활성도가 증가하여 **11.362**를 나타내어 **139.5%**의 활성도만을 확인할 수 있었음. 한편 레몬추출물, 황칠나무 잎 추출물, 황칠나무 줄기 추출물을 투여한 경우에는 **glutathione-S-transferase**의 활성이 납투여군에 비해 감소하는 것을 확인할 수 있었으나, 통계적인 유의성을 관찰되지 않았음 (Fig. 34).

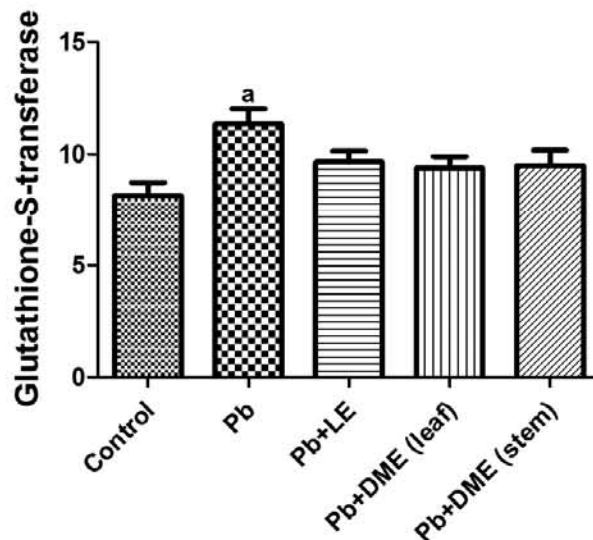


Fig. 34. Activity of glutathione-S-transferase in the hippocampus of control, Pb, Pb+LE,

Pb+DME (leaf), and Pb+DME (stem) group (n = 10 per group; ^aP < 0.05 versus control group; ^bP < 0.05 versus Pb-treated group). Data are presented as the mean ± SEM.

카드뭴 투여군에서도 glutathione-S-transferase의 활성도가 유의적으로 증가하여 14.234를 나타내었으며, 대조군에 비해 147.7%의 활성도를 확인할 수 있었음. 레몬추출물을 투여한 경우 카드뭴 투여군에 비해 glutathione-S-transferase의 활성이 감소하는 것을 확인할 수 있었으나, 감소에 대한 유의적인 차이는 관찰되지 않았으며, 대조군에 비해 유의적으로 높은 활성을 보였음. 한편 황칠나무 잎 추출물, 황칠나무 줄기 추출물을 투여한 경우에는 카드뭴투여군에 비해서 glutathione-S-transferase의 활성이 유의적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었으며, 특히 황칠나무 줄기 추출물을 투여한 군에서 감소폭이 더 큰 것을 확인할 수 있었음 (Fig. 35).

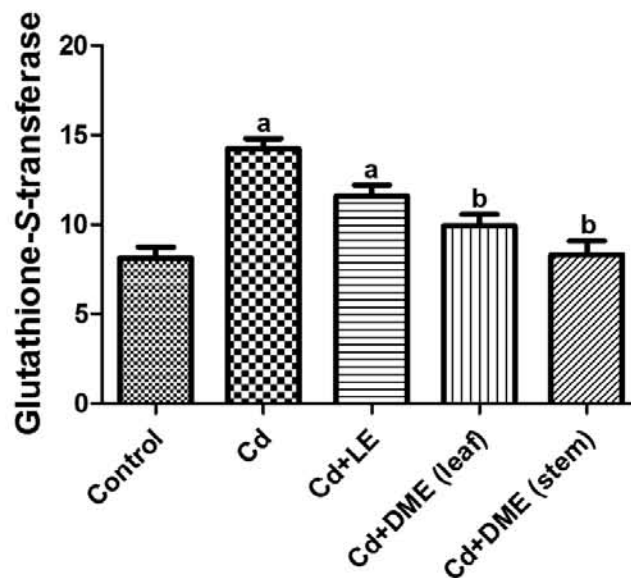


Fig. 35. Activity of glutathione-S-transferase in the hippocampus of control, Cd, Cd+LE, Cd+DME (leaf), and Cd+DME (stem) group (n = 10 per group; ^aP < 0.05 versus control group; ^bP < 0.05 versus Cd-treated group). Data are presented as the mean ± SEM.

수은 투여군에서도 glutathione-S-transferase의 활성이 증가하였으며, 13.870의 활성도를 나타내어 대조군에 비해 170.3%의 활성을 나타내었음. 레몬추출물, 황칠나무 잎 추출물, 황칠나무 줄기 추출물을 투여한 경우 수은투여군에 비해서 glutathione-S-transferase의 활성이 감소하는 것을 확인할 수 있었으나, 통계적인 유의성은 관찰할 수 없었음 (Fig. 36).

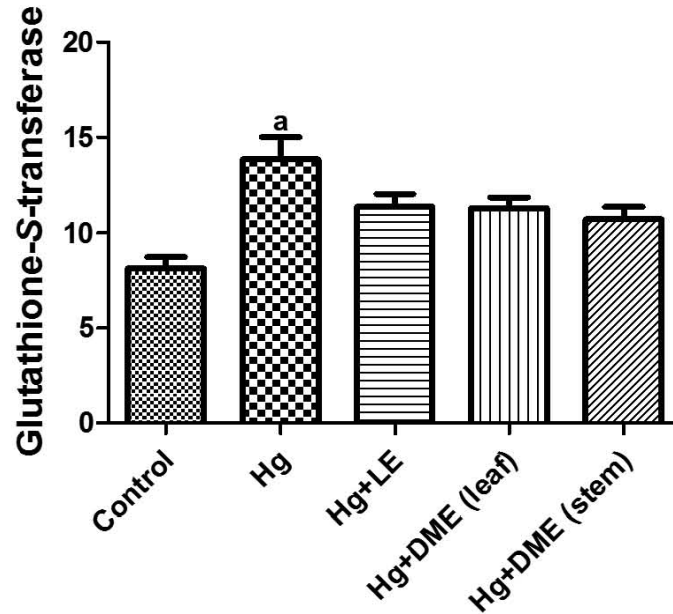


Fig. 36. Activity of glutathione-S-transferase in the hippocampus of control, Hg, Hg+LE, Hg+DME (leaf), and Hg+DME (stem) group (n = 10 per group; ^aP < 0.05 versus control group; ^bP < 0.05 versus Cd-treated group). Data are presented as the mean ± SEM.

이상의 결과를 종합해 볼 때, 납, 카드뮴, 수은 등의 중금속의 투여는 해마에서 glutathione-S-transferase의 활성을 증가시키는 것을 알 수 있었으며, 레몬추출물, 황칠나무 잎 추출물, 황칠나무 줄기 추출물은 중금속에 의해서 증진된 glutathione-S-transferase의 활성을 억제시켜 주는 것을 확인할 수 있었으며, 이러한 활성의 감소는 카드뮴에서 가장 크게 관찰되었음.

11. 레몬 및 황칠나무 추출물의 항산화효소 평가

카드뮴, 납, 수은 등에 투여로 인하여 생체 내에서 산소가 발생되며, 이로 인해 세포막의 지질산화를 유도하기 때문에 체내에서 지질의 비율이 가장 높은 뇌를 대상으로 실험을 계획하였으며, 특히 외부의 변화에 민감한 해마(hippocampus)를 대상으로 본 실험을 수행하였음. 랫드를 대조군, 중금속(납, 카드뮴, 수은) 투여군, 중금속+레몬추출물, 중금속+황칠나무 잎 추출물, 중금속+황칠나무 줄기 추출물 투여군으로 나누어 각 군당 5마리씩을 대상으로 하였으며, 양쪽 해마를 별도로 채취하여 10개의 샘플을 가지고 지질산화의 지표물질로 알려진 malondialdehyde (MDA) level을 ELISA를 이용하여 확인하였으며, Cu,Zn-superoxide dismutase, catalase의 activity는 Cayman Chemical에서 구입하여 ELISA로 측정하였음.

카드뮴을 투여한 군의 경우 MDA level이 급격하게 증가하였으며, 레몬추출물 및 황칠나무 추출물 모든 군에서 카드뮴의 농도를 유의적으로 감소시키는 것을 확인할 수 있었음 (Fig. 37). 또한 SOD activity도 카드뮴 투여군에서 유의적으로 감소하였으며, 레몬추출물 및 황칠나무 추출물 모든 군에서 SOD activity가 현저하게 증가한 것을 확인할 수 있었으며, 대조군과 유사한

정도의 **SOD activity**를 나타내었음. **Catalase activity** 또한 카드뮴 투여에 의해서 현저하게 감소하는 경향을 확인할 수 있었으나, 레몬추출물 및 황칠나무 추출물 투여군의 경우 **catalase activity**가 약간만 증가하는 것을 확인한 바, 레몬 추출물 및 황칠나무 추출물의 모든 군들이 **SOD**에 특히 강한 자극을 나타내었음 (Fig. 37).

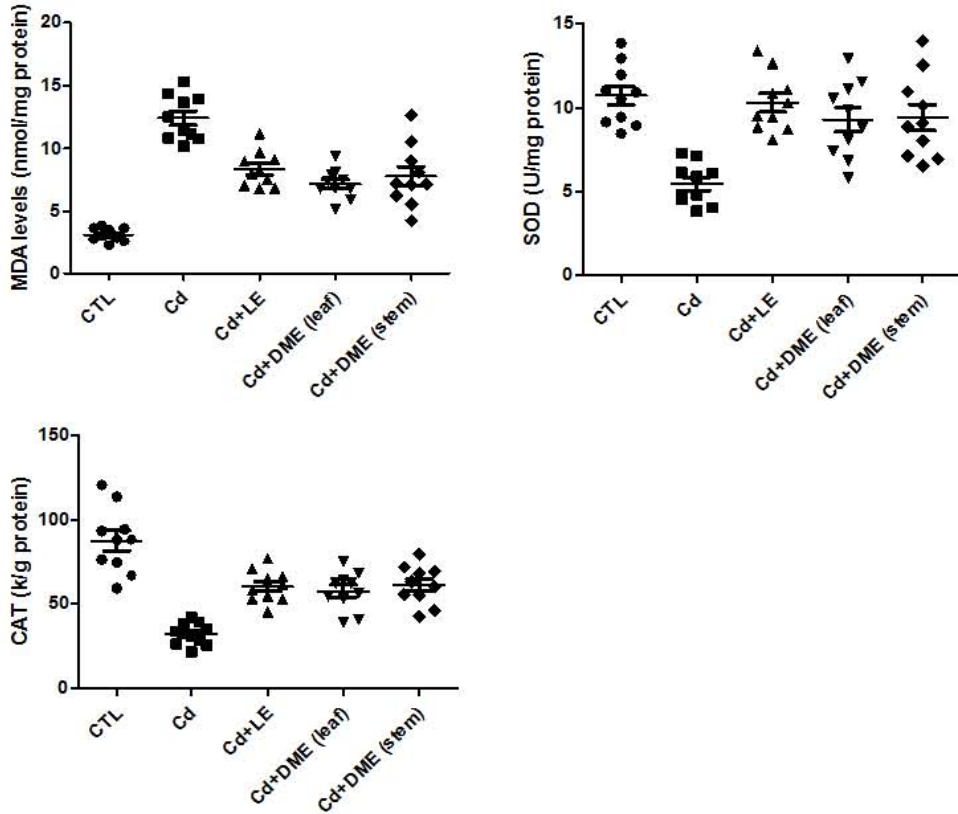


Fig. 37. MDA, SOD activity, catalase activity in the hippocampus at 4 weeks after cadmium and/or extract (lemon extract, Dendropanax extract from leaf and stem).

납을 투여한 군의 경우 **MDA level**이 해마에서 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, 레몬추출물 및 황칠나무 추출물 모두에서 납의 농도를 감소시키는 것을 확인할 수 있었으나, 레몬추출물 투여군의 경우 통계적인 유의성을 확인할 수 없었으나, 황칠나무 추출물을 투여한 경우에는 유의성을 확인할 수 있었음. 한편 **SOD activity**는 납을 투여한 경우에 오히려 상승하는 패턴을 확인할 수 있었으며, 레몬추출물 및 황칠나무 추출물을 투여한 경우에 **SOD activity**가 감소하는 것을 확인할 수 있었음. 이러한 이유는 좀 더 구체적인 실험을 보충해야만 될 것으로 판단되어진다. 한편 **catalase**의 경우에는 납 투여에 따른 큰 변화를 확인할 수 없었음 (Fig. 38).

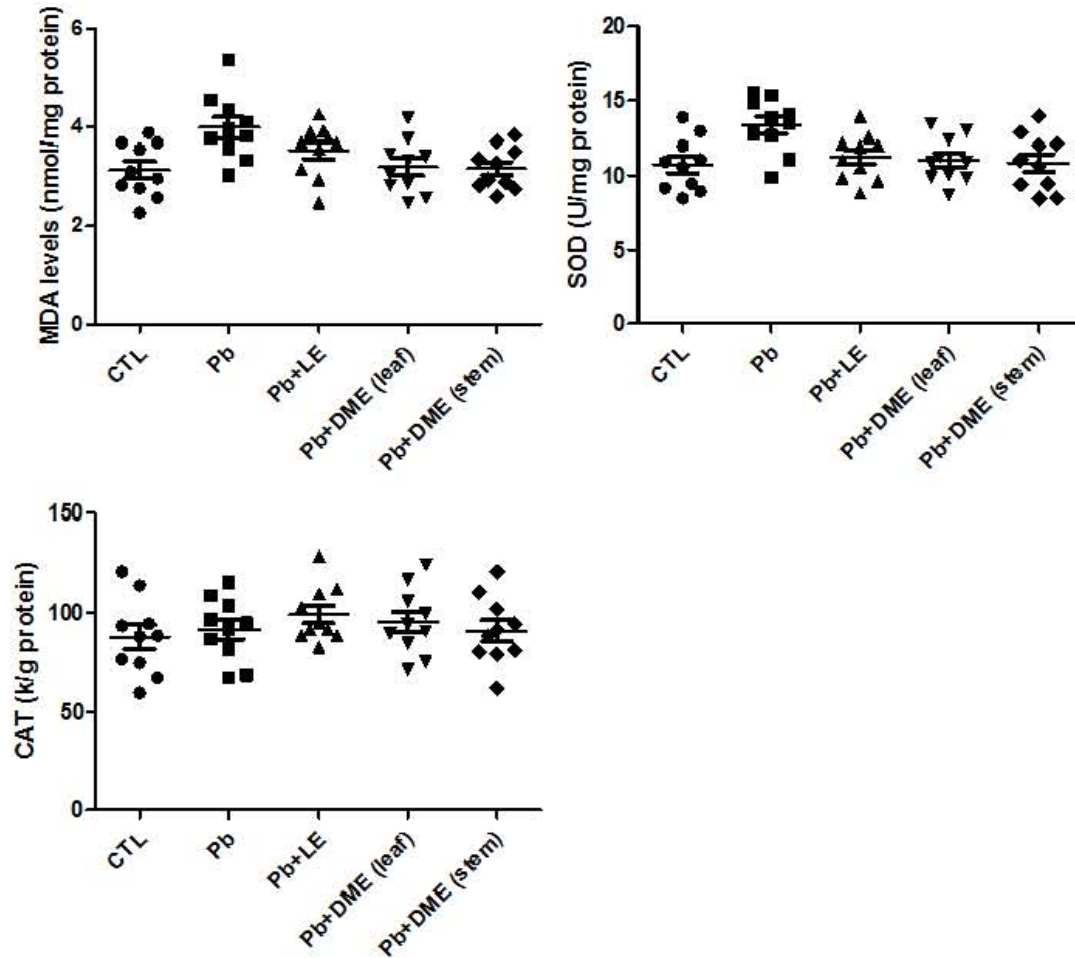


Fig. 38. MDA, SOD activity, catalase activity in the hippocampus at 4 weeks after lead and/or extract (lemon extract, Dendropanax extract from leaf and stem).

수은을 투여한 군에서 수은에 의해 **MDA level**이 급격하게 증가하는 것을 확인할 수 있었음. 그러나 레몬추출물 및 황칠나무 잎 추출물을 투여한 군에서 **MDA level**은 수은을 단독으로 투여한 군과 유사하게 관찰이 되었음. 한편 황칠나무 줄기 추출물을 투여한 군에서는 **MDA level**이 현저하게 감소되는 것을 확인할 수 있었음. **SOD activity**는 수은을 투여한 군에서 유의적으로 감소가 되었으며, 레몬추출물, 황칠나무 잎, 황칠나무 줄기 추출물을 투여한 경우에 급격하게 증가하는 것을 확인할 수 있었으나, **catalase**의 경우에는 큰 증가를 유도하지 못했음 (Fig. 39).

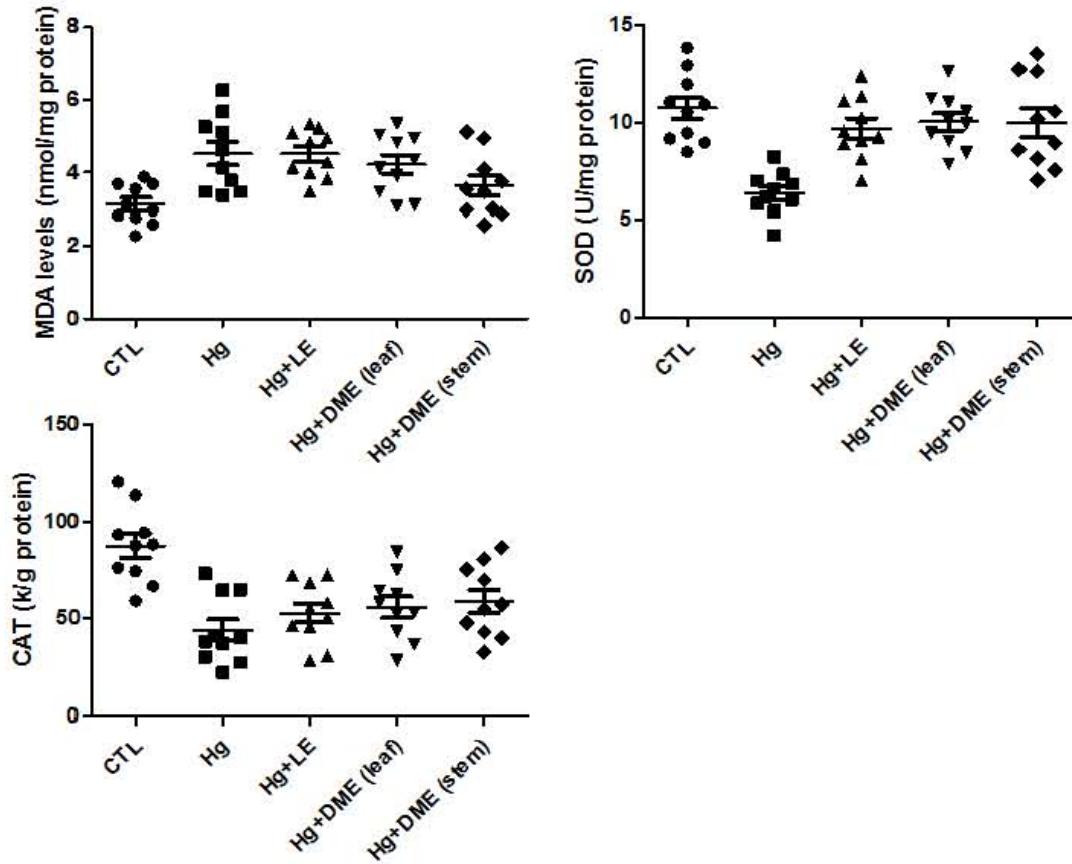


Fig. 39. MDA, SOD activity, catalase activity in the hippocampus at 4 weeks after mercury and/or extract (lemon extract, Dendropanax extract from leaf and stem).

12. 황칠나무 잎 추출물의 시제품 제작

가. 제품 유형: 황칠나무 잎 주정추출물을 주성분으로 하는 경질캡슐 제제

나. 안전성: 황칠나무 잎은 식품의약품안전청의 식품원재료 분류상 식용 가능한 원료로 등재되어 있다(첨부 5, 황칠나무 잎에 관한 식약처 자료 참조). 따라서 이들을 원료로 하여 제조한 가공제품은 안전에 문제가 없다고 판단된다.

다. 성 상

(1) 황칠나무 잎 주정추출물(본약: Dr-100) : 이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 연한 황갈색의 분말을 함유한 진한 적갈색의 경질캡슐

(2) 결정셀룰로오스 등(위약: Dp-100) : 이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 연한 황갈색의 분말을 함유한 진한 적갈색의 경질캡슐

라. 주성분 :

재료	제품	본약	위약
황칠나무 잎	주정추출물	75.0%	
결정 셀룰로오스		24.0%	59.852%
스테아린산	마그네슘	1.0%	
유당혼합분말 (유당 99%, 텍스트린 1%)			40.0%
식용색소	황색		0.12%
식용색소	적색		0.022%
식용색소	청색		0.006%

마. 내용량 : 300 mg/capsule (1회 1캡슐 섭취, 1일 1회 섭취)

바. 시험 제품의 가공

(1). 본약은 황칠나무 잎 부위를 정제수로 이물질을 제거한 뒤에 80°C의 열풍건조기 내에 48 시간동안 방치하여 수분을 제거 한다. 제거된 황칠나무 잎을 파쇄 한 뒤 각 원료를 칭량하고 질량의 7배의 주정에탄올에서 초음파 처리를 한 후 7일간 침지시켜 추출한다. 후에 여과지로 여과를 한뒤 여과액을 회전식 진공 증발기로 감압 농축하여 건조시켜 분말화 한다. 시험제재 황칠나무 잎의 주정추출물에는 결정 셀룰로오스, 스테아린산 마그네슘 외에 다른 부재료는 첨가하지 않는다. 황칠나무 잎 추출물의 분말은 1일 1캡슐 분량으로 제조하여 피험자에 제공한다.

(2). 위약은 결정 셀룰로오스와 유당 분말을 혼합하였고, 시험제제와 같은 색을 내도록 식용색소 황색, 적색, 청색을 첨가한 후 제조하고 시험제제와 동량을 동일한 방법으로 제조하여 제공한다.

사. 품질관리: 정상, 수분(%), 대장균군, 납(mg/kg), 비소(mg/kg), 나트륨(mg/100 g), 봉해시험 검사는 “한국건강기능식품협회 부설 한국건강기능식품연구원”에 검사를 완료한 상태이며, 검사 성적서의 사본은 <별첨 6>에 첨부하였음.

아. 보존료(g/kg) : 첨가하지 않았음

자. 건강기능식품 중 캡슐 제품의 일반적인 제조 공정

- (1) 원료 : 식품공전에서 정하는 기준 및 규격에 적합한 원료를 자체규격검사를 거쳐 적합품에 한하여 원료로 사용한다.
- (2) 칭량 : 위의 원료를 제조배합비율에 따라 전자저울(1 g~60 kg)로 각각 미생물의 혼입 우려가 없는 원료 처리실에서 원료를 칭량한다.
- (3) 혼합 : 각 원료를 혼합기에 투입한 후 균질성이 확보되도록 충분히 혼합한다.
- (4) 타정 : 혼합된 원료를 캡슐기에서 펀치를 사용하여 1 캡슐당 300 mg 단위로 일정하게 캡슐링한다.
- (5) 중간검사 : 선별이 완료된 정제를 중간검사를 실시한다.(성상, 중량)
- (6) 포장 : 중간검사결과 적합한 시험제품을 자동계수기를 사용하여 일정량을 PE병에 충전한다.
- (7) 최종검사 : 포장이 완료에 한하여 일반적인 기준규격에 의한 검사를 실시한다.(성상, 수분, 대장균군, 납, 비소, 나트륨, 봉해시험)

차. 목표 피험자수의 수 및 산출 근거

연구실에서 기존에 실험되었던 연구과제의 연구결과를 바탕으로 하여 대상자를 산출하였으며 그 산출근거의 통계학적 계산식은 식품의약품안전처의 인터넷 자료인 “임상연구 설계와 분석을 위한 기본통계(48-49쪽; D-8.3 두 군의 평균비교)”에 기술되어있는 식을 사용하였다.

$$n = \frac{[A+B]^2 \times 2 \times SD^2}{DIFF^2} \quad \text{공식 [1]}$$

n= 각 군에 요구되는 연구대상수

SD= 일차 결과변수의 표준편차

DIFF = 임상적으로 유의한 효과 크기

A= 유의수준에 의존(표참조)

B= 검정력에 의존(표참조)

A와 B에 대한 표

유의수준	A	검정력	B
5%	1.96	80%	0.84
1%	2.58	90%	1.28

여기서는 검정력 완료에 한하여 80% 유의수준 0.5%로 하여 산출하였으며, 랫드를 통한 실험에서 카드뮴 투여군과 카드뮴/황칠나무 잎 추출물 투여군을 기준으로 하였다. 동물실험에서 표준편차는 12.8로 관찰되었으며, DIFF값은 11이상 차이가 있을 때라고 평가하였다. 그 결과 n 값은 22이므로 군당 22명이나, 추적손실률 5%와 대상자의 순응도 80%를 감안하였을 경우 최소 29명의 피험자가 필요하게 된다. 따라서 2배 하였을 경우 약 60명을 필요로 하게 된다.

카. 복용량 설정사유 :

피험자가 복용함에 있어 불편함이 없도록 1일 1캡슐을 기본으로 하여 선행연구에 대한 독성실험을 바탕으로 하여 충분히 독성이 없는 범위의 용량 내에서의 제제 성형이 가능한 황칠나무 잎 추출물 300mg을 설정하였음. 또한 rat를 이용한 NIH에 동물실험에서 유의한 결과를 얻었으며, 2014년 NIH guidance에 의해 Equivalent surface area dosage conversion factor를 통해 1/7의 factor를 곱해서 용량을 설정한 결과 동물에서 100 mg/kg의 용량이었기 때문에 사람에서 $100 \text{ mg/kg} \times 1/7 \times 60 \text{ kg}$ (사람의 표준) = 857 mg의 용량을 사용함. 본 연구에서는 300 mg을 설정하여 투여하였다.

타. 통계분석

모든 통계분석은 SAS 프로그램을 이용하여 처리하고 시험군 간 평균값의 차이는 two-way ANOVA를 이용하여 유의수준(P<0.05) 수준 내에서 검증한다.

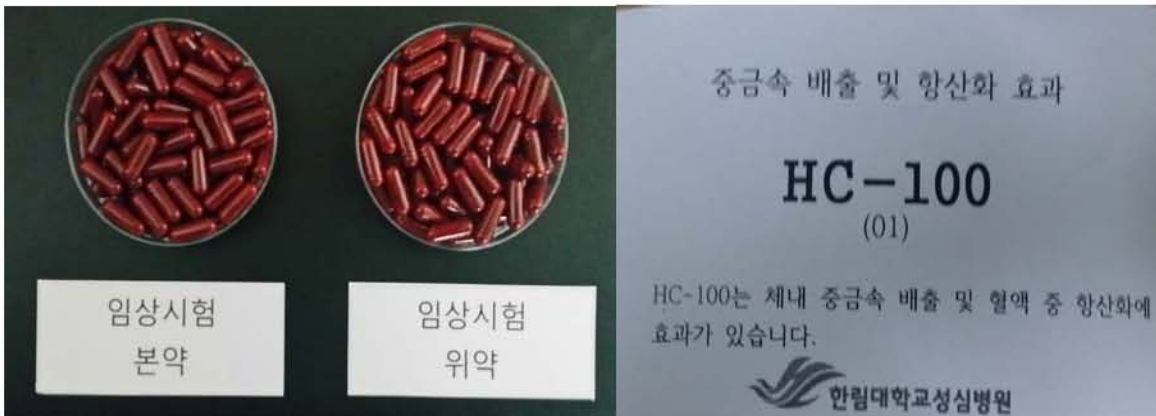


Fig. 40. 시제품 제작

▶ 식품 원재료명 검색

본 자료는 구축중인 자료로 완성된 자료가 아니므로 **식용가능여부 판단**을 위해서는 반드시 **식품의약품안전처**로 문의하여 주시기 부탁드립니다.

○ 상세내역

English 검색초기화면 프린트

영계료명	황칠나무	
이명	노란꽃나무, 풍하이(楓黃梨), Korean Dendropanax	
학명	<i>Dendropanax morbifera</i> Nakai <i>Textoria morbifera</i> (Lev.) Nakai (이명)	
생약명		
원재료 분류	식물	
식용가능 여부	가능	
	제한적	잎 / 줄기 / 뿌리
	불가능	
※ 해당부위를 클릭하시면 부위별 상세정보를 확인 할 수 있습니다.		



이미지 출처 : 식품의약품안전청

1 2 3 4

클릭하시면 원래 크기로 보실 수 있습니다.

특성/분포	두릅나무과(Araliaceae)의 상록 활엽 교목, 높이는 15미터 정도이며 열매는 핵과로 10월에 걸쳐 익는다. 나무껍질에 상처를 내면 황칠이라는 노란 액체가 나오는데 가구의 칠감으로 쓴다. 줄기, 잎과 뿌리는 식용으로 쓰기도 한다. 우리나라 특산품으로 남쪽 지방의 산에 분포한다. [1]
주요성분(부위별)	
안전성/독성	
식용위 용도 (이용부위)	약용, 관상용, 도료 [수액은 가구의 칠용], 열효용(수액), 원예 및 조경용
기타	한국특산식물로 황칠으로 가구를 칠하는데 염료로 사용한다. 관상가치가 높은 식물이다.
근거자료	한국과학식물회, 식물과학사전, (주)교문사, 2012 침적한국식물도감, (주)교학사, 543p(1998) 원계있는우리나무4, 현암사, 94p(2000) 침적한국본초도감, (주)교학사, 349p(2000) 침적한국기중식물도감, 아카데미서적, (1996) 한국민속식물, 아카데미서적(1996)
최종수경일	2012-05-31 14:30
NDSL 검색	황칠나무 <input checked="" type="checkbox"/> 검색 ※ NDSL(과학기술정보 서비스 플랫폼)의 검색 서비스를 이용하고 싶으신 분은 검색을 클릭하세요.

Table. 41. 황칠나무에 관한 식약처 자료

제 D2014061202 호

검 사 성 적 서

검체명	Dp-100	제조일자 (유통기한)	
의뢰인	업체명	(주)이부른	성 명
	주소	경기도 이천시 부박읍 황푸로 1893 (외2필지)	박종문
제조번호		접수년월일	2014-06-25
검사의뢰목적	참고용	검체접수번호	D2014061202

귀하가 우리 연구원에 검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.

검사관련 총 책임자: 김 권 회

시험항목	결과	검사담당자
성상	이더, 이취가 없고 고유한 향미가 있는 연한 황갈색의 분말을 함유한 진한 적갈색의 정질캡슐	김영옥
수분(%)	1.23%	김혜윤
대장균군	음성	박현희
납(mg/kg)	0.0144mg/kg	류미진
비소(mg/kg)	0.0046mg/kg	류미진
나트륨(mg/100g)	15.36mg/100g	남은진
붕해시험	적합	박상진

2014 년 7 월 2 일

한국기능식품연구원



(사)한국건강기능식품협회 부산 한국기능식품연구원 <http://www.khfi.re.kr> 전화번호 051-772-1111 FAX(051)628-0400-1

제 D2014061203 호

검 사 성 적 서


검체명	Dr-100	제조일자 (유통기한)	
의뢰인	업체명	(주)이부른	성명
	주소	경기도 이천시 부박읍 황부로 1893 (외2필지)	
제조번호		접수년월일	2014-06-25
검사의뢰목적	취고용	검체접수번호	D2014061203

귀하가 우리 연구원에 검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다. 검사관련 총 책임자: 김 권 회

시험항목	결과	검사담당자
성상	이더, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 연한 황갈색의 분말을 함유한 진한 적갈색의 정질캡슐	김영옥
수분(%)	4.49%	김혜윤
대장균군	음성	박현희
납(mg/kg)	0.0466mg/kg	류미진
비소(mg/kg)	0.1900mg/kg	류미진
나트륨(mg/100g)	54.81mg/100g	남은진
붕해시험	적합	박상진

2014년 7월 2일

한국기능식품연구원



(사)한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원 <http://www.khfi.re.kr> 전화번호 02-777-2276 FAX(02)7028-0400-1

Table. 42. 황칠나무 잎 추출물 임상시험용 본약(DR-100) 및 위약(DP-100) 시험성적서

13. 황칠나무 잎 추출물의 임상시험평가

주관연구기관에서 제공받은 황칠나무 잎 추출물과 위약을 평가하기 위해 임상시험자를 모집 하였으며, 시험자 모집은 병원에 내원한 환자들이 쉽게 볼 수 있는 곳에 포스터를 제작하여 붙였으며 (Fig. 43), 대학 내에 설치되어 있는 IRB에 모든 내용을 승인받아 진행하였음 (IRB승인 번호: 2014-074). 피험자는 60명 모집을 목표로 하여 피험자 모집을 하였음.

한림대학교 동탄성심병원 임상연구심의위원회(IRB)/기관생명윤리심의위원회

중금속배출, 항산화 임상시험 참여자 모집

- 임상시험 목적**
 - 황칠나무 잎 추출물로 만들어진 건강기능식품의 체내의 중금속 배출 및 항산화 효과확인
- 참여대상**
 - 정상생활을 하고 있는 20세-60세의 성인 남녀
- 참여방법**
 - 첫 방문 포함하여 60일간 총 3회(30일에 1회) 병원 방문
- 참여혜택**
 - 임상시험의 모든 검사 비용 및 임상시험 제품 제공
 - 마지막 방문 시 MRI검사를 통한 건강진단
 - 방문 별 소정의 교통비 지급

문의처
책임자: 신경외과 문승명 교수
담당자: 오유리 간호사(근골격센터)
Tel. 031-8086-2412

본 임상시험은 "농림수산식품기술기획평가원"의 지원을 받아 진행됩니다.

Fig. 43. 피시험자 모집을 위한 포스터

임상연구를 위한 위약과 평가용약은 제작자와 시험평가자간에 이중맹검법(double blind test)으로 실시하였으며, 피험자에게는 피험자 설명문을 반드시 읽도록 하였으며, 동의서를 받았으며 그 내용은 아래와 같음.

피험자 설명문 및 동의서

1. 임상 연구 제목

황칠나무 잎 주정추출물의 섭취가 성인의 중금속 배출 및 혈액 중 항산화에 미치는 영향

2. 시험 책임자

연구책임자 문승명
직 명 부교수
소 속 한림대학교 동탄성심병원 신경외과
주 소 경기도 화성시 큰재봉길 7
E-mail

3. 개요

이 연구는 황칠나무 잎 주정추출물의 섭취를 통해 체내 중금속 배출을 용이하게 하고, 이를 통해 항산화 효능을 증진시키는 연구입니다. 귀하는 건강한 성인이기 때문에 이 연구에 참여하도록 권유받았습니다. 이 연구를 수행하는 동탄성심병원 소속 신경외과 문승명교수(한림대학교 동탄성심병원 신경외과, 경기도 화성시 큰재봉길 7, e-mail: ☎, H.P.)가 귀하에게 이 연구 참여 과정에 대하여 설명해 줄 것입니다. 이 연구는 자발적으로 참여 의사를 밝히신 분에 한하여 수행 될 것이며, 귀하께서는 본 임상 연구에 참여 의사를 결정하기에 앞서, 본 임상연구가 왜 수행되고, 귀하의 정보가 어떻게 사용될지, 본 임상연구가 어떤 것을 포함하고 있는지와 본 연구의 수행에 따른 가능한 이점, 위험, 불편함은 무엇인지에 대하여 이해하는 것이 중요합니다. 다음의 설명을 신중하게 시간을 가지고 주의 깊게 읽으시기 바라며, 필요하시면 귀하의 주치의 또는 가족이나 친구들과 상의하시기 바랍니다. 만일 어떠한 질문 사항이 있으시면 담당 연구원이 자세하게 설명해 줄 것입니다.

4. 임상시험의 배경과 목적

본 임상시험은 임상적 연구입니다.

연구목적은 정상적인 생활을 하는 사람을 대상으로 황칠나무 잎 추출물의 섭취가 안전하고 효과적인지 여부를 판단하고 평가하는 임상시험입니다. 황칠나무 잎 추출물은 전세계 보건당국의 승인을 아직 받지 않은 기능성 식품입니다. 이 기능성 식품은 중금속 배출효과가 있는 기능성 식품으로서 현재 효능에 대한 평가가 진행 중입니다. 따라서 임상시험이 진행되는 도중에 예상치 못한 합병증이 발생할 가능성이 있습니다.

본 임상시험의 참여 결정은 귀하의 의사에 달려 있습니다. 모든 사항은 귀하의 자유의사에 따라 참여를 결정하거나 포기를 결정할 수 있습니다. 또한 임상시험 도중에 언제라도 중단을 결정할 수 있으며, 이로 인하여 어떠한 불이익도 받지 않을 것입니다. 임상시험을 중단할 시에는 담당의사와 통상적인 치료방법을 상의하여 결정을 할 것입니다.

저희는 임상시험 도중 시험약과 관련된 새로운 과학적 자료나 정보, 안전성과 관련된 새로운 사실이 알려지면 여러분에게 즉시 알려드려 임상시험의 계속 참여 여부를 결정할 수 있도록 하겠습니다. 여러분이 임상시험의 계속 참여를 원하셔도 다음과 같은 경우에는 의료진이 임상시험에서 탈락시킬 수 있습니다. (임상시험 참여가 환자에게 해롭거나 임상시험에서 허락하지 않는 다른 치료가 추가로 필요할 경우, 환자가 지시를 따르지 않는 경우, 임신의 경우, 임상시험이 취소되는 경우)

아래의 설명을 읽어 보신 후 임상시험에 참여를 원하시면 자발적으로 서명 동의를 하신 분에 한하여 임상시험을 진행하게 됩니다.

5. 연구 약물

의약품의 설명 : 황칠나무 잎 추출물을 이용한 기능성 식품은 (주)이푸른에서 개발되어진 기능성 식품으로 경질캡슐 제제로 만들어 졌으며 현재 국내 평가를 진행 중인 약물입니다.

본 기능성 식품은 알레르기, 복부 통증 등의 부작용을 일으킬 수 있으며 시험약물의 사용상 주의사항(제외대상, 부작용, 주의사항)은 다음과 같습니다.

신중투여

약용식물 섭취시 발열반응을 보이는 자

부작용

알레르기, 복부 통증, 두통, 발열

주의사항

정해진 일일 1 일 1 캡슐(경질캡슐) 섭취의 권장량을 반드시 지켜야 합니다.

현재까지 알려지지 않은 부작용이 있을 수 있으며, 연구약이 태어나 수유부에 영향이 있을지는 아직 알려지지 않았습니다. 그러므로 임신 및 수유중인 여성은 이번 임상시험에 참여하실 수 없습니다. 또한 임상시험 기간 중 임신이 의심되면 담당의사에게 즉시 알려주셔야 됩니다.

6. 연구방법

1) 임상시험의 절차

이번 연구는 정상적인 생활을 하는 일반인을 대상으로 이 연구에서 정한 적합한 조건에 맞는 일반인을 대상으로 합니다. 대상 피험자 중에서 귀하의 자발적인 참여의사로 임상시험을 시작하게 됩니다.

임상시험 시작 전에 의사의 진찰과 문진, 검사, 투여약물 등에 대한 질문을 하게 되며 임상시험 기준에 적합하면 임상시험에 등록이 됩니다.

본 임상시험에는 60 명의 환자가 참여할 것입니다.

연구기간은 대략 60 일의 기간이 소요됩니다.

연구기간 동안 대략 3 회 병원을 방문하셔야 됩니다.

연구기간동안 경질캡슐제제로 제공되는 알약은 1 일 1 캡슐 섭취하셔야 합니다.

1 회 병원 방문 시에 1 시간이 소요됩니다.

각각의 방문 시에 다음과 같은 검사를 받게 됩니다(혈액검사, 소변검사, 모발 중 중금속 검사 등등). 방문 시 마다 시행되는 검사는 모두 병원에서 일반적으로 하는 검사입니다. 진행되는 검사는 일반적으로 시행되는 검사로 환자에게 어떠한 위험도 없습니다.

방문 시마다 환자분이 느끼거나 발생하는 부작용은 즉시 담당 의사에게 알려야 하며 발생한 부작용에 대하여 즉각적인 감시와 치료를 받습니다.

2) 임상시험의 설계

여러분 중에서 무작위로 시험약(황칠나무 잎 추출물 포함) 또는 위약을 투여 받게 됩니다. 시험약이나 위약을 받을 확률은 1:1 이며 임상시험이 끝날 때까지 담당의사를 포함한 어느 누구도 어떤 약물을 복용하고 있는지 알 수 없습니다. 하지만 응급상황에서는 복용약물을 파악하여 적절한 조치를 받으실 수 있습니다.

3) 시험약의 복용방법

시험약의 포장

포장된 1 개의 통안에 60 캡슐 + 6 캡슐의 제제가 들어있음.

복용방법

1 일 1 캡슐씩 복용

임상시험 기간 중에 시험약 외에 다른 약은 복용을 중단하는 것이 좋으며 복용 시에 꼭 임상시험 담당의사와 상의를 하셔야 됩니다.

7. 표준치료 방법(임상시험 이외의 다른 치료방법)

일반적인 중금속 배출에 대한 다른 치료방법에 대하여 알려드리겠습니다.

중금속 배출에 대한 치료방법은 일반적으로 체외배설의 방법이 알려져 있으며, 다른 방법으로는 항산화제의 정맥 주사를 통해 중금속을 소변으로 배출하는 킬레이션 요법이 개발 되었으며 효과는 중금속 배출이고 부작용은 몸살이나, 두통 어지러움 등이 있을 수 있습니다.

8. 피험자에게 예견되는 이득

임상시험 기간 중에 투여하는 제제가 여러분의 중금속 배출에 도움을 줄 수 있지만 항상 질환의 치료에 도움이 되는 것은 아닙니다. 본 임상시험에 필요한 검사 및 시험약은 모두 무상으로 여러분께 제공됩니다.

이번 임상시험으로 여러분이 직접적인 이익을 보지 못할 수도 있습니다. 하지만 여러분께서 참여하여 주신 임상시험의 정보를 이용하여 더 나은 중금속 배출 기능성 식품 개발에 이용될 수 있습니다.

9. 임상시험의 중도 탈락

임상시험은 어디까지나 본인의 자발적인 의사에 의하여 참여를 결정하는 것입니다. 그리고 임상시험에 참여하신 후에도 언제든지 참여 취소를 하실 수 있으며 이로 인한 불이익은 전혀

없습니다. 또한 임상시험 참여 취소 후에도 이미 알려져 있는 치료법에 의하여 치료를 계속 받으실 수 있습니다.

하지만 여러분께서 임상시험에 참여를 원하셔도 다음과 같은 이유들을 가지고 계시면 임상시험에 참여하실 수 없습니다.

1) 췌장질환, 부신피질이나 뇌하수체 질환, 호르몬 제제나 약물 복용자, 소화기관 수술환자, 고혈압, 당뇨병, 자가면역성, 대사성 및 유전성 간질환자

2) 임산부

다음에 해당되는 경우, 귀하는 귀하의 동의 없이도 본 연구의 참여로부터 제한될 수 있습니다.

A. 시험 담당의사의 지시를 따르지 않음

B. 연구 참여와 관계 없는 중대한 질환이 발생함

C. 시험 담당의사가 귀하에게 있어 연구가 최선의 방법이 아니라고 결정함

D. 시험기간 동안 임신을 하게 되거나, 임신 할 의도가 있거나 수유 중인 경우

귀하의 임상시험 참여가 도중에 중단되면, 몇 가지 검사를 받을 수 있으며 이는 귀하의 안전을 보호하기 위한 것입니다.)

그리고, 여러분이 임상시험에 참여하실 경우 다음과 같은 사항들은 지켜주셔야 합니다.

1) 1 일 1 정을 반드시 지키며, 복용하지 아니하거나 지키지 못한 경우 반드시 담당의사에게 사실을 통보

2) 본 임상시험 외의 다른 임상시험의 참가 불가

10. 연구 관련 새로운 정보의 지속적 제공

본 임상시험 기간 중 귀하의 시험 참여 여부를 결정하는데 영향을 줄 수 있는 새로운 유의한 정보가 얻게 되는 즉시 귀하 또는 귀하의 대리인에게 알려 드릴 것입니다.

11. 피해발생 시 피험자 보상 (의료적 치료/보상) 대책

임상시험 기간 중에 저희는 여러분의 안전을 지키고자 최선의 노력을 다할 것입니다.

만약 중대한 유해사례 발생 시 빠르고 적절한 조치를 취하여 가능한 피해를 최소화 할 것입니다.

본 임상시험에 참여하면서 여러분이 시험약으로 인하여 피해가 발생하는 경우 진료, 검사, 치료를 받을 수 있도록 관리하며 증상이 완치될 때까지 추후 관리를 할 것입니다. 또한 타당한 의학적 치료에 최선을 다할 것이며, 치료를 받은 비용은 제공할 것입니다.

추가적인 금전적인 보상에 관한 내용:

저희는 병원 방문에 대하여 별도의 교통비를 지불하며 추가적인 방문에 대하여서도 교통비를 지급할 것입니다.

본 임상시험의 일부로 요구되는 약, 검사, 등에 대하여 여러분께 비용을 요구하지 않으며 모든 비용은 저희가 지불을 합니다. 하지만 본 임상시험 외에 이전의 치료나 다른 질병으로 인한 치료에 소요되는 비용은 여러분이 직접 지불하셔야 합니다. 본 임상시험에 참여하셔서 피해가 있었다고 생각되시면 담당의사나 저희 직원에게 연락을 주십시오.

12. 비밀 보장

임상시험의 일부로 여러분의 개인기록, 의료기록, 검사결과, 건강정보 등이 수집되게 됩니다. 이러한 정보는 임상연구 담당의사, 연구담당 직원이 이러한 정보를 사용하며 임상시험을 수행하기 위하여 본 연구를 감독하는 정부기관과 병원 내 임상시험 심사위원회도 여러분의 정보를 볼 수 있습니다. 동의서에 여러분이 동의를 한다는 것이 이러한 정보의 사용을 허락한다는 뜻입니다.

하지만 여러분의 신원을 파악할 수 있는 기록은 비밀로 보장될 것이며 건강 정보는 여러분의 성명을 가린 채로 제공되기 때문에 자료상으로 여러분이 어디에 사는 누구인지, 어떤 사람인지 알 수 없습니다. 또한 임상시험의 결과가 출판될 경우에도 여러분의 신상 정보는 비밀상태로 유지될 것입니다.

여러분은 언제라도 임상시험 담당자에게 통보하여 동의를 취소할 수 있습니다. 여러분이 동의하신 것을 철회하면 임상시험 담당자는 여러분의 의학 정보를 더 이상 사용할 수 없습니다. 하지만 동의 철회와 더불어 임상시험 참여 자격을 상실하며 더 이상 본 임상시험 에서 제공하는 치료를 받으실 수 없습니다.

13. 자발적 참여

본 임상시험에 참여하시는 것은 귀하에게 달려 있습니다. 귀하는 언제든지 시험에 참여하지 않기로 결정할 수 있고 또한 시험을 그만 둘 수 있습니다. 귀하가 본 연구에 참여하지 않아도 아무런 불이익을 받지 않으며 귀하의 결정은 향후 귀하가 치료를 받는 것에 영향을 미치지 않습니다.

14. 임상시험 관련 책임자 및 연락처

임상시험에 관한 질문에 임상시험 담당의사 또는 임상시험 담당 직원이 답변을 할 것입니다. 임상시험 기간 중 본인이나 법정대리인이 언제라도 질문을 하실 수 있으며 모든 의문점에 대하여 연락을 주시기 바랍니다. 부작용을 경험하시거나 상해 질병 등이 발생하였을 경우에 즉시 연락을 주십시오.

임상시험 담당의사 : 문승명
소 속 : 한림대학교 동탄성심병원 신경외과
주 소 : 경기도 화성시 큰재봉길 7,
전 화 번 호 :
임상연구심의위원회 전화번호 :

피험자 동의서

1. 본인은 임상연구에 대해 구두로 설명을 받고 상기 피험자 설명문을 읽었으며 담당 연구원과 이에 대하여 의논하였습니다.
2. 본인은 위험과 이득에 관하여 들었으며 나의 질문에 만족할 만한 답변을 얻었습니다.
3. 본인은 이 연구에 참여하는 것에 대하여 자발적으로 동의합니다.
4. 본인은 이후의 치료에 영향을 받지 않고 언제든지 연구의 참여를 거부하거나 연구의 참여를 중도에 철회할 수 있고 이러한 결정이 나에게 어떠한 해가 되지 않을 것이라는 것을 알고 있습니다.
5. 본인은 이 설명서 및 동의서에 서명함으로써 의학 연구 목적으로 나의 개인정보가 현행 법률과 규정이 허용하는 범위 내에서 연구자가 수집하고 처리하는데 동의합니다.
6. 본인은 이 동의서 사본을 받을 것을 알고 있습니다.

피험자 성명 _____ 서명 _____ 날짜 (년/월/일) _____

동의서 받은 연구원 성명 _____ 서명 _____ 날짜 (년/월/일) _____

연구책임자 성명 _____ 서명 _____ 날짜 (년/월/일) _____

(해당 되는 경우)

법적 대리인 성명 _____ 서명 _____ 날짜 (년/월/일) _____

입회인 성명 _____ 서명 _____ 날짜 (년/월/일) _____

피험자 동의서 (취약한 피험자)

1. 본인은 본원 IRB SOP 제44조에 근거한 취약한 피험자로서 본 연구 참여와 관련된 이익에 대한 기대 또는 참여를 거부하는 경우 조직 위계의 상급자로부터 받게 될 불이익을 우려하여 자발적인 참여 결정에 영향을 받지 않았습니다.
2. 본인은 이 연구에 참여하는 것에 대하여 자발적으로 동의합니다.
3. 본인은 이후의 치료에 영향을 받지 않고 언제든지 연구의 참여를 거부하거나 연구의 참여를 중도에 철회할 수 있고 이러한 결정이 나에게 어떠한 해가 되지 않을 것이라는 것을 알고 있습니다.
4. 본인은 이 설명서 및 동의서에 서명함으로써 의학 연구 목적으로 나의 개인정보가 현행 법률과 규정이 허용하는 범위 내에서 연구자가 수집하고 처리하는데 동의합니다.
5. 본인은 이 동의서 사본을 받을 것을 알고 있습니다.

_____ 서명 _____ 날짜 (년/월/일)

_____ 서명 _____ 날짜 (년/월/일)

_____ 서명 _____ 날짜 (년/월/일)

(해당 되는 경우)

_____ 서명 _____ 날짜 (년/월/일)

_____ 서명 _____ 날짜 (년/월/일)

가. 피시험자의 군 배정

피시험자 60명을 모집하였으며, 30명은 위약, 30명은 황칠나무 잎 추출물 투약군으로 나누었으며, 이중맹검법을 시행하였기 때문에 성별이 고려되지 않은 상태로 시험을 진행하였음. 그 결과 위약투약군의 경우 남자가 9명, 여자가 21명이었으며, 황칠나무 잎 추출물 투약군의 경우 남자가 16명, 여자가 14명이었으며 (Table 10), 위약, 황칠나무 잎 추출물 모두 2개월간 섭취를 하도록 하였으며, 섭취 전에 혈액을 채취하였음. 1개월 후에 내원하여 복용 후 나타나는 증상 청취 및 복용에 대한 중간 점검을 하였으며, 2개월 후에 다시 내원하여 혈액을 채취하였음.

Table 10. 피시험자 수 및 평균연령

	위약투약군		황칠나무 잎 추출물투약군	
	남성	여성	남성	여성
피시험자수	9	21	16	14
연령	29.00±11.95	27.14±5.83	29.11±7.82	32.57±10.09

나. 복용지도 및 복용 후 증상 관찰

피시험자를 대상으로 하루에 한 캡슐씩 아침 식후 30분에 섭취도록 지도를 하였음. 피시험자가 내원하였을 때 복용에 따라 나타나는 증상들을 청취한 결과 아침식사를 하지 않고 섭취한 경우 약한 속쓰림 등의 증상을 호소한 피시험자가 2명 있었으며, 그 이외에는 큰 부작용은 없는 것으로 나타났음. 이외에 전날 술을 마신 피시험자에서 숙취가 적다고 느끼는 환자가 4명 있어, 숙취해소에 대한 추후 연구가 필요한 것으로 생각됨.

다. 혈액에서의 중금속 결과

혈액에서의 중금속 양은 대학병원 내에 있는 혈액분석기를 이용하여 측정하였음. 카드뮴의 경우 위약을 먹은 피시험자, 황칠나무 잎 추출물을 먹은 피시험자 모두에서 감소하는 것을 확인할 수 있었으며, 이러한 감소는 여성보다는 남성에서 특징적으로 나타났으며, 남성의 경우 위약투약군에 비해 황칠나무 잎 추출물을 먹은 피시험자에서 254.5%의 배출을 촉진시키는 것을 확인할 수 있었으나, 오차가 큰 관계로 통계적인 유의성은 확인할 수 없었음 (Fig. 44).

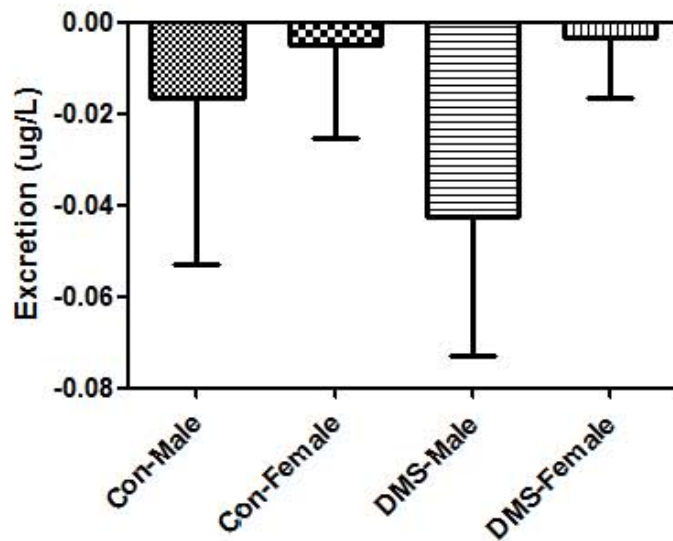


Fig. 44. Serum levels of cadmium before and after placebo and DMS in male and female. Data are shown to differences in cadmium levels before and after placebo and DMS treatment. Data are presented as the mean ± SEM.

수은의 경우 또한 위약을 먹은 피시험자, 황칠나무 잎 추출물을 먹은 피시험자 모두에서 감소하는 것을 확인할 수 있었음. 카드뮴과는 달리, 위약을 먹은 피시험자보다는 황칠나무 잎 추출물을 먹은 피시험자에서 수은의 배출량이 현저하게 배출이 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, 특히 남성보다는 여성에서 배출이 현저하게 늘어나는 것을 확인할 수 있었으며, 12배의 배출 촉진 효과를 보였음. 그러나 오차가 커서 통계적인 유의성은 확인할 수 없었음 (Fig. 45).

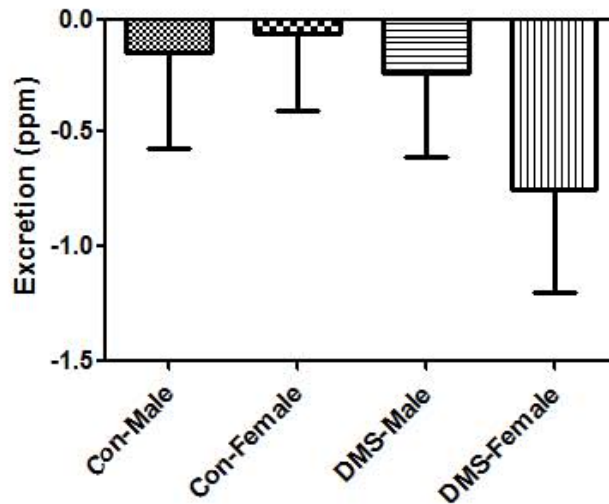


Fig. 45. Serum levels of mercury before and after placebo and DMS in male and female Data are shown to differences in mercury levels before and after placebo and DMS treatment. Data are presented as the mean \pm SEM.

한편 납의 경우 위약을 먹은 피시험자, 황칠나무 잎 추출물을 먹은 피시험자 모두에서 납의 혈중 농도가 증가하는 형태를 보였으며, 황칠나무 잎 추출물을 먹은 피시험자의 증가가 더 많은 것을 관찰할 수 있었음. 이러한 데이터는 혈중 납농도가 현저히 높은 몇 명의 피시험자에 의해 데이터가 나타나는 현상이라고 생각됨 (Fig. 46).

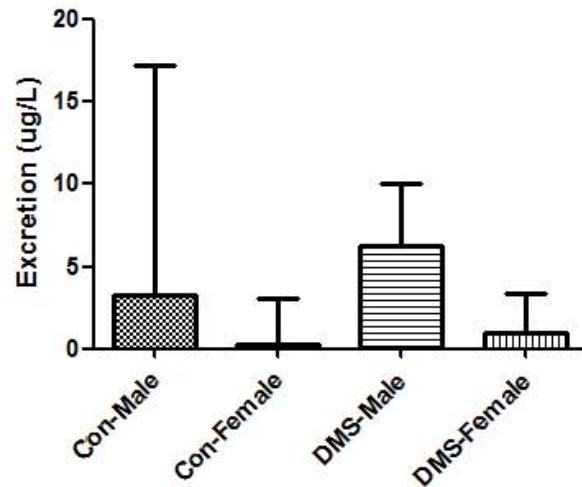


Fig. 46. Serum levels of lead before and after placebo and DMS in male and female Data are shown to differences in mercury levels before and after placebo and DMS treatment. Data are presented as the mean \pm SEM.

라. 혈액에서의 항산화 효소 결과

혈액에서 항산화에 미치는 영향을 확인하기 위하여 우선 총 단백질 양을 확인하였음. 총 단백질 양은 위약투약군, 황칠나무 잎 추출물 투약군 모두에서 증가하는 것을 확인할 수 있었음. 특히 황칠나무 잎 추출물을 섭취한 경우 총 단백질의 증가가 가장 큰 것으로 나타났으나, 통계적인 유의성은 확인할 수 없었음 (Fig. 47).

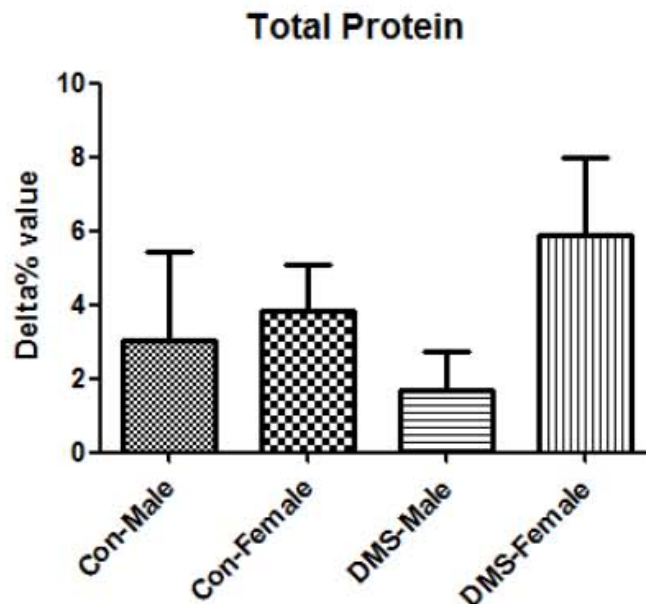


Fig. 47. Serum levels of total protein before and after placebo and DMS in male and female Data are shown to differences in total protein levels before and after placebo and

DMS treatment. Data are presented as the mean \pm SEM.

혈액에서 항산화에 미치는 영향을 확인하기 위하여 대표적인 항산화 효소인 **superoxide dismutase (SOD) level**을 확인하였음. SOD level은 위약투약군 및 황칠나무 잎 추출물 투약군 모두에서 증가를 확인할 수 있었으며, 황칠나무 잎 추출물을 투약 받은 여성의 경우 위약투약 여성에 비해 통계적으로 유의한 수준의 증가를 확인할 수 있었음 (Fig. 48).

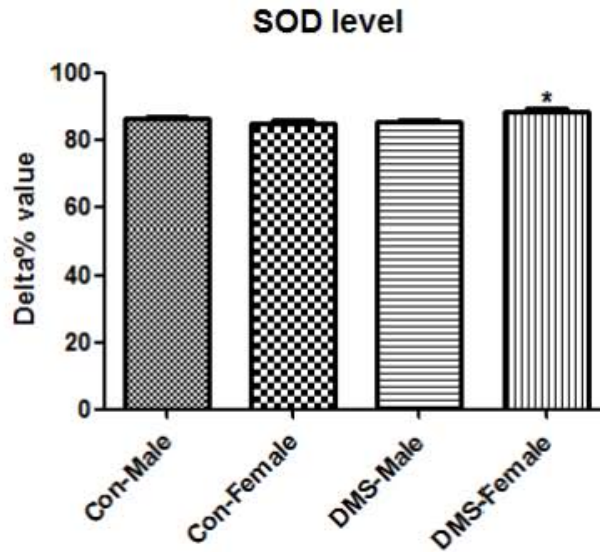


Fig. 48. Serum levels of superoxide dismutase (SOD) before and after placebo and DMS in male and female. Data are shown to differences in SOD levels before and after placebo and DMS treatment. Data are presented as the mean \pm SEM.

한편 다른 항산화 효소인 **catalase level**을 혈액에서 확인한 결과 **catalase level**은 위약투약군 및 황칠나무 잎 추출물 투약군 모두에서 큰 변화를 나타내지 않았음. 다만 황칠나무 잎 추출물을 투약한 피시험자군에서 감소를 나타냈으나, 통계적인 유의성은 확인할 수 없었음 (Fig. 49).

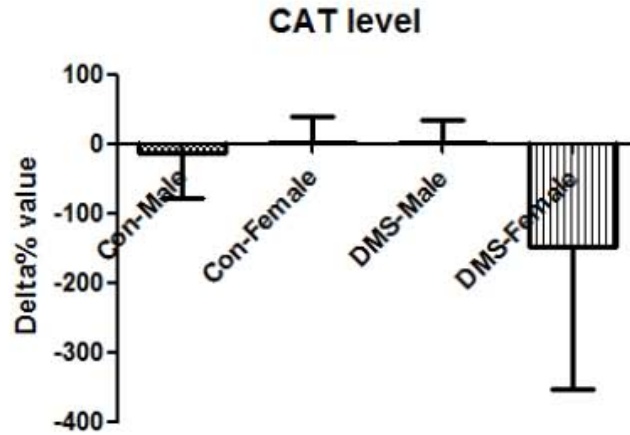


Fig. 49. Serum levels of catalase before and after placebo and DMS in male and female Data are shown to differences in catalase levels before and after placebo and DMS treatment. Data are presented as the mean \pm SEM.

혈액에서 산화적 손상을 확인하기 위하여 malondialdehyde (MDA) level을 확인하였음. 그 결과 MDA level은 남성보다는 여성에서 높게 관찰되었으며, 위약투약군 및 황칠나무 잎 추출물 투약군 모두에서 큰 변화를 나타내지 않았음 (Fig. 50).

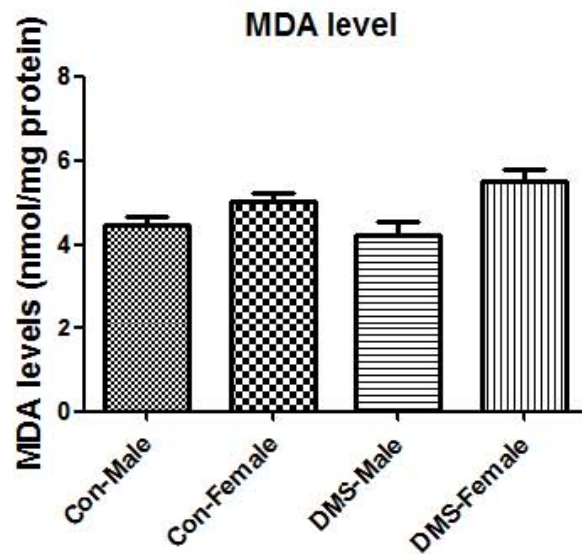


Fig. 50. Serum levels of malondialdehyde (MDA) before and after placebo and DMS in male and female Data are shown to differences in MDA levels before and after placebo and DMS treatment. Data are presented as the mean \pm SEM.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

연차	평가항목	비중 (%)	개발목표치	달성도	달성도 (%)
1 차 년 도	1. 추출물 확보	10	유효 추출물 2건	황칠나무, 레몬추출물등 유효추출물 확보	100
	2. 동물실험 용량설정 근거 마련	5	독성자료 확보 2건	세포독성시험 완료, 제2협동연구기관 동물실험연구 전 독성근거자료 마련완료	100
	3. 세포실험단계, 중금속 저항효능 평가	5	중금속저항 유효 1건	후보 원료 사용으로 인한 중금속 으로부터 세포 보호효과 확인 유전자발현 확인으로 통한 매커니즘 확인	100
	4. in-vitro 연구, 항산화 효능 평가	10	항산화 유효 1건	DPPH Assay, ABTS Assay, DNA strand breaks, Analysis of apoptotic cells 방법등을 통한 추출물의 항산화 효능 확인	100
	5. 동물실험연구, 독성평가	5	독성평가 완료 1건	식약청 고시 의약품 독성 평가 기준에 준하여 연구	100
	6. 동물실험연구, 중금속배출 평가	10	중금속 배출 유효 1건	혈액, 배설물 분석을 통한 중금속 검출	100
2 차 년 도	7. 동물실험연구, 항산화 평가	5	항산화 유효 1건	혈액 및 장기에서 항산화 효소 확인	100
	8. 임상시험 진행	10	중금속 배출에 따른 항산화 효능 유효 1건	혈액 및 조직에서 중금속 배출 확인, 혈액에서 활성산소 및 항산화효소 측정	100
	9. 제품개발	10	제품 개발 1건	중금속 배출 관련 제품 개발	50
	10. 개별인정형 신청	10	1건	상기 연구내용을 기반으로 개별 인정 신청	0
	11. 특허	10	2건	특허 출원 2건	100
	12. 논문	10	2건	논문 게재 1건	50

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

1. 산업화 및 실용화 계획

- 중금속배출(디톡스)관련은 식약처에서 인정하는 개별인정 품목이 아니기 때문에 이와 관련한 제품은 빠른 제품화를 통하여 시장 진입 예정.
- 다만 본 연구결과 및 제품에 대하여 ‘중금속 배출을 통한 항산화에 도움을 줄 수 있음’에 대한 개별인정을 받을 수 있을 것으로 판단되어 이를 목표로 지속적인 개선을 진행하여 개별인정 취득을 통한 신뢰도 높은 기능성 식품을 제품화 하여 시장에 진입하고자 함.
- 국내에는 2012년도에 레몬의 중금속 배출효능에 대한 광고가 많았으며, 그에 따른 제품의 수 및 시장의 규모도 확대되었지만, 제품에 대한 학술적 근거가 부족하여 과장광고 및 복용자의 부작용도 우려되고 있는 바, 현재는 그 시장이 많이 쇠퇴되었다. 그러나 중국발 황사 및 미세먼지의 증가와 일본의 방사능 등으로 인한 수산물에서의 중금속 섭취가 증가함으로 그 시장은 점차적으로 증가할 것으로 보고 있다. 따라서 연구과제의 수행을 통하여 제품의 안전성을 확보하였으며, 효능에 대한 학술적 근거가 마련된 제품의 개발, 시장에 진입하고자하는 발판을 마련하였다.
- 본 연구를 통해 캡슐제형을 적용하여 임상에 이용했지만, 추후 지속적인 연구개발로 미세먼지 흡입을 막을 수 있는 마스크에 적용하는 제품 또는 껌 등의 일반식품에 적용, 의약품 등의 여러 용도로의 제형 다양화 연구에 투자하여 소비자 니즈에 맞는 제품을 추가 개발하는 계획을 가지고 있다.

2. 특허 및 논문확보 계획

- 기존에 존재하는 황칠나무를 이용한 특허는 단순한 음료용 개발 및 *in vitro*에서의 단순 실험만으로는 특허들이 대부분이었다. 본 연구과제는 더욱 심화하여 *in-vivo*, 임상시험 단계의 연구를 진행하였으며, 특히 중금속이 치명적으로 작용하는 뇌에 대하여 소재의 사용에 따른 중금속 배출 및 중금속 독성에 대한 저항 효능을 확인, 항산화능력 개선 효과를 파악하여 특허출원을 2건 진행하였다. 따라서 기존 특허와의 차별성 및 진보성이 가능함으로 특허등록은 가능할 것으로 판단된다.
- SCI급 해외논문 1건은 채택되었으며, SCI급 해외논문 1건은 지금 투고중에 있다. 본 연구 논문들의 발표는 황칠나무의 강력한 항산화 효능 및 중금속 배출 효능을 분석하여 황칠나무의 잎 추출물은 식품으로써 고부가가치를 창출하고자 하는데 좋은 자료 확보가 가능하였다.

3. 추가 연구 및 타 연구에 활용 계획

- 황칠나무 잎 이외에도 줄기 추출물에서도 중금속 배출능에 대한 동물실험 결과가 좋게 나타났기 때문에 추후 줄기를 이용한 임상실험도 계획중에 있으며, 중금속 배출능에 대한 메카니즘의 접근을 좀 더 진행해 보는 것이 바람직하다고 판단된다. 그러면 의약품의 소재로도 가능할 것으로 판단되며, 연구성과물이 계속적으로 확보된다면 신약 후보물질로도 도전해 보는 것도 가능하다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. 디톡스, 항산화 소재에 대한 최근 동향

2000년대 초반에 들어 웰빙의 붐이 일어나면서 질 좋은 삶을 위한 운동, 식품, 의류, 환경 등의 시장이 급격히 확대되었다. 그로 인한 경제적인 효과가 지금까지도 꾸준히 늘어가고 있으며, 웰빙의 여러 분야에서 새로운 소재로 만들어진 식품관련 제품은 속속들이 출시되고 있음. 특히 큰 규모를 이루고 있는 다이어트 시장과 접목하여 디톡스 제품은 레몬을 이용한 제품을 필두로 하여 많은 종류의 소재를 다루고 있다. 레몬의 경우 디톡스의 관심으로 2012년 상반기 보다 2013년 레몬 판매량은 11.4%나 늘었으며, 해독주 관련 토마토, 양배추등의 수요도 늘어났다.(헤럴드경제, 2013). 이것은 디톡스에 대한 관심은 계속하여 늘어나고 있으며, 그에 따른 소재에 대한 시장도 같이 늘어난다는 것으로 파악됨.

또한 중금속에 의한 세포 독성은 산화적 손상에 기인한 것으로 알려져 있어, 항산화 또한 디톡스와 같은 맥락을 이룬다고 할 수 있다. 항산화에 뛰어난 효과가 있는 대표적인 물질로 안토시아닌, 플라보노이드 등이 있으며, 최근 아사이베리 열매에 풍부한 안토시아닌은 사람의 건강한 세포에 영향을 주지 않고 암세포만을 선별적으로 죽인다는 연구가 미국 피츠버그 대학 연구팀에 의해 밝혀졌고, 케리 스톨너 박사가 이끈 미국 5개 대학 공동연구팀은 쥐 실험을 통해 아사이베리가 종양을 억제하는 사실을 발견하였음.

이와 같이 지속적인 디톡스, 항산화에 대한 소재개발 및 연구가 이뤄지고 있으며, 최근에는 다이어트 등과 같은 한 가지 목적에 국한된 식품에서 나아가 건강을 되찾기 위한 방식으로 그 영역이 넓어지고 있음에 따라, 본 연구에서 다루는 황칠 나무는 많은 효능들이 밝혀져 시장에 진입할 경우 그 효과가 클 것으로 예측됨.

2. 항산화효과의 후보 소재인 황칠나무의 동향

새로운 천연자원으로 황칠나무에 대한 연구가 활발하게 이뤄지고 있다. 황칠나무는 200년간 멸종됐던 것으로 알려졌다가 최근 복원 되었으며, 국내 서남해안과 섬 지방에서만 유일하게 자생한다. 황칠나무는 두릅나무과의 나무로 *Dendropanax Morbifera*의 학명을 갖고 있으며, 학명을 풀이하면 “만병통치나무” 라고 하여 과거에서는 황실이나 왕실에서만 사용이 가능했던 것만큼 황칠의 효능은 오랫동안 인정되어 왔음. 이러한 황칠나무는 수많은 연구결과 혈액순환개선, 항 염증, 항 당뇨, 고지혈증 및 고혈압 개선, 피부노화 예방과 미백, 항암 등의 효능이 밝혀지고 있다. 하지만 황칠나무의 효능이 알려지면서 많은 건강기능식품이 생겨나고 있으나, 일부 업체들은 불분명한 원산지의 황칠나무를 원료로 사용하거나 불법으로 채집, 또는 약성이 없는 10년 미만의 어린나무를 판매하고 있는 실정임. 이에 따라 최근 2013년 10월에 서남해안황칠협동조합이 전국 8개지부로 출범을 하면서, 황칠 표준화 모델 개발과 생산자 관리시스템을 구축하여 황칠 유통을 개선하며, 항노화, 간세포 보호등에 대한 인증획득을 위한 연구를 진행한다고 밝혔음. 따라서 황칠의 시장은 계속해서 확립되고 커질 것이다. 따라서 아직 연구가 미비한 황칠의 항산화 효과를 본 연구과제를 통하여 개발된 제품은, 디톡스, 항산화 효과에 대한시장에 급속도로 커져가는 황칠에 대한 관심이 더해져 시장진입을 쉽게 할 수 있을 것으로 예상됨.

제 7 장 참고문헌

백운봉. 한국 특산품 황칠의 생리활성 연구. 31-37, 2003

문창곤. Antioxidant activity of dendropanax morbifera Lev. 23-25, 2007

이순재, 카드뮴의 해독과 Metallothionein 합성에 미치는 selenium의 영향 대구카톨릭대학교 학위논문 1993.

김미지, 홍정희, 이순재, 만성 카드뮴 중독 흰쥐에서 카드뮴 축적과 배설에 미치는 vitamin E의 영향 한국영양학회지 36(7), 691-698, 2003.

양희태, 정승일, 이영철, 윤경아, 백승화, 고삼 추출물을 이용한 해독물질의 개발 한국식품영양학회지, 15(1), 36-41, 2002.

박기문, 황진국, 신경민, 김현석, 송재환, 생약재 추출물의 nicotine 및 dioxin 해독효과 한국식품과학회지, 35(5), 980-987, 2003.

Tae kyung hyun, myeong-ok kim, hyunkyung Lee, Younjoo Kim, Euikyung Kim, Ju-sung Km. Evaluation of anti-oxidant and anti-cancer properties of dendropanax morbifera leveille. Food Chemistry 141:1947-1955(2013)

Chung IM, Kim MY, Park WH, Moon HI. Antiatherogenic activity of dendropanax morbifera essential oil in rats. Pharmazie 64(8):547-9(2009)

Uchikawa T, Maruyama I, Kumamoto S, Ando Y., Yasutake A Chlorella suppresses methylmercury transfer to the fetus in pregnant mice. J. Toxicol. Sci., 36(5), 675-680, 2011.

Li X, Feng L., Spatial distribution of hazardous elements in urban topsoils surrounding Xi'an industrial areas,(NW, China): controlling factors and contamination assessments. J. Hazard Mater., 174(1-3), 662-669, 2010.

Saito T, Kato K, Yokoqawa Y, Nishida M, Yamashita N., Detoxifaication of bisphenol A and nonylphenol by purified extracellular laccase from a fungus isolated from soil., J. Biosci. Bioeng., 98(1), 64-66, 2004.

Takagi M, Satofuka H, Amano S, Mizuno H, Equchi Y, Hirata K, Miyamoto K, Fukui K, Imanaka T., Cellular toxicity of cadmium ions and their detoxification by heavy metal-specific plant peptides, phytochelatin, expressed in mammalian cells. J.Chem., 131(2),

233-299, 2002.

Dixon DP, Cummins L, Cole DJ, Edwards R., Glutathione-mediated detoxification systems in plants., *Curr. Opin. Plant. Biol.*, 1(3), 258-266, 1998.

Moon YJ, Wang X, Morris ME., Dietary flavonoids: effects on xenobiotic and carcinogen metabolism., *Toxicol. in Vitro.*, 20(2), 187-210, 2006.

Arslanoglu H, Altundogan HS, Tumen F., Heavy metals binding properties of esterified lemon. *J. Hazard. Mater.*, 164(2-3), 1406-1413, 2009.

Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976, 72: 248-254.

Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Shaltiel S, Stadtman ER: Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 1990, 186: 464-478.

Habig WH, Jakoby WB, Guthenberg C, Mannervik B, Vander Jagt DL: 2-Propylthiouracil does not replace glutathione for the glutathione transferases. *J Biol Chem* 1984, 259: 7409-7410.

Horn H D, Burns FH. *Methods of enzymatic analysis.* (ed. Bergmeyer HV) Academic Press, New York, 1978 pp 875-879.

Jin CY, Yu HY, Park C, Han MH, Hong SH, Kim KS, Lee YC, Chang YC, Cheong J, Moon SK, Kim GY, Moon HI, Kim WJ, Lee JH, Choi YH. Oleifolioside B-mediated autophagy promotes apoptosis in A549 human non-small cell lung cancer cells. *Int J Oncol.* 2013 Dec;43(6):1943-50.

Lee JW, Kim KS, An HK, Kim CH, Moon HI, Lee YC. Dendropanoxide induces autophagy through ERK1/2 activation in MG-63 human osteosarcoma cells and autophagy inhibition enhances dendropanoxide-induced apoptosis. *PLoS One.* 2013 Dec 17;8(12):e83611.

Park SE, Sapkota K, Choi JH, Kim MK, Kim YH, Kim KM, Kim KJ, Oh HN, Kim SJ, Kim S. Rutin from *Dendropanax morbifera* Leveille protects human dopaminergic cells against rotenone induced cell injury through inhibiting JNK and p38 MAPK signaling. *Neurochem Res.* 2014 Apr;39(4):707-18.

Korciem KM, Arbid MS, Asaad GF. *Chelidonium majus* leaves methanol extract and its

chelidonine alkaloid ingredient reduce cadmium-induced nephrotoxicity in rats. *J Nat Med.* 2013 Jan;67(1):159-67.

Feng N, Guo X, Liang S, Zhu Y, Liu J. Biosorption of heavy metals from aqueous solutions by chemically modified orange peel. *J Hazard Mater.* 2011 Jan 15;185(1):49-54.

Nanjo F, Goto K, Seto R, Suzuki M, Sakai M, Hara Y. Scavenging effects of tea catechins and their derivatives on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Free Radic Biol Med.* 1996;21(6):895-902.

Hyun J, Woo Y, Hwang DS, Jo G, Eom S, Lee Y, Park JC, Lim Y. Relationships between structures of hydroxyflavones and their antioxidative effects. *Bioorg Med Chem Lett.* 2010 Sep 15;20(18):5510-3.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology.* 1992;24:145-9.

주 의

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