

발간등록번호

11-1543000-000819-01

머위를 활용한 알레르기성 천식 완화 기능성식품 개발  
(Development of Functional Food for Relaxation of Allergic  
Asthma by Using *Petasites japonicus*)

부산대학교

농림축산식품부

# 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “머위를 활용한 알레르기성 천식 완화 기능성식품 개발” 과제의 보고서로 제출합니다.

2014년 12 월 25 일

주관연구기관명 : 부산대학교

주관연구책임자 : 이 영 근

세부연구책임자 : 최 영 환

세부연구책임자 : 임 동 순

연 구 원 : 정 현 식

협동연구기관명 : (주) 천호식품

협동연구책임자 : 김 상 현

# 요 약 문

I. 제 목 : 머위를 활용한 알레르기성 천식 완화 기능성식품 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

- 한방 및 근래의 연구에서 천식에 효능이 인정되어온 머위를 활용하여 알레르기성 천식 증상 완화 기능성 식품을 개발하여 국민건강 증진과 머위의 경작 파급화로 농민소득 증대에 기여하고자
- 머위의 알레르기성 천식 완화 기능성분을 탐색하고 분리하여 구조를 분석하고
- 세포 및 질환모델동물을 이용한 약리효능 및 생리활성 검증하며
- 머위 기능성분의 추출공정을 최적화 및 시너지 효과가 있는 부원료를 선정하여 배합비율의 최적화를 통한 기능성 식품 3종 개발

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 제1세부과제: 활성분획분리법을 통한 천식 효능성분 탐색 및 구조 동정
  - 극성별 추출물의 분획화
  - 극성별 추출물로부터 천식 효능 성분의 순수분리
  - 순수분리한 물질의 구조 동정
2. 제2세부과제: 세포 및 질환모델동물을 이용한 약리효능 및 생리활성 검증
  - 세포를 이용한 신속·정확한 효능검증을 통한 기능성물질 탐색
  - Ovalbumin을 이용한 천식 동물모델의 구축
  - 항염증 효능 검증 및 신호전달 규명
  - 항천식 효능 in vitro 기능성 탐색
  - 항알레르기, 천식 질환모델동물 구축
  - 천식 질환모델동물을 이용한 추출물의 효능검증
3. 제3세부과제: 기능성 제품 개발
  - 머위의 효능성분 추출공정 최적화
  - Phyllolizydine alkaloid 제거공정 개발
  - 부원료의 선정 및 배합비율 최적화
  - 품질평가 및 유통기한 설정

#### 4. 협동과제: 제품의 제작 및 산업화

- 머위 추출공정의 실용화 및 제형 검토
- 시작품 제작 및 최종 개발품 제조

### IV. 연구개발결과

#### 1. 제1세부과제

##### **활성추적분리법을 통한 천식 효능성분 탐색 및 구조 동정**

- 머위 부위별 용매를 달리하여 추출한 추출물의 6종의 암세포에 대한 MTT assay를 한 결과 항암 등에 관하여 조사한 결과 부위에 추출용매에 따라서 세포의 생존율이 달랐는데, 극성이 낮은 용매로 추출할수록 세포의 생존율이 감소하였다.
- 머위로부터 항아러지에 효능을 나타내는 성분을 activity-guided purification 방법으로 분리한 결과 항알레르기 효과가 높은 bakkenolide B와 신물질인 petatewalide B를 순수분리하였다.
- 머위의 채취 부위 및 시기별 지표성분인 bakkenolide B의 함량을 평가함으로써 원료소재의 표준화가 이루어 졌음
- 지표성분의 최다 함량시기를 결정함으로써 고품질의 기능성 제품의 개발 방향 제시
- 부원료인 어성초로부터 3-5종, 수세미로부터 2종의 물질을 순수분리하였으며, 현재 항천식 효과를 검증 중에 있음

##### **머위의 부위별 극성용매 추출물이 6종 암세포의 생존율에 미치는 영향**

- 머위의 잎, 엽병 및 근경을 각각 hexane, EtOAc, BuOH 및 물추출물에 대하여 6종의 암세포인 AGS (human gastric cancer), HepG2 (human hepato cellular cancer), HCT-116 (human colorectal cancer), and MCF-7 (human breast cancer) cell lines에 대한 세포생존율을 조사하였다.
- 세포의 생존율은 극성이 낮은 hexane, EtOAc 추출물에서 생존율이 낮아 항암 효과가 있는 것으로 조사되었다.
- 식물체의 부위별 효과를 조사한 결과 HepG2 cell line의 경우에는 IC50이 4.31  $\mu\text{g/ml}$ 으로서 근경보다는 2.5배, 엽병보다는 6.3배 효과가 좋았다.
- 이러한 결과를 종합하면, 머위는 암에 효과가 있는 식의약품 또는 의약품으로서 개발 가능성이 있는 것으로 판단되었다.

##### **머위로부터 Bakkenolide B의 순수분리, HPLC분석 방법 및 채취 시기별 함량 분석**

- 머위(*Peatasites japonicus*)의 잎으로부터 생리활성물질을 탐색하여 항천식 효과가 있는 물질로 알려진 bakkenolide B를 순수분리하였으며, 1D-NMR, 2D-NMR 및 GC-MS spectrum 데이터를 이용하여 구조를 동정하였다.
- 머위의 잎, 엽병 및 근경 등의 채취시기별 bakkenolide B의 함량을 평가하기 위하여 HPLC 분석 방법을 확립하였다.
- Bakkenolide B의 민감도는 210 nm와 215 nm의 파장에서 254 nm, 235 nm 및 265 nm보다

높았으며, 분석을 위한 회귀 직선식은  $y=7.841-6.262(\text{파장 } 215 \text{ nm})$ 로서 상관값( $r^2$ )이 0.999 이상으로서 유의성이 매우 높았다.

- 검출한계(LOD)는 1.05, 정량한계 (LOQ)는 3.38이었다. 회수율은 3종류의 농도값에 대하여 98.6에서 103.1%로서 매우 높았다.
- 이러한 결과들로 미루어 볼 때 머위에서 bakkenolide B의 함량은 HPLC 분석방법으로서 가능한 것으로 증명되었다.
- 식물체의 부위 즉 잎, 엽병 및 근경에서의 bakkenolide B의 함량을 측정한 결과, 잎에서 가장 높았고, 다음은 엽병이었으며, 근경에서 함량이 가장 낮았다.
- 3월 초부터 8월 초까지 1개월 간격으로 식물체의 부위별 bakkenolide B의 함량을 조사한 결과, 3월부터 8월까지 채취시기가 지연될수록 감소하는 경향이였다.
- HPLC를 이용한 Petasites species의 bakkenolides 분석은 단순하고, 급속하게 분석할 수 있는 방법으로 확인되었다.
- 신물질인 petatewalide B는 다양한 효능을 검증하여, 머위의 새로운 효과 제시가 가능할 것으로 기대된다.

#### 부원료인 어성초와 수세미로부터 생리활성 성분의 순수분리 및 구조동정

- 어성초(*Houttuynia cordata* Thunb)로부터 3 - 5종, 수세미(*Lufa cylindrica*)로부터 2종의 물질이 순수분리 되었다.
- 순수분리된 성분들은 항 후 항알레르기, 항염증 등의 효능을 검증할 계획임
- 어성초와 수세미로부터 순수분리한 성분의 효능 검증 후 지표성분으로 활용이 가능할 것으로 기대된다.

## 2. 제2세부과제

#### 머위에서 분리한 bakkenolide B의 항알레르기 및 항염증 효과

머위 속 (*Petasites* genus)의 항알레르기 효과와 항염증 효과를 밝히기 위해서, *Petasites japonicas* 잎에서 추출한 몇 가지 물질들의 효과를 연구하였다.

Bakkenolide B는 *Petasites japonicas* 잎에서 분리한 물질이다. 항알레르기의 측정지표인  $\beta$ -hexosaminidase 활성을 측정하기 위해서 RBL-2H3 비만세포주에서 항원으로 유도된 탈과립 반응 억제효과를 측정하였다. 항염증 효과를 확인하기 위해서 복강 대식세포에서 western blotting 방법을 이용해 inducible nitric oxide synthase (iNOS)와 cyclooxygenase2 (COX-2)의 발현을 측정하였다. Bakkenolide B의 in vivo상에서 효능 검사를 하기 위해 ovalbumin으로 유발된 마우스 천식 모델을 사용하였다.

*Petasites japonicas* 잎의 주요 성분인 bakkenolide B가 RBL-2H3 비만 세포주의 탈과립을 농도의존적으로 억제시키는 것을 확인하였다. 또한, 마우스 복강 대식세포에서 bakkenolide B가 iNOS와 COX-2 발현 유도를 억제시켰다. 그리고 ovalbumin으로 유발된 천식 모델에서 얻은 기관지 세척액에서 bakkenolide B가 호산구, 대식세포, 림프구의 축적을 유의성있게 억제시켰다. Bakkenolide B는 알레르기 반응과 염증 반응을 억제하는 효과를 가지고, 천식 치료제로써 이용될 수 있다.

## 머위에서 분리한 새로운 petatewalide B의 다중 효과

머위 속 (*Petasites* genus)의 효과를 밝히기 위해서, *Petasites japonicas* 잎에서 새로운 구조의 물질인 petatewalidie B를 발견하였다.

Petatewalidie B는 bakkenolide 구조를 가지고 있으며, 항알레르기의 측정지표인  $\beta$ -hexosaminidase 활성을 측정하기 위해서 RBL-2H3 비만세포주에서 항원으로 유도된 탈과립 반응 억제효과를 측정하였을 때, 억제효과를 나타내었다. 하지만 세포내 칼슘농도에 대해서는 억제효과를 보이지 않았다. Petatewalidie B는 항염증 효과를 확인하기 위해서 복강 대식세포에서 western blotting 방법을 이용해 inducible nitric oxide synthase (iNOS)와 cyclooxygenase2 (COX-2)의 발현을 측정하였을 때, iNOS를 억제하였으나, COX-2를 억제하지는 않았다. Petatewalidie B는 NO의 생성을 억제하였다. 또한 petatewalidie B는 C6 glioma세포에서 세포막 전위를 농도의존적으로 증가시켰다. 본 연구를 통해서 머위에서 분리한 petatewalidie B가 항알레르기효과와 항염증효과를 가질 뿐만아니라 C6 glioma 세포의 막전위를 증가시키는 것을 보였다.

## 천식과 복막염 동물모델에서 S-Petasin의 치료효과

*Petasites* genus의 항알레르기 및 항염증 효과를 확인을 위해, *Petasites formosanus*(머위의 종)으로 부터 핵심 sesquiterpene인 s-petasin의 효과를 천식과 복막염모델에서 연구하였다. 오브알부민으로 유도하는 마우스 천식모델에서는, s-petasin은 호산구, 대식세포, 림프구의 기관지세척액으로 축적되는 것을 명확히 억제하였다. s-petasin은 RBL-2H3 비만세포주에서 항원으로 유도하는  $\beta$ -hexosaminidase의 탈과립을 억제하였으나, 세포내  $Ca^{2+}$  증가를 억제하지는 못하였다. S-petasin은 마우스 복강 대식세포에서 LPS로 유도되는 iNOS를 RNA와 단백질레벨에서 억제 하였다. 또한, s-petasin은 NO (iNOS의 생성물)의 생성을 대식세포에서 농도의존적으로 억제하였다. 거기에 더해, s-petasin은 복막강에 다형 및 단핵백혈구 축적을 억제할 명확히 보였다. 이 연구는 *Petasites* genus의 s-petasin이 천식과 복막염과 같은 알레르기성 및 염증성 질병에서 비만세포에서의 탈과립의 억제, 대식세포에서의 iNOS유도와 NO생성의 감소와 염증성세포의 축적의 억제를 통한 치료적 효과를 가지고 있음을 보여 준다.

## 오미자에서 분리한 새로운 항염증물질 $\alpha$ -cubebenoate의 동정

*Schisandra chinensis*의 추출물은 예로부터 항피로제, 강장제로 사용되어왔다. 만성피로 증후군은 염증과 항산화 스트레스와 연관되어있기 때문에 *Schisandra chinensis* 구성물질로 항염증 평가하였고, *Schisandra chinensis*로부터 분리한  $\alpha$ -cubebenoate의 효과를 연구하였다.

$\alpha$ -cubebenoate는 *Schisandra chinensis* 열매의 추출물로부터 분리 되었다. in vitro 실험에서는 mouse peritoneal macrophage에 LPS로 COX-2와 iNOS를 유발시켜 RT-PCR과 Western blotting으로 정량하였다. 세포 배양액 내의 NO와 PGE2는 Griess reagen와 EIA 방법으로 측정하였다. in vivo 실험에서는 LPS로 복막염을 유도한 마우스 모델을 사용하여  $\alpha$ -cubebenoate의 효능을 테스트 하였다.

결과 :  $\alpha$ -cubebenoate (5-10 $\mu$ g/ml)는 mouse peritoneal macrophage의 iNOS, COX-2의 발현을 mRNA와 protein level에서 저해하였고. LPS로 유도된 NO와 PGE2 생성 또한  $\alpha$ -cubebenoate (5-10 $\mu$ g/ml)에 의해 저해 되었다. 게다가,  $\alpha$ -cubebenoate는 mouse peritoneal macrophage 내에 LPS로 유도된 JNK의 활성을 저해시켰다. 하지만 ERK, p38 MAPK는 억제

하지 못 했다. 또한 LPS에 의한 복막염 모델에서  $\alpha$ -cubebenoate는 복막 내 다형핵 백혈구의 축적을 상당히 감소 시켰다.

$\alpha$ -cubebenoate는 LPS에 의해 증가된 iNOS, COX-2를 농도 의존적으로 저해시켰고 그 때문에 peritoneal macrophage의 NO, PGE2의 생성을 억제한 것이다.  $\alpha$ -cubebenoate는 또한 LPS로 유도 된 복막염 모델에서 다형핵 백혈구 축적을 저해시켰다.  $\alpha$ -cubebenoate는 항염증을 통해 *Schisandra chinensis*의 항피로 성분의 역할을 하며 염증성 질환 치료로 사용 될 수 있을 것이다.

### 3. 제3세부과제

○ 머위 잎에서 알레르기성 천식에 효과적 치료제로 알려져 있는 petasin을 효율적으로 추출하기 위해 반응표면분석법을 사용하여 petasin 추출공정 최적화를 실시하였다. 추출물의 petasin 함량은 에탄올 농도, 추출 rpm, 추출 시간의 유의적인 영향을 받으며 특히, 에탄올 농도의 영향이 크며 이의 수준이 높아짐에 따라 증가하는 것으로 나타났다. 추출조건에 따른 petasin의 거동은 유의적인 회귀식으로 설명이 가능한 것으로 확인되었다. 반응표면분석 결과, 머위 잎으로부터 petasin의 추출에 최적인 조건으로 에탄올 농도는 79.92%, 추출 rpm은 178.10, 추출시간은 2.06 hr으로 각각 결정되었다.

○ 머위(*Petasites japonicus*) 잎에서 알레르기성 천식 억제 효능이 있는 bakkenolide B의 최적 추출공정을 반응표면분석법을 이용하여 결정하였다. Bakkenolide B의 추출함량은 추출온도, 시간, pH의 유의적인 영향을 받았으며, 추출온도 127.1°C, 시간 46.6분, 추출용매의 pH 7.7에서 최대치 121.6  $\mu\text{g/g}$ 이 예측되었다. 비만세포의 탈과립반응 억제효과의 회귀분석 결과는 유의성이 인정되지 않았고 낮은 상관계수를 보였다.

○ 머위(*Petasites japonicus*) 잎의 유독성분인 pyrrolizidine alkaloids 성분의 함량감소를 위한 방법을 조사한 결과, pyrrolizidine alkaloids 의 한 종류인 senecionine은 머위 속에 상당한 양이 함유되어 있음을 알 수 있었고 이 성분은 열과 알칼리에 약한 성분임을 알 수 있었다. 그러나 senecionine 성분을 감소시키는 가장 효율적인 방법은 화학적 처리보다 열풍 건조방법이 효과적이며 적용 가능한 방법이었다.

○ 머위 30~70%, 수세미 10~30% 및 어성초 10~30%의 비율로 혼합하여 중앙점 반복을 포함하여 총 12개의 실험점을 설계하였고, 이 설계를 바탕으로 혼합물은 121°C에서 45분간 중탕 추출을 하여 항알레르기 및 항균효과를 측정 한 결과, 항알레르기 효과는 Response surface와 trace plot을 보면 머위의 함량이 많을수록 좋은 효과를 나타내었고 수세미는 다소 약한 영향을 미친다는 것을 알 수 있었다. 다중회귀분석 결과 상관계수  $R^2=82.10\%$ 이며 유의적인 회귀식으로 설명이 가능한 것으로 확인되었다. 따라서 최적비율은 머위 0.75%, 수세미 0.14% 그리고 어성초 0.11%의 비율로 결정되었다. 항균효과는 혼합비율에 따른 각 추출물들이 그람양성균인 *Staphylococcus aureus* (KCCM 40881), *Staphylococcus epidermidis* (KCCM 35494)에 대해서는 유효하나 그람음성균인 *Escherichia coli* (KCCM 11234), *Pseudomonas aeruginosa* (KCCM 11328)에 대해서는 미미하거나 효과가 나타나지 않았다.

#### 4. 협동과제

○ 알레르기성 천식 완화에 효능을 가지는 기능성식품의 원료배합비와 제조공정을 제3세부과제와 협동하여 최적의 공정을 완성하였으며, 이에 따라서 1, 2 및 3차의 시작품을 제작하고 각 시작품의 관능적 품질 검사결과를 토대로 원료배합과 제조공정을 개선하여 최종 제품을 제조하였다.

○ 머위의 기능성분을 알코올로 추출하고 추출물의 건조분말을 껌의 기능성 원료로 첨가한 껌 1종을 개발하였으며, 최근에 유행하고 있는 알레르기성 비염에 효능이 있는 음료제품을 개발하고자 머위에 항균성이 우수한 어성초를 부원료로 첨가한 음료제품을 개발하였다.

#### V. 연구 성과 및 성과활용 계획

- 연구 성과로서 SCI논문 5편, 비SCI 논문 2편 및 특허출원 5건을 산출하였다.
- 연구개발한 기능성 제품의 제조공정 및 제품을 협동기관에서 산업화
- 머위 기능성물질 또는 알려진 물질의 생리활성 검증에 의해 취득한 산업재산권 3건을 산업체에 기술이전용으로 활용
- 개발기술 및 특허를 타 분야(의약품, 의약부외품 등)에 파급 적용할 수 있어 타 분야에도 기술 이전
- 머위의 소비증대를 통한 농촌지역의 소득작물로서의 활용



# SUMMARY

## (영문 요약문)

### 1. 1st Reseach Section

#### ○ **In Vitro Anticancer Activity of Hexane and Ethyl acetate Extracts from Leaf, Petiole and Rhizome of *Petasites japonicus***

Wild *Petasites japonicus*, which is widely distributed in Korea, Japan and China, is used as a culinary vegetable and a traditional medicine for treatment of several human diseases, including asthma, migraines and tension headaches, and allergic rhinitis.

In this study, twelve extracts from the leaves, petioles and rhizomes of *P. japonicus* were evaluated in vitro for their antiproliferative activity against AGS (human gastric cancer), HepG2 (human hepato cellular cancer), HCT-116 (human colorectal cancer), and MCF-7 (human breast cancer) cell lines.

Plant extracts were fractionated using hexane, EtOAc, BuOH and distilled water, after which the antiproliferative activity was measured by MTT assay.

Cell viability decreased in a dose dependent manner in response to the hexane and ethyl acetate extracts for all cell lines, with a significant decrease in cell viability being observed for 100 µg/ml and 75 µg/ml in the AGS and HepG2 cancer cell lines.

The leaf extract appeared to be more potent against HepG2, as indicated by IC50 values of 4.31 µg/ml for approximately 2.5- and 6.3-fold compared with rhizome and petiole extracts, respectively.

The IC50 values of hexane extracts from leaves and rhizomes against AGS, HepG2, and MCF-7 human cell lines were greater than those of other extracts, while ethyl acetate extracts from petioles showed higher significant effect for all cell lines. Hexane and EtOAc extracts exerted their antiproliferative activity in four cancer cell lines.

Because of the rich natural supply, simple extraction procedure and high yield, further studies of the LH of wild *P. japonicus* are warranted.

Overall, the results indicate that *P. japonicus* has the potential to be developed into selective anticancer nutraceutical and/or pharmaceutical treatments with low cost.

#### ○ **Isolation, Quality Evaluation, and Seasonal Changes of Bakkenolide B in *Petasites japonicus* by HPLC**

The leaves of *Peatasites japonicus* are a traditional oriental medicine with diverse biological activities.

A simple and specific analytical method for the quantitative determination of bakkenolide B constituents from methanolic extract of the leaves of *P. japonicus* was developed.

Bakkenolide B was isolated from the leaves of *P. japonicus*, and its structure was elucidated based on 1D, 2D NMR, and GC-MS spectral data.

A liquid chromatographic method was developed to evaluate the quality of *P. japonicus* through determination of major active compound, bakkenolide B.

The wavelengths at 254 and 215 nm were chosen to determine bakkenolide B.

The recovery of the method was in the range of 98.6 to 103.1%, and bakkenolide B showed good linearity ( $r^2=0.999$ ) within test ranges.

The developed method was applied to the determination of bakkenolide B in the plant part and seasonal changes.

The results showed that the content of bakkenolide B in the leaf was higher than in the petiole and rhizome.

In this study, a simple, rapid, and reliable high-performance liquid chromatography method was used to determine the percentage and composition of bakkenolide B in *P. japonicus* procured from different *Petasites* species plants in South Korea.

The method can be employed in routine quantitative analysis and quality control of different products in the market.

#### ○ Isolation and structure elucidation of pure compounds from adjunct *Houttuynia cordata* Thunb and *Lufa cylindrica*

Three - five pure compounds from *Houttuynia cordata* Thunb and 2 pure compounds from were obtained from *Lufa cylindrica*

These compounds screen the biological activity including antiallergic and antiinflammatory activity etc.

## 2. 2nd Reseach Section

#### ○ Anti-allergic and anti-inflammatory effects of bakkenolide B isolated from *Petasites japonicus* leaves

To elucidate the anti-allergic and anti-inflammatory effects of *Petasites* genus, we studied the effects of several compounds isolated from *Petasites japonicus* leaves.

Bakkenolide B was isolated from *Petasites japonicus* leaves. Antigen-induced degranulation was measured in RBL-2H3 mast cells by measuring  $\beta$ -hexosaminidase activity. Induction of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase 2 was measured by Western blotting in peritoneal macrophages. Ovalbumin-induced asthma model was used for in vivo efficacy test of bakkanolide B.

We found that bakkenolide B, a major component of the leaves, concentration-dependently inhibited RBL-2H3 mast cell degranulation. Bakkenolide B also inhibited the gene inductions of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase 2 in mouse peritoneal macrophages. Furthermore, in an ovalbumin-induced asthma model, bakkenolide B strongly inhibited the accumulation of eosinophils, macrophages, and lymphocytes to bronchoalveolar lavage fluid. Bakkenolide B has suppressive properties for allergic and inflammatory

responses and may be utilized as a potent agent for the treatment of asthma.

#### ○ **Multiple effects of a novel compound, petatewalide B from *Petasites japonicus***

To explore the effects of *Petasites* genus, we isolated a novel compound from *Petasites japonicus* leaves (a butterbur species). It was found as a new bakkenolide-type sesquiterpene and named petatewalide B. Petatewalide B inhibited the antigen-induced degranulation of  $\beta$ -hexosaminidase in RBL-2H3 mast cells, but did not affect antigen-induced  $Ca^{2+}$  increase in the cells. Petatewalide B also showed inhibition of the LPS-induced induction of iNOS, but not COX-2 in mouse peritoneal macrophages. Nitric oxide production was also inhibited by petatewalide B in macrophages. Petatewalide B increased the membrane potential of C6 glioma cells in a concentration-dependent manner. The current study shows that petatewalide B from *Petasites* genus not only has anti-allergic and anti-inflammatory effects but also induces a transient increase of membrane potential in C6 glioma cells.

#### ○ **Therapeutic effects of s-petasin on disease models of asthma and peritonitis**

To explore the anti-allergic and anti-inflammatory effects of extracts of *Petasites* genus, we studied the effects of s-petasin, a major sesquiterpene from *Petasites formosanus* (a butterbur species) on asthma and peritonitis models. In an ovalbumin-induced mouse asthma model, s-petasin significantly inhibited the accumulations of eosinophils, macrophages, and lymphocytes in bronchoalveolar fluids. S-petasin inhibited the antigen-induced degranulation of  $\beta$ -hexosaminidase but did not inhibit intracellular  $Ca^{2+}$  increase in RBL-2H3 mast cells. S-petasin inhibited the LPS induction of iNOS at the RNA and protein levels in mouse peritoneal macrophages. Furthermore, s-petasin inhibited the production of NO (the product of iNOS) in a concentration-dependent manner in the macrophages. Furthermore, in an LPS-induced mouse model of peritonitis, s-petasin significantly inhibited the accumulation of polymorphonuclear and mononuclear leukocytes in peritoneal cavity. This study shows that s-petasin in *Petasites* genus has therapeutic effects on allergic and inflammatory diseases, such as, asthma and peritonitis through degranulation inhibition in mast cells, suppression of iNOS induction and production of NO in macrophages, and suppression of inflammatory cell accumulation.

#### ○ **Identification of a novel anti-inflammatory compound, a-cubebenoate from *Schisandra chinensis***

Extracts of *Schisandra chinensis* have been used as an anti-fatigue and tonic agent. Because chronic fatigue syndrome is related to inflammatory and oxidative stress, we assessed whether *Schisandra chinensis* has anti-inflammatory constituents and studied the effect of a novel a-cubebenoate isolated from *S. chinensis*.

a-Cubebenoate was isolated from an extract of *Schisandra chinensis* fruits. The inductions of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase 2 (COX-2) by

lipopolysaccharide (LPS) were quantified by RT-PCR and Western blotting in mouse peritoneal macrophages. Nitric oxide (NO) and prostaglandin E2 (PGE2) were also measured in the media by Griess reagent and EIA method. A mouse model of LPS-induced peritonitis was used to test the in vivo efficacy of  $\alpha$ -cubebenoate.

$\alpha$ -Cubebenoate (5 - 10 mg/ml) inhibited the inductions of iNOS and COX-2 in mouse peritoneal macrophages at the mRNA and protein levels. LPS-induced productions of NO and PGE2 were inhibited by  $\alpha$ -cubebenoate (5 - 10 mg/ml). In addition,  $\alpha$ -cubebenoate inhibited the LPS-induced activation of JNK, but not those of ERK and p38 MAPK in mouse peritoneal macrophages. Furthermore, in the LPS-induced in vivo peritonitis model,  $\alpha$ -cubebenoate (1 mg/kg) strongly inhibited the accumulation of polymorph nuclear lymphocytes in the peritoneal cavity.

$\alpha$ -Cubebenoate inhibited LPS-induced expression of iNOS and COX-2 in a concentration-dependent manner, thereby suppressing productions of NO and PGE2 in vitro in peritoneal macrophages.  $\alpha$ -Cubebenoate also inhibited LPS-induced accumulation of polymorph nuclear lymphocytes in LPS-induced peritonitis model in vivo.  $\alpha$ -Cubebenoate may act as an anti-fatigue constituent of *Schisandra chinensis* through anti-inflammation and could be of therapeutic use as a treatment for inflammatory diseases.

### 3. 3rd Research Section

○ In research to optimize the extraction process of petasin from *P. japonicus* leaves by response surface methodology (RSM), the petasin content was significantly affected by ethanol concentration, extraction rpm, and extraction time, tending to more increase with increasing ethanol concentration. The optimum condition for petasin extraction from *Petasites japonicus* leaves was 79.92% in ethanol concentration, 178.10 in extraction rpm, 2.06 hours in extraction time, respectively.

○ Petasin extracted from *Petasites japonicus* leaves has been well known to be effective in the treatment of allergic asthma. This study was carried out to optimize the extraction process of petasin from *P. japonicus* leaves by response surface methodology (RSM). The dried powder of *P. japonicus* leaves was extracted at ethanol concentrations ranging from 40% to 80%, extraction rpm ranging from 125 rpm to 225 rpm, and extraction time ranging from 1 to 3 hours. The effects of the extraction conditions on the dry yield and petasin content of the extracts were investigated using a second-order Box-Behnken design. The petasin content was significantly affected by ethanol concentration, extraction rpm, and extraction time, tending to increase more with increasing ethanol concentration. The optimum condition for petasin extraction from *Petasites japonicus* leaves was 79.92% in ethanol concentration, 178.10 rpm in extraction rpm, and 2.06 hours in extraction time, respectively.

○ Optimal conditions for extraction of bakkenolide B from *Petasites japonicus* leaves were determined by using response surface methodology. The response surface plot described for bakkenolide B content showed that the maximum bakkenolide B content was predicted as 121.6  $\mu\text{g/g}$  at the extraction conditions of 127.1°C, 46.6 min, and pH 7.7. The extraction temperature and time were important factors in case of bakkenolide B content. The correlation coefficient between the inhibition effect of mast cell degranulation and bakkenolide B content analyzed by the regression equation showed low correlation coefficient.

○ In research to develop the process for reduction of toxic pyrrolizidine alkaloids from *Petasites japonicus*, heating by using warm air and alkali treatment were effective methods, however, heating by using warm air was more effective and adaptable method in industrial field.

○ To find the optimal ratio of *Petasites japonicus*, *Luffa cylindrica* and *Houttuynia cordata* for development of a functional drink, all of which are supposed to have anti-respiratory diseases effects such as rhinitis, the experiment was designed by mixture design and included 12 experimental points with center replicate for three different independent variables (*Petasites japonicus* 30~70 %; *Luffa cylindrica* 10~30 %; and *Houttuynia cordata* 10~30 %). Based upon this design, the mixture was extracted in hot water at 121°C for 45 minutes and observed anti-allergy activity and anti-microbial activity. The response surface and trace plot described for the anti-allergy activity showed that *Petasites japonicas* was relatively important factor. The correlation coefficient ( $R^2$ ) value 82.10% for the inhibition effect of degranulation analyzed by the regression equation. Analysis of variance showed that the model fit was as statistically significant ( $p < 0.05$ ). The optimal ratio of mixture was *Petasites japonicus* 0.75%, *Luffa cylindrica* 0.11% and *Houttuynia cordata* 0.14 %. Anti-microbial activity for each extraction of mixture was valid on gram-positive such as *Staphylococcus aureus* ( KCCM 40881 ), *Staphylococcus epidermidis* ( KCCM 35494 ) while was less effective on gram-negative such as *Escherichia coli* ( KCCM 11234 ), *Pseudomonas aeruginosa* ( KCCM 11328).

#### 4. 4th Reseach Section

○ To optimize the optimal process of functional drink easing the allergy asthma, the study was carried out in collaboration with the 3rd Reseach Section. The optimal process was determined by the research result on the material mixture ratio and manufacturing process for the functional drink. Trial products (1st, 2nd and 3rd) were made and carried out the sensory test. As a result of this test, The final product was finally produced by

the revised material mixture ratio and manufacturing process.

○ The gum which contained extraction of *Petasites japonicus* was developed. Functional compound of *Petasites japonicus* was extracted at ethanol concentrations ranging from 30% to 50% and made in dried powder for the gum.

○ Allergic rhinitis is one of the most rapidly increasing respiratory diseases in modern society. The functional drink with anti-allergy rhinitis effect was also developed by using *Petasites japonicus*, *Luffa cylindrica* and *Houttuynia cordata*, all of which has been known to be effective in anti-microbial activity.

# CONTENTS

|  |     |
|--|-----|
| Chapter 1. Introduction .....  | 1   |
| Section 1. Objectives .....  | 1   |
| Section 2. Necessity .....   | 1   |
| Section 2. Scope .....   | 1   |
| Chapter 2. The Current Situation of Technique Development .....  | 3   |
| Section 1. The Domestic Current Situation .....  | 3   |
| Section 2. The Foreign Current Situation .....   | 3   |
| Chapter 3. Contents and Results of Research and Development .....  | 5   |
| Section 1 1 <sup>st</sup> Research Section : Screening and structure elucidation of anti-allergic<br>active compounds by activity-guided purification .. | 5   |
| Section 2 2 <sup>nd</sup> Research Section : Pharmacological efficacy and physiological activity<br>evaluation using cell and animal model .....         | 48  |
| Section 3. 3 <sup>rd</sup> Research Section : Development of functional food .....   | 77  |
| Section 4. Cooperation Section : Manufacturing of trial products .....   | 114 |
| Chapter 4. Achievement and Contribution to the Related Field .....   | 181 |
| Chapter 5. Fruitful Results and Utilization Plan .....   | 185 |
| Section 1. Fruitful Results .....  | 185 |
| Section 2. Utilization Plan .....  | 190 |
| Chapter 6. Collected Foreign Technical Information .....   | 191 |
| Chapter 7. References .....  | 193 |

# 목 차

|  |     |
|--|-----|
| 제 1 장 연구개발의 개요 .....                               | 1   |
| 제 1 절 연구 개발 목적 .....                               | 1   |
| 제 2 절 연구개발의 필요성 .....                              | 1   |
| 제 3 절 연구개발의 내용 및 범위 .....                          | 1   |
| 제 2 장 국내·외 기술개발 현황 .....                           | 3   |
| 제 1 절 제1절 국내 현황 .....                              | 3   |
| 제 2 절 국외 현황 .....                                  | 3   |
| 제 3 장 연구 개발 수행 내용 및 결과 .....                       | 5   |
| 제 1 절 제1세부 : 활성분획분리법을 통한 천식 효능성분 탐색 및 구조 동정 .....  | 5   |
| 제 2 절 제2세부 : 세포 및 질환모델동물을 이용한 약리효능 및 생리활성 검증 ..... | 48  |
| 제 3 절 제3세부: 기능성 식품 개발 .....                        | 77  |
| 제 4 절 제4세부 : Manufacturing of Trial Products ..... | 114 |
| 제 4 장 목표달성도 및 관련 분야에의 기여도 .....                    | 181 |
| 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획 .....                      | 185 |
| 제 1 절 연구개발성과 .....                                 | 185 |
| 제 2 절 향후 성과활용 계획 .....                             | 190 |
| 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....                  | 191 |
| 제 1 절 해외 머위관련 일반적 정보 .....                         | 191 |
| 제 2 절 해외 머위관련 연구정보 .....                           | 192 |
| 제 7 장 참고문헌 .....                                   | 193 |



# 제 1 장 연구개발의 개요

## 제 1 절 연구 개발 목적

우리나라 자생식물인 머위로부터 알레르기성 천식 증상을 완화시키는 효능성분을 규명하고, 효능성분을 활용한 기능성 식품 등을 개발하여 국민건강 증진, 고부가가치 제품의 개발 및 시판, 그리고 경작 파급화로 농민소득 증대에 기여하고자 함을 목표로 한다.

## 제 2 절 연구개발의 필요성

- 우리나라 인구의 약 12-20% 정도가 알레르기성 천식, 비염, 아토피성 피부염 등의 질환에 만성적으로 시달리고 있으나 뚜렷한 치료제가 없이 체질개선에만 의존되고 있는 실정이다.
- 현재 의약은 다양한 방법으로 발전하고 있는데, 특히 음식을 먹어서 병을 예방 또는 치료하는 연구에 많은 투자를 하고 있다.
- 현대 사회의 산업화, 도시화에 따라서 환경적 인자들에 대한 면역과민반응이 증가하고 있으며, 천식, 아토피를 포함하는 알레르기성 질환의 발병율이 매년 증가하고 있다.
- 천식은 1970년대부터 급격히 증가하여 2009년 250,000명이 사망했으며, 2010년에는 전 세계적으로 3억명이 질환을 앓고 있으며, 현재 발병율이 8%로 증가하였다 (WHO).
- 천식, 아토피 등 알레르기성 질병은 삶의 질을 저하시키며, 건강한 삶을 추구할 수 없게 하고 있다.
- 이러한 알레르기성 질환은 항원의 다양성 때문에 예방적 자연친화적 치료법이 없으나, 최근 천식, 아토피 등의 공통적인 치료방법은 면역 활성의 조절과 염증반응의 감소에 의한 효과로 증명되고 있다.
- 최근의 연구결과 및 한방에서 알레르기 유발물질의 유리 억제 및 길항작용이 있는 것으로 알려진 머위를 기능성 음료 등으로 개발할 경우 알레르기성 질환에 고통 받고 있는 국민의 건강 증진, 야생 머위의 경작화로 농가 소득증대, 신제품 개발로 인한 부가가치 창조 등의 많은 효과가 기대된다.
- 이러한 제품의 개발을 위하여, 머위 중 효능 성분의 분리 및 동정, 효율적 추출공정, 효능의 극대화 내지 관능적 품질향상에 필요한 부재료의 탐색 및 배합비율의 최적화, 그리고 개발된 제품의 안전성 분석, 경제성 검토 및 유통기한 설정 등의 후속 조치에 관한 연구가 필요하다.

### 제 3 절 연구개발의 내용 및 범위

- 머위 효능 검증: 머위의 추출물 또는 순수 분리한 성분으로 천식 효능 및 작용기작을 검증하고 머위 고기능성 제품의 품질 평가에 활용
- 효능성분의 구조 동정: 활성추적분리법을 이용한 천식 효능성분의 순수분리 및 구조 동정
- 효능 및 기작 규명: 천식에 대한 효능 및 작용기작을 in vitro 세포계 질환모델 동물을 이용한 검증.
- 효능성분을 활용한 건강기능식품 개발: 효능성분의 추출공정 및 배합비율 등의 최적화를 통한 기능성 식품 2종 이상 개발

## 제 2 장 국내·외 기술개발 현황

### 제 1 절 제1절 국내 현황

- 머위 (*Petasites japonicus* {Sieb. et Zucc.} Max)는 여러해살이 국화과 머위속에 속하는 초본으로서 전 세계에 약 20종이 있으나, 우리나라에는 머위와 개머위 (*Petasites saxatilis* {Turcz.} Komarov, 산머위) 2종이 있으며, 머위는 잎과 엽병을 식용으로 사용하고 있으나 개머위는 식용으로 사용되지 않는다.
- 우리나라에서 머위는 주로 한약재로 이용되어 왔는데, “동의보감”에는 성질이 따뜻하고 맛은 맵고 달며 독이 없고, 폐를 녹여 주고, 담을 삭이며, 기침을 멎게 하고, 폐위와 폐옹(肺癰)으로 피고름을 뱉는 것을 낫게 하며, 몸에 열이 나고 답답한 증상을 없애고, 허로를 보하고, “강서초약”에서는 “해독하고 어혈을 없애고, 편도선염, 옹종정독(癰腫疔毒), 독사에 물린 상처에 사용한다고 함.
- 국내에서는 산지의 습기가 많은 지역에서 자생하고 있는 머위의 잎과 엽병을 산채하여 나물용으로 사용되고 있으며, 제품화된 것은 전무함.

### 제 2 절 국외 현황

- 국외에서는 우리나라의 종과는 다른 종인 *P. hybridus*로서 꽃의 색이 자색이나, 우리나라 종은 *P. japonicus*는 흰색 꽃으로서 전혀 다른 종이다.
- 머위를 이용한 제품은 외국에서는 이미 천식 또는 편두통 등에 많이 이용되고 있는데, 그 주요 성분은 petasin 또는 isopetasin을 표준성분으로 제품을 생산하고 있다.
- 외국에서 생산되고 있는 주요 제품 및 특징은 다음에서 보는 바와 같다.

|  |   |   |
|--|---|---|
|   |    |    |
| <p><b>Petadolex Butterbur Petasin 50 Capsules</b></p>  | <p><b>POWER HEALTH Butterbur 100mg 90 Tablets</b></p>   | <p><b>FSC Butterbur 58 mg (Standardised) 60 Caps</b></p>  |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>- 서양머위 (<i>P. hybridus</i>) 뿌리 추출물 50 mg으로서 petasin과 isopetasin. 7.5 mg 이상 함유</li> <li>- Pyrrolizidine alkaloids free</li> </ul>        | <ul style="list-style-type: none"> <li>- 서양머위 (<i>P. hybridus</i>) 뿌리 추출물 100 mg</li> <li>- Tablet 당 0.5 mcg의 pyrrolizidine alkaloids 함유</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- 서양머위 (<i>P. hybridus</i>) 전식물체 추출물 58 mg으로 표준화 시켰으며, 추출물 중에 14%의 sesquiterpene lactones 함유 (8 mg)</li> </ul>   |
|    |   |   |
| <p><b>Now Foods, Butterbur, 60 Veggie Caps</b></p>   | <p><b>Butterbur Petasites Hybridus (Herb Pharm) Homeopathic</b></p>   | <p><b>Urovex Purple Butterbur Extract - 50 mg per softgel</b></p>   |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>- 서양머위 (<i>Petasites hybridus</i>) 추출물 75 mg</li> <li>- Pyrrolizidine alkaloids 제거한 제품</li> <li>- 신경장애 해소</li> <li>- 혈액순환 촉진</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- 뿌리줄기 추출물로서 grain alcohol, 증류수 및 머위 추출물을 함유하고 있음</li> <li>- Pyrrolizidine alkaloids 1% 이하 함유.</li> </ul>    | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Urovex Purple Butterbur 뿌리 추출물로서 7.5 mg의 petasin 함량 표준화시킨 것을 Petadolex라고 함</li> <li>- Petasin과 isopetasin을 함유, pyrrolizidine alkaloids를 제거한 제품.</li> </ul> |

## 제 3 장 연구 개발 수행 내용 및 결과

### 제 1 절 제1세부 : 활성분획분리법을 통한 천식 효능성분 탐색 및 구조 동정

#### 1. 머위의 부위별 극성용매 추출물이 6종 암세포의 생존율에 미치는 영향

##### 가. 재료 및 방법

##### (1) 식물 재료

경북 청도군의 야생에서 성장하고 있는 머위 (*Petasites japonicus* Max)를 수집하여 잎, 엽병 및 근경으로 분류하여 건조한 다음 재료로 사용하였다.

##### (2) 시약

Hexane, dichloromethane, chloroform, ethyl acetate, butanol, methanol 및 아세톤은 Fisher Scientific Korea, Ltd. (Kangnam-gu, Seoul, Korea)로부터 구입하여 사용하였으며, Sodium bicarbonate와 dimethyl sulfoxide (DMSO)는 Merck (Darmstadt, Germany)로부터 구입하여 사용하였다. RPMI-1640 medium, polyoxyethylene sorbitan monooleate (Tween 80), cell freezing medium-DMSO, trypsin-EDTA solution, and penicillin/streptomycin (P/S) 용액은 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)로부터 C,N-diphenyl-N'-4,5-dimethyl thiazol-2-yl tetrazolium bromide (MTT)는 Promega Corporation (Madison, WI, USA), Fetal bovine serum (FBS)는 Invitrogen Canada Inc. (Burlington, Ontario, Canada)사로부터 구입하여 사용하였다.

##### (3) 추출방법

수집하여 잎, 엽병 및 근경으로 분류한 재료는 사용할 때까지 -20°C에 저장하였다. 추출방법은 잎, 엽병 및 근경 각각 1 kg을 5,000 ml Erlenmeyer flask에 넣고 3,000 ml의 70% ethanol (final concentration)을 가하고 믹서기(Hanil, Bucheon city, Korea)로 믹서하였다. 삼각 플라스크를 sonicator (Kodo, JAC-4020P, Hwaseong, Gyeonggi-do, Korea)에 옮긴 후 첫 번째는 2시간, 다음은 70% EtOH 3 L를 가하여 2회 더 추출하였다. 70% EtOH 추출물의 용매를 45°C의 회전증발기(Heidolph, Rotavapor 4000, 91126 Schwabach, Germany)에서 증발 한 후, 증류수를 일정량가하여 hexane, EtOAc, BuOH 및 증류수로 순차 분획하여 잎, 엽병, 근경의 hexane, EtOAc, BuOH 및 증류수 추출물을 얻었다 (Fig 1). 각각의 추출물을 DMSO로 희석 (3.125 µg/ml to 100 µg/ml)하여 세포의 생존율을 조사하였다.

##### (4) 세포 배양

AGS (human gastric carcinoma), HepG2 (human hepato cellular cancer), HCT-116 (human colorectal cancer), 및 MCF-7 (human breast cancer) cell은 RPMI-1640에 10% FBS, 1% P/S, 10% fetal bovine serum, 100 IU/ml penicillin 및 100 µg/ml streptomycin (Invitrogen,

Carlsbad, CA, USA)가 첨가된 배지에서 배양하였다. 모든 세포주는 Korean Cell Line Bank로부터 분양받아서 사용하였다. 각각의 세포는 25 cm<sup>2</sup> tissue culture flasks (SPL Life Sciences, Hwaseong, Gyenggi-do, Korea)에서 배양하였으며, 습도 95%, CO<sub>2</sub> 5% 및 온도 37°C로 조절된 CO<sub>2</sub> 인큐베이터(Sanyo Electric Co., Ltd., Moriguchi, Osaka, Japan)에서 배양하였다.

#### (5) 세포 생존율 평가

부위별로 분류된 머위 추출물을 96-well plates (SPL Life Sciences, Hwaseong, Gyenggi-do, Korea)에 첨가한 다음 추출물 (3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 µg/ml)을 첨가하여 세포생존율을 조사하였다. 세포는 104 cells/100µl/well로 배양하였다. 6종의 세포를 96 well plate에서 24 h 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건으로 항온 배양한 후, 각 농도 별로 머위 부위별 추출물을 각각의 농도로 처리하였다. 24 h 배양한 세포를 PBS로 세척하고 MTT 용액(2 µg/ml)을 첨가하여 3 h 동안 반응시킨 후, 생성된 formazan을 DMSO에 녹여 570 nm에서 측정하였다. 아무것도 처리를 하지 않은 비조사군을 대조군으로 하여 100% 기준으로 잡아 상대적인 세포 생존율을 구하였다.

#### 나. 결과 및 고찰

머위를 잎, 엽병 및 근경으로 분류한 다음, 각각을 생체중 1 kg을 70% EtOH로 3회 추출하였다 (Fig. 1). 각각의 추출물을 필터한 다음 회전증발로 에탄올을 증발시킨 후 증류수로 1 L로 정량하였다. 잎의 70% 에탄올 추출물 1 L에 hexane 1 L를 첨가하여 2시간 동안 방치하여 분획하는 방법을 3회 반복하여 hexane 추출물을 얻었다. Hexane 분획 후 남은 물층에 동량의 EtOAc를 3회 가하여 EtOAc 추출물을 얻었으며, 남은 물층에 동량의 BuOH를 3회 가하여 BuOH 추출물과 물 추출물을 얻었다. 엽병과 근경도 잎과 동일한 방법으로 추출하였다.

위의 방법으로 추출한 잎의 hexane 추출물은 13.06 g, EtOAc 추출물은 1.90 g, BuOH 추출물은 4.61 g 및 물 추출물은 18.60 g이었으며, 총 추출물은 38.17 g이었다 (Fig. 1과 Table 1). 엽병의 hexane 추출물은 0.99 g, EtOAc 추출물은 0.33 g, BuOH 추출물은 6.18 g 및 물 추출물은 26.05 g이었으며, 총 추출물은 33.55 g이었다. 근경의 hexane 추출물은 1.03 g, EtOAc 추출물은 1.75 g, BuOH 추출물은 9.24 g 및 물 추출물은 41.31 g이었으며, 총 추출물은 53.33 g이었다. Hexane 추출물은 잎의 추출물이 13.06 g으로서 엽병과 근경의 약 10배 이상 많았으며, EtOAc의 엽병 추출물은 0.33 g으로서 약 6배 이하로 추출물의 함량이 적었다. BuOH 추출물과 물 추출물은 근경의 추출물이 가장 무거웠으며, 잎의 추출물이 가장 적었다.

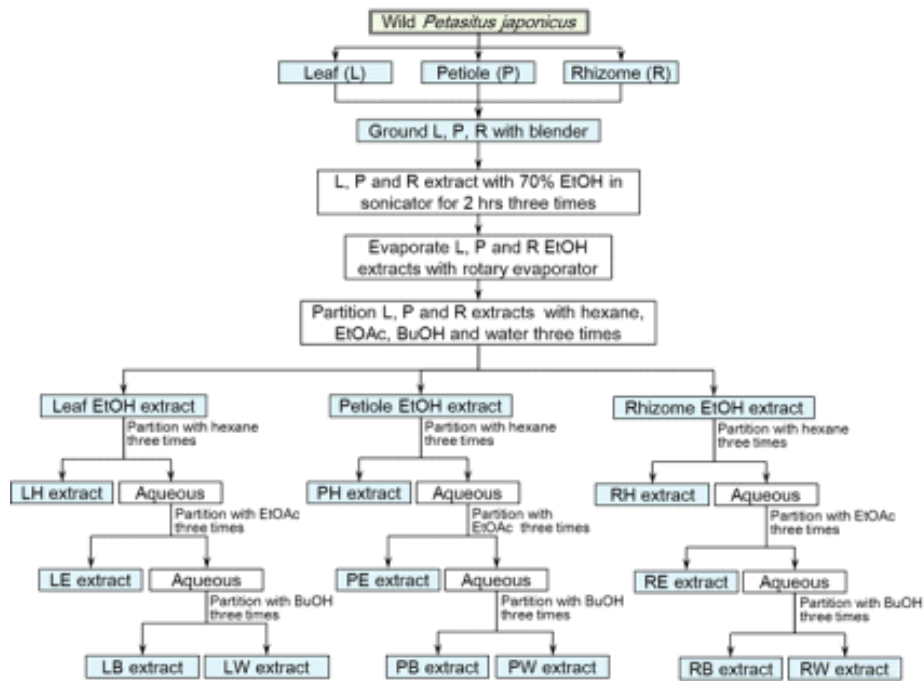


Fig 1. Systematic extraction of various parts of *Petasites japonicus* MAX with 70% ethanol and successive fractionation with hexane, ethylacetate, butanol and distilled water.

Table 1. Yields of hexane, ethyl acetate (EtOAc), butanol (BuOH), and aqueous extracts of leaves, petioles, and rhizomes of *Petasites japonicus* Max.

| Plant parts | Contents of extracts (g/fresh kg) |       |       |                   | Total |
|-------------|-----------------------------------|-------|-------|-------------------|-------|
|             | Hexane                            | EtOAc | BuOH  | dH <sub>2</sub> O |       |
| Leaf        | 13.06                             | 1.90  | 4.61  | 18.60             | 38.17 |
| Petiole     | 0.99                              | 0.33  | 6.186 | 26.05             | 33.55 |
| Rhizome     | 1.03                              | 1.75  | 9.24  | 41.31             | 53.33 |

One kg aliquots of fresh leaves, petioles and rhizomes were extracted with 70% ethanol for 2 hours three times. The total extracts of each part were then further partitioned with hexane, ethyl acetate, butanol and water. Finally, the extracts were obtained by recovering the ethanol in an evaporator at 45°C.

잎, 엽병 및 근경 추출물의 성분을 비교하기 위하여 전개 TLC용매의 극성을 바꾸어서 비교한 결과 (Fig. 2), hexane과 EtOAc 추출물의 성분은 잎, 엽병 및 근경 추출물 간에 상당한 차이가 있었다.

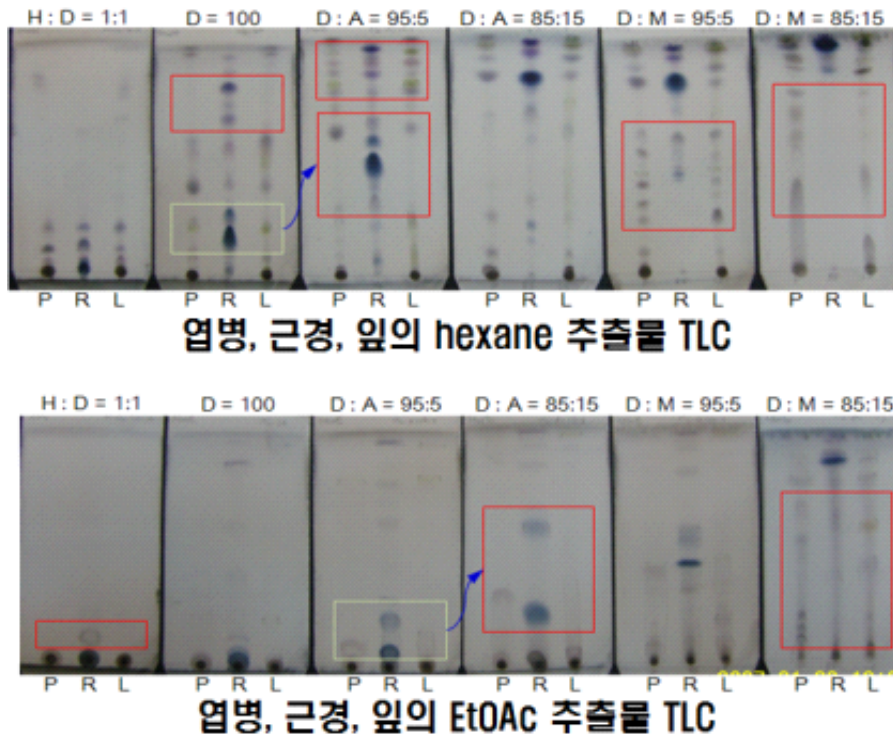


Fig 2. Compare with hexane, EtOAc, BuOH and aqueous extracts from leaf, petiole and rhizome of *P. japonicus* Max.

머위의 잎, 엽병 및 근경의 hexane, EtOAc, BuOH 및 물 추출물을 위암 (AGS), 간암 (HepG2), 대장암 (HCT-116), 유방암 (MCF-7), 흑종암 (B16F10) 및 Sarcoma-180 암세포에 대한 IC<sub>50</sub>을 조사하였다 (Table 2). 잎의 hexane 추출물의 IC<sub>50</sub>은 HCT-116 cell을 제외하고 60 µg/ml로서 항암 효과가 높았다. EtOAc의 엽병 추출물은 6종의 암세포에 대해서 20 µg/ml로서 매우 항암 효과가 높았다. 뿌리의 EtOAc 추출물 IC<sub>50</sub>은 45-75 µg/ml로서 중간 정도였으며, 잎의 EtOAc 추출물은 모든 세포에 대해서 약 95 µg/ml로서 매우 낮은 항암 효과를 보였다. 그러나 BuOH와 물의 잎, 엽병 및 근경 추출물의 IC<sub>50</sub>은 100 µg/ml 이상으로서 항암 효과가 없었다.



Table 2. IC<sub>50</sub> values of AGS, HepG2, HCT-116, MCF-7, S-180 and B16F10 cancer cell lines induced by hexane, EtOAc, BuOH, and aqueous extracts obtained from leaves, petioles, and rhizomes of *P. japonicus* Max.

| Solvents          | Plant parts | IC <sub>50</sub> (μg/ml) |            |            |            |            |            |
|-------------------|-------------|--------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|
|                   |             | AGS                      | HCT-116    | B16F10     | MCF7       | S-180      | HepG2      |
| Hexane            | Leaf        | 27.56±0.36               | >100       | 44.77±1.81 | 21.53±1.05 | 60.25±2.48 | 4.31±0.15  |
|                   | Petiole     | 30.94±0.24               | 39.67±1.92 | 28.59±0.62 | 31.56±0.81 | 39.32±0.90 | 27.31±1.42 |
|                   | Root        | 21.94±0.30               | 63.20±0.38 | 34.45±0.51 | 20.47±2.17 | 43.52±1.70 | 10.69±0.35 |
| EtOAc             | Leaf        | >100                     | >100       | >100       | 99.36±1.71 | >100       | 94.57±2.71 |
|                   | Petiole     | 16.50±0.57               | 13.51±0.62 | 12.65±0.52 | 14.06±0.23 | 20.85±0.06 | 16.66±0.88 |
|                   | Root        | 44.89±0.22               | 61.39±1.23 | 49.67±1.03 | 57.26±1.48 | 75.09±2.71 | 58.57±2.81 |
| BuOH              | Leaf        | >100                     | >100       | >100       | >100       | >100       | >100       |
|                   | Petiole     | >100                     | >100       | >100       | >100       | >100       | >100       |
|                   | Root        | >100                     | >100       | >100       | >100       | >100       | >100       |
| dH <sub>2</sub> O | Leaf        | >100                     | >100       | >100       | >100       | >100       | >100       |
|                   | Petiole     | >100                     | >100       | >100       | >100       | >100       | >100       |
|                   | Root        | >100                     | >100       | >100       | >100       | >100       | >100       |

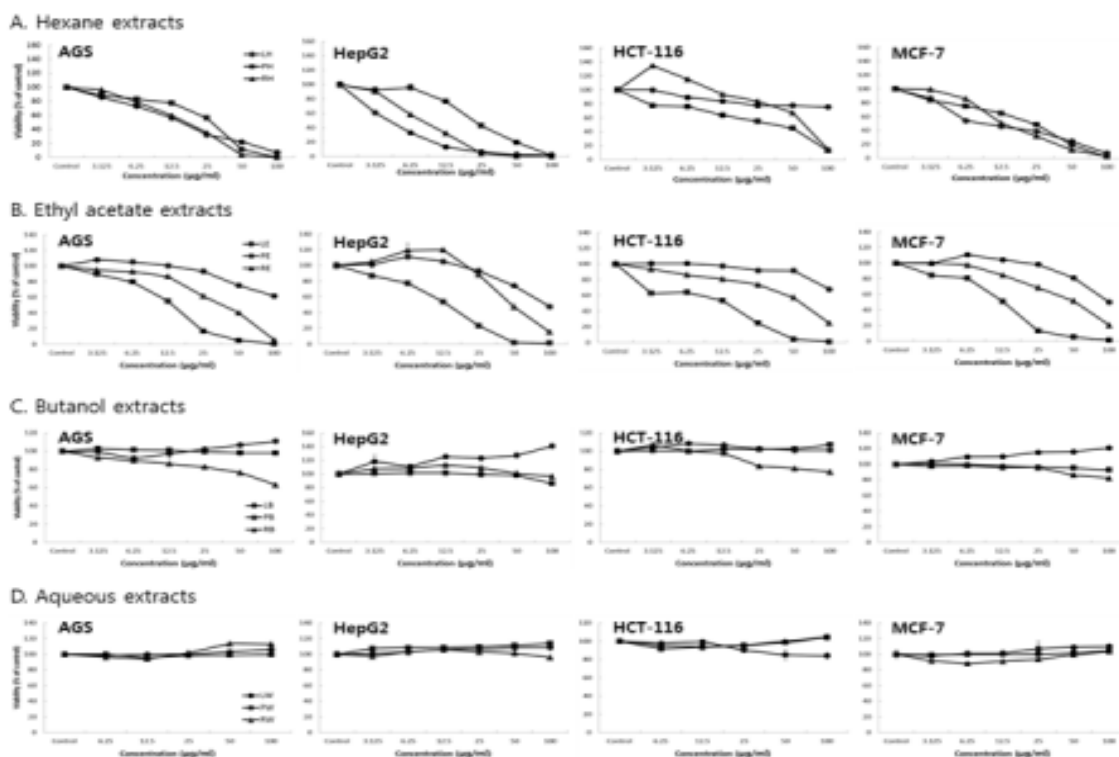


Fig 3. Viabilities of AGS (human gastric carcinoma), HepG2 (human hepatocellular cancer), HCT-116 (human colorectal cancer), and MCF-7 (human breast cancer) cell lines in the presence of hexane, ethyl acetate, butanol and aqueous fractions of *P. japonicus* extract.

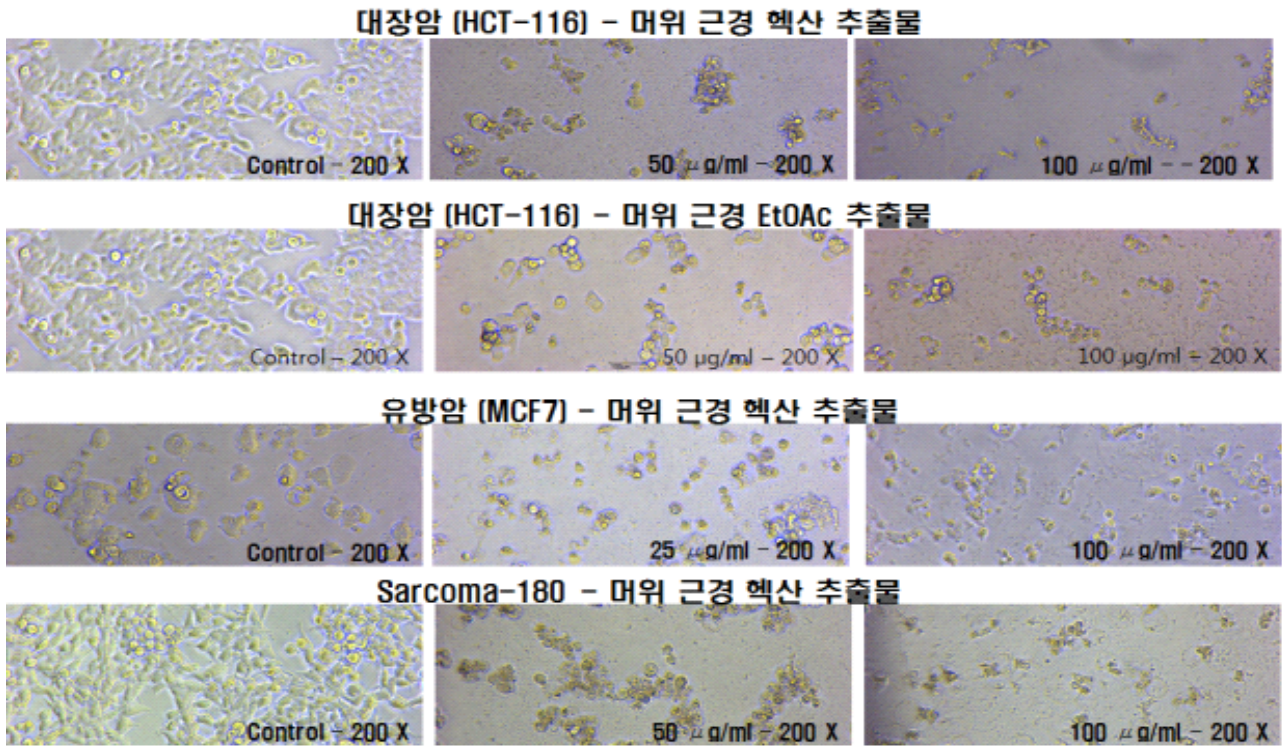


Fig 4. Rhizome extracts of *P. japonicus* induced morphological changes in HCT-116, MCF-7 and Sarcoma-180 cells (X 200).

Cells were treated with increasing concentrations of rhizome extracts for 24 h and their resulting morphological changes were recorded. Vehicle control and 0.5 mg/ml of rhizome extracts treated cells showed normal cell architecture. Few cells in rhizome extracts 50 µg/ml treatment showed rounding. The rate of cell death was indicated by the shrinking of the cells, and the appearance of broken cell membranes increased with increasing concentrations of rhizome extracts at doses of 100 µg/ml.

## 2. 채취시기별 머위 Bakkenolide B의 함량 분석

### 가. 재료 및 방법

#### (1) 식물 재료

경북 청도군의 야생에서 성장하고 있는 머위 (*Petasites japonicus* Max)를 수집하여 잎, 엽병 및 근경으로 분류하여 건조한 다음 재료로 사용하였다. 머위 샘플은 -20°C에 저장하면서 필요 시에 사용하였다.

#### (2) 시약 및 기기

HPLC-grade의 증류수와 acetonitrile은 Fisher (Fair Lawn, NJ, USA)로부터 구입하여 사용하였으며. 기타 증류수는 Milli-pore water purified system에서 얻은 것을 사용하였다. HPLC에 사용되는 모든 용매는 사용하기 전에 ultrasonic bath에서 degass시킨 다음 사용하였다. 지표성분으로 사용된 Bakkenolide B는 본 연구팀이 머위의 잎으로부터 순수분리하여 구조동정한 다음 GC-MS (Gas chromatography - mass spectrometry)로서 98% 이상의 순수물질을 사용하였

다. Bakkenolide B의 구조는 <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, 2D NMR 및 MS spectral data를 이용하여 이미 보고된 자료와 비교하여 증명하였다. <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, 및 2D-NMR의 spectra는 Bruker DMX-500NMR spectrometer(Bruker, Billerica, Massachusetts, USA)로서 TMS를 내부 표준물질로하여서 이동거리를 측정하였다. 물질을 순수분리하기 위한 column chromatography용 silica gel (60-200 mesh)은 Merk (Darmstadt, Germany)사로부터 구입하여 사용하였다.

### (3) 분석 방법

Bakkenolide B의 분석은 vacuum degasser, quaternary pump, thermostated oven device 및 a variable wavelength UV detector가 장착된 Agilent G1100 systems (Waldbronn, Germany)으로 분석하였다. Chromatographic data는 Agilent chromatographic Work Station software를 이용하여 분석하였다. Bakkenolide B의 HPLC분석은 Luna C18 column (5 µm, 150×3.0 mm i.d. Phenomenex, Torrance, CA, USA)를 이용하여 용매조건은 acetonitrile - water (0 to 100)의 구배로 35분 동안 분석하였다. Sample은 10 µl injection하였으며, 칼럼의 온도는 30°C, mobile phase의 flow rate는 0.4 ml min<sup>-1</sup>으로 조정하여 210, 215, 235, 254 nm and 360 nm에서 조사하였다.

### (4) Calibration curves, limits of detection and quantification의 측정

Bakkenolide B의 표준물질 2.0 mg을 2 ml methanol에 녹여서 stock 용액으로 사용하였다. Stock solution은 다양한 5농도 이상 (500, 250, 125, 62.5 및 31.25 mg/ml)으로 희석하여 3반복으로서 calibration curve를 구하였다. 회귀 직선식 (regression equations)  $y=ax+b$ 으로 나타내었으며,  $x = \text{peak area}$ 이었으며,  $y = \text{contents of compound}$ 이었다. Bakkenolide B의 희석농도를 이용하여 limits of detection (LOD)와 limits of quantification (LOQ) 값을 구하였다.

### (5) Precision, repeatability 및 accuracy 측정

Bakkenolide B 표준원액을 메탄올에 희석한 후 혼합하여 제조된 Bakkenolide B 표준용액으로 재현성(repeatability), 정밀성 (precision), 정확성(accuracy)을 측정하였다.

## 나. 결과 및 고찰

항알레르기 효능이 높은 머위 제품을 생산하기 위해서는 지표성분의 함량이 높은 원재료를 확보하는 것이 무엇보다 중요하다. 따라서 머위의 항알레르기 효과가 높은 주요 성분인 bakkenolide B와 petatewalide B의 함량을 HPLC 조건을 확립하였다. bakkenolide B와 petatewalide B의 함량을 측정할 수 있는 HPLC 분석은 Luna C18 (2) column (150 x 3.0 mm id, 5 m particle size (Phenomenex Inc., Torrance, CA)으로 215 nm에서 분석하였을 때에 두 가지 성분이 분리된 피크를 얻을 수 있었다. 그러나 기준에 보고된 조건으로 분리하였을 경우에는 두 성분이 하나의 피크로 관찰되었다.

Table 3. Values of correlation, regression, LOD and LOQ of bakkenolide B and petatewalide B from *P. japonicus* leaf.

| Compounds      | Correlation ( $r^2$ ) | Regression          | LOD   | LOQ   |
|----------------|-----------------------|---------------------|-------|-------|
| Bakkenolide B  | 0.987                 | $y=14372.0x+7857.9$ | 1.472 | 4.471 |
| Petatewalide B | 0.999                 | $y=14372.0x+7857.9$ | 1.453 | 4.404 |

따라서 본 연구에서 확립한 방법으로 머위를 4월부터 1개월 간격으로 8월까지 잎줄기 및 근경으로 구분하여 채취한 다음 bakkenolide B와 petatewalide B의 함량을 조사하였다.

(1) 머위 채취 시기별 잎, 엽병 및 근경에서 Petatewalide B의 함량

머위 채취 시기별 잎에서 petatewalide B의 함량을 비교한 결과, 6월까지의 함량이 증가하다가, 7월 이후에는 함량이 거의 없었다. 엽병에서는 7월에 수확한 샘플에서 약 0.2%로서 매우 낮았다. 반면, 근경에서는 5월 이전에는 0.2%로서 매우 낮았으나, 6월 이후에는 점차 증가하였다.

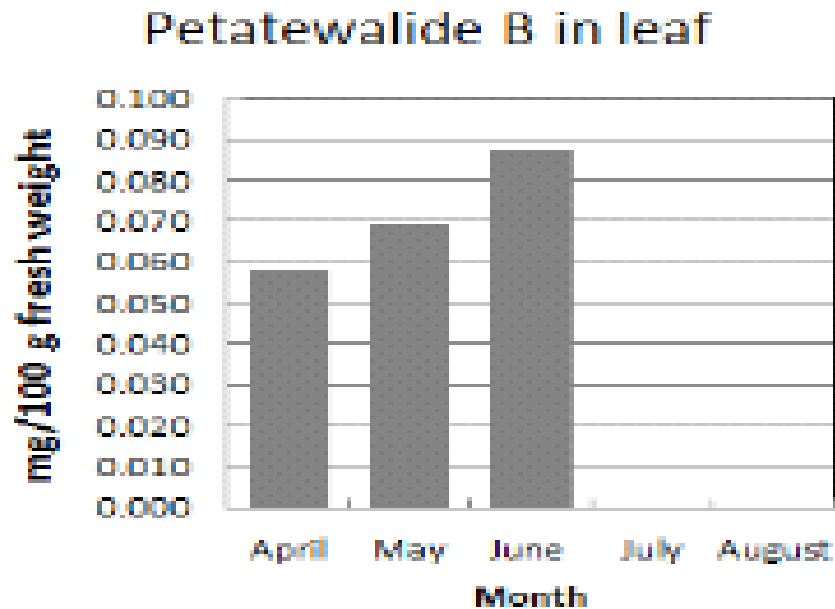


Fig 5. Seasonal change of petatewalide B from *P. japonicus* leaf.

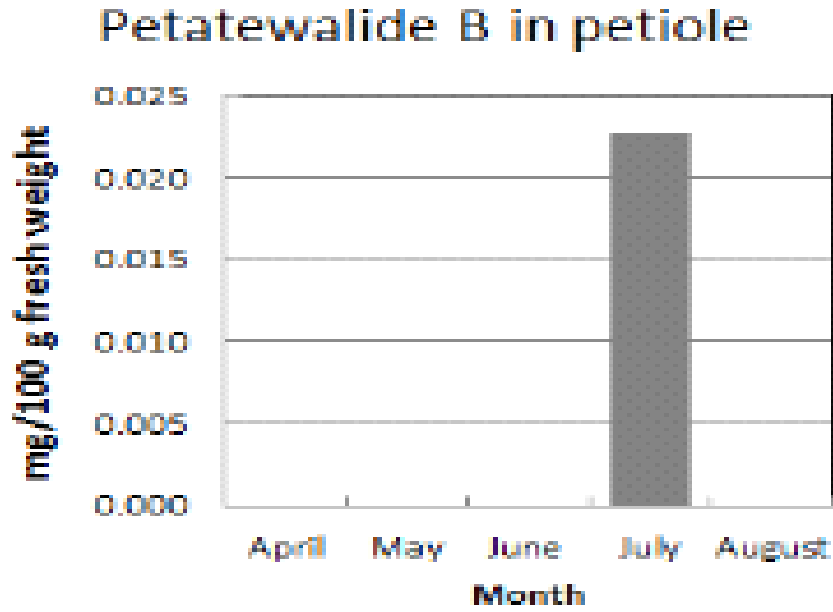


Fig 6. Seasonal change of petatewalide B from *P. japonicus* petiole.

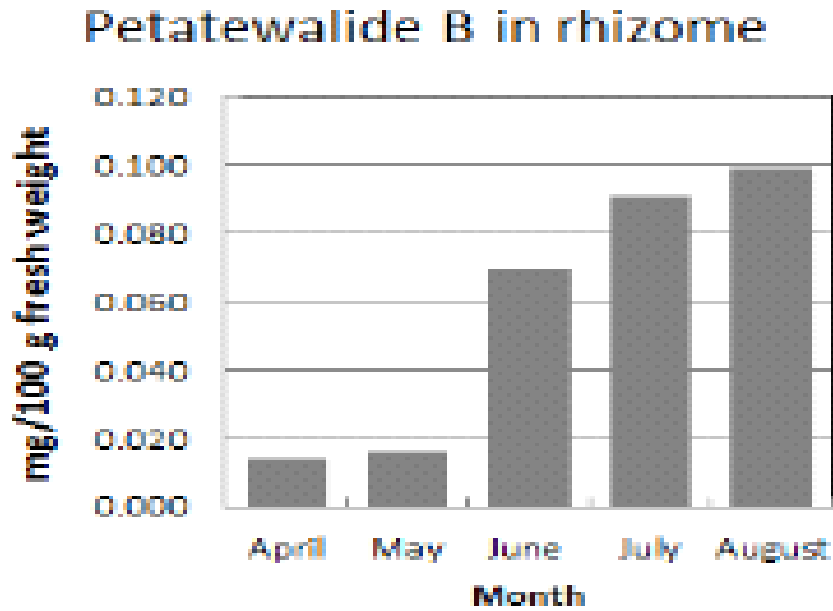


Fig 7. Seasonal change of petatewalide B from *P. japonicus* rhizome.

(2) 머위 채취 시기별 잎, 엽병 및 근경에서 bakkenolide B의 함량

채취 시기별 잎, 엽병 및 근경에서 bakkenolide B의 함량을 비교한 결과, 잎, 엽병 및 근경 모두에서 4월에서 8월까지 함량이 비례적으로 감소하였다. 잎에서는 4월에 bakkenolide B의 함량이 0.3 mg/100 g 생체중이던 것이 8월에는 약 1/3로 감소하여 0.1 mg/100 g 생체중으로

감소하였다. 기관별 Bakkenolide B의 함량은 잎에서 가장 많았으며, 다음은 엽병이었으며 근경의 bakkenolide 함량이 가장 낮은 경향이였다.

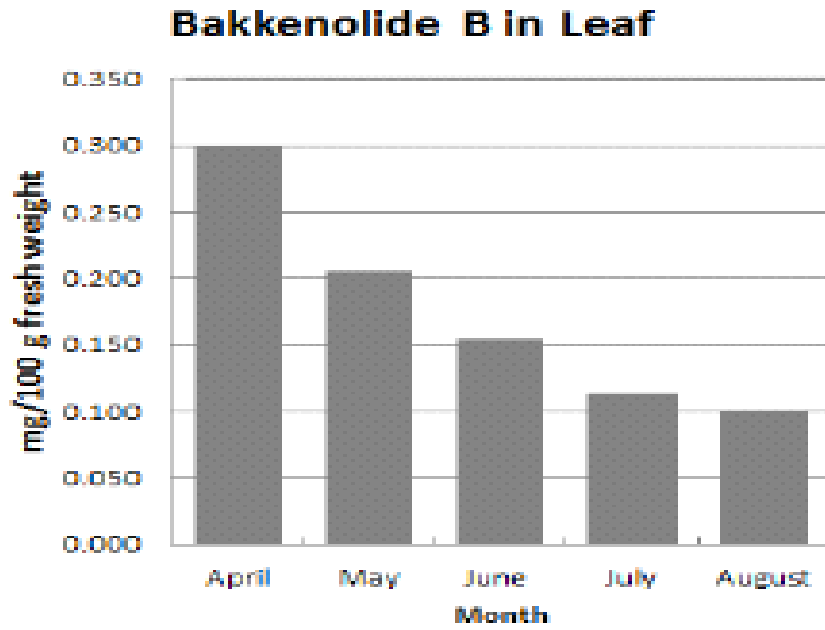


Fig 8. Seasonal change of bakkenolide B from *P. japonicus* leaf.

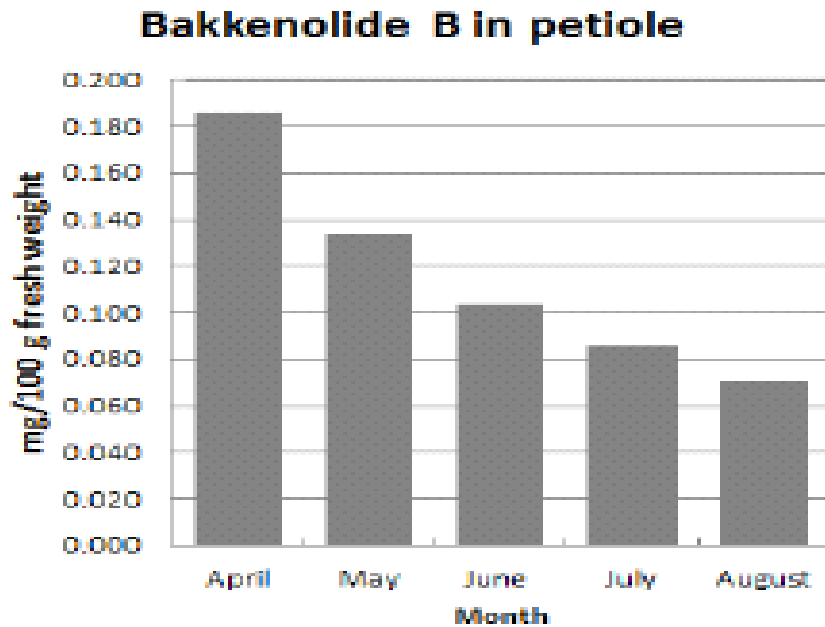


Fig 9. Seasonal change of bakkenolide B from *P. japonicus* petiole.

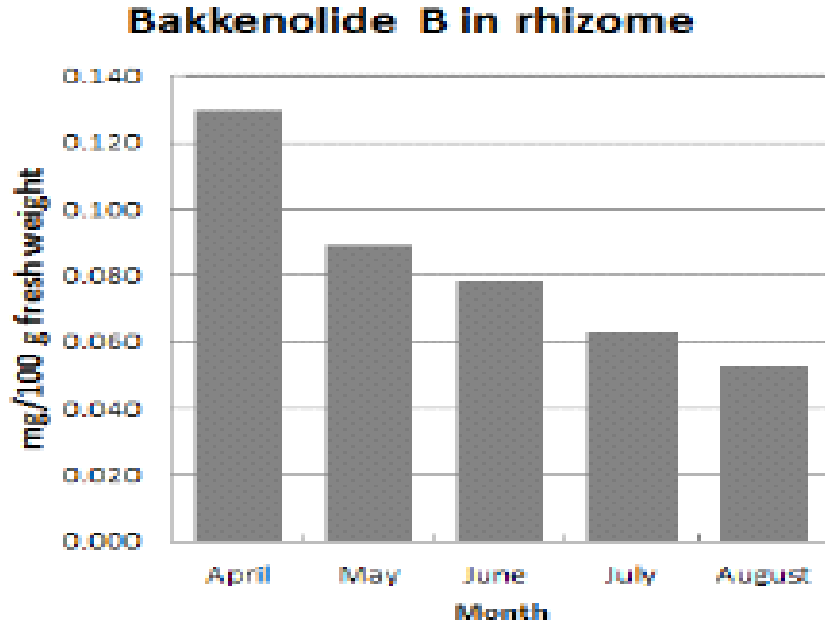


Fig 10. Seasonal change of bakkenolide B from *P. japonicus* rhizome.

(3) 머위 채취 시기별 효능성분인 bakkenolide B와 petatewalide B의 최적 채취시기

- ① Bakkenolide B의 채취 시기 : 4월에 채취하는 것이 제품 개발시에 bakkenolide B의 함량이 가장 높을 것으로 판단됨.
- ② Bakkenolide B의 채취 부위 : 잎을 이용하는 것이 가장 효과적일 것임
- ③ Petatewalide B의 채취 시기 : 잎은 6월 전에, 근경은 7월 이후에 하는 것이 가장 효과적일 것으로 판단됨
- ④ Petatewalide B의 채취 부위 : 잎은 6월 이전, 근경은 7월 이후

(4) 결 론 : 항알레르기 제품 개발을 위한 최적 조건

- Bakkenolide B와 petatewalide B 중에서 항알레르기 효과는 bakkenolide B가 지표성분으로서 좋은 것으로 판단됨
- 채취 부위는 잎을 하는 것이 가장 좋을 것으로 판단됨
- 채취 시기는 4월에 채취하였을 때에 제품 중에 함량이 가장 높을 것으로 판단됨
- 제품 개발팀 : 잎을 사용하여 제품 개발 중에 있음 (제 1세부과제의 결과 활용)

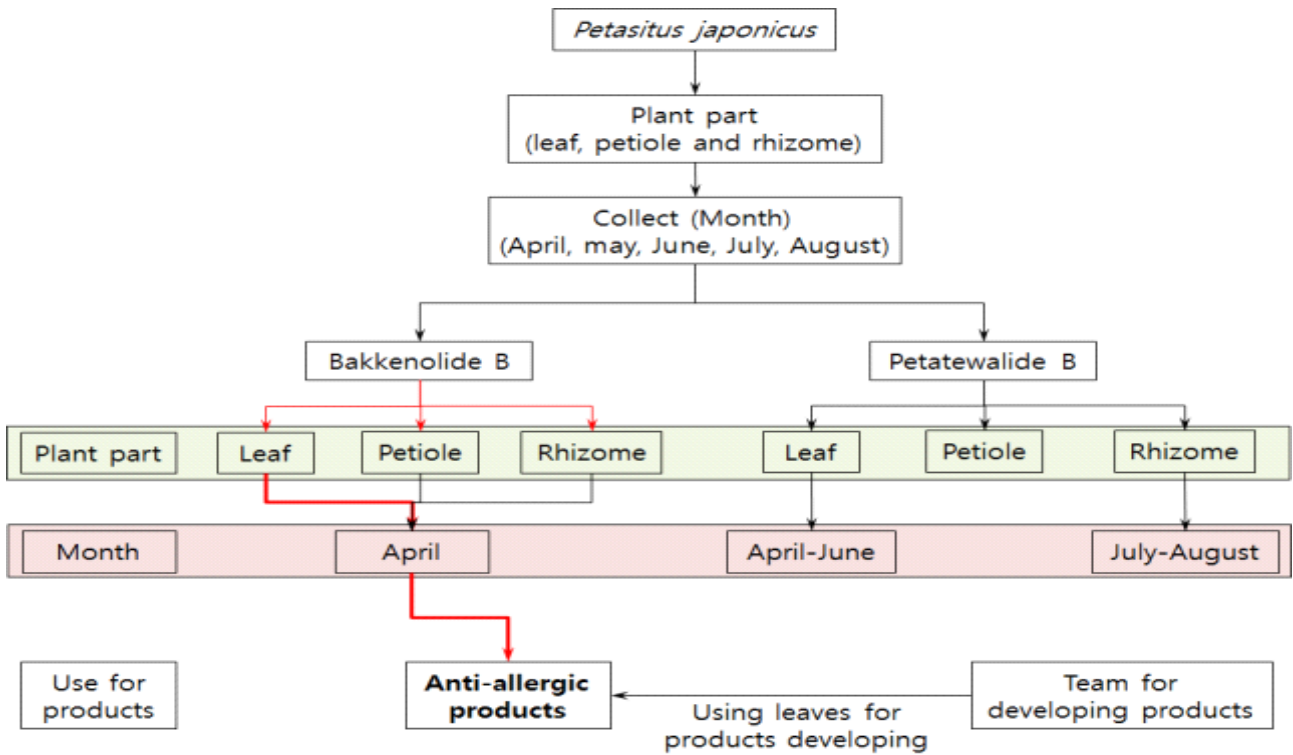


Fig 11. 항알레르기 제품개발을 위한 최적 재료 선정

### 3. 부원료인 어성초로부터 생리활성 성분의 순수분리 및 구조동정

#### 가. 재료 및 방법

##### (1) 어성초로부터 극성별 추출

1-2차연도에 주 재료인 머위 (*Petasites japonicus* (S. et Z.) Max.)로부터 항 알레르기 효능이 높은 성분 중에서 이미 알려진 bakkenolide B와 신물질인 petatewalide B를 순수분리하여 구조를 동정하였다. 그 중에서 항알레르기 효능이 높은 bakkenolide B의 분석 방법을 확립하여 채취시기별 함량을 평가하여 원료를 표준화하였다.

3차연도에는 부원료로부터 몇 가지 성분을 순수분리하였으며, 순수분리한 성분 중 몇 가지 성분을 구조가 동정되었으며, 몇 가지의 성분을 구조를 동정 중에 있으며, 동시에 생리활성을 검증 중에 있다.

따라서 현재 구조동정이나 생리활성을 검증 중에 있는 성분들은 추후 물질 또는 효능 특허 때문에 구조를 밝힐 수 없으며, 차후 효능이 검증되면, 특허 출원 후에 논문과 특허의 성과로 잡힐 수 있을 것으로 생각된다. 평가시에 구조를 완전히 밝히지 않은 성분들에 대해서는 농기평과 평가하시는 분들의 양해를 구합니다.

부원료인 어성초의 추출은 건조된 어성초 1 kg을 분쇄하여 5 L의 삼각플라스크에 넣고 3 L hexane을 가하여 sonicator에서 1시간 동안 추출하는 방법으로 3회 반복 추출하였다. 남은 분말에 3 L의 EtOAc를 가하여 sonicator에서 3회 반복 추출하였으며, MeOH를 순차적으로 가하여 동일한 방법으로 추출하였다. 추출물의 함량은 hexane 추출물은 39.79 g, EtOAc 추출물은 8.58 g, MeOH 추출물은 118.13 g을 얻었다.



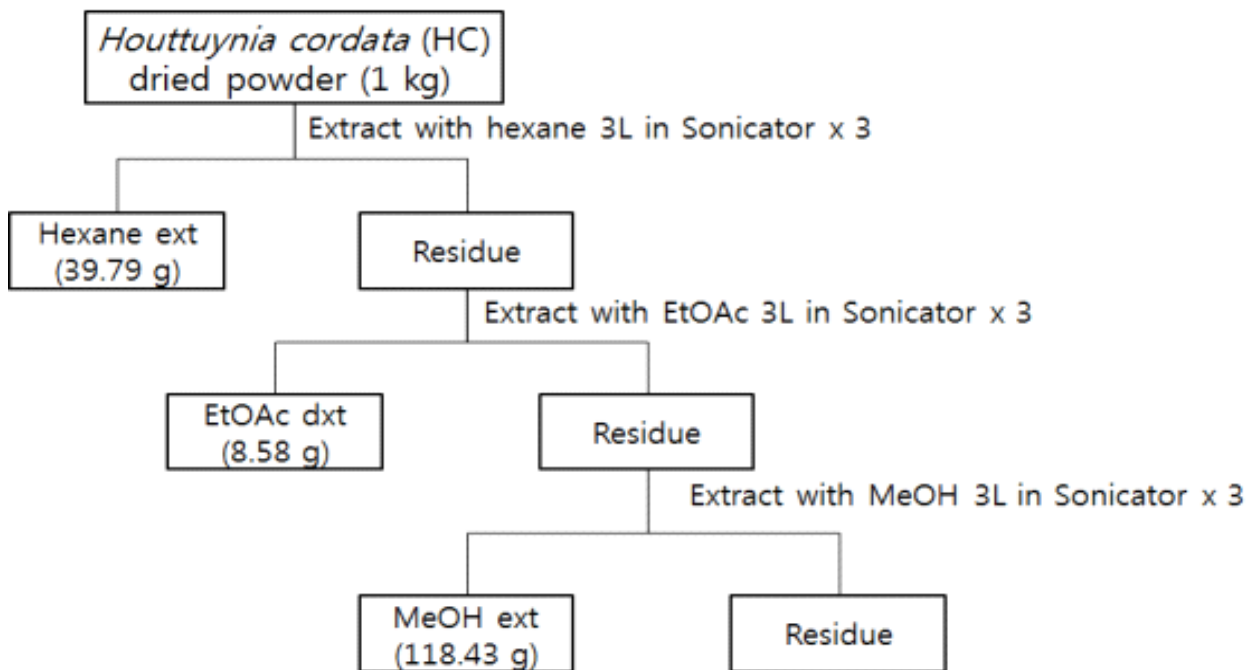


Fig 12. Successively extraction form *Houttuynia cordata* (HC).

## (2) 어성초로부터 성분의 순수분리

어성초의 hexane 추출물 중 22.21 g으로부터 물질을 순수분리한 성분의 모식도는 다음의 그림에서 보는 바와 같다. 어성초 hexane 추출물 22.21 g을 실리카겔이 충전된 칼럼에 첨가한 다음 용매를 흘려보내면서 총 123개의 분획을 얻었다. 그중 순수분리한 물질 1종을 얻었으며 (HCH20 + HCH21), 수득한 123개의 분획 중에 32번 주위의 분획을 합한 분획 (HCE32)을 sephadex칼럼에 첨가하여 용매를 흘려보내면서 얻은 15개의 분획 중에서 497.9 mg의 분획 HCH32IE를 선정하였다. HCH32IE를 SiO<sub>2</sub>칼럼에 첨가하여 얻은 분획 (HCH32IEIH + 32IEII) 44.8 mg의 순수물질을 얻었다. 마지막으로 수득한 202.3 mg의 분획을 칼럼에 가하여 용매를 흘려보내면서 173.8 mg의 순수물질인 MWLSH9ICIBIC를 분리하였다.

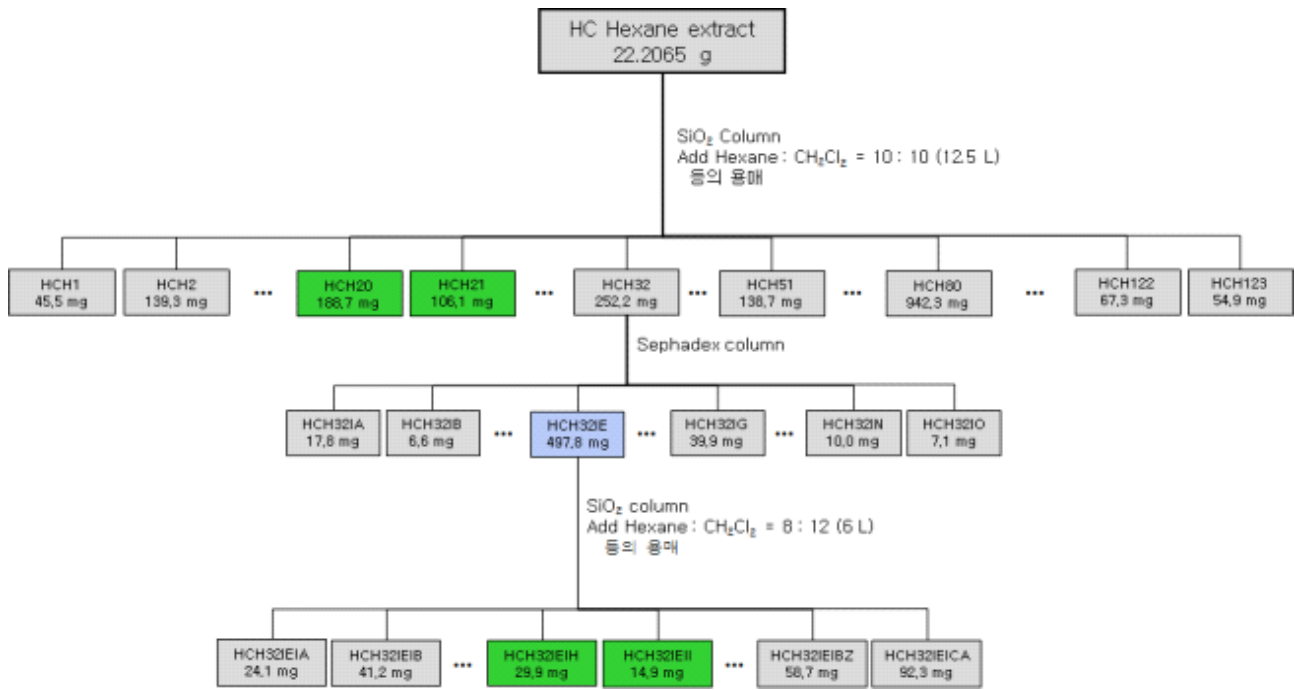


Fig 13. Isolation scheme of pure compounds (>97%) from *Houttuynia cordata* Thunb.

### (3) 어성초로부터 순수분리한 성분의 구조동정

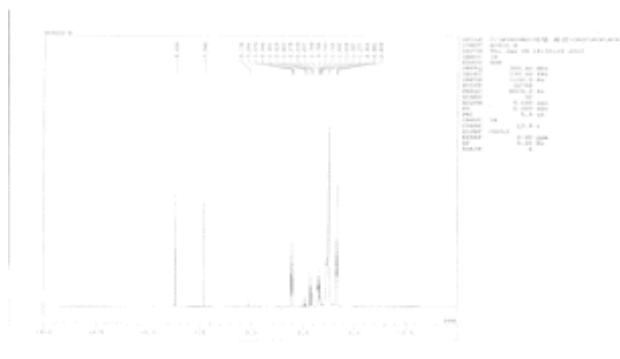
순수분리한 성분의 구조는  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ , 2D NMR 및 MS spectral data를 이용하여 분석하였다.  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ , 및 2D-NMR의 spectra는 Bruker DMX-500NMR spectrometer(Bruker, Billerica, Massachusetts, USA)로서 TMS를 내부 표준물질로 하여서 이동거리를 측정하였다.

#### 나. 결과 및 고찰

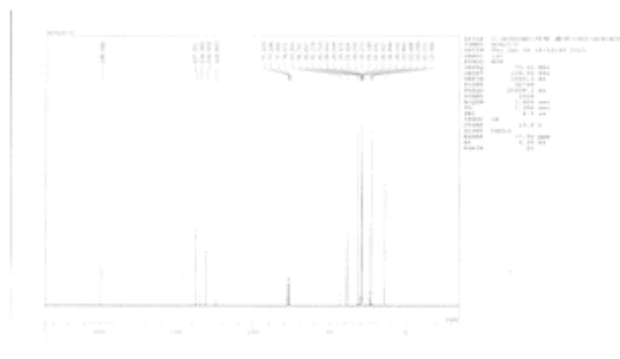
##### (1) 순수분리한 성분의 구조동정

##### (가) 어성초 (HC)로부터 순수분리한 HCH20의 NMR spectrum 및 GC chromatogram

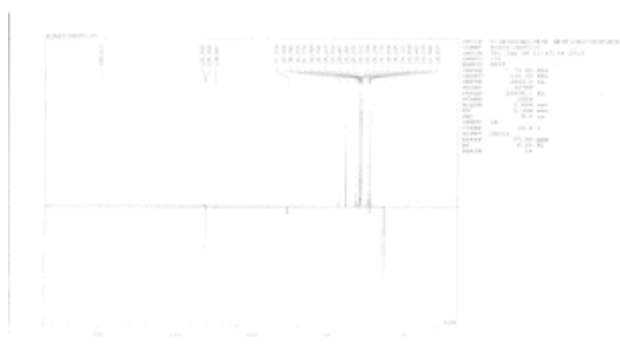
어성초의 hexane (HCH) 추출물로부터 294.8 mg의 HCH20을 순수분리하였으며,  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ , Dept 135-NMR, Dept 90-NMR, COSY-NMR, HSQC-NMR 및 HMBC-NMR spectrum은 다음의 그림에서 보는 바와 같다. 작용기의 주요 특성은 1개의 aldehyde와 double bond 1개를 가지고 있다. GC-MS spectrum으로부터 얻은 분자량은 542.5이며, GC chromatogram의 결과 약 97% 이상의 순도를 가지고 있으며, 성분의 구조는 차후에 생리활성 검증 후에 특허 출원 등이 문체가 되므로 생리활성을 검증한 후에 특허를 출원한 다음에 구조를 밝힐 계획이다.



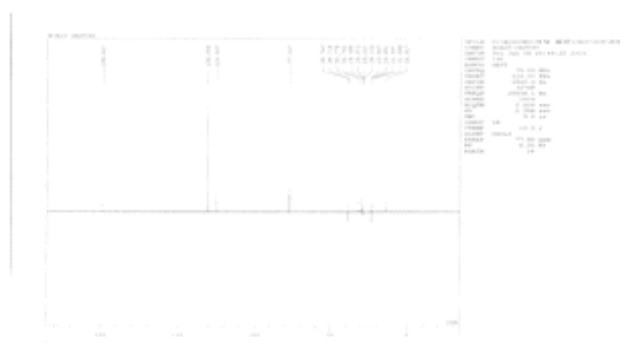
$^1\text{H-NMR}$  of  $\text{HCH}_2\text{O}$  (300 MHz in  $\text{CDCl}_3$ )



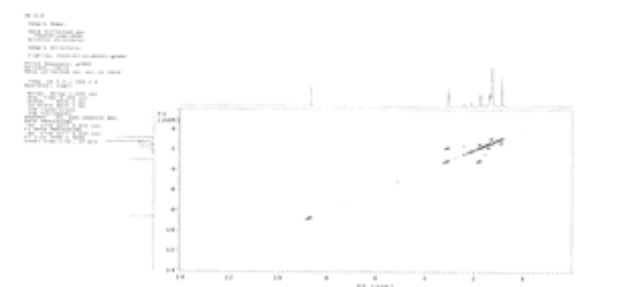
$^{13}\text{C-NMR}$  of  $\text{HCH}_2\text{O}$  (75 MHz in  $\text{CDCl}_3$ )



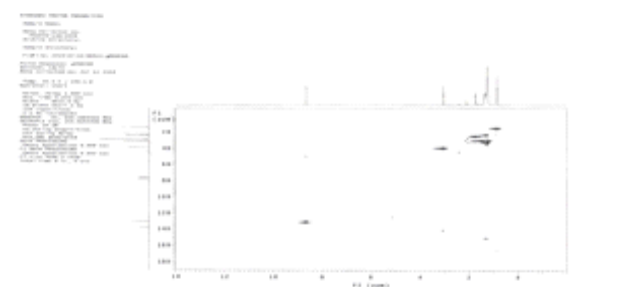
Dept135-NMR of  $\text{HCH}_2\text{O}$  (in  $\text{CDCl}_3$ )



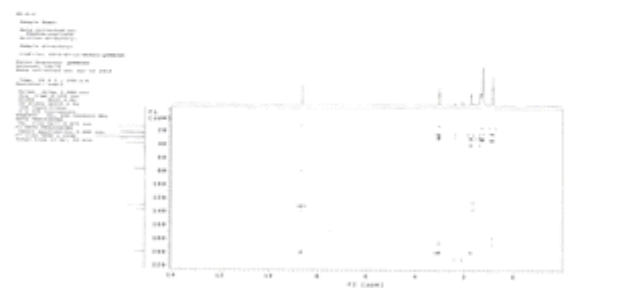
Dept90-NMR of  $\text{HCH}_2\text{O}$  (in  $\text{CDCl}_3$ )



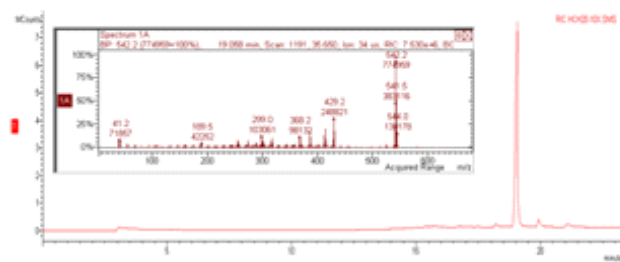
COSY-NMR of  $\text{HCH}_2\text{O}$  (in  $\text{CDCl}_3$ )



HSQC-NMR of  $\text{HCH}_2\text{O}$  (in  $\text{CDCl}_3$ )



HMBC-NMR of  $\text{HCH}_2\text{O}$  (in  $\text{CDCl}_3$ )



GC chromatogram

Fig 14. 1D and 2D-NMR spectrum and GC chromatogram of  $\text{HCH}_2\text{O}$  compound from *Houttuynia cordata* Thunb.

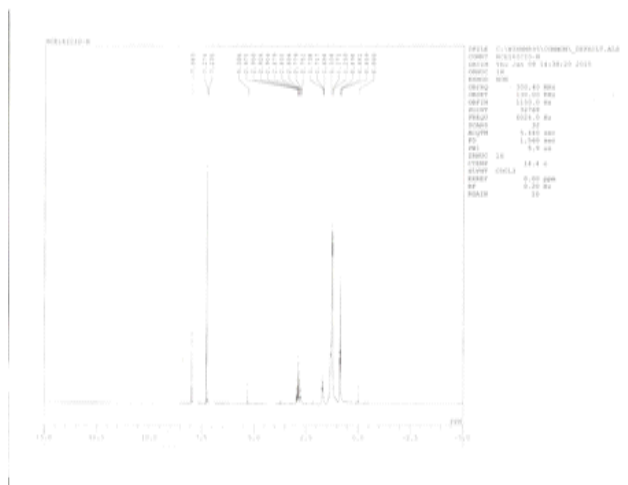
Table 4. <sup>1</sup>H (500 MHz in CDCl<sub>3</sub>) and <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz in CDCl<sub>3</sub>) spectral data, and HMBC data of HCH20.

| No | $\delta_c$ | $\delta_H$      | HMBC |
|----|------------|-----------------|------|
|    | 199.25     | C               |      |
|    | 137.83     | C-              |      |
|    | 131.07     | CH              |      |
|    | 38.87      | CH <sub>2</sub> |      |
|    | 31.84      | CH <sub>2</sub> |      |
|    | 29.42x2    | CH <sub>2</sub> |      |
|    | 29.23x4    | CH <sub>2</sub> |      |
|    | 24.09      | CH <sub>2</sub> |      |
|    | 22.63x2    | CH <sub>2</sub> |      |
|    | 14.06      | CH <sub>3</sub> |      |

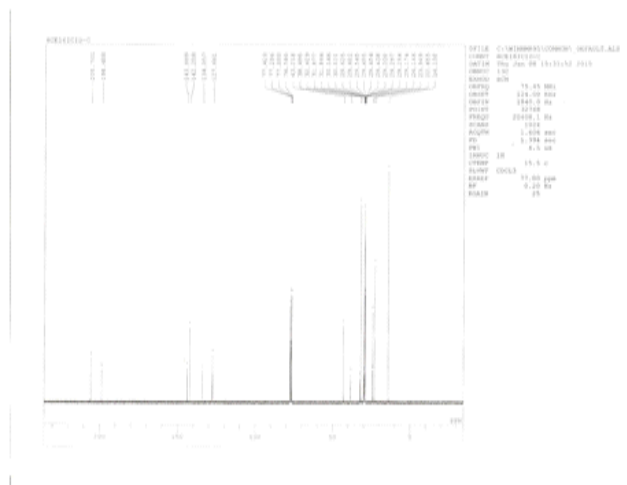
※ 최종 spectrum과 구조분석은 생리활성 검증 후, 특히 가능성을 확인 한 다음에 밝힐 계획 임.

**(나) 어성초 (HC)로부터 순수분리한 HCE16ICID의 NMR spectrum 및 GC chromatogram**

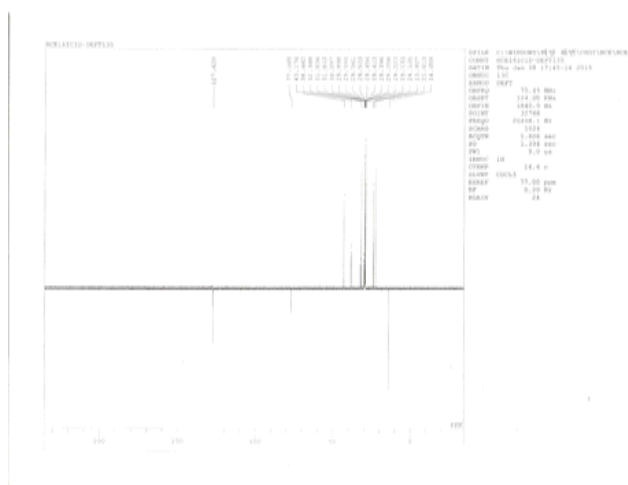
어성초의 hexane (HCH) 추출물로부터 52.6 mg의 HCE16ICID을 순수분리하였으며, <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, Dept 135-NMR, Dept 90-NMR, COSY-NMR, HSQC-NMR 및 HMBC-NMR spectrum은 다음의 그림에서 보는 바와 같다. 작용기의 주요 특성은 aldehyde 또는 ketone를 각각 1개를 포함하고 있으며, 2개의 double bond를 가지고 있다. GC-MS spectrum으로부터 얻은 분자량은 너무 크므로 추후 LC-MS로 확인하여야 할 것이며, GC chromatogram의 결과 약 98% 이상의 순도를 가지고 있으며, 성분의 구조는 차후에 생리활성 검증 후에 특히 출원 등이 문제가 되므로 생리활성을 검증한 후에 특허를 출원한 다음에 구조를 밝힐 계획이다.



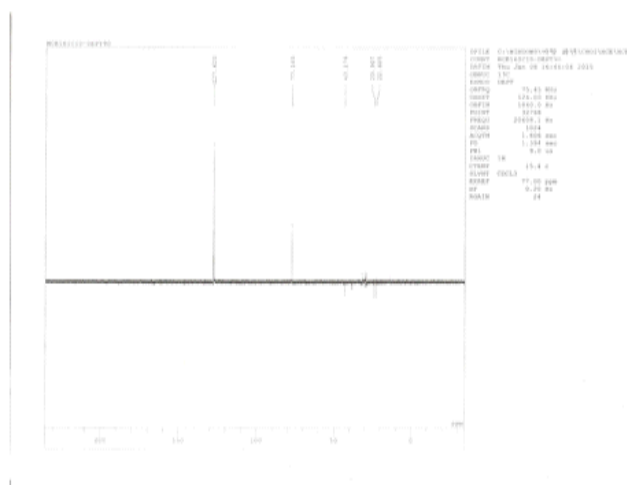
<sup>1</sup>H-NMR of HCE161CID (300 MHz in CDCl<sub>3</sub>)



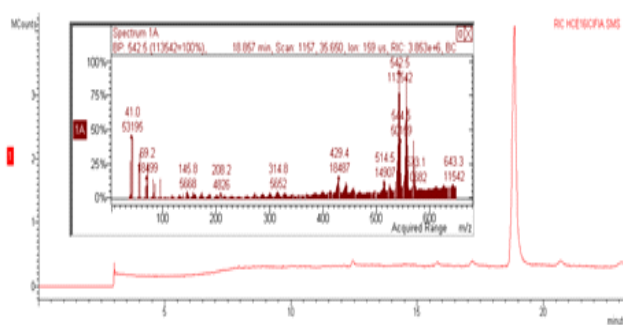
<sup>13</sup>C-NMR of HCE161CID (75 MHz in CDCl<sub>3</sub>)



Dept135-NMR of HCE161CID (in CDCl<sub>3</sub>)



Dept90-NMR of HCE161CID (in CDCl<sub>3</sub>)



GC chromatogram of HCE161CID

Fig 15. 1D-NMR spectrum and GC chromatogram of HCE161CID compound from *Houttuynia cordata* Thunb.

(다) 어성초로부터 순수분리한 HCE21IDII의 NMR spectrum 및 GC chromatogram

어성초의 EtOAc (HCE) 추출물로부터 71.2 mg의 HCE21IDII을 순수분리하였으며,  $^1\text{H}$ -NMR,  $^{13}\text{C}$ -NMR, Dept 135-NMR, Dept 90-NMR, COSY-NMR, HSQC-NMR 및 HMBC-NMR spectrum은 다음의 그림에서 보는 바와 같다. 작용기의 주요 특성은 1개의 aldehyde기를 가지고 있으며, 1개의 double bond를 가지고 있다. GC-MS spectrum으로부터 얻은 분자량은 541.6이며, GC chromatogram의 결과 약 96% 이상의 순도를 가지고 있으며, 성분의 구조는 차후에 생리활성 검증 후에 특허 출원 등이 문제가 되므로 생리활성을 검증한 후에 특허를 출원한 다음에 구조를 밝힐 계획이다.

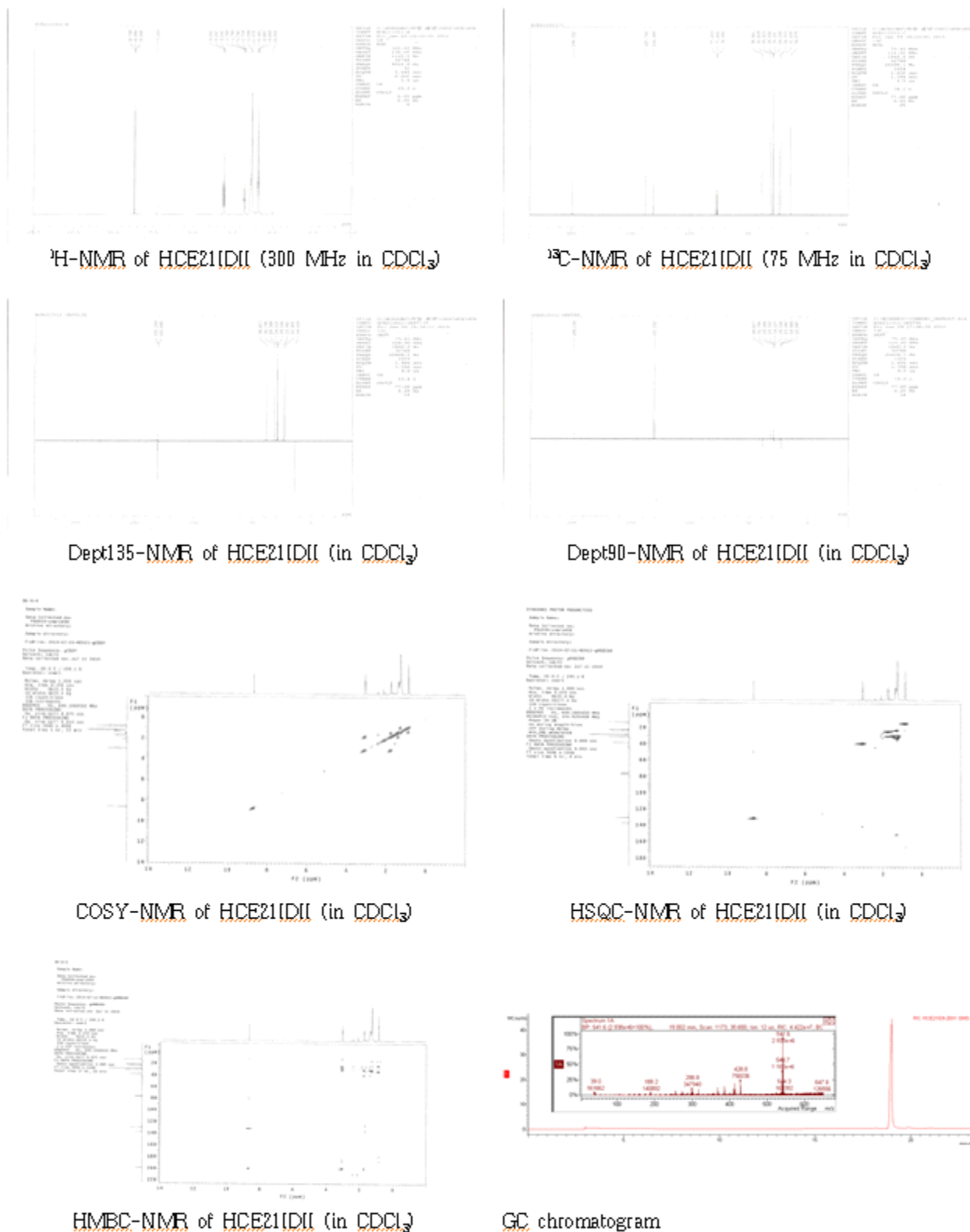
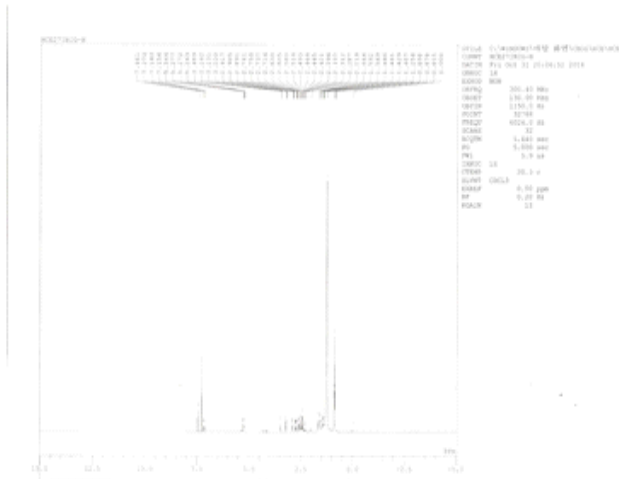


Fig 16. 1D and 2D-NMR spectrum and GC chromatogram of HCE21IDII compound from *Houttuynia cordata* Thunb.

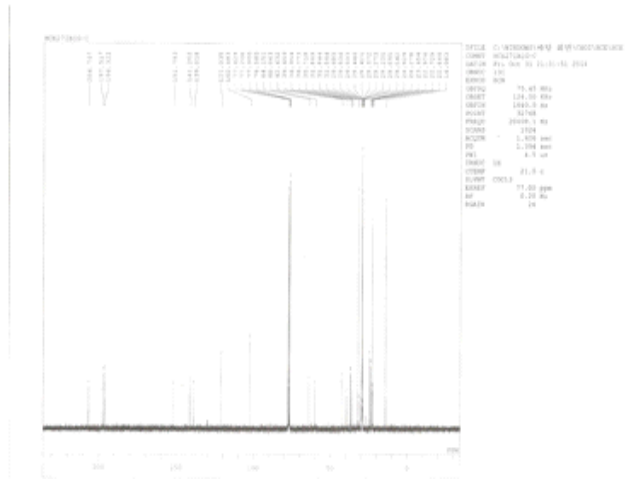
(라) 어성초로부터 순수분리한 HCE27IBIG의 NMR spectrum 및 GC chromatogram

어성초의 EtOAc (HCE) 추출물로부터 32.1 mg의 HCE27IBIG을 순수분리하였으며,  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ , Dept 135-NMR, Dept 90-NMR, COSY-NMR, HSQC-NMR 및 HMBC-NMR spectrum은 다음의 그림에서 보는 바와 같다.

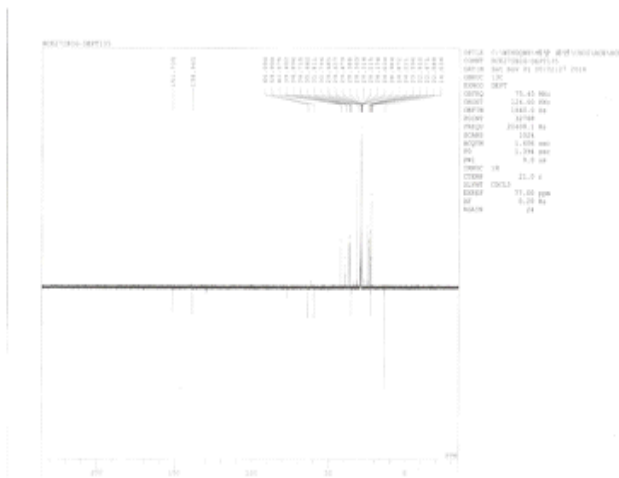




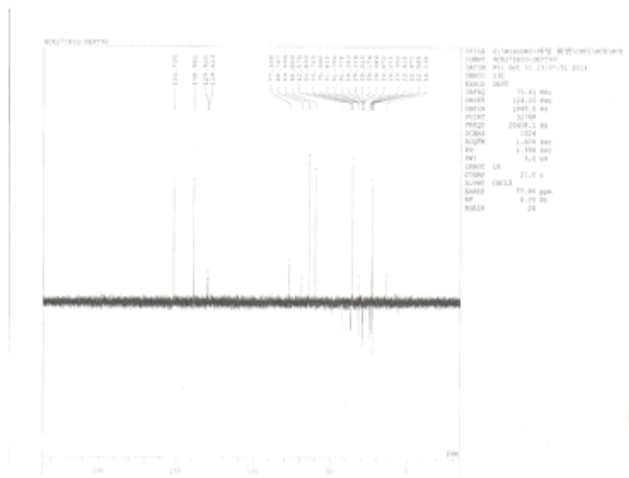
$^1\text{H-NMR}$  of HCE27IBIG (300 MHz in  $\text{CDCl}_3$ )



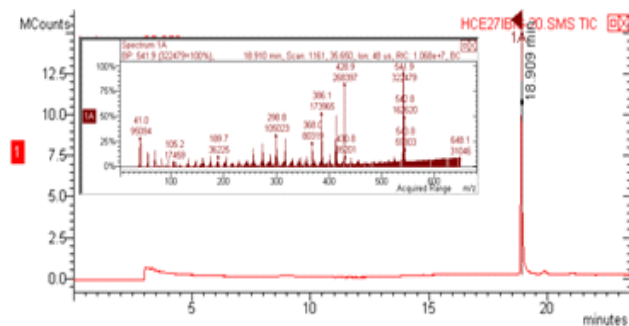
$^{13}\text{C-NMR}$  of HCE27IBIG (75 MHz in  $\text{CDCl}_3$ )



Dept135-NMR of HCE27IBIG (in  $\text{CDCl}_3$ )



Dept90-NMR of HCE27IBIG (in  $\text{CDCl}_3$ )



GC chromatogram

Fig 17. 1D-NMR spectrum and GC chromatogram of HCE27IBIG compound from *Houttuynia cordata* Thunb.

작용기의 주요 특성은 3개의 aldehyde 또는 ketone기를 가지고 있으며, 2개의 double bond를 가지고 있다. GC-MS spectrum으로부터 얻은 분자량은 541.9이며, GC chromatogram의 결과

약 96% 이상의 순도를 가지고 있으며, 성분의 구조는 차후에 생리활성 검증 후에 특허 출원 등이 문제가 되므로 생리활성을 검증한 후에 특허를 출원한 다음에 구조를 밝힐 계획이다.

#### 4. 부원료인 수세미로부터 생리활성 성분의 순수분리 및 구조 동정

##### 가. 재료 및 방법

##### (1) 수세미로부터 극성별 추출

부원료인 수세미의 추출은 건조된 수세미 1 kg을 분쇄하여 5 L의 삼각플라스크에 넣고 3 L hexane을 가하여 sonicator에서 1시간 동안 추출하는 방법으로 3회 반복 추출하였다. 남은 분말에 3 L의 EtOAc를 가하여 sonicator에서 3회 반복 추출하였으며, 다음에는 95% EtOH, 75% EtOH, 50% EtOH 및 증류수를 순차적으로 가하여 EtOAc와 동일한 방법으로 추출하였다. 추출물의 함량은 hexane 추출물은 22.51 g, EtOAc 추출물은 28.25 g, 95% EtOH 추출물은 48.95 g, 75% EtOH 추출물은 73.82 g, 50% EtOH 추출물은 53.28 g 및 증류수 추출물은 20.89 g을 얻었다.

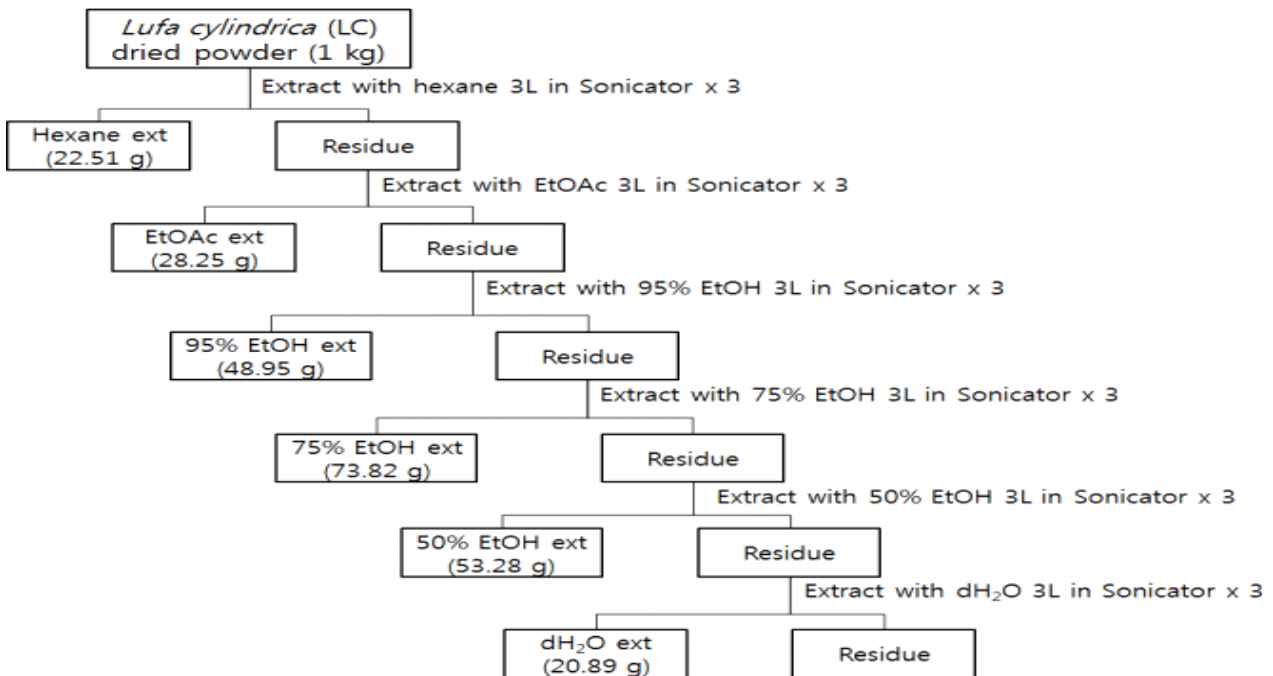


Fig 18. Successively extraction form *Houttuynia cordata* (HC).

##### (2) 수세미로부터 성분의 순수분리

부원료인 수세미의 hexane 추출물로부터 2-4종의 물질을 분리하였으며, 그 모식도를 보면 다음의 그림에서 보는 바와 같다.

수세미의 hexane 추출물 중 39.70 g으로부터 물질을 순수분리한 성분의 모식도는 다음의 그림에서 보는 바와 같다. 수세미 hexane 추출물 39.70 g을 실리카겔이 충전된 칼럼에 첨가한 다음 용매를 흘려보내면서 총 99개의 분획을 얻었다. 수득한 99개의 분획 중에서 순수분리한 물질 41번 분획을 (HCH42, 134.0 mg)을 얻었다. 또한 수득한 99개의 분획 중에 2번 분획을 (HCH2)

을 SiO<sub>2</sub>칼럼에 첨가하여 용매를 흘려보내면서 얻은 10개의 분획 중에서 3번째 분획 (LCH2IC, 109.3 mg)을 선정하였다. LCH2IC를 SiO<sub>2</sub>칼럼에 첨가하여 얻은 분획 (LCH2ICIB) 73.1 mg의 순수물질을 얻었다. 6번 분획 (LCH6, 1.4676 g)을 sephadex칼럼에 첨가하여 용매를 흘려보내면서 얻은 9개의 분획 중에서 순수 분리한 5번째 분획 (LCH6IF, 342.5 mg)을 얻었다.

46번 분획 (LCH46, 832.3 mg)을 SiO<sub>2</sub>칼럼에 첨가하여 용매를 흘려보내면서 얻은 6개의 분획 중에서 4번째 분획 (LCH46ID, 86.5 mg)을 다시 SiO<sub>2</sub>칼럼에 첨가하여 용매를 흘려보내면서 얻은 7개의 분획 중에서 5번째 분획 (LCH2ICIE, 42.4 mg)을 다시 SiO<sub>2</sub>칼럼에 첨가하여 용매를 흘려보내면서 얻은 24개의 분획 중에서 순수 분리된 11번째 분획 (LCH2ICIEIK, 28.4 mg)을 얻었다.

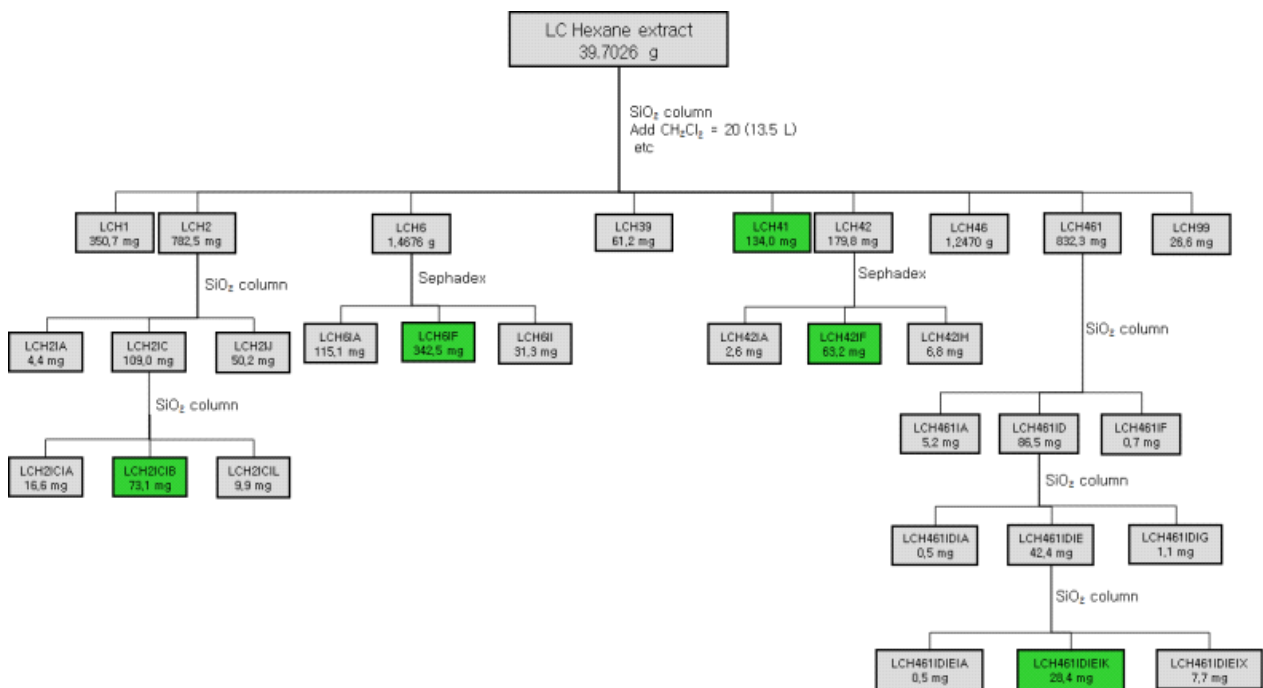
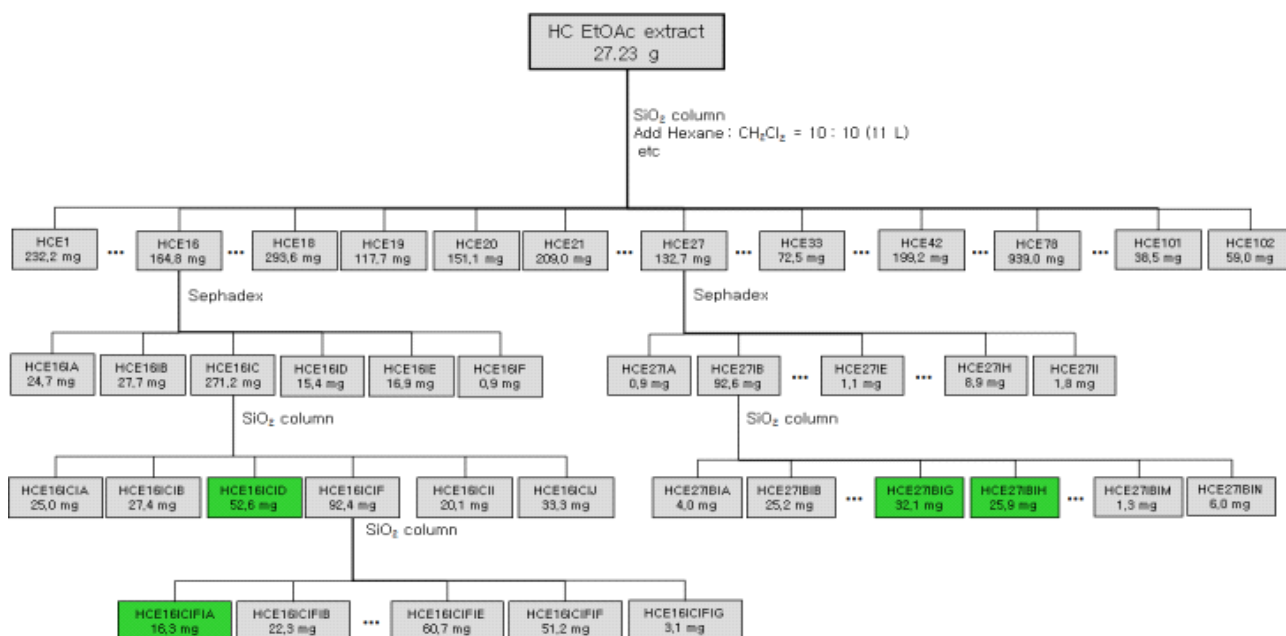


Fig 19. Isolation scheme of pure compounds (>97%) from hexane extracts of *Luffa cylindrica* Roem.

또한 수세미의 EtOAc 추출물로부터 수종의 물질을 순수 분리하였는데, 순수분리 모식도는 다음의 그림에서 보는 바와 같다.

수세미의 EtOAc 추출물 중 27.23 g을 실리카겔이 충전된 칼럼에 첨가한 다음 용매를 흘려보내면서 총 102개의 분획을 얻었다. 수득한 102개의 분획 중에서 16번 분획을 (HCE16)을 sephadex칼럼에 첨가하여 용매를 흘려보내면서 얻은 6개의 분획 중에서 3번째 분획 (LCE2IC, 271.2 mg)을 선정하였다. LCE16IC를 SiO<sub>2</sub>칼럼에 첨가하여 용매를 흘려보내면서 얻은 10개의 분획 중에서 순수 분리한 4번째 분획 (LCH16ID, 52.8 mg)을 얻었으며, 6번째 분획 (LCH16IF, 92.4 mg)을 SiO<sub>2</sub>칼럼에 첨가하여 용매를 흘려보내면서 얻은 7개의 분획 중에서 1번째 분획 (LCH46IFIA, 16.3 mg) 즉 LCH16IF와 동일한 물질을 얻었다. 또한 102개의 분획 중에서 27번 분획 (HCE27, 132.7 mg)을 sephadex칼럼에 첨가하여 용매를 흘려보내면서 얻은 9개의 분획 중에서 순수분리한 2번째 분획 (LCH27IB, 92.6 mg)을 다시 SiO<sub>2</sub>칼럼에 첨가하여 용매를 흘려

보내면서 얻은 14개의 분획 중에서 순수분리한 7-8번째 분획 (HCE27BIG, HCE27BIH, 58 mg)을 얻었다.



### (3) 수세미로부터 순수분리한 성분의 구조동정

순수분리한 성분의 구조는  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ , 2D NMR 및 MS spectral data를 이용하여 분석하였다.  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ , 및 2D-NMR의 spectra는 Bruker DMX-500NMR spectrometer(Bruker, Billerica, Massachusetts, USA)로서 TMS를 내부 표준물질로 하여서 이동거리를 측정하였다.

## 나. 결과 및 고찰

### (1) 순수분리한 성분의 구조동정

#### (가) 수세미로부터 순수분리한 LCH6IF의 NMR spectrum 및 GC chromatogram

덜익은 수세미 과일의 hexane 추출물 (LCH)로부터 342.5 mg의 LCH6IF을 순수분리하였으며,  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ , Dept 135-NMR, Dept 90-NMR, COSY-NMR, HSQC-NMR 및 HMBC-NMR spectrum은 다음의 그림에서 보는 바와 같다.

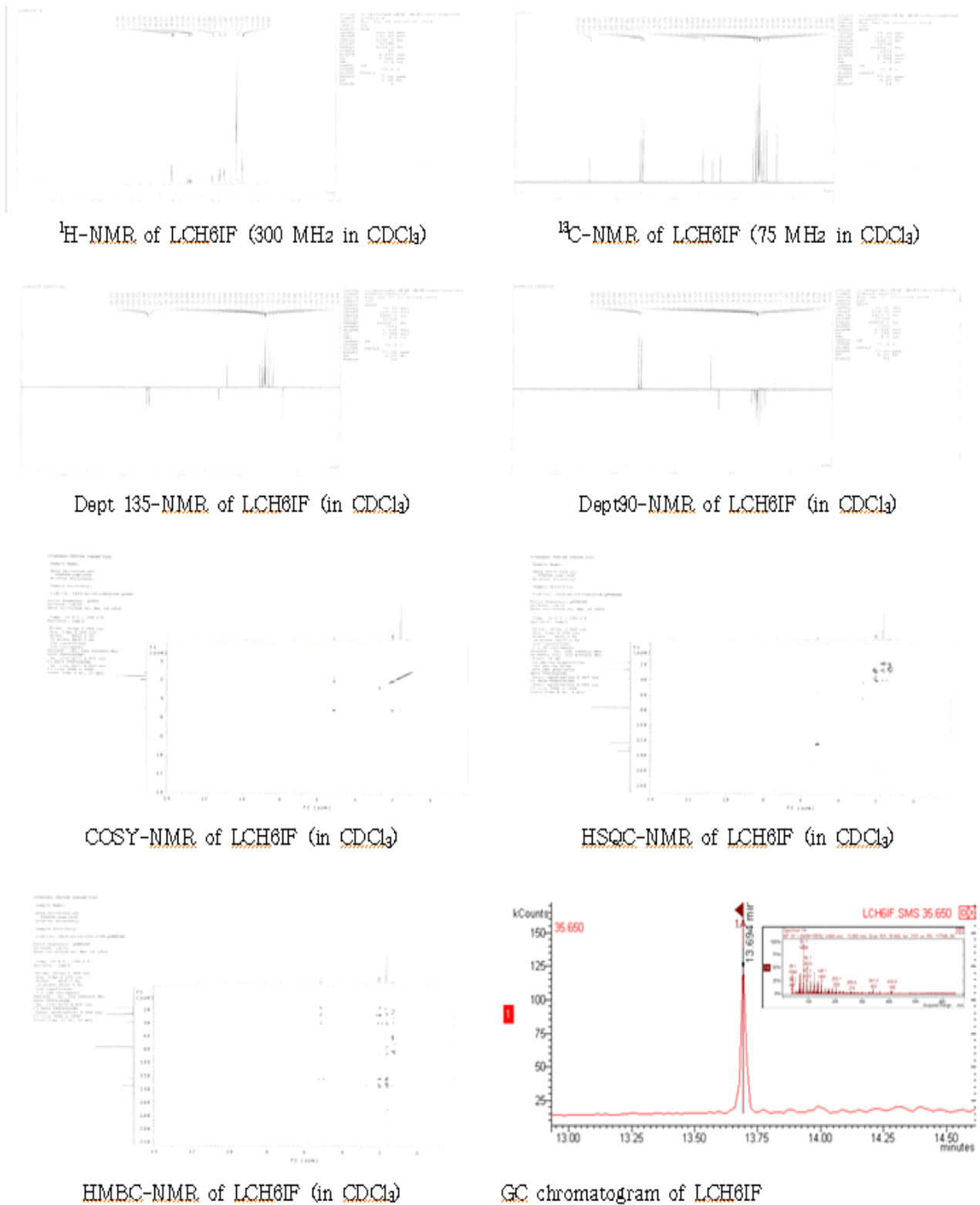


Fig 21. 1D and 2D-NMR spectrum and GC chromatogram of LCH6IF compound from *Luffa cylindrica* Roem.

작용기의 주요 특성은 1개의 carboxyl기를 가지고 있으며, 2개의 double bond를 가지고 있다. GC-MS spectrum으로부터 얻은 분자량은 400이며, GC chromatogram의 결과 약 96% 이상의

순도를 가지고 있으며, 1D와 2D NMR spectrum을 이용하여 구조는 밝혔으나 차후에 생리활성 검증 후에 특허 출원 등이 문제가 되므로 생리활성을 검증한 후에 특허를 출원한 다음에 구조를 밝힐 계획이다.

(나) 수세미로부터 순수분리한 LCH2ICIB의 NMR spectrum 및 GC chromatogram

덜익은 수세미 과일의 hexane 추출물 (LCH)로부터 73.1 mg의 LCH2ICIB을 순수분리하였으며, 1H-NMR, 13C-NMR, Dept 135-NMR, Dept 90-NMR, COSY-NMR, HSQC-NMR 및 HMBC-NMR spectrum은 다음의 그림에서 보는 바와 같다. 작용기의 주요 특성은 1개의 benzene ring을 가지고 있다. GC-MS spectrum으로부터 얻은 분자량은 490.8이며, GC chromatogram의 결과 약 100% 이상의 순도를 가지고 있으며, 1D와 2D NMR spectrum을 이용하여 구조는 밝혔으나 차후에 생리활성 검증 후에 특허 출원 등이 문제가 되므로 생리활성을 검증한 후에 특허를 출원한 다음에 구조를 밝힐 계획이다.

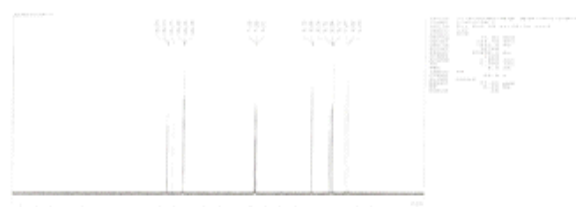
Table. 8. 1H (500 MHz in CDCl3) and 13C-NMR (125 MHz in CDCl3) spectral data, and HMBC data of LCH2ICIB.

| Position | $\delta_C$      | $\delta_H$ | HMBC  |
|----------|-----------------|------------|---|
| 135.071  | C               |            |   |
| 134.864  | C               |            |   |
| 131.203  | C               |            |   |
| 124.393  | CH              | 5.14       | 28.254  |
| 124.294  | CH              | 5.11, 5.09 | 39.728-39.705, 26.752, 16.013, 15.967,                              |
| 124.255  | CH              | 5.11, 5.09 |   |
| 39.728   | CH <sub>2</sub> | 1.983, m   | 135.071-134.864, 124.393-124.255,<br>26.752-26.645, 16.013-15.967   |
| 39.705   | CH <sub>2</sub> | 1.983, m   |   |
| 28.254   | CH <sub>2</sub> | 2.08, m    | 135.071-134.864, 124.393-124.255,<br>39.728-39.705                  |
| 26.752   | CH <sub>2</sub> | 2.039, m   |   |
| 26.645   | CH <sub>2</sub> | 2.039, m   |   |
| 25.657   | CH <sub>3</sub> | 1.675, s   | 131.203, 124.393-124.255, 17.645,<br>135.071-134.864, 131.203,      |
| 17.645   | CH <sub>3</sub> | 1.595, t   | 124.393-124.255, 39.728-39.705, 25.657<br>135.071-134.864, 131.203, |
| 16.013   | CH <sub>3</sub> | 1.595, t   | 124.393-124.255, 39.728-39.705, 25.657                              |
| 15.967   | CH <sub>3</sub> | 1.595, t   |   |

※ 최종 spectrum과 구조분석은 생리활성 검증 후, 특허 가능성을 확인 한 다음에 밝힐 계획  
입



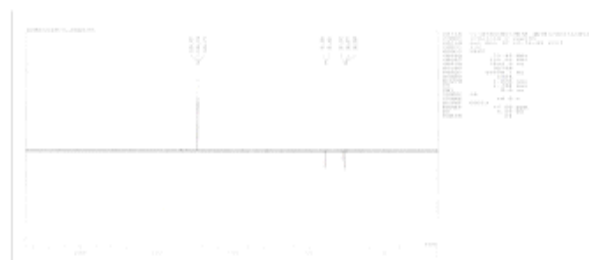
$^1\text{H-NMR}$  of LCH2ICIB (300 MHz in  $\text{CDCl}_3$ )



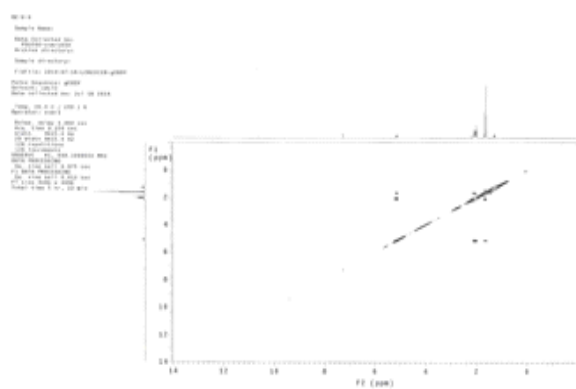
$^{13}\text{C-NMR}$  of LCH2ICIB (75 MHz in  $\text{CDCl}_3$ )



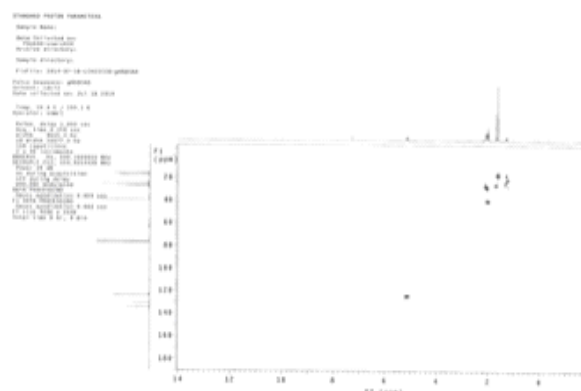
DEPT-135-NMR of LCH2ICIB (in  $\text{CDCl}_3$ )



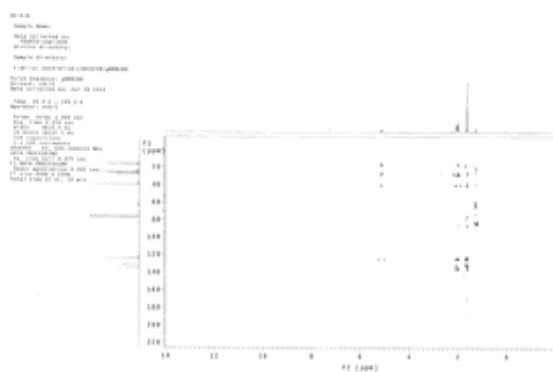
DEPT-90-NMR of LCH2ICIB (in  $\text{CDCl}_3$ )



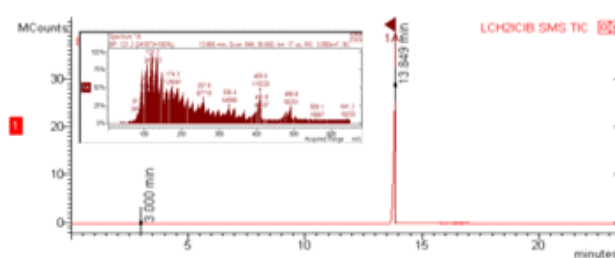
COSY-NMR of LCH2ICIB (in  $\text{CDCl}_3$ )



HSQC-NMR of LCH2ICIB (in  $\text{CDCl}_3$ )



HMBC-NMR of LCH2ICIB (in  $\text{CDCl}_3$ )



GC chromatogram

Fig 22. 1D and 2D-NMR spectrum and GC chromatogram of LCH2ICIB compound from *Luffa cylindrica* Roem.

## 5. Activity-guided purification 방법을 이용한 머위 추출물로부터 활성성분 분리

### 가. 재료 및 방법

#### (1) 추출 방법

「1. 머위의 부위별 극성용매 추출물이 6종 암세포의 생존율에 미치는 영향」의 재료 및 방법 참고.

#### (2) 활성성분

제 2세부에서의 재료 및 방법과 동일함.

### 나. 결과 및 고찰

#### (1) 제 2 세부과제와 연계한 항알레르기 효능성분의 탐색

제 2세부과제에서 항알레르기 효과를 검증하기 위하여 세포내 칼슘농도의 증가와 이에 따르는 탈과립반응에 의한 알레르기반응 매개물질의 분비를 탐색하기 위하여 세포내 Ca 농도 증가와  $\beta$ -hexosaminidase 측정을 통한 탈과립 반응을 조사하였다. 그 결과 앞에서 추출한 MWSLE, MWSLH, 엽병유래 MWPE에서 세포내 Ca의 농도를 유의하게 억제하였다. 또한 탈과립 반응도 앞에서 추출한 MWSLE와 MWSLH의 탈과립억제 효과를 나타내었다 (제 2세부 과제 참조).

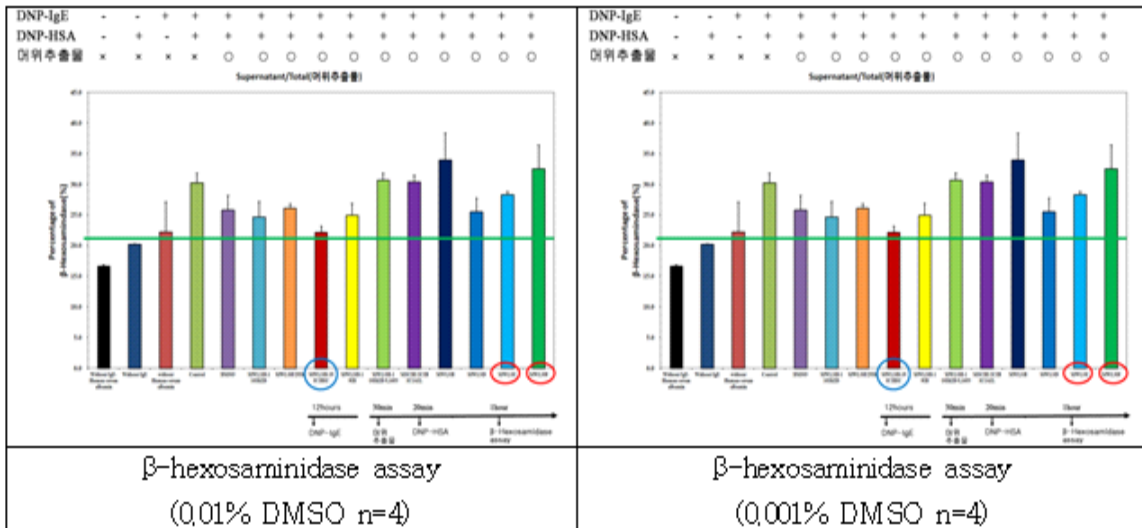


Fig 23.  $\beta$ -hexosaminidase 측정을 통한 탈과립 반응

따라서 항천식 효과가 있을 성분을 순수분리하기 위해서  $Ca^{2+}$ 와  $\beta$ -hexosaminidase assay (탈과립)에 효과가 가장 높은 hexane 추출물로부터 물질을 순수분리 하였다.

#### (2) 머위로부터 항알레르기 효능성분의 순수분리

머위 (*Petasites japonicus* (S. et Z.) Max.)를 경상북도 청도군에서 자생하고 있는 것을 2011년 5월 채집하여 동결 건조한 다음 실험 재료로 사용하였다. 식물 재료는 부산대학교 생명자원



과학대학 천연물 연구실에 보관하였다. 수집한 동결건조 머위를 잎, 엽병 및 근경으로 분류한 다음 동결건조한 잎을 분쇄기로 잘게 간 분말 425 g을 5L 삼각플러스크에 넣고 헥산 1.5 L를 가하여 소니케이트에서 2시간 동안 추출한 후 상등액을 Whatman no. 2 filter paper에서 여과한 다음 회전증발기로 농축하였다. 이와 같은 방법을 3회 반복하여 헥산 추출물 8.477g (MWLSH)을 얻었다. 헥산 추출 후 남은 분말에 에틸아세테이트, 부탄올 및 증류수를 각각 3회 반복하여 순차적으로 가하여 에탄올 추출물 1.612g (이하 'MWLSE'라 명명함), 부탄올 추출물 3.92 g (MWLSB) 및 물 추출물 15.81g (MWLSW)을 얻었다.

잎 추출물 중에서 헥산 추출물 2.673 g을 실리카겔이 충전된 칼럼에 첨가한 다음 용매를 흘려보내면서 총 62개의 분획을 얻었다. 수득한 62개의 분획 중에 282.9 mg의 9번 분획 (MWLSH9)을 칼럼에 첨가하여 용매를 흘려보내면서 얻은 9개의 분획 중에서 209.7 mg의 분획 MWLSH9IC을 선정하였다. 9IC를 sephadex칼럼에 첨가하여 얻은 분획 (MWLSH9ICIB) 202.3 mg을 얻었다. 마지막으로 수득한 202.3 mg의 분획을 칼럼에 가하여 용매를 흘려보내면서 173.8 mg의 순수물질인 MWLSH9ICIBIC를 분리하였다.

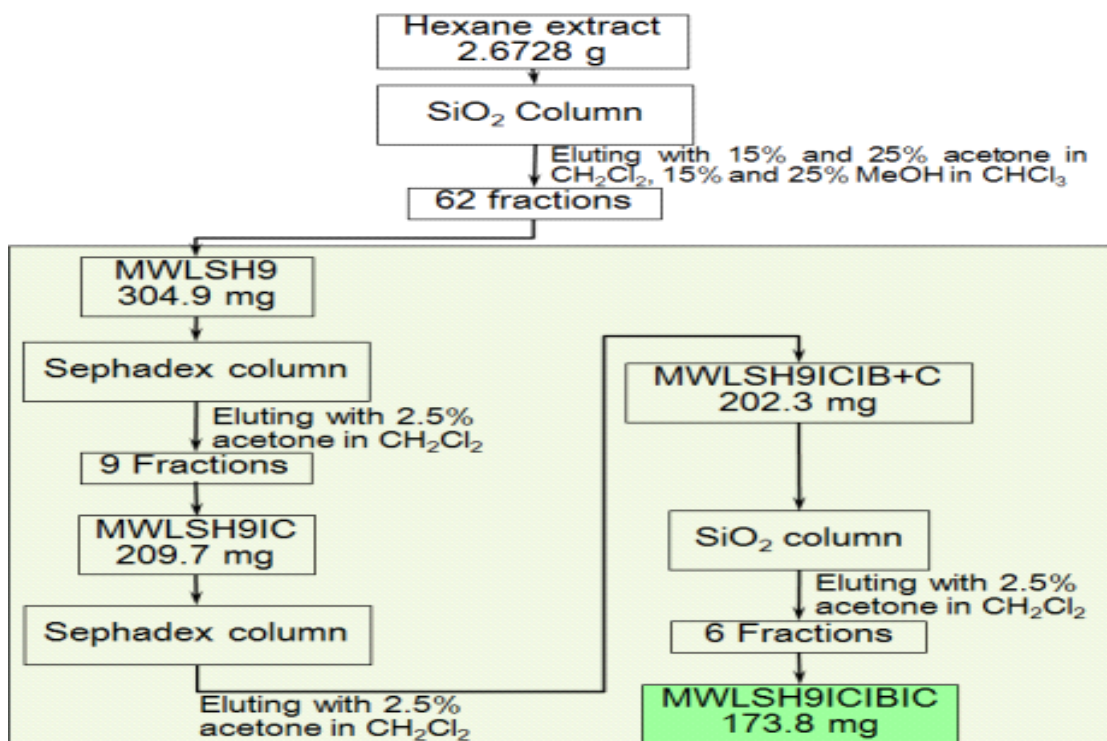


Fig 24. Scheme of MWLSH9ICIBIC compound from *P. japonicus* leaf.

### (3) 머위로부터 항알레르기 효능성분의 구조 동정

머위로부터 순수분리한 물질의 구조를 밝히기 위하여  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR 스펙트럼을 이용하여 그 구조를 동정하였으며 ( $\text{CDCl}_3$ ,  $^1\text{H}$  NMR 500 MHz,  $^{13}\text{C}$  NMR 125 MHz), 그 결과는 표 1과 화학식 1에서 보는 바와 같이 확정하였다. 다음의 물질을 NMR spectrum을 분석할 결과 MWLSH-19ICIBIC는 그림에서 보는 바와 같은 물질로서 bakkenolide B로 판명되었다 (문헌 참조).

MWLSH-19ICIBIC는 GC-MS의 분자이온 시그널이 391 (M+H)<sup>+</sup>로서 분자식은 C<sub>22</sub>H<sub>30</sub>O<sub>6</sub>이 있으며 1H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>), 13C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 및 Dept NMR의 spectrum 분석 결과 5개 primary carbon의 δC (15.48 (X2), 19.53, 20.29, 20.90), 4개 secondary carbon의 δC (26.77, 29.50, 45.81, 70.53, 108.22), 5개 tertiary carbon의 δC 35.22, 51.41, 70.40, 80.75, 136.48) 및 7개 quaternary carbon의 δC (43.28, 54.91, 128.20, 147.75, 167.17, 169.81, 177.38)인 화합물로서 Angeloyl group을 가진 Bakkenolide B (= (-)-Bakkenolide B = Fukinolide)로 판명되었다. 순수분리한 bakkenolide B의 순도는 99% 이상의 순도를 나타내었다.

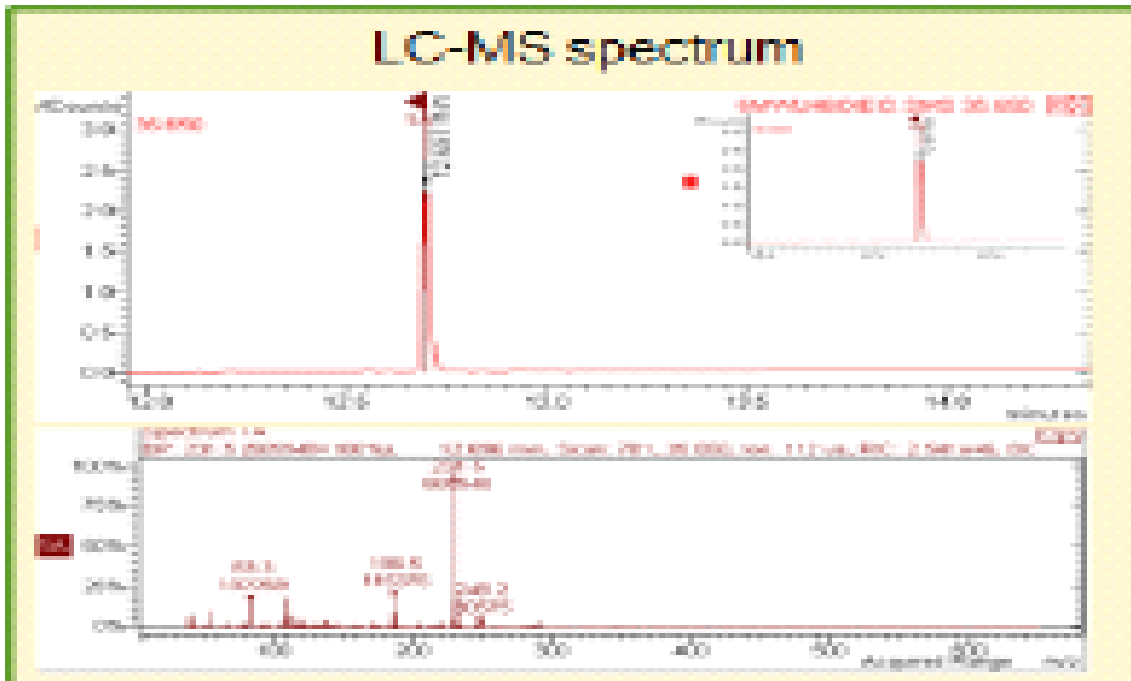


Fig 25. GC-MS spectrum of MWLSH-19ICIBIC (bakkenolide B) from *P. japonicus* leaf. Purity of MWLSH-19ICIBIC compound more than 99%.

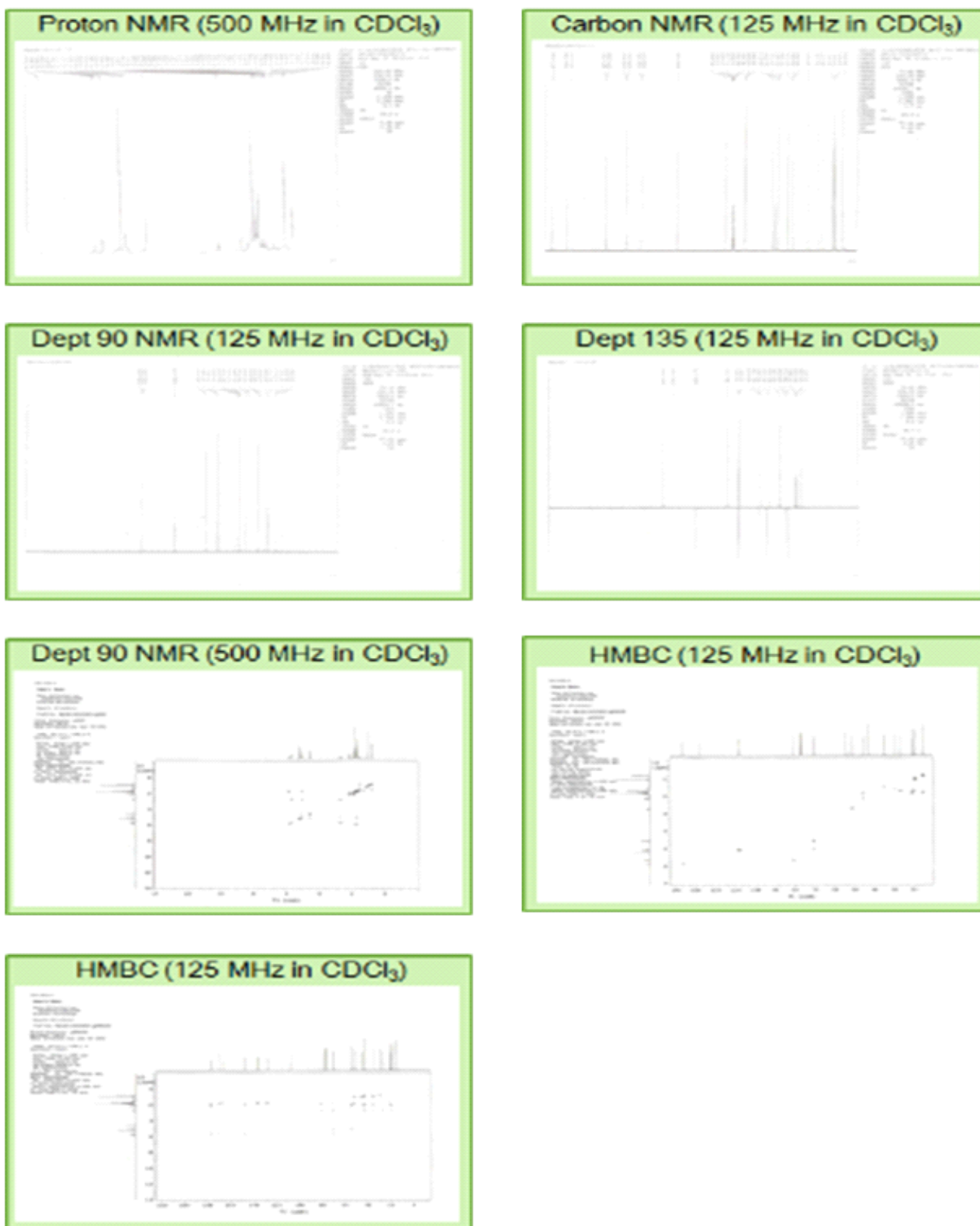


Fig 26. 1D and 2D NMR spectrum of MWLSH9ICIBIC (bakkenolide B) from *P. japonicus* leaf.

Table 6. 1D and 2D NMR spectrum of MWLSH9ICIBIC (bakkenolide B) from *P. japonicus* leaf.

| $\delta_c$ | HMBC            |                                  |   |
|------------|-----------------|----------------------------------|---|
| 177.38     | C               |                                  |   |
| 169.81     | C               |                                  |   |
| 167.17     | C               |                                  |   |
| 147.75     | C               |                                  |   |
| 136.58     | CH              | 5.86, d,d                        |   |
| 128.20     | C               |                                  |   |
| 108.22     | CH <sub>2</sub> | 5.10, d, J=14.0                  | 70.52, 54.91  |
| 80.75      | CH              | 5.66, d, J=11.0                  | 177.38, 169.81, 147.75, 70.40,  |
| 70.52      | CH <sub>2</sub> | 4.57, t                          |   |
| 70.40      | CH              | 5.09, s                          |   |
| 54.91      | C               |                                  |   |
| 51.41      | CH              | 2.72                             | 80.75, 70.40, 43.28, 35.22, 26.77, 19.53?,  |
| 45.81      | CH <sub>2</sub> | 2.14, d, J=14<br>1.87, d, J=14.0 | 177.38, 147.75, 54.91, 43.28, 35.22, 19.53<br>177.38, 147.75, 54.91?, 51.41, 43.28, 35.22 |
| 43.28      | C               |                                  |   |
| 35.22      | CH              | 1.5                              |   |
| 29.50      | CH <sub>2</sub> | 1.6                              |   |
| 26.77      | CH <sub>2</sub> | 1.73, dd, J=9.5/6.5              |   |
| 20.90      | CH <sub>3</sub> | 1.84, s                          | 169.81  |
| 20.29      | CH <sub>3</sub> | 1.70, s                          | 167.17, 136.58, 128.20, 20.90?  |
| 19.53      | CH <sub>3</sub> | 1.03, s                          | 51.41, 45.81, 43.28, 35.22  |
| 15.48      | CH <sub>3</sub> | 0.82, d, J=6.5<br>1.79, d, J=6.5 | 43.28, 35.22, 29.50<br>136.58, 128.20   |

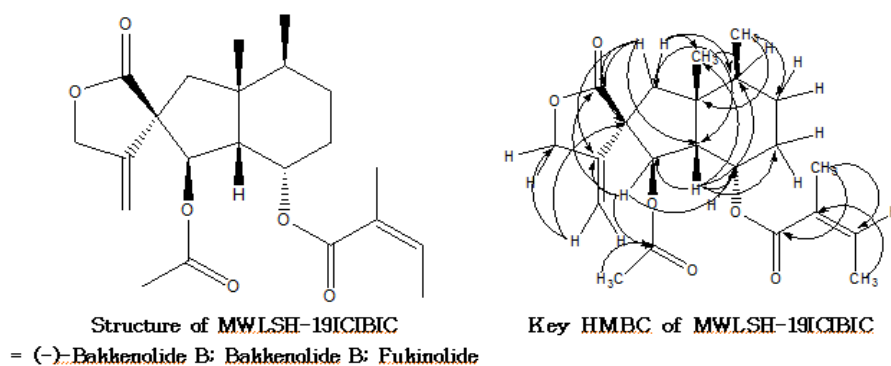


Fig 27. structure and key HMBC of MWLSH-19ICIBIC (bakkenolide B) from *P. japonicus* leaf

#### (4) 항알레르기 효능 신물질의 순수분리

앞 추출물 중에서 헥산 추출물 2.673 g을 실리카겔이 충전된 칼럼에 첨가한 다음 다양한 용매를 순차적으로 흘려보내면서 총 62개의 분획을 얻었다. 수득한 62개의 분획 중에 282.9 mg의 10번 분획 (MWLSH10)을 실리카겔이 충전된 칼럼에 첨가하여 용매를 흘려보내면서 얻은 14개의 분획 중에서 106.7 mg의 분획 MWLSH10IK을 선정하였다. 마지막으로 상기에서 수득한 106.7 mg의 분획을 칼럼에 가하여 100% 메탄올을 흘려보내면서 58.6 mg의 순수물질인 MWLSH10IKID를 분리하였다.

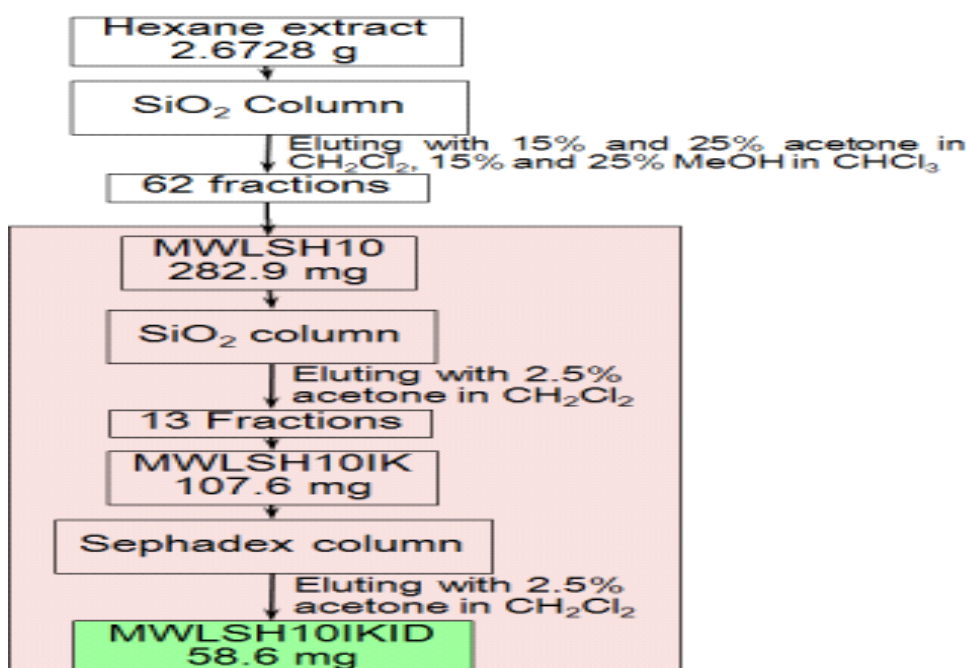


Fig 28. Scheme of novel MWLSH10IKID compound from *P. japonicus* leaf

#### (5) 머위로부터 항알레르기 효능 신물질의 구조 동정

머위로부터 분리한 물질의 구조를 밝히기 위하여  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , Dept90, Dept 135, COSY, HSQC 및 HMBC NMR 스펙트럼을 이용하여 그 구조를 동정하였으며 ( $\text{CDCl}_3$ ,  $^1\text{H}$  NMR 500 MHz,  $^{13}\text{C}$  NMR 125 MHz), 그 결과는 표와 화학식 에서 보는 바와 같이 확정하였다. NMR spectrum을 이용해서 분리된 물질 (MWLSH10IKID)의 구조를 동정한 결과 신규 화합물로 판명되었다.

순수분리한 물질 (MWLSH10IKID)은 백색분발로서 EIMS 스펙트럼의 결과  $m/z$  377  $[\text{M}+\text{H}]^+$  이었다. 분자식은  $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{O}_6$ 으로서 GC-MS ( $m/z$  376.19, NMR 등의 스펙트럼으로서 결정하였다. 순수분리한 물질 (MWLSH10IKID)의  $^1\text{H}$  NMR 데이터를 분석한 결과 4개의 methyl groups [ $\delta$  0.89 (3H, d,  $J=6.6$  Hz, H3-14), 1.09 (3H, s, H3-15), 2.00 (3H, s,  $-\text{COCH}_3$ ), 및 2.37 (3H, d,  $J=7.3$  Hz,  $-\text{COCH}=\text{CHCH}_3$ )], 2개의 olefinic protons [ $\delta$  5.28 (1H, s, H-13a) 및 5.12 (1H, s, H-13b)], 2개의 oxygenated methines [ $\delta$  5.15 (1H, m, H-1) 및 5.74 (1H, dd,  $J=11.0/6.0$  Hz, H-9)], 및 1개의 exocyclic methylene groups [ $\delta$  5.28, 5.12 (each 1H, dt,

J=13.0, 2.2 Hz, H-13)]이 이었다.

또한 순수분리한 물질 (MWLSH10IKID)의  $^{13}\text{C}$  NMR, Dept, HSQC spectra를 분석한 결과 21개의 탄소를 가진 화합물이었다. 이들 탄소는 4개의 methyls [ $\delta$  15.55 (C-14), 19.56 (C-15), 21.10 (C-2''), and 19.25 (C-4')], 5개의 methylenes [ $\delta$  26.82 (C-2), 29.53 (C-3), 45.79 (C-6), 70.55 (C-12), and 108.22 (C-13)], 6개의 methines [ $\delta$  70.32 (C-1), 35.33 (C-4), 80.79 (C-9), 51.76 (C-10), and 112.49 (C-2'), and 152.72 (C-3')], 및 6개의 quaternary carbons [ $\delta$  43.29 (C-5), 54.80 (C-7), 177.51 (C-8), 147.80 (C-11), 165.59 (C-1'), 169.87 (C-1'')] 등의 4종의 탄소로 분류될 수 있었다.

물질의 C-1에서부터 C-15탄소의 탄소 이동을 비교한 결과 순수분리 성분(MWLSH10IKID)은 acetoxy기와 crotyloxy기를 가진 bakkenolide형의 sesquiterpene인 것으로 확인 할 수 있었다. 또한 HSQC와 HMBC spectra 분석결과, bakkenolide형의 기본 골격에 acetoxy와 crotyloxy groups을 가진 화합물이라는 것을 확인하였다.

HMBC correlations의 분석결과, H-1은 acetoxy group의 carbonyl carbon에 연결되어 있었으며, H-9은 crotyloxy group의 carbonyl carbon에 연결되어 있다는 것을 확인하였으므로 acetoxy group는 C-9에 crotyloxy group는 C-1에 각각 연결되어 있는 것으로 결론지을 수 있었다. HSQC, HMBC, 및  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY spectra를 분석한 결과 모든 proton과 carbon signals이 분명하게 연관되어 있었으므로 머위로부터 순수 분리한 MWLSH10IKID의 구조가 확인되었고, 이는 다음의 구조를 가진 신규 화합물로 판명되었으므로, 신규물질인 Petatewalide A로 명명하였다.

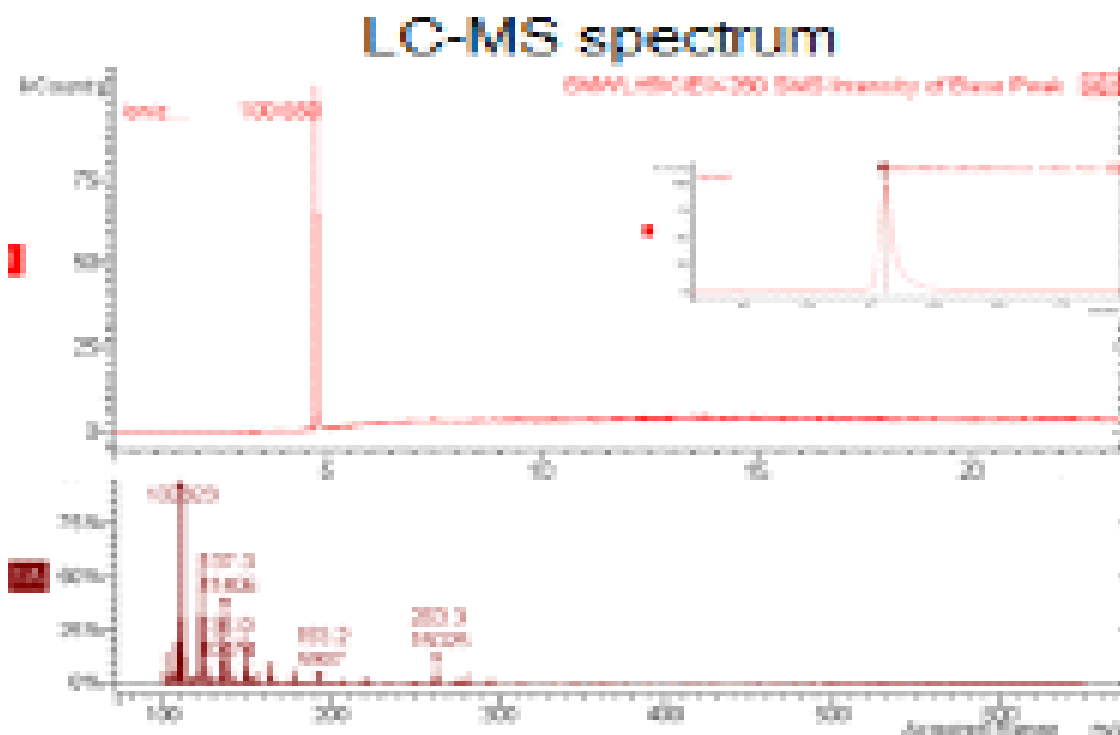


Fig 29. GC-MS spectrum of MWLSH10IKID (Petatewalide B) from *P. japonicus* leaf. Purity of MWLSH10IKID compound more than 99%.

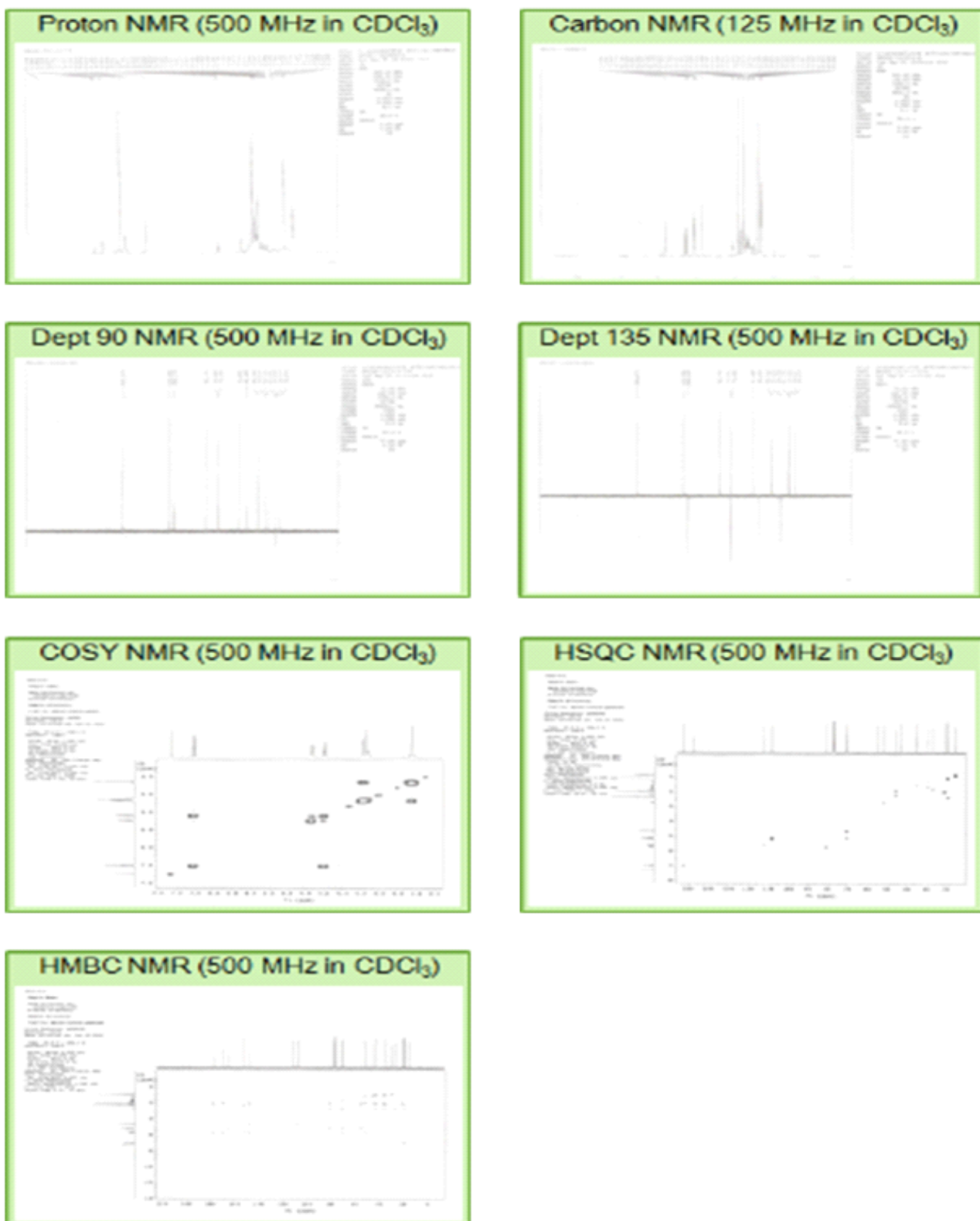


Fig 30. 1D and 2D NMR spectrum of MWLSH9ICIBIC (bakkenolide B) from *P. japonicus* leaf.

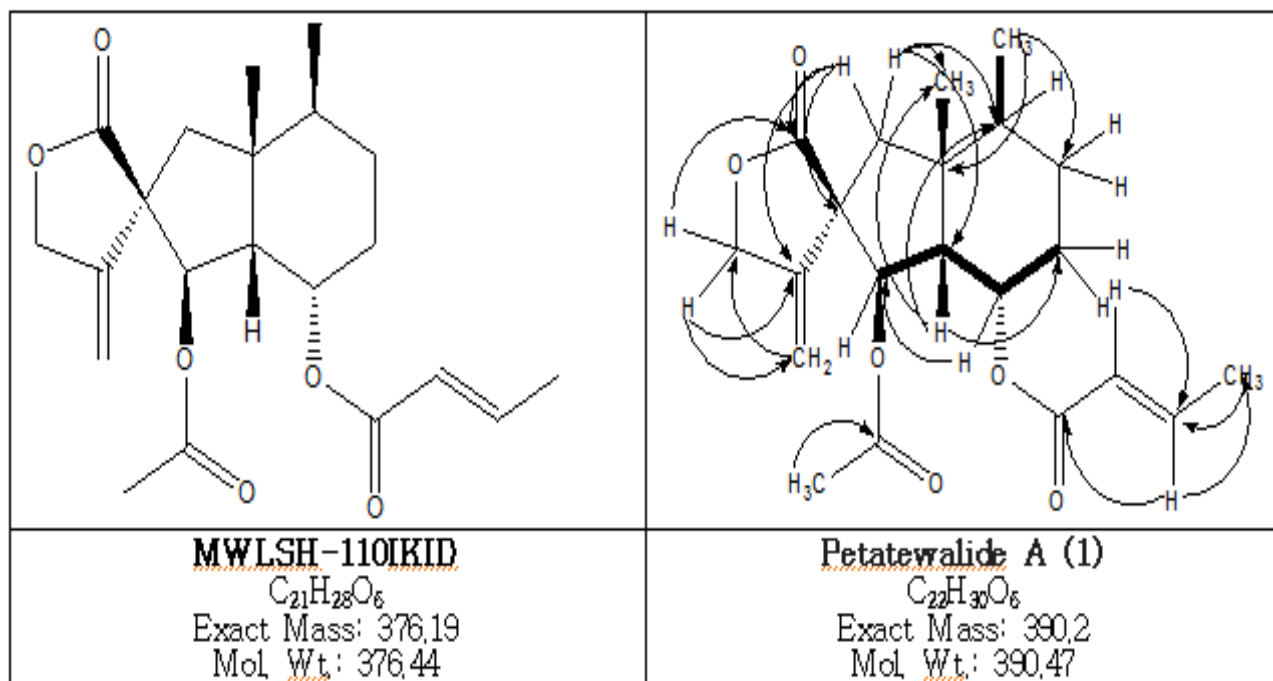


Fig 31. Structure and key HMBC of novel MWLSH-110IKID (Petatewalide B) from *P. japonicus* leaf.



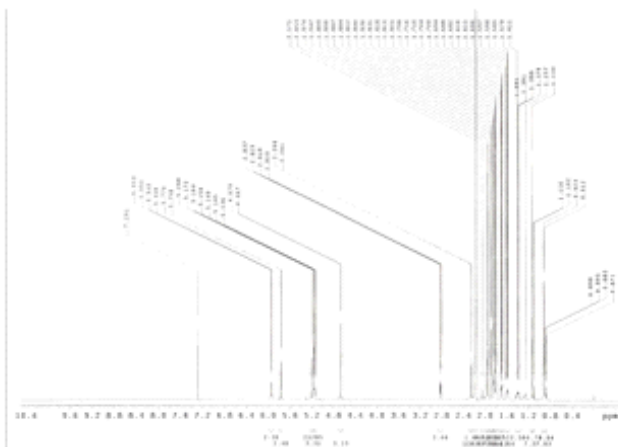
Table 7. NMR spectral data of a novel MWLSH-110IKID compound from *P. japonicus* leaf.

| $\delta_C$ (125 MHz in $CDCl_3$ ) |                 | $\delta_H$ (500 MHz in $CDCl_3$ )            | HMBC   |
|-----------------------------------|-----------------|--|--|
| 177.51                            | C               |  |  |
| 169.87                            | C               |  |  |
| 165.59                            | C               |  |  |
| 152.72                            | CH              | 7.02, dd, J=9.5/3.5                          | 165.59, 19.25  |
| 147.80                            | C               |  |  |
| 112.49                            | CH              | 5.60, m                                      | 152.72,  |
| 108.22                            | CH <sub>2</sub> | 5.28, s<br>5.12, t                           | 70.55,   |
| 80.79                             | CH              | 5.74, dd, J=11.0/6.0                         | 177.51, 169.89, 147.80, 70.55, 54.80, 51.76  |
| 70.55                             | CH <sub>2</sub> | 4.65, s                                      | 177.51, 147.80, 108.22   |
| 70.32                             | CH              | 5.15, s                                      | 80.79,   |
| 54.80                             | C               |  |  |
| 51.76                             | CH              | 2.73, dd, J=10.5/5.0                         | 80.73, 70.32, 43.29, 35.33, 26.82, 19.56   |
| 45.79                             | CH <sub>2</sub> | 2.22, dd, J=14.5/7.5<br>1.94, dd, J=14.0/5.0 | 177.51, 147.80, 54.80, 43.29, 35.33, 19.56<br>177.51, 147.80, 54.80, 51.76, 43.29, 35.33 |
| 43.29                             | C               |  |  |
| 35.33                             | CH              | 1.55, m                                      |  |
| 29.53                             | CH <sub>2</sub> | 1.65, dd, J=14.5/3.5<br>1.34, dd, J=13.5/4.0 |  |
| 26.82                             | CH <sub>2</sub> | 1.82, br                                     |  |
| 21.19                             | CH <sub>3</sub> | 2.00, s                                      | 169.87   |
| 19.56                             | CH <sub>3</sub> | 1.09, s                                      | 51.76, 45.79, 43.29, 35.33   |
| 19.25                             | CH <sub>3</sub> | 2.366, s                                     | 152.72,  |
| 15.55                             | CH <sub>3</sub> | 0.89, t                                      | 43.29, 35.33, 29.53  |

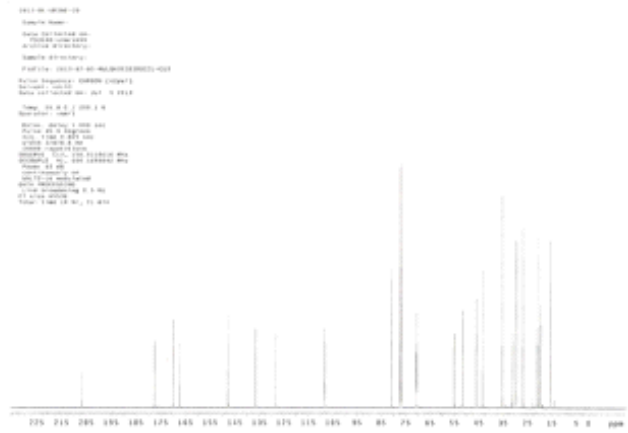
#### (6) 머위로부터 기타 생리활성 성분의 순수분리 및 구조동정

##### (가) 머위로부터 순수분리한 MWLSH35IEIBICIL의 구조동정

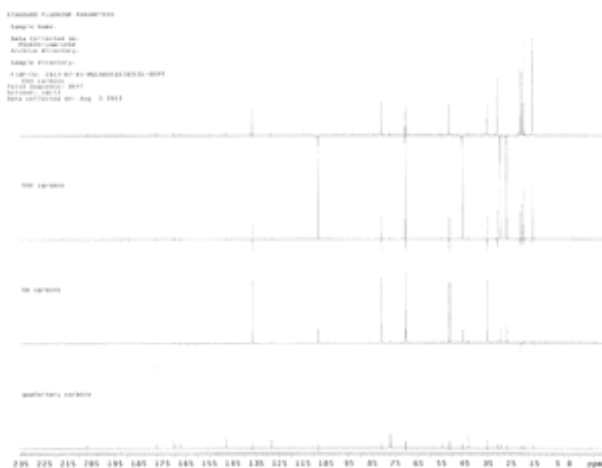
머위의 잎으로부터 순수분리한 MWLSH35IEIBICIL의 H-NMR, C-NMR, COSY-NMR, HSQC-NMR 및 HMBC-NMR spectrum은 다음의 그림에서 보는 바와 같다. 1D와 2D NMR spectrum을 이용하여 구조는 밝혔으나 차후에 생리활성 검증 후에 특허 출원 등이 문제가 되므로 생리활성을 검증한 후에 특허를 출원한 다음에 구조를 밝힐 계획이다.



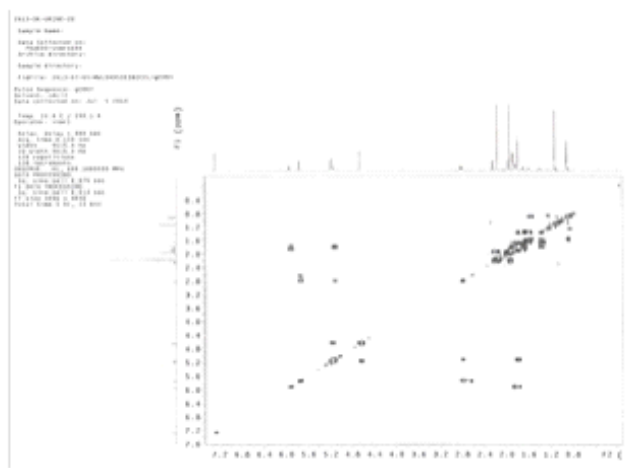
**$^1\text{H-NMR}$  of MWLSH35IEIBICIL (600 MHz in  $\text{CDCl}_3$ )**



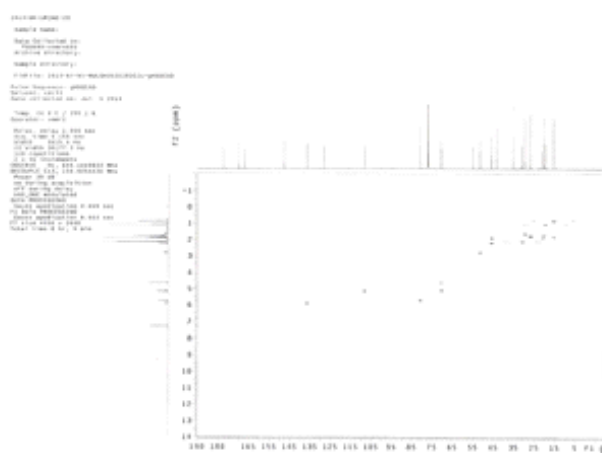
**$^{13}\text{C-NMR}$  of MWLSH35IEIBICIL (125 MHz in  $\text{CDCl}_3$ )**



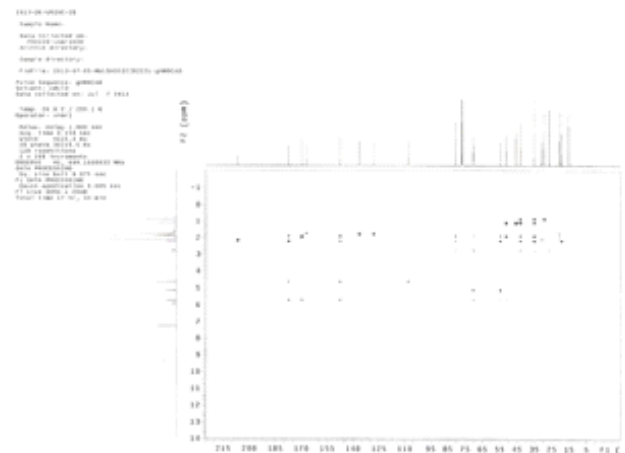
**Dept-NMR of MWLSH35IEIBICIL**



**COSY-NMR of MWLSH35IEIBICIL**



**HSQC-NMR of MWLSH35IEIBICIL**



**HMBC-NMR of MWLSH35IEIBICIL**

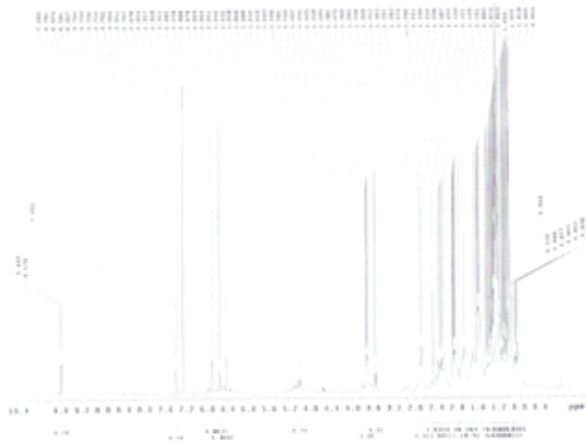
Fig 32. 1D and 2D-NMR spectrum of MWLSH35IEIBICIL compound from *P. japonicus* leaf.

Table 8. NMR spectral data of a novel MWLSH35IEIBICIL compound from *P. japonicus* leaf.

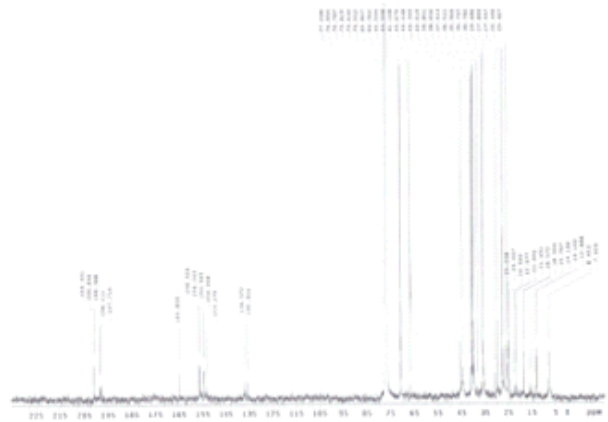
| $\delta_C$ (125 MHz in $CDCl_3$ ) | $\delta_H$ (600 MHz in $CDCl_3$ ) |
|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 206.82                            |                                   |
| 177.45                            |                                   |
| 169.93                            |                                   |
| 167.30                            |                                   |
| 147.81                            |                                   |
| 136.60                            | 5.95, dd, J=15.0/7.2              |
| 136.57                            | 5.95, dd, J=15.0/7.2              |
| 128.30                            |                                   |
| 108.32?                           |                                   |
| 108.27                            | 5.21, s                           |
| 108.21                            |                                   |
| 80.82                             | 5.77, d, J=10.8                   |
|                                   | 5.17, s                           |
| 70.58                             | 4.67, d, J=1.8                    |
|                                   | 5.17, s                           |
| 70.48                             | 4.67, d, J=1.8                    |
|                                   | 5.17, s                           |
| 70.42                             | 4.67, d, J=1.8                    |
|                                   | 5.17, s                           |
| 55.00                             |                                   |
| 51.51                             | 2.82, dd, J=11.4/4.8              |
| 45.86                             | 2.25, d, J=15.0                   |
| 43.35                             |                                   |
| 35.27 x 2                         |                                   |
| 30.87                             | 2.17, s                           |
| 30.86                             |                                   |
| 29.55                             | 1.71, dd, J=7.2/3.6               |
| 26.81                             | 1.84, dd, J=9.6/3.6               |
| 20.96                             | 1.89, dd, J=7.2/1.8               |
| 20.33                             | 1.80, d, J=1.2                    |
| 19.57                             | 1.13, s                           |
| 15.55                             | 0.92, d, J=6.6                    |

(나) 머위로부터 순수분리한 MWR249IDIF의 구조동정

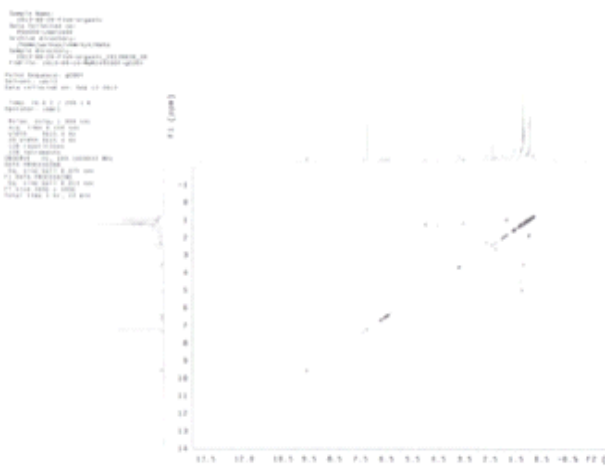
머위의 근경으로부터 순수분리한 MWR249IDIF의 <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, COSY-NMR, HSQC-NMR 및 HMBC-NMR spectrum은 다음의 그림에서 보는 바와 같다. 다음의 성분의 구조는 차후에 생리활성 검증 후에 특허 출원 등이 문제가 되므로 생리활성을 검증한 후에 특허를 출원한 다음에 구조를 밝힐 계획이다.



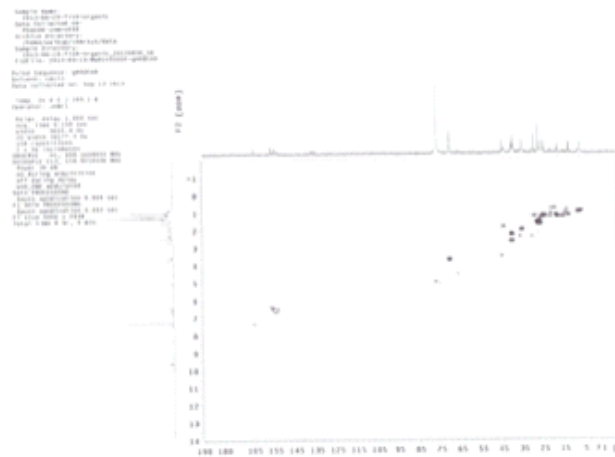
$^1\text{H-NMR}$  of MWR249IDIF (600 MHz in  $\text{CDCl}_3$ )



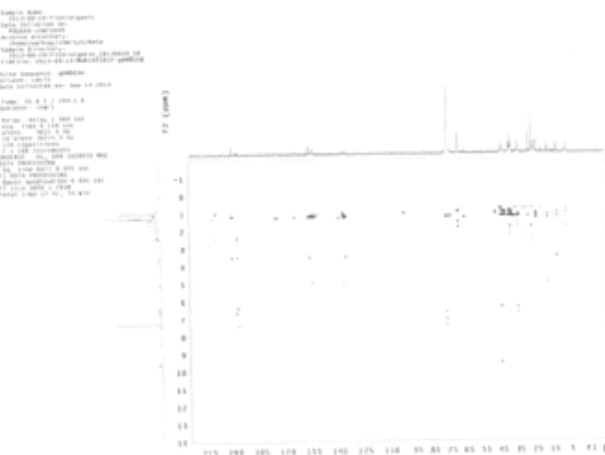
$^{13}\text{C-NMR}$  of MWR249IDIF (125 MHz in  $\text{CDCl}_3$ )



COSY-NMR of MWR249IDIF (600 MHz in  $\text{CDCl}_3$ )



HSQC-NMR of MWR249IDIF (600 MHz in  $\text{CDCl}_3$ )



HMBC-NMR of MWR249IDIF (600 MHz in  $\text{CDCl}_3$ )

Fig 33. 1D and 2D-NMR spectrum of MWR249IDIF compound from *P. japonicus* leaf.

(7) 머위로부터 순수분리한 항알레르기 성분의 활용 방법

- ① 제품 (제 3세부과제) 또는 식물체에 대하여 신물질인 petatewalide B와 알려진 물질인 bakkenolide B의 표준화

② Petatewalide B와 bakkenolide B의 항염증 작용 기전 규명

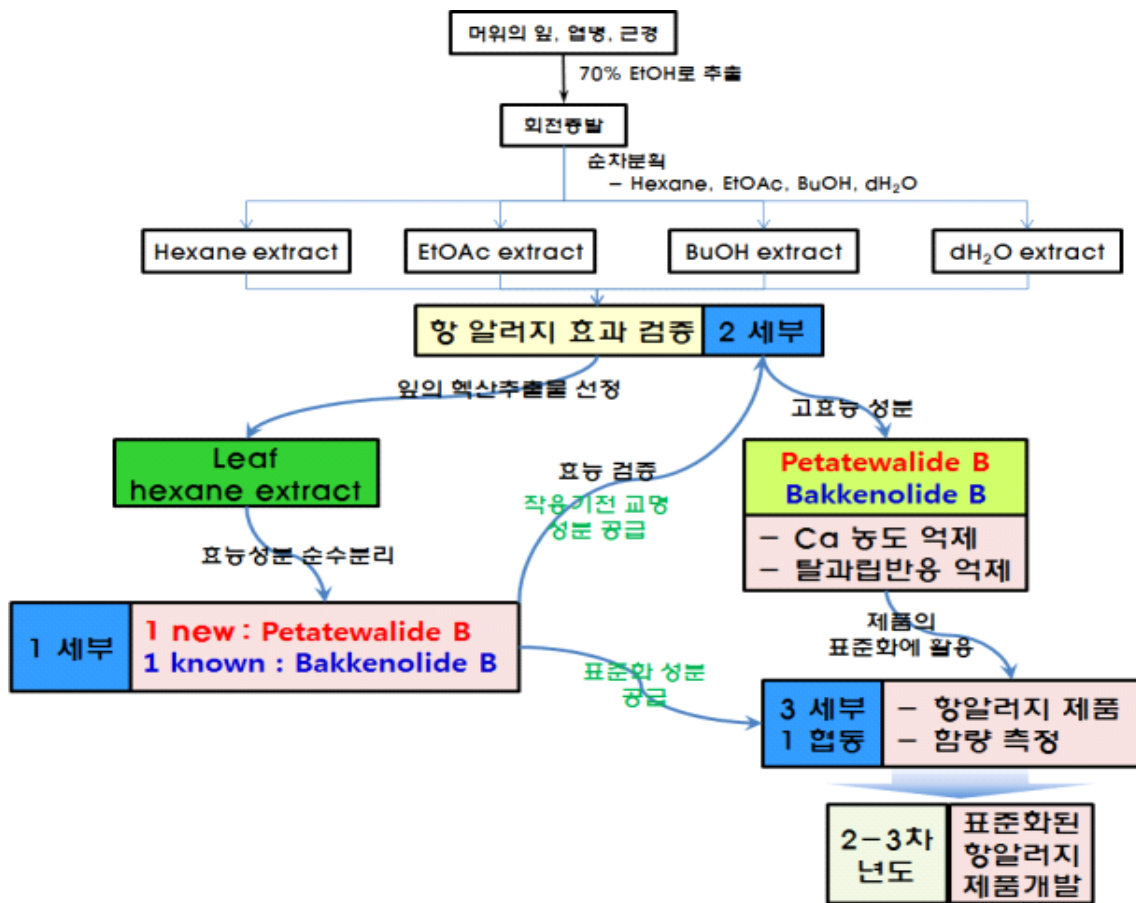


Fig 34. 세부과제별 협동을 통한 항염증 효능 제품의 개발 방법

(8) 항알레르기 성분인 Bakkenolide B와 petatewalide B의 다량 분리

본 실험에서 분리한 성분인 Bakkenolide B와 petatewalide B가 항알레르기 효과가 높은 것으로 증명되었으므로, 이를 지표성분으로 이용하기 위해서는 다량의 성분이 필요하다. 따라서 Bakkenolide B와 petatewalide B를 다량으로 분리할 수 있는 방법의 확립이 필요하다. 머위의 잎으로부터 성분을 다음의 방법으로 분리하였다.

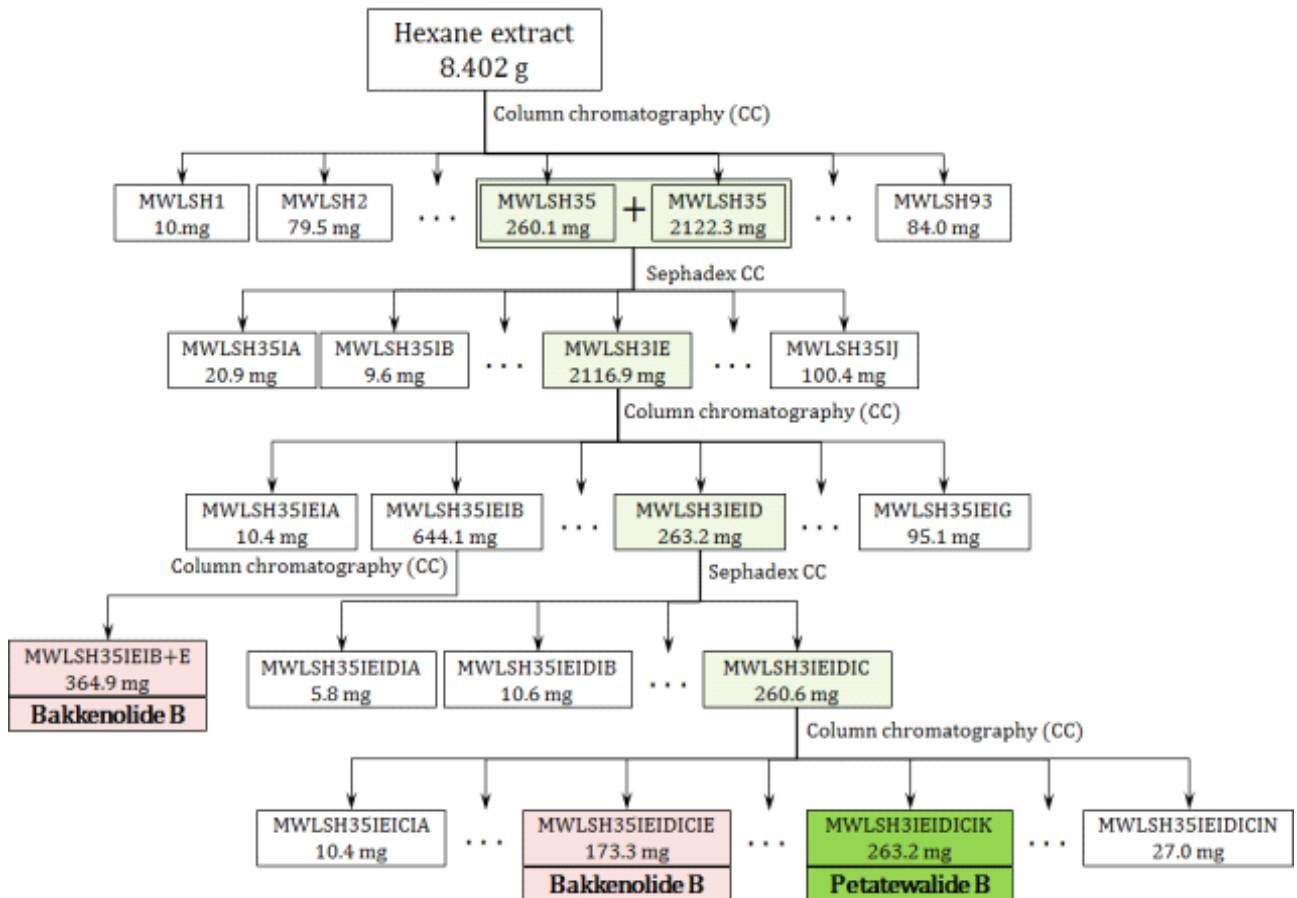


Fig 35. Scheme of large scale purification in bakkenolide B and petatewalide B from *P. japonicus* leaf.

## 6. 순수분리한 성분의 생리활성 검증

순수분리한 성분은 현재 생리활성을 검증 중에 있으며, 그 결과는 추적 평가시에 보고할 계획임.

## 제 2 절 제2세부 : 세포 및 질환모델동물을 이용한 약리효능 및 생리활성 검증

### 1. 실험방법

#### 가. 탈과립화측정

RBL-2H3 비만세포주로부터 탈과립화 측정은  $\beta$ -hexosaminidase 분비 저해 활성을 측정하여 조사하였다. 24-well plates에 RBL-2H3 세포주를 10% FBS와 1% penicillin-streptomycin이 첨가된 DMEM 배지에 현탁시킨 후 24-well plate에  $2 \times 10^5$  cells/mL 세포와 dinitropheny-immunoglobulin E (DNP-IgE, 0.5  $\mu$ g/mL)를 분주한 뒤 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 18시간 배양하였다. 각 세포들을 PIPES buffer (119 mM NaCl, 5 mM KCl, 5.6 mM glucose, 0.4 mM MgCl<sub>2</sub>, 25 mM PIPES, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.1% BSA, pH 7.2)로 2회 세척한 다음 농도별로 시료를 희석시켜 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 30분간 반응시켰다. 이 후 dinitropheny-human serum albumin (DNP-HSA, 10  $\mu$ g/mL)을 가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 2시간 반응시킨 후 상층액 50  $\mu$ L를 96-well plate에 옮긴 후 cell lysate buffer (4-p-nitrophenyl-N-acetyl-  $\beta$ -D-glucosaminide 1 mM, sodium citrate, 0.05 M, pH 4.5) 50  $\mu$ L를 넣고 37°C에서 1시간 동안 배양시킨 다음 각 well 당 0.05M sodium carbonate buffer 200  $\mu$ L를 첨가하여 반응을 종결시키고 microplate reader를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Secretion of  $\beta$ -Hexosaminidase (%) =

$$\frac{\text{시료 첨가구의 흡광도} - \text{대조군의 흡광도}}{\text{대조구의 흡광도}} \times 100$$

#### 나. BALB/c 마우스에서 천식의 유도과 약물 처리

6주령된 BALB/c 수컷 마우스는 대한 바이오링크에서 구매 하였으며, 부산대학교 동물실에서 실험 전 일주일간 적응시켰다. 실험동물은 PBS 투여군, ovalbumin 투여군 그리고 시험하는 물질(bakkenolide B, s-petasin, petatewalide B, a-cubebenoate)을 투여한 천식유도군으로 세 개의 군(n=7/group)으로 실험하였다. 천식은 ovalbumin과 aluminium hydroxide를 1일째와 14일째 복강 투여하였다. 28일째부터 3일간 연속적으로 10분간 ovalbumin을 분무하여 노출시켰다. 시험하는 물질(bakkenolide B, s-petasin, petatewalide B, a-cubebenoate)을 1mg/kg으로 PBS에 녹여 28, 29, 30일째에 약물분무를 하기 1시간 전에 복강투여 하였다. ovalbumin 약물분사 이후 이 일후에 기관지세척액을 폐로서부터 채취하였으며 기관지세척액속의 세포의 분포를 염색과 수를 세어 분석하였다.

#### 다. 복막염 유도와 호중구 계산



복막염은 1mg/kg로 LPS를 복강주사하여 유도하였다. C57B/6 마우스를 PBS와 1mg/kg의 시험하는 물질(bakkenolide B, s-petasin, petatewalide B, a-cubebenoate)을 LPS 처리 1시간 전에 선 처리 하였다. 복강세척은 차가운 4ml의 RPMI1640배양액을 사용하여 LPS 처리 후 24시간이 지난 이후 시행되었다. 복강 세척액에 포함된 전체 세포의 수는 trypan blue 염색을 시행하여 계산하였다. 세포는 0.1 M phosphate buffer(pH 6.8)로 세척하였다. 0.1 M phosphate buffer는 153ml의 0.2 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>와 147 ml 0.2 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 를 혼합한 것에 증류수를 첨가 하여 최종의 부피 900ml가 되게 만들었다. 세포는 5분간 500rpm으로 Cellspin을 이용하여 슬라이드에 부착 시켰다. 슬라이드는 상온에서 30분간 건조 시킨 이 후 30초간 메탄올을 이용하여 고정 시켰다. 이후 May-Grünwald와 Giemsa 용액으로 각각의 세포 유형을 동정할 수 있게 염색하였다.

#### 라. 세포내 Ca<sup>2+</sup>이온의 농도 측정

세포를 trypsin-digest가 된 가라 앉은 세포를 monoclonal anti-dinitrophenyl specific mouse IgE가 함유된 배지에 37°C에 2시간 배양한다. 이 후 20 mM Hepes (pH 7.4), 103 mM NaCl, 4.8 mM KCl, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 15 mM glucose, 2.5 mM probenecid and 0.1% bovine serum albumin ( 지방산 불포함 )으로 구성 된 Hepes-buffered medium에 현탁 한 이후 5 μM fura 2-AM과 함께 40분간 배양한다. [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 레벨은 510 nm의 방출 파장과 두 개의 흡수 파장(340 nm와 380 nm)을 때 0.1초마다 F4500 fluorescence spectrometer를 이용하여 fura 2의 형광 변화를 측정하여 계산된다. 이전연구에서 설명되어진 이들 두 개의 파장에서 형광강도(λ340/λ380)의 비율은 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>의 대체용으로 사용 되어졌다.

#### 마. 세포배양

American Type Culture Collection (ATCC)에서 구매한 랫트 RBL-2H3 비만세포를 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>배양기에서 10% (v/v) FBS, 100 units/mL penicillin, 50 μg/mL streptomycin, 2 mM glutamamine, 1 mM sodium pyruvate가 포함된 high glucose DMEM의 배지에서 배양한다.

#### 바. 마우스 복강 대식세포 분리와 배양

10-12주령 C57/BL6 마우스에 3% thioglycollate 용액을 3 mL을 i.p injection한다. 4일 후, 마우스의 복강에서 복강액을 4°C에서 보관한 PBS로 세포를 취하여 원심분리한다. 분리한 세포를 10% (v/v) FBS, 100 units/mL penicillin, 50 μg/mL streptomycin이 포함된 RPMI 1640 배지로 배양한 후, 다음날 0.5% FBS 포함된 RPMI 1640 배지를 새로 넣어 24시간 배양한다. 대식 세포에 시험하는 물질(bakkenolide B, s-petasin, petatewalide B, alpha-cubebenoate)를 처리하고, 1시간 후 100 ng/mL LPS를 처리한다. RNA 샘플의 경우 LPS 처리 5시간 후 취하며, protein의 경우 24시간 후 sample을 걷어 실험을 진행한다.

#### 사. Western blot

LPS를 24시간 처리한 세포를 lysis buffer로 용해 시킨다. BCA protein assay를 이용해 단백질의 농도를 구하고, 같은 양의 단백질을 sodium dodecyl sulphate (SDS)-polyacrylamide mini-gel에서 1시간 30분간 100 V에서 전기영동 시킨 후, transfer buffer를 이용하여

nitrocellulose membrane으로 이동시킨다. 비특이적 단백질 결합을 차단하기 위해 membrane을 5% skim milk와 0.1% tween20이 포함된 TBS-T buffer로 1시간 blocking한다. 각각의 COX-2와 iNOS에 대한 1차 항체를 membrane에 반응시키고 horseradish-peroxidase가 결합된 2차 항체를 사용하여 반응시킨다. ECL detection reagent를 가하고, enhanced chemiluminescence system을 사용하여 signal을 확인한다.

#### 아. Reverse transcriptase-PCR

LPS를 5시간 처리한 후 Trizol reagent를 사용하여 RNA를 분리한다. Total RNA에 Promega Go-Taq DNA polymerase를 사용하여 cDNA를 합성한다. COX-2, iNOS, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , GAPDH에 대한 특이적 primer를 사용하여 PCR을 진행한다. 사용된 primer의 서열과 PCR조건은 아래 테이블과 같다.

| Primer          | Sequence                   | Anneling<br>T <sub>m</sub> | Cycles |
|-----------------|----------------------------|----------------------------|--------|
| IL-1 $\beta$ F  | GGAGAAGCTGTGGCAGCTA        | 57 °C                      | 22     |
| IL-1 $\beta$ R  | GCTGATGTACCAGTTGGGGA       |                            |        |
| IL-6 F          | TGGGAAATCGTGGAAATGAG       | 57 °C                      | 27     |
| IL-6 R          | GAAGGACTCTGGCTTTGTCT       |                            |        |
| TNF- $\alpha$ F | GACCCTCACACTCAGATCAT       | 57 °C                      | 27     |
| TNF- $\alpha$ R | TTG AAGAGAACCTGGGAGTA      |                            |        |
| COX-2 F         | CCGTGGGGAATGTATGAGCA       | 60 °C                      | 30     |
| COX-2 R         | CCAGGTCCTCGCTTATGATCTG     |                            |        |
| iNOS F          | ACCTACCACACCCGAGATGGCCAG   | 60 °C                      | 30     |
| iNOS R          | AGGATGTCCTGAACATAGACCTTGGG |                            |        |
| GAPDH F         | TTCACCACCATGGAGAAGGC       | 60 °C                      | 27     |
| GAPDH R         | GGCATGGACTGTGGTCATGA       |                            |        |

#### 자. Nitrites 측정

Nitrite의 양을 측정함으로써 NO의 생산을 추측할 수 있으며 NO의 대사체는 안정적이다. 시험하는 물질(bakkenolide B, s-petasin, petatewalide B, a-cubebenoate)을 1시간 전 처리한 후 LPS (100 ng/ml)를 처리하여 24시간동안 배양하였다. 배양액 내의 Nitrite 농도를 Griess Reagent System (Promega)으로 측정하였다.

#### 차. PGE2 생성

Peritoneal macrophage 에  $\alpha$ -cubebenoate를 (1, 3, 5, 10  $\mu$ g/ml) 1시간 전 처리 후 LPS (100 ng/ml)를 처리하여 24시간동안 배양하였다. macrophage 배양 액을 걷는 즉시 PGE2 EIA kit (Cayman Chemical) 를 사용하여 측정하였다.

## 2. 결과 및 고찰

### 가. 세포 및 질환모델동물을 이용한 약리효능 및 생리활성 검증 - 2012년

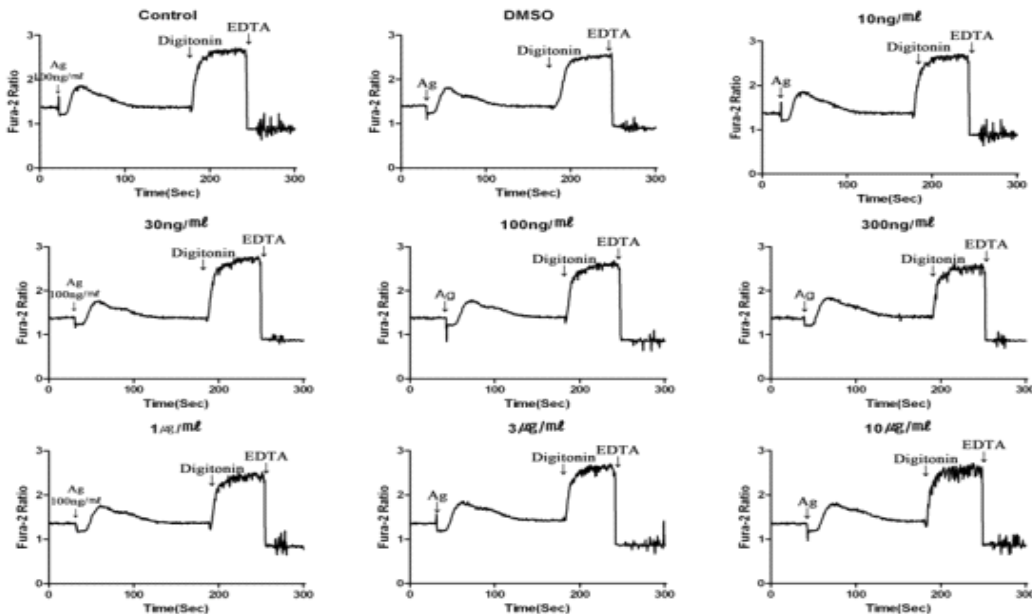
#### (1) 머위 추출물의 항알레르기효과 탐색법의 개발과 적용

항알레르기 효과를 검증하기 위하여 basophil과 비만세포에서 IgE의 크로스링크에 의한 세포내 칼슘농도의 증가와 이에 따르는 탈과립반응에 의한 알레르기 반응 매개물질의 분비를 탐색하기 위하여 다음의 두 가지 방법을 개발 적용하였다.

#### (가) 세포내 칼슘농도의 증가

RBL-2H3라는 랫트 비만세포를 배양하여 DNP-IgE (500 ng/ml)를 18시간처리한 후, 머위추출물을 첨가하고 15분뒤 DNP-HSA 100 ng/ml를 첨가하면서 세포내 칼슘농도의 변화를 Fura-2 형광색소를 이용하여 측정하였다. 하기 그림에 보여진 바와 같이 DNP-HSA의 첨가에 의하여 세포내 칼슘농도의 증가를 관찰하였다. 이를 이용하여 머위유래 추출물의 항알레르기효과를 비만세포에서 세포내 칼슘농도의 증가에 대한 억제효과로 스크리닝하는 시스템을 구축하였다.

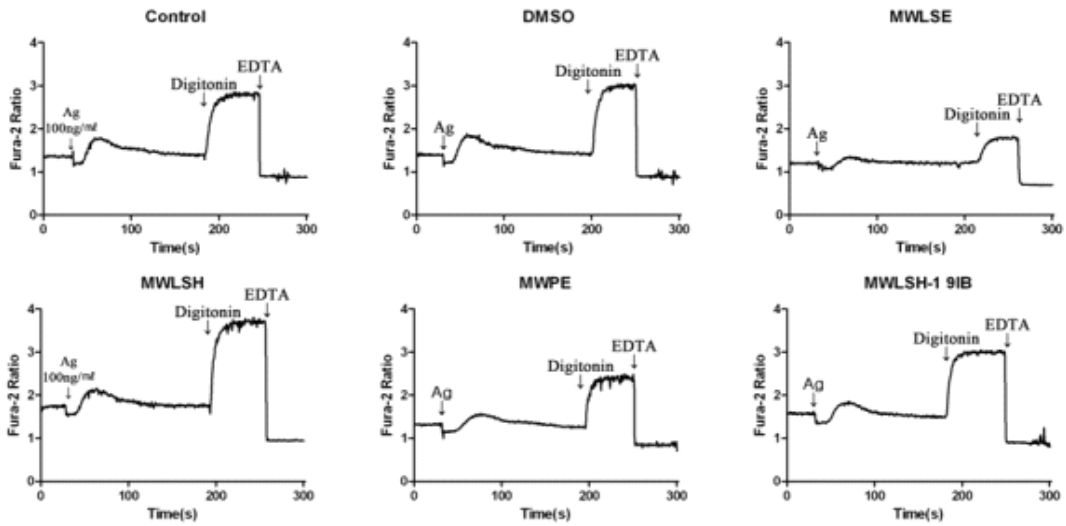
#### DNP-HAS mobilizes intracellular $Ca^{2+}$ in RBL-2H3 rat mast cells in a concentration-dependent manner



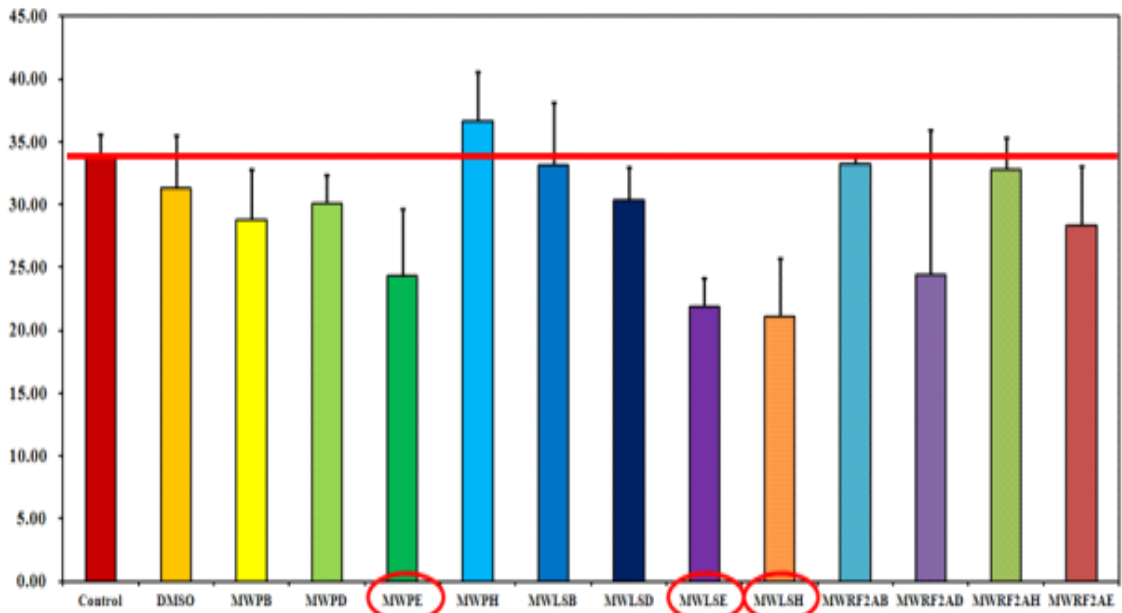
머위 유래 물질인 S-petasin에 의한 억제효과를 관찰하지 못했으나, 앞에서 추출한 MWSLE, MWSLH, 엽병유래 MWPE에서 유의한 억제효과를 관찰하였다.

이러한 조추출물에서 성분분리를 시도하여 단일성분들을 얻을 수 있었으며, 이러한 단일 순수 분리물질에 대해서도 세포내 칼슘농도의 대한 영향을 조사한 바, 하기 그림에 나타난 바와 같이 MWLSH-19IB, MELSH-110IKID와 MSCH ICIBICIAIL에서 유의한 억제효과를 관찰하였다.

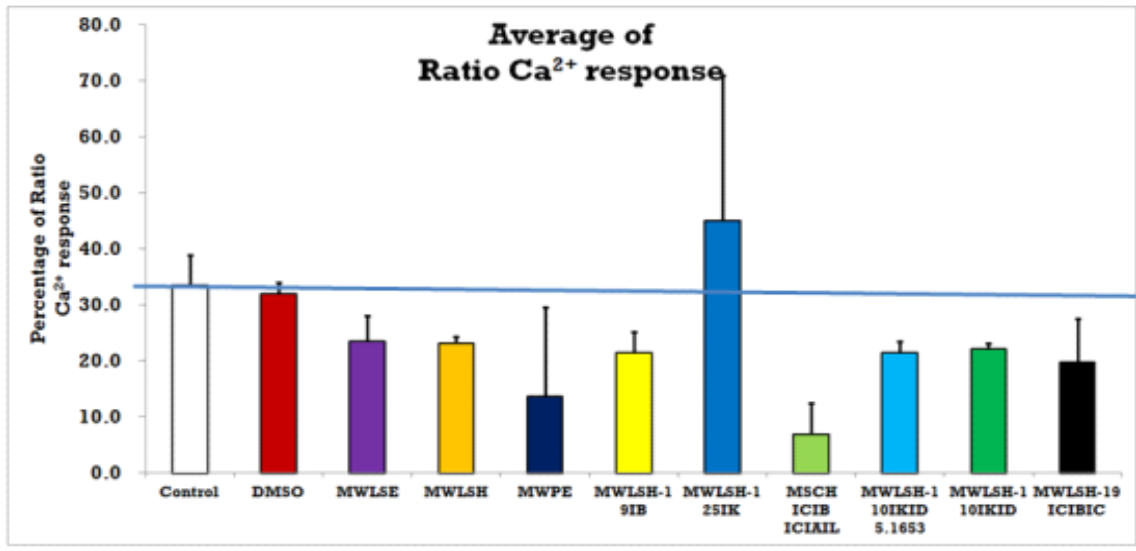
Several fractions of *Petasites japonicus* extracts inhibited intracellular Ca<sup>2+</sup> increase in RBL-2H3 rat mast cells



Average ratio



Purified compounds from *Petasites japonicus* inhibited intracellular Ca<sup>2+</sup> increase in RBL-2H3 rat mast cells



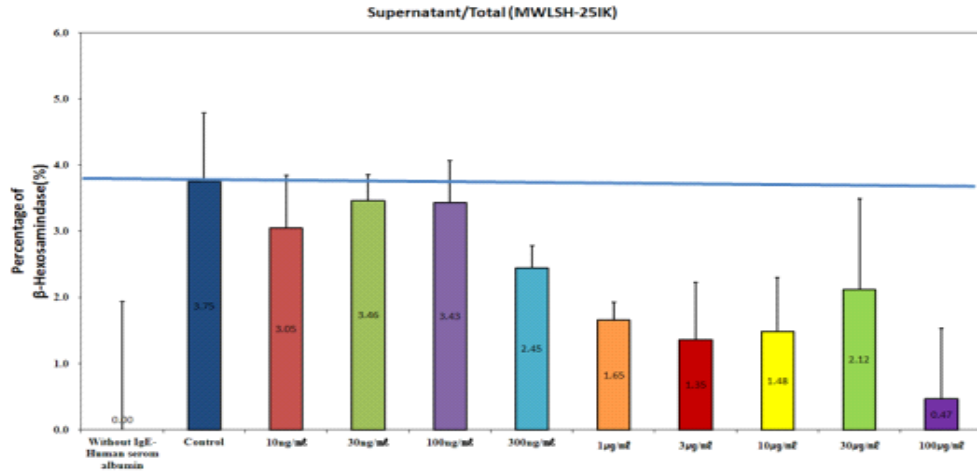
(나) β-hexosaminidase측정을 통한 탈과립 반응

RBL-2H3라는 랫트 비만세포를 배양하여 DNP-IgE (500 ng/ml)를 18시간처리한 후, 머위추출물을 첨가하고 15분뒤 DNP-HSA 100 ng/ml를 첨가한후 1시간 뒤에 세포외액과 세포내에 있는 β-hexosaminidase활성을 측정하여 탈과립반응의 정도를 조사하였다. 우선 자초 유래성분을 이용하여 하기 그림에 보여진 바와 같이 농도 의존적으로 DNP-HSA에 의한 탈과립반응을 억제하는 것을 관찰하였다. 이로서 β-hexosaminidase측정을 통한 탈과립 반응의 측정을 위한 시스템을 구축했다고 볼 수 있다.

머위 유래 추출물들에 의한 비만세포 타과립반응에 대한 억제활성을 측정하여 활성분획을 추적하였다. 이러한 과정에서 MWLSH-25IK성분에 의한 탈과립 억제반응의 농도 의존성을 관찰할 수 있었다. 또한 하기 그림에 보여진 바와 같이 MWLSH-1 10IKID성분에 의한 탈과립 억제반응의 농도 의존성을 관찰할 수 있었다.

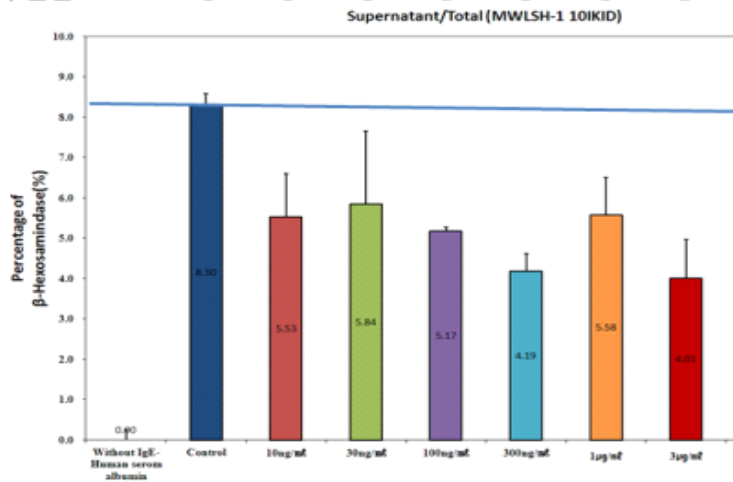
**MWLSH-25IK inhibited degranulation in RBL-2H3 rat mast cells by using measurement of  $\beta$ -hexosamidase activity**

|         |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|---------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| DNP-IgE | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| DNP-HSA | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 머위추출물   | × | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |



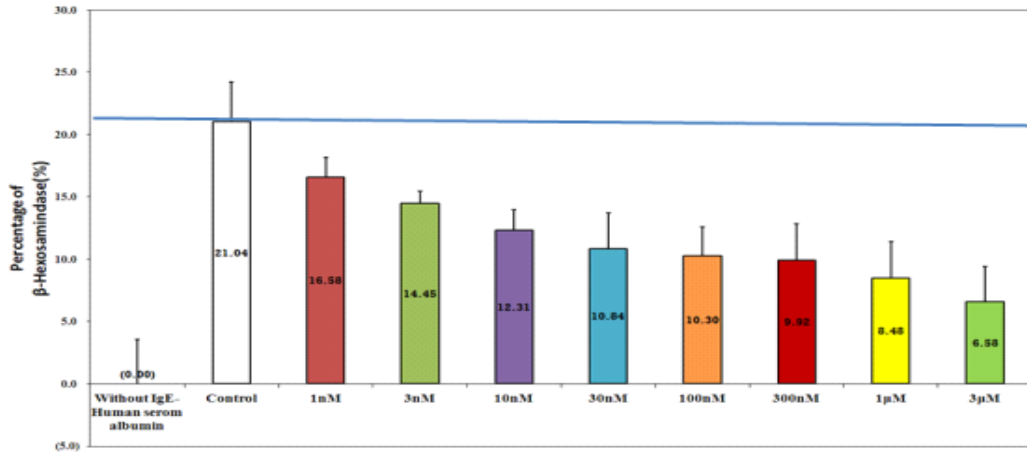
**MWLSH-1 10IKID inhibited degranulation in RBL-2H3 mast cells by using measurement of  $\beta$ -hexosamidase activity**

|         |   |   |   |   |   |   |   |   |
|---------|---|---|---|---|---|---|---|---|
| DNP-IgE | - | + | + | + | + | + | + | + |
| DNP-HSA | - | + | + | + | + | + | + | + |
| 머위추출물   | × | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |



**Shikonin inhibited degranulation in RBL-2H3 rat mast cells  
by using measurement of  $\beta$ -hexosamidase activity**

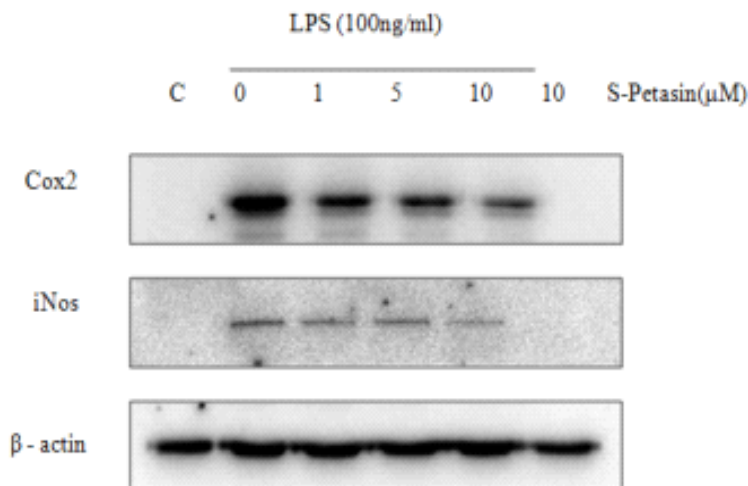
|          |   |   |                             |   |   |   |   |   |   |   |
|----------|---|---|-----------------------------|---|---|---|---|---|---|---|
| DNP-IgE  | - | + | +                           | + | + | + | + | + | + | + |
| DNP-HSA  | - | + | +                           | + | + | + | + | + | + | + |
| Shikonin | × | × | ○                           | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
|          |   |   | Supernatant/Total(Shikonin) |   |   |   |   |   |   |   |



**(다) 항염증활성의 측정**

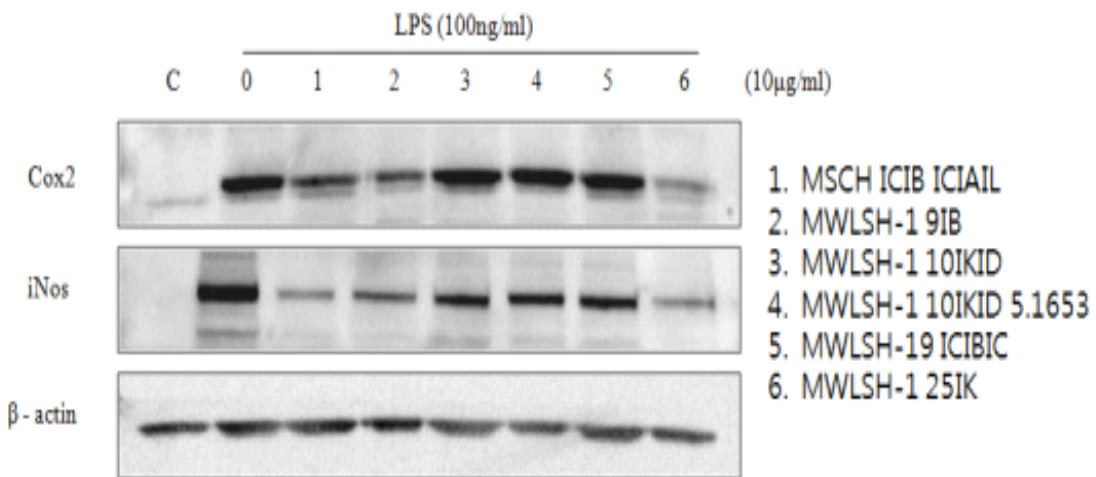
복강유래 대식세포의 iNOS, COX-2 발현에 대한 머위 추출물의 억제효과에 대한 실험을 수행하여, 머위유래 성분인 S-petasin이 iNOS와 COX-2의 발현을 억제하는 것을 관찰할 수 있었다. 농도의 존적으로 COX-2와 iNOS의 발현을 억제하는 것은 S-petasin의 항염증활성을 의미한다.

**S-petasin inhibited induction of inflammatory enzymes  
COX-2 and iNOS in peritoneal macrophages**



머위 추출물에 대하여도 같은 실험을 시행하여 몇종류의 머위유래 순수물질에서 iNOS와 COX-2의 발현을 억제하는 활성을 관찰하였으며, 각각의 활성물질에 대한 농도의존성을 시험하였다. 이중에서 MWLSH 1 10IKID와 MWLSH-1 25IK가 iNOS와 COX-2의 발현에 대하여 좋은 활성을 나타내었다.

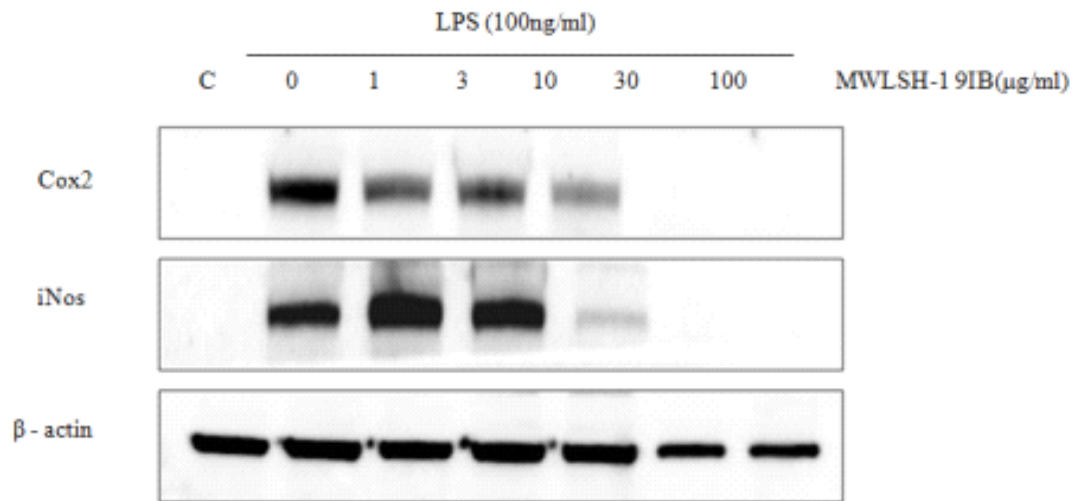
Extracts from *Petasites japonicus* inhibited induction of COX-2 and iNOS in peritoneal macrophages



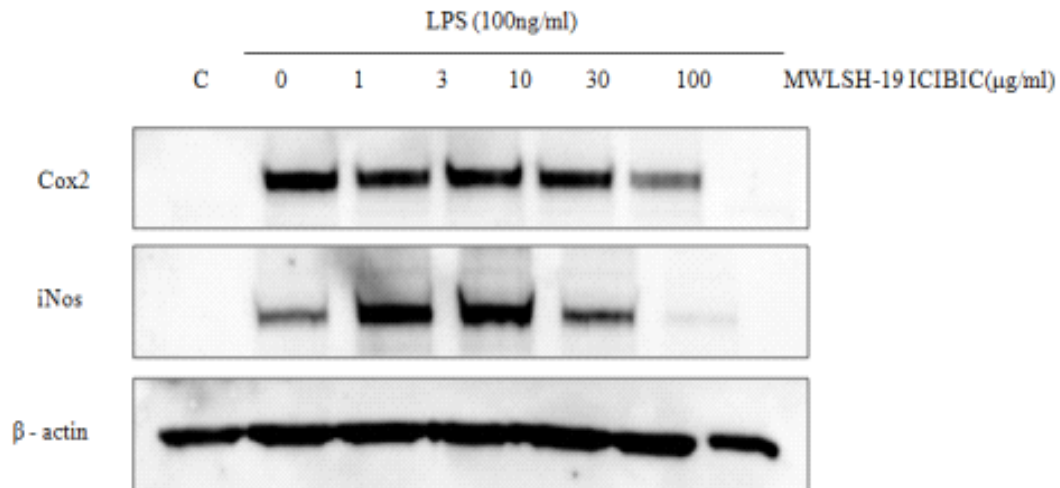
활성이 있는 머위유래 성분에 대하여 활성을 확인하기 위하여 농도 의존성을 Western blot으로 확인하였으며, 아래의 그림에 보여진 바와 같이 MWLSH-19IB, MWLSH-19ICIBC, MWLSH-125IK에서 대식세포의 COX-2, iNOS의 발현을 LPS로 유도할 때, 세가지 성분 모두 억제활성에 대한 농도의존성을 확인하였다. MWLSH-19ICIBC > MWLSH-19IB >> MWLSH-125IK순으로 억제활성을 나타내었다.



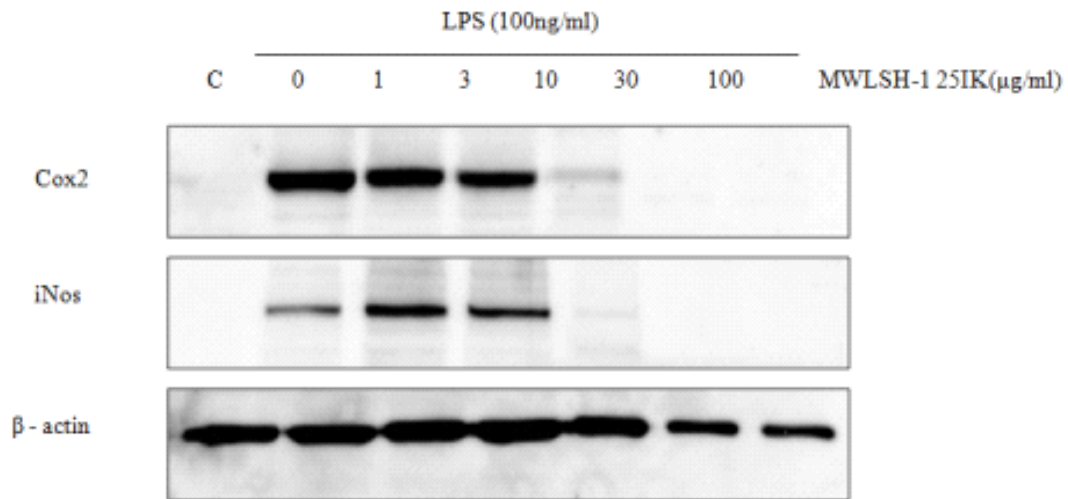
MWLSH-19IB from *Petasites japonicus* inhibited induction of COX-2 and iNOS in macrophages



MWLSH-19ICIBC from *Petasites japonicus* inhibited induction of COX-2 and iNOS in macrophages



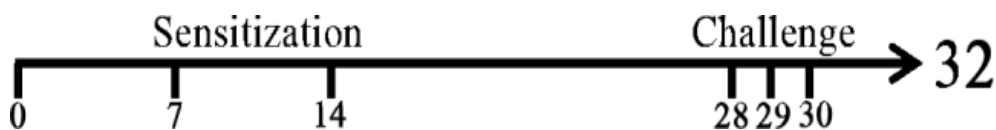
MWLSH-1 25IK from *Petasites japonicus* inhibited induction of COX-2 and iNOS in macrophages



(라) 천식동물모델

① Ovalbumin(OVA)이용 마우스모델에서 Asthma 유도

6주에서 8주령 BALB/cCrSic 마우스를 각각 3~4마리 씩 케이지에 각각 넣어 25±2℃ 상대습도 50±10%에서 1주일간 사육 후 20mg/mouse로 Albumin from chicken egg (Sigma-Aldrich A5503 OVA)을 2mg aluminum hydroxide(Sigma-Aldrich 239186)/Phosphate buffer saline (PBS)에 타서 복강 주사하여 감작 시킨다. 이후 7일 후 위와 똑같은 성분으로 두번째 복강주사한다. 실험시작 후 28, 29, 30일 쯤 OVA를 1% 농도가 되게 PBS에 타서 20분간 nebulizer를 이용하여 기도로 흡입 시킨다. 32일 쯤 샘플을 채취한다.



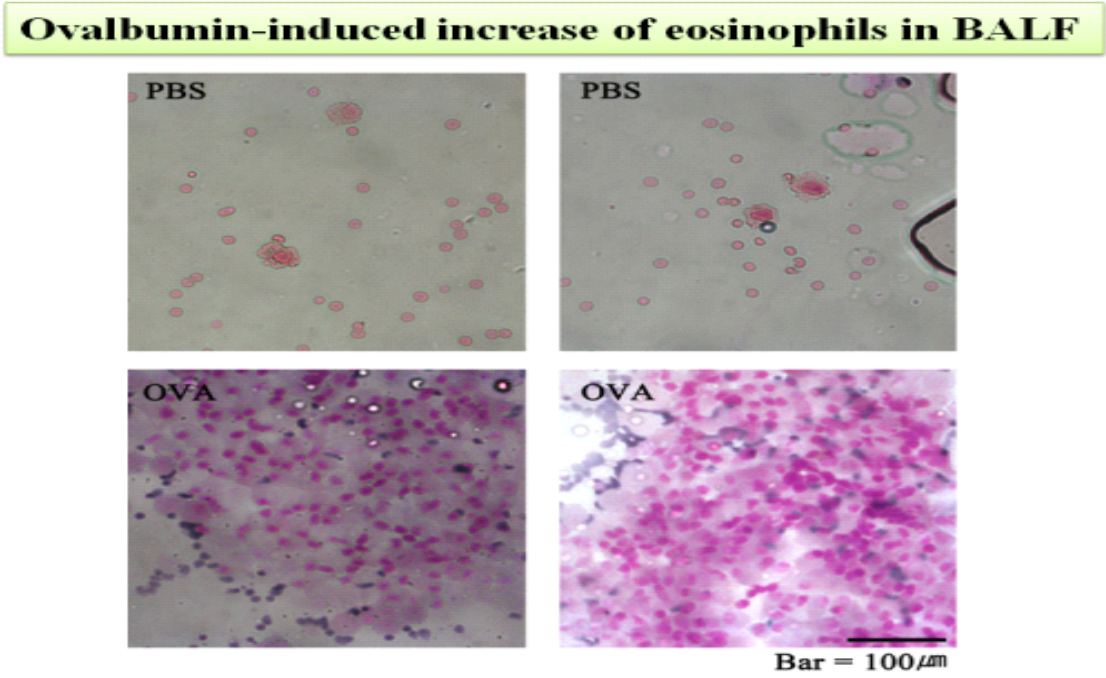
② 기관지세척액 (Bronch-alverolar lavage fluid: BALF) 채취 및 염색법

마지막으로 nebulizer 이후 48시간이 지난 뒤 마우스를 치사 시킨 후 기관지에 0.1M Phosphate buffer (pH 7.4 PB)를 I. V. Catheter를 이용하여 1ml 주입 후 마우스의 가슴을 주물러 준 후 다시 폐 속에 있는 용액을 채취한다.

채취한 시료를 PB를 이용하여 200×g 10min 원심분리 후, 상등액을 버리고 1ml의 0.1M PB에 재부유 시킨 후 각각 150μl씩 500rpm 5분간 Cell spin(Hanil Science industrial)을 사용하여 슬라이드에 붙인다.

자연건조 후 Methanol로 30초간 고정을 한다. 이후 May-Grüunwald (Sigma-Aldrich 63590)을 5분간 슬라이드에 처리 후 0.1M PB(pH 6.8)와 May-Grüunwald을 1:1희석을 하여 3분간 슬

라이드에 처리한다. 이 때 용액에 금속빛깔이 나며, 1:20 로 Gimsa stain solution과 0.1M PB(pH 6.8)와 희석을 하여 15분간 처리한다.  
70-80-90-100% Ethanol에 각 2분씩 탈수 후 Xylene에 2분간 담근 후 Permount(Fisher Scientific 016703)을 이용하여 커버슬립 한다.



**나. 세포 및 질환모델동물을 이용한 약리효능 및 생리활성 검증 2013년**

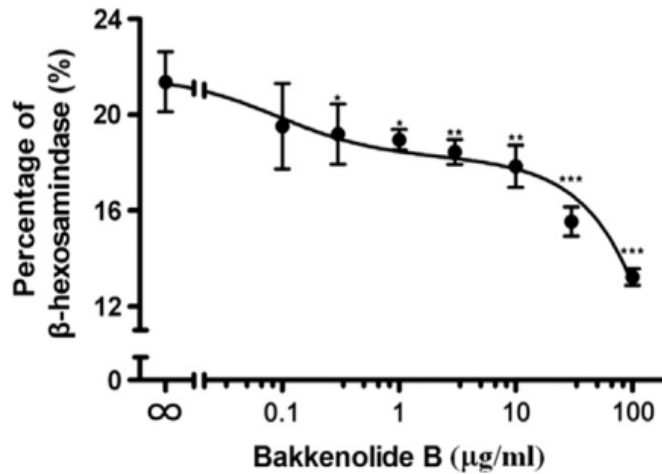
**(1) Bakkenolide B의 항염증과 항알레르기효과의 발견**

1차년도 연구를 통하여 항알레르기 효과를 갖는 머위추출 유용성분을 RBL-2H3라는 랫트 비만세포를 이용하여 스크리닝 하였다. 조추출물에서 성분분리를 시도하여 단일성분들을 얻을 수 있었으며, 이러한 단일 순수 분리물질에 대해서도 세포내 칼슘농도의 대한 영향을 조사한 바, MWLSH-19IB, MELSH-110IKID와 MSCH ICIBICIAIL에서 유의한 억제효과를 관찰하였다.

그 중에서 Bakkenolide B라는 성분이 대식세포에 대해 항염증효과를 가지며, 비만세포의 탈과립반응을 억제함을 관찰하였다.

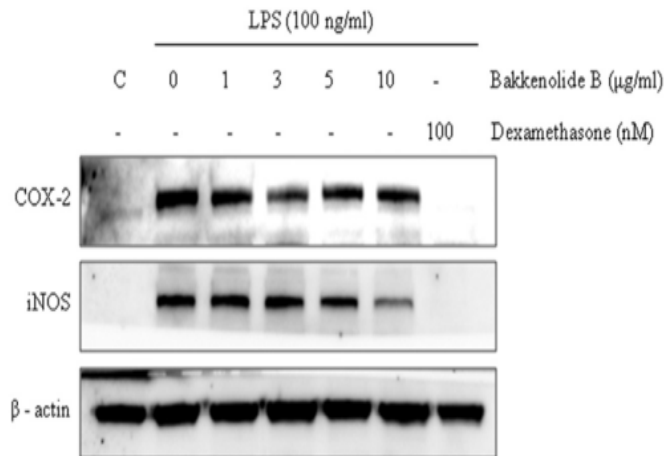
RBL-2H3라는 랫트 비만세포를 배양하여 DNP-IgE (500 ng/ml)를 18시간처리한 후, bakkenolide B를 첨가하고 15분뒤 DNP-HSA 100 ng/ml를 첨가한후 1시간 뒤에 세포외액과 세포내에 있는  $\beta$ -hexosaminidase활성을 측정하여 탈과립반응의 정도를 조사하였다. 오른 쪽 그림에 보여진 바와 같이 bakkenolide B는  $\beta$ -hexosaminidase측정을 통한 탈과립 반응의 측정에서 농도 의존적으로 탈과립 반응을 억제함을 관찰할 수 있었다 (아래그림).

비만세포에서 bakkenolide B의 탈과립반응의 억제활성



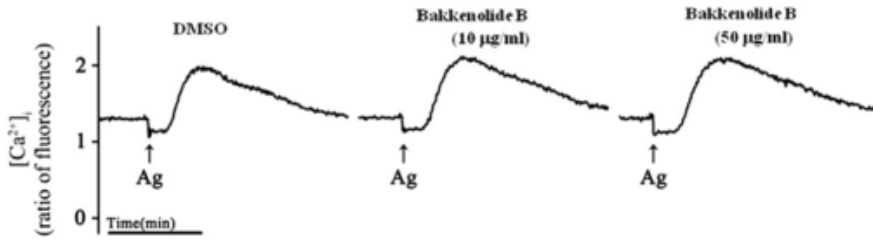
복강유래 대식세포의 iNOS, COX-2 발현에 대한 Bakkenolide B의 억제효과에 대한 실험을 수행하여, bakkenolide B가 iNOS와 COX-2의 발현을 억제하는 것을 관찰할 수 있었다. 농도의 존적으로 COX-2와 iNOS의 발현을 억제하는 것은 항염증활성을 의미한다. (아래 그림).

대식세포에서 bakkenoldie B에 의한 COX-2, iNOS 발현억제효과



하지만 RBL-2H3라는 랫트 비만세포를 배양하여 DNP-IgE (500 ng/ml)를 18시간처리한 후, 머위추출물을 첨가하고 15분뒤 DNP-HSA 100 ng/ml를 첨가하면서 세포내 칼슘농도의 변화를 Fura-2 형광색소를 이용하여 측정하였으나 Antigen에 의한 세포내 칼슘농도의 증가는 관찰하였으나, bakkenolide B에 의한 억제효과는 관찰할 수 없었다. 따라서 antigen에 의한 세포내 칼슘농도의 증가를 억제시키는 것은 bakkenolide B의 작용기전이 아닌 것으로 생각된다. (아래 그림).

## Bakkenolide B의 비만세포의 세포내 칼슘농도의 증가에 대한 영향

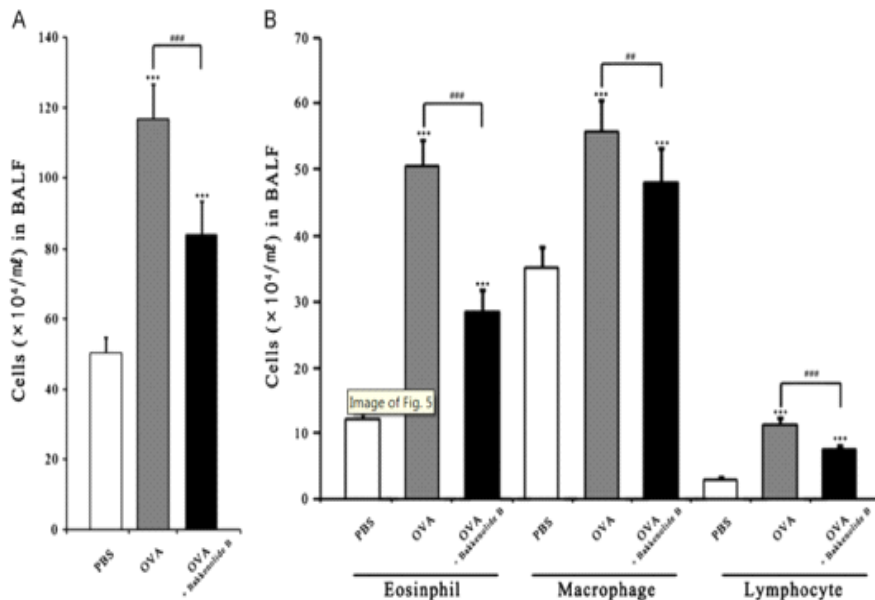


### (2) Bakkenolide B의 항천식효과의 규명

3차연도에 연구할 예정이었던 천식실험동물모델을 조기에 구축하여 Bakkenolide B에 의한 항천식효과를 *in vivo* 실험으로 증명하였다. 천식모델은 Balb/c 마우스를 이용하였으며, 실험 1일, 14일에 두 번에 걸쳐 복강으로 ovalbumin과 alum을 투여하여 ovalbumin에 대한 면역성을 유도하였으며, 28일째부터 nebulizer를 통해 10분간 ovalbumin에 노출시켰다. 삼일째되는 날 BALF(bronchioalveolar fluid)를 회수하여 이곳에 모인 세포들을 카운트하는 방식으로 진행하였다.

하기 그림에 보여진 바와 같이 Bakkenolide B의 투여는 BALF에 축적된 전체 혈구세포의 숫자를 감소시켰으며, 호산구, 대식세포, 백혈구의 숫자를 모두 유의성 있게 감소시키는 것이 관찰되었다.

### Ovalbumin유도 천식모델에서 bakkenoldie B에 BALF 혈구 축적 억제효과



Lee et al. Journal of Ethnopharmacology 에 bakkenolide B 연구결과 발표

Journal of Ethnopharmacology 148 (2013) 890–894



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Journal of Ethnopharmacology

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



Anti-allergic and anti-inflammatory effects of bakkenolide B isolated from *Petasites japonicus* leaves



Kyoung-Pil Lee<sup>a</sup>, Saeromi Kang<sup>a</sup>, Soo-Jin Park<sup>a</sup>, Young-Whan Choi<sup>b</sup>, Young-Geun Lee<sup>c</sup>, Dong-Soon Im<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Molecular Inflammation Research Center for Aging Intervention (MRCA) and College of Pharmacy, Pusan National University, Busan 609-735, Republic of Korea

<sup>b</sup> Department of Horticultural Bioscience, College of Natural Resources & Life Science, Pusan National University, Miryang-si, Gyeongsangnam 627-706, Republic of Korea

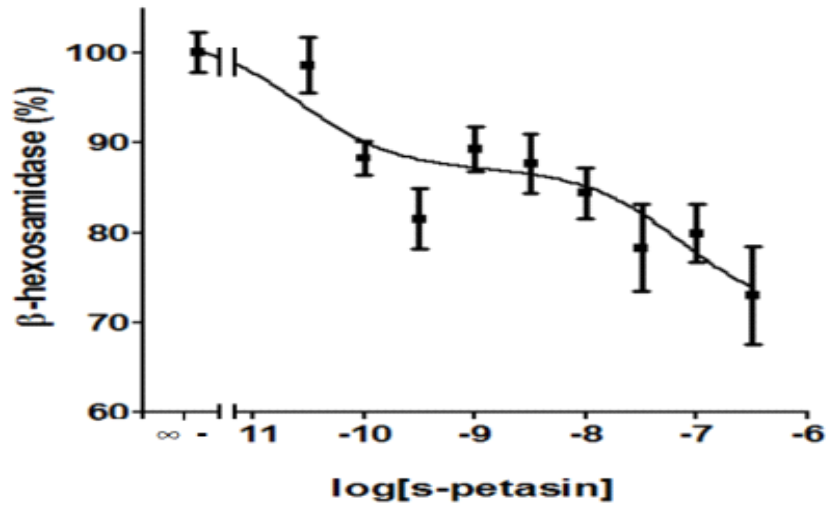
<sup>c</sup> Department of Food Engineering, College of Natural Resources & Life Science, Pusan National University, Miryang-si, Gyeongsangnam 627-706, Republic of Korea

이를 SCI급 국제저널인 Journal of Ethnopharmacology, 148, 890–894, 2013에 게재하였다.

### (3) S-petasin의 탈과립억제활성과 COX-2, iNOS발현억제 효과의 발견

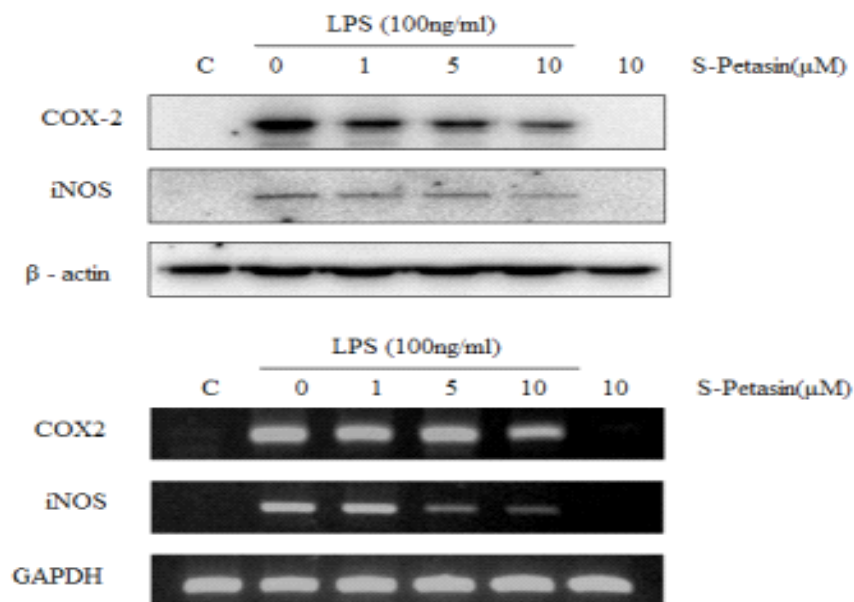
Petasites의 주성분중에 하나인 S-petasin에 대한 연구를 병행하여 S-petasin에 의한 비만세포에서의 탈과립 억제활성을 측정하였으며, s-petasin에 의한 농도의존적억제효과를 관찰하였다 (하기 그림).

S-petasin에 의한 탈과립반응의 억제활성농도의존성



또한 대식세포에서 s-petasin에 의한 항염증활성을 COX-2의 발현억제와 inducible-NOS의 발현억제를 RNA와 단백질 수준에서 관찰하였다. 이러한 효과는 s-petasin이 항염증효과를 가지고 있다는 증거가 될 수 있다.

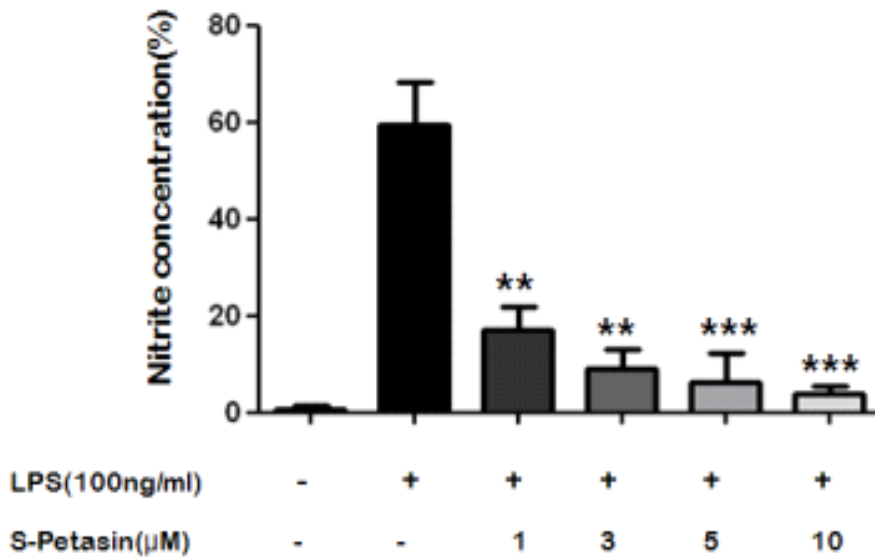
S-petasin에 의한 항염증활성의 농도의존성



#### (4) S-petasin의 NO생성억제와 PGE2생성에 대한 영향 분석

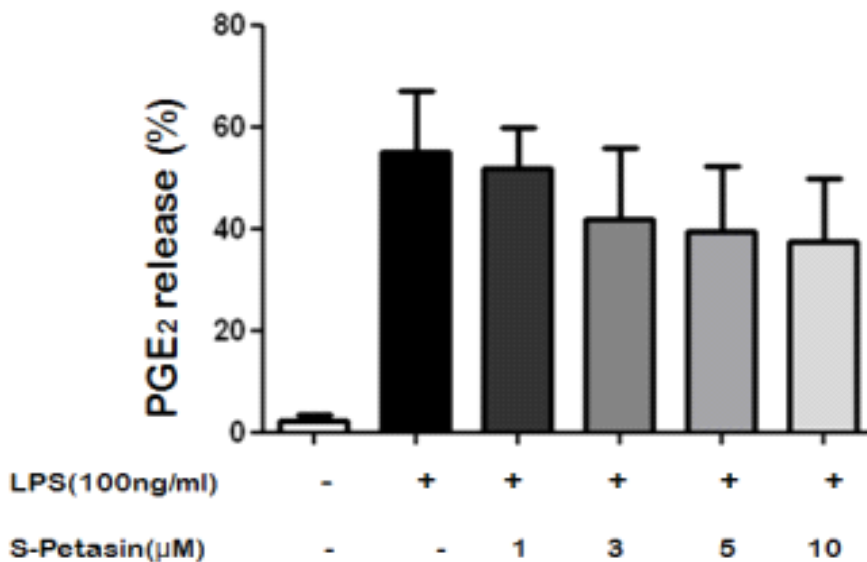
S-petasin에 의한 iNOS와 COX-2발현억제에 대한 영향을 분석하는 방법으로 iNOS에 의해 생성되는 NO의 양을 측정하였으며, s-petasin에 의해 농도의존적으로 억제됨을 관찰하였다 (하기 그림).

#### S-petasin에 의한 NO 생성의 억제 농도의존성



하지만 COX-2의 생성물이라고 생각되는 PGE2의 양은 s-petasin에 의해 억제되는 경향을 보였으나 유의성 있는 억제는 관찰되지 않았다.

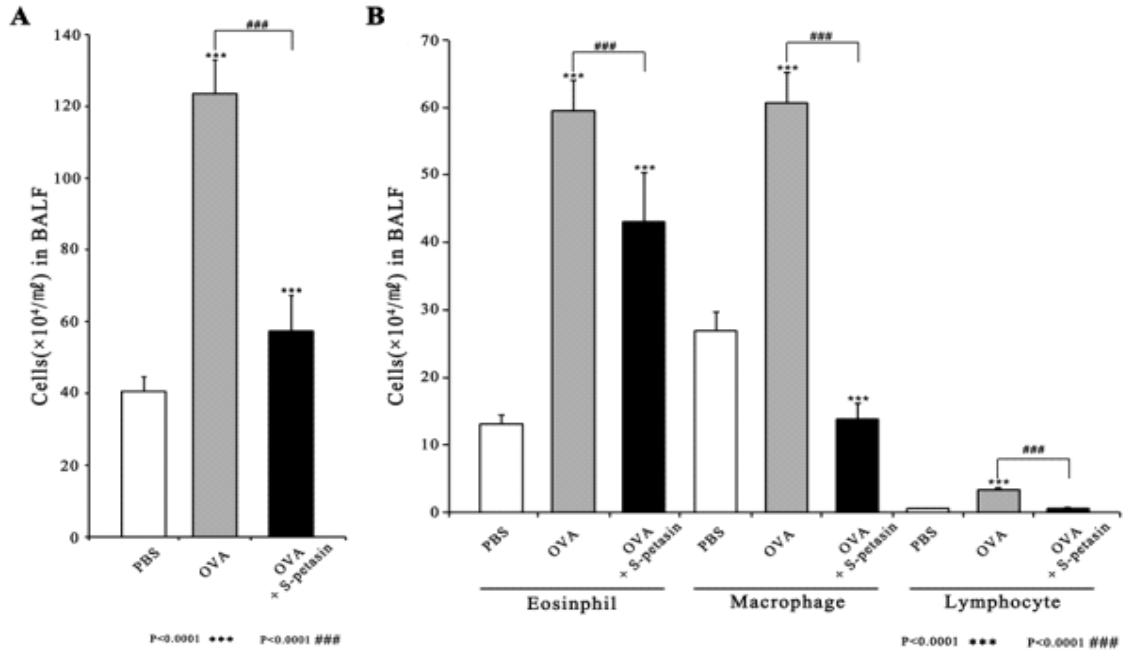
#### S-petasin에 의한 PGE<sub>2</sub> 생성에 대한 영향





(5) S-petasin의 ovalbumin 유도 천식모델에서 BALF에 백혈구 축적억제

Ovalbumin 유도 천식 모델에서 S-petasin에 의한 호중구, 대식세포, 백혈구의 기관세 내의 축적억제효과

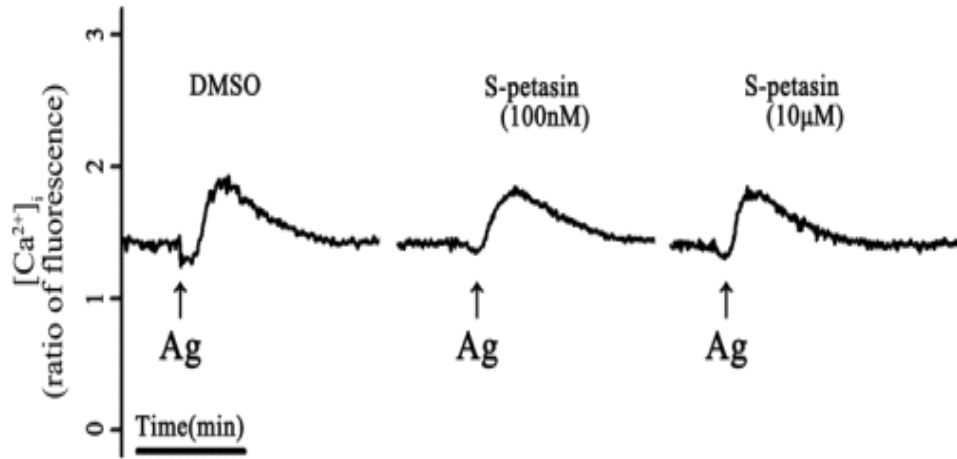


Balb/c 마우스를 이용하여 ovalalbumin을 투여하여 만든 천식 실험동물 모델에서 s-petasin의 투여에 의한 BALF(bronchioalbeolar lavage fluid)에 축적되는 호중구, 대식세포, 백혈구의 숫자가 유의성 있게 억제되는 것을 관찰하였다.

(6) S-petasin의 비만세포에서 Antigen에 의한 세포내 칼슘농도 증가에 대한 영향

비만세포에서 antigen에 노출이 되면 IgE의 crosslink에 의해 세포내 칼슘농도의 증가가 일어나며 이를 통해서 탈과립반응이 일어난다. s-petasin에 의한 탈과립억제의 기전으로서 세포내 칼슘농도에 대한 영향을 조사하였으나, antigen에 의한 세포내 칼슘농도의 증가는 관찰하였으나 s-petasin에 의한 억제효과는 관찰할 수 없었다.

S-petasin의 비만세포의 세포내 칼슘농도의 증가에 대한 영향



## 다. 세포 및 질환모델동물을 이용한 약리효능 및 생리활성 검증 -2014년

### (1) S-petasin의 천식과 복막염에 대한 치료효과 발표

2차년도 연구를 통하여 항알레르기 효과와 항염증 효과에 대한 결과를 얻었던 s-petasin의 약리활성에 대해서 2015년 1월에 SCIE 저널인 *Biomolecules & Therapeutics*에 발표하였다. Therapeutic Effects of S-Petasin on Disease Models of Asthma and Peritonitis. Lee KP et. al *Biomolecules & Therapeutics* 2015 Jan; 23(1): 45-52.



Original Article  
*Biomol Ther* 23(1), 45-52 (2015)

## Therapeutic Effects of S-Petasin on Disease Models of Asthma and Peritonitis

Kyoung-Pil Lee<sup>1,†</sup>, Saeromi Kang<sup>1,†</sup>, Min-Soo Noh<sup>1,†</sup>, Soo-Jin Park<sup>1</sup>, Jung-Min Kim<sup>1</sup>, Hae Young Chung<sup>1</sup>, Nam Kyung Je<sup>1</sup>, Young-Geun Lee<sup>2</sup>, Young-Whan Choi<sup>2</sup> and Dong-Soon Im<sup>1,\*</sup>

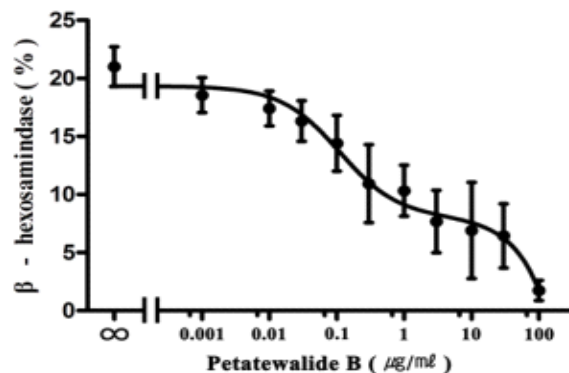
<sup>1</sup>Molecular Inflammation Research Center for Aging Intervention (MRCA) and College of Pharmacy, Pusan National University, Busan 609-735, <sup>2</sup>Department of Horticultural Bioscience, College of Natural Resources & Life Science, Pusan National University, Miryang 627-706, Republic of Korea

### (2) Petatewalide B의 항알레르기효과의 발견

1차년도 연구를 통하여 항알레르기 효과를 갖는 머위추출 유효성분을 RBL-2H3라는 랫트 비만세포를 이용하여 스크리닝 하였다. 조추출물에서 성분분리를 시도하여 단일성분들을 얻을 수 있었으며, 이러한 단일 순수 분리물질중에서 MELSH-110IKID는 petatewalide B라는 성분으로 밝혀졌으며, 대식세포에 대해 항염증효과를 가지며, 비만세포의 탈과립반응을 억제함을 관찰하였다.

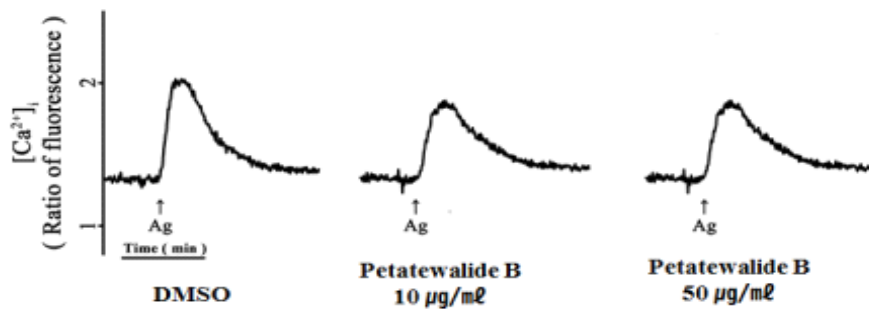
RBL-2H3라는 랫트 비만세포를 배양하여 DNP-IgE (500 ng/ml)를 18시간처리한 후, petatewalide B를 첨가하고 15분뒤 DNP-HSA 100 ng/ml를 첨가한후 1시간 뒤에 세포외액과 세포내에 있는  $\beta$ -hexosaminidase활성을 측정하여 탈과립반응의 정도를 조사하였다. 오른 쪽 그림에 보여진 바와 같이 petatewalide B는  $\beta$ -hexosaminidase측정을 통한 탈과립 반응의 측정에서 농도 의존적으로 탈과립 반응을 억제함을 관찰할 수 있었다 (아래그림).

Petatewalide B에 의한 RBL-2H3 비만세포에서 탈과립 억제효과



하지만 RBL-2H3라는 랫트 비만세포를 배양하여 DNP-IgE (500 ng/ml)를 18시간처리한 후, 머위추출물을 첨가하고 15분뒤 DNP-HSA 100 ng/ml를 첨가하면서 세포내 칼슘농도의 변화를 fura-2 형광색소를 이용하여 측정하였으나 antigen에 의한 세포내 칼슘농도의 증가는 관찰하였으나, petatewalide B에 의한 억제효과는 관찰할 수 없었다. 따라서 antigen에 의한 세포내 칼슘농도의 증가를 억제시키는 것은 petatewalide B의 작용기전이 아닌 것으로 생각된다 (아래 그림).

**Petatewalide B 에 의한 RBL-2H3 비만세포에서 세포내 칼슘농도에 대한 영향**

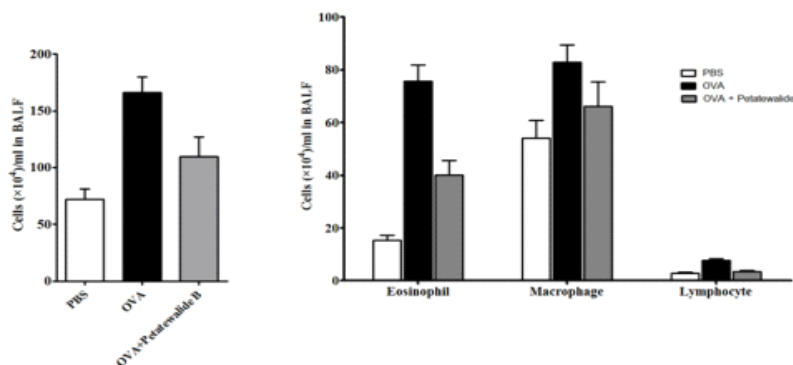


**(3) Petatewalide B의 항천식효과의 발견**

2차연도부터 확립한 천식 실험동물모델을 이용하여 petatewalide B에 의한 항천식효과를 in vivo 실험으로 증명하였다. 천식모델은 Balb/c 마우스를 이용하였으며, 실험 1일, 14일에 두 번에 걸쳐 복강으로 ovalbumin과 alum을 투여하여 ovalbumin에 대한 면역성을 유도하였으며, 28일째부터 nebulizer를 통해 10분간 ovalbumin에 노출시켰다. 3일째되는 날 BALF(bronchioalveolar fluid)를 회수하여 이곳에 모인 세포들을 카운트하는 방식으로 진행하였다.

하기 그림에 보여진 바와 같이 petatewalide B의 투여는 BALF에 축적된 전체 혈구세포의 숫자를 감소시켰으며, 호산구, 백혈구의 숫자를 모두 유의성 있게 감소시키는 것이 관찰되었다.

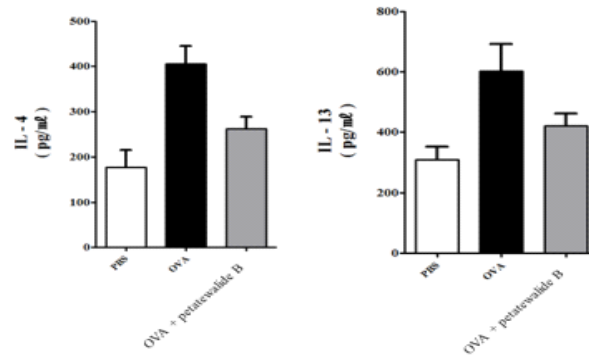
**마우스 천식 모델에서 Petatewalide B에 의한 BALF 세포축적 억제효과**



천식은 Th2 면역반응으로서 IL-4와 IL-13이 주로 관여하는 것으로 알려져 있다. 이에 IL-4와 IL-13의 양을 측정하였으며, 하기 그림에서 보여지는 바와 같이 petatewalide B의 투여는 IL-4

와 IL-13의 생성량을 감소시켰다.

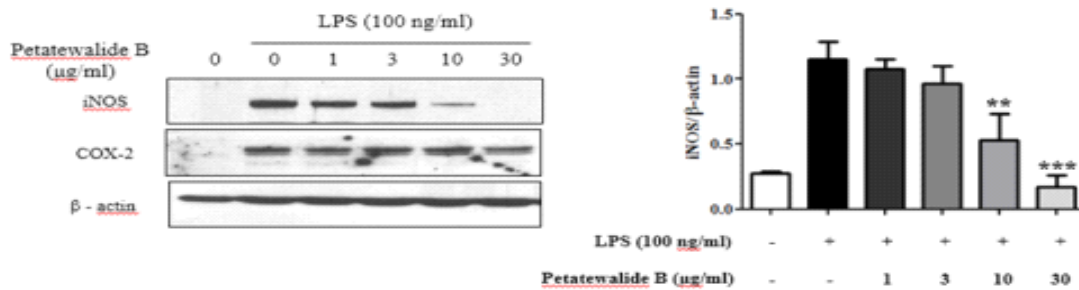
마우스 천식 모델에서 Petatewalide B에 의한 사이토카인 생성 억제효과



#### (4) Petatewalide B의 항염증효과의 발견

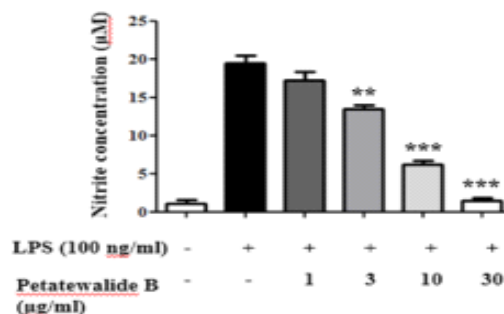
복강유래 대식세포의 iNOS, COX-2 발현에 대한 petatewalide B의 억제효과에 대한 실험을 수행하여, petatewalide B가 iNOS의 발현을 억제하는 것을 관찰할 수 있었다. 농도의존적으로 iNOS의 발현을 억제하는 것은 항염증활성을 의미한다 (아래 그림).

Petatewalide B에 의한 마우스 대식 세포에서 iNOS 유도 억제효과



복강유래 대식세포에서 petatewalide B가 iNOS의 발현을 억제하는 것을 증명하기 위하여 iNOS 효소의 생성물인 NO를 측정하였으며, 하기 그림에 보여지는 것과 같이 petatewalide B는 농도 의존적으로 NO의 생성을 억제하였다.

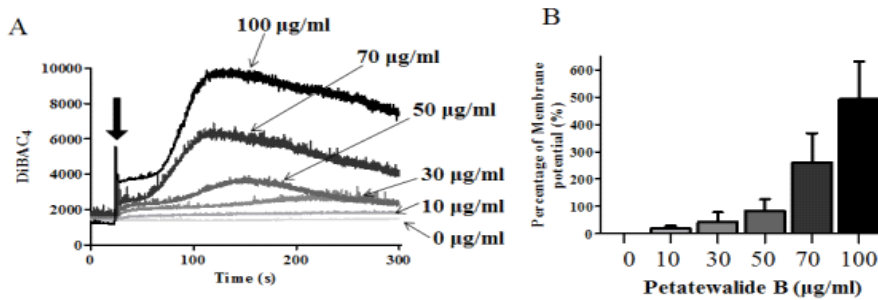
Petatewalide B에 의한 마우스 대식 세포에서 NO 생성 억제효과



### (5) Petatewalide B의 막전위 상승효과의 발견

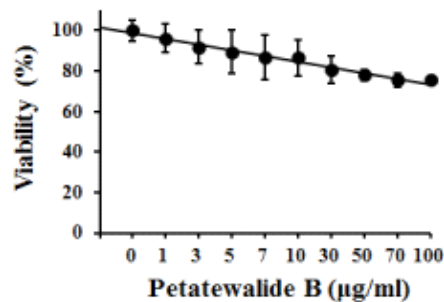
세포막 전위의 유지는 세포의 활성의 조절에 매우 중요하다. C6 glioma 세포를 이용하여 세포막 전위에 대한 petatewalide B의 영향을 검토하였다. 세포막 전위는 DiBAC4 형광염료를 사용하여 측정하였으며, C6 glioma세포의 막전위에 대해서 s-petasin은 영향을 주지 않았지만, petatewalide B는 농도의존적으로 세포막 전위의 상승을 일으켰다. 막전위는 일시적으로 상승했으며, 시간이 지남에 따라서 원래의 막전위로 돌아오는 것을 관찰할 수 있었다.

Petatewalide B에 의한 C6 glioma세포에서 세포막전위 증가효과



이러한 petatewalide B의 영향이 세포생존에 영향을 주는 지 조사하였으나, 아래그림에 보여진 바와 같이 세포생존에 대해서는 약 20%정도의 세포독성을 관찰할 수 있었다. 하지만 막전위의 경우 50 mg/ml와 100 mg/ml에서 막전위의 상승 효과에 차이를 관찰할 수 있었으나, 세포독성에서는 두 농도사이에 커다란 차이를 관찰할 수 없었다. 이를 통해 막전위의 상승은 세포독성과 연관이 없는 것으로 생각된다.

Petatewalide B에 의한 C6 glioma세포의 세포생존에 대한 영향



(6)  $\alpha$ -cubebenoate의 항염증효과의 발견

Schisandra의 새로운 성분으로 발견한  $\alpha$ -cubebenoate에 의한 항염증작용을 연구를 병행하여, SCI 저널에 논문을 발표하였다. Identification of a novel anti-inflammatory compound,  $\alpha$ -cubebenoate from Schisandra chinensis. Kang S et al. J Ethnopharmacol. 2014 Apr 11;153(1):242-9.



Identification of a novel anti-inflammatory compound,  $\alpha$ -cubebenoate from *Schisandra chinensis*

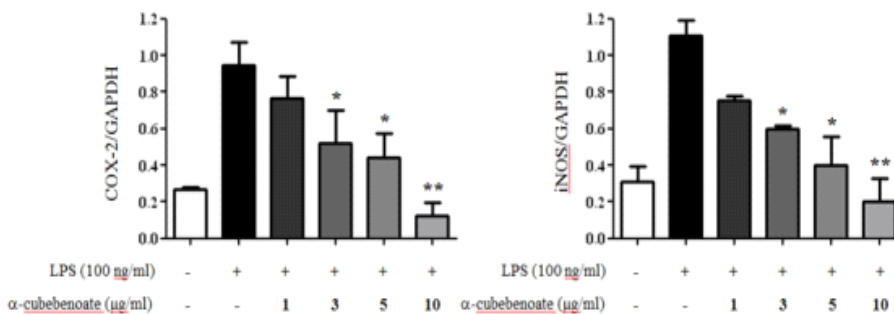


Saeromi Kang<sup>a</sup>, Kyoung-Pil Lee<sup>a</sup>, Soo-Jin Park<sup>a</sup>, Dae-Young Noh<sup>a</sup>, Jung-Min Kim<sup>a</sup>, Hyung Ryong Moon<sup>a</sup>, Young-Geun Lee<sup>b</sup>, Young-Whan Choi<sup>b,\*</sup>, Dong-Soon Im<sup>a,\*\*</sup>

<sup>a</sup> Molecular Inflammation Research Center for Aging Intervention (MRCA) and College of Pharmacy, Pusan National University, 63 Beon-gil 2, Busandaehag-ro, Geumjeong-gu, Busan 609-735, Republic of Korea  
<sup>b</sup> Department of Horticultural Bioscience, College of Natural Resources & Life Science, Pusan National University, Miryang-si, Gyeongsangnam 627-706, Republic of Korea

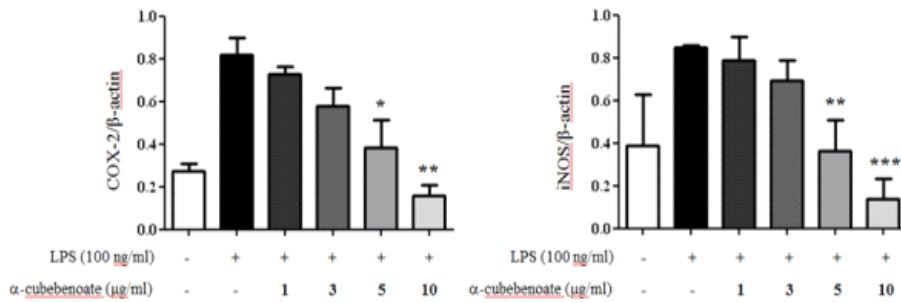
$\alpha$ -Cubebenoate에 의한 iNOS와 COX-2 발현 유도에 대한 영향을 mRNA 수준에서 RT-PCR 방법을 통해서 연구하였으며, iNOS, COX-2의 발현이  $\alpha$ -cubebenoate에 의해 농도의존적으로 억제됨을 관찰하였다 (하기 그림).

$\alpha$ -Cubebenoate에 의한 마우스 대식 세포에서 iNOS와 COX-2 유도 억제효과 (m-RNA)



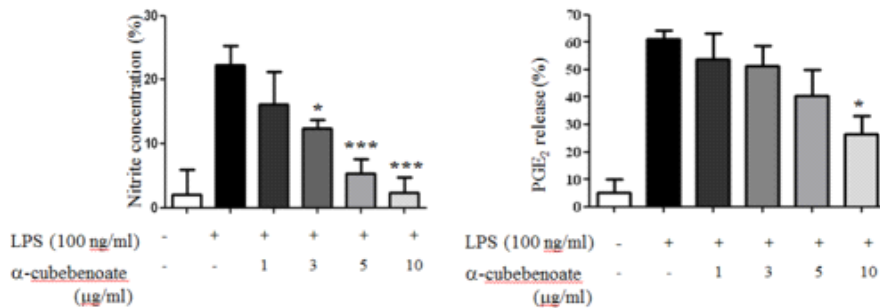
$\alpha$ -Cubebenoate에 의한 iNOS와 COX-2 발현 유도에 대한 mRNA 수준에서 억제 효과를 확인하기 위하여 Western blotting 방법을 통해서 단백질 수준에서 연구하였으며, iNOS, COX-2의 단백질 발현이  $\alpha$ -cubebenoate에 의해 농도의존적으로 억제됨을 관찰하였다 (하기 그림).

**$\alpha$ -Cubebenoate에 의한 마우스 대식 세포에서  
iNOS와 COX-2 유도 억제효과 (단백질량)**



$\alpha$ -Cubebenoate의 마우스 대식세포에서 iNOS와 COX-2 발현유도에 대한 mRNA와 단백질 수준에서의 억제 효과를 확인하기 위해서, iNOS와 COX-2효소의 생성물인 NO와 프로스타글란딘 E2 (PGE2)의 생성량에 대한  $\alpha$ -cubebenoate에 영향을 검토한 결과, 하기 그림과 같이 NO의 생성량에 대해서 농도의존적인 억제를 관찰할 수 있었다. 또한 PGE2에 대해서도 고농도에서는 억제효과를 관찰할 수 있었다.

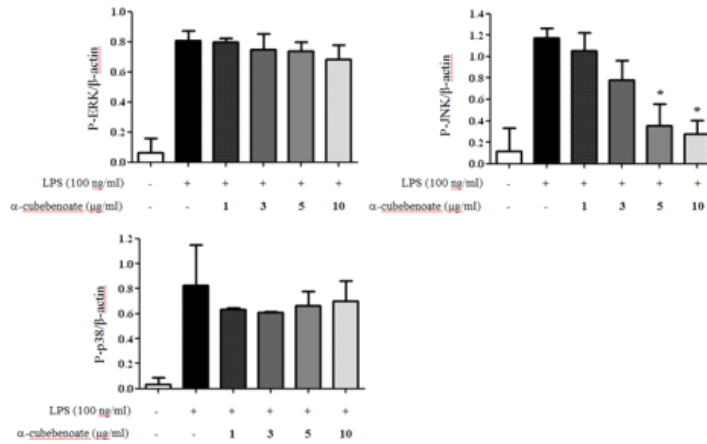
**$\alpha$ -Cubebenoate에 의한 마우스 대식 세포에서  
NO 생성과 PGE<sub>2</sub> 생성 억제 효과**



$\alpha$ -Cubebenoate의 마우스 대식세포에서 iNOS와 COX-2 발현억제와 NO와 PGE2의 생성억제에 대한 기전연구로서 대표적인 신호전달 단백질인 mitogen-activated protein kinase (MAPK) 단백질들에 대한 영향을 검토하였다.  $\alpha$ -Cubebenoate는 하기 그림과 같이 LPS에 의해 유도되는 ERK1/2활성화, JNK 활성화, p38 MAPK활성화중에서 ERK1/2와 p38 MAPK에 대해서는 영향이 없었으나, JNK의 활성화에 대해서는 억제활성을 보였다. 따라서  $\alpha$ -Cubebenoate는 JNK의 활성화를 억제하여 iNOS, COX-2의 유도를 억제하는 것으로 생각된다.

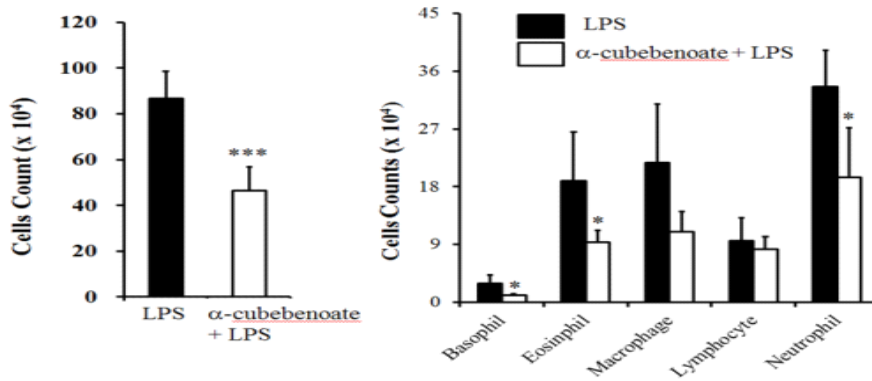


**α-Cubebenoate에 의한 마우스 대식 세포에서  
신호전달 단백질들에 대한 효과**



α-Cubebenoate의 마우스 대식세포에서 iNOS와 COX-2 발현억제와 NO와 PGE2의 생성억제에 대한 *in vivo* 활성을 확인하기 위해서 LPS유도 마우스 복강염 모델을 사용하였다. 마우스의 복강내에 LPS를 주사하면 면역반응이 시작되어 호산구, 중성구, 대식세포, 백혈구들이 모여들게 되는데, α-cubebenoate의 전처리에 의해서 면역반응이 억제되어, 하기 그림과 같이 LPS에 의해 유도된 세포축적이 억제되는 것이 관찰되었다. 특히 호산구와 중성구의 축적이 유의성 있게 억제되는 것을 관찰하였다.

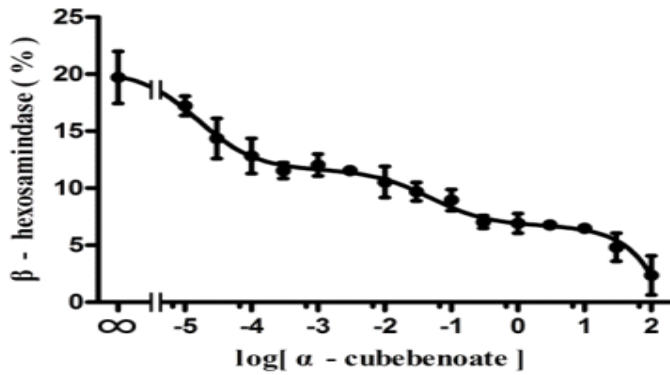
**마우스 복강염 모델에서 α-Cubebenoate에 의한 세포축적 억제효과**



**(7) α-cubebenoate의 항알레르기 효과의 발견**

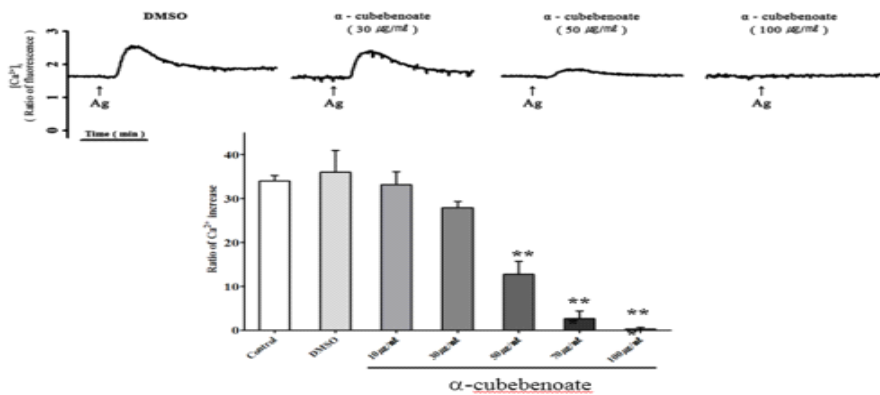
또한 α-cubebenoate에 의한 항알레르기 효과를 연구하여, α-cubebenoate에 의한 비만세포에서의 탈과립 억제활성을 측정하였으며, α-cubebenoate에 의한 농도의존적억제효과를 관찰하였다 (아래 그림).

RBL-2H3 비만세포에서  $\alpha$ -cubebenoate에 의한 탈과립 억제효과



비만세포에서 antigen에 노출이 되면 IgE의 crosslink에 의해 세포내 칼슘농도의 증가가 일어나며 이를 통해서 탈과립반응이 일어난다.  $\alpha$ -cubebenoate에 의한 탈과립억제의 기전으로서 세포내 칼슘농도에 대한 영향을 조사하였으며, antigen에 의한 세포내 칼슘농도의 증가에 대해서  $\alpha$ -cubebenoate에 의한 억제효과를 관찰할 수 있었다. 하지만 칼슘농도의 증가를 억제하는 농도는 탈과립반응을 억제하는 농도보다 상당히 높은 농도였다.

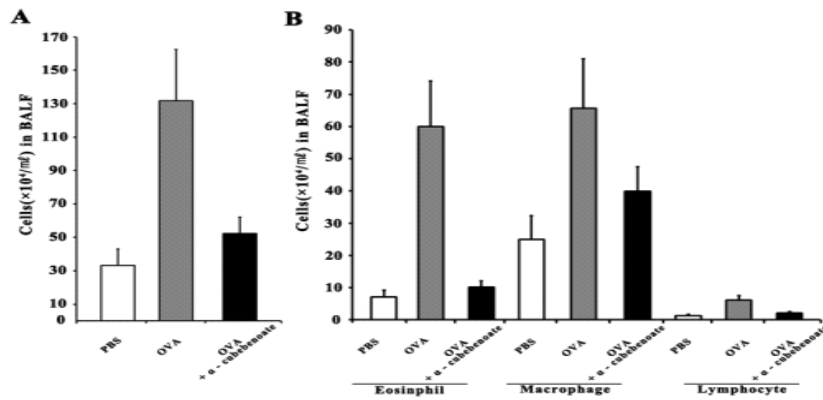
RBL-2H3 비만세포에서  $\alpha$ -cubebenoate에 의한 세포내 칼슘농도 억제효과



(8)  $\alpha$ -cubebenoate의 ovalbumin 유도 천식모델에서 BALF에 백혈구 축적억제와 항천식효과의 발견

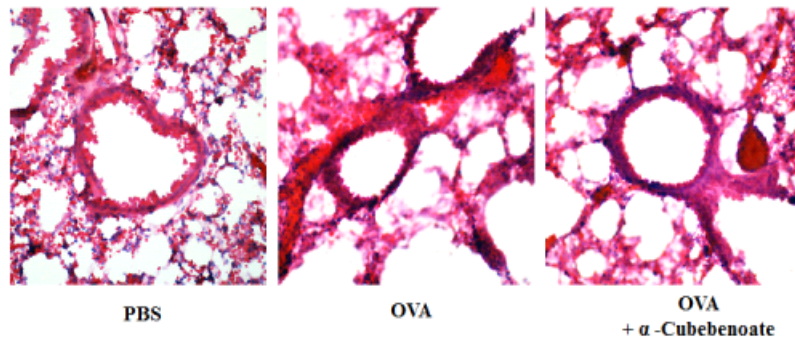
Balb/c 마우스를 이용하여 ovalalbumin을 투여하여 만든 천식 실험동물 모델에서  $\alpha$ -cubebenoate의 투여에 의한 BALF(bronchioalveolar lavage fluid)에 축적되는 호중구, 대식세포, 백혈구의 숫자가 유의성 있게 억제되는 것을 관찰하였다 (하기 그림).

마우스 천식 모델에서  $\alpha$ -Cubebenoate에 의한 BALF 세포축적 억제효과



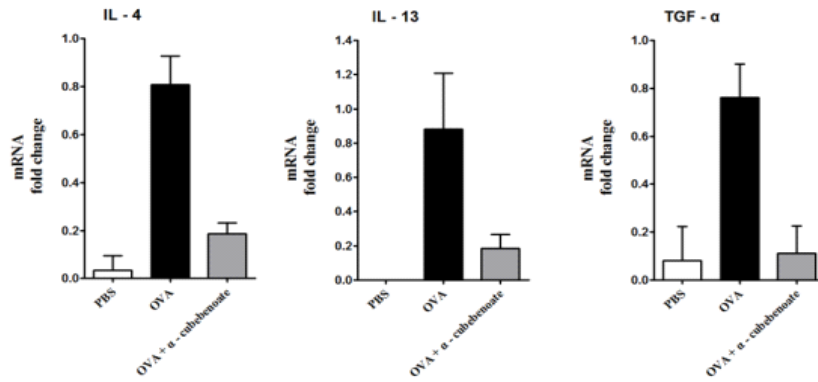
천식 질환 모델에서 ovalbumin의 처리에 의해 폐 기관지에 염증반응에 의한 조직학적 변화를 관찰할 수 있었으며, 이러한 조직학적 변화에 대해서  $\alpha$ -cubebenoate의 처리는 억제효과를 보이는 것을 관찰하였다 (하기 그림).

마우스 천식 모델에서  $\alpha$ -Cubebenoate에 의한 폐조직 손상 억제효과



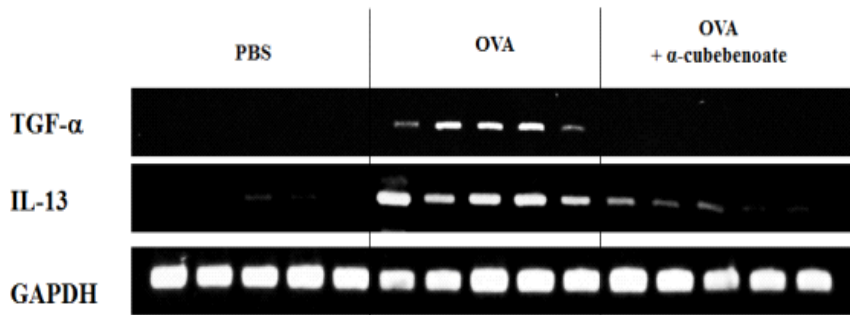
Ovalbumin 유도 천식모델은 Th2 반응으로 IL-4와 IL-13이 주로 관여하는 것으로 알려져 있다. 이에 IL-4, IL-13에 덧붙여 TNF- $\alpha$ 의 양의 발현양을 폐조직에서 측정하였으며, 하기 그림에서 보여지는 바와 같이 IL-4, IL-13, TNF- $\alpha$ 의 양은 ovalbumin에 의해 증가되었으나,  $\alpha$ -cubebenoate의 투여는 IL-4, IL-13, TNF- $\alpha$ 의 발현량을 감소시켰다.

$\alpha$ -Cubebenoate에 의한 마우스 천식 모델에서 폐 염증유전자 발현 억제효과



Ovalbumin 유도 천식모델에서 폐조직에서의 IL-4, IL-13, TNF- $\alpha$ 의 발현량에 대한 억제효과를 더욱 확실하게 하기 위해서 BALF에서의 mRNA 발현을 RT-PCR방법을 통해 확인하였으며, 하기 그림에서 보여지는 바와 같이 TNF- $\alpha$ , IL-13의 BALF에서의 발현량이  $\alpha$ -cubebenoate의 투여 마우스에서는 현저히 억제되어 있는 것을 관찰하였다.

마우스 천식 모델에서  $\alpha$ -Cubebenoate에 의한 BALF 유전자 발현 억제효과



### 제 3 절 제3세부: 기능성 식품 개발

#### 1. Petasin의 추출공정 개발

머위의 천식효능성분인 petasin은 그림(Fig.1)과 같이 4종류가 자연에 존재하며 이들 중 표준품으로 확보 가능한 s-petasin을 지표물질로 하여 추출공정을 연구하였다. 추출공정으로서 가장 먼저 고려할 수 있는 물추출법은, 본 연구진이 과거의 연구경험 및 관련 문헌에 의하면 고온고압추출법이 목적물의 추출수율이 가장 높은 것으로 밝혀졌다. 그러나 이 방법은 목적물질의 내열성이 없거나 용해도가 극히 낮을 경우 n-hexane 등의 유기용매에 의한 추출법에 비해 추출수율이 상당히 떨어지는 것으로 밝혀졌다. 본 연구에서도 예비실험에서 물추출법은 에탄올추출법에 비해 추출수율이 낮은 것으로 나타나서 추출공정 개발에서는 에탄올추출 위주로 검토하였다. 그러나 추출액을 원료로 그대로 사용하여야 하는 액상음료제품의 경우에는 에탄올함유가 불가하므로, 산업체에서 일반적으로 활용하고 있는 고온고압 물추출법을 적용함이 타당한 것으로 검토되었다.

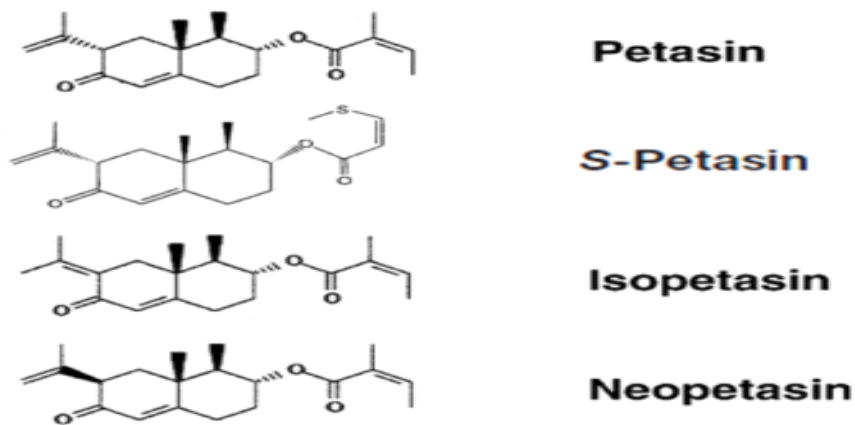


Fig 1. Chemical structure of petasin, S-petasin, isopetasin, neopetasin.

#### 가. 재료 및 방법

##### (1) 실험 재료

##### (가) 머위

본 실험에 사용된 머위는 2012년 경남 산청지역에 자생하는 머위를 채취하여 잎과 줄기로 분리하여 7~10일간 자연 건조하여 mixer(BL5013, Tefal, Brazil)로 분쇄하여 분말화한 것을 표준망체 (40 mesh)를 이용하여 통과한 분말을 얻어 냉장보관을 하면서 시료로 사용하였다.

##### (나) 시약

추출시 사용된 retanol A (Duksan, Korea)와 증류수를 사용하였고, 이동상에 사용한 acetonitrile, methanol (Fisher, Korea)HPLC grade와 증류수를 사용하였으며, 시료 재부유에 사용한 tetrahydrofuran (Merck, Germany)HPLC grade를 사용하였으며, 표준물질은 s-petasin (Sigma aldrich, USA)를 사용하였다. 실험에 사용된 모든 sample들은 HPLC에 주입하기 전에 filter (Dismic-13JP, 0.50 µm PTFE, ADVANTEC, Japan)를 이용하여 여과하였다.

### (다) 실험기기

본 실험에서 추출시 사용한 shaker (VS-202D, Sangwoo, Korea)를 사용하였으며, 농축 건조시 사용한 rotary vacuum evaporator (N-N, Eyela, Japan)를 사용하였고, 분석용 HPLC (Younglin, Korea)는 solvent delivery pump는 SP930D, absorbance detector는 UV730D, program은 autochro 2000(ver. 1.0, Younglin)이 사용되었으며, column은 Phenomenex (USA) 제품으로 type은 (Nucleosil 10 silica 100A), C18 (250 × 4.6 mm 10micron) column을 사용하였다. Standard 및 sample 주입량은 5 µl, 유속은 1 ml/min, 검출기 파장은 230 nm, 이동상은 methanol : acetonitrile : D.W (32 : 31 : 37, v/v)로 하여 등용리로 분석하였다.

## (2) 실험방법

### (가) 표준용액의 제조

실험에 사용된 standard용액은 표준품인 s-petasin (Sigma aldrich, USA) 1 mg을 1 ml의 THF에 녹인 후 1000 ppm으로 제조하였다. 그 후 1000 ppm을 희석하여 250, 500, 750 ppm별로 standard를 제조하여 HPLC로 분석한 후 standard curve를 작성하고 이를 토대로 sample을 분석하였다. Standard curve에서는 3반복 분석을 하였고 데이터의 평균을 Excel 2007 (Microsoft office, USA)을 사용하여 분산형 그래프로 나타내고 추세선과 수식을 표시하였다.

### (나) Petasin의 추출

각 공정의 방법에 따른 에탄올 추출 시험은 Fig. 2에 나타낸 바와 같다. 머위 잎을 건조시켜 분쇄한 후 40 mesh에 통과시킨 분말 2.5 g에 에탄올 50 ml를 가하여 추출조건으로 추출하여, 여과지 (Whatman No. 2)로 여과 후 잔사를 3회 반복하여 추출하였다. 추출한 추출물을 여과지 (Whatman GF/F)로 감압 여과한 후 농축플라스크의 무게를 측정한 다음 rotary vacuum evaporator로 증발 농축하여 건조 시키고 무게를 측정하여 추출물의 추출수율로 하고, 건조시킨 추출물을 THF (Tetrahydrofuran) 5 ml로 재부유한 후 syringe filter (Dismic-13JP, 0.50 µm PTFE, ADVANTEC, Japan)로 여과하여 vial에 담아 보관하여 petasin 분석시료로 사용하였다.

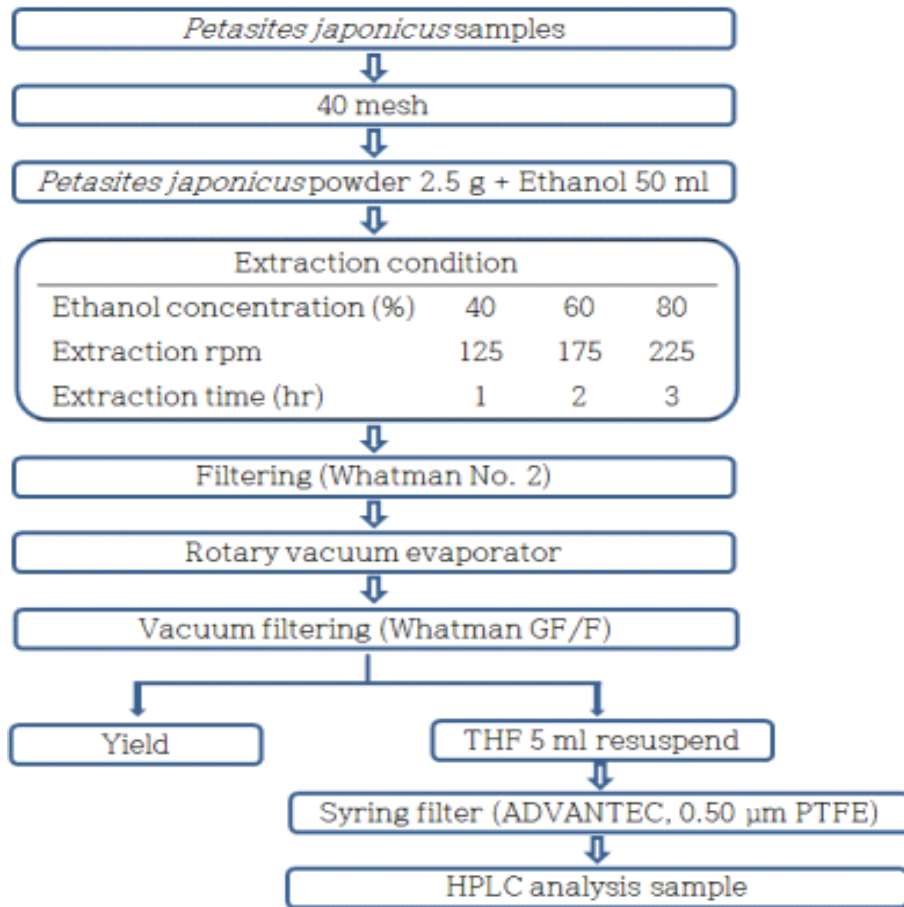


Fig 2. Flow chart of extraction process by ethanol from *Petasites japonicus*

Table 1. Petasin HPLC analytical conditions

| Items          | Conditions   |     |
|----------------|--|-----|
| Mobile solvent | methanol   | 32% |
|                | acetonitrile   | 31% |
|                | D.W  | 37% |
| Flow           | 1 ml/min   |     |
| Analysis time  | 40 min   |     |
| Detection      | 230 nm   |     |
| Column         | Phenomenex Nucleosil 10 silica 100A C <sub>18</sub> 250 × 4.6 mm<br>10micron |     |

#### (다) 추출조건 설정을 위한 실험계획

본 실험에서는 에탄올 추출을 이용한 머위의 효능성분인 petasin 추출조건 최적화를 위해 반응표면분석법(response surface methodology, RSM)을 실시하였다. 그 결과를 이용하여 3-level-3-factor 실험계획인 box-behnken design을 이용하여 추출공정의 최적화를 실시하였

다. 추출공정에 중요한 독립변수 ( $X_i$ )로 고려되는 인자 즉, 에탄올 농도 (Ethanol concentration (%):  $X_1$ ), 추출 Rpm (Extraction Rpm:  $X_2$ )과 추출시간 (Extraction time (hr):  $X_3$ )를 요인 변수로 하여 3단계 (-1, 0, 1)로 부호화 하였으며 (Table 2), box-behnken design에 따라 15구로 설정하여 추출실험을 하였다(Table 3). 또한 이들의 독립변수에 영향을 받는 종속변수는 추출수율 (yield:  $Y_1$ ) 과 petasin함량 ( $Y_2$ )으로 하여 3회 반복으로 측정하여 각각의 회귀분석을 실시하였다. 회귀분석에 의한 최적 조건의 예측은 SAS (statistical analysis system, Version 9.1) program을 이용하였으며 (SAS Institute, Cary, NC, U.S.A) 회귀분석 결과 임계점이 최대점이거나 최소점이 아니고 안장점일 경우에는 능선분석을 하여 최적점을 구하였다.

$$Y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{11}x_1^2 + b_{21}x_2x_1 + b_{22}x_2^2 + b_{31}x_3x_1 + b_{32}x_3x_2 + b_{33}x_3^2$$

추출특성의 모니터링과 최적조건범위 예측은 각 종속변수의 contour map을 이용하여 분석하였다.

**Table 2. Uncoded and coded independent variables used in RSM design of Ethanol-assisted extraction of *Petasites japonicus***

| $X_i$ | Independent variables     | Coded level |     |     |
|-------|---------------------------|-------------|-----|-----|
|       |                           | -1          | 0   | 1   |
| $X_1$ | Ethanol concentration (%) | 40          | 60  | 80  |
| $X_2$ | Extraction Rpm            | 125         | 175 | 225 |
| $X_3$ | Extraction time (hr)      | 1           | 2   | 3   |



Table 3. The box-behnken design by RSM for optimization extraction condition of *Petasites japonicus*

| Treatment No. | Ethanol concentration (%) | Extraction Rpm | Extraction time (hr) |
|---------------|---------------------------|----------------|----------------------|
| 1             | 40                        | 125            | 2                    |
| 2             | 40                        | 225            | 2                    |
| 3             | 80                        | 125            | 2                    |
| 4             | 80                        | 225            | 2                    |
| 5             | 60                        | 125            | 1                    |
| 6             | 60                        | 125            | 3                    |
| 7             | 60                        | 225            | 1                    |
| 8             | 60                        | 225            | 3                    |
| 9             | 40                        | 175            | 1                    |
| 10            | 80                        | 175            | 1                    |
| 11            | 40                        | 175            | 3                    |
| 12            | 80                        | 175            | 3                    |
| 13            | 60                        | 175            | 2                    |
| 14            | 60                        | 175            | 2                    |
| 15            | 60                        | 175            | 2                    |

<sup>1)</sup>The number of experimental conditions by box-behnken design

### (3) 결과 및 고찰

#### (가) 모델 구축 및 통계분석

에탄올 추출을 이용해 머위의 유용성분 추출조건을 최적화를 위해 box-behnken design을 실시하였으며, 본 실험에서 공정변수로 에탄올 농도와 추출 rpm, 추출시간으로 두고, 이에 따른 머위 추출물의 수율과 petasin함량의 값을 Table 4에 나타내었다. Table 4의 결과를 바탕으로 SAS program을 사용하여 분석한 결과는 Table 5-6에 나타내었으며, 또한 추출 수율, petasin 함량과 같은 품질 특성에 추출조건이 미치는 영향을 보기위해 Figs. 4-5에 반응표면 곡선으로 나타내었다.

Table 4. Experimental point of the box-behnken design and the experimental data of *Petasites japonicus*

| Treatment No. | Ethanol concentration (%) | Extraction Rpm | Extraction time (hr) | Yield (%) | Petasin content (ug/g) |
|---------------|---------------------------|----------------|----------------------|-----------|------------------------|
| 1             | 40                        | 125            | 2                    | 34.38     | 50.7357                |
| 2             | 40                        | 225            | 2                    | 33.56     | 108.6051               |
| 3             | 80                        | 125            | 2                    | 34.58     | 531.3584               |
| 4             | 80                        | 225            | 2                    | 39.76     | 678.1991               |
| 5             | 60                        | 125            | 1                    | 34.36     | 392.3998               |
| 6             | 60                        | 125            | 3                    | 37.56     | 465.6967               |
| 7             | 60                        | 225            | 1                    | 38.96     | 280.0364               |
| 8             | 60                        | 225            | 3                    | 39.55     | 361.5585               |
| 9             | 40                        | 175            | 1                    | 35.57     | 140.4525               |
| 10            | 80                        | 175            | 1                    | 32.97     | 683.9102               |
| 11            | 40                        | 175            | 3                    | 34.18     | 143.6024               |
| 12            | 80                        | 175            | 3                    | 34.96     | 668.6243               |
| 13            | 60                        | 175            | 2                    | 36.93     | 529.3841               |
| 14            | 60                        | 175            | 2                    | 36.39     | 374.8585               |
| 15            | 60                        | 175            | 2                    | 37.61     | 326.5760               |

Table 5. Polynomial equation calculated by RSM program for extraction of *Petasites japonicus*

| Responses                         | The second order polynomial <sup>1)</sup>   | R <sup>2</sup> | significance |
|-----------------------------------|---|----------------|--------------|
| Yield (Y <sub>1</sub> )           | Y <sub>1</sub> =34.855062+0.371019X <sub>1</sub> -0.161524X <sub>2</sub> +1.319942X <sub>3</sub> -0.005744X <sub>1</sub> <sup>2</sup> +0.001498X <sub>2</sub> X <sub>1</sub> +0.000357X <sub>2</sub> <sup>2</sup> +0.042320X <sub>3</sub> X <sub>1</sub> -0.013010X <sub>3</sub> X <sub>2</sub> -0.258267X <sub>3</sub> <sup>3</sup>      | 0.8382         | 0.1284       |
| Petasin content (Y <sub>2</sub> ) | Y <sub>2</sub> =-909.942697+14.883824X <sub>1</sub> +5.712796X <sub>2</sub> -38.680369X <sub>3</sub> -0.042280X <sub>1</sub> <sup>2</sup> +0.022243X <sub>2</sub> X <sub>1</sub> -0.020455X <sub>2</sub> <sup>2</sup> -0.230448X <sub>3</sub> X <sub>1</sub> +0.041126X <sub>3</sub> X <sub>2</sub> +15.786382X <sub>3</sub> <sup>3</sup> | 0.9231         | 0.0251*      |

<sup>1)</sup>X<sub>1</sub> : Ethanol concentration, X<sub>2</sub> : Extraction rpm, X<sub>3</sub> : Extraction time

\*Significance at p<0.05

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{11}X_1^2 + b_{21}X_2X_1 + b_{22}X_2^2 + b_{31}X_3X_1 + b_{32}X_3X_2 + b_{33}X_3^2$$

Table 6. Predicted values of optimum condition for the maximized and minimized responses to variables by the ridge analysis by their response surface

| Responses              | Extraction condition <sup>1)</sup> |                |                |                     | Morphology   |
|------------------------|------------------------------------|----------------|----------------|---------------------|--------------|
|                        | X <sub>1</sub>                     | X <sub>2</sub> | X <sub>3</sub> | Estimated Responses |              |
| Yield (%)              | 40.0487                            | 176.2092       | 2.0654         | 34.0932(min)        | saddle point |
|                        | 65.0267                            | 223.3688       | 2.0318         | 39.5008(max)        |              |
| Petasin content (µg/g) | 40.1837                            | 180.8604       | 1.9325         | 126.3521(min)       | saddle point |
|                        | 79.9173                            | 178.1022       | 2.0663         | 659.2855(max)       |              |

<sup>1)</sup>X<sub>1</sub> : Ethanol concentration, X<sub>2</sub> : Extraction rpm, X<sub>3</sub> : Extraction time

(나) RSM을 이용한 petasin 추출의 최적화

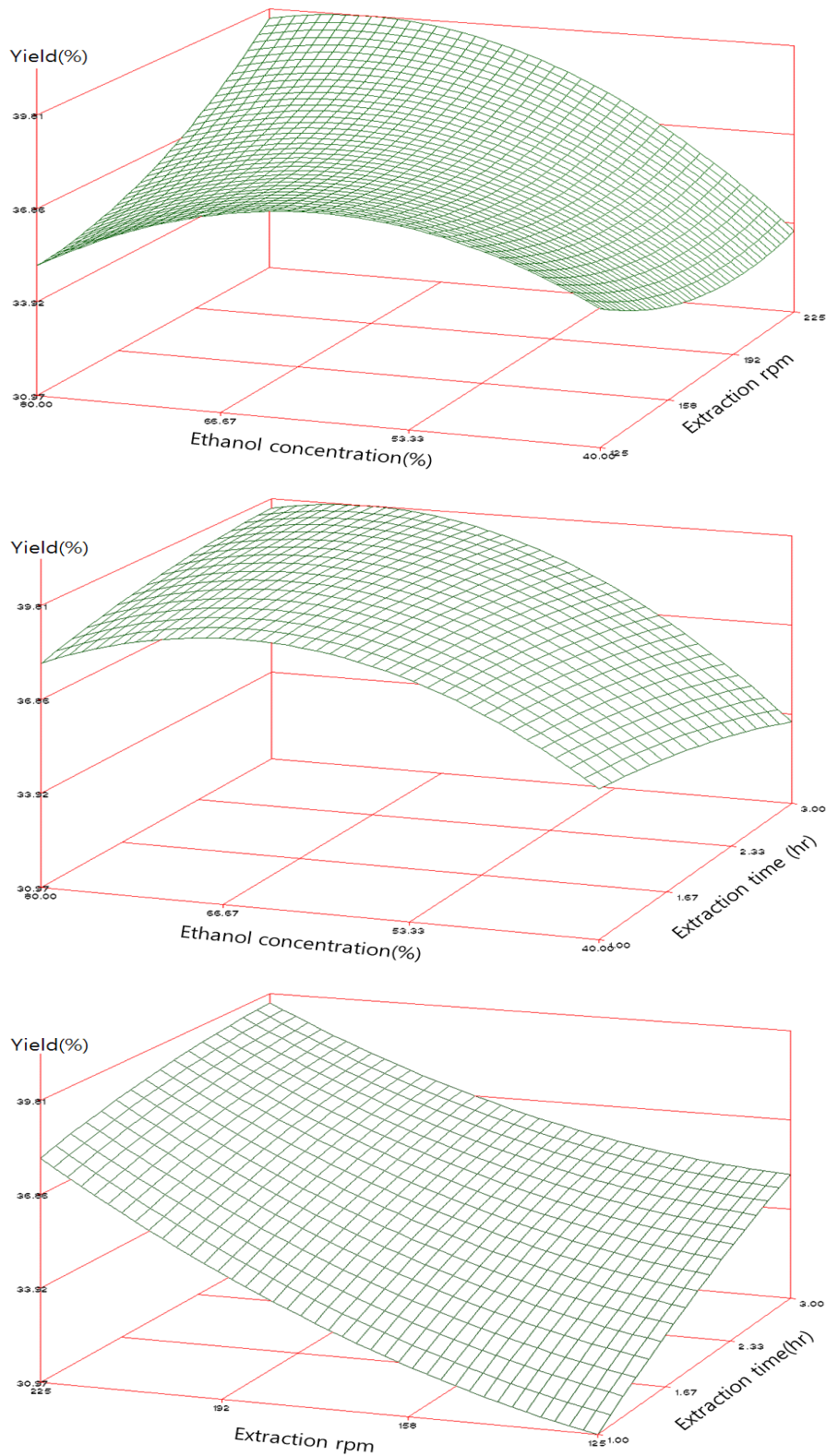


Fig 3. Contour maps for the effects of extraction conditions on Yield (%).

각 추출 조건에 따른 머위 잎의 수율을 측정된 결과에 대한 반응표면 회귀식은 Table 5에 나타내었으며 반응표면 결과는 Fig. 3에 나타내었다. 반응표면 그래프에 따르면 시료에 대한 rpm

이 수율에 가장 큰 영향을 미치는 것으로 나타났으며, 용매농도와 추출시간은 큰 영향이 없는 것으로 나타났다. 추출수율에 대한 R2값은 0.8382로 높은 상관관계를 보였으나 유의성은 없는 것으로 나타났으며, 예측된 정상점은 안장점(saddle point)으로 시료에 대한 용매농도 65.02%, 추출 rpm 223.3708, 추출시간 2.0325 hr에서 최대값 39.50%로 나타났다 (Table 6).

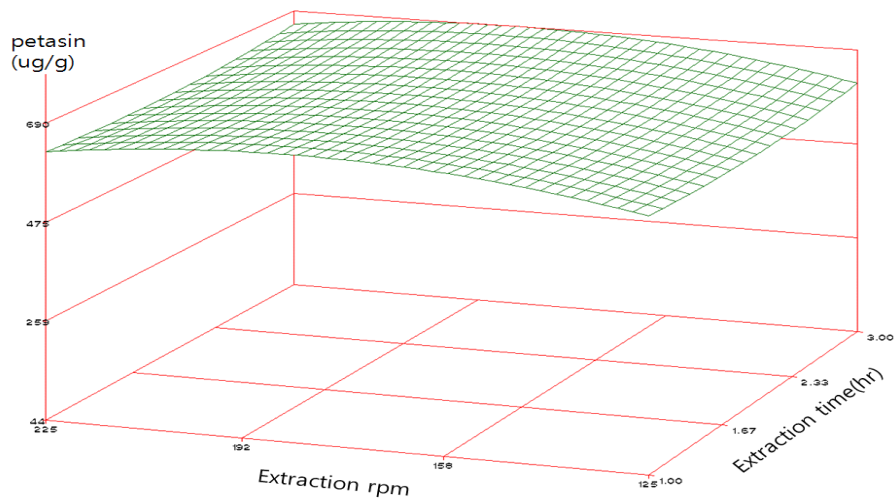
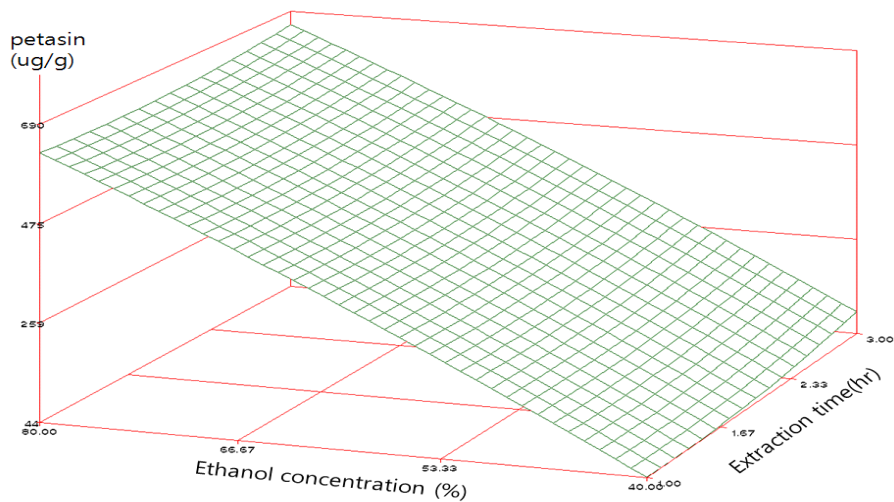
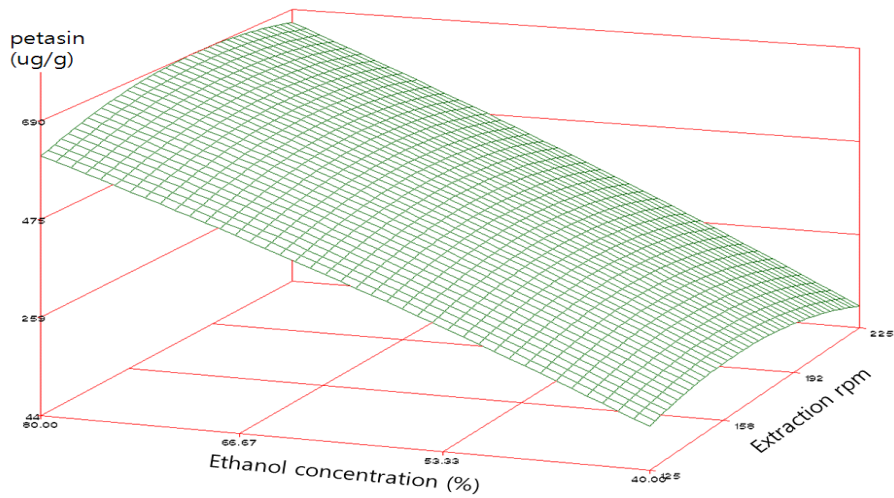


Fig 4. Response surface for the effects of extraction condition on petasin ( $\mu\text{g/g}$ ).

추출 조건에 따른 추출물의 petasin 함량을 분석한 결과에 대한 회귀식의 R2값은 0.9231로 높은 상관관계를 보였고 5% 이내에서 유의성이 인정되었다. Fig. 4에 나타낸 반응표면 그래프를 보면 시료에 대한 용매의 비가 petasin 함량에 가장 영향을 많이 주는 것으로 나타났다. 반응

표면분석에 따라 예측된 정상점은 안장점(saddle point)이며 최대값은 659.2854  $\mu\text{g/g}$ 으로 예측되었다. 이때 추출조건은 시료에 대한 용매농도 79.92%, 추출 rpm 178.1022, 추출시간 2.0663 hr이었다(Table 6).

## 2. 유독성 pyrrolizidine 저감공정 개발

머위의 유독성 물질인 pyrrolizidine alkaloid류의 무독화 내지 저감화 기술을 개발하기 위하여, pyrrolizidine alkaloid류 중 대표적 물질이며 표준품을 확보할 수 있는 senecionine을 지표 물질로 하여, 제1안으로 senecionine을 무독성인 N-oxide form으로 전환시키기 위한 방안으로 과산화수소 처리법, 제2안으로 senecionine의 ester구조를 분해하기 위한 알칼리 처리법, 제3안으로 에탄올로 추출제거하는 방안, 그리고 제4안으로 열풍건조에 의한 방안 등을 검토한 결과, 다음과 같이 과산화수소처리와 가열건조에 의한 방법이 효과적인 것으로 나타났다.

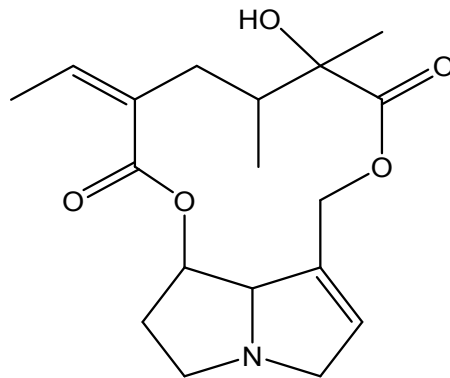


Fig 5. Senecionine

### 가. 재료 및 방법

#### (1) 과산화수소에 의한 산화

##### (가) 실험 목적

독성을 나타내는 senecionine이 hydrogen peroxide와 반응하였을 때, 무독성의 senecionine N-oxide form으로 산화됨을 확인하고자 시도함.

##### (나) 실험 방법

머위 잎 각 5 g을 두 플라스크[A, B]에 담아 hexane 100 mL를 각각 A와 B에 넣고 교반기 30분, 초음파 20분간 추출하여 여과하고 잔사에 혼합용액 (Hexane 100mL+Methanol 20mL)을 넣고 교반기[30분]와 초음파기계[20분]로 2차 추출 후 여과하고, 이의 잔사에 혼합용액 Hexane 100 mL+Methanol 40 mL를 넣고 교반기[30분]와 초음파기계[20분]로 3차 추출 후 여과하여 나온 용액을 모두 합하여 얻은 A 와 B용액을 각각 감압농축기[32 $^{\circ}\text{C}$ ]로 농축하였다. 각 농축플라스크 내 잔사를 50% 메탄올 150 mL로 처리 후 pH를 3~4로 맞춘 후 A용액에는 hydrogen peroxide 2 ml를 첨가하고 B용액을 대조구로 하여 50 $^{\circ}\text{C}$  항온수조에서 100분간 반응시킨 후 12 시간 동안 방치하였다. A와 B를 분별깔대기에서 chloroform 100ml로 추출하고 1시간 정지한 후 분액하여 1차 chloroform을 수거한 후 물층을 암모니아로 pH를 8~9로 맞추고, 이에 2~4차 chloroform[100mL]로 추출하여 합한 추출액을 감압농축[35 $^{\circ}\text{C}$ ]시킨 후 농축잔사를 methanol로

일정량으로 하여 HPLC 시험용액으로 하였으며, 분석조건은 Table 7과 같다.

**Table 7. HPLC operation condition for analysis of Pyrrolizidine alkaloids from *Petasites japonicus***

| Items        | Conditions  |
|--------------|---|
| Column       | C18(4.6×150mm, Agilent)   |
| Mobile phase | A : lauryl sulfate(1→128) + H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (1)<br>B : acetonitrile<br>A:B = 50:50 |
| Split ratio  | 1ml/min   |
| UV detector  | 218nm   |

## (2) 알칼리 처리에 의한 senicionine 분해

### (가) 실험 목적

유독성 senicionine의 무독화 및 저감화를 목적으로 senicionine의 ester를 sodium hydroxide와 반응시켜 분해하고자 시도함.

### (나) 실험 방법

머위 잎 5g을 2개의 플라스크에 각각 담고 2N NaOH 100 ml을 가한 후, 80℃ 수욕상에서 30분간 반응시킨 후 여과한 잔사에 D.W 100 ml을 가하여 15분 교반하여 걸러냄(세척과정) 여과 후 잔사에 메탄올 100 ml을 가하여 교반 40분 초음파 20분 추출(3회반복) 세 번의 추출로 얻은 용액을 진공 농축기로 농축하였다.

플라스크 내 잔사를 메탄올 100 mL로 처리 후 pH를 3~4로 맞추고 Zn dust를 한 스푼씩 각각 넣고 충분히 혼든 후 상온에서 2시간 반응 후 여과한 여액을 분별여두에 넣고 chloroform 100 ml로 추출하고 1시간 동안 정치한 다음 1차 chloroform을 따로 받은 후 남은 물층에 암모니아로 pH를 8~9로 맞추고 2~4차 chloroform 100 mL 씩으로 반복 추출하여 모아진 chloroform층을 감압농축기에서 증발농축하고 플라스크내 잔사에 메탄올 15 ml로 채부유시키고 여과한 용액을 HPLC로 분석하였다.

## (3) 가열에 의한 저감화

### (가) 실험 목적

머위의 가열건조에 의한 senicionine 저감화

### (나) 실험 방법

머위를 전기건조기 내에서 40℃ 및 60℃에서 각각 1주-4주간 건조한 후 senicionine의 함량변화를 측정하였다.

## 나. 결과 및 고찰



### (1) 과산화수소에 의한 산화

분석결과, 대조구에서는 RT 7.1167분에 senecionine이 검출되었으나, 과산화수소 처리구에서는 senecionine이 검출되지 않았다. 또한 senecionine N-oxide form으로 추정할 만한 피크도 검출되지 않았는데 이는 산화형의 경우 극성이 높아서 시료의 용매인 메탄올과 함께 유출된 것으로 추정되었다.

과산화수소에 의한 senecionine의 산화형으로의 전환에 의한 제거방법은 개발하였으나, 머위의 기능성물질인 petasin에 대한 영향도 검토하고자, 별도로 s-petasin표준품에 과산화수소를 처리하고 HPLC로 분석하여 대조구와 비교한 결과, 과산화수소에 의한 감소는 거의 없는 것으로 확인되었다.

### (2) 알칼리 처리에 의한 senecionine분해

senecionine의 검출량이 대조구와 동일하여 알칼리처리에 의한 분해가 일어나지 않은 것으로 판단되었다.

### (3) 가열에 의한 저감화

표와 같이 건조과정 중에 senecionine의 함량은 점진적으로 감소되었으며, 60℃ 4주간 보관시에는 소멸되어 검출되지 않았다.(Table 8)

이 방법은 연구과정 중 머위를 냉장상태에 보관하더라도 senecionine의 함량이 점차적으로 감소함에 착안하였으며, 실질적으로 가장 안전하며 실용적 방안으로 평가되었다.

다만, 액상음료 제품의 경우에는 건조과정이 필요치 않아, 가열방법 이외에 냉장보관 상태에서의 senecionine의 함량 감소 여부를 검토할 필요가 있는 것으로 판단되었다.

Table 8. 가열건조에 의한 머위의 senecionine함량 변화

|     | Raw | 1 Week | 2 Weeks | 3 Weeks | 4 Weeks |
|-----|-----|--------|---------|---------|---------|
| 40℃ |     | 9.72   | 7.52    | 1.05    | 1.45    |
| 60℃ |     | 8.49   | 14.94   | 6.27    | ND      |

## 3. Bakkenolide추출공정 최적화

### 가. 재료 및 방법

#### (1) Bakkenolide 추출 및 항천식효능 최적화를 위한 실험계획

1차년도에서는 머위의 항천식 기능성 물질로 이미 알려져 있는 petasin을 위주로 추출공정을 연구하였으며, 2차년도인 본 실험에서는 제1 및 제2 세부과제에서 머위의 항천식 기능성 물질로 새로이 발견한 Bakkenolide의 추출공정의 최적화를 연구하게 되었다.

이 연구에서는, 머위 음료제품의 개발을 전제로 실제 산업현장에서 가장 보편화된 가압열처리추출법을 이용한 머위의 Bakkenolide 등 기능성 물질 추출조건 최적화를 위해 3-level-3-factor 실험계획인 box-behnken design과 반응표면분석법을 이용하였다. 추출공정에 중요한 독립변수(Xn)로 고려되는 인자 즉, 추출온도 (℃) : X1), 추출시간 (min. : X2)과 pH (X3)를 요인변수로 하여 3단계 (-1, 0, 1)로 부호화 하였으며(Table 1), box-behnken design에

따라 15구로 설정하여 추출실험을 하였다.(Table 9-10) 또한 이들의 독립변수에 영향을 받는 종속변수는 Bakkenolide수율(Y1)과 천식완화성 (Y3)으로 하여 3회 반복으로 측정하여 각각의 회귀분석을 실시하였다. 회귀분석에 의한 최적 조건의 예측은 SAS (statistical analysis system, Version 9.1) program을 이용하였으며(SAS Institute, Cary, NC, U.S.A) 회귀분석 결과 임계점이 최대점이거나 최소점이 아니고 안장점일 경우에는 능선분석을 하여 최적점을 구하였다. 반응표면분석에서 독립변수의 종속변수에 대한 2차회귀식은 다음과 같다.

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{11}X_1^2 + b_{21}X_2X_1 + b_{22}X_2^2 + b_{31}X_3X_1 + b_{32}X_3X_2 + b_{33}X_3^2$$

여기서 Y는 종속변수, X1, X2, X3은 독립변수, b0는 절편, bn은 회귀계수이다. 추출특성의 모니터링과 최적조건범위 예측은 각 종속변수의 contour map을 이용하여 분석하였다.

**Table 9. Uncoded and coded independent variables used in RSM design of heating extraction of functional compound from *Petasites japonicus***

| X <sub>n</sub> | Independent variables  | Coded level |     |     |
|----------------|------------------------|-------------|-----|-----|
|                |                        | -1          | 0   | 1   |
| X <sub>1</sub> | Temperature (°C)       | 80          | 100 | 120 |
| X <sub>2</sub> | Extraction time (min.) | 30          | 45  | 60  |
| X <sub>3</sub> | Extraction pH          | 5.0         | 7.0 | 9.0 |

Table 10. The box-behnken design by RSM for optimization extraction condition of functional compound from *Petasites japonicus*

| Treatment No. | Temperature (°C) | Extraction Time (min.) | Extraction pH |
|---------------|------------------|------------------------|---------------|
| 1             | 80               | 30                     | 7.0           |
| 2             | 80               | 60                     | 7.0           |
| 3             | 120              | 30                     | 7.0           |
| 4             | 120              | 60                     | 7.0           |
| 5             | 100              | 30                     | 5.0           |
| 6             | 100              | 30                     | 9.0           |
| 7             | 100              | 60                     | 5.0           |
| 8             | 100              | 60                     | 9.0           |
| 9             | 80               | 45                     | 5.0           |
| 10            | 120              | 45                     | 5.0           |
| 11            | 80               | 45                     | 9.0           |
| 12            | 120              | 45                     | 9.0           |
| 13            | 100              | 45                     | 7.0           |
| 14            | 100              | 45                     | 7.0           |
| 15            | 100              | 45                     | 7.0           |

<sup>1)</sup>The number of experimental conditions by box-behnken design

## (2) 추출 공정

각 공정의 방법에 따른 추출 과정(Fig 6)은, 머위 잎 200g을 블렌드로 마쇄한 후 물 800 ml 을 가하고 30% 초산 및 10 N NaOH용액으로 pH를 조정한 후 용량을 1,000ml로 하여, 각 추출조건으로 추출한 후, 여과지(Whatman No. 2)로 1차 여과 후, 2차 여과지(Whatman GF/F)로 감압 여과한 후, 이를 시험액으로 하여 bakkenolide함량, brix당도 및 천식기능성을 측정하였다. 모든 과정은 3회 반복 실시하였다.

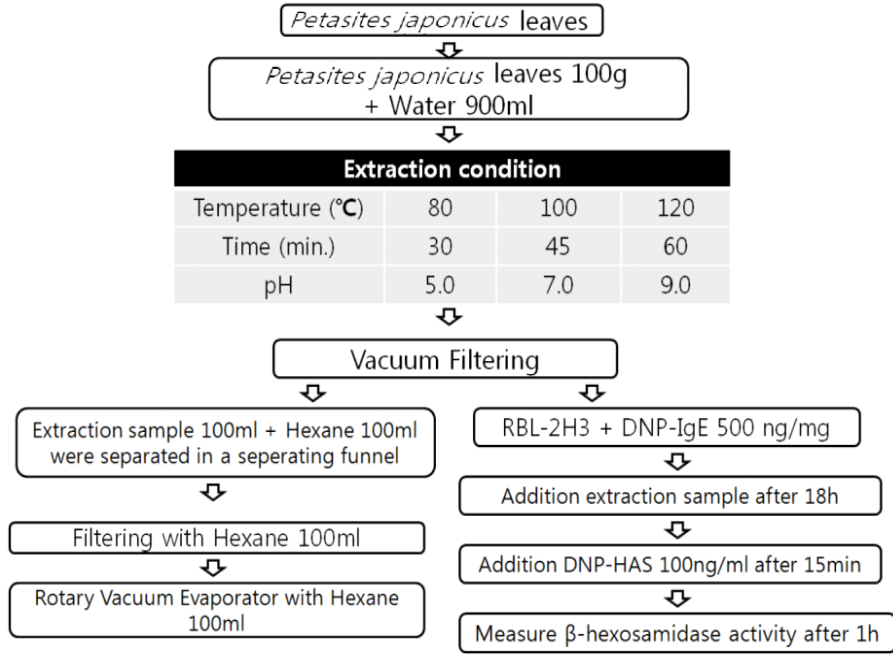


Fig 6. Flow chart of extraction process for Bakkenolide from *Petasites japonicus*.

### (3) Bakkenolide 함량 측정

각 공정으로 추출하고 여과한 시험액 100ml에 n-hexane(HPLC grade) 100ml를 가하여 분액 여두에서 추출한 후 hexane 층을 분리하고 감압농축 후 hexane로써 20ml로 정용한 후 HPLC를 통해 분석하였다(Table 11). column은 (4.6×250nm, 5μm, agilent)를 사용하였다.

Table 11. The operation condition of HPLC for determination of Bakkenolide-b content

| Item           | Condition               |     |
|----------------|-------------------------|-----|
| Mobile solvent | THF                     | 28% |
|                | Acetonitrile            | 12% |
|                | Water                   | 60% |
| Flow           | 1 ml/min                |     |
| Analysis time  | 50 min                  |     |
| Detection      | 215nm                   |     |
| Column         | 4.6×250nm, 5μm, agilent |     |

## 나. 결과 및 고찰

### (1) Bakkenolide 추출수율

가압열처리추출법을 이용한 머위의 Bakkenolide 등 기능성 물질 추출조건 최적화를 위해 3-level-3-factor 실험계획인 box-behnken design과 반응표면분석법을 이용하여 추출한 조추출물 수율과 Bakkenolide함량은 Table 12와 같이 측정되었다. bakkenolide함량과 항알레르기반

응도에 대한 반응 표면회귀식은 Table 13에 나타내었으며, 반응표면그래프는 Fig 7와 8에 각각 나타내었다.

Table 13에서와 같이 bakkenolide함량에 대한 상관계수  $R^2$ 은 0.8949로 비교적 높았으나 유의성은 낮았으며, 예측된 안장점의 정상은 추출온도 127.10°C, 추출시간 46.65분, pH는 7.76에서 최대값 16.10이었다.

**Table 12. Experimental data for response parameters of Bakkenolide-b content of *Petasites japonicus* extracts in relation to the extraction conditions**

| Treatment No. | Temperature (°C) | Extraction Time (min.) | Extraction pH | Yield (ppm) | Bakkenolid content (µg/g) |
|---------------|------------------|------------------------|---------------|-------------|---------------------------|
| 1             | 80               | 30                     | 7.0           | 36.80       | 46.1                      |
| 2             | 80               | 60                     | 7.0           | 93.58       | 117.1                     |
| 3             | 120              | 30                     | 7.0           | 67.55       | 84.6                      |
| 4             | 120              | 60                     | 7.0           | 71.61       | 89.6                      |
| 5             | 100              | 30                     | 5.0           | 76.21       | 95.4                      |
| 6             | 100              | 30                     | 9.0           | 48.44       | 60.6                      |
| 7             | 100              | 60                     | 5.0           | 68.96       | 86.3                      |
| 8             | 100              | 60                     | 9.0           | 96.34       | 120.6                     |
| 9             | 80               | 45                     | 5.0           | 52.71       | 66.0                      |
| 10            | 120              | 45                     | 5.0           | 87.28       | 109.2                     |
| 11            | 80               | 45                     | 9.0           | 60.48       | 75.7                      |
| 12            | 120              | 45                     | 9.0           | 82.68       | 103.5                     |
| 13            | 100              | 45                     | 7.0           | 68.65       | 85.9                      |
| 14            | 100              | 45                     | 7.0           | 75.55       | 94.6                      |
| 15            | 100              | 45                     | 7.0           | 65.17       | 81.6                      |

Table 13. Polynomial equation calculated by RSM for the extraction of Bakkenolide-b and its antiallergic effect from *Petasites japonicus*

| Responses                  | The second order polynomial   | R <sup>2</sup> | Significance |
|----------------------------|---|----------------|--------------|
| Bakkenolide-b <sub>2</sub> | $Y = -134.626250 + 3.954125X_1 + 2.163000X_2 - 23.451250X_3 - 0.005131X_1^2 - 0.043933X_2X_1 - 0.001567X_2^2 - 0.077312X_3X_1 + 0.459583X_3X_2 + 0.762500X_3^2$ | 0.8949         | 0.0509       |
| β-hexosaminidase           | $Y = -47.441563 + 0.7178960X_1 - 0.013917X_2 + 5.9427080X_3 - 0.003607X_1^2 - 0.001692X_2X_1 + 0.002809X_2^2 + 0.005188X_3X_1 - 0.012750X_3X_2 - 0.420729X_3^2$ | 0.5095         | 0.7769       |

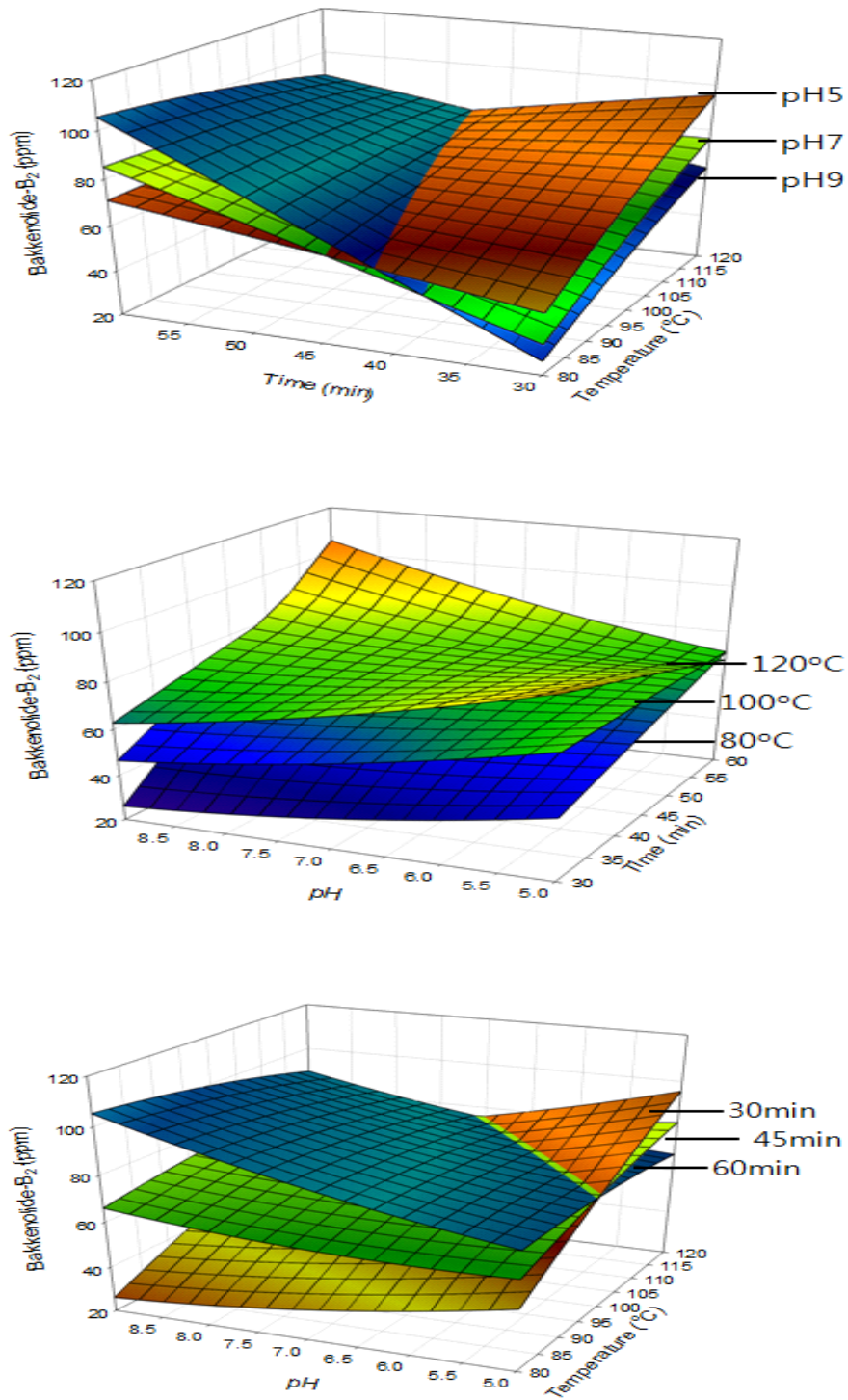


Fig 7. Response surfaces of Bakkenolide-b content of extracts as a function of extraction temperature, time and pH

(2) 항천식효능 검정(제2세부 협조사항)

$\beta$ -hexosaminidase측정을 통한 탈과립 반응을 이용하여 머위 추출물의 항천식(항알레르기) 효

능을 검정하였다. 즉, RBL-2H3라는 랫트 비만세포를 배양하여 DNP-IgE (500 ng/ml)를 18시간처리한 후, 머위추출물을 첨가하고 15분뒤 DNP-HSA 100 ng/ml를 첨가한 후 1시간 뒤에 세포외액과 세포내에 있는  $\beta$ -hexosaminidase활성을 측정하여 탈과립반응의 정도를 조사하였다.

$\beta$ -hexosaminidase의 탈과립반응억제효과를 측정한 결과에서 회귀곡선의 상관계수 0.5095, 유의성 0.7769로 모두 낮게 나타났으며, 예측되는 정상점은 안장점으로 추출온도 93.61℃, 추출시간 46.40분, pH 6.93에서 최대 억제치인 3.44로 나타났다.

Fig 7와 Fig 8에 나타난 바와 같이 bakkenolide와  $\beta$ -hexosaminidase의 탈과립반응억제효과이 최적조건에서 비록 추출시간과 pH는 유사하였으나, 추출온도에서는 bakkenolide가 약 120℃의 고온에서 최적이었으나  $\beta$ -hexosaminidase의 탈과립반응억제효과는 93℃의 낮은 온도에서 발현되어 그 차이가 컸으며, 이러한 결과는 머위의 항알레르기 효능을 발현하는 기능성물질이 bakkenolide만으로 나타나는 것이 아니고 아직 발견하지 못한 물질들이 추출물에 함유되어 있는 것으로 추정되었다.



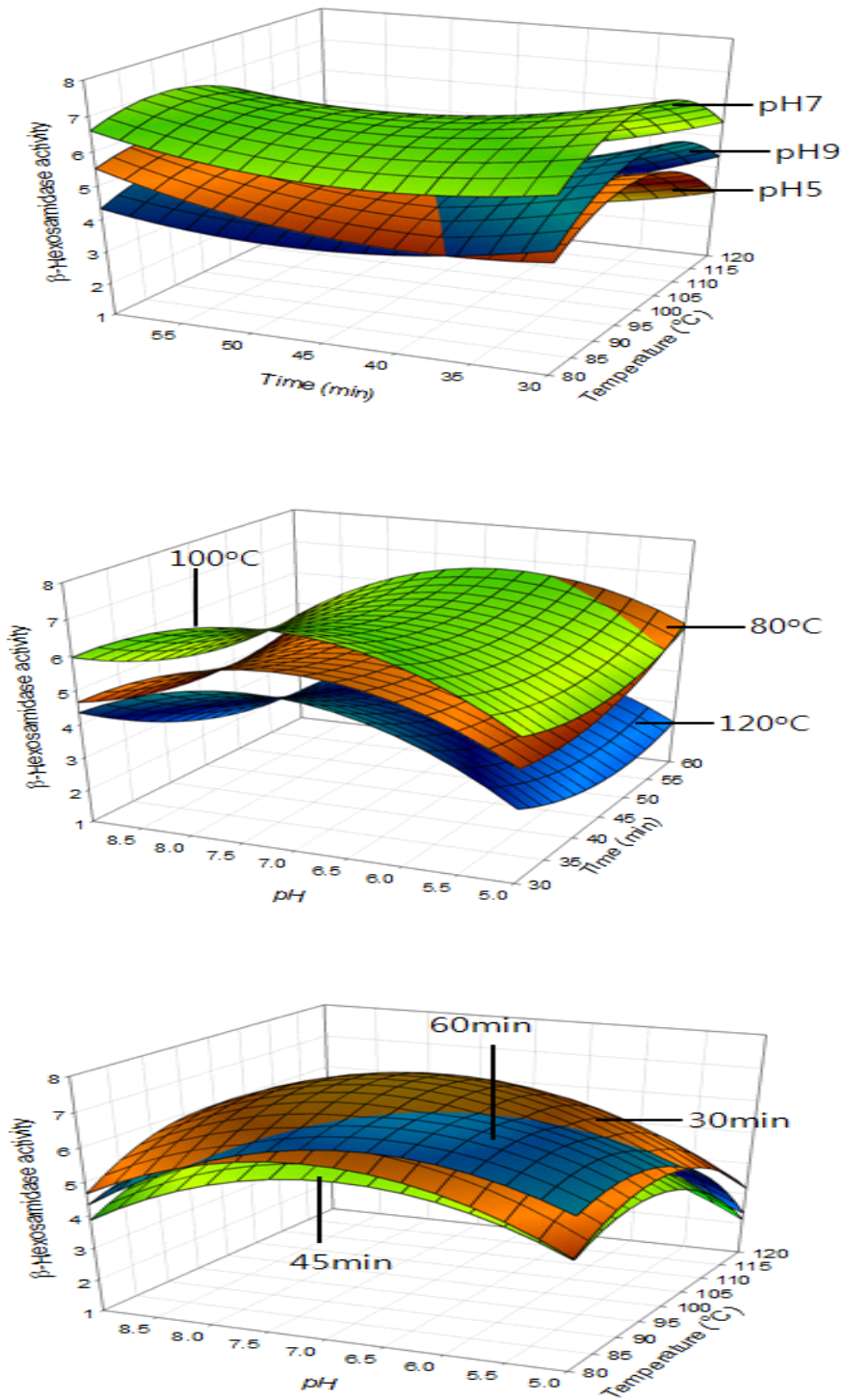


Fig 8. Response surfaces of  $\beta$ -Hexosamidase activity of extracts as a function of extraction temperature, time and pH

#### 4. 머위 음료제품의 원료배합비율의 최적화

머위 음료제품의 개발을 위하여, 머위의 추출공정의 최적화 연구 이외에, 머위와 부원료의 중

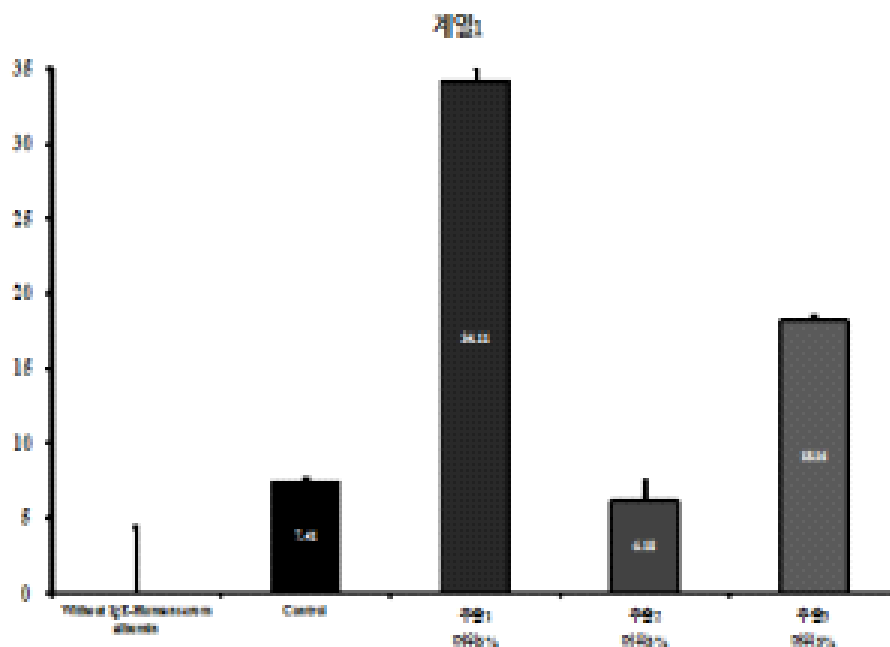
류 및 배합비율의 최적화를 도출하기위하여 1차적 예비실험으로 Table 14와 같이 머위 이외, 천식에 효능이 있는 것으로 전래되는 도라지와 수세미를 배합한 후 3. 머위의 Bakkenolide추출 공정 최적화 에서 도출된 추출공정(100℃, 45분, pH 7.0)에 따라서 추출한 시험액을 세부2과제에 의뢰하여 항천식효능검정을 하였다.

**Table 14. [ 예비실험 ]**

**머위 음료제품의 최적 배합비율 도출시험을 위한 예비배합비율표(%)**

| 원료  | 배합1 | 배합2 | 배합3 |
|-----|-----|-----|-----|
| 머위  | 5.0 | 5.0 | 5.0 |
| 도라지 | 2.5 | 1.0 | 4.0 |
| 수세미 | 2.5 | 4.0 | 1.0 |
| 증류수 | 90  | 90  | 90  |

예비실험으로서 Table 14과 같이 3종의 배합비로 추출한 시험액으로, RBL-2H3라는 랫트 비만세포를 배양하여 DNP-IgE (500 ng/ml)를 18시간처리한 후, 추출한 3종 시험액을 각각 첨가하고 15분 뒤 DNP-HSA 100 ng/ml를 첨가한후 1시간 뒤에 세포외액과 세포내에 있는  $\beta$ -hexosaminidase활성을 측정하여 탈과립반응의 정도를 3반복 측정하여 조사한 결과 Fig 9와 같은 결과를 얻었다. Fig 9의  $\beta$ -Hexoseamidase activity는 추출시험액 3종중 추출2에서 가장 억제효능이 높게 나타났으며, 추출2와 타2종의 차이는 도라지의 배합비율 감소만큼 수세미의 비율을 증대함에 있어, 항알레르기 효능은 도라지보다 수세미의 효능이 좋은 것으로 추정되었다.



**Fig 9. 머위 음료제품의 예비배합비율에 따른  $\beta$ -Hexoseamidase activity**

예비실험에서 도라지의 효능이 거의 없는 반면 수세미의 효능이 우수한 것으로 판단되어 머위 음료제품의 주원료 및 부원료의 배합비율 최적화 실험에서는 도라지보다 수세미의 비율을

증대시키는 방향으로 다음과 같이 수행하였다.

**가. 재료 및 방법**

머위와 부원료의 배합비율의 최적화를 위해 3-level-3-factor 실험계획인 box-behnken design과 반응표면분석법을 이용하였다. 배합원료의 중요한 독립변수(Xn)로 고려되는 인자 즉, 머위함량(% : X1), 수세미 함량(% : X2)과 도라지 함량(% : X3)를 요인변수로 하여 3단계 (-1, 0, 1)로 부호화 하였으며(Table 15), box-behnken design에 따라 15구로 배합하여 추출실험을 하였다(Table 16). 또한 이들의 독립변수에 영향을 받는 종속변수는 β-Hexoseamidase activity(항알레르기성) (Y3)으로 하여 3회 반복 측정하여 각각의 회귀분석을 실시하였다. 회귀분석에 의한 최적 조건의 예측은 SAS (statistical analysis system, Version 9.1) program을 이용하였으며(SAS Institute, Cary, NC, U.S.A) 회귀분석 결과 임계점이 최대점이거나 최소점이 아니고 안장점일 경우에는 능선분석을 하여 최적점을 구하였다. 반응표면분석에서 독립변수의 종속변수에 대한 2차회귀식은 다음과 같다.

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{33}X_3^2 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3$$

여기서 Y는 종속변수, X1, X2, X3은 독립변수, b0는 절편, bn은 회귀계수이다. 추출특성의 모니터링과 최적조건범위 예측은 각 종속변수의 contour map을 이용하여 분석하였다.

**Table 15. Uncoded and coded independent variables used in RSM design for optimization of ingredients of the functional juice containing *Petasites japonicus***

| X <sub>n</sub> | Independent variables | Coded level |     |     |
|----------------|-----------------------|-------------|-----|-----|
|                |                       | -1          | 0   | 1   |
| X <sub>1</sub> | 머위(%)                 | 3.0         | 5.0 | 7.0 |
| X <sub>2</sub> | 수세미(%)                | 2.0         | 4.0 | 6.0 |
| X <sub>3</sub> | 도라지(%)                | 0           | 1.0 | 2.0 |

Table 16. The box-behnken design by RSM for optimization extraction condition of functional compound from *Petasites japonicus*

| Treatment No. | 머위(%) | 수세미(%) | 도라지(%) |
|---------------|-------|--------|--------|
| 1             | 3.0   | 2.0    | 1.0    |
| 2             | 3.0   | 6.0    | 1.0    |
| 3             | 7.0   | 2.0    | 1.0    |
| 4             | 7.0   | 6.0    | 1.0    |
| 5             | 5.0   | 3.0    | 0.0    |
| 6             | 5.0   | 2.0    | 2.0    |
| 7             | 5.0   | 6.0    | 0.0    |
| 8             | 5.0   | 6.0    | 2.0    |
| 9             | 3.0   | 4.0    | 0.0    |
| 10            | 7.0   | 4.0    | 0.0    |
| 11            | 3.0   | 4.0    | 2.0    |
| 12            | 7.0   | 4.0    | 2.0    |
| 13            | 5.0   | 4.0    | 1.0    |
| 14            | 5.0   | 4.0    | 1.0    |
| 15            | 5.0   | 4.0    | 1.0    |

<sup>1)</sup>The number of experimental conditions by box-behnken design

#### 나. 결과 및 고찰

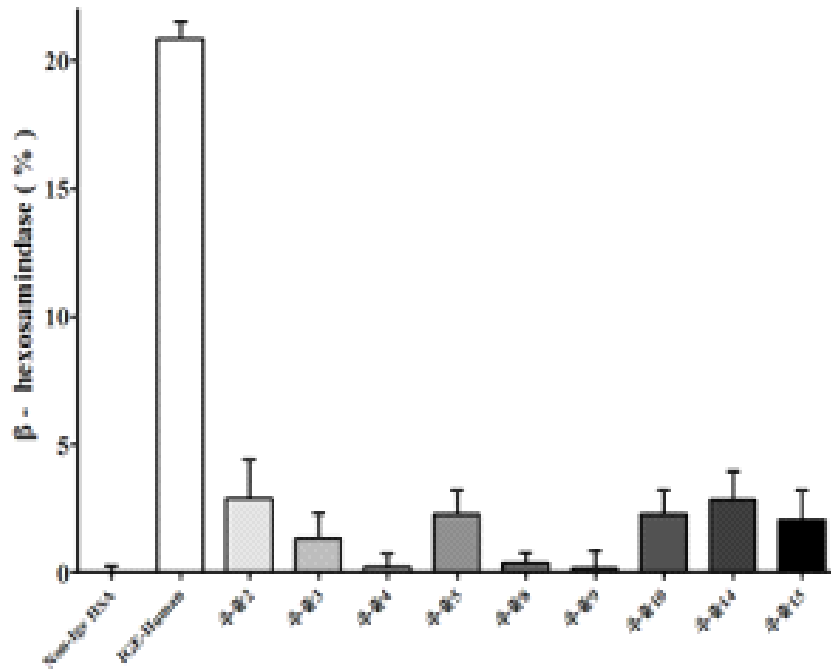


Fig 10. 머위 및 부원료 배합비에 따른 혼합음료의 항알레르기 활성 1st

3 Mar. 2014

B - hexosaminidase assay 추출물 1/20 희석

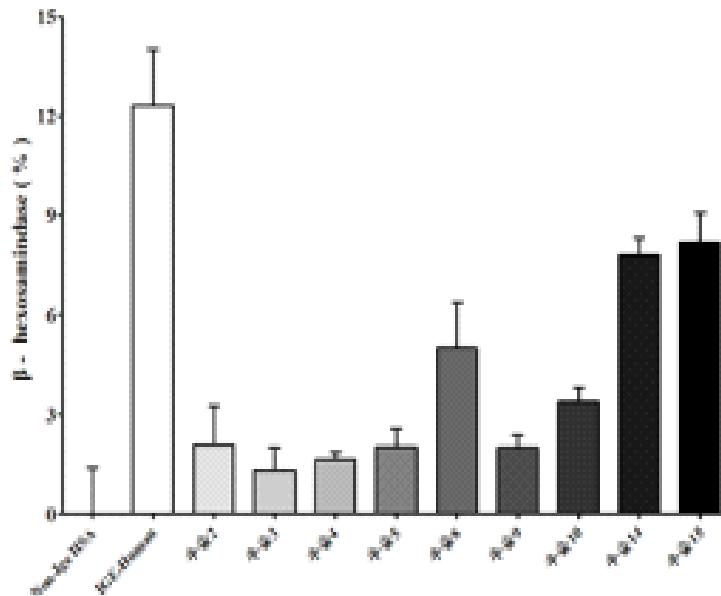


Fig 11. 머위 및 부원료 배합비에 따른 혼합음료의 항알레르기 활성 2nd

3 Mar. 2014

B-hexosaminidase assay 추출물 1/20 희석

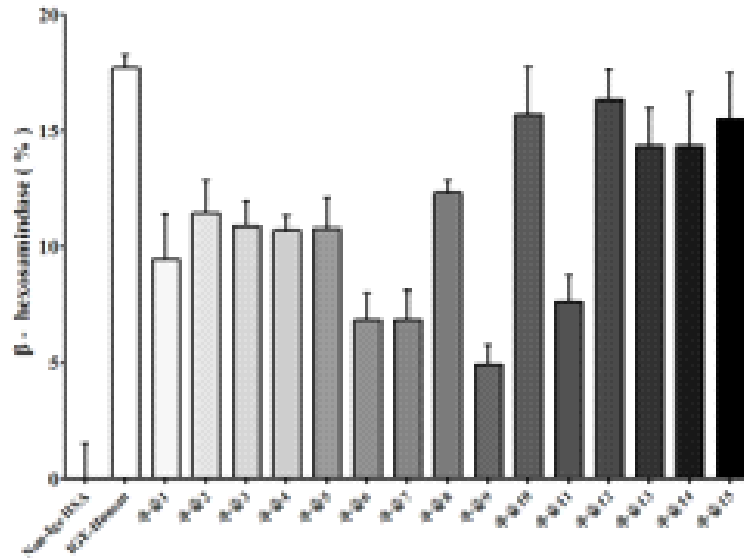


Fig 12. 머위 및 부원료 배합비에 따른 혼합음료의 항알레르기 활성 3rd

#### 다. 유통기한 설정 실험

개발한 항비염 음료의 시작품을 협동과제인 천호식품에서 제작하여 다음과 같이 유통기한 설정 실험을 행하였다.

##### (1) 실험디자인

- 저장 온도 : 유통온도를 포함한 온도 이외 2~3개 추가한다. 따라서 냉장 유통온도인 4℃, 상온 25℃, 미생물의 생육하기 좋은 35℃로 설정하여 실험하였다.
- 저장기간 : 실험의 정확성을 위해 목표 유통기한의 50%이상이 되도록 저장한다. 따라서 이 제품은 예상 유통기한이 1년이므로 저장기간은 6개월로 예상하고 실험하였다.
- 실험주기 : 저장 온도 별 의도한 유통기한이 15일 이상일 경우 최소 6회~7회 한다. 3개월을 기준으로 하였을 때 15일을 주기로 실험을 행하며 그 이후에 데이터가 나오지 않을 때에는 더 길게(6개월) 예상하고 실험하였다.

##### (2) 일반세균수와 관능평가

검체의 일반세균수는 표준한천배지(SPC 1L: tryptone 5g/ yeast extract 2.5g/ dextrose 1g/ agar15g)에 검체를 혼합 응고시켜 배양 후 발생한 세균 집락수를 계수하여 검체 중의 생균수를 산출하는 표준평판법을 이용하였으며, 관능평가는 기호도 척도법으로 7점 기준으로 하며, 패널은 소비자를 대상으로 하였다. 식품의약품안전처에서 보급한 유통기한설정시험 프로그램을 사용하여 일반세균수 측정된 결과(Table 17)와 관능평가결과(Table 18)를 토대로 통계를 한 결과에 안전 계수(0.8)을 곱하여 유통기한을 산정하였다.

Table 17. 유통기한 실험 결과 - 일반세균수

|     |   | 6/11        | 7/11 | 8/11 | 9/11 | 10/11 | 11/11 | 12/11 |
|-----|---|-------------|------|------|------|-------|-------|-------|
|     |   | 1st<br>(0일) | 2nd  | 3th  | 4th  | 5th   | 6th   | 7th   |
| 4℃  | ① | 0           | 0    | 0    | 0    | 0     | 0     | 0     |
|     | ② | 0           | 0    | 0    | 0    | 0     | 0     | 0     |
|     | ③ | 0           | 0    | 0    | 0    | 0     | 0     | 0     |
|     | ④ | 0           | 0    | 0    | 0    | 0     | 0     | 0     |
| 25℃ | ① | 0           | 0    | 0    | 0    | 0     | 0     | 0     |
|     | ② | 0           | 0    | 0    | 0    | 0     | 0     | 0     |
|     | ③ | 0           | 0    | 0    | 0    | 0     | 0     | 0     |
|     | ④ | 0           | 0    | 0    | 0    | 0     | 0     | 0     |
| 35℃ | ① | 0           | 0    | 0    | 0    | 0     | 0     | 0     |
|     | ② | 0           | 0    | 0    | 0    | 0     | 0     | 0     |
|     | ③ | 0           | 0    | 0    | 0    | 0     | 0     | 0     |
|     | ④ | 0           | 0    | 0    | 0    | 0     | 0     | 0     |

Table 18. 유통기한 실험 결과 - 일반세균수

|           |                   | 6/11             | 7/11 | 8/11 | 9/11 | 10/11 | 11/11 | 12/11 |     |
|-----------|-------------------|------------------|------|------|------|-------|-------|-------|-----|
|           |                   | 1st<br>(0일)      | 2nd  | 3th  | 4th  | 5th   | 6th   | 7th   |     |
| 4℃        | 성상                | 제품의 빛깔이<br>아름답다  | 5    | 5.4  | 5    | 5.2   | 4.8   | 5.2   | 5   |
|           |                   | 색깔이 음료로<br>적당하다  | 4.6  | 4.9  | 5.1  | 5.4   | 5.6   | 5.6   | 5.1 |
|           |                   | 마시고 싶은<br>생각이 든다 | 4.8  | 4.9  | 5    | 4.8   | 4.6   | 5.2   | 4.8 |
|           | 냄새                | 향이 좋다            | 5    | 4.6  | 5.2  | 5.3   | 5.2   | 4.7   | 4.9 |
|           | 맛                 | 단맛               | 4.8  | 4.9  | 5.7  | 5     | 5.4   | 5.5   | 6.1 |
|           |                   | 쓴맛               | 4.3  | 5.1  | 5.7  | 4.7   | 4.9   | 4.7   | 5.2 |
|           |                   | 감칠맛              | 4.2  | 4.3  | 4.8  | 4.7   | 4.5   | 4.8   | 4.5 |
|           | 식감                | 마셨을 때<br>느낌이 좋다  | 4    | 4.6  | 4.8  | 4.6   | 5     | 5     | 4.4 |
| 전반적<br>평가 | 전반적으로<br>내 입맛에 맞다 | 4.2              | 4    | 4.9  | 4.7  | 4.8   | 4.6   | 4.3   |     |
| 25℃       | 성상                | 제품의 빛깔이<br>아름답다  |      | 5    | 5.1  | 5     | 4.8   | 5.3   | 5.1 |
|           |                   | 색깔이 음료로<br>적당하다  |      | 4.9  | 5.1  | 5.3   | 5.3   | 5.4   | 4.9 |
|           |                   | 마시고 싶은<br>생각이 든다 |      | 4.6  | 5.2  | 4.6   | 4.7   | 5.2   | 4.6 |
|           | 냄새                | 향이 좋다            |      | 5.1  | 4.9  | 5     | 4.9   | 4.7   | 5   |
|           | 맛                 | 단맛               |      | 4.4  | 4.4  | 4.5   | 5     | 4.9   | 5.3 |
|           |                   | 쓴맛               |      | 4.9  | 4.9  | 4.7   | 5.2   | 5.1   | 4.7 |
|           |                   | 감칠맛              |      | 4.2  | 4.5  | 4.1   | 4.8   | 5.2   | 3.6 |
|           | 식감                | 마셨을 때<br>느낌이 좋다  |      | 4.1  | 4.2  | 4.6   | 4.8   | 5.4   | 4.1 |
| 전반적<br>평가 | 전반적으로<br>내 입맛에 맞다 |                  | 4    | 4.4  | 4.1  | 4.5   | 5.3   | 3.7   |     |
| 35℃       | 성상                | 제품의 빛깔이<br>아름답다  |      | 4.8  | 5    | 4.7   | 4.7   | 4.6   | 4.6 |
|           |                   | 색깔이 음료로<br>적당하다  |      | 4.9  | 5.5  | 4.7   | 4.9   | 4.9   | 4.6 |
|           |                   | 마시고 싶은<br>생각이 든다 |      | 4.9  | 5.1  | 4.5   | 4.7   | 4.9   | 4.5 |
|           | 냄새                | 향이 좋다            |      | 5.1  | 4.8  | 4.9   | 4.7   | 4.8   | 5.1 |
|           | 맛                 | 단맛               |      | 4.1  | 4.7  | 4.8   | 5.1   | 4.6   | 5.1 |
|           |                   | 쓴맛               |      | 4.5  | 5    | 4.5   | 5     | 4.6   | 4.8 |
|           |                   | 감칠맛              |      | 4    | 4    | 4     | 4.5   | 4.9   | 3.9 |
|           | 식감                | 마셨을 때<br>느낌이 좋다  |      | 3.7  | 4.5  | 4.2   | 4.5   | 5.1   | 3.8 |
| 전반적<br>평가 | 전반적으로<br>내 입맛에 맞다 |                  | 3.5  | 4.5  | 4.4  | 4.4   | 5.1   | 3.4   |     |



Table 19. [참고] 머위 음료의 관능검사 조사표

(1:대단히 나쁘다~4:보통이다~7:대단히 맛있다)

| Scale 1~7<br>(1: 대단히 나쁘다~4:보통이다~<br>7: 대단히 맛있다) |                 | 검<br>사<br>자 | 이름   |   |  |
|---|-----------------|-------------|------|---|--|
|   |                 |             | 전화번호 |   |  |
|   |                 |             | 계 좌  |   |  |
| 주요구분  | 항목              | A           | B    | C |  |
| 성상  | 제품의 빛깔이 아름답다    |             |      |   |  |
|   | 색깔이 음료로서 적당하다   |             |      |   |  |
|   | 마시고 싶은 생각이 든다   |             |      |   |  |
| 냄새  | 향이 좋다           |             |      |   |  |
| 맛   | 단맛              |             |      |   |  |
|   | 쓴맛              |             |      |   |  |
|   | 감칠맛             |             |      |   |  |
| 식감  | 마셨을 때 느낌이 좋다    |             |      |   |  |
| 전반적 평가  | 전반적으로 내 입맛에 맞는다 |             |      |   |  |

\*기타의견: \_\_\_\_\_

1점: 대단히 나쁘다

2점: 나쁘다

3점: 조금 나쁘다

4점: 보통이다

5점: 조금 맛있다

6점: 맛있다

7점: 매우 맛있다

\*쓴맛은 쓸수록 낮은 점수

## 5. 항비염 음료제품의 개발

### 가. 재료 및 방법

#### (1) 실험 재료

머위 잎은 전라북도 장수군에서 2013년 수확한 것을 생머위로 구입하였고, 수세미는 경상북도 경주에서 그리고 어성초는 경상남도 진주에서 채취한 것을 건조된 상태로 구입하여 사용하였다.

#### (2) 혼합 비율의 최적화를 위한 실험 디자인

MINITAB 17을 이용하여 혼합 최적 비율을 알기 위해 혼합물 설계하였다. 머위, 수세미, 어성초의 각 혼합 비율을 Table. 20 와 같다. 머위, 수세미, 어성초의 최소 및 최대 범위는 머위( *Petasites japonicas* ) 30~70%, 수세미( *Luffa cylindrical* ) 10~30% 그리고 어성초( *Houttuynia cordata* ) 10~30%으로 하였고, 실험은 중심에 반복점을 더 하여 총 12개의 설계점(Fig. 13) 으로 수행하였다.

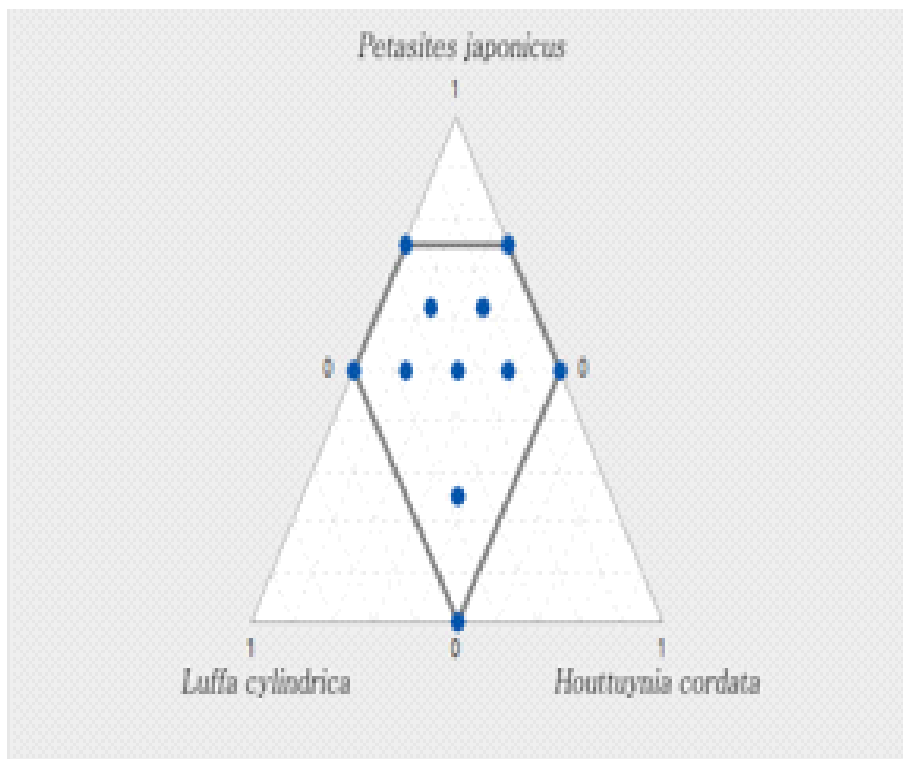


Fig 13. Plot of a modified distance design in the mixture region

Table 20. Experimental design of mixtures for finding the optimal mixture ratio

| No | Run | Pseudo component |       |       | Actual component ( g ) |    |    |
|----|-----|------------------|-------|-------|------------------------|----|----|
|    |     | A                | B     | C     | A                      | B  | C  |
| 4  | 1   | 0.750            | 0.250 | 0.000 | 70                     | 20 | 10 |
| 3  | 2   | 0.000            | 0.500 | 0.500 | 33                     | 33 | 33 |
| 8  | 3   | 0.500            | 0.125 | 0.375 | 56.65                  | 15 | 25 |
| 6  | 4   | 0.500            | 0.250 | 0.250 | 56.65                  | 20 | 20 |
| 12 | 5   | 0.500            | 0.250 | 0.250 | 56.65                  | 20 | 20 |
| 9  | 6   | 0.250            | 0.375 | 0.375 | 43.3                   | 25 | 25 |
| 2  | 7   | 0.500            | 0.000 | 0.500 | 56.65                  | 10 | 30 |
| 10 | 8   | 0.625            | 0.250 | 0.125 | 63.3                   | 20 | 15 |
| 1  | 9   | 0.750            | 0.000 | 0.250 | 70                     | 10 | 20 |
| 7  | 10  | 0.625            | 0.125 | 0.250 | 63.3                   | 15 | 20 |
| 11 | 11  | 0.500            | 0.375 | 0.125 | 56.65                  | 25 | 15 |
| 5  | 12  | 0.500            | 0.500 | 0.000 | 56.65                  | 30 | 10 |

### (3) 추출 제조

머위 잎, 수세미 그리고 어성초는 40°C에서 건조한 후 사용하였다. 모든 시료들은 분쇄기 (HMF-3100S, Hanil Electric Co., Seoul, Korea)를 이용해서 마쇄하여 사용하였다. 설계된 조건을 바탕으로 증탕추출기(Dongnam Co., Korea)를 이용하여 121°C에서 45분간 증류수 500 mL 와 함께 열수 추출을 하였고, 추출물은 Whatman NO.2를 사용하여 1차 여과를 한 후 Whatman GF/F 90 mm로 감압여과를 2차로 하였다.

### (4) Cell 배양

Rat RBL-2H3 cell을 American Type Culture Collection ( ATCC, Manassas, VA )에서 분양 받았으며 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 37°C에 배양하였다. 그리고 RBL-2H3 세포를 열에 불활성화된 10%(v/v) fetal bovine serum(FBS), 100 units/mL penicillin, 50 µg/mL streptomycin, 2 mM glutamine 그리고 1 mM sodium pyruvate 를 포함한 DMEM (Dulbeco's Modified Eagle's Medium)에 현탁 시켜 사용하였다.

### (5) Anti-allergy activity 측정

혼합 추출물의 항알레르기 효과는 이전에 Dearman의 연구를 바탕으로 RBL-2H3 세포로부터 β-hexosaminidase의 방출 억제 효과를 측정하였다. RBL-2H3 cell (2×10<sup>5</sup> cells/well)을 24 well plate에 접종하고, cell에 dinitropheny-immunoglobulin E (DNP-IgE, 0.5 µg/ml)를 처리하여 5% CO<sub>2</sub>incubator에서 37°C에서 12시간 배양 하였다. 각 well의 세포들을 PIPES buffer (pH 7.2; 25 mM PIPES, 110 mM NaCl, 5 mM KCl, 5.6 mM glucose, 0.4 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% BSA and 1 mM CaCl<sub>2</sub>)로 DNP-IgE를 제거하기 위해 2회 수세하였다. 그런 후 각 well에 PIPES buffer 500 µl 와 각 추출물 10 µl 씩 로딩 후 5% CO<sub>2</sub>incubator에서 37°C로 60분간 반

응시켰다. 이 때 각 추출물은 PIPES buffer로 20배 희석한 것을 사용하였다. 또 각 well에 탈과립 시키기 위해 10 mg/mL 의 DNP-HSA (human dinitrophenyl serum albumin, A6661 Sigma, St. Louis, MO) 300  $\mu$ l를 반응 시킨 후 1시간 20분 동안 37°C에서 배양하였다. 각 well의 상층액 50  $\mu$ l를 96-well plate에 옮겼고, 0.1 M sodium citrate buffer에 1 mM p-nitrophenyl-Nacetyl- $\beta$ -D-glucosaminide (N9376, Sigma, St.Louis) 과 0.5% Triton X-100를 반응시킨 50  $\mu$ l를 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 마지막으로 0.05 M sodium carbonate buffer (pH 10.0; 0.05 M Na<sub>2</sub> CO<sub>3</sub> /0.05 M NaHCO<sub>3</sub> ) 250  $\mu$ l 를 반응시킨 후 microplate reader를 이용하여 410 nm에서 흡광도를 측정하여  $\beta$ -hexosaminidase 방출량을 나타내었다. 탈과립(%)는 총  $\beta$ -hexosaminidase activity 에 대한 방출된  $\beta$ -hexosaminidase 의 비율로 계산하였다.

#### (6) 사용 균주 및 배지

미생물은 한국미생물보존센터(KCCM, Seoul, South-Korea )에서 총 4개의 미생물을 분양 받았다. 그람양성균인 *Staphylococcus aureus* (KCCM 40881), *Staphylococcus epidermidis* (KCCM 35494)과 그람음성균인 *Escherichia coli* (KCCM 11234), *Pseudomonas aeruginosa* (KCCM 11328)이다. 각 미생물들의 배지는 TSB/TSA (Trypticase Soy Broth/Trapticase Soy Agar, Difco, USA)에서 배양하였고, 항균 활성력은 MHA (Mueller Hinton Agar, Difco, USA)에서 측정하였다.

#### (7) Anti-microbial activity 측정

항균 활성 검색을 위하여 well diffusion method으로 실험하였다. 각 균주를 TSB 배지에서 2회 계대 배양하여 사용하였으며 균의 활성은 UV spectrophotometer (Optizen POP, Mecasys co., Ltd, Korea)를 이용하여 650 nm 에서 optical density (O.D) 값 0.4가 되게 맞춘 후 사용하였다. MHA 배지에 soft agar (0.8% agar) 를 이용하였고, pour-plate 방법에 따라 배지가 분주 된 배양 접시에 균일하게 섞은 후 실온에서 응고 시켜 pasteur pipette을 이용하여 직경 6 mm의 well을 만들어 각각의 well에 추출물 70  $\mu$ l 과 negative control로 ether (99%, Junsei, Japan)을 주입하였다. 그런 후, 37°C 에서 24시간 배양하면서 저해환의 생성 유무 및 직경의 크기를 확인 하였다. 각 추출물 350 mL에 99% ether를 사용하여 분액여두로 3번 추출한 후 감압농축을 하여 3 mL로 정용한 후 사용하였다.

#### (8) 통계 분석

모든 설계점에서 랜덤으로 3반복 실시하였고, Degranulation 와 anti-microbial activity 값의 통계 처리는 MINITAB 17 (Minitab Inc., State College, PA, USA)을 이용하여 mean $\pm$ standard deviation (n=3) 으로 나타내었다. Degranulation 은 평균 값을 바탕으로 혼합물 설계와의 관계를 회귀분석을 하였고, 최적 혼합 설계점을 구축하였다.

### 나. 결과 및 고찰

#### (1) Anti-allergy activity

혼합비율에 따른 각 추출물을 20배 희석하여 RBL-2H3 cell에 대한 항알레르기 실험의 결과는 다음 Table 21와 같다. Table 21에 나타낸 값은 control 값인 16.77 에서 각 추출물의  $\beta$

-hexosaminidase 값 (%) 을 뺀 값을 바탕으로 혼합물 설계와의 관계를 분석하였다. Response surface 와 trace plot (Fig. 14-16) 를 보면 머위가 가장 큰 영향을 주었고, 수세미는 다소 약한 영향을 미친다는 양상을 알 수 있다. 다중회귀분석의 결과는 Table 22에 나타내었는데 degranulation의 저해에 대한 상관계수 값은 82.10% 이며, 전체 회귀분석의 결과는 p값 0.030 (p<0.05) 으로 유의성이 있다고 할 수 있다. 뿐만 아니라 1차회귀방정식에서는 p값이 0.009 (p<0.05), 2차회귀방정식에서는 0.013 (p<0.05) 으로 유의성 있는 것으로 나타났다. 그 모델식은 다음과 같다;

$$Y=14.98A-14.63B+1.03C+23.22AB-0.76AC+74.12BC.$$

최종적으로 최적의 혼합 설계점은 머위 0.75%, 수세미 0.14%, 어성초 0.11% 의 비율이라는 것을 알 수 있었다(Fig. 17). 또한, 혼합 설계점의 대부분에서 항알레르기 효과가 우수한 결과를 보이므로 알레르기성 호흡기계 질환에 대한 효과도 좋을 것으로 전망된다. 이전 연구에서 머위는 RBL-2H3 cell에 대한 degranulation의 저해 활성 뿐만 아니라 염증 물질인 iNOS (inducible nitric oxide synthase ) 와 COX-2 (Cyclooxygenase 2)을 저해하는 항염 활성도 좋다는 결과가 있었으며, 어성초 또한 degranulation의 저해 효과와 NF-κB의 항원 유도 활성화 와 ROS (Reactive Oxygen Species)의 생산을 억제한다는 결과가 보고된 바 있다.

**Table 21. Inhibition effect of the mixtures on degranulation.**

| No | Run | Pseudo component |       |       | Actual component (g) |    |    | Inhibition effect on degranulation <sup>2</sup> |
|----|-----|------------------|-------|-------|----------------------|----|----|---|
|    |     | A <sup>1</sup>   | B     | C     | A                    | B  | C  |   |
| 4  | 1   | 0.750            | 0.250 | 0.000 | 70                   | 20 | 10 | 11.8369   |
| 3  | 2   | 0.000            | 0.500 | 0.500 | 33                   | 33 | 33 | 11.9231   |
| 8  | 3   | 0.500            | 0.125 | 0.375 | 56.65                | 15 | 25 | 10.1701   |
| 6  | 4   | 0.500            | 0.250 | 0.250 | 56.65                | 20 | 20 | 11.0478   |
| 12 | 5   | 0.500            | 0.250 | 0.250 | 56.65                | 20 | 20 | 11.7054   |
| 9  | 6   | 0.250            | 0.375 | 0.375 | 43.3                 | 25 | 25 | 10.5217   |
| 2  | 7   | 0.500            | 0.000 | 0.500 | 56.65                | 10 | 30 | 8.4174  |
| 10 | 8   | 0.625            | 0.250 | 0.125 | 63.3                 | 20 | 15 | 11.8369   |
| 1  | 9   | 0.750            | 0.000 | 0.250 | 70                   | 10 | 20 | 11.4423   |
| 7  | 10  | 0.625            | 0.125 | 0.250 | 63.3                 | 15 | 20 | 11.1793   |
| 11 | 11  | 0.500            | 0.375 | 0.125 | 56.65                | 25 | 15 | 12.2315   |
| 5  | 12  | 0.500            | 0.500 | 0.000 | 56.65                | 30 | 10 | 4.9978  |

<sup>1</sup>A : Petasites japonicus B:Luffa cylindrica C:Houttuynia cordata

<sup>2</sup>Inhibition effects are expressed as the remained number from that control value(16.77) minus β-hexosaminidase release rate(%)

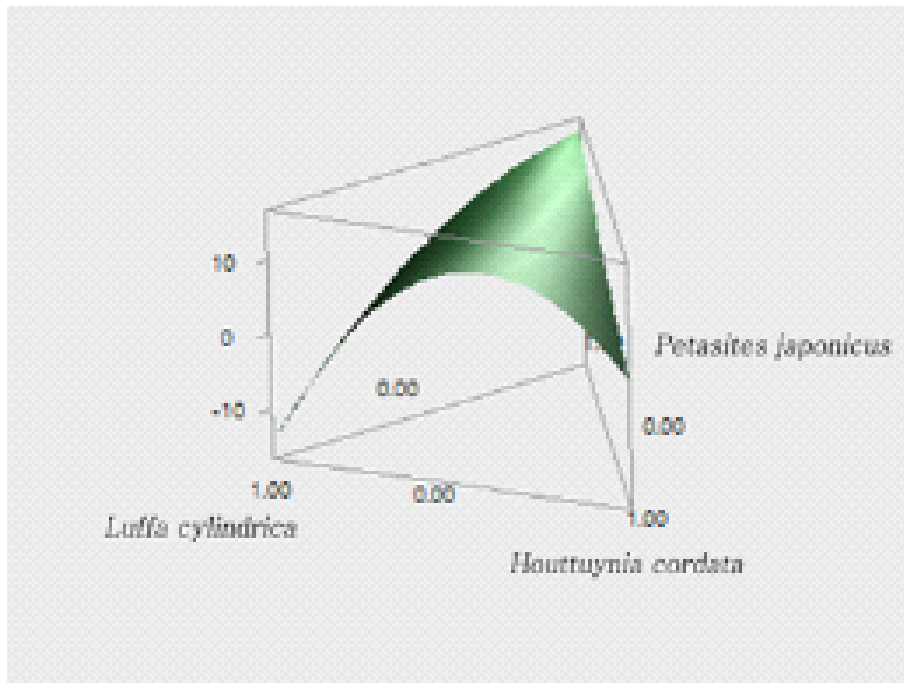


Fig 14. Response surface on the inhibition effect on degranulation

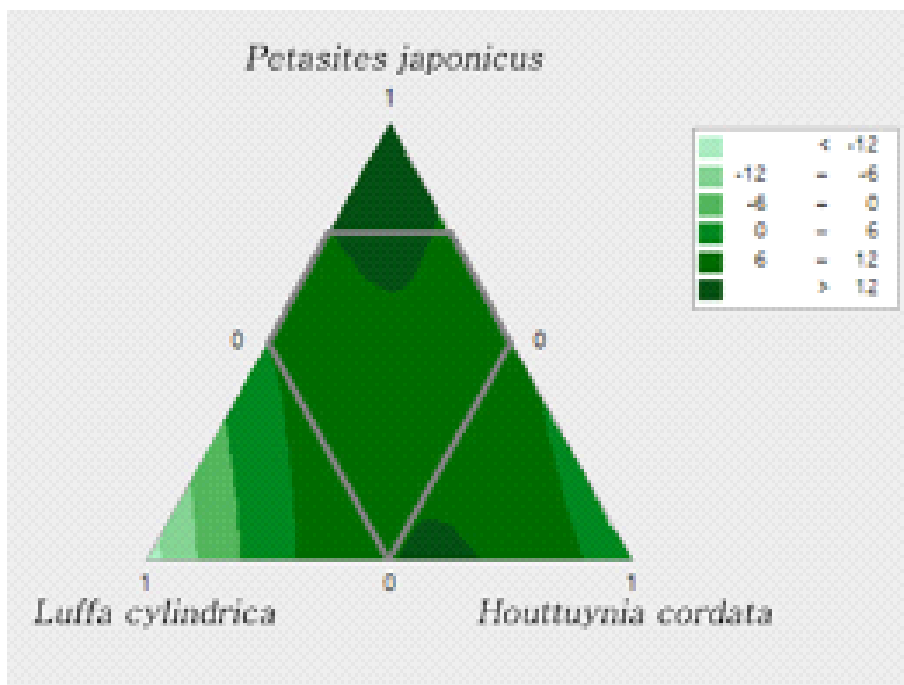


Fig 15. Contour map of the inhibition effect on degranulation

Table 22. Regression analysis of the inhibition effect on degranulation

| Response            | F     | P     | R <sup>2</sup> (%) | Equation on terms of pseudo component          |
|---------------------|-------|-------|--------------------|--|
| Regression analysis | 5.50  | 0.030 |                    |  |
| Linear              | 11.64 | 0.009 |                    |  |
| Quadratic           | 8.85  | 0.013 | 82.10              | YI= 14.98A-14.63B+1.03C+23.22AB-0.76AC+74.12BC |
| A*B                 | 1.91  | 0.217 |                    |  |
| A*C                 | 0.00  | 0.966 |                    |  |
| B*C                 | 20.23 | 0.004 |                    |  |

A : *Petasites japonicus*, B : *Luffa cylindrical*, C : *Houttuynia cordata*

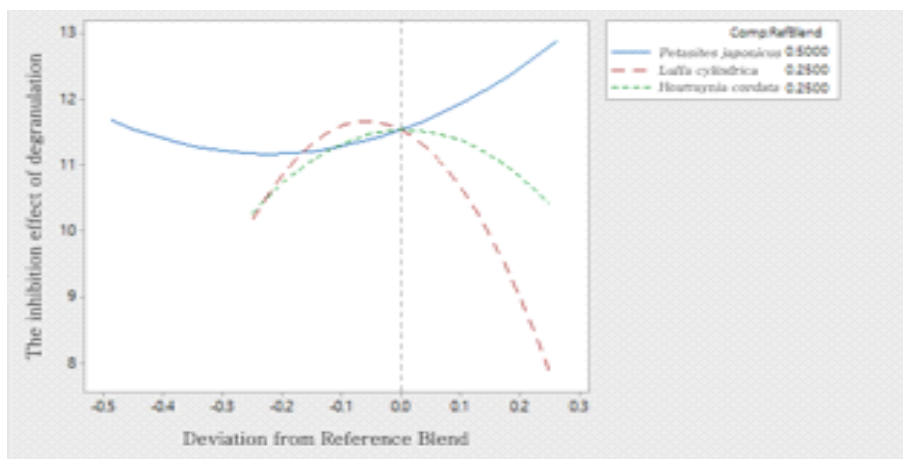


Fig 16. Trace plot of the inhibition effect on degranulation

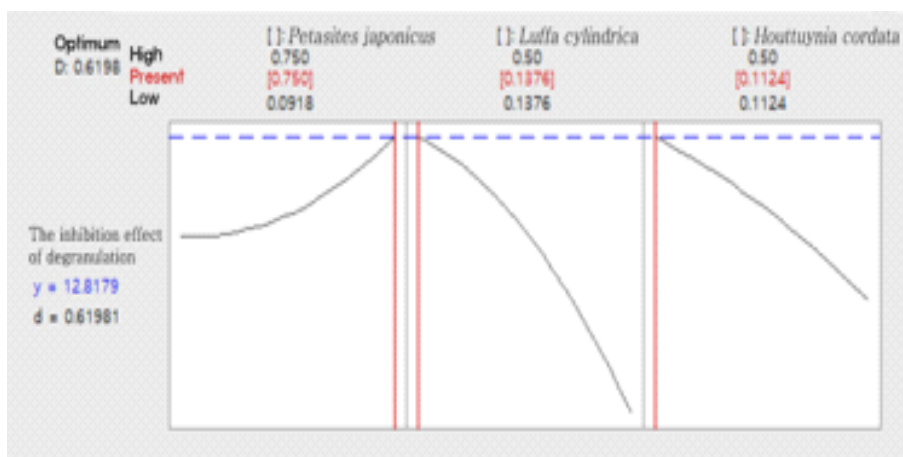


Fig 17. The optimal ratio of mixture design

## (2) Anti-microbial activity

Anti-microbial activity의 결과는 Table 23 와 같다. 전반적으로 모든 추출물에서 큰 차이를 보이지는 않지만 대체적으로 모든 추출물은 Negative control인 ether과 비교하여 그람양성균인 *S. aureus* 와 *S. epidermidis* 에서 항균력이 유효한 것으로 나타났다. *S. aureus* 는 No. 9 추출물에서 12.67 mm 로 가장 크게 저해환이 나타났으며 그 다음 No. 1 추출물에서 12.00 mm, No. 11 추출물 11.33 mm 의 순으로 활성이 작게 나타났다. *S. epidermidis* 는 No. 11 추출물에서 15.00 mm 로 가장 큰 저해환이 나타났고 No. 8 추출물과 No. 9 추출물에서 12.33 mm 로 비슷한 활성을 나타냈다. 반면에 그람음성균인 *E. coli* 와 *P. aeruginosa* 에서는 No. 9 추출물에서 *E. coli* 는 10.00 mm 와 *P. aeruginosa* 는 13.33 mm 로 가장 뚜렷했으며 다른 추출물에서는 미미한 결과가 나타났다. 따라서 항균 활성이 전체적으로 뚜렷하게 나타난 추출물은 No. 9 이며, 각각 균에 대해 최대 활성을 나타내는 추출물은 다르지만 대체로 머위의 함유가 추출물에서 항균활성이 강한 것으로 알 수 있다(Fig. 18). 비염, 천식 등 호흡계 질환은 중국의 황사 문제 뿐만 아니라 현대사회에서 대기오염과 관련하여 환경성 질환이 문제시되고 있으며 특히 소아·청소년기 유병률이 뚜렷이 증가되고 있다, 특히 Nenad Pandak et al 의 연구에서 만성비염, 축농증 등의 환자들의 부비강에 대부분 *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella* spp. 그리고 *Streptococci* 등의 병원성 미생물을 발견한 것으로 보고하였다. 따라서 머위, 수세미 그리고 어성초의 혼합 추출물이 호흡기계 질환에 관련된 항알레르기와 항균에 대한 효과 있는 것으로 보아 향후 고부가가치 기능성 음료의 개발 가치가 있는 것으로 사료된다.

Table 23. Anti-microbial activity on the mixtures (unit=mm)

| No. | Gram positive    |                       | Gram negative  |                      |
|-----|------------------|-----------------------|----------------|----------------------|
|     | <i>S. aureus</i> | <i>S. epidermidis</i> | <i>E. coli</i> | <i>P. aeruginosa</i> |
| 1   | 12.00 ± 0.00     | 10.00 ± 0.00          | -              | -                    |
| 2   | 10.00 ± 0.00     | 8.67 ± 0.58           | -              | -                    |
| 3   | 9.00 ± 0.00      | 9.00 ± 0.00           | -              | -                    |
| 4   | 8.67 ± 0.58      | 8.00 ± 0.00           | -              | -                    |
| 5   | 8.33 ± 0.58      | 8.33 ± 0.58           | -              | -                    |
| 6   | 11.00 ± 0.00     | 11.33 ± 1.15          | -              | -                    |
| 7   | 11.00 ± 0.00     | 10.00 ± 1.00          | -              | -                    |
| 8   | 10.70 ± 0.58     | 12.33 ± 0.58          | -              | -                    |
| 9   | 12.67 ± 0.58     | 12.33 ± 0.58          | 10.00 ± 0.00   | 13.33 ± 0.58         |
| 10  | 10.00 ± 1.00     | 13.00 ± 0.00          | -              | -                    |
| 11  | 11.33 ± 0.58     | 15.00 ± 0.00          | -              | -                    |
| 12  | 9.67 ± 0.58      | 9.67 ± 0.58           | -              | -                    |



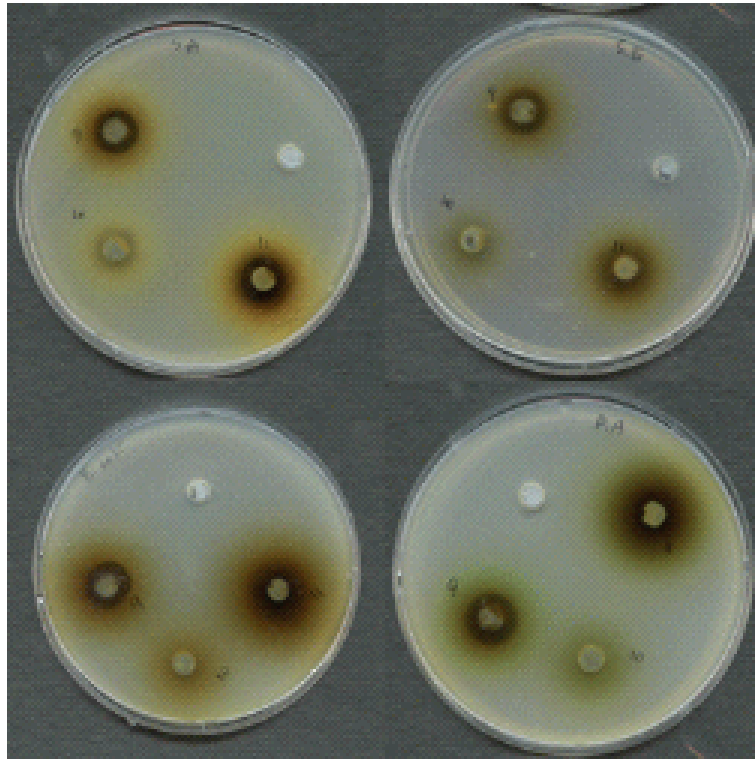


Fig 18. Anti-microbial activity of extract No.9 (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*)

# 제 4 절 제4세부 : Manufacturing of Trial Products

## 제4절 협동과제 : 제품개발 및 산업화

### 1. 머위 액상음료 개발

머위를 이용하여 액상 음료제품을 제작하기 위하여 먼저 생머위를 추출함에 있어서, 제3세부 과제에서 도출한 80% 주정추출방법은 주정제거공정이 필수적이어서 음료제품에는 적절하지 않아, 열수추출법으로 다음과 같이 추출하였다.

#### 가. 머위 추출액 제조

- ① 시료양: 머위 100 g + 정제수 1,224g
- ② 추출조건: 온도 130 -134℃ , 압력 1-1.2atm
- ③ 끓는 물에 시료를 투입하여 processing chart 에 따라 작업

머위 추출액과 혼합할 부원료의 종류와 추출조건은 Table 1과 같이 열수추출하였다.

#### ○ 부원료의 추출

부원료로서 선정된 어성초는 해독 및 항균효능, 강화사자발쑤는 혈액순환과 간기능 강화에 좋 으며 특히 향이 좋아 제품의 향료로서 선정되었다. 대추, 숙지황 및 감초는 제품의 단맛을 내 는데 기여하면서 기침, 천식에 효과가 있어 본 연구개발 제품의 효능을 증진시키고자 첨가하였 다.

용안육은 심장과 비장의 기능을 돕는 효과가 뛰어나며 특히 포도당이 많아 제품의 단맛에 기 여하며, 구강염증을 치료하는비타민 B<sub>2</sub> 도 함유돼 있다.

각 부원료인 어성초, 강화사자발쑤, 대추, 감초, 용안육, 숙지황을 Table 1과 같은 조성으로 추 출하였다.

Table 1. 부원료의 종류 및 추출량

| 시료명    | 시료양(g) | 용매      |
|--------|--------|---------|
| 어성초    | 300    |         |
| 강화사자발쑤 | 15     |         |
| 대추     | 40     | 정제수     |
| 감초     | 15     | 4,776 g |
| 용안육    | 10     |         |
| 숙지황    | 10     |         |

- \* 추출조건: 온도 130 - 134℃ , 압력 1-1.2 atm
- \* 끓는 물에 시료를 투입하여 processing chart 에 따라 작업

#### ○ 음료제품의 배합비율 및 제조과정

주원료와 각 부원료의 추출액을 Table 2와 같은 배합비로써 Fig 1과 같은 과정에 따라 음료 제품의 시작품을 제조하였다.

Table 2. 머위 액상 음료 제품 원료 배합 비율

| 원료명                       |        | 합량      |
|---------------------------|--------|---------|
| 머위 추출액 (Brix 0.6% 이상)     |        | 20.4 %  |
|                           | 어성초    | 76.92 % |
|                           | 강화사자발쑉 | 3.85 %  |
| 식물성 원료 추출액<br>(Brix 1%이상) | 대추     | 10.26 % |
|                           | 감초     | 3.85 %  |
|                           | 용안육    | 2.56 %  |
|                           | 숙지황    | 2.56 %  |
|                           | 합계     | 100 %   |
| 합                         | 계      | 100%    |

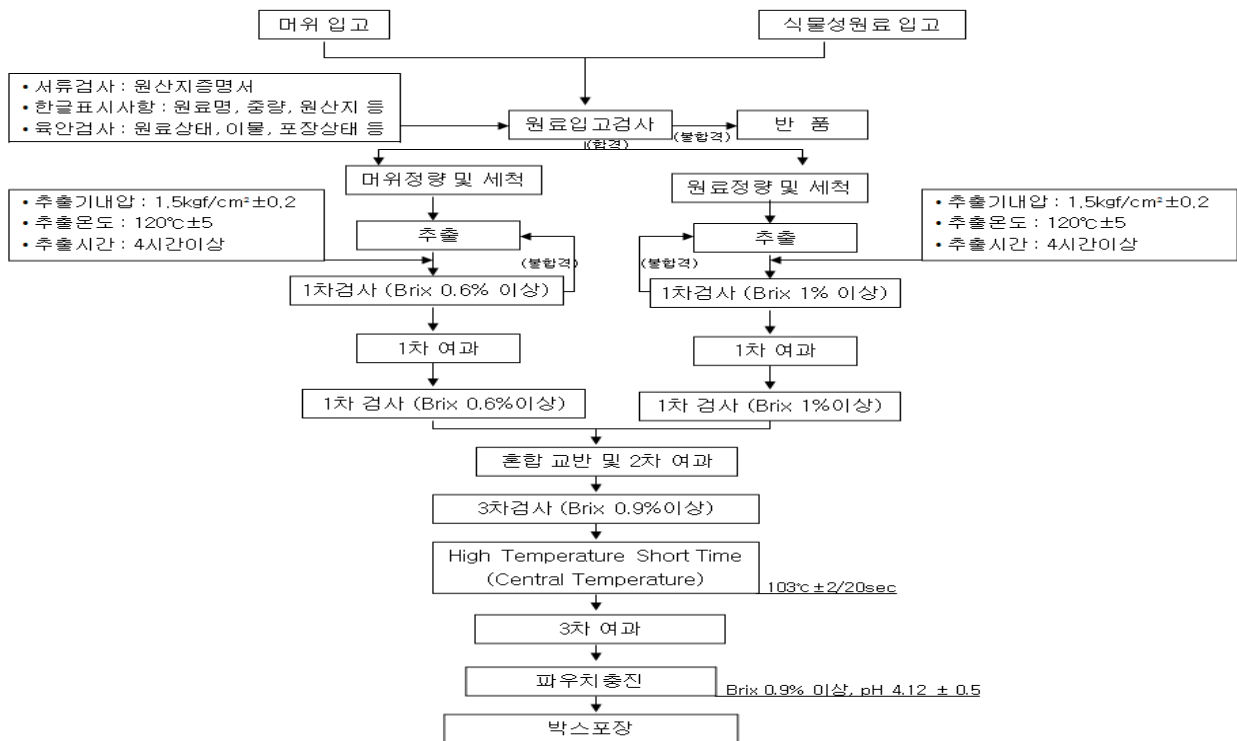


Fig 1. 머위 음료제품의 제조공정도



Fig 2. 머위 액상음료 시작품

#### 나. 머위 음료제품의 petasin함량 및 관능적 품질검사

제조한 머위 음료제품의 petasin함량은  $160\mu\text{g/g}$  정도이며, 이러한 결과는 배합비를 감안하여 에탄올용액으로 추출한 결과와 환산하여 비교할 때 다소 적은 것으로 추산되었다.

또한 음료제품의 관능적품질검사는 시제품의 맛과 향의 관능적 품질을 Moskowitz가 행한 Descriptive sensory analysis법을 사용하여 관능적 품질을 평가하였다.

즉, 냄새에 비교적 민감하고 비흡연자인 10명의 panalist를 선정하여 시제품의 성상, 냄새, 맛, 그리고 종합적 향미에 대한 평가를 scale 0~5(0:미약, 3:적당, 5:과다)를 基準으로 하여, Table 3과 같은 data sheet에 scale을 표시토록 하여 통계처리한 결과는 다음과 같다.

Table 3. 머위 음료 관능검사 조사표

| Scale 0~5<br>(0:약 및 나쁘다, 3:적당하다, 5: 과다) |                 | 검<br>사<br>자 | 이름   |   |   |   |   |
|---|-----------------|-------------|------|---|---|---|---|
|   |                 |             | 전화번호 |   |   |   |   |
|   |                 |             | 계좌   |   |   |   |   |
| 주요구분                                    | 항목              | 0           | 1    | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 성상                                      | 제품의 빛깔이 아름답다    |             |      |   |   |   |   |
|   | 색깔이 음료로서 적당하다   |             |      |   |   |   |   |
|   | 마시고 싶은 생각이 든다   |             |      |   |   |   |   |
| 냄새                                      | 향이 좋다           |             |      |   |   |   |   |
|   | 향이 적당하게 난다      |             |      |   |   |   |   |
| 맛                                       | 단맛              |             |      |   |   |   |   |
|   | 쓴맛              |             |      |   |   |   |   |
|   | 짜운 맛            |             |      |   |   |   |   |
|   | 뽀은 맛            |             |      |   |   |   |   |
|   | 구수한 맛           |             |      |   |   |   |   |
| 식감                                      | 마셨을 때 느낌이 좋다    |             |      |   |   |   |   |
| 전반적 평가                                  | 전반적으로 내 입맛에 맞는다 |             |      |   |   |   |   |

머위의 관능적 품질검사를 실시한 결과, 빛깔 및 색의 기호도는 낮고, 쓴맛과 단맛이 과한 것으로 평가되어 이의 개선이 필요하며, 짠맛과 뽀은 맛은 적고 구수한 맛은 적당하여 개선할 사항은 없었다. 또한 종합적 평가성격인 마셨을 때 식감은 적당한 것으로 평가되었다.

Table 4. 일표본 통계량

|                 | N  | 평균   | 표준편차 | 평균의 표준오차 |
|-----------------|----|------|------|----------|
| 성상-제품의 빛깔이 아름답다 | 30 | 2.23 | .898 | .164     |

Table 5. 일표본 검정

|                     | 검정값 = 3 |     |              |       | 차이의            |      |
|---------------------|---------|-----|--------------|-------|----------------|------|
|                     | t       | 자유도 | 유의확률<br>(양쪽) | 평균차   | 95% 신뢰구간<br>하한 | 상한   |
| 성상-<br>제품의 빛깔이 아름답다 | -4.678  | 29  | .000         | -.767 | -1.10          | -.43 |

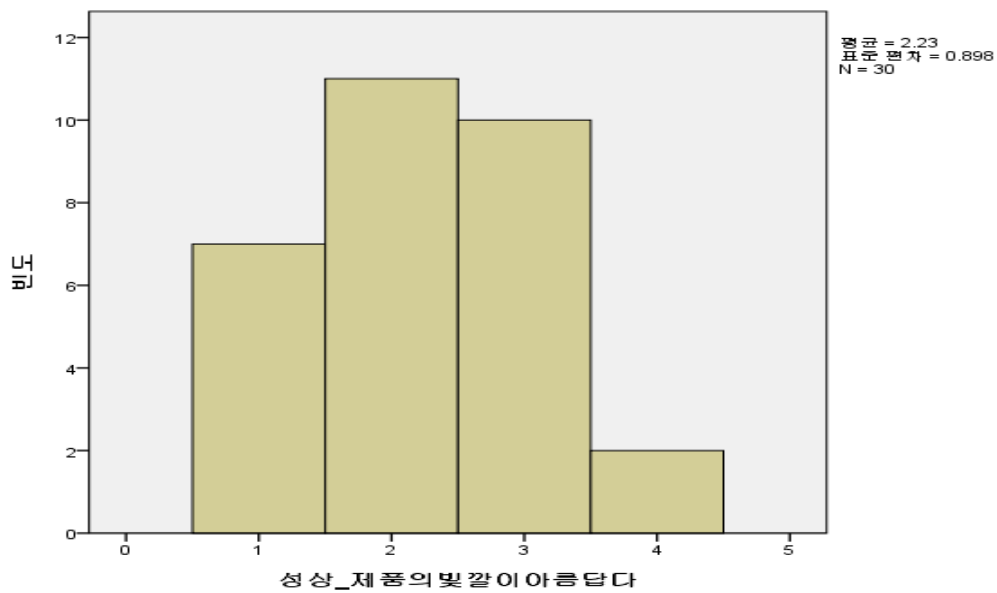


Fig 3. 머위 시제품의 성장 중에서 제품의 빛깔에 대한 선호도 조사 결과

Table 6. 일표본 통계량

|                      | N  | 평균   | 표준편차 | 평균의 표준오차 |
|----------------------|----|------|------|----------|
| 성상-<br>색깔이 음료로서 적당하다 | 30 | 2.03 | .809 | .148     |

Table 7. 일표본 검정

|                      | 검정값 = 3 |     |              |       |                          |
|----------------------|---------|-----|--------------|-------|--------------------------|
|                      | t       | 자유도 | 유의확률<br>(양쪽) | 평균차   | 차이의<br>95% 신뢰구간<br>하한 상한 |
| 성상-<br>색깔이 음료로서 적당하다 | -6.547  | 29  | .000         | -.967 | -1.27    -.66            |

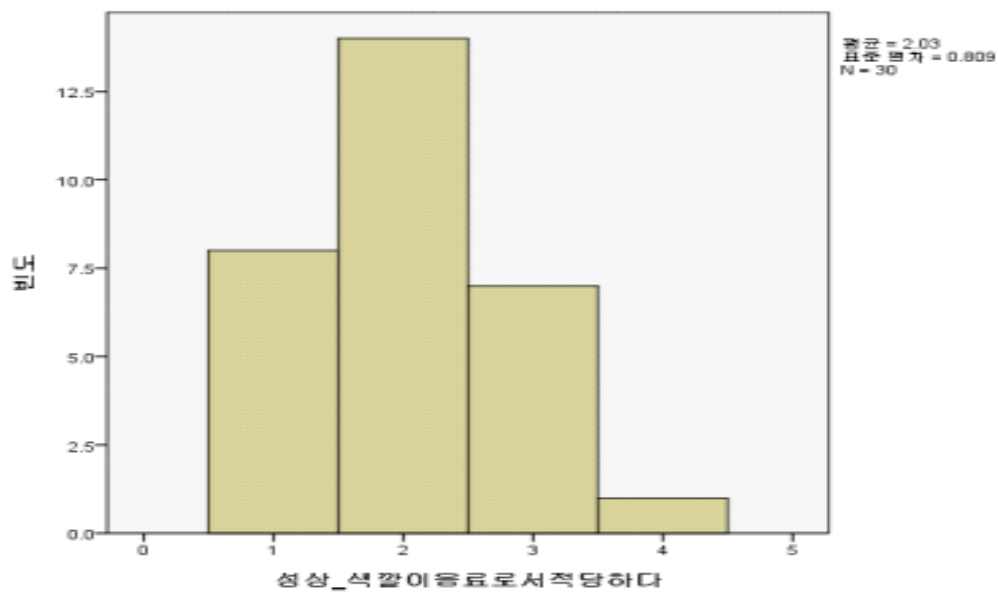


Fig 4. 머위 시제품의 성상 중에서 음료로서의 적정성에 대한 선호도 조사 결과

Table 8. 일표본 통계량

|                      | N  | 평균   | 표준편차 | 평균의 표준오차 |
|----------------------|----|------|------|----------|
| 성상-<br>마시고 싶은 생각이 든다 | 30 | 2.27 | .868 | .159     |

Table 9. 일표본 검정

|                      | 검정값 = 3 |     |              |       |                          |
|----------------------|---------|-----|--------------|-------|--------------------------|
|                      | t       | 자유도 | 유의확률<br>(양쪽) | 평균차   | 차이의<br>95% 신뢰구간<br>하한 상한 |
| 성상-<br>마시고 싶은 생각이 든다 | -4.626  | 29  | .000         | -.733 | -1.06    -.41            |

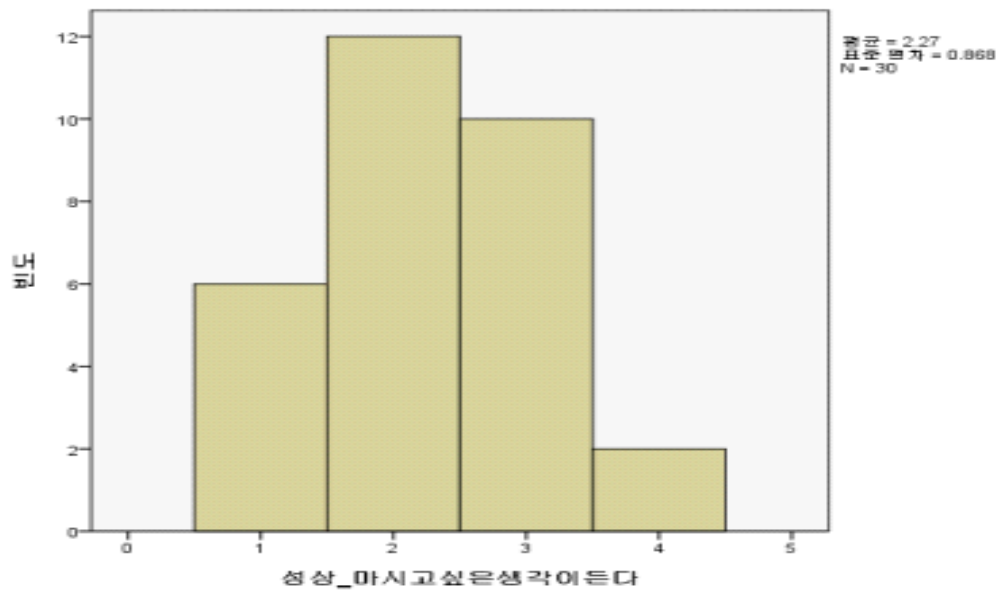


Fig 5. 머위 시제품의 성장 중에서 먹고 싶은 충동성에 대한 선호도조사 결과



Table 10. 일표본통계량

|          | N  | 평균   | 표준편차 | 평균의 표준오차 |
|----------|----|------|------|----------|
| 냄새-향이 좋다 | 30 | 3.03 | .890 | .162     |

Table 11. 일표본 검정

|          | 검정값 = 3 |     |              |      |                 |     |
|----------|---------|-----|--------------|------|-----------------|-----|
|          | t       | 자유도 | 유의확률<br>(양쪽) | 평균차  | 차이의<br>95% 신뢰구간 |     |
|          |         |     |              |      | 하한              | 상한  |
| 냄새-향이 좋다 | .205    | 29  | .839         | .033 | -.30            | .37 |

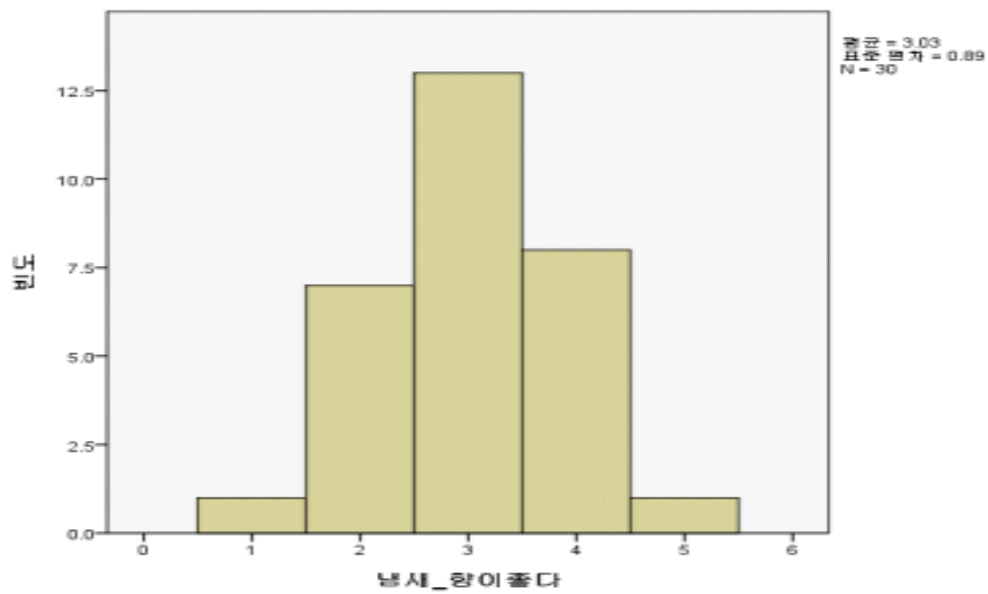


Fig 6. 머위 시제품의 냄새 중에서 향에 대한 선호도 조사 결과

Table 12. 일표본 통계량

|                | N  | 평균   | 표준편차 | 평균의 표준오차 |
|----------------|----|------|------|----------|
| 냄새- 향이 적당하게 난다 | 30 | 3.47 | .860 | .157     |

Table 13. 일표본검정

|               | 검정값= 3 |     |              |      |                       |     |
|---------------|--------|-----|--------------|------|-----------------------|-----|
|               | t      | 자유도 | 유의확률<br>(양쪽) | 평균차  | 차이의<br>95% 신뢰구간<br>하한 | 상한  |
| 냄새-향이 적당하게 난다 | 2.971  | 29  | .006         | .467 | .15                   | .79 |

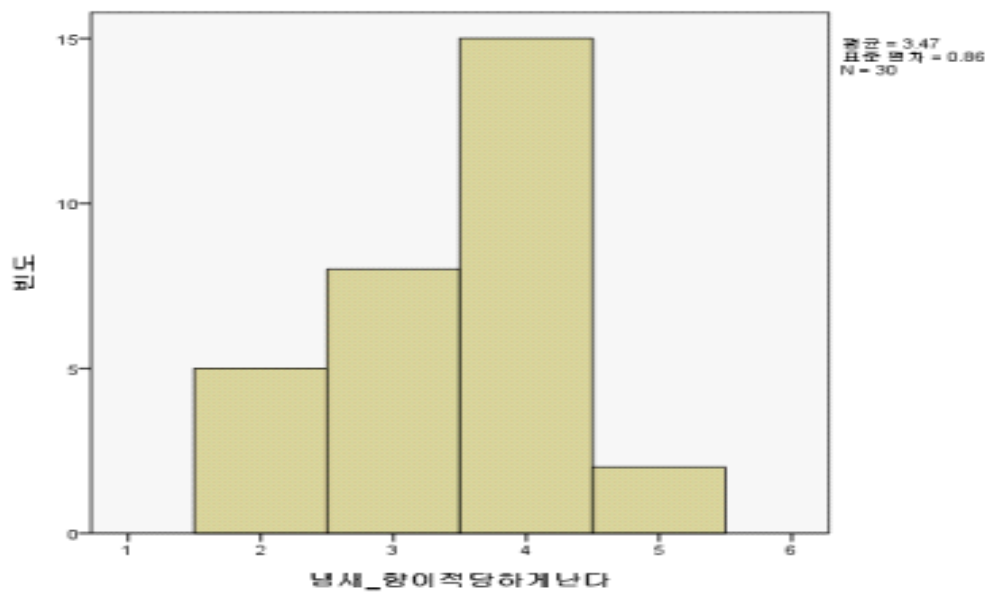


Fig 7. 머위 시제품의 냄새 중에서 향의 적정성에 대한 선호도 조사 결과

Table 14. 일표본 통계량

|    | N  | 평균   | 표준편차 | 평균의 표준오차 |
|----|----|------|------|----------|
| 단맛 | 30 | 1.97 | .890 | .162     |

Table 15. 일표본 검정

|    | 검정값 = 3 |     |               |        |                 |      |
|----|---------|-----|---------------|--------|-----------------|------|
|    | t       | 자유도 | 유의 확률<br>(양쪽) | 평균차    | 차이의<br>95% 신뢰구간 |      |
|    |         |     |               |        | 하한              | 상한   |
| 단맛 | -6.360  | 29  | .000          | -1.033 | -1.37           | -.70 |

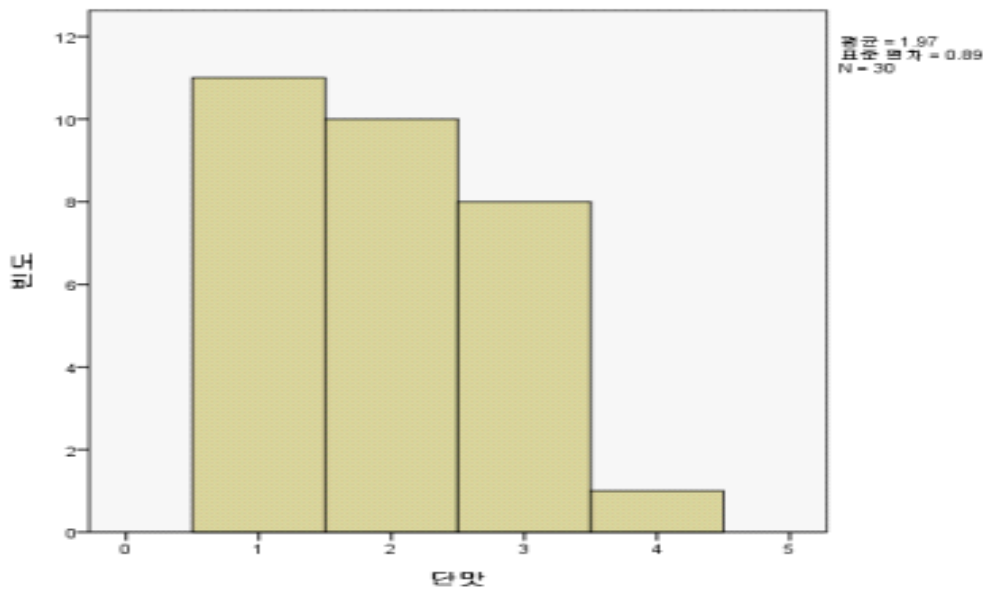


Fig 8. 머위 시제품의 단맛에 대한 선호도 조사 결과

Table 16. 일표본 통계량

|    | N  | 평균   | 표준편차  | 평균의 표준오차 |
|----|----|------|-------|----------|
| 쓴맛 | 30 | 3.20 | 1.095 | .200     |

Table 17. 일표본 검정

|    | 검정값 = 3 |     |              |      |                 |     |
|----|---------|-----|--------------|------|-----------------|-----|
|    | t       | 자유도 | 유의확률<br>(양쪽) | 평균차  | 차이의<br>95% 신뢰구간 |     |
|    |         |     |              |      | 하한              | 상한  |
| 쓴맛 | 1.000   | 29  | .326         | .200 | -.21            | .61 |

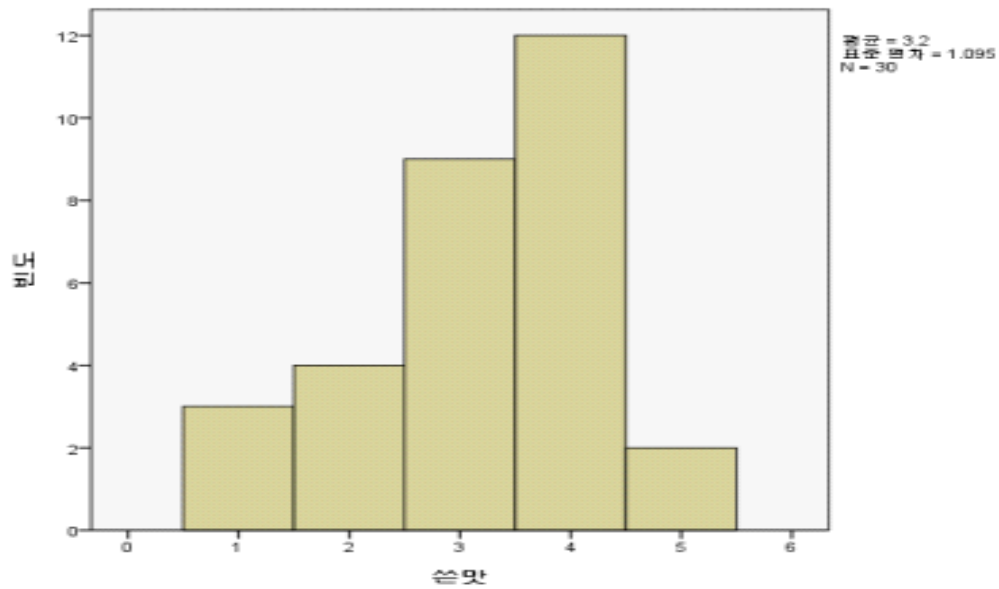


Fig 9. 머위 시제품의 쓴맛에 대한 선호도 조사 결과

Table 18. 일표본 통계량

|    | N  | 평균   | 표준편차 | 평균의 표준오차 |
|----|----|------|------|----------|
| 짬맛 | 30 | 1.47 | .819 | .150     |

Table 19. 일표본 검정

|    | 검정값 = 3 |     |              |        |                 |       |
|----|---------|-----|--------------|--------|-----------------|-------|
|    | t       | 자유도 | 유의확률<br>(양쪽) | 평균차    | 차이의<br>95% 신뢰구간 |       |
|    |         |     |              |        | 하한              | 상한    |
| 짬맛 | -10.251 | 29  | .000         | -1.533 | -1.84           | -1.23 |

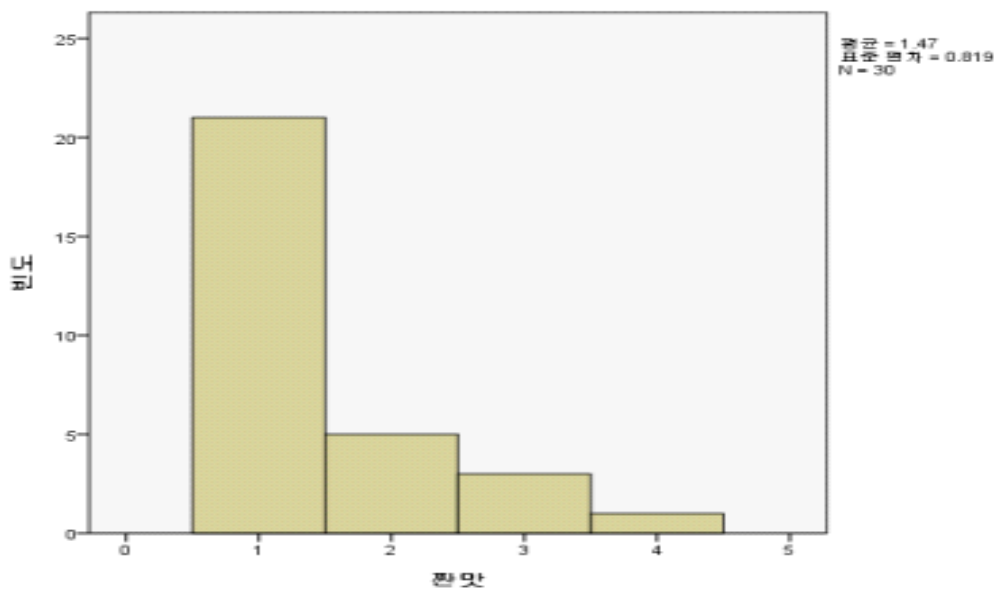


Fig 10. 머위 시제품의 짬맛에 대한 선호도 조사 결과

Table 20. 일표본 통계량

|     | N  | 평균   | 표준편차 | 평균의 표준오차 |
|-----|----|------|------|----------|
| 뽕은맛 | 30 | 2.83 | .874 | .160     |

Table 21. 일표본 검정

|     | 검정값 = 3 |     |              |       |                 |     |
|-----|---------|-----|--------------|-------|-----------------|-----|
|     | t       | 자유도 | 유의확률<br>(양쪽) | 평균차   | 차이의<br>95% 신뢰구간 |     |
|     |         |     |              |       | 하한              | 상한  |
| 뽕은맛 | -1.044  | 29  | .305         | -.167 | -.49            | .16 |

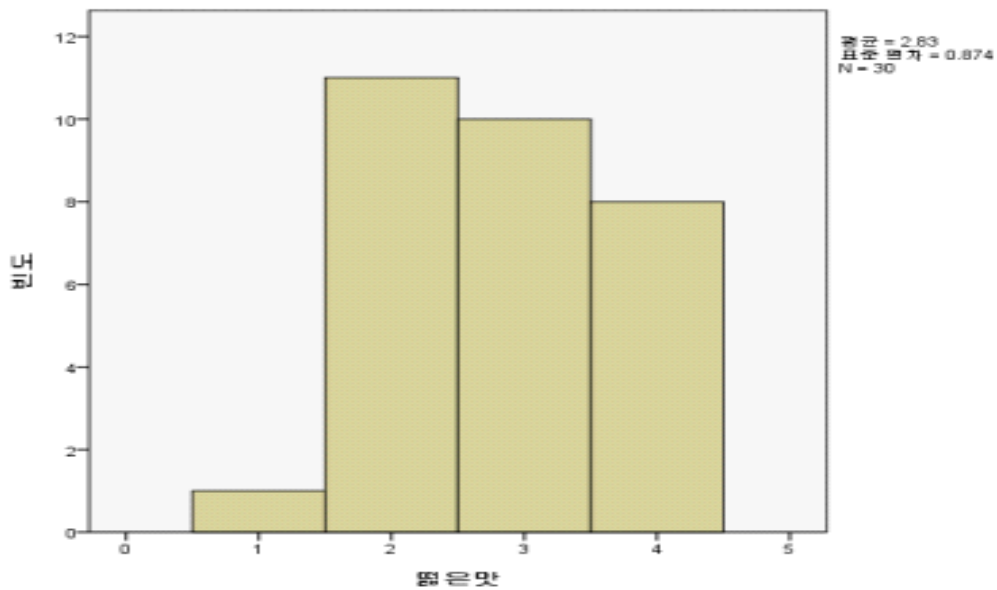


Fig 11. 머위 시제품의 뽕은맛에 대한 선호도 조사 결과

Table 22. 일표본 통계량

|       | N  | 평균   | 표준편차  | 평균의 표준오차 |
|-------|----|------|-------|----------|
| 구수한 맛 | 30 | 2.73 | 1.143 | .209     |

Table 23. 일표본 검정

|       | 검정값 = 3 |     |              |       |                 |     |
|-------|---------|-----|--------------|-------|-----------------|-----|
|       | t       | 자유도 | 유의확률<br>(양쪽) | 평균차   | 차이의<br>95% 신뢰구간 |     |
|       |         |     |              |       | 하한              | 상한  |
| 구수한 맛 | -1.278  | 29  | .211         | -.267 | -.69            | .16 |

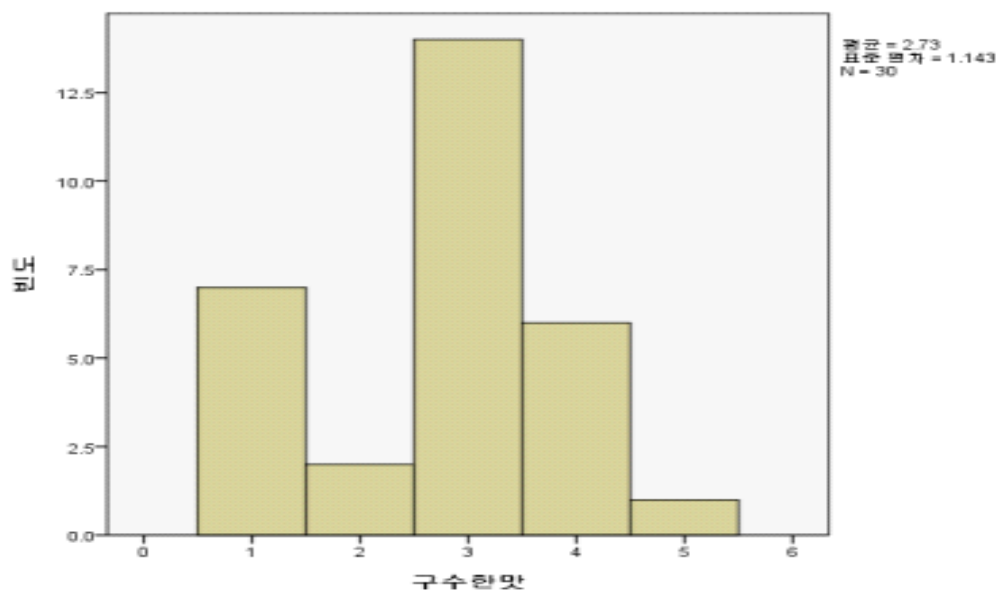


Fig 12. 머위 시제품의 구수한 맛에 대한 선호도 조사 결과

Table 24. 일표본 통계량

|                     | N  | 평균   | 표준편차 | 평균의 표준오차 |
|---------------------|----|------|------|----------|
| 식감-<br>마셨을 때 느낌이 좋다 | 30 | 2.77 | .626 | .114     |

Table 25. 일표본 검정

|                     | 검정값 = 3 |     |              |       |                 |     |
|---------------------|---------|-----|--------------|-------|-----------------|-----|
|                     | t       | 자유도 | 유의확률<br>(양쪽) | 평균차   | 차이의<br>95% 신뢰구간 |     |
|                     |         |     |              |       | 하한              | 상한  |
| 식감-<br>마셨을 때 느낌이 좋다 | -2.041  | 29  | .050         | -.233 | -.47            | .00 |

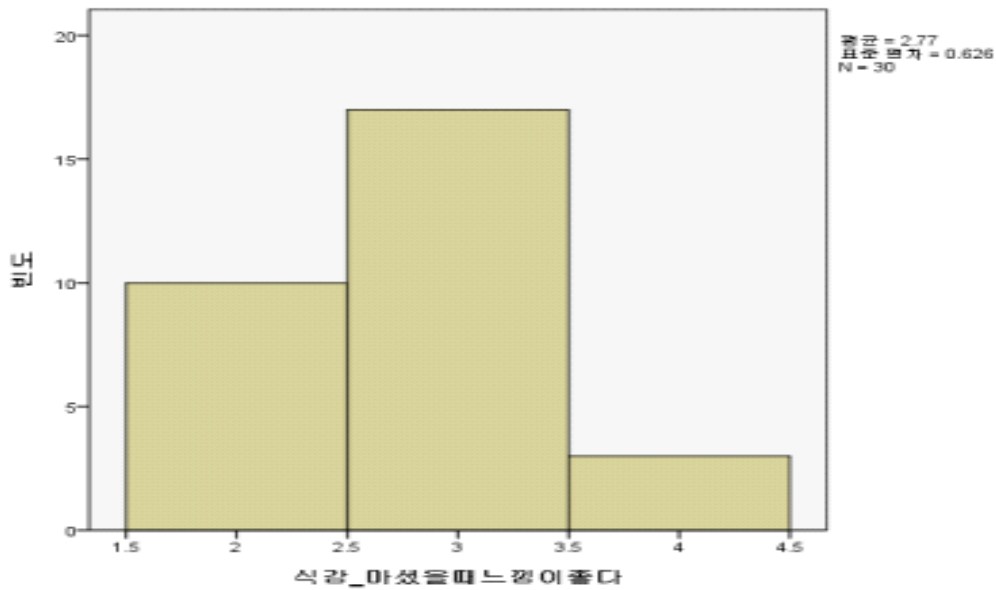


Fig 13. 머위 시제품의 식감 중에서 마셨을 때의 느낌에 대한 선호도 조사 결과



Table 26. 일표본 통계량

|                     | N  | 평균   | 표준편차 | 평균의 표준오차 |
|---------------------|----|------|------|----------|
| 평가- 전반적으로 내 입맛에 맞는다 | 30 | 2.87 | .973 | .178     |

Table 27. 일표본 검정

|                    | t     | 자유도 | 유의 확률<br>(양쪽) | 평균차   | 차이의<br>95% 신뢰구간 |     |
|--------------------|-------|-----|---------------|-------|-----------------|-----|
|                    |       |     |               |       | 하한              | 상한  |
| 평가-전반적으로 내 입맛에 맞는다 | -.750 | 29  | .459          | -.133 | -.50            | .23 |

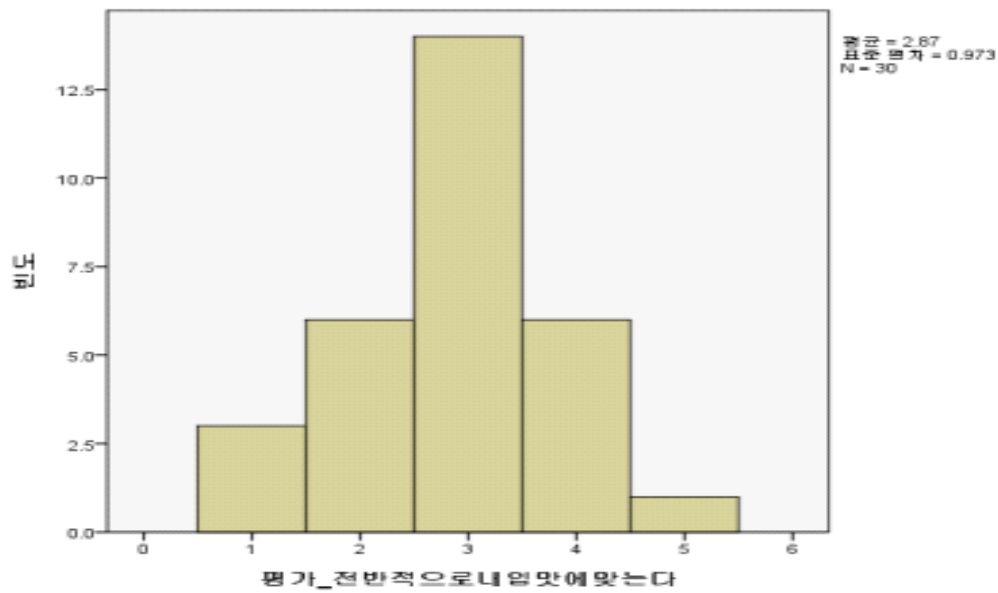


Fig 14. 머위 시제품의 종합평가 중에서 전반적인 맛의 느낌에 대한 선호도 조사 결과

## 2. 머위환제 제조

머위 환제는 생머위를 동결건조하여 생산한 분말을 그림 2의 공정도와 같이 제환기로 압착하여 제조하였다.

Table 29. 머위 환제의 배합비

| 원 료 명     | 합 량  |
|-----------|------|
| 동결건조 머위분말 | 100% |
| 합 계       | 100% |

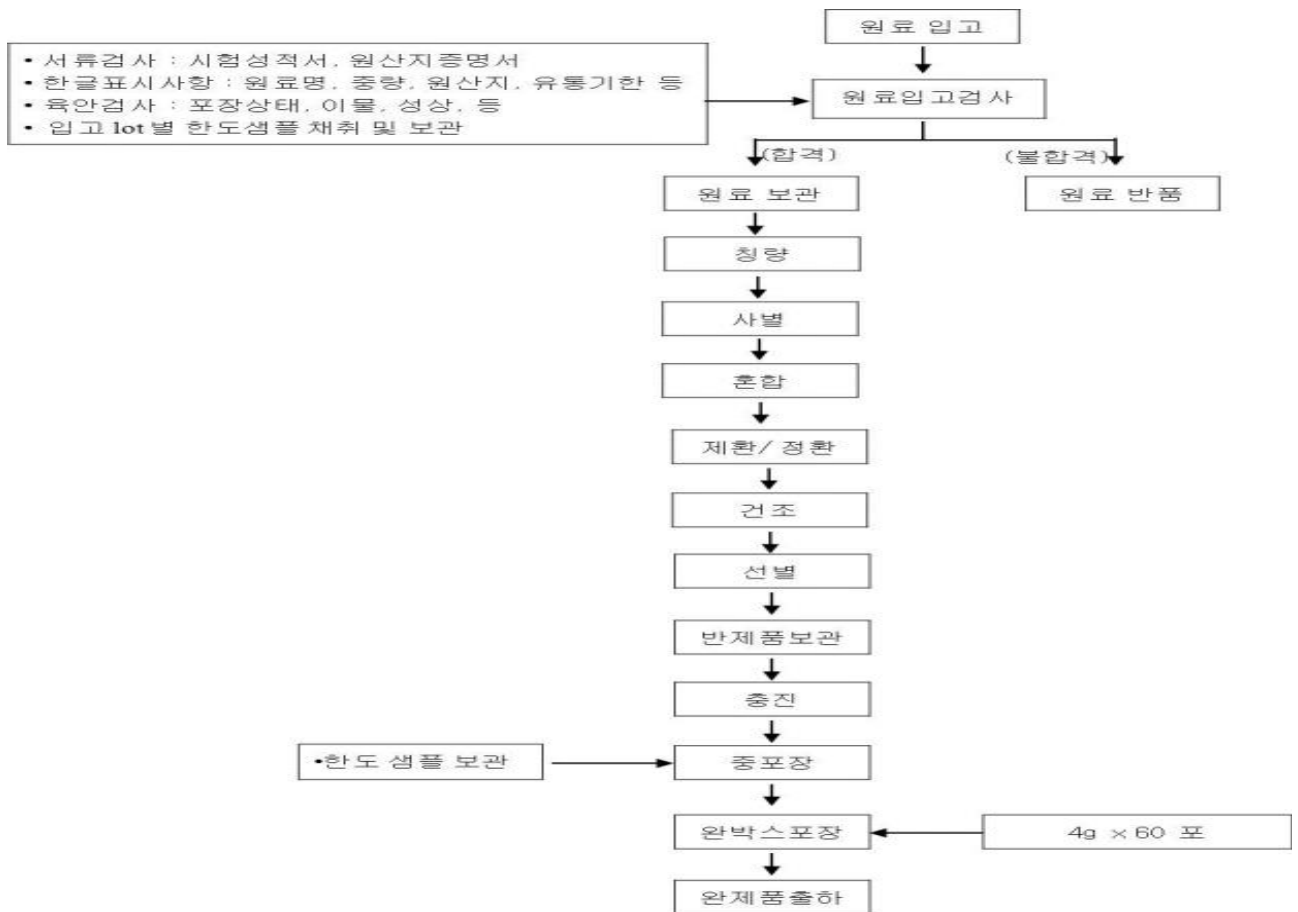


Fig 15. 머위환제의 제조 공정도

Table 30. 머위 환제의 일반성분 및 petasin 함량

| 수분   | 회분    | 조단백질  | 조지방   | Petasin   |
|------|-------|-------|-------|-----------|
| 7.8% | 18.2% | 12.6% | 17.2% | 390 mg/kg |

### 3. 1차 머위음료 시작품 2종 개발

#### 가. 머위 음료의 배합비

##### (1) 시작품 I 배합비

| 원료명 | 배합비    | 투입량 (kg) |
|-----|--------|----------|
| 머위  | 2.0%   | 0.1      |
| 수세미 | 1.5%   | 0.075    |
| 맥문동 | 0.6%   | 0.03     |
| 금은화 | 0.2%   | 0.01     |
| 감초  | 0.4%   | 0.02     |
| 대추  | 1.5%   | 0.075    |
| 정제수 | 93.8%  | 4.69     |
| 총합계 | 100.0% | 5        |

##### (2) 시작품 II 배합비

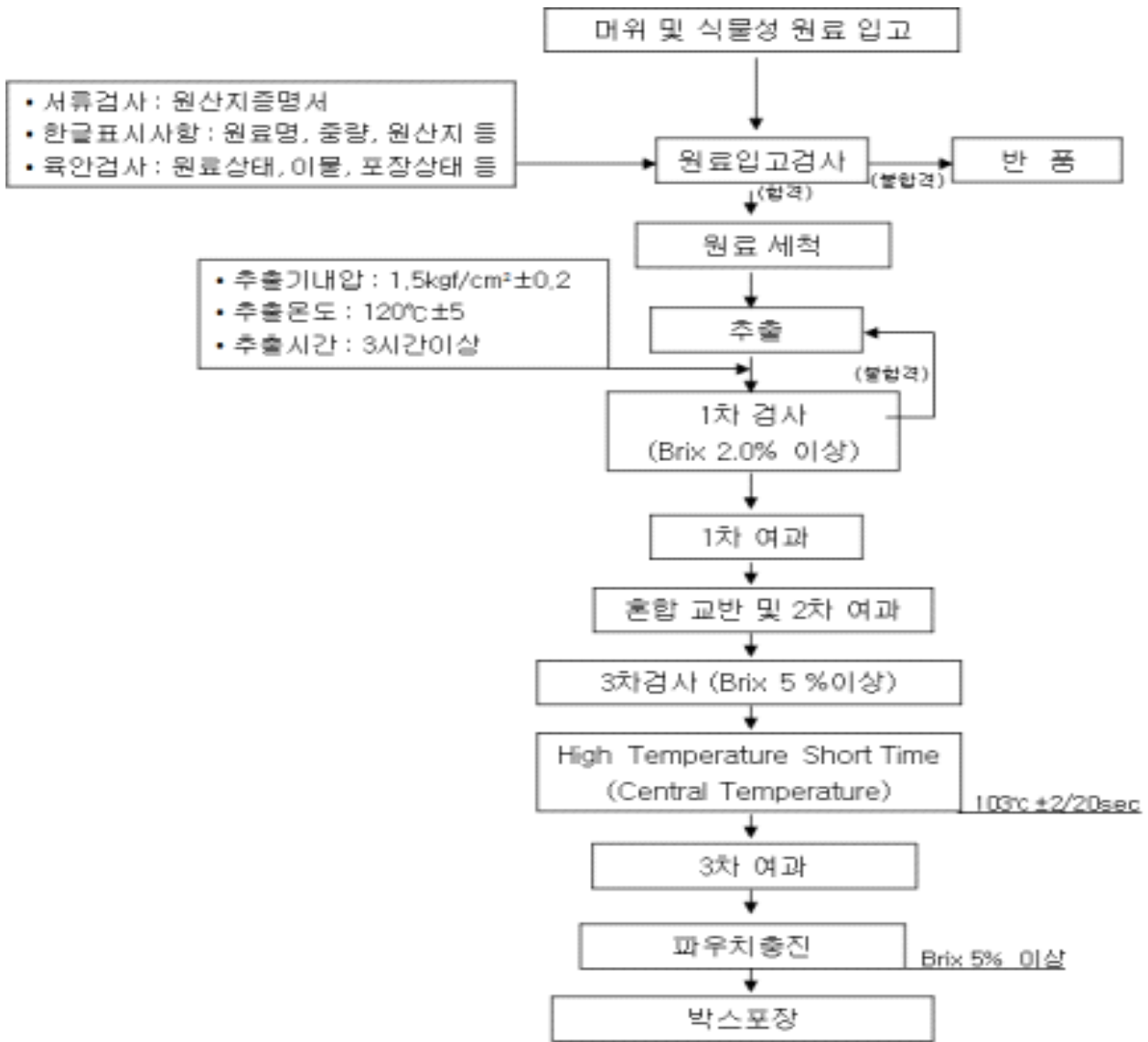
| 원료명 | 배합비    | 투입량 (kg) |
|-----|--------|----------|
| 머위  | 2.0%   | 0.12     |
| 수세미 | 1.5%   | 0.09     |
| 맥문동 | 0.6%   | 0.036    |
| 금은화 | 0.2%   | 0.012    |
| 감초  | 0.4%   | 0.024    |
| 대추  | 1.5%   | 0.09     |
| 도라지 | 1.0%   | 0.06     |
| 정제수 | 92.8%  | 5.568    |
| 총합계 | 100.0% | 6        |

#### 나. 머위 음료제품 제조공정

제3세부과제에서 최적 추출공정으로 도출한 아래의 고온가압추출공정에 따라, 원재료들은 정해진 조성비(위 표 1과 2)에 맞춰 정량 후 고압살수 세척한다. 정제수 투입한 후 3시간이상 추출한다.

- ① 추출조건: 온도  $120\pm 5^{\circ}\text{C}$ , 압력  $1.5\text{kgf/cm}^2 \pm 0.2$
- ② 추출용매: 정제수

다음의 processing chart 에 따라 열수 추출 진행하였다.  
 전체 투입량(원재료+정제수)에 대한 수율은 약 72% 이다.



### 다. 1차 시작품의 관능평가(제3세부과제 협동사항)

#### (1) 관능적 품질검사

음료제품의 관능적품질검사는 시제품의 맛과 향의 관능적 품질을 Moskowitz가 행한 Descriptive sensory analysis법을 사용하여 관능적 품질을 평가하였다.

즉, 냄새에 비교적 민감하고 비흡연자인 10명의 panalist를 선정하여 시제품의 성상, 냄새, 맛, 그리고 종합적 향미에 대한 평가를 scale 0~5(0:미약~ 3:적당~5:과다)를 基準으로 하여, Table 32과 같은 data sheet에 scale을 표시토록 하여 통계처리하였다.

Table 32. 머위 음료 시작품의 관능검사 조사표 (0:미약~ 3:적당~5:과다)

| Scale 0~5<br>(0:약 및 나쁘다~3:적당하다~5: 과다) |                 | 검<br>사<br>자 | 이름   |    |    |    |  |
|---------------------------------------|-----------------|-------------|------|----|----|----|--|
|                                       |                 |             | 전화번호 |    |    |    |  |
|                                       |                 |             | 계좌   |    |    |    |  |
| 주요구분                                  | 항목              | 1차          | 2차   | 3차 | 총점 | 평균 |  |
| 성상                                    | 제품의 빛깔이 아름답다    |             |      |    |    |    |  |
|                                       | 색깔이 음료로서 적당하다   |             |      |    |    |    |  |
|                                       | 마시고 싶은 생각이 든다   |             |      |    |    |    |  |
| 냄새                                    | 향이 좋다           |             |      |    |    |    |  |
|                                       | 향이 적당하게 난다      |             |      |    |    |    |  |
| 맛                                     | 단맛              |             |      |    |    |    |  |
|                                       | 쓴맛              |             |      |    |    |    |  |
|                                       | 시원한 맛           |             |      |    |    |    |  |
|                                       | 떫은 맛            |             |      |    |    |    |  |
|                                       | 구수한 맛           |             |      |    |    |    |  |
| 식감                                    | 마셨을 때 느낌이 좋다    |             |      |    |    |    |  |
| 전반적 평가                                | 전반적으로 내 입맛에 맞는다 |             |      |    |    |    |  |

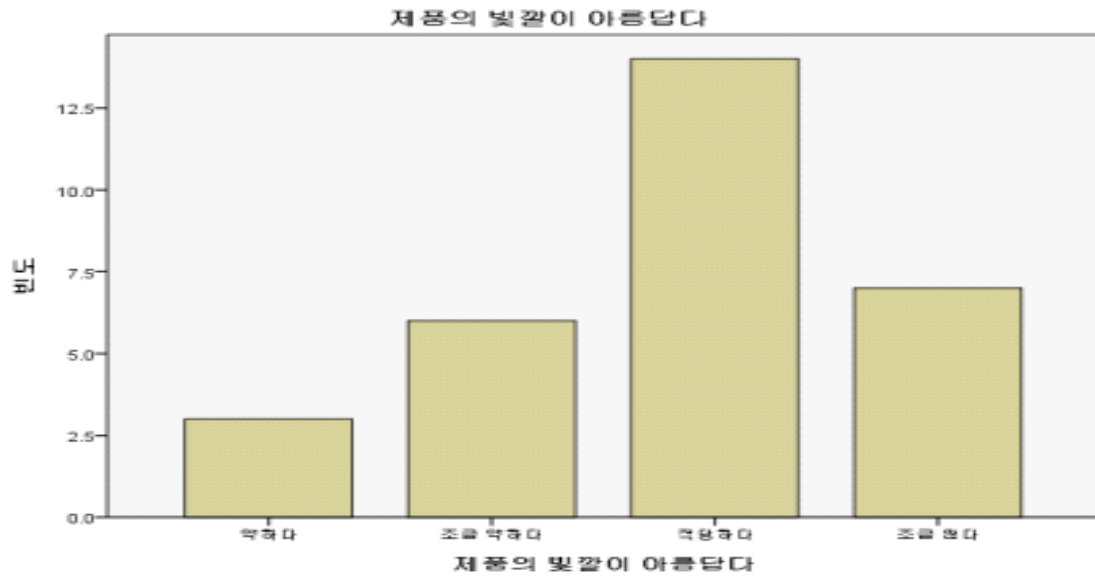
(2) 1차 시작품 I의 관능적 품질평가 결과



Fig 15. 1차 머위음료 시작품 I

제품의 빛깔이 아름답다

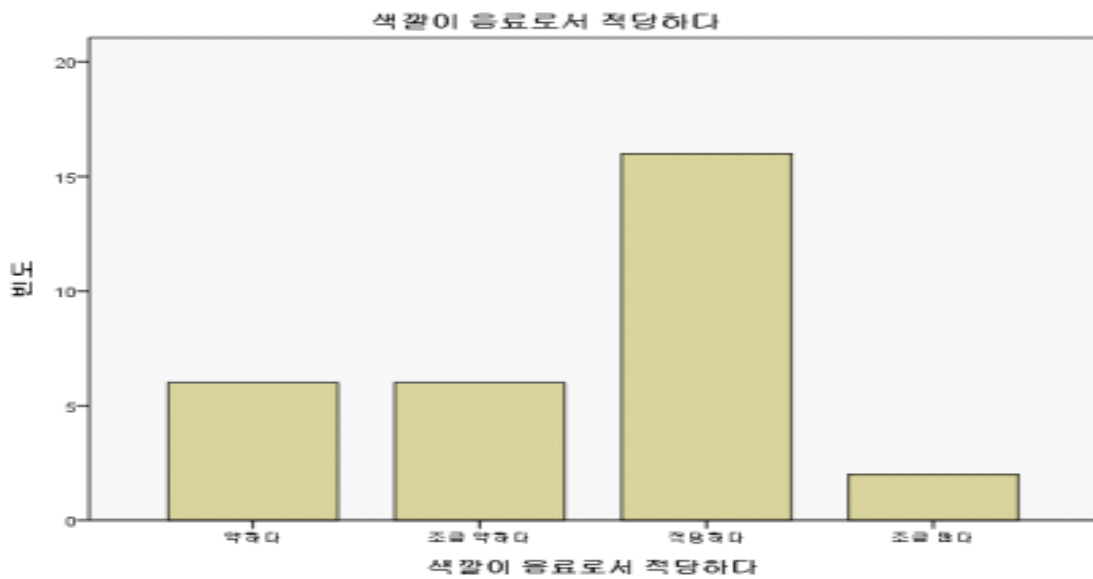
|    |        | 빈도 | 퍼센트   | 유효퍼센트 | 누적퍼센트 |
|----|--------|----|-------|-------|-------|
| 유효 | 약하다    | 3  | 10.0  | 10.0  | 10.0  |
|    | 조금 약하다 | 6  | 20.0  | 20.0  | 30.0  |
|    | 적당하다   | 14 | 46.7  | 46.7  | 76.7  |
|    | 조금 많다  | 7  | 23.3  | 23.3  | 100.0 |
| 합계 |        | 30 | 100.0 | 100.0 |       |





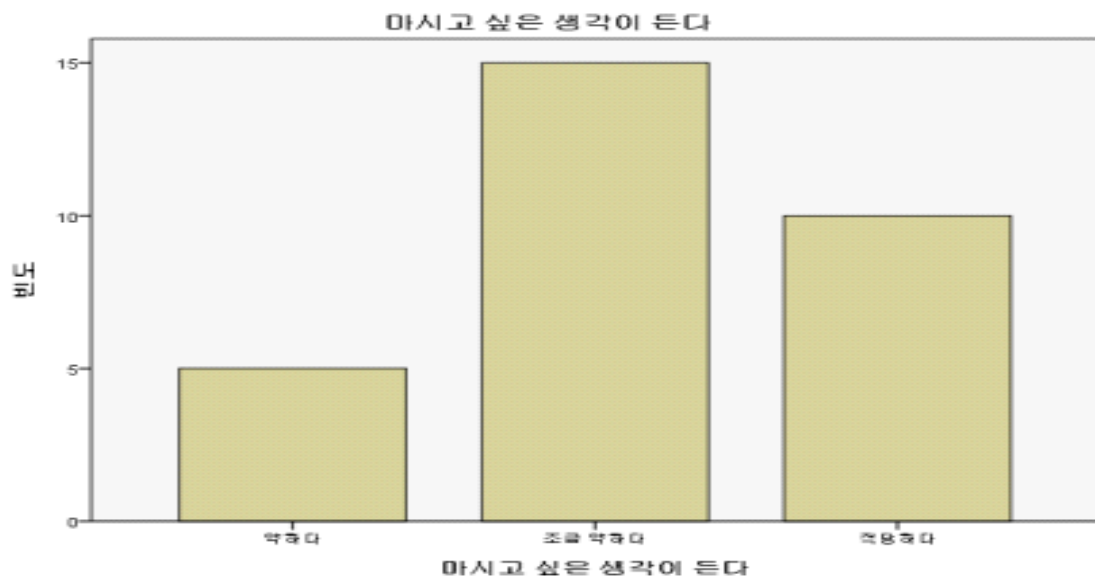
색깔이 음료로서 적당하다

|            | 빈도 | 퍼센트   | 유효퍼센트 | 누적퍼센트 |
|------------|----|-------|-------|-------|
| 약하다        | 6  | 20.0  | 20.0  | 20.0  |
| 조금 약하다     | 6  | 20.0  | 20.0  | 40.0  |
| 유효<br>적당하다 | 16 | 53.3  | 53.3  | 93.3  |
| 조금 많다      | 2  | 6.7   | 6.7   | 100.0 |
| 합계         | 30 | 100.0 | 100.0 |       |



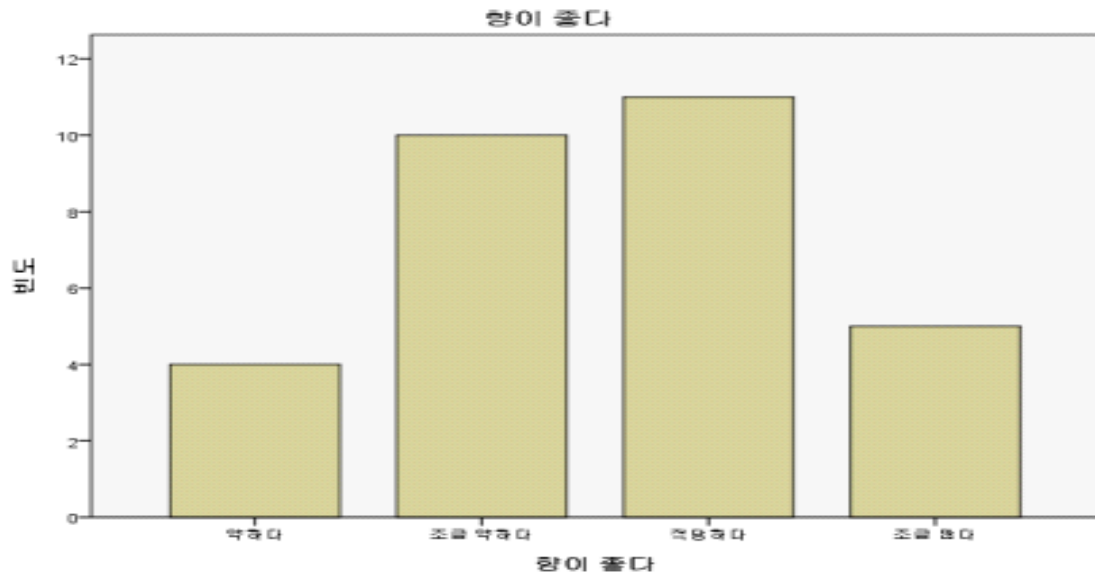
마시고 싶은 생각이 든다

|    |        | 빈도 | 퍼센트   | 유효퍼센트 | 누적퍼센트 |
|----|--------|----|-------|-------|-------|
| 유효 | 약하다    | 5  | 16.7  | 16.7  | 16.7  |
|    | 조금 약하다 | 15 | 50.0  | 50.0  | 66.7  |
|    | 적당하다   | 10 | 33.3  | 33.3  | 100.0 |
|    | 합계     | 30 | 100.0 | 100.0 |       |



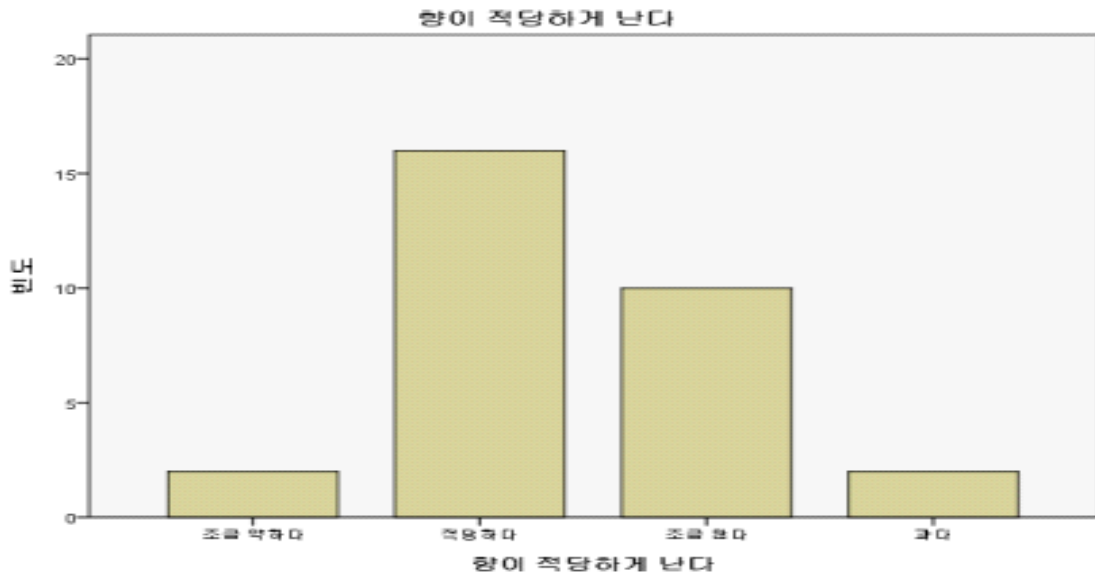
향이 좋다

|            | 빈도 | 퍼센트   | 유효퍼센트 | 누적퍼센트 |
|------------|----|-------|-------|-------|
| 약하다        | 4  | 13.3  | 13.3  | 13.3  |
| 조금 약하다     | 10 | 33.3  | 33.3  | 46.7  |
| 유효<br>적당하다 | 11 | 36.7  | 36.7  | 83.3  |
| 조금 많다      | 5  | 16.7  | 16.7  | 100.0 |
| 합계         | 30 | 100.0 | 100.0 |       |



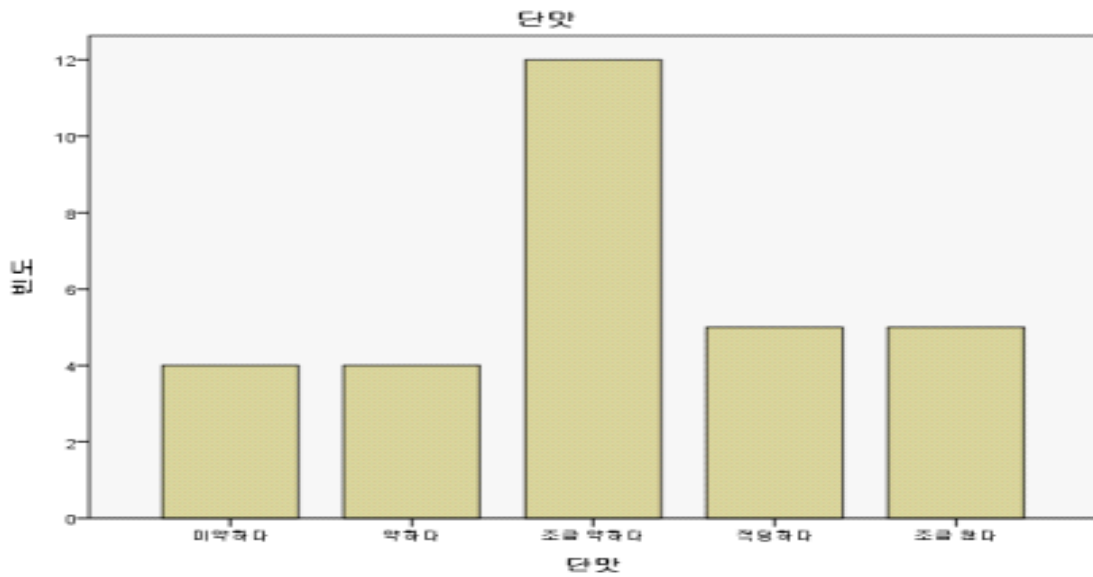
량이 적당하게 난다

|        | 빈도    | 퍼센트   | 유효퍼센트 | 누적퍼센트 |
|--------|-------|-------|-------|-------|
| 약하다    | 2     | 6.7   | 6.7   | 6.7   |
| 조금 약하다 | 16    | 53.3  | 53.3  | 60.0  |
| 유효     | 적당하다  | 10    | 33.3  | 93.3  |
|        | 조금 많다 | 2     | 6.7   | 100.0 |
| 합계     | 30    | 100.0 | 100.0 |       |



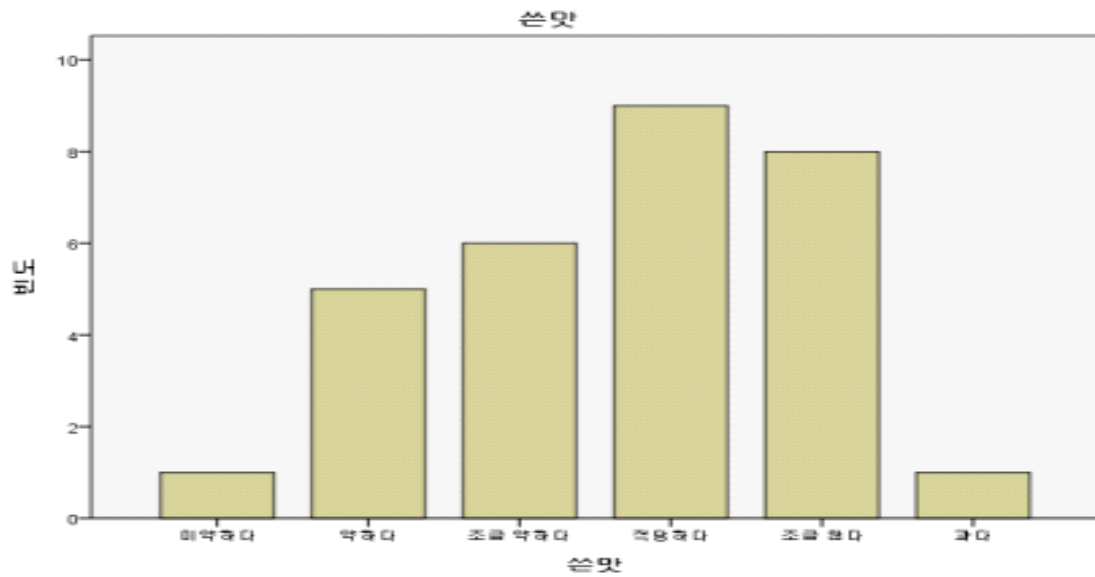
단맛

|    | 빈도     | 퍼센트 | 유효퍼센트 | 누적퍼센트 |
|----|--------|-----|-------|-------|
| 유효 | 미약하다   | 4   | 13.3  | 13.3  |
|    | 약하다    | 4   | 13.3  | 26.7  |
|    | 조금 약하다 | 12  | 40.0  | 66.7  |
|    | 적당하다   | 5   | 16.7  | 83.3  |
|    | 조금 많다  | 5   | 16.7  | 100.0 |
|    | 합계     | 30  | 100.0 | 100.0 |



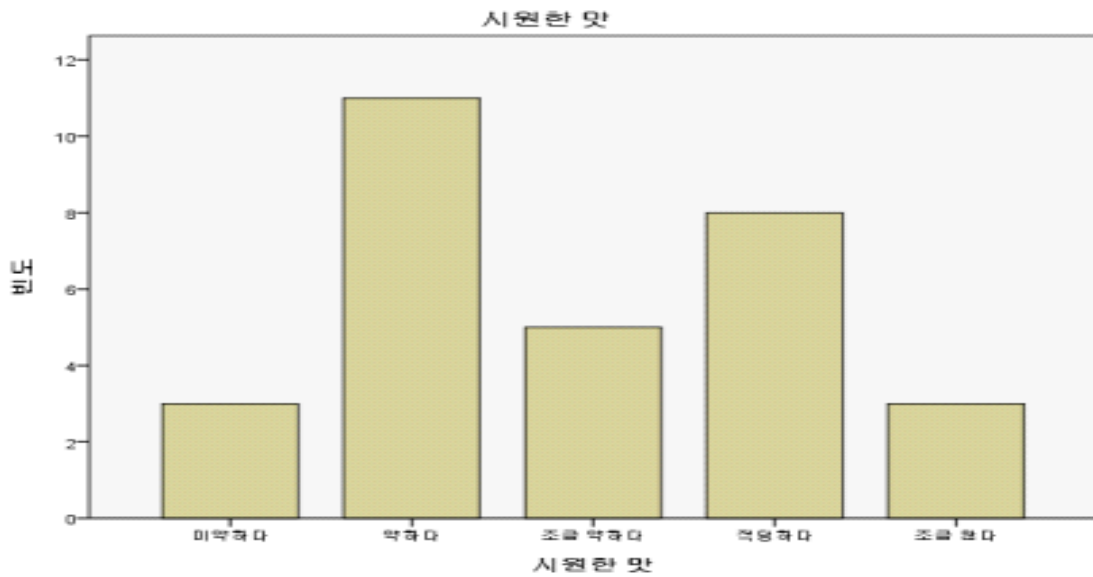
쓴맛

|        | 빈도    | 퍼센트   | 유효퍼센트 | 누적퍼센트 |       |
|--------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 미약하다   | 1     | 3.3   | 3.3   | 3.3   |       |
| 약하다    | 5     | 16.7  | 16.7  | 20.0  |       |
| 조금 약하다 | 6     | 20.0  | 20.0  | 40.0  |       |
| 유효     | 적당하다  | 9     | 30.0  | 30.0  | 70.0  |
|        | 조금 많다 | 8     | 26.7  | 26.7  | 96.7  |
|        | 과다    | 1     | 3.3   | 3.3   | 100.0 |
| 합계     | 30    | 100.0 | 100.0 |       |       |



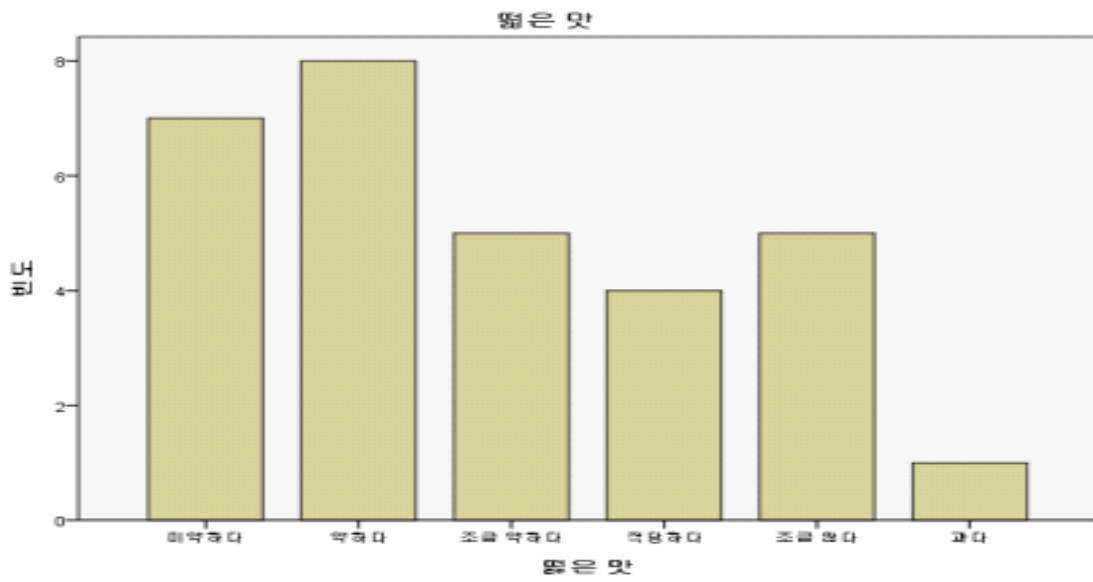
시원한맛

|    | 빈도     | 퍼센트 | 유효퍼센트 | 누적퍼센트 |
|----|--------|-----|-------|-------|
| 유효 | 미약하다   | 3   | 10.0  | 10.0  |
|    | 약하다    | 11  | 36.7  | 46.7  |
|    | 조금 약하다 | 5   | 16.7  | 63.3  |
|    | 적당하다   | 8   | 26.7  | 90.0  |
|    | 조금 많다  | 3   | 10.0  | 100.0 |
|    | 합계     | 30  | 100.0 | 100.0 |



뽕은맛

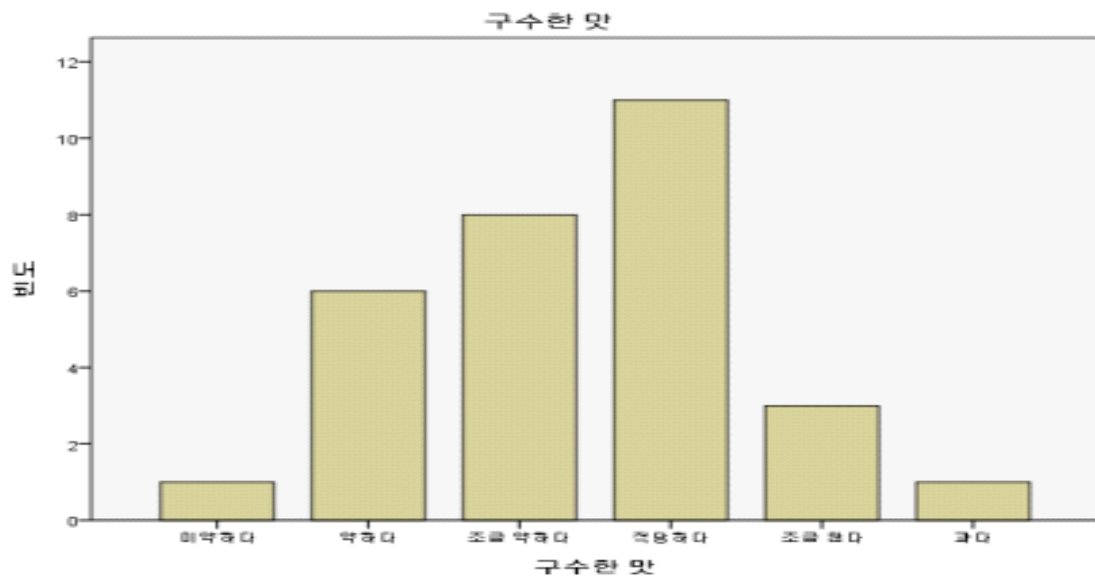
|         | 빈도 | 퍼센트   | 유효퍼센트 | 누적퍼센트 |
|---------|----|-------|-------|-------|
| 미약하다    | 7  | 23.3  | 23.3  | 23.3  |
| 약하다     | 8  | 26.7  | 26.7  | 50.0  |
| 조금 약하다  | 5  | 16.7  | 16.7  | 66.7  |
| 유효 적당하다 | 4  | 13.3  | 13.3  | 80.0  |
| 조금 많다   | 5  | 16.7  | 16.7  | 96.7  |
| 과다      | 1  | 3.3   | 3.3   | 100.0 |
| 합계      | 30 | 100.0 | 100.0 |       |





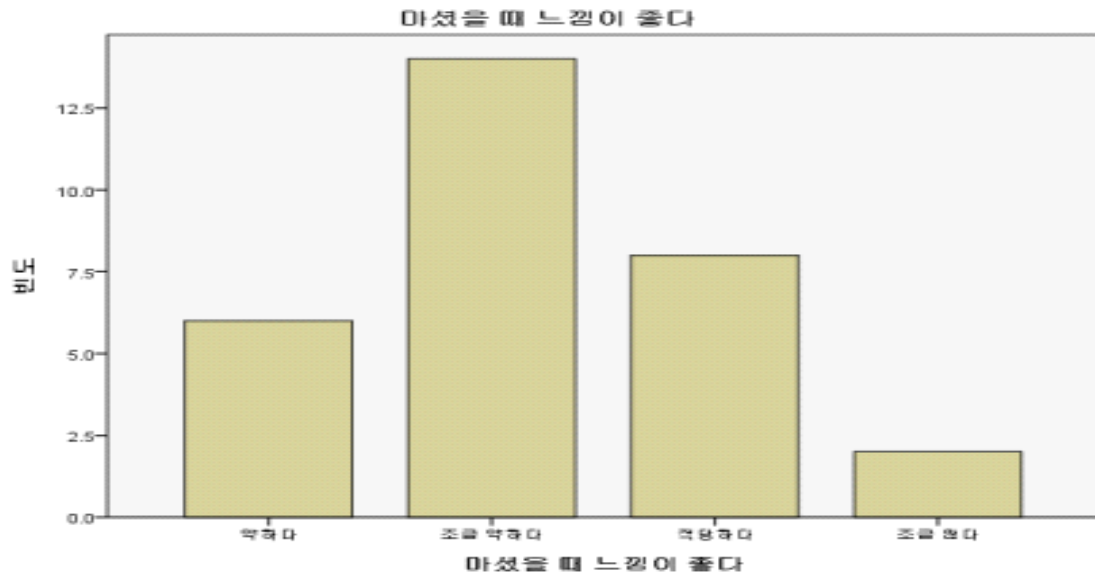
구수한맛

|            | 빈도 | 퍼센트   | 유효퍼센트 | 누적퍼센트 |
|------------|----|-------|-------|-------|
| 미약하다       | 1  | 3.3   | 3.3   | 3.3   |
| 약하다        | 6  | 20.0  | 20.0  | 23.3  |
| 조금 약하다     | 8  | 26.7  | 26.7  | 50.0  |
| 유효<br>적당하다 | 11 | 36.7  | 36.7  | 86.7  |
| 조금 많다      | 3  | 10.0  | 10.0  | 96.7  |
| 과다         | 1  | 3.3   | 3.3   | 100.0 |
| 합계         | 30 | 100.0 | 100.0 |       |



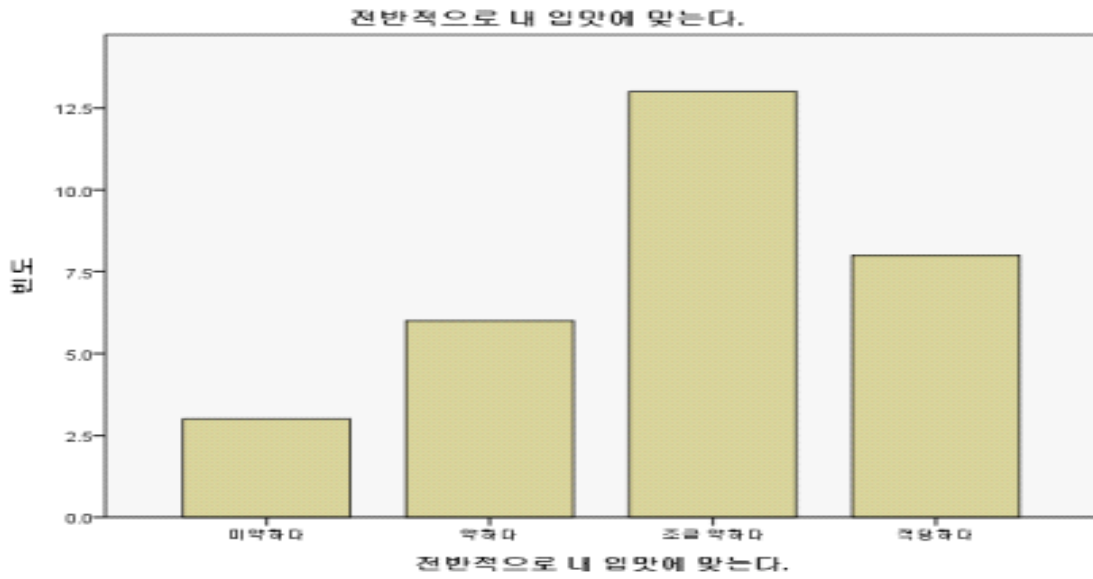
마셨을 때 느낌이 좋다

|    |        | 빈도 | 퍼센트   | 유효퍼센트 | 누적퍼센트 |
|----|--------|----|-------|-------|-------|
| 유효 | 약하다    | 6  | 20.0  | 20.0  | 20.0  |
|    | 조금 약하다 | 14 | 46.7  | 46.7  | 66.7  |
|    | 적당하다   | 8  | 26.7  | 26.7  | 93.3  |
|    | 조금 많다  | 2  | 6.7   | 6.7   | 100.0 |
| 합계 |        | 30 | 100.0 | 100.0 |       |



전반적으로 내 입맛에 맞는다

|    | 빈도     | 퍼센트 | 유효퍼센트 | 누적퍼센트 |
|----|--------|-----|-------|-------|
|    | 미약하다   | 3   | 10.0  | 10.0  |
|    | 약하다    | 6   | 20.0  | 30.0  |
| 유효 | 조금 약하다 | 13  | 43.3  | 73.3  |
|    | 적당하다   | 8   | 26.7  | 100.0 |
| 합계 |        | 30  | 100.0 | 100.0 |



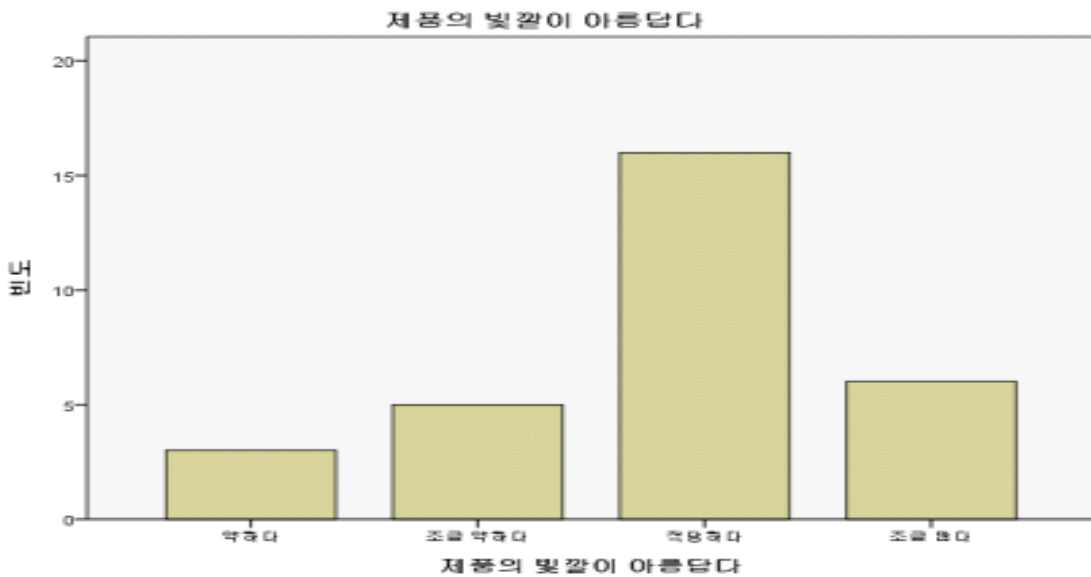
(3) 1차 시작품 II의 관능적 품질평가 결과



Fig 16. 1차 머위 음료 시작품 II

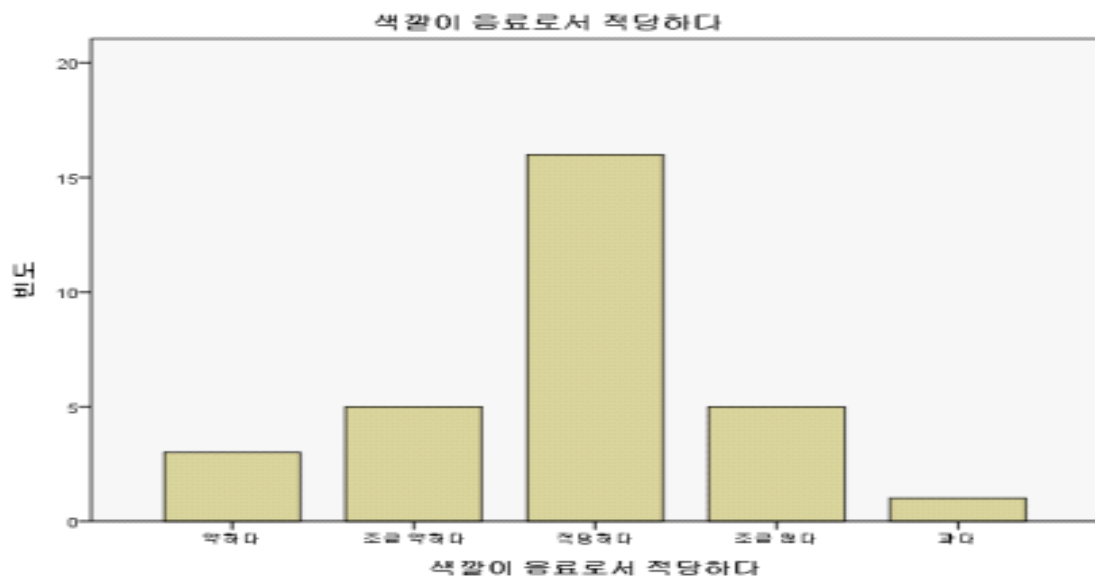
제품의 빛깔이 아름답다

|            | 빈도 | 퍼센트   | 유효퍼센트 | 누적퍼센트 |
|------------|----|-------|-------|-------|
| 약하다        | 3  | 10.0  | 10.0  | 10.0  |
| 조금 약하다     | 5  | 16.7  | 16.7  | 26.7  |
| 유효<br>적당하다 | 16 | 53.3  | 53.3  | 80.0  |
| 조금 많다      | 6  | 20.0  | 20.0  | 100.0 |
| 합계         | 30 | 100.0 | 100.0 |       |



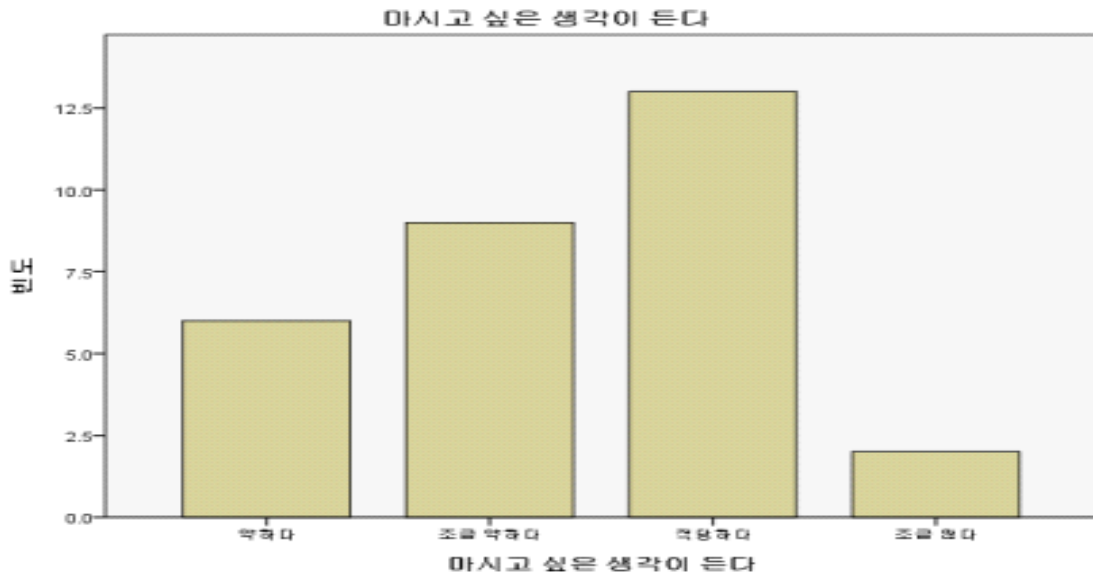
색깔이 음료로서 적당하다

|    | 빈도     | 퍼센트   | 유효퍼센트 | 누적퍼센트 |
|----|--------|-------|-------|-------|
| 유효 | 약하다    | 3     | 10.0  | 10.0  |
|    | 조금 약하다 | 5     | 16.7  | 26.7  |
|    | 적당하다   | 16    | 53.3  | 80.0  |
|    | 조금 많다  | 5     | 16.7  | 96.7  |
|    | 과다     | 1     | 3.3   | 100.0 |
| 합계 | 30     | 100.0 | 100.0 |       |



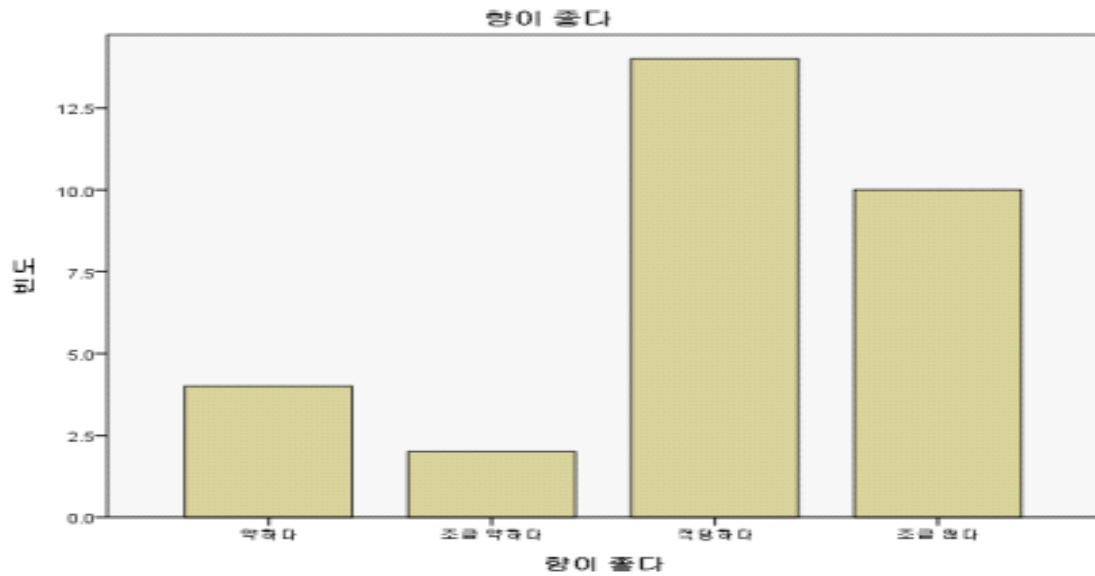
마시고 싶은 생각이 든다

|    | 빈도     | 퍼센트 | 유효퍼센트 | 누적퍼센트 |
|----|--------|-----|-------|-------|
|    | 약하다    | 6   | 20.0  | 20.0  |
|    | 조금 약하다 | 9   | 30.0  | 50.0  |
| 유효 | 적당하다   | 13  | 43.3  | 93.3  |
|    | 조금 많다  | 2   | 6.7   | 100.0 |
| 합계 |        | 30  | 100.0 | 100.0 |



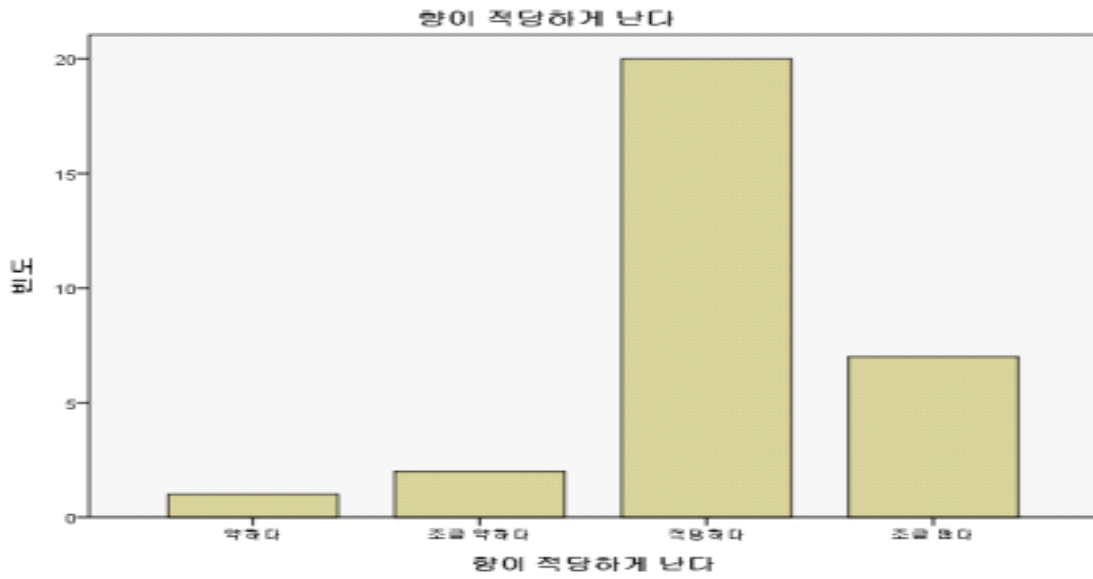
량이 좋다

|    |        | 빈도 | 퍼센트   | 유효퍼센트 | 누적퍼센트 |
|----|--------|----|-------|-------|-------|
| 유효 | 약하다    | 4  | 13.3  | 13.3  | 13.3  |
|    | 조금 약하다 | 2  | 6.7   | 6.7   | 20.0  |
|    | 적당하다   | 14 | 46.7  | 46.7  | 66.7  |
|    | 조금 많다  | 10 | 33.3  | 33.3  | 100.0 |
| 합계 |        | 30 | 100.0 | 100.0 |       |



향이 적당하게 난다

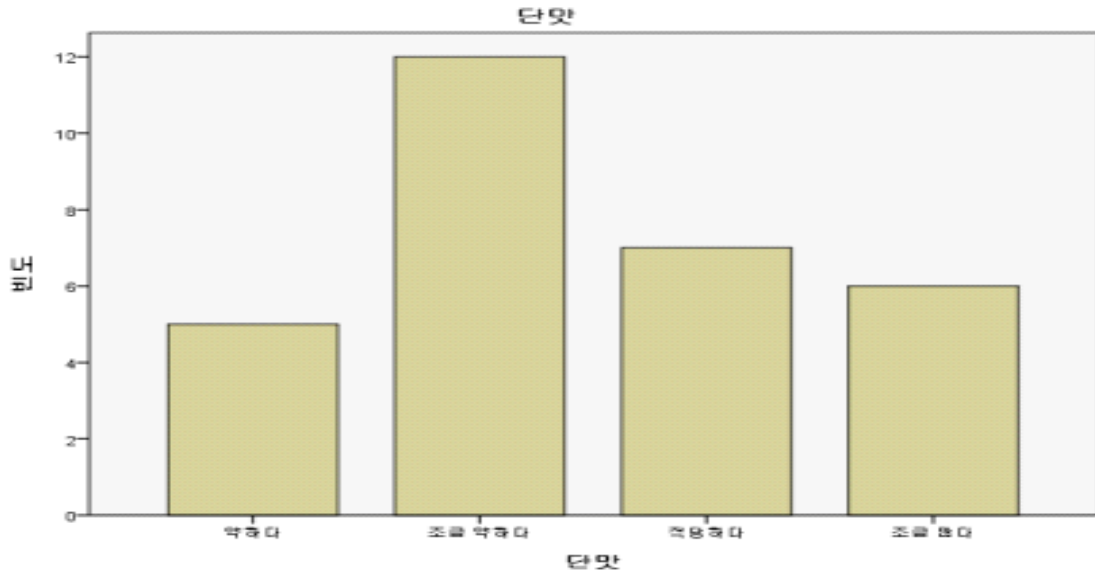
|        | 빈도    | 퍼센트   | 유효퍼센트 | 누적퍼센트 |
|--------|-------|-------|-------|-------|
| 약하다    | 1     | 3.3   | 3.3   | 3.3   |
| 조금 약하다 | 2     | 6.7   | 6.7   | 10.0  |
| 유효     | 적당하다  | 20    | 66.7  | 76.7  |
|        | 조금 많다 | 7     | 23.3  | 100.0 |
| 합계     | 30    | 100.0 | 100.0 |       |





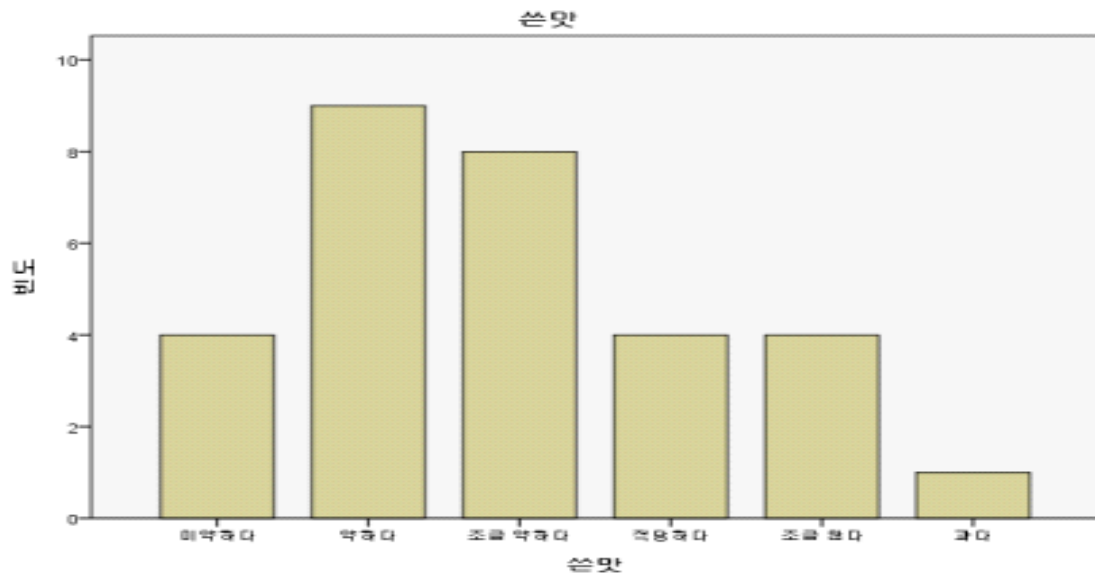
단맛

|         | 빈도 | 퍼센트   | 유효퍼센트 | 누적퍼센트 |
|---------|----|-------|-------|-------|
| 약하다     | 5  | 16.7  | 16.7  | 16.7  |
| 조금 약하다  | 12 | 40.0  | 40.0  | 56.7  |
| 유효 적당하다 | 7  | 23.3  | 23.3  | 80.0  |
| 조금 많다   | 6  | 20.0  | 20.0  | 100.0 |
| 합계      | 30 | 100.0 | 100.0 |       |



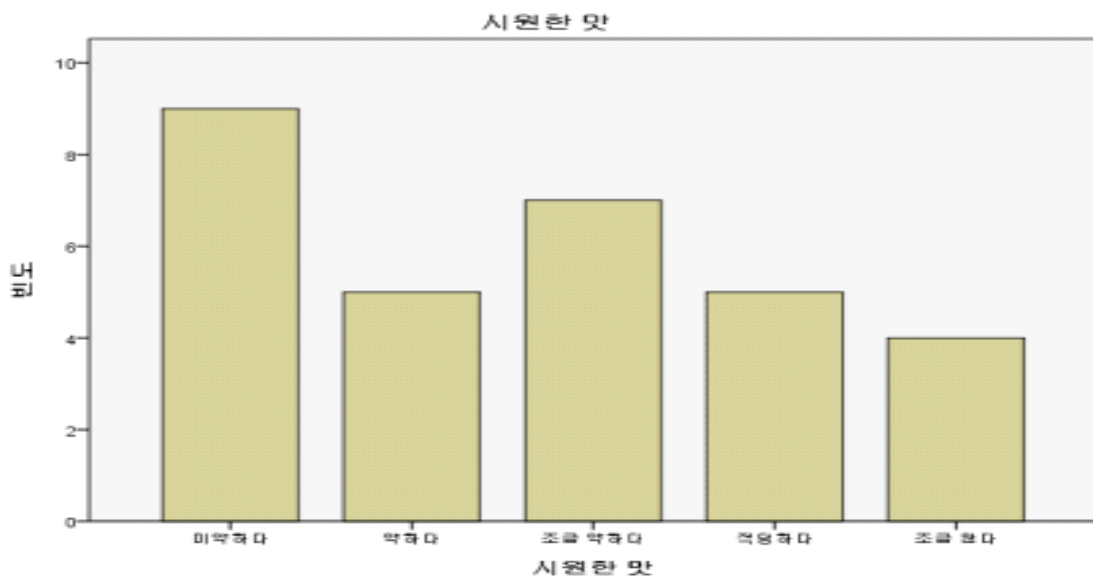
쓴맛

|         | 빈도 | 퍼센트   | 유효퍼센트 | 누적퍼센트 |
|---------|----|-------|-------|-------|
| 미약하다    | 4  | 13.3  | 13.3  | 13.3  |
| 약하다     | 9  | 30.0  | 30.0  | 43.3  |
| 조금 약하다  | 8  | 26.7  | 26.7  | 70.0  |
| 유효 적당하다 | 4  | 13.3  | 13.3  | 83.3  |
| 조금 많다   | 4  | 13.3  | 13.3  | 96.7  |
| 과다      | 1  | 3.3   | 3.3   | 100.0 |
| 합계      | 30 | 100.0 | 100.0 |       |



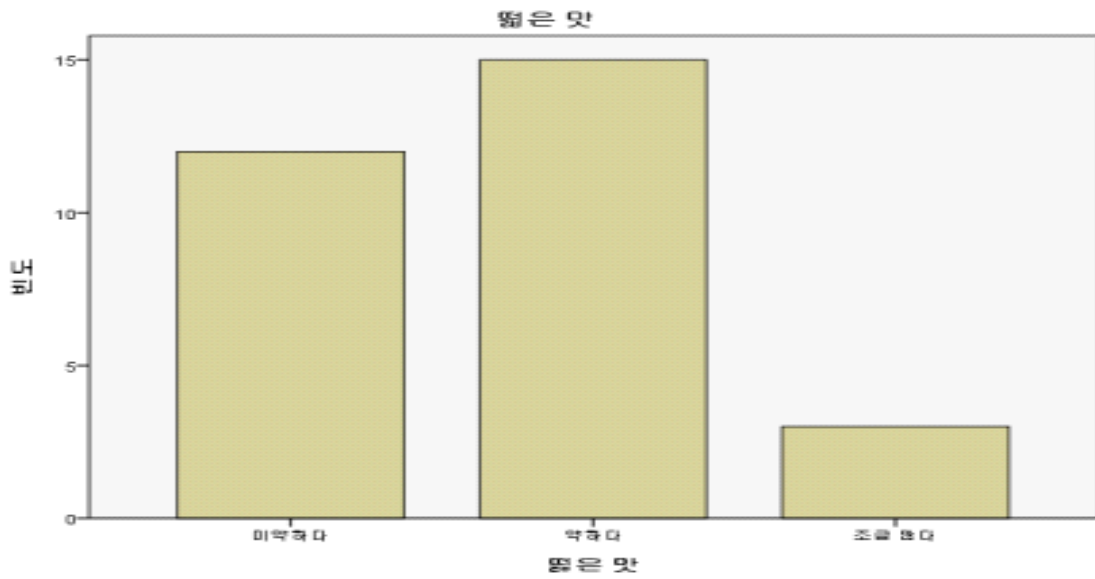
시원한맛

|    | 빈도     | 퍼센트 | 유효퍼센트 | 누적퍼센트 |
|----|--------|-----|-------|-------|
| 유효 | 미약하다   | 9   | 30.0  | 30.0  |
|    | 약하다    | 5   | 16.7  | 46.7  |
|    | 조금 약하다 | 7   | 23.3  | 70.0  |
|    | 적당하다   | 5   | 16.7  | 86.7  |
|    | 조금 많다  | 4   | 13.3  | 100.0 |
|    | 합계     | 30  | 100.0 | 100.0 |



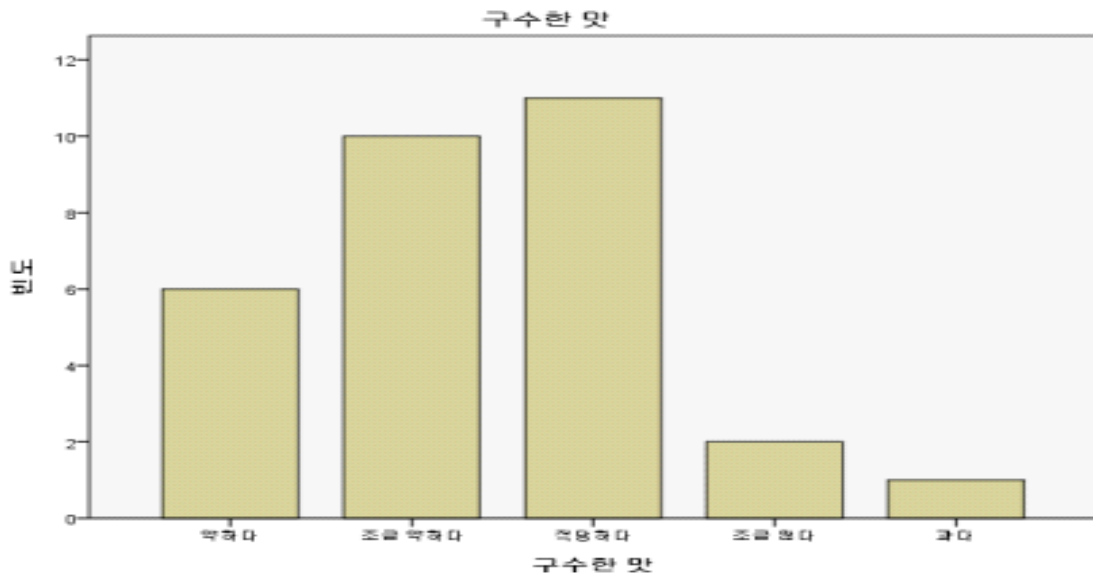
뽕은맛

|    | 빈도    | 퍼센트 | 유효퍼센트 | 누적퍼센트 |
|----|-------|-----|-------|-------|
| 유효 | 미약하다  | 12  | 40.0  | 40.0  |
|    | 약하다   | 15  | 50.0  | 90.0  |
|    | 조금 많다 | 3   | 10.0  | 100.0 |
|    | 합계    | 30  | 100.0 | 100.0 |



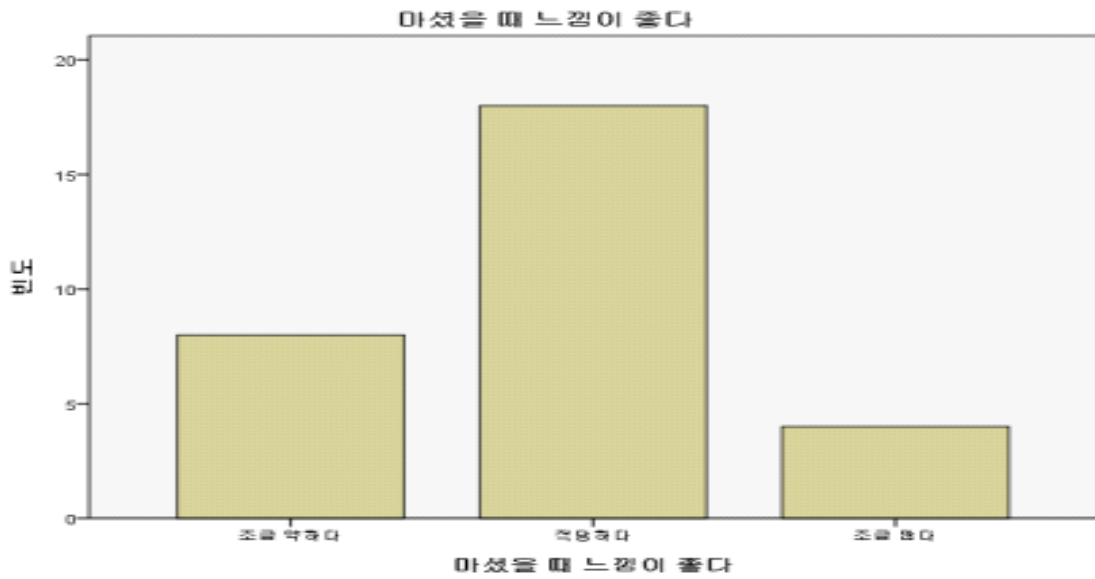
구수한맛

|    | 빈도     | 퍼센트   | 유효퍼센트 | 누적퍼센트 |
|----|--------|-------|-------|-------|
| 유효 | 약하다    | 6     | 20.0  | 20.0  |
|    | 조금 약하다 | 10    | 33.3  | 53.3  |
|    | 적당하다   | 11    | 36.7  | 90.0  |
|    | 조금 많다  | 2     | 6.7   | 96.7  |
|    | 과다     | 1     | 3.3   | 100.0 |
| 합계 | 30     | 100.0 | 100.0 |       |



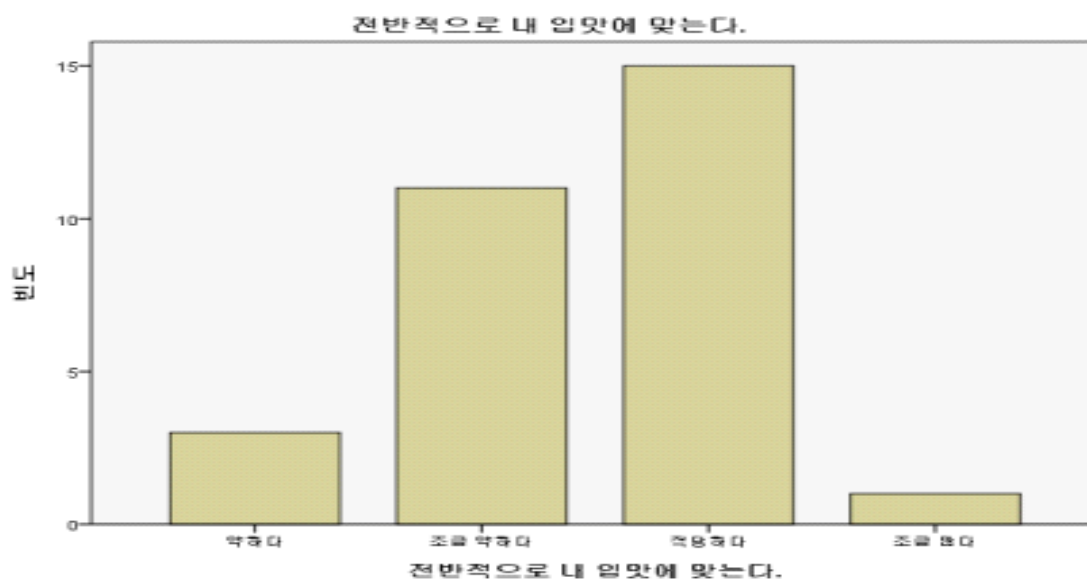
마셨을 때 느낌이 좋다

|    |        | 빈도 | 퍼센트   | 유효퍼센트 | 누적퍼센트 |
|----|--------|----|-------|-------|-------|
| 유효 | 조금 약하다 | 8  | 26.7  | 26.7  | 26.7  |
|    | 적당하다   | 18 | 60.0  | 60.0  | 86.7  |
|    | 조금 많다  | 4  | 13.3  | 13.3  | 100.0 |
|    | 합계     | 30 | 100.0 | 100.0 |       |



### 전반적으로 내 입 맛에 맞는다

|         | 빈도 | 퍼센트   | 유효퍼센트 | 누적퍼센트 |
|---------|----|-------|-------|-------|
| 약하다     | 3  | 10.0  | 10.0  | 10.0  |
| 조금 약하다  | 11 | 36.7  | 36.7  | 46.7  |
| 유효 적당하다 | 15 | 50.0  | 50.0  | 96.7  |
| 조금 많다   | 1  | 3.3   | 3.3   | 100.0 |
| 합계      | 30 | 100.0 | 100.0 |       |



#### 4. 2차 머위음료 시작품 2종 개발

제2 및 제3세부과제에서,  $\beta$ -hexosaminidase측정을 통한 탈과립 반응 측정을 통한 1차 시작품의 부원료인 도라지의 항알레르기 효능이 미약하다는 검토 결과에 따라, 2차 시작품에서 도라지를 제외시키고, 1차 시작품의 관능평가 결과에서 쓴맛과 향이 너무 강하고 단맛과 청량감이 부족하다는 평가에 의하여 배합비를 개선하여 제조하였다.

가. 머위 음료의 배합비

(1) 시작품 I 배합비

| 원료명 | 배합비    | 투입량 (kg) |
|-----|--------|----------|
| 머위  | 2.0%   | 0.100    |
| 수세미 | 1.5%   | 0.075    |
| 형계  | 0.2%   | 0.010    |
| 금은화 | 0.1%   | 0.005    |
| 감초  | 0.4%   | 0.020    |
| 대추  | 1.0%   | 0.050    |
| 천문동 | 0.6%   | 0.030    |
| 정제수 | 94.8%  | 4.740    |
| 총합계 | 100.0% | 5        |

(2) 시작품 II 배합비

| 원료명 | 배합비    | 투입량 (kg) |
|-----|--------|----------|
| 머위  | 2.0%   | 0.100    |
| 수세미 | 1.5%   | 0.075    |
| 형계  | 0.2%   | 0.010    |
| 금은화 | 0.2%   | 0.010    |
| 감초  | 0.4%   | 0.020    |
| 대추  | 0.5%   | 0.025    |
| 천문동 | 0.6%   | 0.030    |
| 정제수 | 95.2%  | 4.760    |
| 총합계 | 100.0% | 5        |

(3) 시작품 III 배합비



| 원료명                      | 배합비    | 투입량 (kg) |
|--------------------------|--------|----------|
| 머위                       | 2.0%   | 0.100    |
| 수세미                      | 1.5%   | 0.075    |
| 형계                       | 0.2%   | 0.010    |
| 금은화                      | 0.2%   | 0.010    |
| 감초                       | 0.4%   | 0.020    |
| 대추                       | 0.5%   | 0.025    |
| 천문동                      | 0.6%   | 0.030    |
| 배즙 농축액<br>(Brix 72 % 이상) | 4.0%   | 0.200    |
| 정제수                      | 91.2%  | 4.560    |
| 총합계                      | 100.0% | 5        |

#### 나. 머위 음료제품 제조 공정

1차 시작품의 추출과정 및 제조 공정 동일하게 시행하였음.



Fig 17. 2차 머위음료 시작품

#### 다. 2차 시작품의 관능평가(제3세부과제 협동사항)

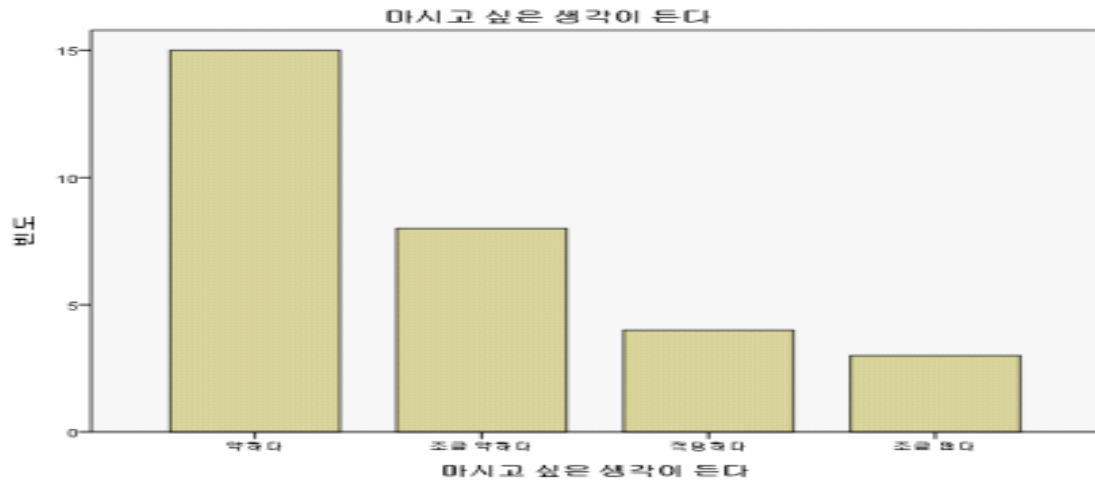
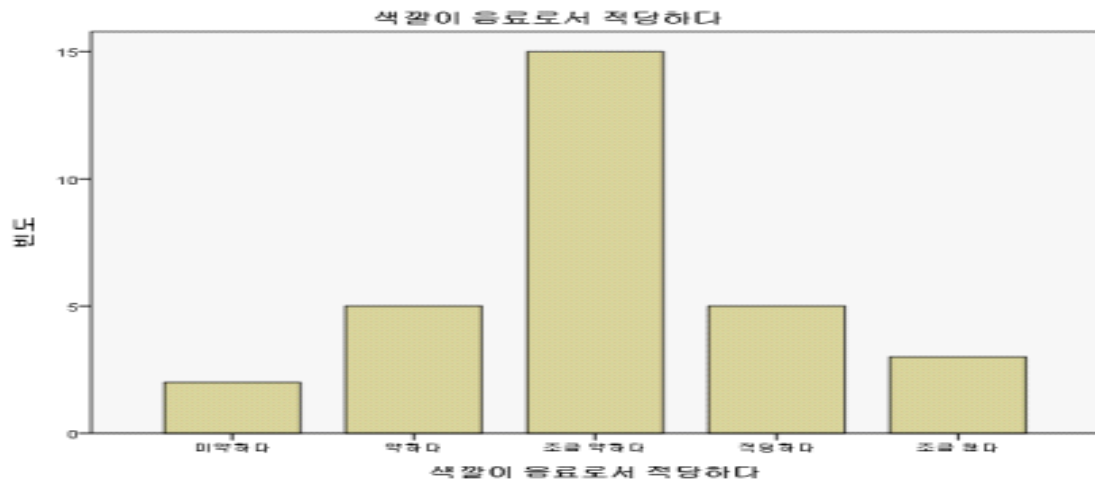
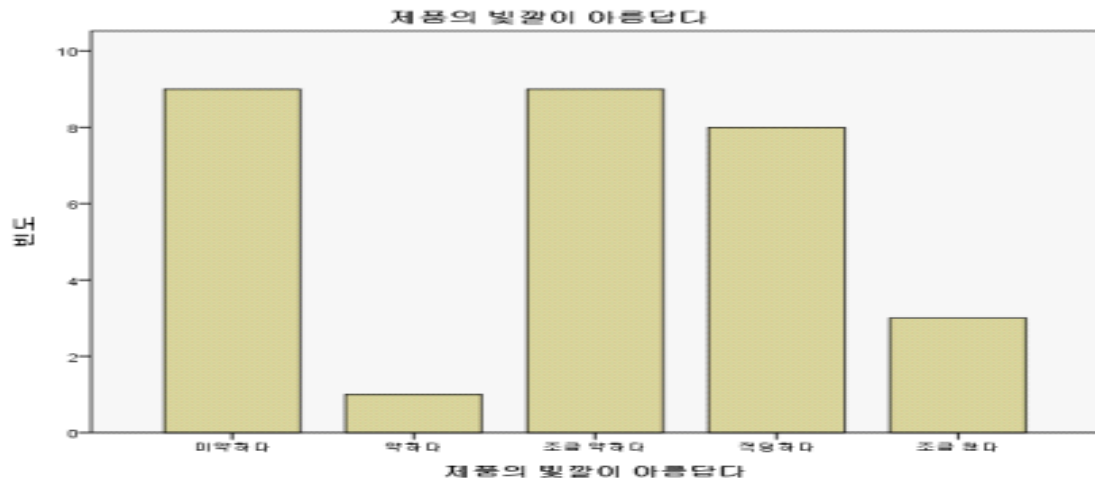
##### (1) 관능적 품질검사

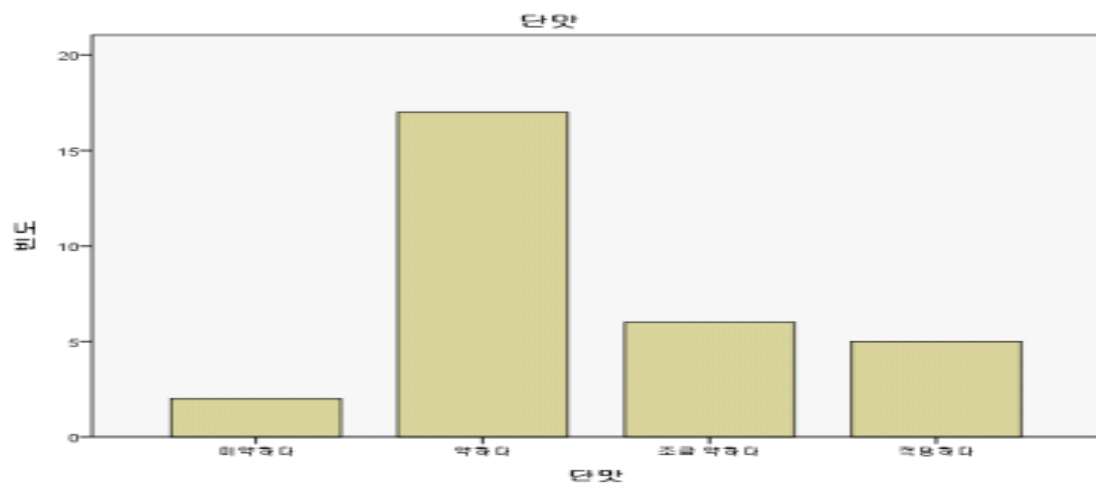
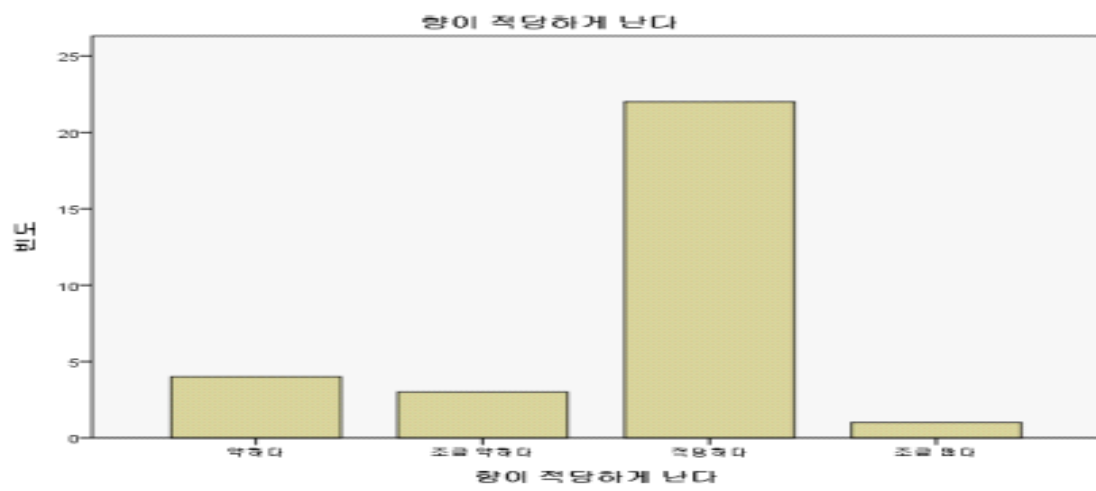
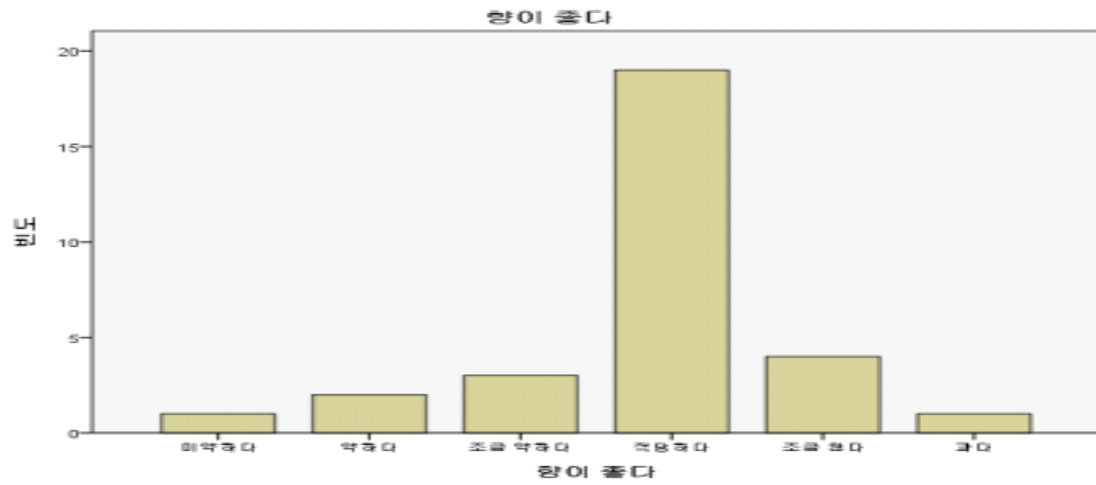
1차 시작품의 관능평가 방법과 동일 함.

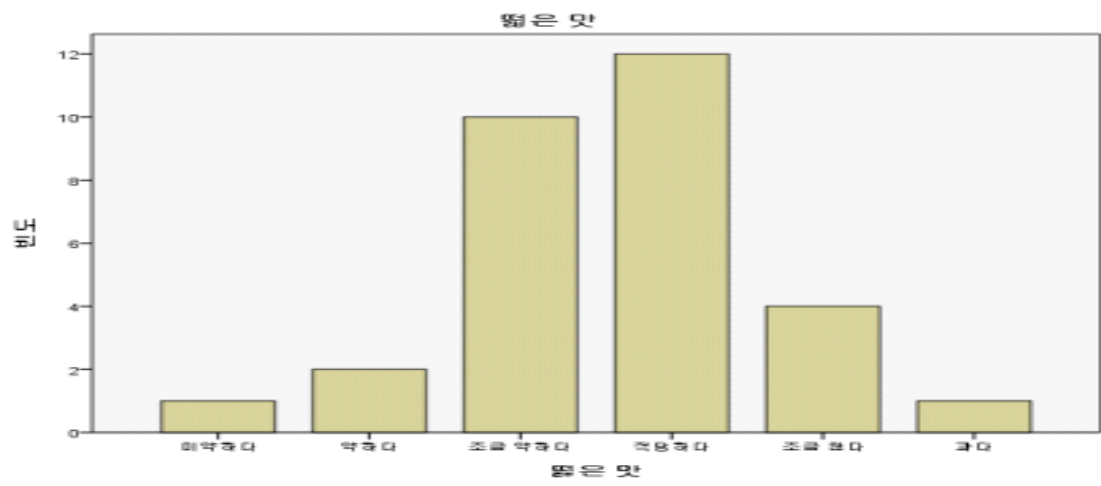
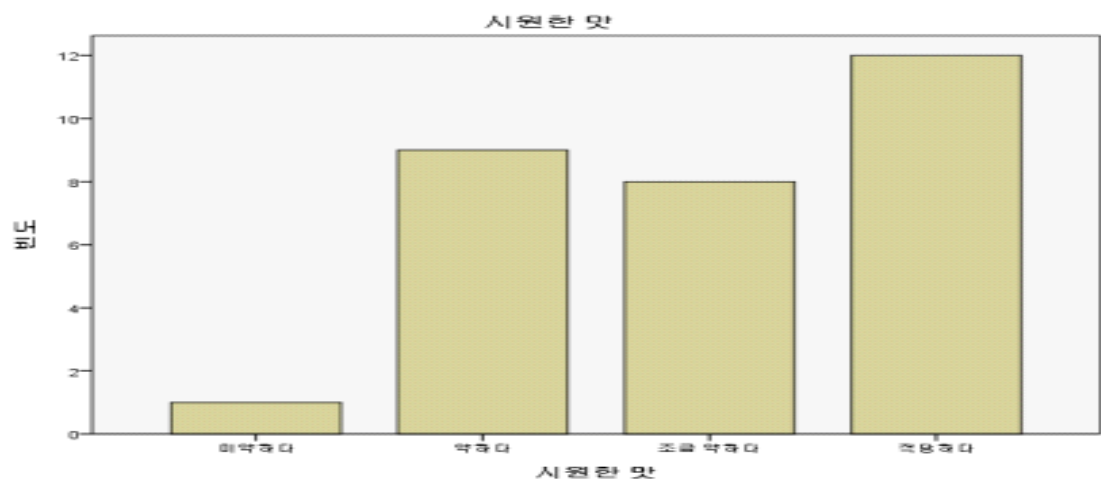
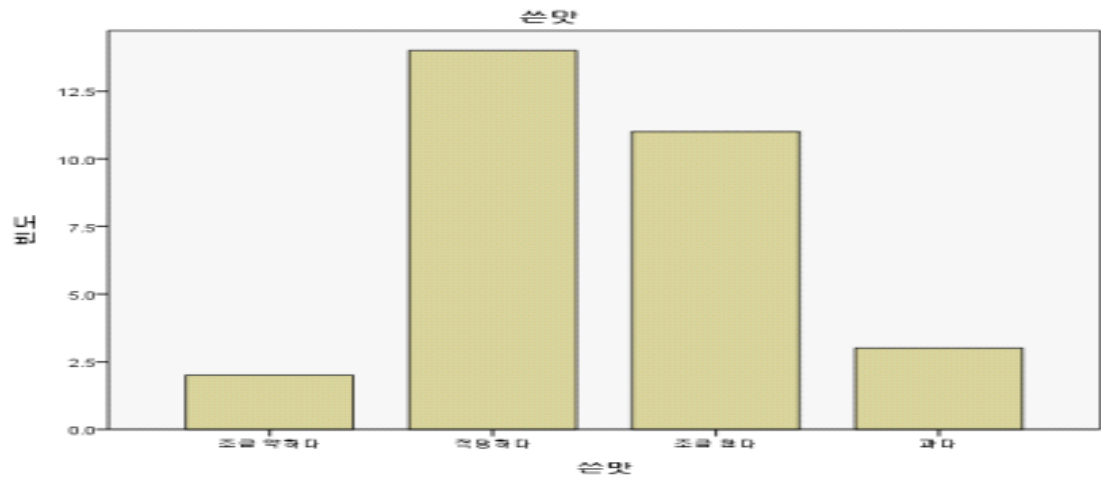
##### (2) 2차 시작품 I 의 관능적 품질평가 결과

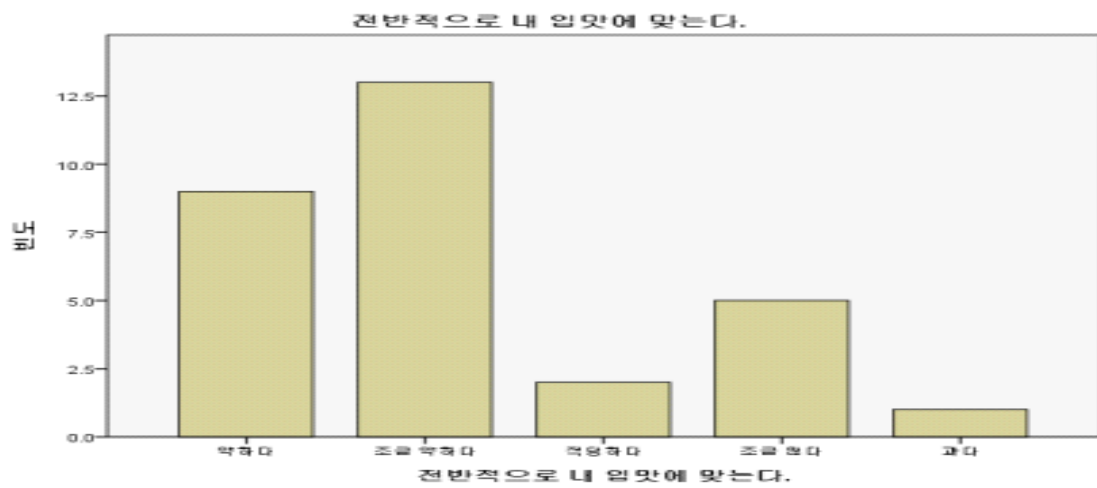
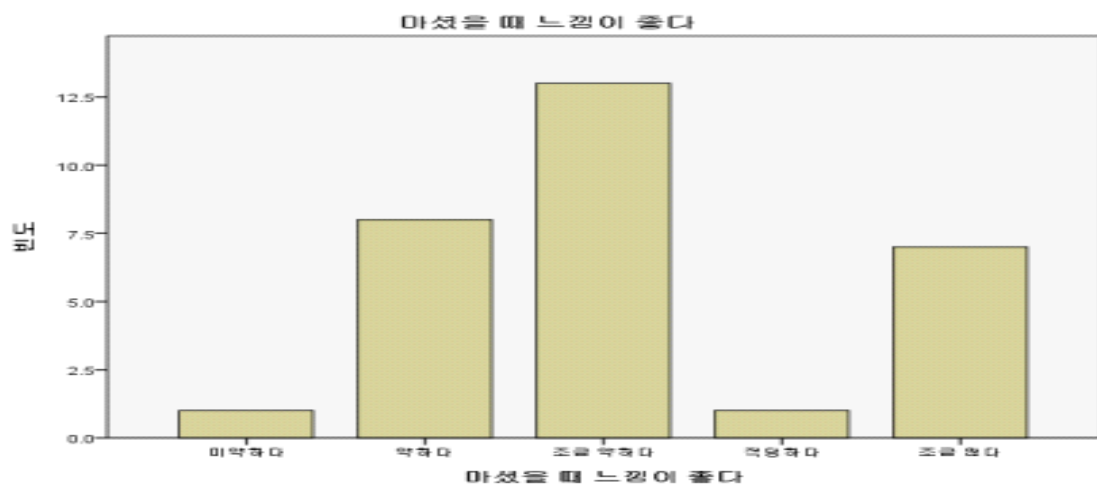
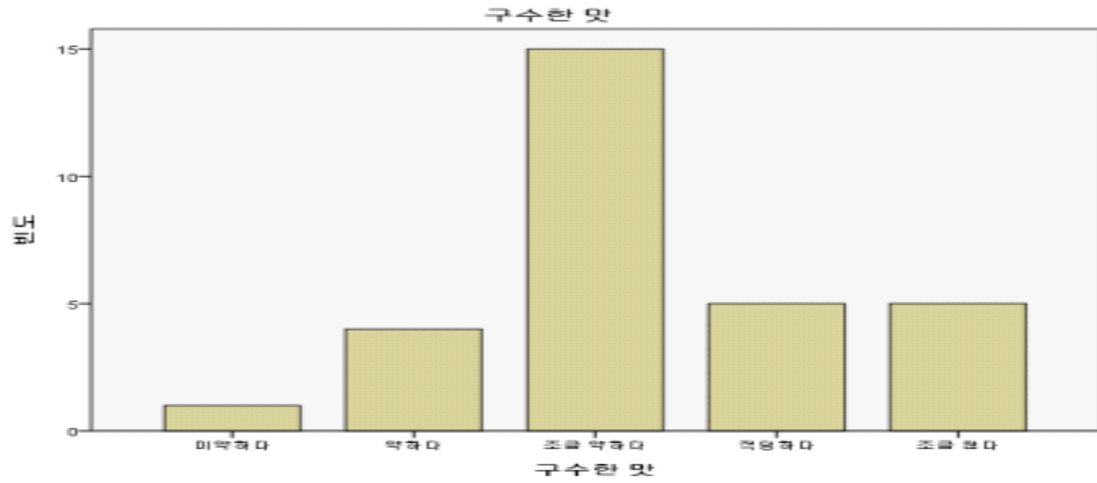
통계량

|   |    | 제품의 빛깔이 아름답다 | 색깔이 음료로서 적당하다 | 마시고 싶은 생각이 든다 | 향이 좋다 | 향이 적당하게 난다 | 단맛   | 쓴맛   | 시원한 맛 | 뽀은 맛 | 구수한 맛 | 마셨을 때 느낌이 좋다 | 전반적으로 내 입맛에 맞는다. | VAR00001 |
|---|----|--------------|---------------|---------------|-------|------------|------|------|-------|------|-------|--------------|------------------|----------|
| N | 유효 | 30           | 30            | 30            | 30    | 30         | 30   | 30   | 30    | 30   | 30    | 30           | 30               | 0        |
|   | 결측 | 0            | 0             | 0             | 0     | 0          | 0    | 0    | 0     | 0    | 0     | 0            | 0                | 30       |
|   | 평균 | 1.83         | 2.07          | 1.83          | 2.87  | 2.87       | 1.47 | 3.50 | 2.03  | 2.63 | 2.30  | 2.17         | 2.20             |          |
|   | 합계 | 55           | 62            | 55            | 86    | 80         | 44   | 105  | 61    | 79   | 69    | 65           | 66               |          |





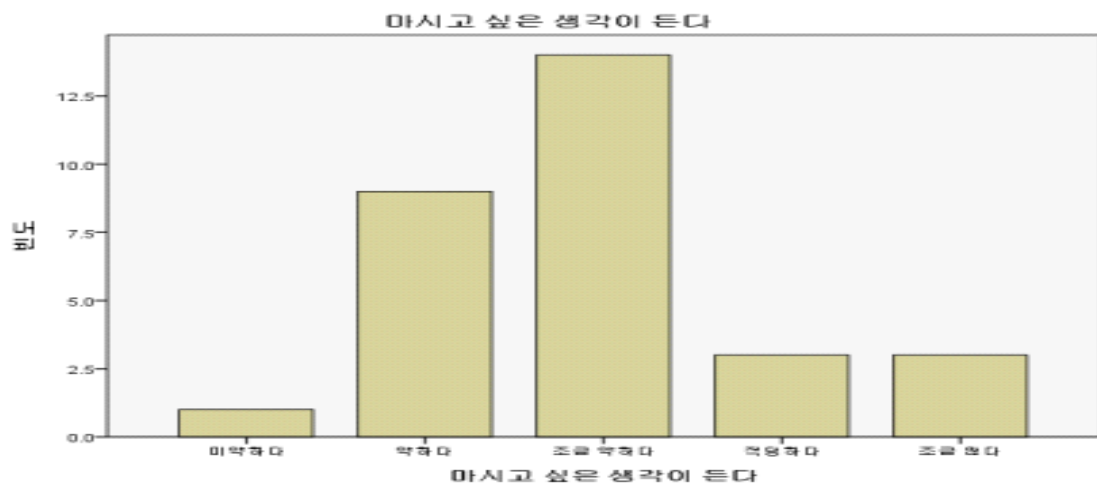
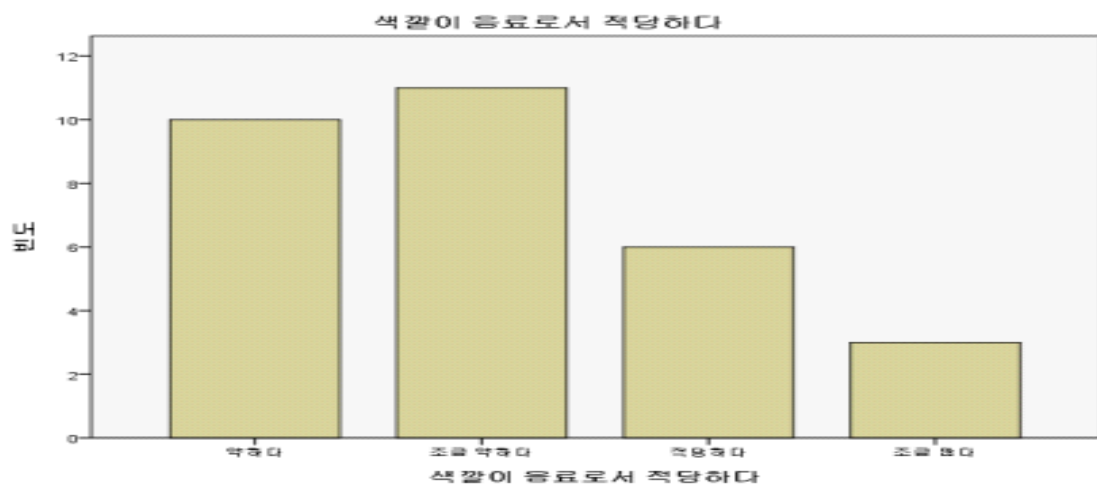
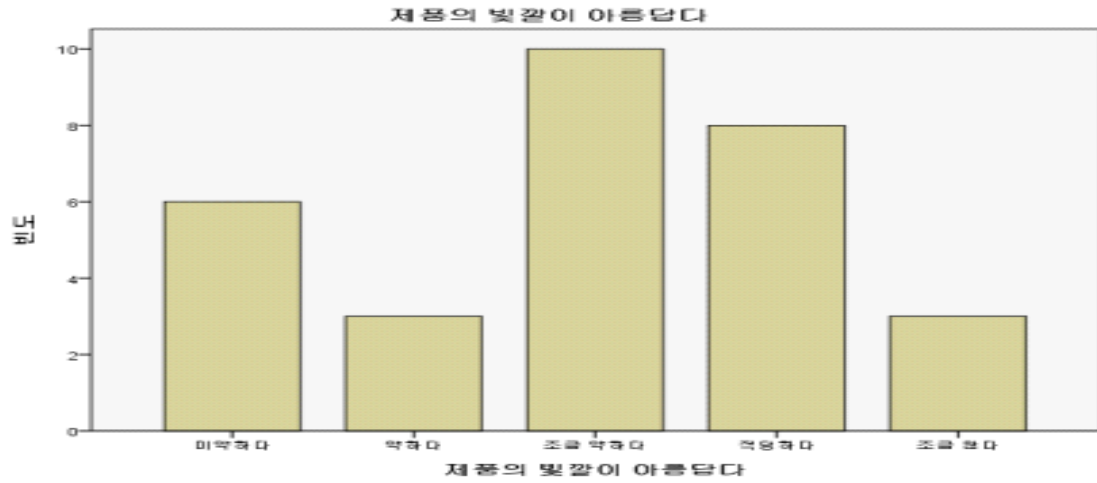


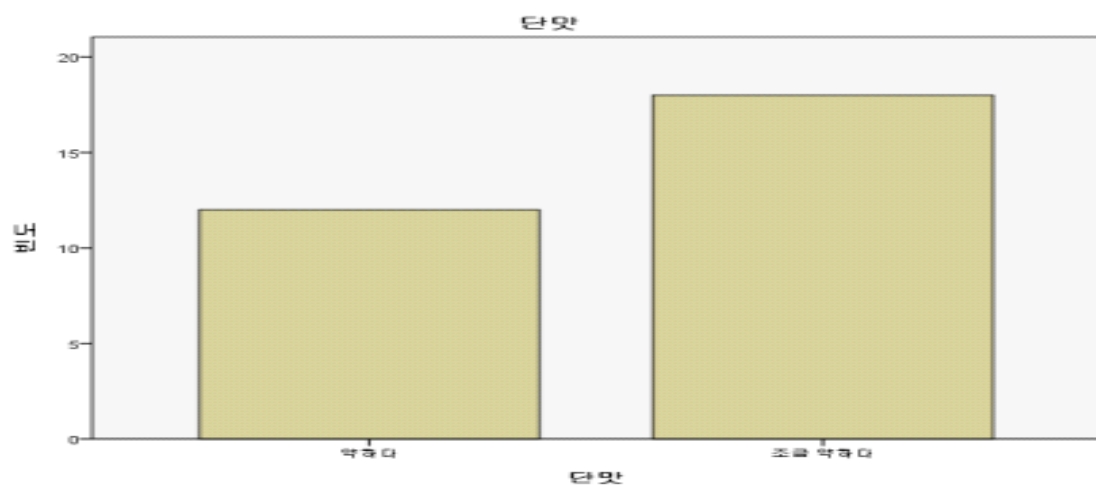
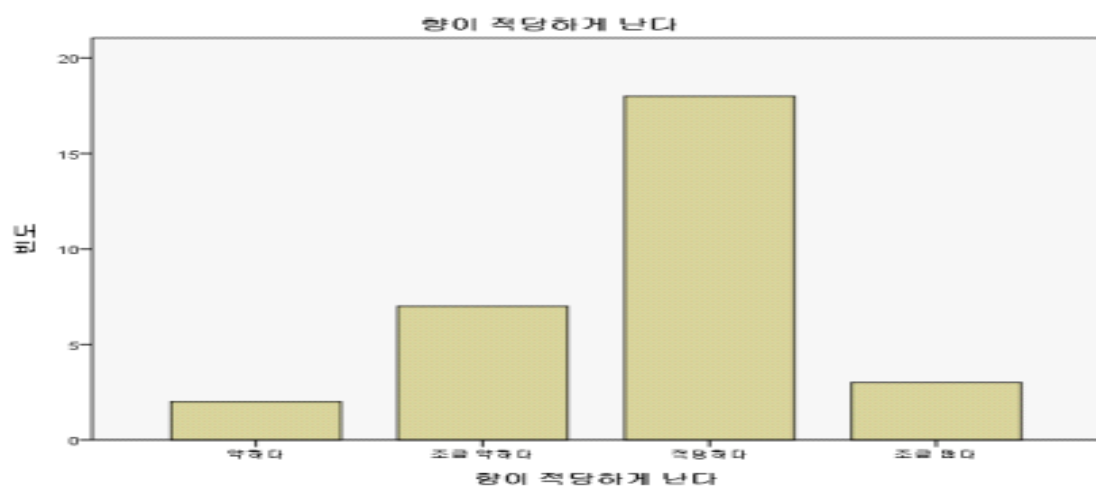
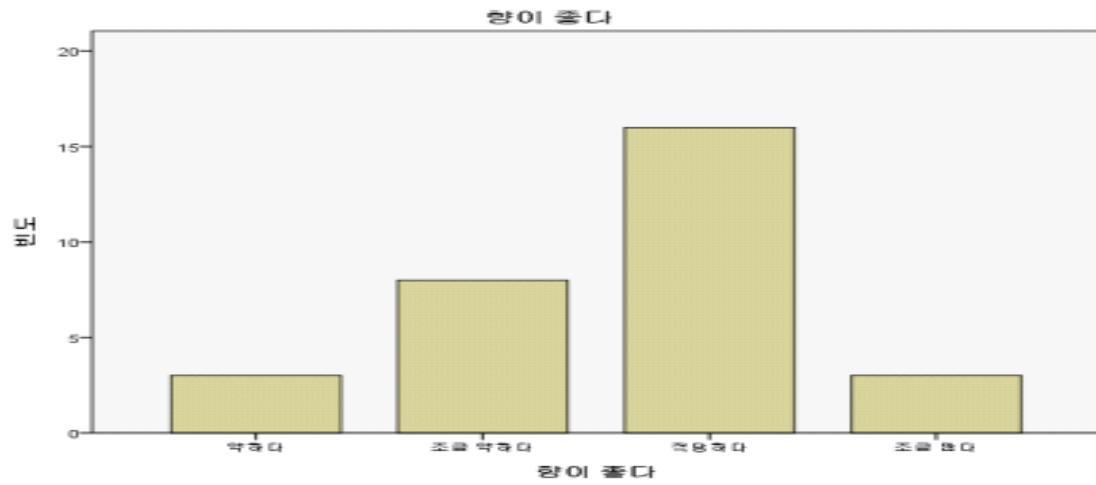


(3) 2차 시작품 II의 관능적 품질평가 결과

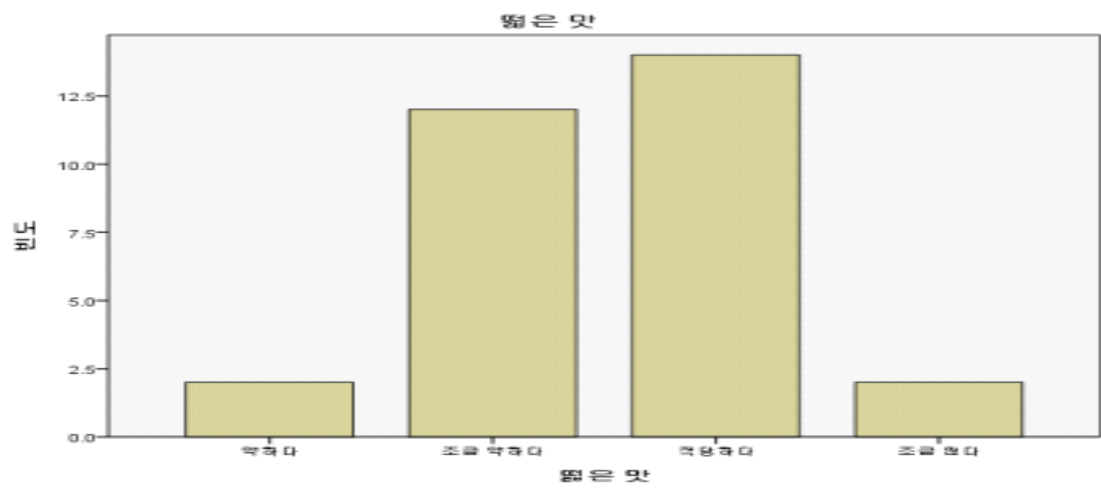
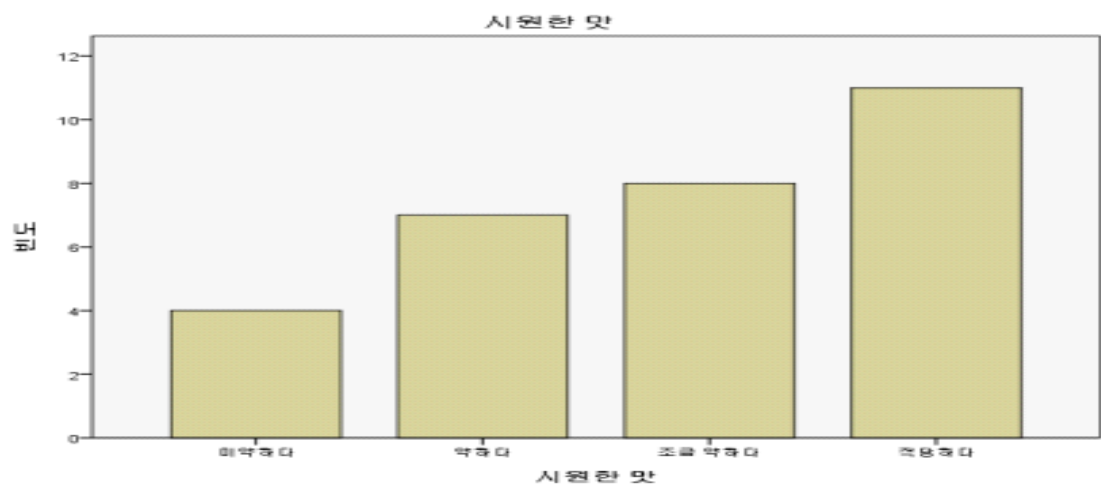
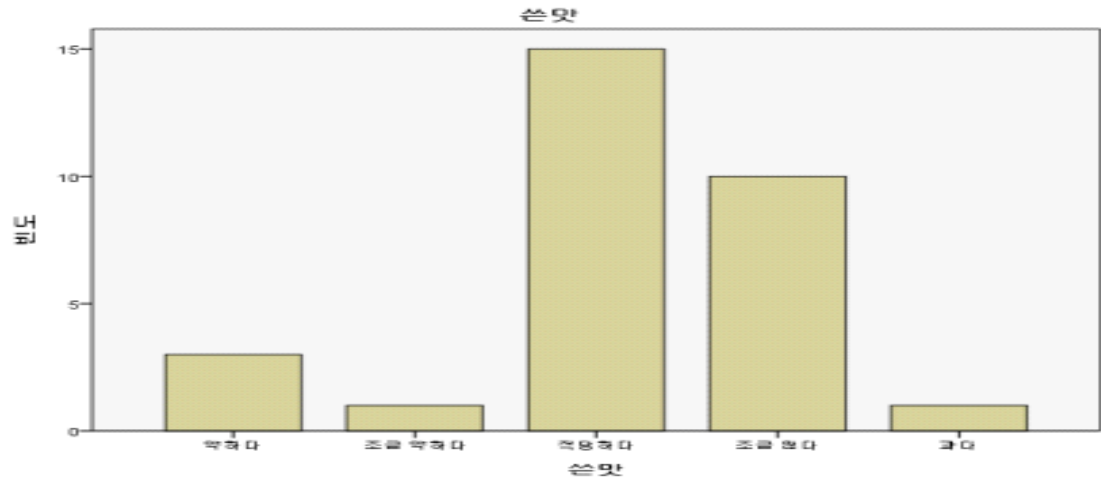
통계량

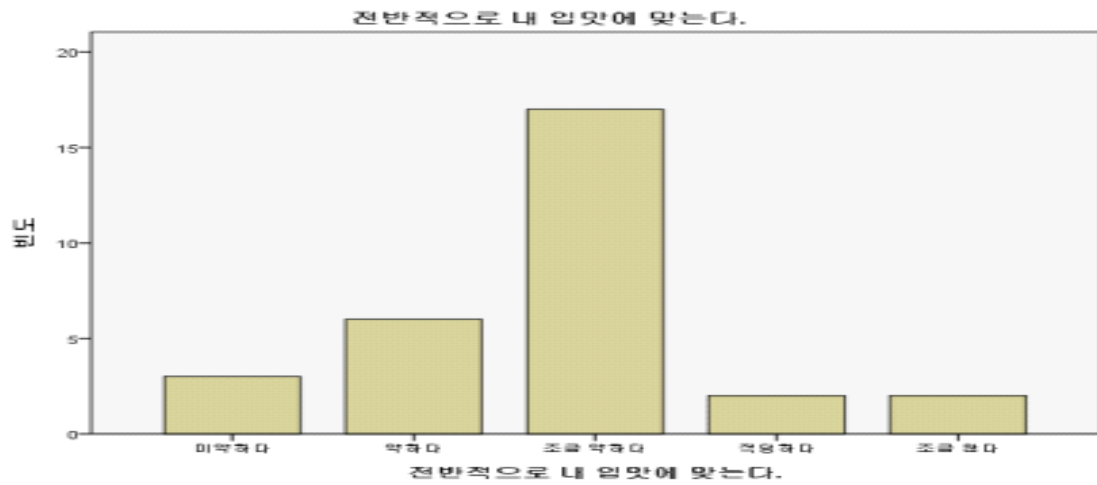
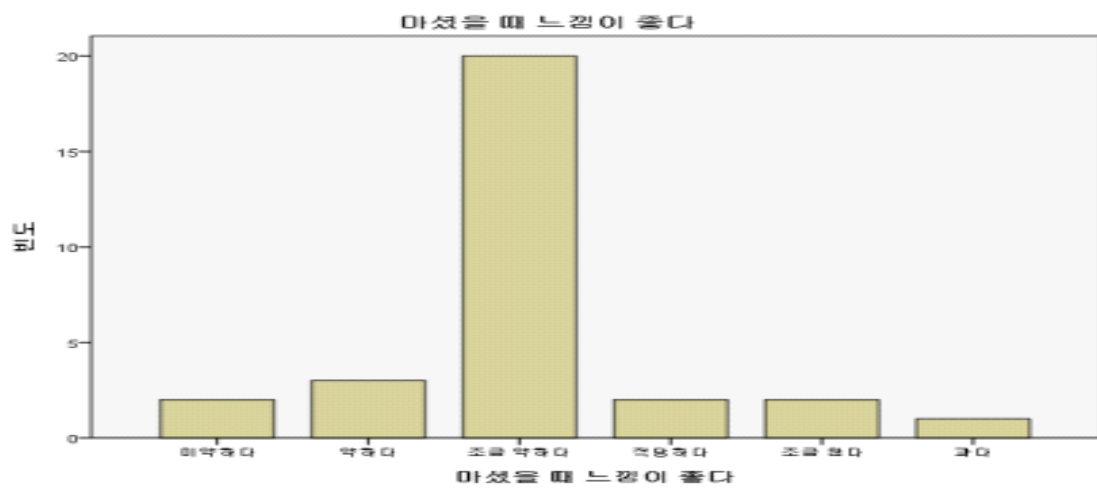
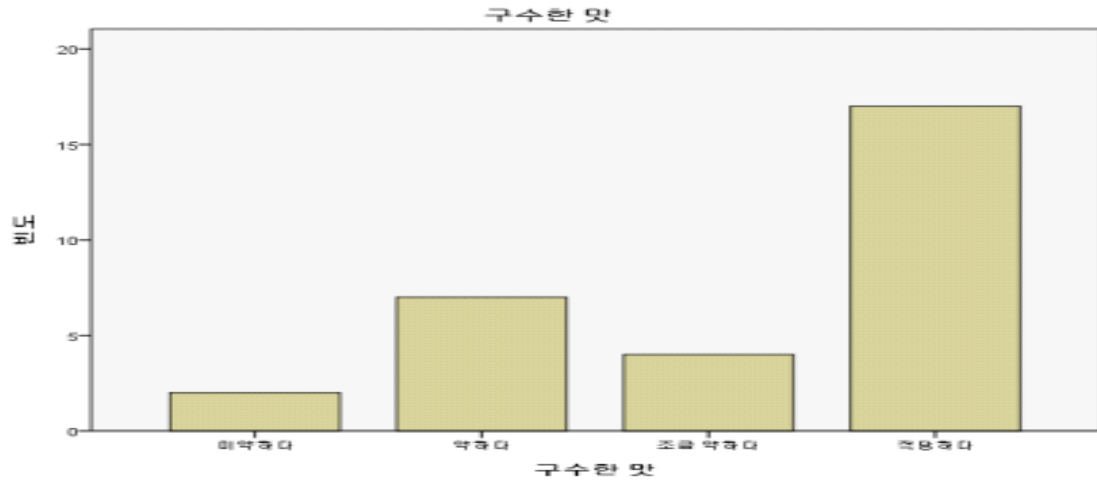
|   |    | 제품의 색깔이 아름답다 | 색깔이 음료로서 적당하다 | 마시고 싶은 생각이 든다 | 향이 좋다 | 향이 적당하게 난다 | 단맛   | 쓴맛   | 시원한 맛 | 달콤한 맛 | 구수한 맛 | 마셨을 때 느낌이 좋다 | 전반적으로 내 입맛에 맞는다. | VAR00001 |
|---|----|--------------|---------------|---------------|-------|------------|------|------|-------|-------|-------|--------------|------------------|----------|
| N | 유효 | 30           | 30            | 30            | 30    | 30         | 30   | 30   | 30    | 30    | 30    | 30           | 30               | 0        |
|   | 결측 | 0            | 0             | 0             | 0     | 0          | 0    | 0    | 0     | 0     | 0     | 0            | 0                | 30       |
|   | 평균 | 1.97         | 2.07          | 1.93          | 2.63  | 2.73       | 1.60 | 3.17 | 1.87  | 2.53  | 2.20  | 2.07         | 1.80             |          |
|   | 합계 | 59           | 62            | 58            | 79    | 82         | 48   | 95   | 56    | 76    | 66    | 62           | 54               |          |







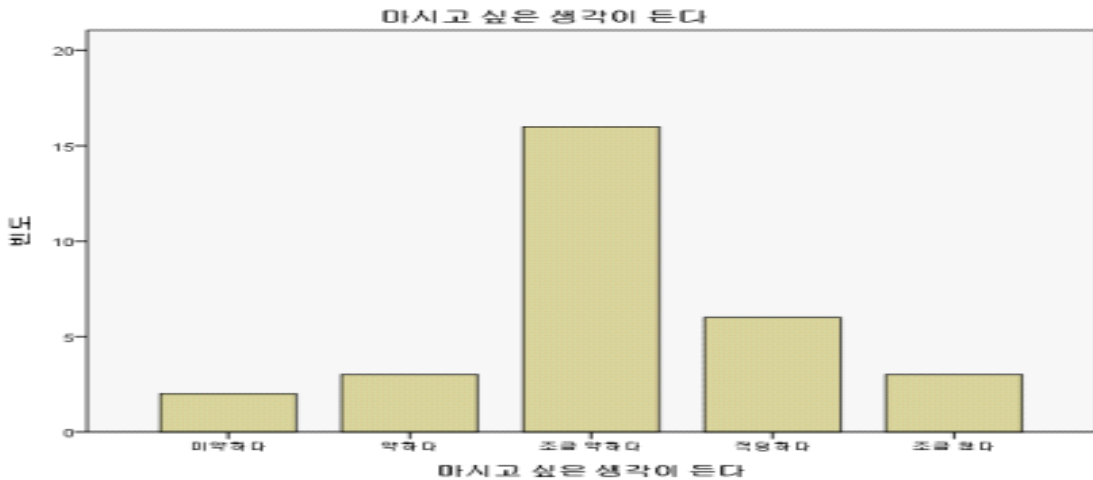
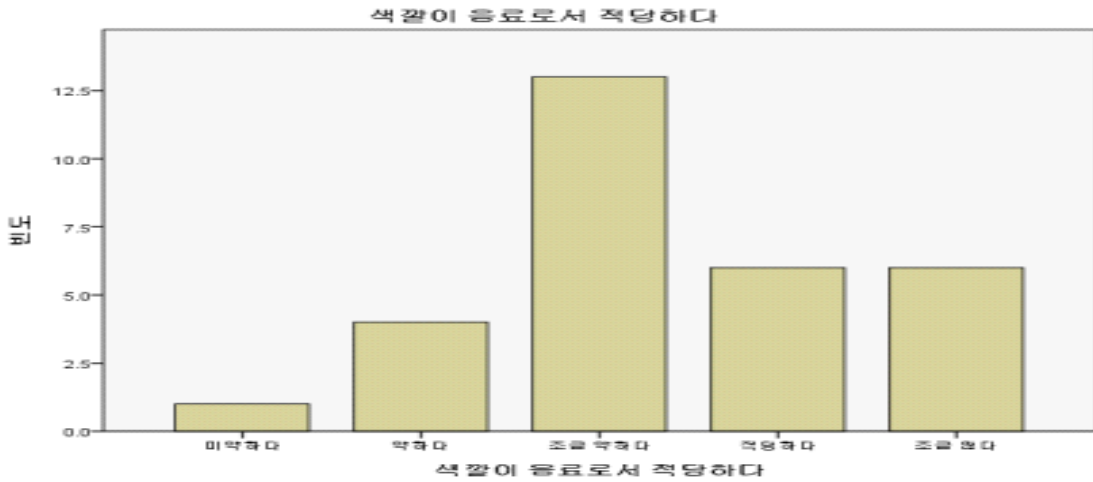
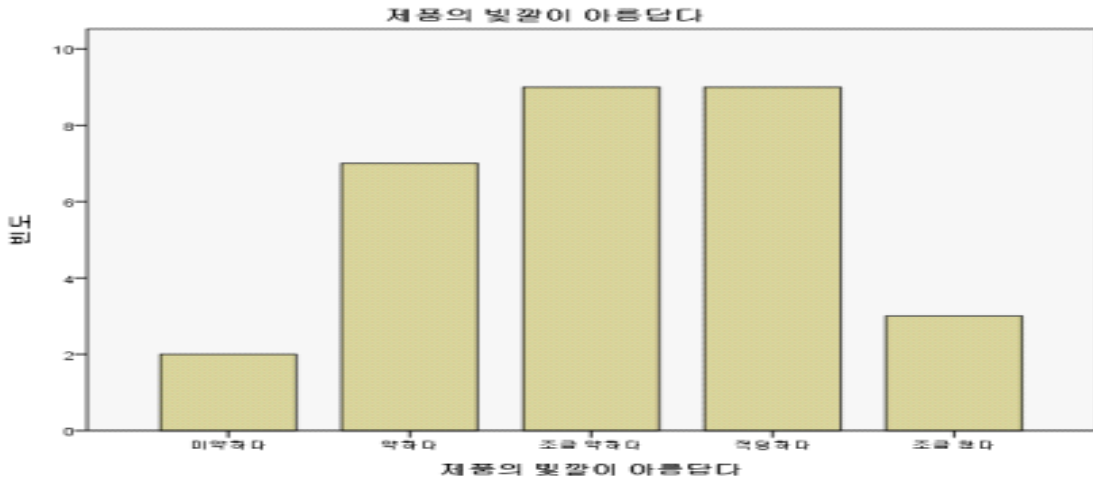


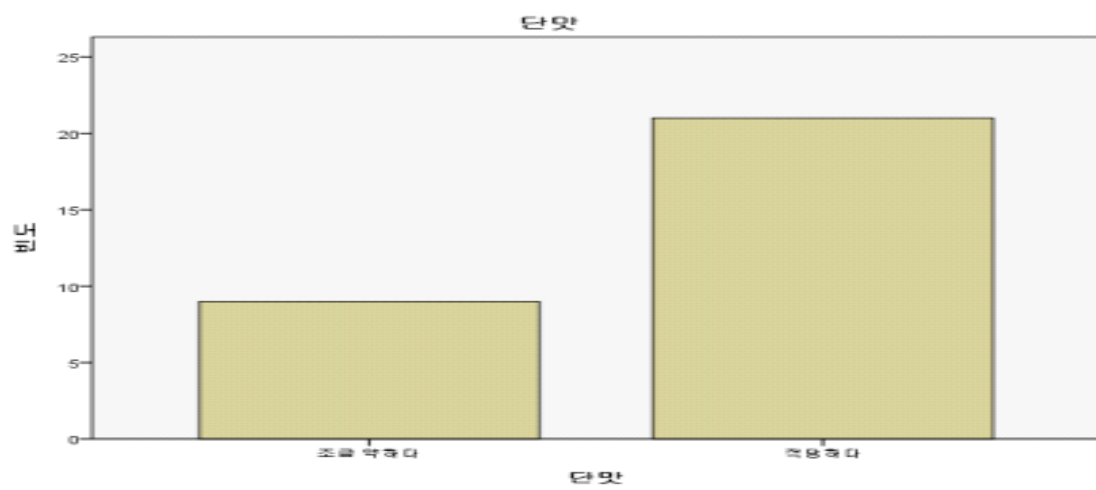
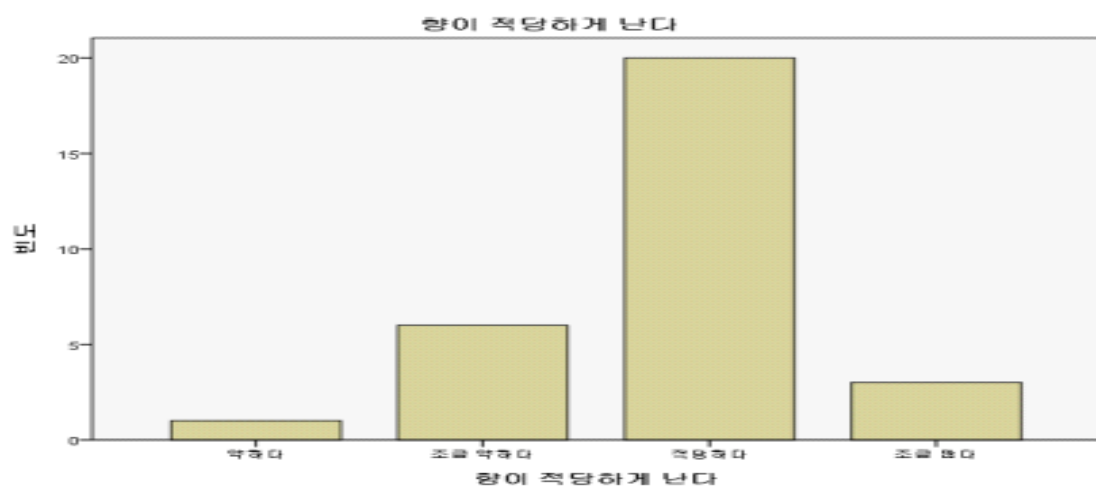
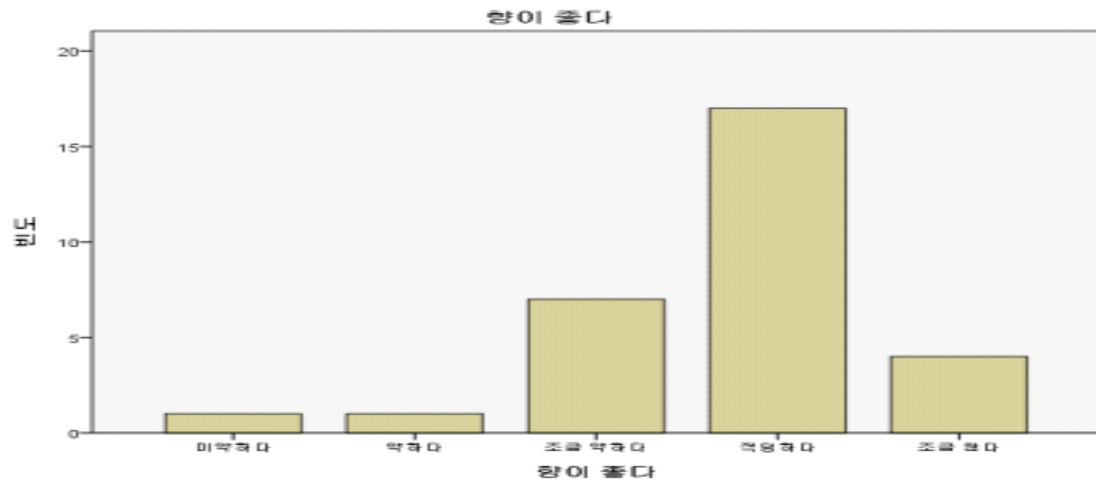


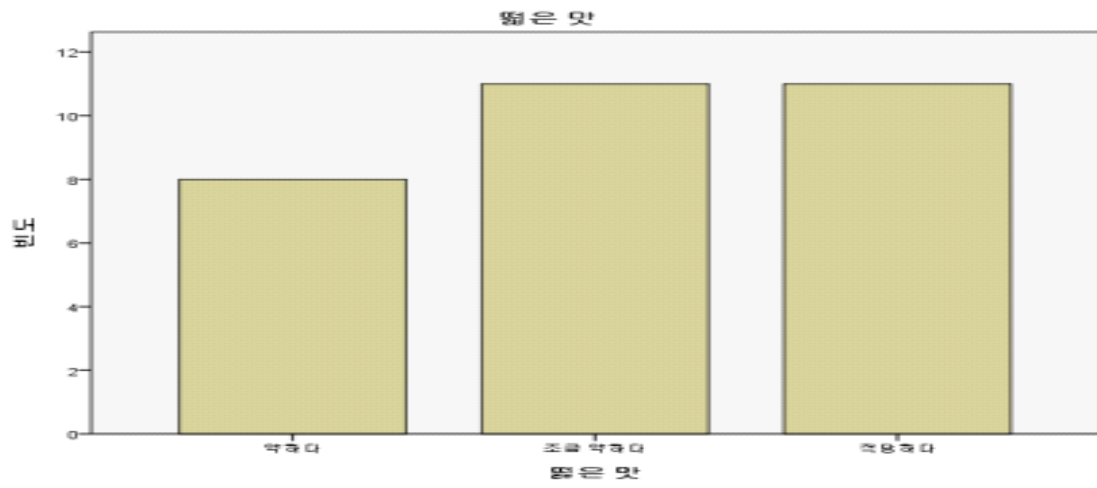
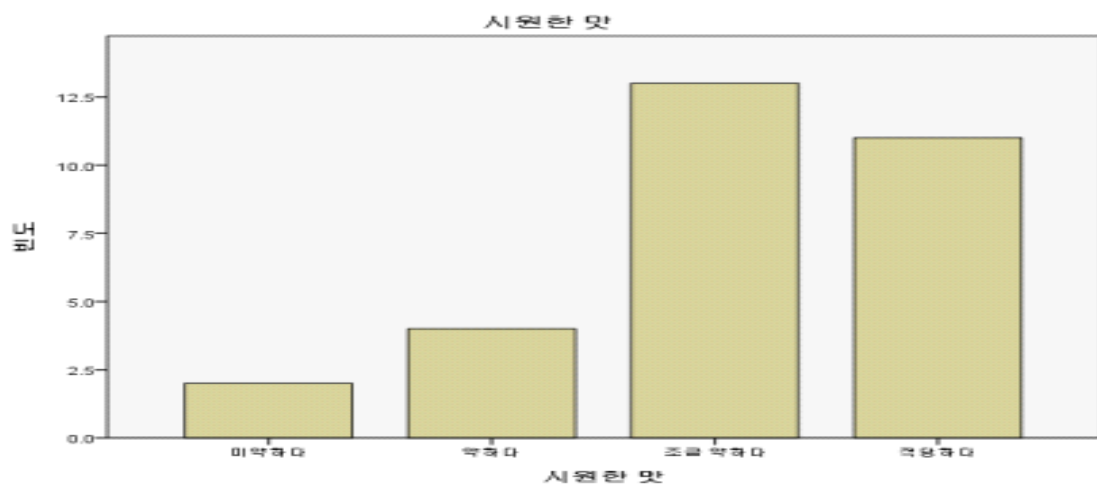
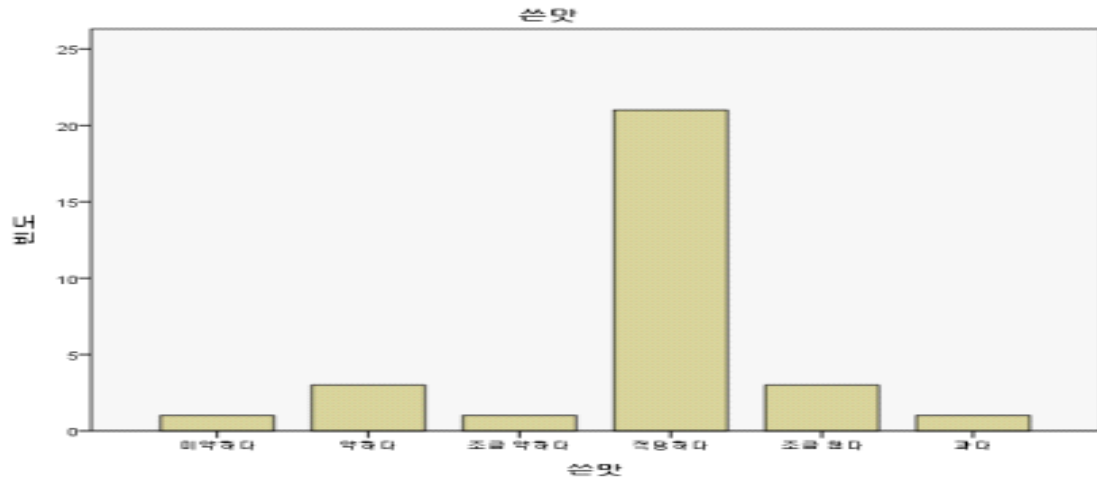
(4) 2차 시작품 Ⅲ의 관능적 품질평가 결과

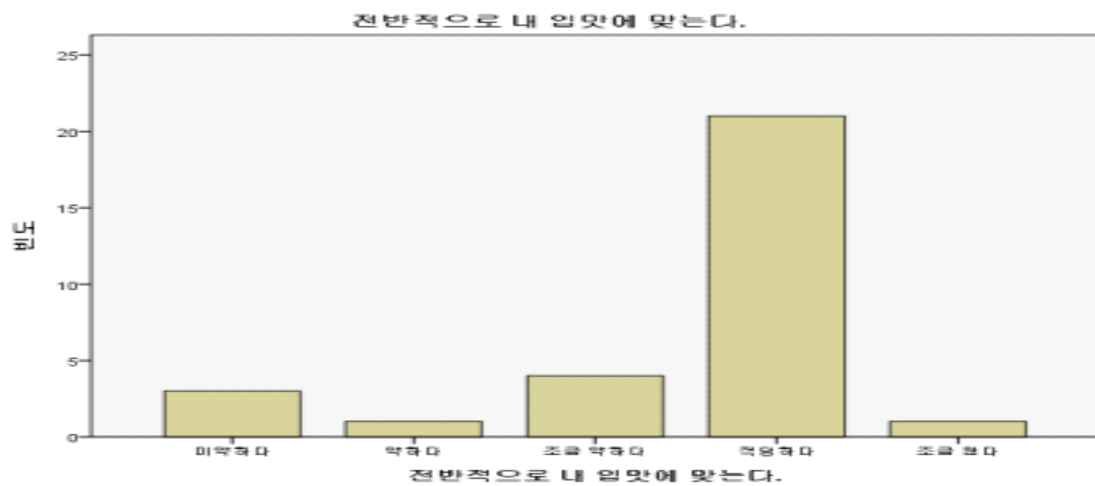
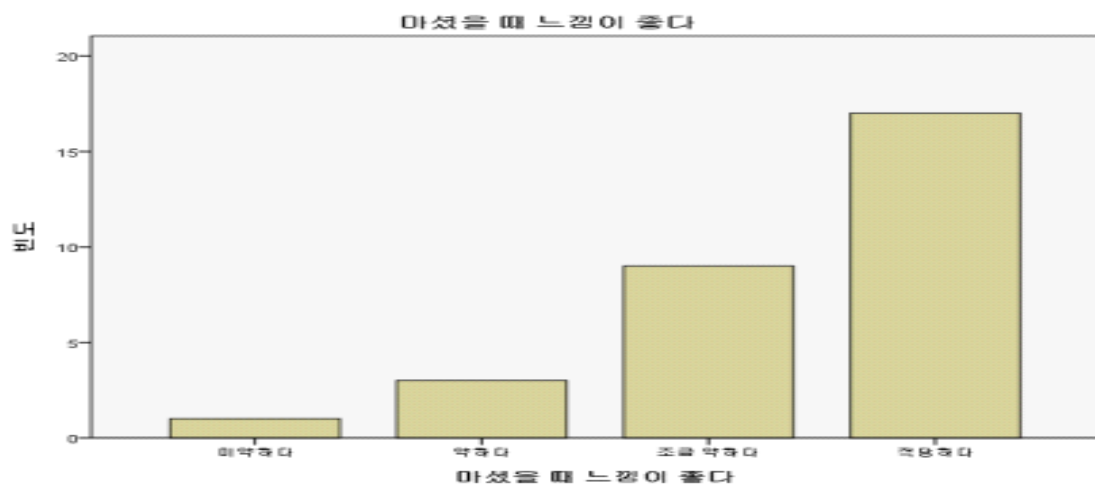
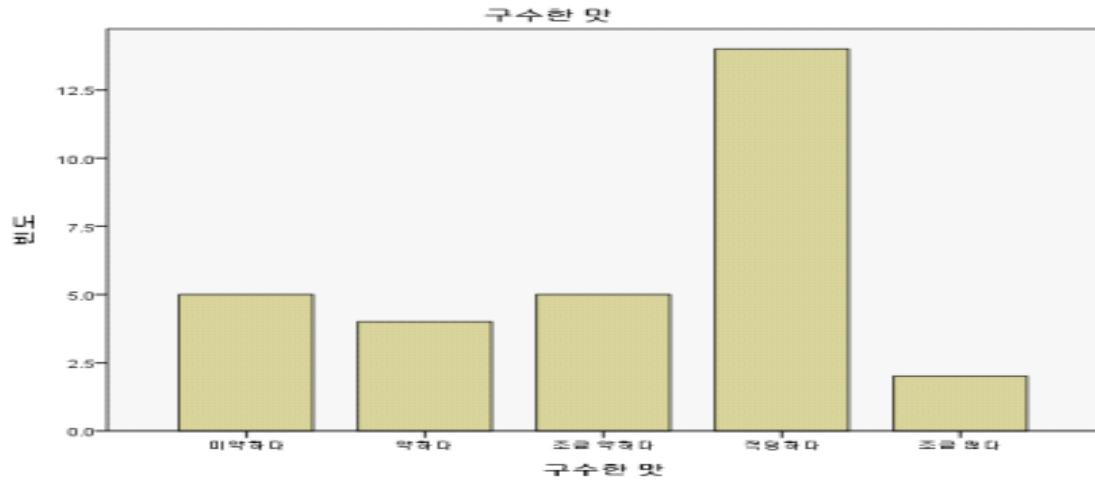
통계량

|   |    | 제품의 빛깔이 아름답다 | 색깔이 음료로서 적당하다 | 마시고 싶은 생각이 든다 | 향이 좋다 | 향이 적당하게 난다 | 단맛   | 쓴맛   | 시원한 맛 | 뽀은 맛 | 구수한 맛 | 마셨을 때 느낌이 좋다 | 전반적으로 내 입맛에 맞는다. | VAR00001 |
|---|----|--------------|---------------|---------------|-------|------------|------|------|-------|------|-------|--------------|------------------|----------|
| N | 유효 | 30           | 30            | 30            | 30    | 30         | 30   | 30   | 30    | 30   | 30    | 30           | 30               | 0        |
|   | 결측 | 0            | 0             | 0             | 0     | 0          | 0    | 0    | 0     | 0    | 0     | 0            | 0                | 30       |
|   | 평균 | 2.13         | 2.40          | 2.17          | 2.73  | 2.83       | 2.70 | 2.83 | 2.10  | 2.10 | 2.13  | 2.40         | 2.53             |          |
|   | 합계 | 64           | 72            | 65            | 82    | 85         | 81   | 85   | 63    | 63   | 64    | 72           | 76               |          |









**(5) 2차 시작품 3종의 관능적 품질평가 비교**

2차 시작품 3종의 관능적 품질을 비교하면 시작품 I 이 향은 비교적 좋게 평가되었으나 쓴 맛과 떼은 맛이 3종 중 가장 강하여 가장 저하된 평가를 받았으며 또한 구수한 맛은 가장 높게 평가되었으나 이러한 요소는 음료 제품에서 바람직하지 않은 것으로 판단된다.

시작품 III의 경우, 제품의 빛깔, 적당한 향, 마셨을 때의 느낌 및 전반적 맛에서 가장 높게 평가되었으며, 또한 쓴맛, 떼은 맛 및 구수한 맛이 가장 낮게 평가되어 시작품 3종 중 가장 좋은

품질인 것으로 평가되었다.

### 5. 3차 시작품 제작 및 품질평가

#### 가. 머위 최종 액상음료 개발

머위를 이용하여 액상 음료제품을 만들어 천식에 가장 효능이 있는 머위와 어성초를 이용하여 최종 액상음료 2종을 개발하였다.

항균, 항염 작용에 유용한 어성초는 천식 알레르기에 효능이 뛰어나 머위와 어성초만으로 음료제품 1종을, 천식, 기관지염에 효능이 알려진 원료와 관능적인 부분을 상승시키기 위하여 배농축액을 첨가하여 1종, 총 2종을 최종 개발하였다.

#### (1) 머위 액상 제품의 제조

최종 음료 제품은 아래와 같은 배합 및 추출 조건으로 제작하였다.

##### (가) 시료 배합비

##### ① 최종 음료 제품 1

Table 60. 음료제품 1의 원료배합비

| 원 료 명 | 합 량     |
|-------|---------|
| 머위    | 4.50 %  |
| 어성초   | 0.84 %  |
| 수세미   | 0.66 %  |
| 정제수   | 94.00 % |
| 합 계   | 100%    |

##### ② 최종 음료 제품 2

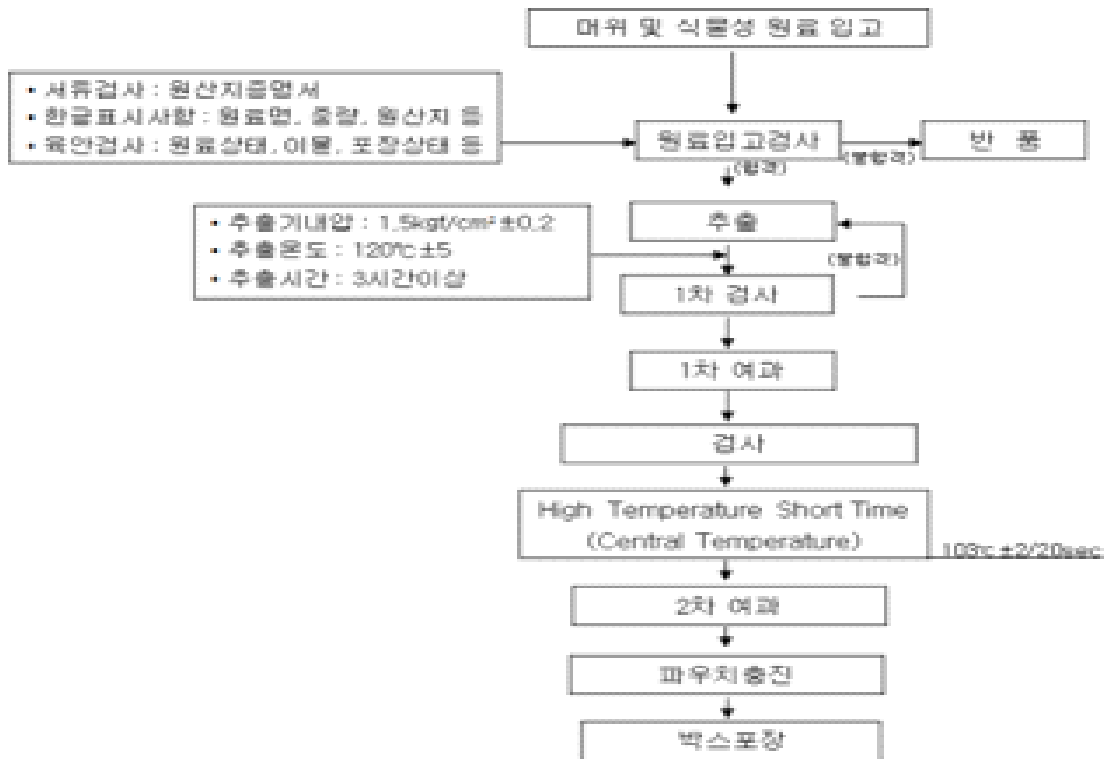
| 원 료 명                           | 합 량   |
|---------------------------------|-------|
| 머위                              | 2%    |
| 수세미                             | 1.5%  |
| 형계                              | 0.2%  |
| 머위 등 식물<br>혼합추출액<br>(brix 2%이상) | 96%   |
| 금은화                             | 0.2%  |
| 감초                              | 0.4%  |
| 대추                              | 0.5%  |
| 천문동                             | 0.6%  |
| 정제수                             | 94.6% |
| 배농축액<br>(brix 72%이상)            | 4%    |
| 합 계                             | 100%  |

#### (나) 음료 제조 과정

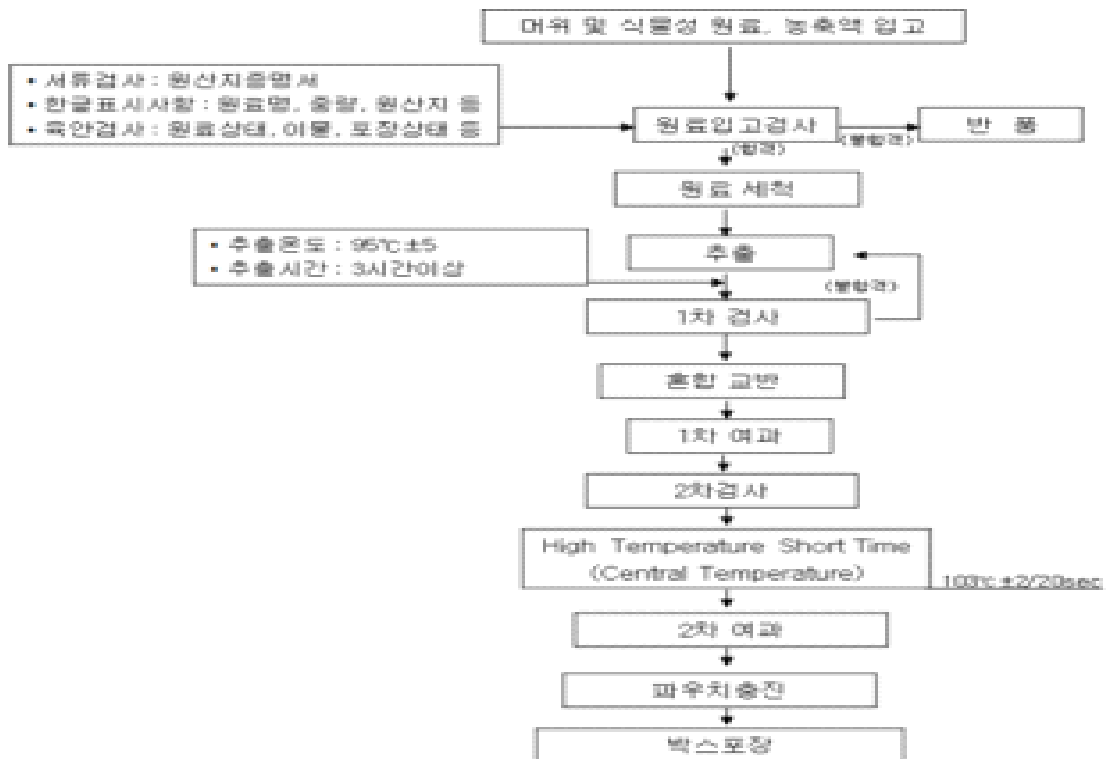
추출조건은 최종 음료 제품 1은 온도 120±5 ℃, 압력 1.5 ± 0.2 kgf/cm<sup>2</sup>의 가압 추출을 진행

하였으며, 최종 음료 제품 2은 온도  $95 \pm 5$  °C, 압력  $1.5 \pm 0.2$  kgf/cm<sup>2</sup>의 무압 추출을 진행하였다. 시료를 투입하여 processing chart 에 따라 작업하였다.

① 최종 음료 제품 1



② 최종 음료 제품 2



나. 일반성분 및 기타성분 분석



### (1) pH, 당도 측정

제품의 pH 측정은 pH meter (model HM30R , TOAKK, Japan)을, 당도는 (Model:RX7000,ATAGO,Japan)을 이용하여 측정하였다.

최종제품 1의 경우 단순 식물성원료만 추출한 제품으로 당도가 약 brix 2, pH 4.5를 나타냈으며, 최종제품 2의 경우 brix 4.5, pH 4.0을 나타내었다.

**Table 62. 제품의 당도와 pH**

| 시료명     | 당도       | pH     |
|---------|----------|--------|
| 최종 제품 1 | Brix 2.2 | pH 4.5 |
| 최종 제품 2 | Brix 4.7 | pH 4.0 |

### (2) 가용성 고형물 함량

가용성 고형물 함량은 식품공전 1.식품성분시험법 중 상압가열건조법에 준하여 진행하였다. 각 각의 최종 제품을 3-5g 채취하여 증발접시에 넣고 98-100 °C으로 셋팅된 dry oven 에서 상압건조시켜 수분을 제거하고 남은 고형물의 무게를 가용성 고형물 함량으로 하여 측정하였다.

가용성 고형물 함량은 Table 63과 같이 각 각 2.0 %와 4.5 % 를 나타내었다. 즉, 제품의 고형분 함량은 각 각 2 g/100ml, 4.5 g/100ml을 함유함을 확인할 수 있었다.

**Table 63. 가용성 고형물 함량**

| 시료명     | 가용성 고형분 함량 |
|---------|------------|
| 최종 제품 1 | 고형분 2.0 %  |
| 최종 제품 2 | 고형분 4.5 %  |

### (3) 중금속 분석 (납, 카드뮴)

납과 카드뮴은 주거환경에 흔히 존재하고 토양에서 재배된 농산물에 축적되어 인간에게 가장 흔히 노출되기 쉬운 인체에 유해한 금속이다.

최종 제품의 유형을 식품공전을 준하여 나누었을 때 액상차로 분류하고, 액상차에 맞는 기준 규격 검사항목은 중금속 중 납, 카드뮴임으로 이에 대한 분석을 진행하였다.

중금속 분석은 식품공전에 준한 방법을 이용하여 분석하였다. 시료는 건식회화법에 의하여 진행하는데, 시료 5-20 g를 도가니, 백금접시에 취해 건조하여 탄화시킨 다음 500°C에서 회화한다. 회화가 잘 되지 않으면 일단 식혀 질산(1+1)을 2~5 mL로 적시고 건조한 다음 회화를 계속한다. 회화가 불충분할 때는 위의 조작을 1회 되풀이하고 필요하면 마지막으로 질산(1+1) 2~5 mL를 가하여 완전하게 회화를 한다. 회화가 끝나면 회분을 물로 적시고 염산 2~4 mL를 가하여 수욕상 또는 건조장치에서 건조한 다음 염산 1~2 mL를 가하여 가온해서 녹이고 불용물이 있으면 석면 또는 유리여과기로 여과한 다음 일정량 ( 25 mL ) 으로 하여 시험용액으로 한다. 중금속 분석에 사용한 기기는 ICP(유도결합플라즈마)를 이용하여 측정하였다.

제품의 식품의 유형을 액상차로 하였을 때 납의 기준은 0.3 mg/kg 이하, 카드뮴은 0.1 mg/kg 이하이다. 최종 제품 1, 2 의 경우 모두 기준치 이하 혹은 불검출로 나왔으므로 액상차 음료의 안전성을 확인할 수 있었으며, 식품기준에 준한 제품으로 확인되었다.

| 시료명     | 납         |      | 카드뮴       |      |
|---------|-----------|------|-----------|------|
|         | 기준        | 분석치  | 기준        | 분석치  |
| 최종 제품 1 | 0.3 mg/kg | 0.00 | 0.1 mg/kg | 0.00 |
| 최종 제품 2 | 이하        | 0.00 | 이하        | 불검출  |

#### (4) 미생물

모든 미생물의 실험방법은 식품공전에 준하여 진행하였다.

##### (가) 세균수

최종 음료 제품 1, 2 1mL를 일반세균용 건조필름배지 (Petri film, 3M, USA)에 접종한 후 잘 흡수시키고 35±1℃에서 24~48시간 배양한 후 생성된 붉은 집락수를 확인한 후 이를 일반세균수로 한다.

##### (나) 대장균군

최종 음료 제품 1, 2 1mL를 대장균군 건조필름배지 (Petri film, 3M, USA)에 접종한 후 잘 흡수 시키고, 35±1℃에서 24±2시간 배양한 후 생성된 붉은 집락 중 주위에 기포를 형성하고 있는 집락수를 계산하고, 그 평균집락수로 대장균군 수를 산출한다.

##### (다) 대장균

최종 음료 제품 1, 2 1mL를 대장균 건조필름배지(Petri film, 3M, USA)에 접종한 후 잘 흡수 시키고, 35±1℃에서 24~48시간 배양한 후 생성된 푸른 집락 중 주위에 기포를 형성하고 있는 집락수를 계산하고 그 평균집락수로 대장균수를 산출한다.

##### (라) 병원성 미생물

아래와 같은 병원성 미생물 실험 방법은 식품공전에 준하여 정성 시험을 진행하였다.

Table 65. 병원성 미생물의 종류와 사용 배지

| 병원성 미생물 종류         | 사용배지                                       | 확인   |
|--------------------|--|--|
| 바실러스세레우스           | MYP 배지                                     | 분홍색 집락 확인시<br>확인시험한다.                                      |
| 리스테리아<br>모노사이토제네시스 | 중균배양 : Listeria 중균배지<br>분리배양 : Ocford 한천배지 |  |
| 살모넬라               | 중균배양 : 펩톤수<br>분리배양 : MacConkey 한천배지        | 검은색 집락을 나타내면<br>확인시험한다.                                    |
| 황색포도상구균            | 중균배양 : TSB 배지<br>분리배양 : 만니톨식염한천배지          | 황색불투명집락을 나타내고<br>주변에 혼탁한 백색환이<br>있는 집락 발견시 확인시험한<br>다.     |
| 장출혈성 대장균           | 중균배양 : mTSB 배지<br>분리배양 : TC-SMAC 배지        | Sorbitol 분해하지 않은 무색집<br>락확인시 확인시험(PCR)을 위<br>해 공인기관에 의뢰한다. |

최종 제품의 식품공전에 준한 기준은 세균수는 1 mL당 100 이하, 대장균군은 음성으로 관리하고 있어야 한다. 제품의 안전성을 위하여 기준의 병원성 미생물 5종과 오염의 지표균인 대장균 검사를 진행한 결과 아래의 표와 같다.

Table 66. 제품의 미생물학적 안전성 확인

| 미생물 종류             | 기준           | 최종 제품 1 | 최종 제품 2 |
|--------------------|--------------|---------|---------|
| 일반세균               | 1 mL당 100 이하 | 0       | 0       |
| 대장균군               | 음성           | 음성      | 음성      |
| 대장균                | 음성           | 음성      | 음성      |
| 바실러스세레우스           | 음성           | 음성      | 음성      |
| 리스테리아<br>모노사이토제네시스 | 음성           | 음성      | 음성      |
| 살모넬라               | 음성           | 음성      | 음성      |
| 황색포도상구균            | 음성           | 음성      | 음성      |
| 장출혈성 대장균           | 음성           | 음성      | 음성      |

제조 공정상 각 각 120℃, 95℃의 온도로 고온 추출한 후 103 ± 2 °C 고압살균 시스템으로 제품을 살균하여 생산함으로써 이는 병원성 미생물 등의 살균 기준을 충분히 만족시킨 조건으로 제조하였으므로 제품내 미생물에 대해서 불검출의 결과를 얻었으며, 이는 제품의 미생물학적 안정성이 확보됨을 확인하였다.

## 6. 머위 껌 제조

### 가. 재료 및 방법

#### (1) 추출 방법

머위의 향알레르기 및 향천식 기능성 물질은 bakkenolide B를 지표성분으로 하여 식용이 가능한 알코올을 용매로 추출하였으며 추출시 다량의 유지성분이 동시 추출되어 껌의 첨가원료로 첨가시 묽은 물성으로 인하여 형태의 유지가 어려웠다. 따라서, 먼저 알코올의 도수를 낮추어 bakkenolide B함량의 손실을 최소화하고 유지의 추출을 최대 억제하여 물성을 고화할 수 있는 추출조건을 Table 24 과 같은 실험결과를 토대로 50%의 주정으로 추출하였다.

Table 67. 주정농도별 머위추출분말의 Bakkenolide B함량

| 주정농도 | Bakkenolide B함량(mg/g) |
|------|-----------------------|
| 30%  | 36.5                  |
| 40%  | 63.6                  |
| 50%  | 84.4                  |

#### (2) 껌 제조 방법

Gum base (10g), Glycerin (1g) 및 citric acid (0.15g)을 중탕 가열하여 녹이고, 여기에 향료 (0.001g), sugar powder (1g) 및 머위추출분말 (0.5g) 첨가하여 혼합하고 미리 sugar powder를 갈아놓은 성형틀에서 성형하였다.(Table 25, Fig 19)

Table 68. Mixture ratio for making butterbur gum

| 원료           | 배합량 (g) | 배합비율   | 백분율 (%) |
|--------------|---------|--------|---------|
| Gum base     | 10      | 0.7905 | 79.0451 |
| Glycerin     | 1       | 0.0790 | 7.9045  |
| Citric acid  | 0.15    | 0.0119 | 1.1857  |
| 향료           | 0.001   | 0.0001 | 0.0079  |
| Sugar powder | 1       | 0.0790 | 7.9045  |
| 머위가루         | 0.5     | 0.0395 | 3.9523  |
| 계            | 12.651  | 1      | 100     |

나. 결과



Fig 35. 머위 껌

## 제 4 장 목표달성도 및 관련 분야에의 기여도

| 구 분          | 연 도  | 과 제   | 세부연구개발 목표   | 달성도  | 평가의 착안점 및 기준                            |
|--------------|------|-------|---|------|---|
| 1차년도<br>(연도) | 2011 | 1세부   | ○ 머위의 분획 추출                                       | 100% | ○ 분획된 추출물의 분리방법을 확립                     |
|              |      |       | ○ Hexane추출물로부터 성분 순수분리                            | 100% | ○ Hexane 추출물로부터 물질이 순수분리                |
|              |      |       | ○ 순수분리한 성분의 구조 동정                                 | 100% | ○ 순수분리한 물질의 구조 동정                       |
|              |      |       | ○ 구조동정을 위한 충분한 spectrum (NMR, FT-IR, LC-MS, UV 등) | 100% | ○ 순수분리한 물질의 구조동정을 위한 spectrum은 정상적으로 수행 |
|              |      | 2세부   | ○ 세포를 이용한 신속·정확한 효능검증을 통한 기능성물질 탐색                | 100% | ○ 세포를 이용한 신속·정확한 기능성물질 효능검증 시스템 확립      |
|              |      |       | ○ 염증매개물질 생성에 대한 효율적인 ELISA 스크리닝법의 적용              | 100% | ○ 친식매개물질 생성에 대한 효율적인 ELISA 스크리닝법의 확립    |
|              |      |       | ○ 비만세포로부터 류코트리엔 생성억제 효능 탐색                        | 100% | ○ 비만세포로부터 프로스타글란딘, 류코트리엔 생성억제 효능 수행     |
|              |      |       | ○ 수지상세포의 분화에 대한 영향과 사이토카인분비 탐색                    | 100% | ○ 수지상세포의 분화에 대한 영향과 사이토카인분비 시행          |
|              |      |       | ○ SOD, GPX 등 항산화효능 탐색                             | 100% | ○ SOD, GPX 등 항산화효능 수행                   |
|              |      | 3세부   | ○ 머위의 효능성분 추출공정 최적화                               | 100% | ○ 효능성분의 추출공정의 최적화 도출                    |
|              |      |       | ○ Phyllolizydine alkaloid 제거공정 확립                 | 100% | ○ 효율적 제거공정 도출                           |
|              |      |       | ○ 원료특성에 부합되는 제품의 제형 결정                            | 100% | ○ 개발제품의 제형이 효능성분 특성 부합 확인               |
|              |      | 협동 과제 | ○ 1세부과제 도출한 추출공정의 플랜트 실험 및 검토                     | 100% | ○ 플랜트 제작 실시로 제조공정의 검토                   |
|              |      |       | ○ 1세부과제 도출한 제품의 제형 검토                             | 100% | ○ 도출한 제품 제형 타당성 및 경제성 검토                |
|              |      |       | ○ 제품의 품목 결정                                       | 100% | ○ 개발제품의 품목결정                            |

| 구분           | 연도   | 과제    | 세부연구개발 목표  | 달성도  | 평가의 착안점 및 기준   |
|--------------|------|-------|--|------|--|
| 2차년도<br>(연도) | 2012 | 1세부   | ○ EtOAc, BuOH 및 dH <sub>2</sub> O 추출물의 순수분리                      | 100% | ○ EtOAc, BuOH 및 dH <sub>2</sub> O의 일부 분획물로부터 물질의 순수분리            |
|              |      |       | ○ 순수분리한 물질 구조 동정   | 100% | ○ 순수분리한 물질의 구조동정   |
|              |      |       | ○ 구조동정을 위한 충분한 spectrum (NMR, FT-IR, LC-MS, UV 등)                | 100% | ○ 물질의 동정할 수 있는 spectrum의 구비                                      |
|              |      |       | ○ 생리활성 검증(제2세부 협조)을 통한 머위 유효성분의 표적분자 발굴                          | 100% | ○ 약리적 효능(제2세부 협조)을 가지고 있는 머위 유효성분의 도출                            |
|              |      | 2세부   | ○ 유용성분에 의한 비만세포와 대식세포에서의 in vitro 효능 검증                          | 100% | ○ 유용성분에 의한 비만세포와 대식세포에서의 in vitro 효능 검증                          |
|              |      |       | ○ 혈구세포에서의 유용성분의 신호전달 및 작용기작 규명                                   | 100% | ○ 혈구세포에서의 유용성분의 신호전달 및 작용기작 규명                                   |
|              |      |       | ○ EtOAc, BuOH 및 dH <sub>2</sub> O 추출물을 이용한 대식 및 비만세포주에 대한 세포독성시험 | 100% | ○ EtOAc, BuOH 및 dH <sub>2</sub> O 추출물을 이용한 대식 및 비만세포주에 대한 세포독성시험 |
|              |      | 3세부   | ○ 부원료의 선정 및 배합비를 최적화   | 100% | ○ 적절한 부원료 선정 및 최적 배합비의 도출  |
|              |      |       | ○ 시작품 모형품의 제작  | 100% | ○ 실험실 모형품 제작을 통한 공정의 타당성 및 품질 검토                                 |
|              |      |       | ○ 관능검사를 통한 품질개선  | 30%  | ○ 관능검사를 통한 공정 및 배합의 지속적 개선                                       |
|              |      | 협동 과제 | ○ 1세부 요청 시작품 제작 지원   | 100% | ○ 요청한 시작품 제작 지원  |
|              |      |       | ○ 제조공정 및 품질의 적정성 검토 협조   | 100% | ○ 제조공정 및 품질의 적정성 검토  |

| 구분           | 연도   | 과제   | 세부연구개발 목표                                     | 달성도  | 평가의 착안점 및 기준                                  |
|--------------|------|------|---|------|---|
| 3차년도<br>(연도) | 2013 | 1세부  | ○ 목표질환 기준의 품질 표준화                             | 100% | ○ 기능성 성분을 기초로 한 품질표준화의 방법 설정                  |
|              |      |      | ○ 고극성 추출물로부터 물질의 순수분리                         | 100% | ○ 고극성 분획물로부터 물질의 순수분리                         |
|              |      |      | ○ 성분의 구조분석을 위한 spectrum의 분석                   | 100% | ○ 순수분리한 물질의 구조 동정                             |
|              |      | 2세부  | ○ 천식질환모델동물을 이용한 기능성물질 약리효능 및 생리활성검증계 구축       | 100% | ○ 천식질환모델동물을 이용한 기능성물질 약리효능 및 생리활성검증계 구축       |
|              |      |      | ○ Ovalalbumin유발 천식질환 모델에서 기능성물질 약리효능 및 생리활성검증 | 100% | ○ Ovalalbumin유발 천식질환 모델에서 기능성물질 약리효능 및 생리활성검증 |
|              |      | 3세부  | ○ 제조공정도 완성                                    | 100% | ○ 최종 제조공정도 완성                                 |
|              |      |      | ○ 최종시작품의 품질 검토                                | 100% | ○ 일반성분 검사 및 안전성 검토                            |
|              |      |      | ○ 유통기한 설정                                     | 100% | ○ 제품의 유통기한 설정                                 |
|              |      | 협동과정 | ○ 최종 개발품 완성 및 포장도안                            | 100% | ○ 최종 개발품 완성 여부<br>○ 개발품의 포장 및 도안 완성           |





# 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

## 제 1 절 연구개발성과

| 구분          |    | 특허 |      | (예시)신품종        |  |      |    | (예시)유전자<br>유전자<br>원<br>등록 | (예시)논문 |      | 기타 |
|-------------|----|----|------|----------------|--|------|----|---------------------------|--------|------|----|
|             |    | 출원 | 등록   | 품종<br>명칭<br>등록 | 품종<br>생<br>산<br>수<br>입<br>관<br>매<br>신고 | 품종보호 |    |                           | SCI    | 비SCI |    |
|             |    |    |      |                |  | 출원   | 등록 |                           |        |      |    |
| 1차 년도       | 목표 | 1  |      |                |  |      |    | 1                         |        |      |    |
|             | 달성 | 1  |      |                |  |      |    |                           |        |      |    |
| 2차 년도       | 목표 | 2  | 1    |                |  |      |    | 2                         | 1      |      |    |
|             | 달성 | 1  |      |                |  |      |    | 1                         | 1      |      |    |
| 3차 년도       | 목표 | 2  | 2    |                |  |      |    | 2                         | 1      |      |    |
|             | 달성 | 3  | 1    |                |  |      |    | 2                         | 1      |      |    |
| 종료<br>1차 년도 | 목표 |    |      |                |  |      |    |                           |        |      |    |
|             | 달성 |    | (1)  |                |  |      |    | (2)                       | (2)    |      |    |
| 종료<br>2차 년도 | 목표 |    |      |                |  |      |    |                           |        |      |    |
|             | 달성 |    | (1)  |                |  |      |    |                           |        |      |    |
| 계           | 목표 | 5  | 3    |                |  |      |    | 5                         | 2      |      |    |
|             | 달성 | 5  | 3(2) |                |  |      |    | 5(2)                      | 4(2)   |      |    |

### 1. 논문 게재 성과

| 게재연도       | 논문명  | 저자   |          |  | 학술지명                         | Vol.(No.)        | 국내외 구분 | SCI구분                                      |
|------------|--|------|----------|--|------------------------------|------------------|--------|--|
|            |  | 주저자  | 교신저자     | 공동저자   |                              |                  |        |  |
| 2013       | Anti-allergic and anti-inflammatory effects of bakkenolide B isolated from <i>Petasites japonicus</i> leaves | 이경필  | 임동순      | 강새로미, 박수진, 최영환, 이영근                              | Journal of Ethnopharmacology | 148 (890-894)    | 국제     | SCI (IF=2.939)<br>발행국=아일랜드<br>2013년 7월 30일 |
| 2013       | 반응표면분석법에 의한 머위 잎의 petasin 추출공정 최적화   | 이동완  | 이영근      | 이세열, 정현식, 최영환, 임동순                               | 생명과학회                        | 23(11) 1360-1364 | 국내     |  |
| 2014       | Identification of a novel anti-inflammatory compound, a-cubebenoate from <i>Schisandra chinensis</i>         | 강새로미 | 최영환, 임동순 | 이경필, 박수진, 노대영, 김정민, 문형룡, 이영근                     | Journal of Ethnopharmacology | 153 (242-249)    | 국제     | SCI (IF=2.939)<br>발행국=아일랜드<br>2014년 4월 11일 |
| 2014       | 머위로부터 Bakkenolide B의 순수분리, HPLC분석 방법 및 채취 시기별 함량 분석  | 김태훈  | 최영환      | 김도연, 정원정, 손병구, 박영훈, 강영준, 강점순, 임용재, 이영동, 이영현, 최영환 | 한국생명과학회                      | 24(3) 252~259    | 국내     | 비SCI                                       |
| 2015       | Therapeutic effects of s-petasin on disease models of asthma and peritonitis                                 | 이경필  | 임동순      | 강새로미, 노민수, 박수진, 김정민, 정혜영, 제남경, 최영환, 이영근          | Biomolecules & Therapeutics  | 23 (45-52)       | 국제     | SCIE (IF=0.841)<br>발행국=한국<br>2015년 1월 30일  |
| 2015<br>예정 | Multiple effects of a novel compound, petatewalide B from <i>Petasites japonicus</i>                         | 최영환  | 임동순      | 김정민, 강새로미, 이경필, 박수진, 문형룡, 정지형, 이영근               | Fitoterapia                  | 투고중              | 국제     | SCIE (IF=2.216)<br>발행국=네덜란드<br>2015년       |

| 게재연도       | 논문명   | 저자  |      |  | 학술지명  | Vol.(No.) | 국내외 구분 | SCI구분                         |
|------------|---|-----|------|--|---|-----------|--------|-------------------------------|
|            |   | 주저자 | 교신저자 | 공동저자   |   |           |        |                               |
| 2015<br>예정 | Optimization of mixture ratio of <i>Petasites japonicus</i> , <i>Luffa cylindrica</i> and <i>Houttuynia cordata</i> by Mixture Design | 정혜진 | 이영근  | 이경필<br>정현식<br>김동섭<br>김한수<br>최영환<br>임동순<br>성종환  | 생명과학회지                                      | 게재중       | 국내     |                               |
| 2015<br>예정 | Anti-allergic effect of a-cubebenoate from <i>Schisandra chinensis</i>  | 이경필 | 임동순  | 박수진,<br>강새로미,<br>황진,<br>최영환,<br>이영근  | Journal of Ethnopharmacology                | 투고예정      | 국제     | SCI<br>(IF=2.939)<br>발행국=아일랜드 |
| 2015<br>예정 | Anticancer Activity of Extracts from Different Parts of <i>Petasitesjaponicus</i>   | 박세진 | 최영환  | Seetharaman<br>Rajasekar,<br>고민정,<br>박난청, ,<br>조민현,<br>윤무경,<br>곽정호,<br>박영훈,<br>이영근,<br>이한철,<br>손병구,<br>임동순 | Horticulture, Environment and Biotechnology | 투고예정      | 국내     | SCIE                          |

## 2. 특허 성과

| 출원된 특허의 경우   |           |             |      |                 | 등록된 특허의 경우 |     |     |     |      |
|--------------|-----------|-------------|------|-----------------|------------|-----|-----|-----|------|
| 출원연도         | 특허명       | 출원인         | 출원국  | 출원번호            | 등록연도       | 특허명 | 등록인 | 등록국 | 등록번호 |
| 2012. 09. 21 | 머위로부터 리한화 | 부산대학교 산학협력단 | 대한민국 | 10-2012-0104975 |            |     |     |     |      |
|              |           |             |      |                 |            |     |     |     |      |

\* 발명자 : 최영환, 임동순, 이영근, 박세진, 고민정

| 출원된 특허의 경우   |                          |             |      |                 | 등록된 특허의 경우 |     |     |     |      |
|--------------|--------------------------|-------------|------|-----------------|------------|-----|-----|-----|------|
| 출원연도         | 특허명                      | 출원인         | 출원국  | 출원번호            | 등록연도       | 특허명 | 등록인 | 등록국 | 등록번호 |
| 2013. 10. 25 | 반응분표식이머위로부터 유출된 폐타유물 제조법 | 부산대학교 산학협력단 | 대한민국 | 10-2013-0127744 |            |     |     |     |      |
|              |                          |             |      |                 |            |     |     |     |      |

\* 발명자 : 최영환, 임동순, 이영근

| 출원된 특허의 경우  |                               |             |      |                 | 등록된 특허의 경우 |                                    |             |      |            |
|-------------|-------------------------------|-------------|------|-----------------|------------|------------------------------------|-------------|------|------------|
| 출원연도        | 특허명                           | 출원인         | 출원국  | 출원번호            | 등록연도       | 특허명                                | 등록인         | 등록국  | 등록번호       |
| 2014. 1. 29 | $\alpha$ -쿠베노트 효유분함는르기 방치 조성물 | 부산대학교 산학협력단 | 대한민국 | 10-2014-0011531 | 2014-04-01 | 머위로부터 순수분리한 신규한 Petatewalide B 화합물 | 부산대학교 산학협력단 | 대한민국 | 10-1382959 |
|             |                               |             |      |                 |            |                                    |             |      |            |

\* 발명자 : 최영환, 임동순

| 출원된 특허의 경우   |                                      |             |      |                 | 등록된 특허의 경우 |     |     |     |      |
|--------------|--------------------------------------|-------------|------|-----------------|------------|-----|-----|-----|------|
| 출원연도         | 특허명                                  | 출원인         | 출원국  | 출원번호            | 등록연도       | 특허명 | 등록인 | 등록국 | 등록번호 |
| 2014. 11. 28 | 페타테 B를 유호성으로 포함하는 알레르겐 예방 또는 치료용 조성물 | 부산대학교 산학협력단 | 대한민국 | 10-2014-0168751 |            |     |     |     |      |

\* 발명자 : 최영환, 임동순, 이영근

| 출원된 특허의 경우   |                            |             |      |                 | 등록된 특허의 경우 |     |     |     |      |
|--------------|----------------------------|-------------|------|-----------------|------------|-----|-----|-----|------|
| 출원연도         | 특허명                        | 출원인         | 출원국  | 출원번호            | 등록연도       | 특허명 | 등록인 | 등록국 | 등록번호 |
| 2015. 01. 23 | 알레르기 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물 | 부산대학교 산학협력단 | 대한민국 | 10-2015-0011429 |            |     |     |     |      |

\* 발명자 : 최영환, 임동순, 이영근

### 3. 인력활용/양성 성과

| 지원 총인원 | 지원 대상 (학위별, 취득자) |    |    |    | 성별 |   | 지역별 |    |      |
|--------|------------------|----|----|----|----|---|-----|----|------|
|        | 박사               | 석사 | 학사 | 기타 | 남  | 여 | 수도권 | 대전 | 기타지역 |
|        | 2                | 3  | 2  | 1  | 5  | 3 |     |    | 8    |

## 제 2 절 향후 성과활용 계획

### 1. 연구 활용 방안

- 본 연구 결과에서 도출된 기술을 타 약용식물의 순수물질 분리 및 구조 동정 방법에 활용.
- 분획별 추출물의 생리활성 검증방법 및 약용자원식물로부터 물질의 순수분리 기술은 타 생물자원 연구에 활용 가능
- 본 과제의 수행 중에 축적된 독자적인 기술은 기능성 식품소재, 식의약품 및 보조치료제 개발을 위한 기반 조성
- 제품개발 중 부원료로 사용하거나 검토한 어성초, 수세미, 도라지 및 오미자 등 식물체에서 순수 분리한 기능성물질에 대한 논문 및 특허가 진행 중에 있음.
- 본 연구팀이 참여하고 있는 농기평 과제 중에서 천연물의 함량 평가에 활용될 수 있을 것임.
- 본 연구결과(국내야생)와 외국산 원료를 상호비교하여 국내산의 우수성을 홍보활동에 이용 하겠음.

### 2. 산업화 활용 방안

- 페타테왈리드 B를 유효성분으로 포함하는 알레르기 질환 예방 또는 치료용 조성물의 특허를 활용하여 산업체 기술이전 또는 상품화를 기대한다.
- a-쿠베베노에이트를 유효성분으로 함유하는 알레르기 예방 또는 치료용 조성물의 특허를 활용하여 산업체 기술이전 또는 상품화를 기대한다.
- 연구개발한 기능성 제품의 제조공정 및 제품을 협동기관에서 산업화.
- 본 연구결과를 산업화시 생산제품의 특성에 적합한 맛과 향의 개선 연구에 활용 함.
- 머위 기능성물질 또는 알려진 물질의 생리활성 검증에 의해 취득한 산업재산권 3건을 산업체에 기술이전용으로 활용
- 개발기술 및 특허를 타 분야(의약품, 의약부외품 등)에 파급 적용할 수 있어 타 분야에도 기술 이전
- 머위의 소비증대를 통한 농촌지역의 소득작물로서의 활용

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

### 제 1 절 해외 머위관련 일반적 정보

- 머위는 다양한 성분을 가지고 있는데, 꽃대에는 quercetin, kaempferol, 고미질인 petasitin (C<sub>20</sub>H<sub>28</sub>O<sub>4</sub>), isopetasitin (C<sub>20</sub>H<sub>28</sub>O<sub>3</sub>), angelic acid, caproic acid, caffeic acid, chlorogenic acid, fumaric acid 등이 있으며, 뿌리에는 petasin, isopetasin, protocatechuic acid, angelic acid, caproic acid, caprylic acid,  $\beta$ -sitosterol, flavone 등, 잎에는 1-tridecane,  $\beta$ -caryophyllene, eremofukinone, 9-acetomyfukinanolide, S-japonin 등이 분리 보고 됨
- 우리나라에서 자생하고 있는 머위와 유사종인 *Petasites hybridus* (butterbur)는 유럽, 아시아 및 북아메리카원산으로서 질병 예방 (prophylactic), 편두통 (migraines) 치료, 진경제 (antispasmodic agent), 만성기침과 천식 (chronic cough or asthma), 위궤양 (gastric ulcers) 예방, 과민방광 (irritable bladder) 및 비뇨기계 경련 (urinary tract spasms), 항알레르기 (antiallergy), 월경통 (menstrual cramps), 신장결석 (kidney stone), 간과 위장장애 (gastrointestinal disorders) 등의 치료제로서 사용됨.
- *Petasites hybridus*의 잎, 줄기 및 근경 추출물은 두 종의 sesquiterpenes인 petasin과 isopetasin은 진경 및 항염증 효과를 나타냄.
- 서양에서 항암효과가 있다고 알려진 *Petasites officinalis*는 우리나라에서 자생하는 *Petasites japonicus* (S.ef.z) Max와 다른 종이나 우리나라 자생의 머위도 옹종, 암, 기관지염, 편도선염 등에 쓴 기록이 있고 민간에서 암치료에 활용하고 있어 서양 머위에 못지않은 효과가 있을 것으로 생각됨.
- 서양에서는 머위추출물인 “페타포스”를 암환자의 고통을 줄일 수 있는 통증완화제로 사용하고 있음.
- 중국이 원산지인 관동화 (*Tussilago farfara* L.)는 꽃봉오리를 약용으로 사용하며, 중국에만 자생하고 우리나라에는 자생하지 않는 약용으로 재배하는 식물로서 기침에 특효가 있으며 암을 치료하는 데에도 사용됨.

## 제 2 절 해외 머위관련 연구정보

| 개발기술명         |        | 머위 성분의 항염증효과  | 머위 성분의 천식효과  |
|---------------|--------|---|--|
| Keyword       |        | Petasites, Inflammatory   | Petasites, Asthma  |
| 검색건수          |        | 1   | 6  |
| 유효논문건수        |        | 1   | 1  |
| 핵심논문 및<br>관련성 | 논문명    | Role of petasin in the potential anti-inflammatory activity of a plant extract of <i>Petasites hybridus</i> | <i>Petasites hybridus</i> (Butterbur root) extract in the treatment of asthma-An open trial                            |
|               | 학술지명   | Biochemical Pharmacology  | Alternative Medicine Review  |
|               | 저자     | O.A.R. Thomet 외 4명  | Ulrich Danesch   |
|               | 게재년도   | 2001  | 2004   |
|               | 관련성(%) | 40  | 30   |
|               | 유사점    | 서양머위 ( <i>P. hybridus</i> )에 함유되어 있는 petasin으로 항염증 효능 검증  | <i>Petasites</i> 속에서 추출한 추출물의 천식 효과  |
|               | 차이점    | 우리나라 머위는 <i>P. japonicus</i> 로서 서양 머위와는 종명, 꽃의 색에 현저한 차이가 있으므로 우리나라 자생 머위의 식용자원개발시 성공 가능성이 매우 높음            | 기 연구에 사용된 머위는 <i>P. hybridus</i> 로서 우리나라에 자생하는 머위 ( <i>P. japonicus</i> )와는 다른 종이므로 효능 개발시 본 연구팀이 originality를 가질 수 있음 |

- 1) 개발기술명은 본 연구과제 최종 연구개발 목표기술을 의미
- 2) keyword는 검색어를 의미하며, 검색건수는 keyword에 의한 총검색건수를, 유효논문건수는 검색한 논문 중 핵심(세부)개발기술과 관련성이 있는 논문을 의미
- 3) 핵심논문은 개발기술과의 관련성이 높고 인용도가 높은 논문을 기준으로 분석



## 제 7 장 참고문헌

- Abe, N., Onoda, R., Shirahata, K., Kato, T., Woods, M. C., Kitahara, Y., Ro, K. and Kurihara, T. 1968. The structures of bakkenolides-B, -C and -D as determined by the use of a nuclear overhauser effect. *Tetrahedron Lett* 9, 1993-1997.
- Asher, M. I., Montefort, S., Bjorksten, B., Lai, C. K., Strachan, D. P., Weiland, S. K., Williams, H. and the ISAAC Phase Three Study Group. 2006. Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood; ISAAC phases one and three repeat multicountry cross-sectional surveys. *Lancet* 368, 733-743.
- Avula, B., Wang, Y. H., Wang, M., Smillie, T. J. and Khan, I. A. 2012. Simultaneous determination of sesquiterpenes and pyrrolizidine alkaloids from the rhizomes of *Petasites hybridus* (L.) G.M. et Sch. and dietary supplements using UPLC-UV and HPLC - ToF - MS methods. *J Pharm Biomed Anal* 70, 53-63.
- Aydin, A. A., Zerbes, V., Parlar, H. and Letzel, T. 2013. The medical plant butterbur (*Petasites*): Analytical and physiological (re)view. *J Pharm Biomed Anal* 75, 220-229.
- Bernstein, J. A. 2004. Health effects of air pollution. *J Allergy and Clinical Immunology* 114, 1116-1126.
- Cha, J. Y., Jeon, B. S., Park, J. W., Moon, J. C. and Cho, Y. S. 2004. Effect of fermented compositions containing *Inonotus obliquus* with *Houttuynia cordata* on growth of human AGS gastric and HCT-15 colon cancer cells. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 47, 202-207.
- Cha, S. Y., Jang, J. Y., Lee, Y. H., Lee, G. O., Lee, H. J., Hwang, K. T., Kim, Y. J., Jun, W. J. and Lee, J. M. 2010. lipolytic effect of methanol extracts from *Luffacylindrica* in mature 3T3-L1 adipocytes. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39: 813-819.
- Chang, K. W., Moon, C. S., Lee, H. D., Lee, C. J. and Lee, V. C. 1991. Determination of the effective components in the various parts of *Luffa cylindrica* (L.) Roemer and development to remove the flesh from its fruit; ( I ) Determination of chemical components in the vareious parts of *Luffa cylindrica* (L.) Roemer by GC and GC/MS. *J Korea Agric Chem Soc* 34, 366-372.
- Chizzola, R., Ozelsberger, B. and Langer, T. 2000. Variability in chemical constituents in *Petasites hybridus* from Austria. *Biochem Syst Ecol* 28, 421-432.
- Cho, B. S., Lee, J. J., Ha, J. O. and Lee, M. Y. 2006. Physicochemical composition of *Petasites japonicus* S. et Z. Max. *Korean J Food Preserv* 13, 661-667.

- Cho, S. Y., Han, Y.B. and Shin, K.H. 2001. Screening for antioxidant activity of edible plants. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 30, 133-137.
- Choi, O. B. 2002. Anti-allergic effects of *Petasites japonicum*. *Korean J Food & Nutr* 15, 382-385.
- Chung, C. K., Ham, S. S., Lee, S. Y., Oh, D. H., Choi, S. Y., Kang, I. J. and Nam, S. M. 1999. Effects of *Houttuynia cordata* ethanol extracts on serum lipids and antioxidant enzymes in rats fed high fat diet. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 28, 205-211.
- Danesch, U.C., *Petasites hybridus* (Butterbur root) extract in the treatment of asthma—an open trial, *Altern Med Rev* 9 (2004) 54-62.
- Dawson, T. M. and Dawson, V. L. 2003. Molecular pathways of neurodegeneration in Parkinson's disease. *Science* 302, 819-822.
- Dearman, R. J., Skinner, R. A., Deakin, N., Shaw, D. and Kimber, I. 2005. Evaluation of an in vitro method for the measurement of specific IgE antibody responses; the rat basophilic leukemia (RBL) cell assay. *Toxicology* 206, 195 - 205.
- Dong, X. W., Li, R. J., Gao, X. and Row, K. H. 2010. Bakkenolides from *Petasites tatewakianus*. *Fitoterapia* 8, 153-156.
- Dong, X.W., Li, R.J., Gao, X. and Row, K.H., Bakkenolides from *Petasites tatewakianus*. *Fitoterapia* 81 (2010) 153-156.
- Elliott, M. Jr. 1996. Biological properties of plant flavonoids: and overview. *J pharmacognosy* 34, 344-348.
- Fiebich, B.L., Grozdeva, M., Hess, S., Hull, M., Danesch, U., Bodensieck, A. and Bauer, R., *Petasites hybridus* extracts in vitro inhibit COX-2 and PGE2 release by direct interaction with the enzyme and by preventing p42/44MAP kinase activation in rat primary microglial cells. *Planta Medica* 71 (2005) 12-19.
- Guo, L.Y., Hung, T.M., Bae, K.H., Shin, E.M., Zhou, H.Y., Hong, Y.N., Kang, S.S., Kim, H.P., Kim, Y.S., Anti-inflammatory effects of schisandrin isolated from the fruit of *Schisandra chinensis* Baill. *European Journal of Pharmacology* 591 (2008) 293-299.
- Haemmerle, G., Lass, A., Zimmermann, R., Gorkiewicz, G., Meyer, C., Rozman, J.,

Heldmaier, G., Maier, R., Theussel, C., Eder, S., Kratky, D., Wagner, E. F., Klingenspor, M., Hoefler, G. and Zechner, R. 2006. Defective lipolysis and altered energy metabolism in mice lacking adipose triglyceride lipase. *Science* 312, 734-737.

Han, E. H., Park, J. H., Kim, J. Y., Jeong, H. G. 2009. *Houttuynia cordata* water extract suppresses anaphylactic reaction and IgE-mediated allergic response by inhibiting multiple steps of FcεRI signaling in mast cells. *Food and Chemical Toxicology* 47, 1659 - 1666.

HIRA (Health Insurance Review & Assessment Service) <http://www.hira.or.kr>

Jee, H. M., Kim, K. W., Kim, C. S., Sohn, M. H., Shin, D. C. and Kim, K. E. 2009. Prevalence of asthma, rhinitis and eczema in Korean children using the international study of asthma and allergies in childhood (ISAAC) questionnaires. *Pediatric Allergy and Respiratory Disease* 19, 165-172.

Jung, Y. S., Lee, S. K., Ok, C. Y., Cho, E. J., Park, J. S., Choi, Y. W. and Bae, Y. S. 2013. Role of CXCR2 on the immune modulating activity of α-iso-cubebenol a natural compound isolated from the *Schisandra chinensis* fruit. *Biochem Biophys Res Commun* 431, 433-436.

Jung, Y.S., Lee, S.K., Ok, C.Y., Cho, E.J., Park, J.S., Choi, Y.W., Bae, Y.S., Role of CXCR2 on the immune modulating activity of α-iso-cubebenol a natural compound isolated from the *Schisandra chinensis* fruit. *Biochemical Biophysical Research Communications* 431 (2013) 433-436.

Ki, Y., Min, J., Yoo, H. and Paek, D. 2008. The relationship between allergic responses and oxidative stress among male adults in an industrial area. *J Environ Health Sci* 34, 117-123.

Kim, J. H., Kim, Y. M., Chung, H. S., Choi, Y. W., Lee, K. P., Im, D. S., Lee, Y. G. 2014. Optimization of Extraction Conditions for Bakkenolide B from the Leaves of *Petasites japonicus* by Using Response Surface Methodology. *Journal of Life Science* 24, 167-172.

Kim, S. K., Ryu, S. Y., Choi, S. U. and Kim, Y. S. 2001. Cytotoxic alkaloids from *Houttuynia cordata*. *Arch Pharm Res* 24, 518-521.

Langer, T., Mostl, E., Chizzola, R. and Gutleb, R. 1996. A competitive enzyme immunoassay for the pyrrolizidine alkaloids of the senecionine type. *Planta Med* 62, 267-271.

Lee, H.S., Park, C.S., Lee, Y.M., Suk, H.Y., Clemons, T.C. and Choi, O.H., Antigen-induced Ca<sup>2+</sup> mobilization in RBL-2H3 cells: role of I(1,4,5) P<sub>3</sub> and S1P and necessity of I(1,4,5)P<sub>3</sub> production. *Cell Calcium* 38 (2005) 581-592.

Lee, J.S., Yang, E.J., Yun, C.Y., Kim, D.H., Kim, I.S., Suppressive effect of *Petasites*

japonicus extract on ovalbumin-induced airway inflammation in an asthmatic mouse model, *Journal of Ethnopharmacology* 133 (2011) 551–557.

Lee, K. P., Kang, S., Park, S. J. Choi, Y. W., Lee, Y. G. and Im, D. S. 2013. Anti-allergic and anti-inflammatory effects of bakkenolide B isolated from *Petasites japonicus* leaves. *J Ethnopharmacol* 148, 890–894.

Lee, K. P., Kang, S., Park, S. J. Choi, Y. W., Lee, Y. G. and Im, D. S. 2013. Anti-allergic and anti-inflammatory effects of bakkenolide B isolated from *Petasites japonicus* leaves. *J Ethnopharmacol* 148, 890–894.

Nanjing University of Chinese Medicine. 2006. Dictionary of Chinese materia medica, 2nd (eds.), pp. 3490–3491, Shanghai: Shanghai Scientific and Technological Press.

Naya, K., Kawai, M., Naito, M. and Kasai, T. 1972. The structures of eremofukinone, 9-acetoxylfukinanolide, and S-japonin from *Petasites japonicus maxim*. *Chem Let* 1972, 241–244.

Oh, S. H., Yang, Y. H., Kwan, O. Y. and Kim, M. R. 2006. Effects of diet with added Butterbur(*Petasites japonicus Maxim*) on the plasma lipid profiles and antioxidant index of mice. *J East Asian Soc Dietary Life* 16, 399–407.

Pandak, N., Pajic-penavic, L., et. 2011. Bacterial colonization or infection in chronic sinusitis. *Wien Klin Wochenschr* 123, 710–713.

Park, S. Y., Park, S. J., Park, N. J., Joo, W. H., Lee, S. J. and Choi, Y. W. 2013.  $\alpha$ -Iso-cubebene exerts neuroprotective effects in amyloid beta stimulated microglia activation. *Neurosci Lett* 555, 143–148.

Park, S. Y., Park, S. J., Park, T. G., Rajasekar, S., Lee, S. J. and Choi, Y. W. 2013. Schizandrin C exerts anti-neuroinflammatory effects by upregulating phase II detoxifying/antioxidant enzymes in microglia. *Int Immunopharmacol* 17, 415–426.

R.J. Dearman, R.A. Skinner, N. Deakin, D. Shaw, I. Kimber, Evaluation of an in vitro method for the measurement of specific IgE antibody responses: the rat basophilic leukemia (RBL) cell assay, *Toxicology* 206 (2005) 195–205.

Shimoda, H., Tanaka, J., Yamada, E., Morikawa, T., Kasajima, N. and Yoshikawa, M. 2006. Anti type I allergic property of Japanese butterbur extract and its mast cell degranulation inhibitory ingredients. *J Agric Food Chem* 54, 2915–2920.

Shimoda, H., Tanaka, J., Yamada, E., Morikawa, T., Kasajima, N. and Yoshikawa, M., Anti type I allergic property of Japanese butterbur extract and its mast cell degranulation inhibitory ingredients. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54 (2006) 2915–2920.

- Shirahata, K., Kato, T., Kitahara, Y. and Abe, N. 1969. Constituents of Petasites. IV. Bakkenolide-A, a sesquiterpene of novel carbon skeleton. *Tetrahedron* 25, 3179-3191.
- Sok, D. E., Oh, S. H., Kim, Y. B., Kang, H. G. and Kim, M. R. 2006. Neuroprotection by extract of *Petasites japonicus* leaves, a traditional vegetable, against oxidative stress in brain of mice challenged with kainic acid. *Eur J Nutr* 45, 61-69.
- Song, J. H., Kim, M. J., Kwon, H. D. and Park, I. H. 2003. Antimicrobial activity of fractional extracts from *Houttuynia Cordara* root. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32, 1053-1058.
- Tori, M., Kawahara, M. and Sono, M. 1997b. Novel epoxyremophilanolides, eremopetasitenins A1, A2, B1, and B2, from *Petasites japonicus*. *Tetrahedron Let* 38, 1965-1968.
- Torres, P., Ayala, J., Grande, C., Macias, M. and Grande, M. 1998. Furanoeremophilanes and a bakkenolide from *Senecio auricula* var. *major*. *Phytochemistry* 47, 57-61.
- Wang, G. J., Shum, A. Y., Lin, Y. L., Liao, J. F., Wu, X. C., Ren, J. and Chen, C. F. 2001. Calcium channel blockade in vascular smooth muscle cell is major hypotensive mechanism of S-petasin, a hypotensive sesquiterpene from *Petasites formosanus*. *J Pharmacol Exp Ther* 297, 240-246.
- Wang, Y. L., Guo, M. and Wang, Y. 2009. Quality evaluation of *Petasites tricholobus* through simultaneous determination of four bioactive bakkenolides by LC. *Chromatographia* 70, 1367-1371.
- Wildi, E., Langer, T., Schaffner W. and Buter, K. B. 1998. Quantitative analysis of petasin and pyrrolizidine alkaloids in leaves and rhizomes of in situ grown *Petasites hybridus* plants. *Planta Med* 64, 264-267.
- World Health Organization (WHO). 2003. Health aspects of air pollution with particulate matter, ozone and nitrogen dioxide, pp. 7-56, Report on a WHO working Group, EUR/03/5042688, Bonn, Germany.
- Wu, T. S., Kao, M. S., Wu, P. L., Lin, F. W., Shi, L. S., Liou, M. J. and Li, C. Y. 1999. The bakkenolides from the root of *Petasites formosanus* and their cytotoxicity. *Chem Pharm Bull* 47, 375-382.
- Y. Lu, J.K. Son, H.W. Chang, Saucerneol F, a New Lignan Isolated from *Saururus chinensis*, Attenuates Degranulation via Phospholipase Cg1 Inhibition and Eicosanoid Generation by Suppressing MAP Kinases in Mast Cells, *Biomolecules & Therapeutics* 20 (2012) 526-531.

Yaoita, Y. and Kikuchi, M. 1994. Constituents of the rhizomes of *Petasites japonicus* Maxim. IV. Structures of six new eremophilanolides from the rhizomes of *Petasites japonicus* Maxim. *Chem Pharm Bul* 42, 1944–1947.

Yaoita, Y. and Kikuchi, M. 1996a. seco-Eremophilane derivatives from rhizomes of *Petasites japonicus*. *Phytochemistry* 42, 751–755.

Yaoita, Y. and Kikuchi, M. 1996b. Structures of new dinor-eremophilane derivatives and new eremophilanolides from the rhizomes of *Petasites japonicus* Maxim. *Chem Pharm Bul* 44, 1731–1735.

Yoo, J. and Song, D. S. 2004. The *Houttuynia cordata* drink's fatigue-relieving effect on athletes and general population. *J Korean Sport Research* 15, 1345–1356.

Zhang, F.J., Wang, Q., Wang, Y., Guo, M.L., Anti-allergic effects of total bakkenolides from *Petasites tricholobus* in ovalbumin-sensitized rats, *Phytotherapy Research* 25 (2011)116–121.

## 주 의

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