

최 종
연구보고서

진달래를 이용한 지역특화브랜드 개발에 관한
연구

Development of region specialization brand
using *Rhododendron mucronulatum* Flos

주관연구기관 : 대구한의대학교 화장품약리학과
협동연구기관 : 경북대학교 식품공학과

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “진달래를 이용한 지역특화브랜드 개발에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2008년 04월 24일

주관연구기관명 : 대구한의대학교 화장품약리학과

총괄연구책임자 : 안 봉 전

세부연구책임자 : 안 봉 전

연 구 원 : 이 진 영

연 구 원 : 박 근 혜

연 구 원 : 현 석 준

연 구 원 : 김 한 혁

협동연구기관명 : 경북대학교 식품공학과

협동연구책임자 : 조 영 제

연 구 원 : 천 성 숙

연 구 원 : 주 인 식

연 구 원 : 김 진 성

요 약 문

I. 제 목

♣ 연구과제명 : 진달래를 이용한 지역특화브랜드 개발에 관한 연구

주관연구과제명 : 진달래를 이용한 천연활력화장품 개발에 관한 연구

협동연구과제명 : 진달래로부터 생리활성 물질을 이용한 design food 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

진달래 꽃잎과 두견주(진달래술)는 혈액순환을 촉진시키고 혈액속의 콜레스테롤을 낮추어 주며 진해(鎭海), 혈압강하, 피로회복, 류마티스 치료에 효과가 있다고 하였으며, 진달래꽃과 잎은 중국 의학에서 강장제, 이뇨제, 건위제와 같은 높은 약리학적 효능을 가진 것으로 알려져 왔다. 또한 진달래꽃의 2차대사 산물 중 flavonoid 성분인 quercetin, myricetin, afzelin, quercitrin, myricitrin, catechin, dihydroflavonol 등이 항산화 활성이 있음이 알려지는 등 진달래의 생리활성은 다양하게 탐색될 필요성이 있다.

따라서 본 연구에서는 진달래의 꽃, 잎, 줄기 및 뿌리 등으로부터 식물의 생리활성 및 향암, 항균효과와 구성 물질에 대한 탐색을 통해 진달래꽃의 이용가치를 규명함으로써 기초적인 연구정보를 확보하고, 민간요법이나 한약에서 알려진 임상결과를 과학적으로 뒷받침하여 우리고유의 전통 꽃의 명성을 알리며, 화장품 산업 및 기능성 식품산업의 1차적인 원료를 공급하고, 나아가 기능성 화장품 및 식품에 직접 적용함으로써 이를 산업적으로 이용하여 고부가가치 산업의 경쟁력을 확보하고 식물자원을 이용한 고기능성 소재 개발을 위한 생산기술을 개발하고자 한다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 봄의 꽃이라는 탄생적 배경과 서정적 의미에 호소하는 이미지에 부합 지역 특화브랜드로서의 진달래를 활용하여 화장품 및 미용식품을 개발하는데 그 의의가 있다.

<주관기관 연구내용>

- ♣ 진달래 추출물의 생리활성을 검증하여 천연물로서의 효과 확인
- ♣ 고기능성 화장품의 천연물로서의 가치를 평가하기 위하여 미백 및 주름개선효과를 검증
- ♣ 피부에 도포 시 피부 상재균의 영향을 확인하기 위하여 항균효과를 확인
- ♣ 진달래의 유효성분을 분리하기 위하여 column chromatography (Sephadex LH-20, MCI-gel)를 이용
- ♣ 유효분획물을 HPLC와 TLC를 통해 순도 검증
- ♣ Mass spectrum에 의한 유효성분 분획물의 주요 지표물을 동정
- ♣ 진달래 유효분획물의 효능을 검증하기 위하여 생리활성 및 미백, 주름개선 효과, 항균, 항암 효과 검증
- ♣ 진달래 유효성분 함유 다기능 화장품 개발 처방 연구
- ♣ 진달래 추출물을 첨가한 화장품의 안정성 및 인체 안전성을 확인
- ♣ 진달래 유효성분 함유 화장품에서의 효능 검증
- ♣ 진달래 유효성분 함유 화장품 브랜드 시제품 개발
: 크림, 에센스, 로션, 스킨, 팩

<협동기관 연구내용>

- ♣ 진달래 추출물의 항과킨슨, 항관절염, 항산화, 항당뇨, 위궤양 예방, 항고혈압 및 항암효과 등 생리활성 확인
 - 1) 추출최적조건 규명
 - 2) 추출조건별 생리활성 효과 측정

- ♣ EVOP-factorial system을 이용한 향과킨슨, 향관절염, 항산화, 항당뇨, 항고혈압, 위궤양 예방 및 항암기능의 최적화 modeling
- ♣ 용매분획에 따른 생리활성 효과 검증
- ♣ 생리활성 물질의 정제 및 구조 동정
 - 1) NMR spectrum에 의한 구조분석
 - 2) IR spectrum에 의한 구조분석
 - 3) MS spectrum에 의한 구조분석
 - 4) 정제물의 생리활성 효과 측정
- ♣ 기능성 Well-Being Design Food의 개발
 - 1) 분말제품 1종류 개발

IV. 연구개발결과

<주관연구기관 - 대구한의대학교>

진달래꽃 추출물의 전자공여능 측정 결과, 진달래꽃 에탄올추출물과 초임계추출물이 다른 추출물에 비해 높은 전자공여능을 나타내었으며, 진달래꽃 분획물의 경우 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 Fr-3, Fr-4 분획물이 대조군이 BHT와 유사한 전자공여능을 나타내었다. 또한, 진달래 추출물을 함유한 화장품의 전자공여능 측정 결과 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 50% 이상의 전자공여능을 나타내었다. 진달래꽃 추출물의 SOD 유사활성 측정 결과 1.5%에서 51.6%까지 농도가 증가할수록 증가하는 경향을 나타내었으며, 진달래 열수와 에탄올 추출물이 40% 이상의 저해활성을 나타내었다. 게다가, 진달래꽃 분획물의 경우 대조군이 BHT와 유사한 SOD 유사활성을 나타내었으며, 진달래 추출물을 함유한 화장품의 SOD 유사활성 측정 결과, 진달래꽃 추출물을 첨가하지 않은 화장품보다 높은 SOD 유사활성을 나타내었다. 진달래꽃 추출물의 xanthine oxidase 저해활성의 경우 낮은 저해활성을 나타내었으나, 진달래꽃 Fr-2 분획물의 경우 *in vitro* 시험에서 매우 강한 xanthine oxidase 저해활성을 나타내었다. 산화 촉매제인 Fe^{2+} , Cu^{2+} 를 이용하여 지방 산패 억제능을 측정한 결과, 산화 촉매제인 Fe^{2+} 를 함유한 지방 산패 억제능 측정결과,

0.5 mg/mL의 농도에서 70% 이상의 높은 지방산패 억제능을 나타내었으며 산화 촉매제인 Cu^{2+} 를 이용한 지방 산패 억제능의 경우 0.5 mg/mL의 농도에서 진달래꽃 에탄올추출물이 가장 높은 저해능을 나타내어 산화 촉매제인 Fe^{2+} 를 함유한 지방 산패 억제능이 Cu^{2+} 를 이용한 지방 산패 억제능보다 우수한 결과를 나타내었다. 진달래 추출물이 함유된 화장품의 경우 Fe^{2+} 및 Cu^{2+} 를 이용한 지방 산패 억제능 모두에서 낮은 저해활성을 나타내었으며 진달래꽃 분획물의 경우 50 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 *L*-ascorbic acid와 BHT보다 우수한 지방 산패 억제능을 나타내었다. 진달래꽃 추출물의 멜라닌의 생성 억제 작용은 tyrosinase 저해활성과 B16세포를 이용한 멜라닌 생합성 억제 작용으로 측정하였다. 우선, 진달래꽃 추출물의 tyrosinase 저해 활성의 경우 진달래꽃 열수 추출물과 아세톤 추출물이 다른 추출물에 비해 높은 tyrosinase 저해활성을 나타내었으나 모든 추출물 및 진달래꽃이 함유된 화장품에서 낮은 tyrosinase 저해활성을 나타내었다. 또한, 진달래꽃 분획물의 경우 Fr-4를 제외한 Fr-1, Fr-2, Fr-3에서도 낮은 tyrosinase 저해활성을 나타내었다. 더욱이, 멜라닌 생합성 저해능의 경우 진달래꽃 추출물과 분획물의 모든 농도에서 알부틴보다 낮은 멜라닌 생합성 저해능을 나타내었다. 피부 노화를 억제하는 새로운 물질을 검색하는데 이용되는 elastase 저해 활성을 측정한 결과, 진달래 Fr-4 분획물이 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 50% 이상의 저해활성을 나타내었다. 수렴 효과의 측정결과 진달래꽃 Fr-3, Fr-4분획물이 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 50% 이상의 수렴 효과를 나타내었다. 진달래꽃 추출물과 진달래꽃 분획물의 항암 활성 측정 결과, 진달래꽃 열수 추출물이 0.5 mg/mL의 농도에서 70% 정도의 항암활성을 나타내었으며, 진달래꽃 분획물의 경우 Fr-3, Fr-4 분획물이 역시 0.5 mg/mL의 농도에서 높은 항암효과를 나타내었다. 진달래꽃 추출물이 함유된 화장품의 안정성을 측정한 결과, pH 및 점도의 변화가 없이 일정했으며 온도 안정성에서 60일 동안 변화 없이 안정하였다. 진달래꽃 추출물을 첨가한 크림 및 첨가하지 않은 크림의 유·수분 측정 결과 첨가한 크림이 보습 및 수분감이 높게 나타났다. 진달래꽃을 분획하여 2가지 단일물질을 얻었으며, 단일물질 1은 myricetin-3-*O*-rhamnopyranoside, 단일물질 2는 quercetin 3-*O*-rhamnoside로 구조가 결정되었다.

<협동연구기관 - 경북대학교>

본 연구의 목적은 진달래 추출물의 생리활성 기능성을 확인하고 활성 성분의 구조를 분석하여 design food를 개발하기 위함이다. 진달래 꽃잎의 페놀 화합물의 함량은 물 추출물에서 24.23mg/g, 60% ethanol 추출물에서 30.57 mg/g으로 ethanol 추출물에서 더 높은 함량을 나타내었다. 추출물의 수용성 물질에 대한 항산화 효과는 DPPH radical 소거활성이 60% ethanol 추출물에서 89.7%의 전자 공여능을 나타냈으며, ABTS radical cation decolorization은 모든 추출물에서 높은 항산화 활성을 나타내었다. 지용성 물질에 대한 항산화 효과를 측정해 본 결과 antioxidant protection factor(PF)는 30-40% ethanol 추출물에서 1.4 PF로 나타났으며, TBARS는 50% ethanol 추출물에서 67%로 가장 높은 항산화력을 나타내었다. 고혈압에 관여하는 angiotensin converting enzyme에 대한 저해효과를 측정해본 결과 60% ethanol 추출물에서 46.7%의 저해 효과가 관찰되었으며, 항당뇨 실험에서 항당뇨 실험에서는 α -amLyase, α -glucosidase에서 모두 물 추출물이 60% ethanol 추출물보다 높은 저해효과를 나타내었다. 또한 *Helicobacter pylori*균에 대한 항균활성은 60% ethanol 추출물에서 phenol 화합물을 50 μ g/mL이상 주입하였을 때부터 12 mm이상의 clear zone이 관찰되어 *Helicobacter pylori*균에 대한 높은 항균력을 나타내었다. 진달래 추출물을 정제한 결과 quercetin-3-o-rhamnopyranoside, myricetin-3-o-rhamnopyranoside, quercetin 3가지 단일 물질로 동정하였다. 각각의 화합물은 *Helocibacter pylori*균에 대한 항균력을 가지지 않았으나 세가지 물질을 혼합되었을 때 항균력을 가지는 것으로 나타났다.

SUMMARY

[Daegu Haany University]

DPPH free radical scavenging activity of *Rhododendron mucronulatum* Flos extracts was higher in the solutions extracted with ethanol and supercritical fluid. The antioxidant activity was similar to that of BHT in the Fr-3 and Fr-4 at a 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ concentration isolated from *Rhododendron mucronulatum* Flos. Also, cosmetic containing *Rhododendron mucronulatum* Flos showed higher DPPH radical scavenging activity than 50% at a 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ concentration. The SOD like activity of *Rhododendron mucronulatum* Flos extracts was varied from 1.5% to 51.6% and especially, water and ethanol extracts showed over 40% higher activity than other extracts. In addition, the fraction of *Rhododendron mucronulatum* Flos was presented similar antioxidant activity compared with BHT. SOD like activity of cosmetics containing *Rhododendron mucronulatum* Flos was higher than control cosmetics. From the test of inhibitory effect of xanthine oxidase, all extracts of *Rhododendron mucronulatum* Flos and cosmetic containing *Rhododendron mucronulatum* Flos extract showed insufficient inhibition rate. However, Fr-2 fraction of *Rhododendron mucronulatum* Flos powerfully inhibit xanthine oxidase activity *in vitro*. In order to investigate the effects on lipid oxidation, the Fe^{2+} chelating abilities was evaluated and showed that when higher than 0.5 mg/ml *Rhododendron mucronulatum* Flos extracts was used, it showed relatively high inhibition of lipid peroxidation by more than 70%. Also, the Cu^{2+} chelating abilities of *Rhododendron mucronulatum* Flos extracts was higher in the solutions extracted with ethanol at a 0.5 mg/ml concentration. And, *Rhododendron mucronulatum* Flos extracts showed higher inhibitory effect against oxidation of Fe^{2+} rather than Cu^{2+} . The Fe^{2+} and Cu^{2+} chelating abilities of cosmetic containing *Rhododendron mucronulatum* Flos did not affected its activity *in vitro*. The *Rhododendron mucronulatum* Flos fraction exhibited anti-lipid peroxidation which was higher than *L*-ascorbic acid and BHT at a concentration of 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Melanin production was inhibited significantly by

Rhododendron mucronulatum Flos extracts. For the use of *Rhododendron mucronulatum* Flos in tyrosinase inhibition effect, *Rhododendron mucronulatum* Flos extracts was higher in the solutions extracted with water and acetone. And all extracts and cosmetic containing *Rhododendron mucronulatum* Flos did not affected its activity *in vitro*. Also, *Rhododendron mucronulatum* Flos of Fr-4 with the exception of all fraction showed insufficient inhibition rate. Furthermore, melanin synthesis inhibition effect of the arbutin was higher than that of isolated from *Rhododendron mucronulatum* Flos and *Rhododendron mucronulatum* Flos extracts. To develop a new anti-skin aging cosmetics or functional foods by using elastase inhibitor, a elastase inhibitor was screened from *Rhododendron mucronulatum* Flos extracts and its isolated *Rhododendron mucronulatum* Flos fraction condition was investigated. Isolated *Rhododendron mucronulatum* Flos Fraction Fr-4 showed the highest elastase inhibitory activity of 50% at concentration of 100 $\mu\text{g/ml}$. In the measurement of astringent effect, 100 $\mu\text{g/ml}$ of isolated *Rhododendron mucronulatum* Flos with Fr-3, Fr-4 showed over 50%. The cellular growth inhibition of *Rhododendron mucronulatum* Flos extracts and isolated *Rhododendron mucronulatum* Flos was screened using MTT assay against mouse melanoma cell. Water extract of *Rhododendron mucronulatum* Flos showed potent anticancer activity among them, and Fr-3, Fr-4 fractions of isolated *Rhododendron mucronulatum* Flos showed significant inhibitory activity against mouse melanoma cell. The safety of the cosmetic contains *Rhododendron mucronulatum* Flos was assessed by various safety profiles. First, on pH and viscosity change of the cosmetic contains *Rhododendron mucronulatum* Flos was detected. The cosmetic contains *Rhododendron mucronulatum* Flos also showed stability against storage temperature for 60 days. AS a non-invasive skin testing methods, Corneometer CM 825 was used for moisture measurement, Sebummeter SM 810 was used for oiliness measurement. The moisture index showed a significantly higher value in the RMWC as 72.64 ± 21.96 AU compared to the RMEC. The oiliness index of the skin surface was higher value in the RMEC as 30.26 ± 18.33 $\mu\text{g/cm}^2$ compared to the RMWC. As a results, two compounds were isolated. The chemical structures of each compounds were

determined and identified using ^1H - and ^{13}C -NMR and FAB-Mass. The compounds were confirmed as myricetin-3-*O*-rhamnopyranoside (compound 1), Quercetin-3-*O*-rhamnoside (compound 2).

[Kyungpook National University]

The purpose of this study was by analyzing the chemical structure of the component of Jindalae, by establishing its biologically activated function and by development of design food. The biological activity as functional food source with water extracts and 60% ethanol extracts from *Rhododendron mucronulatum* Turcz. flowers were examined. The total phenol contents of 60% ethanol extract (30.6 ± 0.14 mg/g) with *Rhododendron mucronulatum* Turcz. flowers was higher than water extract (23.2 ± 0.21 mg/g). Electron donation ability on DPPH was shown 89.7% in 60% ethanol extracts from *Rhododendron mucronulatum* Turcz. flowers. The ABTS[2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] radical decolorization were $95.5 \pm 0.29\%$ in water extracts and $93.8 \pm 0.08\%$ in 60% ethanol extracts. Antioxidant protection factor of water extracts (1.55 PF) was higher than 60% ethanol extracts (1.55 PF). The TBARS of water extracts and 60% ethanol extracts were shown as 0.29×10^2 μM and 0.28×10^2 μM and it was lower than control. Angiotensin converting enzyme inhibitory activity in water extracts (67.6% inhibition) from *Rhododendron mucronulatum* Turcz. flowers was higher than 60% ethanol extract (46.7% inhibition). Water extracts had higher inhibitory activities on α -amylase and α -glucosidase than 60% ethanol extracts. In the continuous study from natural compound, three simple phenolic compounds have been isolated from the Jindalae. The structures of quercetin-3-*O*-rhamnopyranoside, myricetin-3-*O*-rhamnopyranoside and quercetin were established NMR. Quercetin-3-*O*-rhamnopyranoside, myricetin-3-*O*-rhamnopyranoside and quercetin showed not inhibitory activity on the *Helicobacter pylori* respectively. By the way, inhibitory activity on the *H. pylori* showed then that three compounds mixture.

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	1
제 1 절 연구개발의 필요성	1
제 2 장 국내외 기술개발 현황	4
제 1 절 세계적 수준	4
제 2 절 국내 수준	4
제 3 절 국내외 연구현황	7
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	9
제 1 절 서 론	9
제 2 절 재료 및 방법 (주관연구기관)	11
1. 실험 재료	11
2. 실험방법	16
제 3 절 결과 및 고찰	44
1. 시료의 추출 및 분리	44
2. 항산화능 측정 결과	49
3. 미백효과 측정 결과	63
4. 주름개선 측정 결과	69
5. 수렴활성 측정 결과	72
6. 항암효과 측정 결과	75
7. 항균효과 측정 결과	83
8. 진달래꽃 추출물을 첨가한 화장품의 제조	99
9. 진달래꽃 추출물을 첨가한 화장품의 항산화효과 측정	101
10. 진달래꽃 추출물을 첨가한 화장품의 미백효과 측정	110
11. 진달래꽃 추출물을 첨가한 화장품의 안정성 측정	112

12. 피부의 유·수분량 측정 결과	125
13. 진달래꽃이 첨가된 크림의 사용감 결과	128
14. 진달래꽃 분획물의 구조분석	130
제 4 절 재료 및 방법 (협동연구기관)	146
1. 실험재료	146
2. 실험방법	146
제 5 절 결과 및 고찰	154
1. Phenol성 물질의 추출 조건	154
2. Ethanol 농도에 따른 진달래꽃 추출물의 항산화 효과	158
3. Ethanol 농도에 따른 진달래꽃 추출물의 <i>Helicobacter pylori</i> 항균활성 측정	166
4. Ethanol 농도에 따른 진달래꽃 추출물의 항 고혈압 효과 측정	168
5. Ethanol 농도에 따른 진달래꽃 추출물의 항 관절염 효과 측정	170
6. Ethanol 농도에 따른 진달래꽃 추출물의 항 당뇨 효과 측정	172
7. 진달래 부위별 phenol성 물질의 함량	175
8. 진달래 부위별 항산화 효과	176
9. 진달래 부위별 <i>Helicobacter pylori</i> 항균활성 측정	180
10. 진달래 부위별 항 고혈압 효과 측정	181
11. 진달래 부위별 항 관절염 효과 측정	182
12. 진달래 부위별 항 당뇨 효과 측정	183
13. 진달래 추출물의 분리	187
14. 진달래 분획물의 생리활성 검정	192
15. 진달래 추출물로부터 <i>Helicobacter pylori</i> 균 저해물질 분리 및 정제	198
16. 진달래로부터 분리한 <i>Helicobacter pylori</i> 억제물질을 이용한 진달래 과립차 시제품 개발	211
 제 4 장. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	 220

제 5 장 연구개발결과의 활용계획	223
제 1 절 기술적 측면에서의 활용방안 및 기대성과	223
제 2 절 경제적·산업적 측면에서의 활용방안 및 기대성과	224
제 6 장 연구개발 관련 본 제품 생산	226
제 1 절 주관연구기관 - 대구한의대학교 화장품약리학과	226
제 2 절 협동연구기관 - 경북대학교 식품공학과	227
제 7 장 참고문헌	228

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 필요성

1. 연구개발 대상 기술의 경제적·산업적 중요성 및 연구개발의 필요성

♣ 참꽃(진달래)을 활용한 지역특화 브랜드 연구개발 중요성

- 진달래는 옛 부터 민가에서 새 생명을 의미하는 화신의 꽃으로 화전놀이의 대표적 민가 음식으로 애용되어 왔음.
- 진달래는 이미 소월의 시를 통해 민족적 의식에 뿌리 깊게 스며있는 향토색이 짙은 정서적 꽃으로 국민 통합적 이미지를 포함하고 있음.
- 이미 지방자치단체에서는 이른 봄 진달래축제(참꽃)라는 이벤트로 지역특화 산업의 이미지 창출에 활용하고 있음. (예 : 경북의 비슬산 참꽃 축제 외 문경, 등 다수)
- 봄의 꽃이라는 탄생적 배경과 서정적 의미에 호소하는 이미지에 부합 지역특화브랜드로서 진달래를 활용 화장품 및 미용식품 개발연구는 마케팅 분야에서 시장 접근성이 빠를 것으로 판단됨.

♣ 참꽃(진달래)을 활용한 고기능성 화장품 개발 및 난치병 예방 치료식품으로서의 개발 필요성

- 본 사업에서는 진달래를 기원으로 가능한 많은 종류의 생리활성을 screening하여 기존에 보고 된 생리활성보다 우수한 활성을 나타내는 물질을 주 target으로 정하여 이를 이용한 제품을 개발하고자 함.
- 현재의 시중에 유통되는 상품들은 주로 의약품으로 개발된 것이기 때문에 개개인의 취향에 따라 선택할 수 있는 폭은 매우 좁은 상태임. 따라서 의약품이 아닌 기능성 화장품 및 식품의 형태로 화장품 및 식품에 직접 첨가하거나, 캡슐화, 분말화 시켜 적용범위를 확대할 수 있음.
- 고기능성 컨셉에 맞게 미백, 주름개선, 항염증억제 등의 효과를 최대한 살린 화장품을 개발하여 피부 상태에 따라 다양하게 사용할 수 있음.
- 또한 design food의 기법을 통하여 식품에 향관절염, 항당뇨병, 항산화, 위염억제,

항과킨슨병 및 항고혈압 성분이 함유되어 질 수 있도록 design된 식품을 개발하여 섭취 형태의 다양화를 이룰 수 있음.

- 현재 노인성 질환인 관절염에 사용되는 약물은 요산 배설을 촉진시키는 pyrazolon계통의 sulfipyrazone과 과립 백혈구의 이동을 억제하는 colchicine, 체내의 요산농도를 감소시키는 allopurinol, 요산 형성을 봉쇄하는 약물인 allopurinol 등이 있음.
- 그러나 이들은 주로 약물로 이용되는 것들이며, 천연물을 이용한 관절염 유발효소인 xanthin oxidase에 대한 저해기술은 아직 전문화, 보편화되지 않고 있는 실정임.
- 피부상재균인 *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*에 대한 항균 화장품은 시중에 많이 출시되어 있으나, 구체적인 연구결과와 천연물 소재를 이용한 저해기술은 아직 전문화, 보편화되지 않고 있는 실정임.
- 또한 식품에서도 현재 *H. Pylori* 균은 특정 유제품의 선전을 위해 매체를 이용한 광고로 일반인들에게도 잘 알려진 위염의 주요 발병균임. 이러한 *Helicobacter pylori*의 억제를 위한 여러 종류의 연구결과물들이 나오고 있으나, 이는 주로 젖산균을 이용한 것들이며 천연물 소재를 이용한 저해기술은 아직 전문화, 보편화되지 않고 있는 실정임. ➔ 본 연구팀은 이미 *Helicobacter pylori*균에 의한 항 위염 효과를 screening하는 기술을 확보하고 있음.
- 고혈압은 발생기작에서 angiotensin converting enzyme(ACE)은 혈압 조절에 매우 중요한 역할을 함. ACE저해작용을 갖는 peptide는 현저한 혈압강하 작용을 가지며, ACE억제제들이 고혈압 치료제로서의 개발 가능성이 제시된 후 ACE 저해효과를 가지는 Novasc, Diovan 등의 고혈압치료제가 개발된 바 있음. 그러나 이러한 의약품이 아닌 기능성 식품의 형태인 고혈압 억제제가 개발되어 산업화 된 예는 거의 없는 실정임.
- 현재 국내에 1000만에 육박하는 당뇨병 환자들의 치료제 또는 대용식이 개발되지 않아 치료에 어려움을 겪고 있는 실정임. 현재 당뇨병 치료제로는 Acarbose와 Vogliboser가 각각 2.79억\$, 1.75억\$의 시장을 형성하고 있으며 이들을 대체할 수 있는 천연물 소재의 당뇨억제 물질의 개발이 시급한 실정임.
- Tyrosinase (monophenol, dihydroxy - L - phenylalanin : oxygen oxidoreductase, EC 1.14.18.1)는 구리를 함유한 효소로서 melanin 합성의 초기단계인 L - tyrosine에서 L - 3,4 - dihydroxyphenylalanine (DOPA), DOPA에서 L - dopa quinone으로의 전

이에 작용하는 효소로 알려져 있음.

- Tyrosine 활성 억제제는 피부 내에서의 melanin polymer 합성을 효과적으로 저해할 수 있어 피부 미백제의 개발에 있어서 tyrosinase 활성억제 실험은 유용한 평가법으로 인정하고 있으나, 천연물을 이용한 tyrosinase 활성억제 실험은 아직 전문화, 보편화되지 않고 있는 실정임.
- Parkinson병은 뇌에 존재하는 dopamine과 acetylcholine의 불균형에 의해서 신경 변성이 야기되어서 생기는 것으로 보통 dopamine을 생성하는 세포의 변성 때문에 일어난다.
- Parkinson병 치료에는 neurotransmitter인 dopamine의 전구물질인 L-DOPA가 일반적으로 쓰임 → L-DOPA가 많이 함유된 식품의 섭취는 혈액 내 L-DOPA의 level을 증가시키고 아무런 부작용 없이 환자들의 motor performance에 뚜렷한 개선을 가져옴. 그러나 천연물소재에 함유된 이들 L-DOPA를 활용하고자 하는 시도는 현재까지 이루어지지 않고 있는 실정임.
- 소비자들의 접근성을 용이하게 하기 위해 또한 취향의 다양성을 소화하기 위해서도 천연물 소재를 이용하여 기능성 화장품 및 성인병에 대한 예방력을 가진 물질의 개발이 필요함. 이는 국내뿐만이 아니라 진달래 등 천연 plant source의 미백, 주름개선 및 성인병치료 또는 예방 물질로서의 효능이 잘 인식되어 있지 않은 국제시장을 겨냥 할 때도 매우 긍정적인 결과를 가져올 수 있을 것이라 기대됨.
- 본 개발팀은 많은 사업 수행을 통하여 미백, 주름개선, 항노화, 항염증 및 항파킨슨병, 항관절염, 항당뇨병, 항산화, 위궤양억제 및 항고혈압 실험에 관한 know how를 확보한 상태임.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 세계적 수준

개념정립 단계		기업화 단계	0	기술 안정화 단계	
---------	--	--------	---	-----------	--

제 2 절 국내 수준

- 지금까지 진달래꽃으로부터 분리한 생리기능물질을 분리, 정제하고 그 활성을 검증하여 식품에만 첨가될 뿐, 고기능성 화장품 개발에 실용화 된 바는 없는 상태임.
- 폐자원의 이용에 대한 인식부족과 진달래꽃의 주요기능에 관한 생리활성 검증이 부족한 상태임.
- 천연자원의 활성효과와 기능을 이해하는데 인식이 부족한 상태임.
- 실험에 필요한 예산부족으로 체계적이고 생산적인 공정 개발이 어렵고, 모든 국민의 기호성에 맞는 화장품 조합 기술이 부족함.
- 자연에 존재하는 꽃이라는 인식뿐, 우리고유의 상품이라는 의식고취가 부족함.
- 여러 가지 형태의 천연 재료를 첨가한 화장품이 쏟아져 나오고 있는 시점에서 보다 체계적인 연구가 미비한 실정임.
- 화장품 제형과 화장품에 첨가되는 천연물을 동시에 검증하여 생산까지 할 수 있는 곳이 없음.

연구개발 대상 기술의 화장품 및 식품 관련기술은 다음과 같다.

구 분		관 련 기 술 현 황
화 장 품	항균 화장품	<ul style="list-style-type: none"> ○ 피부상재균인 <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Staphylococcus epidermidis</i>에 대한 항균 화장품은 시중에 많이 출시되어 있으나, 구체적인 연구결과와 천연물 소재를 이용한 저해기술은 아직 전문화, 보편화되지 않고 있는 실정임.
	미백 화장품	<ul style="list-style-type: none"> ○ Tyrosinase (monophenol, dihydroxy - L - phenylalanin : oxygen oxidoreductase, EC 1.14.18.1)는 구리를 함유한 효소로서 melanin합성의 초기단계인 L - tyrosine에서 L - 3,4 - dihydroxyphenylalanine (DOPA), DOPA에서 L - dopaquinone으로의 전이에 작용하는 효소로 알려져 있음. ○ Tyrosine 활성 억제제는 피부 내에서의 melanin polymer 합성을 효과적으로 저해할 수 있어 피부 미백제의 개발에 있어서 tyrosinase 활성 억제 실험은 유용한 평가법으로 인정하고 있으나, 천연물을 이용한 tyrosinase 활성억제 실험은 아직 전문화, 보편화되지 않고 있는 실정임.
	주름개선 화장품	<ul style="list-style-type: none"> ○ 인체의 중성구 과립구내에 존재하는 elastase는 체내의 elastin을 분해하는 백혈구 과립 효소 중의 하나로 이상조직에서는 그 효소의 활성이 극히 높아 조직 파괴에 직접적인 원인이 되어 피부의 주름 및 탄력성 소실을 유발하는 효소임. 화장품에 천연물을 첨가하여 주름억제효과를 볼 수 있는 연구는 아직 보편화된 곳이 없으며, 본 연구팀은 이미 SCI(<i>Dermatologic Surgery</i>)논문에 투고하여 실험기술을 확보하고 있음. ○ 논문을 통하여 주름을 억제하는 몇 가지 방안에 대해 소개된 바 있으나, 천연물을 이용한 주름개선에 대한 연구는 초기연구단계에 그치고 있을 뿐 산업화에 성공한 예는 없음.
	항염증 화장품	<ul style="list-style-type: none"> ○ 고분자 다당인 hyaluronic acid(HA)은 진피층의 섬유아세포로부터 산출되어, 표피, 진피에 있어서 주요한 세포외 매트릭스로서, 상처 치유 과정에서 inflammation, fibrosis등을 증가시키는 것으로 알려져 있음. 현재 아토피 환자들이 급성장 하고 있는 시점에서 천연물 소재의 화장품 개발이 시급한 실정임. 또한 천연물을 이용하여 아토피 피부 개선 대체 의약품 개발이나 화장품을 개발하는 것이 급선무임.

구 분		관 련 기 술 현 황
식품	항위염	<ul style="list-style-type: none"> ○ 현재 <i>Helicobacter pylori</i>균은 매체를 이용한 광고로 일반인들에게도 잘 알려진 위궤양 및 위염의 주요 발병균임. 이러한 <i>Helicobacter pylori</i>의 억제를 위한 여러 종류의 연구결과물들이 나오고 있으나, 이는 주로 젖산균을 이용한 것들이며, 양잠산물 소재의 천연물을 이용한 저해기술은 아직 전문화, 보편화되지 않고 있는 실정임.
	항관절염	<ul style="list-style-type: none"> ○ 현재 관절염에 사용되는 약물은 요산 배설을 촉진시키는 pyrazolon계통의 sulfapyrazone과 과립 백혈구의 이동을 억제하는 colchicine, 체내의 요산 농도를 감소시키는 allopurinol, 요산 형성을 봉쇄하는 약물인 allopurinol 등이 개발되어 있음. ○ 논문을 통하여 관절염을 예방하는 몇 가지 방안이 소개된 바 있으나, 천연물을 이용한 항관절염에 대한 연구는 초기연구단계에 그치고 있을 뿐 산업화에 성공한 예는 없음.
	항당뇨	<ul style="list-style-type: none"> ○ 현재 당뇨병 치료제로는 Acarbose와 Vogliboser가 각각 2.79억\$, 1.75억\$의 시장을 형성하고 있으며 이들을 대체할 수 있는 천연물 소재의 당뇨억제 물질의 개발이 시급한 실정임. ○ 또한 천연물을 이용하여 항당뇨 효능을 가지는 대체 의약품의 개발이나 당뇨병 환자식을 개발하는 것이 급선무임.
	항고혈압	<ul style="list-style-type: none"> ○ Angiotensin converting enzyme(ACE)저해작용을 갖는 물질이 현저한 혈압강하 작용을 가지며, 이들 ACE억제제들이 고혈압 치료제로서의 개발 가능성이 제시된 후 Novasc(amlodipine)와 Diovan(valsartan) 등의 약물이 개발되어 고혈압의 치료제로 이용되고 있지만, 천연물에서 분리하여 ACE 저해활성을 가지는 물질을 이용한 기능성 식품의 산업화는 이루어지지 않고 있는 실정임.
	항파킨슨	<ul style="list-style-type: none"> ○ 현재 천연물을 이용한 기능성 식품소재의 edible 백신의 개념을 가지는 상품은 출시된 적이 없으며, 파킨슨병 치료 약물을 대체할 수 있는 천연물 소재의 파킨슨 예방 물질의 개발이 시급한 실정임. ○ 또한 천연물을 이용하여 파킨슨 예방 기능을 가지는 환자식을 개발하는 것이 필요함.

제 3 절 국내외 연구현황

- 1970년대 우리나라에서 진달래꽃 및 진달래 나무에 대한 연구 자료는 원예학회에서 보고한 생육 및 개화에 관한 자료가 전부였으나, 1991년 한국응용생명화학회지에서 밝힌 진달래꽃의 오일에 함유된 휘발성 성분에 관한 연구에서 GC 및 GC-MASS로 분석한 결과 총 162개의 성분이 분리 동정 되었으며, 이들 중 탄화수소류 61종, 18종의 aldehyde, 18개의 ester, 41종의 alcohol, 3종의 ketone, 4종의 oxide, 8종의 acid류, 6종의 phenol 및 기타 3성분을 함유한 것으로 밝혀짐. 또한 1996년 기재된 진달래꽃 으로부터 분리한 페놀산 화합물 5-*O*-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid), 3,5-*O*-dicaffeoylquinic acid, 4,5-*O*-dicaffeoylquinic acid, 3,4-*O*-dihydroxycinnamic acid(caffeic acid), 4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid (ferulic acid)와 플라보노이드 화합물 afzelin, quercitrin, quercetin, myricitrin, ampelopsin, myricetin등의 화합물의 항산화효과를 측정한 결과, α -tocopherol < ferulic acid < caffeic acid < chlorogenic acid < 4,5-*O*-dicaffeoylquinic acid < 3,5-*O*-dicaffeoylquinic acid 및 afzelin < α -tocopherol < quercitrin < quercetin < myricitrin < ampelopsin < myricetin의 화합물 순으로 항산화 효과가 높은 것으로 나타남. (부산국립대학교 식품영양연구팀, 정태영, 김미애, 이승은)
- 1999년도 한국식품영양학회에서 대전보건대 식품영양연구팀이 연구한 진달래꽃 에테르(ester) 추출물에서 탄화수소류, 탄화수소류의 산소화 유도체(Oxygenated derivations), 방향족화합물인 n-heneicosane, n-tricosane, n-tritricosane, n-pentacosane, n-heptacosane, n-nonacosane의 물질 등이 가공 및 숙성 도중에 효소작용, 미생물 및 효모에 의한 발효, 가열 등에 의한 산화에 의해 2-ethoxy-1-hexanol, n-hexadecanoic acid methyl ester, 9,12-octadecadienoic acid methyl ester, 9,12,15-octadecadienoic acid methyl ester, n-eicosanoic acid methyl ester, n-pentacosane, 9-docosaenoic acid methyl ester, n-heptacosane등과 같이 다른 물질로 변환되거나 전구물질(precursor)로부터 생성을 보고함.
- 특허청의 특허출원의 경우 진달래꽃과 꿀을 혼합한 숙성액의 기능성 건강음료 및 진

달래의 꽃 및 진달래의 잎과 뿌리 및 줄기에서 얻어낸 추출액에서 얻어낸 숙성액을 이용한 건강음료에 관한 것, 진달래의 잎, 뿌리, 줄기에서의 추출액 및 진달래 꽃의 숙성액에 알코올을 혼합하여 제조하는 진달래주의 제조방법에 관한 것 등이 있음. (이인화 특허출원 10-2001-0004859, 10-2002-0002687, 10-2003-0033298)

- 국외의 경우, gibberellic acid가 진달래 휴면활동에 미치는 영향이나, 진달래 잎과 뿌리에서 추출한 유효성분의 동정 및 anti-HIV등의 생리활성에 관한 보고가 일본과 중국 연구팀에 의해 밝혀졌으나, 진달래꽃과 진달래꽃에 함유된 유효성분의 생리활성에 관해서는 발표된 바 없는 상태임.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 서 론

최근 웰빙시대를 맞아 건강과 미용에 대한 관심이 고조됨과 더불어 항산화 및 항노화 등에 유용한 소재들을 이용한 제품출시가 활발히 전개되고 있다. 이는 현대인이 오염된 공기와 약물, 불규칙한 생활로 생긴 독성이 인체의 피부 축적되면서 활성 산소를 과잉 발생 시켜 노화가 촉진되고 있는 등 항산화에 대한 관심이 점차 높아지고 있기 때문으로 분석되고 있다¹⁾. 노화란 세포와 신체조직 전 기관에 걸쳐 일어나는 기능적, 구조적, 생화학적 변화라 할 수 있다. 최근 생물의 발생, 유전 등 주요 현상에 대한 기본 원리가 계속 밝혀지고 있으나, 아직까지도 노화의 조절원리나 노화의 기작에 대해서는 분명하게 밝혀지지 않고 있다. 현재까지 밝혀진 노화의 원인에는 크게 분자레벨에 의한 노화, 세포 레벨에 의한 노화, 조직·장기레벨에 의한 노화, 개체 레벨에 의한 노화 등으로 나뉘며 분자레벨의 노화에는 디옥시리보핵산(DNA)의 손상, 손상된 DNA의 수복 기능의 저하, 유전암호 해독의 착오, 노화촉진유전자 등이 있다. 세포 레벨에 의한 노화는 형태학·생화학·생리학 등의 연구영역에서 노화의 원인을 밝히려 노력하고 있으며 조직·장기레벨에 의한 노화는 신경계, 심장 및 혈관계, 호흡기계, 생식선, 결합조직, 면역계 등에서 노화의 원인을 발견할 수 있다. 개체 레벨에 의한 노화는 적응반응의 변화, 노 배설 기능의 변화, 체온 조절의 변화, 대사조절의 변화 등 항상성조절 기능의 변화에서 나타난다. 이러한 노화의 원인 중에서 노화유도유전자와 관련된 것은 분자레벨에 의한 노화이며 유해산소와 관련된 것은 세포레벨의 의한 노화이다²⁻⁶⁾. 인간의 몸속에서 세포가 산소를 이용하여 대사 작용을 하는 과정에서 활성 산소라는 부산물이 생긴다. 이러한 활성산소는 강력한 세포독성을 가지고 있기 때문에 세포막이나 단백질 혹은 DNA의 구조와 기능을 손상시키고 이러한 손상이 축적되면 암, 심장병, 백내장, 기억력 장애, 노화 등이 일어난다는 것이다. 이러한 세포독성물질들을 분해하여 노화를 방지하는 작용을 하는 물질을 항산화 물질이라고 한다. 이는 산소에서 생성되는 활성산소(Reactive Oxygen Species; ROS) 생성을 감소시키며 생성된 활성산소에 의한 손상부위를 복구하거나 새로운 물질로 교체할 수 있기 때문이다⁷⁻¹⁰⁾. 생체 내에서는 기본적으로 생성되는 활성산소와

free radical을 방어할 수 있는 항산화 효소로서는 SOD¹¹⁾, catalase¹²⁾, peroxidase¹³⁾ 등이 있으며 항산화를 나타내는 대표적 물질로서 합성 항산화제인 BHA, BHT, TBHQ와 천연 항산화제로는 tocopherol¹⁴⁾, sesaminol, capsaicin, quercetin¹⁵⁾, gallic acid¹⁶⁾ 등이 있다. 하지만 합성 항산화제의 경우 인체 유해성에 의해 제품에 사용 시 배합 비율이 제한적이며 천연 항산화제의 경우 제품에 사용 시 다른 성분과의 혼화성이 낮아 사용성이 제한적이다. 따라서 인체 유해성이 낮고 혼화성이 뛰어나며, 활성산소 및 free radical을 방어가 우수하고 항노화 등의 다기능성을 가진 소재를 검색하고자 본 실험을 실시하였다.

진달래(*Rhododendron mucronulatum* Turcz.)는 중국을 비롯하여 시베리아 및 한국, 일본의 홋카이도 등지에서 자생하는 철쭉과의 낙엽 활엽관목이다. 해발 50~2000m 사이의 산에서 주로 자라며 꽃은 3월에서 5월 사이에 잎보다 먼저 개화 한다¹⁷⁻¹⁹⁾. 진달래의 잎과 뿌리는 중국 의학에서 강장제, 이뇨제, 건위제와 같은 약제로 알려져 왔으며 우리나라 민간에서는, 감기에 의한 두통이나 해수 및 기관지염에 진달래꽃을 이용하기도 했다²⁰⁾. 또한, 옅은 홍색의 진달래꽃은 식품이나 화장품의 발색제 및 향료로서도 이용하였다. 진달래꽃에 관한 효능으로는 항산화 효과²¹⁾ 및 항암효과, 진달래꽃으로부터 분리된 페놀산 화합물²²⁾ 및 플라보노이드 화합물의 항산화 효과²³⁾가 밝혀져 있으며 진달래꽃을 이용한 화장품 소재 개발 및 물성에 관한 연구²⁴⁾가 이루어져 있으나 그 내용이 항산화 활성을 중심으로 제한적이다. 또한, 화장품의 다기능성 원료로서 혼합 시 진달래꽃 추출물이 피부에 어떤 생리 활성을 나타내는지에 대한 연구가 미비하다.

따라서 본 연구과제에서는 진달래꽃을 이용하여 보다 폭 넓은 생리활성 검증을 통해 화장품과 식품 및 바이오산업의 다기능성 소재로서 응용가능성을 검토하였다.

[주관연구기관 - 대구한의대학교]

제 2 절 재료 및 방법

1. 실험 재료

가. 재료

본 실험에서 사용한 진달래꽃은 2006년 4월 중순경 경북 청도시에 소재하는 야산에서 채집하였으며 물로 세척하여 음건 후 마쇄하여 실험에 사용하였다.

나. 시료 추출

시료의 추출은 Fig. 1과 같이 추출하였다. 즉, 열수 추출물과 1, 3-butylene glycol 추출의 경우, 진달래꽃에 10배 양의 증류수와 70%로 희석한 1, 3-butylene glycol를 가하여 85℃에서 3시간 환류냉각 추출하여 상등액과 침전물을 분리하여 3회 반복 추출하였다. 시료의 에탄올 추출과 아세톤 추출은 각각 70% 에탄올과 아세톤에 10배의 양을 가하여 실온에서 24시간 침지하여 상등액과 침전물을 분리하여 동일한 방법으로 3회 반복 추출하였다. 진달래꽃의 초임계 추출의 경우, CO₂ 유체와 보조용매 ethanol을 사용하였으며, 유속은 1 flow/min에서 압력 40 Mpa, 45℃에서 추출 행하였다. 각 추출물을 원심분리 및 여과, 농축하여 동결건조 후 냉장실에 보관하면서 본 실험의 시료로 사용하였다.

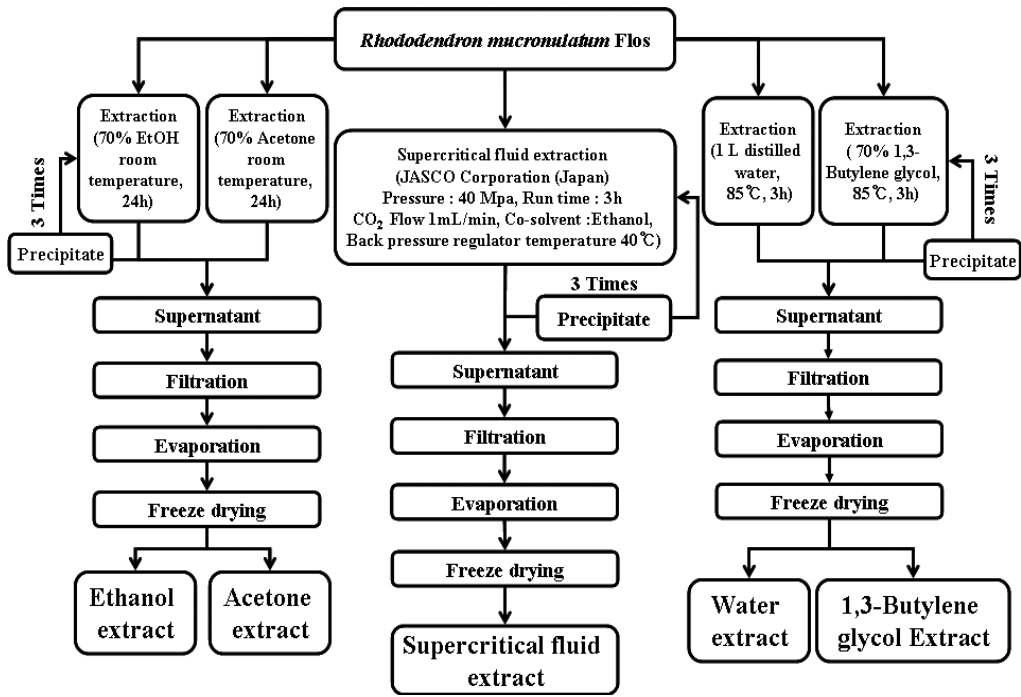


Fig. 1. The procedure for extraction from *Rhododendron mucronulatum* Flos.

다. 분리 정제용 시료의 제조

시료는 Fig. 2와 같이 제조하였다. 건조한 진달래꽃을 추출 탱크에서 70% 아세톤에 침지하여 실온에서 24시간 방치 한 후 원심 분리하여 상층액을 취하였다. 침전물을 다시 70% 아세톤을 가하여 위와 같은 추출 과정을 3회 반복하여 상층액을 모아 농축 여과하여 클로로필을 제거한 후 여액을 회수하여 분리용 시료로 사용하였다. 분리용 Sephadex LH-20 column에 시료를 loading 하고, 전개 용매로는 methanol을 사용하여 methanol : D.I.-water 0:100→100:0로 전개하여 분리시켰다. 각 분획물은 silica gel thin layer chromatography(TLC)로 전개시켜 발색시약으로 발색유무를 확인한 후 본 실험의 시료로 사용하였다.

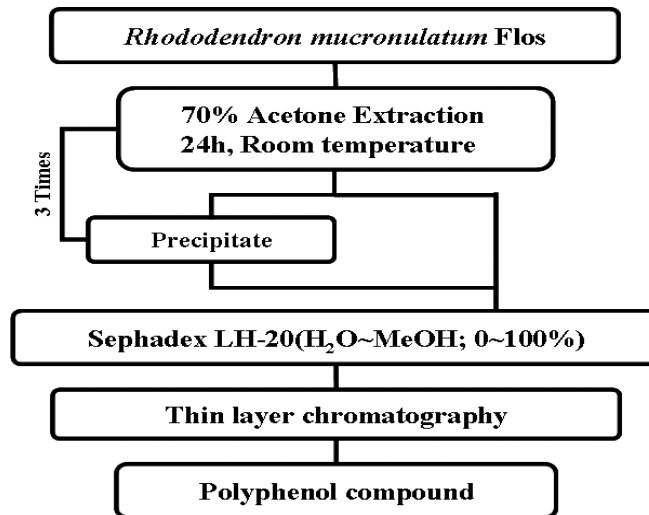


Fig. 2. Procedure for polyphenol isolated from *Rhododendron mucronulatum* Flos.

라. 시약 및 기기

1) 항산화능 및 항염증 측정 시약

항산화능과 항염증 측정 실험에 사용된 시약인 1 - 1 - diphenyl - 2 - picryl - hydrazyl (DPPH), xanthine, xanthine oxidase, pyrogallol, trichloroacetic acid(TCA) 등은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, 2 - thiobarbituric acid(TBA)는 Eastern Organic Chemical(Rochester, NY, USA)에서 구입하여 사용하였다.

2) 미백 및 주름억제 효과 측정 시약

미백 및 주름억제 효과 측정에 사용된 시약인 mushroom tyrosinase, L - 3,4 - dihydroxyphenyl - alanine(L - DOPA), porcine pancreas elastase (PPE), N - Succinyl - (L - Ala)₃ - p - nitroanilide 등은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, M.O., U.S.A)에서 구입하였다. 흑색종 배양에 사용된 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 은 Gibco BRL Co. (Grand Island, NY, USA)에서 구입하여 사용하였다.

3) 항균력 측정에 사용된 균주 및 배지

항균력 검색 실험에서 사용한 공시 균주는 피부 상재균으로서 *Staphylococcus aureus* KCTC 1621, *Staphylococcus epidermidis* KCTC 1917 및 *Escherichia coli* KCTC 1039 를 계대 배양하여 사용하였으며, 전 배양 및 본 배양을 위한 액체 배지는 nutrient broth(NB), tryptic soy broth(TSB)를 Difco Lab.(Sparks, M.D., U.S.A)에서 구입하여 사용하였으며, 생육 저해환 및 생균수 측정을 위한 고체배지는 nutrient agar(NA), tryptic soy agar(TSA)를 Difco Lab.(Sparks, M.D., U.S.A)에서 구입하여 사용하였다.

4) 항암효과 측정에 사용된 세포주 및 시약

암세포 증식에 미치는 영향에 대한 실험의 세포주는 피부암세포인 B16F10은 Korean

Cell Line Bank(KCLB)에서 구입하여 사용하였다. 항암효과 측정을 위한 시약은 RPMI 1640 Medium, DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium), fetal bovine serum(FBS), penicillin/streptomycin(1000U/ml), 0.5% trypsin-EDTA, 0.4% trypan blue stain은 Gibco BRL Co.(Grand Island, NY, USA) 및 haemocytometer(Marienfeld, Germany)에서 구입하여 사용하였으며, 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromide(MTT)와 SRB(Solforhodamine B Sodium salt)는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, M.O., U.S.A)에서 구입하여 사용하였다. 그 외의 기타 시약은 특급 시약을 사용하였다.

5) 실험에 사용된 기기

생리활성 실험에 사용된 기기는 UV/vis spectrophotometer(Hitachi, Japan), rotary vacuum evaporator(Tokyo, Rikakikai Co., Japan), centrifuge(Hitachi, Japan), freeze drier(Ilsin, Korea), microscope(Olympus, Japan), CO₂ incubator(Hanbaek Scientific Co., Korea), pH meter(Metrohm, Switzerland), B.O.D incubator(Hanbaek Co., Korea), autoclave(Hanbaek Scientific Co., Korea), ELISA reader(Bio Rad, Japan)을 사용하였으며, 화장품 안정성 실험에 사용된 기기는 rheometer(TA Instruments Ltd, USA), pH meter(Metrohm 691, Metrohm UK Ltd, Herisau, Switzerland), Brookfield viscometer(Brookfield LV-II⁺, Brookfield Engineering Laboratories, Inc., Middleboro, MA, USA), spectrophotometer(Minolta, Japan), homo mixer(Tokushu Kika Kogyo Co., Japan), agi mixer(Young Hana Tect, Korea), hot plate(Young Hana Tech., Korea) 등을 사용하여 측정하였다.

2. 실험 방법

가. 총 폴리페놀 함량 측정

폴리페놀의 정량은 AOAC²⁵⁾에 준하여 정량하였다. 즉, 100배 희석한 시료용액 3 mL에 phenol reagent 시약 1 mL를 가하고, 포화 Na₂CO₃ 용액 1 mL를 가하여 혼합한 후 1시

간 실온에서 방치하고, 1 N HCl 0.2 mL을 가하여 640 nm에서 흡광도를 측정 한 후, 미리 작성한 표준곡선의 흡광도 값과 비교하여 폴리페놀 함량을 산출하였다.

나. 항산화 효과 측정

1) 전자공여능 측정

전자공여능 (EDA: electron donating ability)은 Blois의 방법²⁶⁾을 변형하여 측정하였다. 각 시료용액 2 mL에 0.2 mM의 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl(DPPH) 1 mL 넣고 교반한 후 30분간 방치한 다음 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여능은 시료용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{전자공여능(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{무첨가군의 흡광도}} \right) \times 100$$

2) Superoxide dismutase(SOD) 유사활성 측정

SOD 유사활성은 Marklund의 방법²⁷⁾에 준하여 측정하였다. 각 시료용액 0.2 mL에 tris-HCl 완충용액 (50 mM tris + 10 mM EDTA, pH 8.5) 2.6 mL와 7.2 mM pyrogallol 0.2 mL를 가하여 25°C에서 10분간 반응시킨 후 1 M HCl 0.1 mL를 가하여 반응을 정지시키고 반응액 중 산화된 pyrogallol의 양을 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. SOD 유사활성은 시료용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{SOD 유사활성능(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{무첨가군의 흡광도}} \right) \times 100$$

3) Xanthine oxidase 저해활성 측정

Xanthine oxidase 저해활성은 Stirpe와 Corte의 방법²⁸⁾에 따라 측정하였다. 각 시료용액 0.1 mL와 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.5) 0.6 mL에 xanthine(2 mM)을 녹

인 기질액 0.2 mL를 첨가하고 xanthine oxidase(0.2 U/mL) 0.1 mL를 가하여 37°C에서 15분간 반응시킨 후 1 N HCl 1 mL를 가하여 반응을 종료시킨 다음, 반응액 중에 생성된 uric acid의 양을 292 nm에서 흡광도를 측정하였다. Xanthine oxidase 저해활성은 시료 용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{저해율(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가군의 uric acid 생성량}}{\text{무첨가군의 uric acid 생성량}} \right) \times 100$$

4) 지방산패 억제능 측정

가) Fish oil emulsion 조제

지방산패 억제능 실험에 사용하는 oil emulsion은 실험직전에 만들었으며, 미리 pH 6.5로 보정한 0.1 M maleic acid buffer 8 mL를 넣은 다음 0.05 mL의 유화제인 tween-20 0.05 mL와 0.25 mL의 fish oil을 넣고 15분간 교반하였다. 이 후 KOH 2 g를 넣고 150 mL까지 정제수를 가한 후 교반 하면서 2 N HCl로 pH 6.5가 되도록 조제하여 사용하였다.

나) Fe²⁺, Cu²⁺의 첨가에 따른 지방 산패 억제도 측정

산화 촉진제인 Fe²⁺, Cu²⁺의 첨가에 따른 지방 산패 억제도 측정은 Buege와 Aust의 방법²⁹⁾에 따라 측정하였다. Oil emulsion 0.5 mL와 진달래꽃이 첨가된 화장품 0.1 mL 및 50 ppm의 Fe²⁺ 또는 Cu²⁺ 이온용액 0.1 mL가 포함된 혼합물이 채워진 시험관을 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 2 mL의 TCA/TBA 시약을 가하고 다시 혼합 후 끓는 물에서 15분간 끓인 다음 5,000 rpm에서 10분간 원심분리 시켜 상층액을 흡광도 531 nm에서 측정하였다. Fe²⁺, Cu²⁺의 첨가에 따른 지방 산패 억제도는 시료용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{저해율(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{무첨가군의 흡광도}} \right) \times 100$$

다. 미백 효과 측정

1) Tyrosinase 저해 활성 측정

Tyrosinase 저해활성 측정은 Yagi 등의 방법³⁰⁾에 따라 측정하였다. 반응구는 0.175 M sodium phosphate buffer(pH 6.8) 0.5 mL에 10 mM L-DOPA를 녹인 기질액 0.2 mL 및 시료용액 0.1 mL의 혼합액에 mushroom tyrosinase(110 U/mL) 0.2 mL를 첨가하여 25°C에서 2분간 반응시켜 반응액 중에 생성된 DOPA chrome을 475 nm에서 측정하였다. Tyrosinase 저해 활성은 시료용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{저해율(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{무첨가군의 흡광도}} \right) \times 100$$

2) Melanin 생합성 저해 측정

피부 흑색종 세포로부터의 melanin 생합성 저해 측정은 Hoiso이 등의 방법³¹⁾에 따라 측정하였다. DMEM 배지로 배양된 흑색종 세포주를 100 mm culture dish에 2×10^6 cells/dish가 되게 분주하고 24시간 배양 후 시료를 농도 별로 조절하여 2 mL 첨가 후 2 일째에 인산완충액 (pH 7.4)으로 세척하였다. 그 다음 0.25 M trypsin-EDTA 용액으로 세포를 탈착한 후 수확 한 세포를 1×10^6 세포 당 1 mL의 5% TCA로 처리하였다. 그 다음 2500 rpm으로 2회 원심분리한 후 분리된 melanin을 인산완충액으로 세척한 뒤 ether : EtOH (1:3) 1 mL를 가하여 2회 원심분리 한 후 ether 1 mL로 세척 건조시켰다. 건조된 melanin에 1 N NaOH를 가하여 56°C에서 1시간 반응시킨 후 분광 광도계 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{Melanin 생합성 저해율(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{무첨가군의 흡광도}} \right) \times 100$$

라. 주름개선 효과 측정

1) Elastase 저해 활성 측정

Porcine pancreas elastase 저해 활성 측정은 기질로서 *N*-succinyl-(L-Ala)₃-*p*-nitoanilide를 사용하여 37℃에서 20분간 *p*-nitoanilide의 생성량을 405 nm에서 측정하였다³²⁾. 즉, 각 시험용액을 일정 농도가 되도록 조제하여 0.5 mL씩 시험관에 취하고 50 mM tris-HCl buffer(pH 8.6)에 녹인 elastase(2.5 U/mL)용액 0.5 mL을 가한 후 기질로 50 mM tris-HCl buffer(pH 8.6)에 녹인 *N*-succinyl-(L-Ala)₃-*p*-nitoanilide (0.5 mg/mL)을 첨가하여 20분간 반응시켜 측정하였다.

$$\text{저해율(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{무첨가군의 흡광도}} \right) \times 100$$

마. 수렴활성 측정

1) Astringent 활성 측정

진달래꽃을 이용한 astringent 실험은 Lee 등의 방법³³⁾에 따라 실험하였다. 피부단백질과 유사하고 시료로서 쉽게 구할 수 있는 혈액 단백질 (Hemoglobin from Bovine, Sigma Co., USA)을 사용하였으며 원심분리관 용기에 각각의 추출물 용액과 헤모글로빈 용액을 1:1로 넣어서 진탕 혼합한 다음 5,000 rpm에서 3분간 원심분리 후, 576 nm에서 흡광도를 측정하였다. astringent 활성의 측정은 hemoglobin과 증류수를 섞은 것을 무첨가군으로 하였으며 hemoglobin과 시료를 혼합한 것을 첨가군으로 하여 백분율로 수렴효과를 측정하였다.

$$\text{수렴 효과(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{무첨가군의 흡광도}} \right) \times 100$$

바. 항암 효과

1) 세포배양

본 실험에 이용한 각 세포의 배양은 10% fetal bovine serum(FBS)과 1% penicillin/streptomycin(100 U/mL)을 첨가한 RPMI 1640 배지를 사용하였으며, 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다.

2) 적정 접종 세포수 결정

항암효과 측정을 위한 지수기의 적정 세포 수 측정은 96 well plate에 5×10⁴ cells/well 이 되게 0.18 mL 분주한 후 세포밀도를 1/2로 희석하면서 접종한 후 37°C, 5% CO₂ 상에서 4일간 배양하였다. 여기에 5 mg/mL의 농도로 제조한 MTT 용액 0.02 mL를 첨가하여 4시간 배양한 후 배양액을 제거하고 각 well당 DMSO : ethanol (1:1)용액 0.15 mL를 가하여 30분간 교반한 뒤 ELISA reader로 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3) MTT assay에 의한 항암 효과 측정

암세포 주에 대한 증식 억제효과는 Carmichael의 방법³⁴⁾에 따라 측정하였다. B16F10 암세포주를 96 well plate에 1×10⁴ cells/well이 되게 0.18 mL 분주하고 시료를 농도 별로 조제하여 0.02 mL 첨가한 후, 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 대조군은 시료와 동량의 증류수를 첨가하여 동일한 조건으로 배양하였다. 여기에 5 mg/mL 농도로 제조한 MTT 용액 0.02 mL를 첨가하여 4시간 배양한 후 배양액을 제거하고 각 well당 DMSO : ethanol (1:1) 0.15 mL를 가하여 실온에서 30분간 반응 시킨 뒤 ELISA reader로 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 암세포주의 성장억제효과는 시료용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{증식 억제율(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{무첨가군의 흡광도}} \right) \times 100$$

4) SRB assay에 의한 항암 효과 측정

암세포 주에 대한 증식 억제효과는 Skehan의 방법³⁵⁾에 따라 측정하였다. B16F10 암세포주를 96 well plate에 1×10^4 cells/well이 되게 0.18 mL 분주하고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 시료를 농도 별로 조절하여 0.02 mL 첨가한 후 대조군은 시료와 동량의 증류수를 첨가하여 동일한 조건으로 37°C, 5% CO₂ incubator에서 다시 48시간 배양하였다. 배양이 완료된 세포를 냉장 보관한 10%(W/V) trichloroacetic acid를 이용하여 5°C에서 1시간 동안 10%(W/V) trichloroacetic acid 0.1 mL를 처리하여 세포를 고정시키고, 1시간 뒤 10% trichloroacetic acid를 제거하고 수회 증류수를 이용하여 세척한 후 건조하였다. 1%(V/V) acetic acid에 녹인 0.4%(W/V) sulforhodamine B(SRB)용액 0.1 mL를 30분간 처리하여 세포 단백질을 염색한다. 세포와 결합하지 않은 SRB 염색액은 1% acetic acid를 이용하여 수회 세척하여 제거한 후 다시 건조시킨 후, 96 well plate에 10 mM tris buffer(pH 10.5)로 세포와 결합된 염색제를 충분히 녹인 후, 546 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{증식 억제율(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{무첨가군의 흡광도}} \right) \times 100$$

사. 통계처리

결과 통계처리는 SPSS 10.0 for windows program을 사용하였으며, 유의차 검증은 분산분석 (ANOVA : analysis of variance)을 한 후 $\alpha=0.05$ 수준에서 Duncan의 다중검증법(DMRT : Duncan's multiple range test)에 따라 분석하였다.

아. 항균력 측정

1) 균배양

*Streptococcus mutans*와 *Candida albicans*의 배양을 위한 액체배지로는 brain heart infusion(BHI) 및 YM broth(YMB)를 각각 사용하였으며, *Escherichia coli* 및 *Staphylococcus epidermidis*의 액체배지로는 nutrient broth(NB)를 사용하였고, *Staphylococcus aureus*의 액체배지로는 tryptic soy broth(TSB)를 사용하였다. 고체배지는 상기 액체배지에 agar를 첨가하여 본 실험에 사용하였다. *Streptococcus mutans*균은 CO₂ incubator에, 그 외 균주는 BOD incubator에서 37°C로 배양하였다.

2) 생육 저해환(Clear zone) 측정

항균력 측정은 paper disc법³⁶⁾을 이용하여 측정하였다. 즉, 평판배지에 배양된 각 균주를 1 백금이 취해서 액체배지 10 mL에서 18~24시간 배양하여 증균배양 시킨 후 다시 액체배지 10 mL에 균액을 0.1 mL 접종하여 3~6시간 본 배양한 후 평판배지 1개당 균수가 약 1×10^7 cells되게 접종하여 멸균 면봉으로 균일하게 도말하였다. 멸균된 filter paper disc(Tokyo, 8 mm, Japan)를 고체 평판배지에 올려놓은 다음 0.05 mL/disc가 되도록 시료를 농도별로 흡수시켜 37°C에서 18~24시간 배양하여 disc주위의 clear zone(cm)의 직경을 측정하였다.

자. 진달래꽃 추출물을 첨가한 화장품의 제조와 생리활성 검증

1) 진달래꽃 추출물을 첨가한 화장품의 제조

가) 진달래꽃 추출물을 첨가한 스킨의 제조 처방 및 방법

진달래꽃을 첨가한 스킨은 Table 1의 처방에 따라 Fig. 3과 같이 제조하였다. 수상에는 보습제인 glycerin, 1,3-butylene glycol, betaine과 항산화제인 disodium EDTA, dipotassium glycyrrhizate를 넣었으며, 에탄올상에는 가용화제인 PEG-40 hydrogenated

castor oil와 방부제를 넣고 각각 핸드믹싱한 후 혼합하였다. 혼합한 후 피부컨디셔닝제인 sodium hyaluronate, aloe barbadensis leaf juice와 pH 조절제인 citric acid와 sodium citrate를 넣고, 진달래꽃 추출물 2.0% (20,000 ppm)을 넣어 혼합하여 본 실험에 사용하였다.

나) 진달래꽃 추출물을 첨가한 로션의 제조 처방 및 방법

진달래꽃을 첨가한 로션은 Table 2의 처방에 따라 Fig. 4와 같이 제조하였다. 수상에는 보습제인 glycerin, 계면활성제인 sodium hydrogenated tallowyl glutamate와 방부제를 넣어 80℃까지 가열하여 완전히 용해시키고, 점증제인 carbomer를 첨가하였다. 유상에는 유화제와 유화안정제인 bees wax, glyceryl stearate, decaglyceryl myristate, octyldodecyl myristate와 방부제를 넣어 80℃까지 가열하여 완전히 용해시키고, 수상과 섞은 후 homo mixer (T.K. Homo Mixer Mark II, Tokushu kika kogyo Co., Ltd. Osaka, Japan)을 이용하여 3,000 rpm에서 3분간 유화한 후, 중화제인 sodium hydroxide을 넣어 3,000 rpm에서 2분간 더 유화하였다. 다음 피부컨디셔닝제인 sodium hyaluronate와 진달래꽃 추출물 2.0% (20,000 ppm)을 넣어 2분간 유화한 후 30℃까지 냉각하고 탈기하여 본 실험에 사용하였다.

다) 진달래꽃 추출물을 첨가한 에센스의 제조 처방 및 방법

진달래꽃을 첨가한 에센스는 Table 3의 처방에 따라 Fig. 5와 같이 제조하였다. 수상에는 보습제인 glycerin, 1,3-butylene glycol, betaine, PEG-32와 항산화제인 disodium EDTA, dipotassium glycyrrhizate를 넣어 80℃까지 가열하여 용해시킨 후, homo mixer (T.K. Homo Mixer Mark II, Tokushu kika kogyo Co., Ltd. Osaka, Japan)을 이용하여 3,000 rpm에서 2분간 유화하고, 미리 분산한 피부컨디셔닝제인 glyceryl polymethacrylate (and) propylene glycol, sodium hyaluronate와 점증제인 carbomer를 넣고 2분간 유화하였다. 다음 triethanolamine (T.E.A)를 넣고 3분간 더 유화한 후, 가용화제인 PEG-40 hydrogenated castor oil과 방부제를 넣어 1분간 유화하고, 진달래꽃 추출물 2.0% (20,000 ppm)을 넣어 2분간 유화한 후 30℃까지 냉각하고 탈기하여 본 실험에 사용하였다.

라) 진달래꽃 추출물을 첨가한 크림의 제조 처방 및 방법

진달래꽃을 첨가한 크림은 Table 4의 처방에 따라 Fig. 6과 같이 제조하였다. 수상에는 보습제인 glycerin, 항산화제인 disodium EDTA, dipotassium glycyrrhizate 및 방부제를 넣어 80℃까지 가열하여 완전히 용해시키고, 미리 분산한 점증제인 xanthan gum을 첨가하였다. 유상에는 유화제와 유화안정제 및 레시틴을 넣어 80℃까지 가열하여 완전히 용해시키고, 수상과 섞은 후 homo mixer (T.K. Homo Mixer Mark II, Tokushu kika kogyo Co., Ltd. Osaka, Japan)을 이용하여 3,000 rpm에서 3분간 유화한 후, 피부컨디셔닝제인 biosaccharide gum-1과 진달래꽃 추출물 2.0% (20,000 ppm)을 넣어 2분간 유화한 후 30℃까지 냉각하고 탈기하여 본 실험에 사용하였다.

마) 진달래꽃 추출물을 첨가한 팩의 제조 처방 및 방법

진달래꽃 추출물을 첨가한 팩은 Table 5의 처방에 따라 Fig. 7과 같이 제조하였다. 수상과 에탄올 상으로 나누어 용해시킨 후, 수상에 들어가는 polymer인 carboxyvinyl-polymer와 sodium hyaluronate를 agi mixer(Young Hana Tect. Korea)로 분산시킨 수상에 첨가시킨다. 수상과 에탄올상을 섞어 agi mixer(Young Hana Tect. Korea) 1,500 rpm에서 3분간 분산하여, triethanolamine(T.E.A)를 넣고 3분간 검화한 후, 진달래꽃 추출물 2.0% (20,000 ppm)을 넣은 뒤 다시 3분간 분산 후 탈포하여 실험의 시료로 사용하였다.

Table 1. The experimental formulation of the skin containing *Rhododendron mucronulatum* Flos

Phase	No.	INCI Name	Contents (%)
A	1	Deionized Water	to 100
A	2	Disodium EDTA	0.05
A	3	Dipotassium Glycyrrhizate	0.05
A	4	Betaine	2.00
A	5	Glycerin	1.00
A	6	1,3-Butylene Glycol	3.00
B	1	Ethanol	5.00
B	2	Methylparaben	0.15
B	3	PEG-40 Hydrogenated Castor Oil	0.50
B	4	Phenoxyethanol	0.30
C	1	Sodium Hyaluronate	0.05
D	1	Aloe Barbadensis Leaf Juice	0.50
E	1	Citric Acid	0.05
E	2	Sodium Citrate	0.01
F	1	<i>Rhododendron mucronulatum</i> Flos powder	2.00

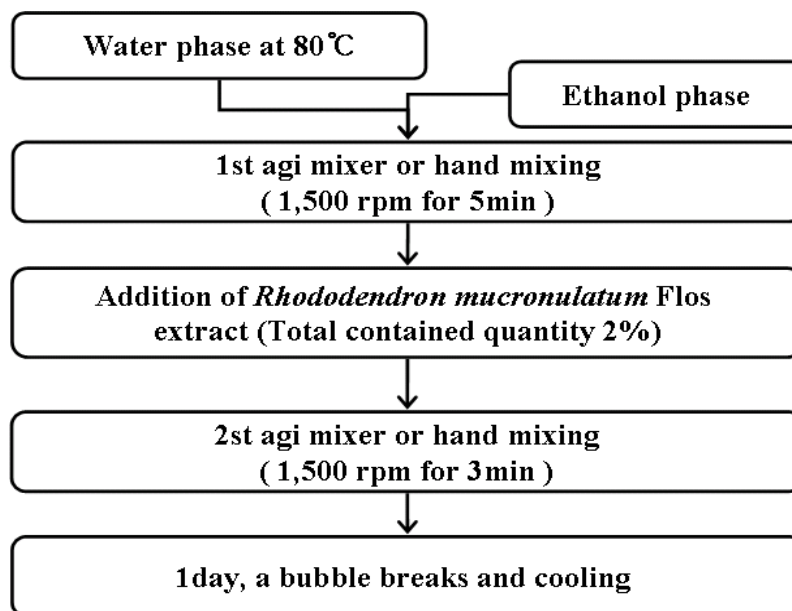


Fig. 3. Preparation of the skin containing *Rhododendron mucronulatum* Flos.

Table 2. The experimental formulation of the lotion containing *Rhododendron mucronulatum* Flos

Phase	No.	INCI Name	Contents (%)
A	1	Deionized Water	to 100
A	2	Glycerin	5.00
A	3	Sodium Hydrogenated Tallowoyl Glutamate	0.50
A	4	Methylparaben	0.20
A	5	Imidazolidinyl Urea	0.15
B	1	Carbomer	0.20
C	1	Sodium Hydroxide	0.05
D	1	Bees Wax	2.00
D	2	Glyceryl Stearate	2.00
D	3	Decaglyceryl Myristate	2.00
D	4	Octyldodecyl Myristate	3.00
D	5	Squalane	5.00
D	6	Dimethicone	2.00
D	7	Butylparaben	0.10
D	8	Propylparaben	0.10
E	1	Sodium Hyaluronate	0.05
F	1	<i>Rhododendron mucronulatum</i> Flos powder	2.00

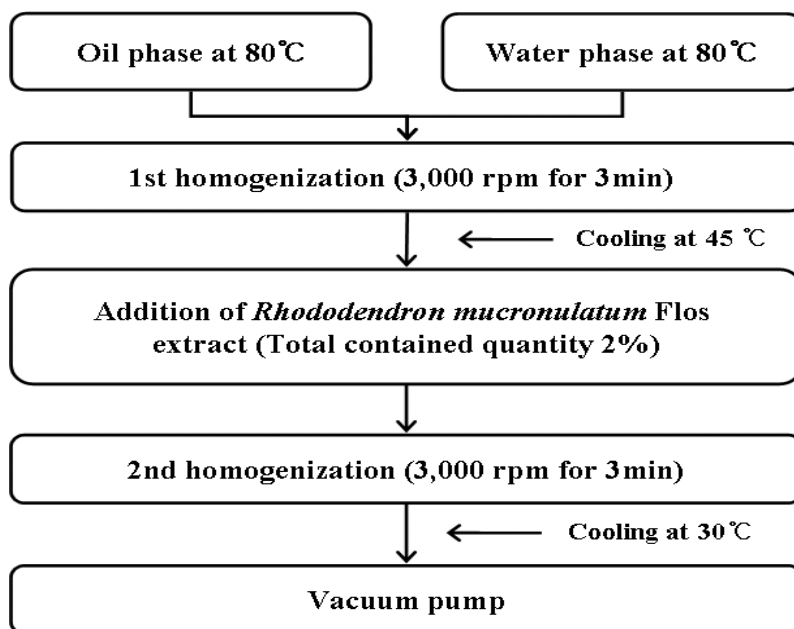


Fig. 4. Preparation of the lotion containing *Rhododendron mucronulatum* Flos.

Table 3. The experimental formulation of the essence containing *Rhododendron mucronulatum* Flos

Phase	No.	INCI Name	Contents (%)
A	1	Deionized Water	to 100
A	2	1,3-Butylene Glycol	5.00
A	3	Glycerin	3.00
A	4	Disodium EDTA	0.05
A	5	Dipotassium Glycyrrhizate	0.05
A	6	Betaine	3.00
A	7	PEG-32	3.00
B	1	Glyceryl polymethacrylate (and) Propylene Glycol	3.00
C	1	Carbomer	0.20
D	1	Sodium Hyaluronate	0.05
E	1	Triethanolamine	0.20
F	1	Ethanol	5.00
F	2	PEG-40 Hydrogenated Castor Oil	0.50
F	3	Phenoxyethanol (and) Methylparaben (and) Ethylparaben (and) Butylparaben (and) Propylparaben (and) Isobutylparaben	1.00
G	1	Biosaccharide Gum-1	0.50
H	1	<i>Rhododendron mucronulatum</i> Flos powder	2.00

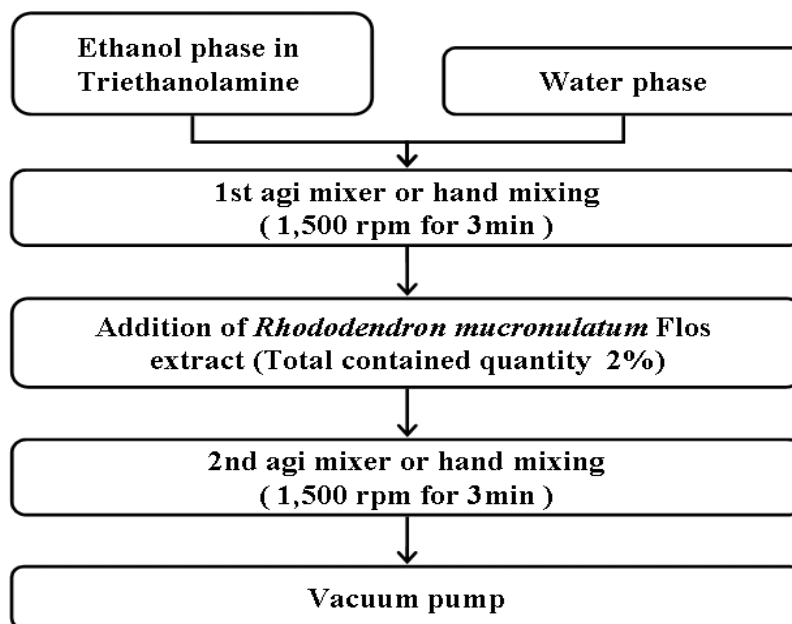


Fig. 5. Preparation of the essence containing *Rhododendron mucronulatum* Flos.

Table 4. The experimental formulation of the cream containing *Rhododendron mucronulatum* Flos

Phase	No.	INCI Name	Contents (%)
A	1	Deionized Water	to 100
A	2	Glycerin	5.00
A	3	Phenoxyethanol (and) Methylparaben (and) Ethylparaben (and) Butylparaben (and) Propylparaben (and) Isobutylparaben	1.00
A	4	Triethanolamine	0.50
A	5	Disodium EDTA	0.05
A	6	Dipotassium Glycyrrhizate	0.05
B	1	1,3-Butylene Glycol	5.00
B	2	Xanthan Gum	0.10
C	1	Cetyl Alcohol	1.00
C	2	Caprylic/Capric Triglyceride	5.00
C	3	Lecithin	1.00
C	4	Stearic Acid	2.00
C	5	Cetearyl Alcohol	2.00
C	6	Glyceryl Stearate (and) PEG-100 Stearate	2.00
C	7	Sorbitan Stearate	1.00
C	8	Caprylic/Capric/Myristic/Stearic Triglyceride	2.00
C	9	Squalane	5.00
C	10	Dimethicone	2.00
D	1	Biosaccharide Gum-1	1.00
E	1	<i>Rhododendron mucronulatum</i> Flos powder	2.00

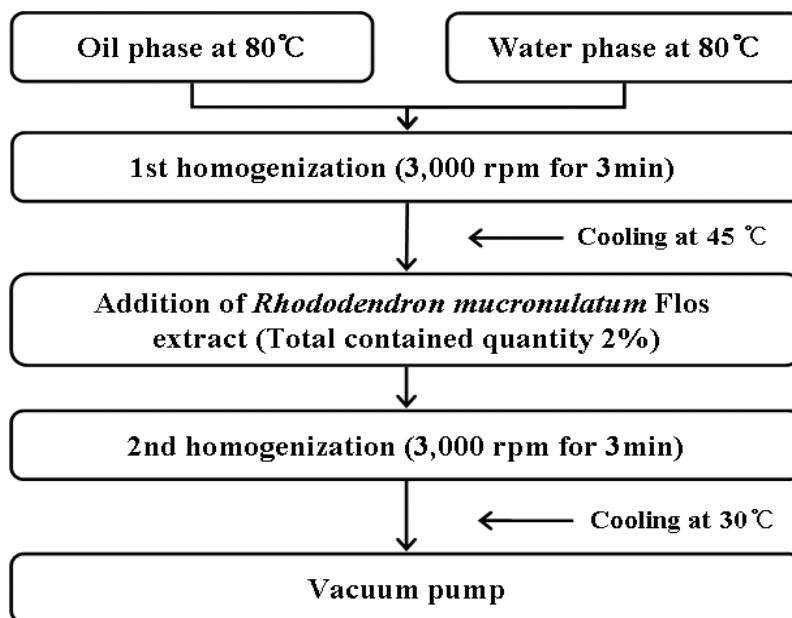


Fig. 6. Preparation of the cream containing *Rhododendron mucronulatum* Flos.

Table 5. The experimental formulation of the pack containing *Rhododendron mucronulatum* Flos

Phase	No.	INCI Name	Contents (%)
A	1	Deionized Water	to 100
A	2	Polyethylene Glycol 1500	5.00
A	3	Glycerin	4.00
A	4	Propylene Glycol	2.50
A	5	Disodium EDTA	0.01
B	1	Carbomer	0.56
C	1	Alcohol	6.38
C	2	Methyl paraben	0.10
C	3	Polyoxyethylene Hydrogenated Castor Oil	0.60
C	4	Dimethicone	0.10
D	1	Sodium Hyaluronate	2.00
E	1	Triethanolamine	0.70
F	1	<i>Rhododendron mucronulatum</i> Flos powder	2.00

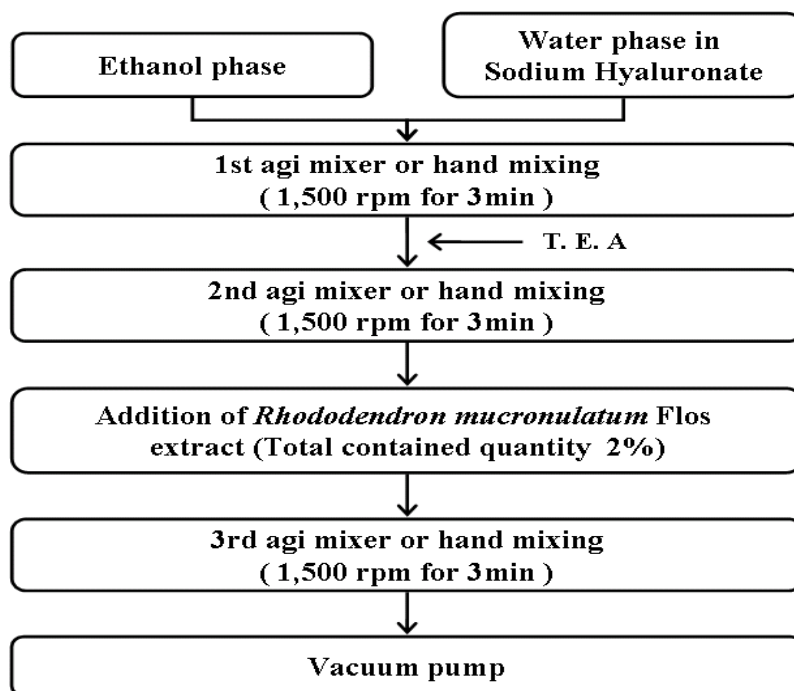


Fig. 7. Preparation of the pack containing *Rhododendron mucronulatum* Flos.

차. 진달래꽃 추출물을 첨가한 화장품의 안정성 실험

1) pH 측정

pH 측정은 Metrohm(Metrohm 691, Metrohm UK Ltd., Herisau, Switzerland)사의 pH meter를 이용하여 진달래꽃 추출물을 첨가한 화장품의 pH를 측정하였다. 측정하기 전에 유리전극은 미리 염기성 완충액이나 증류수에 수시간 담그어 두고 pH meter는 전원에 연결하고 10분 이상 두었다가 사용하였다. 검출부는 물로 잘 씻어 가볍게 닦아 낸 다음 사용하였다.

2) 점도 측정

점도측정³⁷⁻³⁹⁾은 Brookfield viscometer(Brookfield LV-Ⅱ⁺, Brookfield Engineering Laboratories Inc., Middleboro, MA, USA)를 이용하여 측정하였다. 스피들(spindle) No. 4를 택하여 6 rpm에서 1분간 점도를 측정하였다.

3) 일반적 보존 시험

가) 온도 (Incubation)에 따른 안정성 시험법

진달래꽃 추출물을 첨가한 화장품의 온도(Incubation)에 따른 안정성 시험법⁴⁰⁾은 소정의 온도 조건 (0, 25, 40℃)에 보관하여, 경시적 변화에 따른 상태변화를 Table 6과 같이 육안으로 평가하였다.

Table 6. Check points in stability test of the cosmetic containing *Rhododendron mucronulatum* Flos in constant temperature conditions (0, 25, 40℃)

Temp.	Period (Day)	Check points
	1	
	3	Separation
0℃	5	Precipitation
25℃	7	Discoloration
40℃		Creaming deterioration
	15	Viscosity
	30	pH etc.
	60	

나) 광안정성 시험법

(1) 인공광 (Artificial sun lamp) 노출 시험법

투명 용기에 크림을 담아 sun lamp(WL-610, Labtron Co. Ltd., Busan, Korea)에 넣은 후 기내 온도는 40℃, 광원과의 거리는 20.3 cm로 조절하여 인공 UV조사 후 0.5, 1, 3시간 동안의 변색, 발색, 변취, 산패 등의 변화를 육안으로 관찰하였다.

(2) 자연광 노출 시험법

한여름 태양하에서의 조건을 고려하여 투명용기에 크림을 담아 햇빛이 잘 드는 실외에 보관하여 7, 15일 동안의 변색, 발색, 변취, 산패 등의 변화를 육안으로 관찰하였다.

4) 특수·가혹 보존 시험

가) 온도순환 (Cycle chamber)에 따른 안정성 시험법

진달래꽃 추출물을 첨가한 화장품을 투명 용기에 담아 -15°C , -10°C , -5°C , 0°C , 5°C , 10°C , 15°C , 25°C , 37.5°C , 40°C 에서 각각 24시간 보관한 후 이를 1 cycle로 하여 10회 반복 시행하여 온도 순환에 따른 안정성을 평가하였다⁴¹⁻⁴⁵⁾.

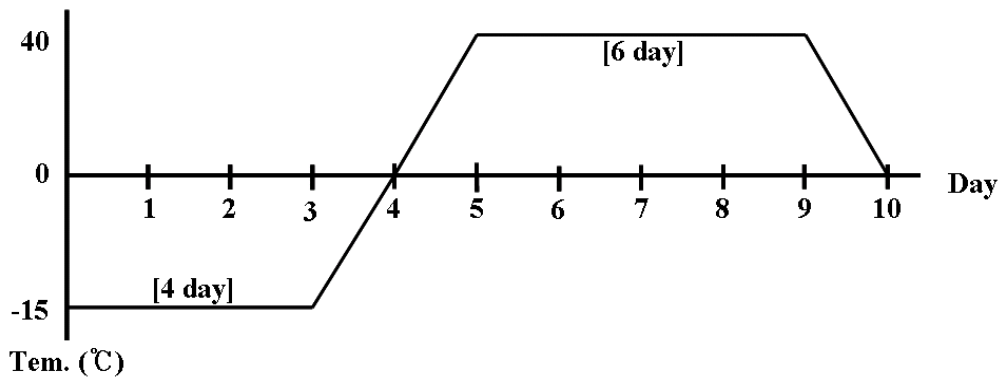


Fig. 8. Cycle temperature change with day for 1 cycle.

나) 냉·해동순환 (Freeze & Thaw cycling)에 따른 안정성 시험법

진달래꽃 추출물을 첨가한 화장품을 투명 용기에 담아 -10°C 와 25°C 에 각각 24시간 보관하여 이를 1 cycle로 하여 3, 7일 동안의 안정성을 육안으로 관찰하였다⁴¹⁻⁴⁵⁾.

카. 피부 유·수분량 측정

1) 대상 및 환경조건

실험결과에 영향을 줄만한 피부질환이 없이 건강한 20~50세의 여자 30명을 대상으로 실시하였으며, 각 대상자들은 실험 전 30분 동안 휴식을 취하도록 하여 외적환경에 적응하게 하였으며, 실내온도 26~28℃, 실내습도 70%로 유지하여 동일 장소에서 실험을 시행하였다.

2) 측정도구 및 방법

가) 유분측정

유분 측정은 Sebummeter SM 810(Courage & Khazaka, Germany)을 사용하였으며, 측정방법은 투명 플라스틱 필름이 부착되어 있는 probe를 피부표면에 접촉하여, 빛이 투과하는 정도를 측정하였으며, 피지량의 단위는 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 표시하였다. 측정값은 진달래꽃 첨가군과 무첨가군의 크림을 볼 부위에 바른 후 1시간 뒤에 기구를 이용하여 3회 측정한 값을 평균 내어 사용하였다.

나) 수분측정

수분 측정은 Corneometer CM 825(Courage & Khazaka, Germany)를 사용하였으며, 피부에서 가장 높은 절연계수를 가지고 있는 수분함량에 따른 정전용량(capitance)을 측정함으로써, 수분함량의 상대적 크기를 측정하였다. 측정치는 감지기를 측정 부위 피부표면에 밀착시킨 후 가볍게 누르면 나타나는 수치를 자체 기준의 임의 단위인 AU(Arbitratr Unit)로 표시하여 측정하였으며, 진달래꽃 첨가군과 무첨가군의 크림을 볼

부위에 바른 후 1시간 뒤에 기구를 이용하여 3회 측정된 값을 평균 내어 사용하였다.



<Photograph of Courage & Khazaka instrument>

타. 진달래꽃을 첨가한 크림의 사용감 설문 평가

진달래꽃 열수, 에탄올 추출물이 첨가된 크림의 사용감 설문 평가를 위해 선정된 설문 요원은 충분한 훈련을 거쳐 사용감을 판별할 수 있는 능력을 갖춘 20대의 여자대학생 20명을 선발하였다. 평가항목은 Table 7과 같이 보습감 (moisturizing effect), 끈적임 (no sticky-feel), 바른 후의 피부상태 (skin condition after application), 바름성 (spreadability), 추천여부 (recommendation)의 5가지 문항으로 평가했다. 평가방법은 5점 법으로 기호도 검사를 실시하였으며, 설문 항목에 대해 (매우 좋다 : 5점, 좋다 : 4점, 보통이다 : 3점, 나쁘다 : 2점, 매우 나쁘다 : 1점)로 평가 하였다.

Table 7. User test of the cream containing *Rhododendron mucronulatum* Flos

※ Give a point of preference on the following check points to each sample from 1 to 5.

(For example, if you have a preference on each sample in order of A, C, B, E, D then you give a point to each sample, as 5 to A, 4 to C, 3 to B, 2 to E and 1 to D).

Check Points	Point				
1. Moisturizing effect	A	B	C	D	E
	()	()	()	()	()
2. No sticky-feel	A	B	C	D	E
	()	()	()	()	()
3. Skin condition after application	A	B	C	D	E
	()	()	()	()	()
4. Spreadability	A	B	C	D	E
	()	()	()	()	()
5. Recommendation	A	B	C	D	E
	()	()	()	()	()

A : The cream not containing *Rhododendron mucronulatum* Flos

B : The cream containing *Rhododendron mucronulatum* Flos water extract of 1,000 ppm

C : The cream containing *Rhododendron mucronulatum* Flos water extract of 20,000 ppm

D : The cream containing *Rhododendron mucronulatum* Flos ethanol extract of 1,000 ppm

E : The cream containing *Rhododendron mucronulatum* Flos ethanol extract of 20,000 ppm

제 3 절 결과 및 고찰

1. 시료의 추출 및 분리

가. 시료의 추출 수율 및 폴리페놀 함량 측정 결과

진달래꽃으로부터 추출한 추출물의 추출 수율과 폴리페놀 함량을 측정한 결과는 Table 8, 9와 같다. 70% 아세톤 추출법이 추출법 중 가장 높은 수율을 나타내었으며, 1, 3-butylene glycol 추출법의 경우 동결건조를 통한 고체 시료 조제가 불가능하여 추출 수율을 구하지 못했다. 또한, 폴리페놀 함량을 측정한 결과, 진달래꽃 초임계 추출물이 522.2 $\mu\text{g/g}$ 로 가장 높은 폴리페놀함량을 나타내었다.

나. TLC에 의한 폴리페놀 동정 및 활성물질의 분획

진달래꽃 아세톤 추출물 270 g를 sephadex LH-20 column으로 분획한 결과 Fig. 9, 10과 같이 나타내었다. 각각 Fr-1은 15.8 g, 수용성 색소 분획물인 Fr-2는 27.2 g, Fr-3은 20.4 g, Fr-4의 경우 2.4 g의 일차 분획물을 얻었다. 또한, 진달래꽃으로부터 분리된 폴리페놀 동정을 확인하기 위해 silica TLC plate를 이용하여 전개시킨 결과 Fig. 10과 같이 나타냈다. 분획물을 silica TLC plate에서 전개 후 anisaldehyde - H_2SO_4 용액으로 발색시켰을 때, 노란색과 붉은색의 정색 반응을 나타내었다. 이를 통해 진달래꽃으로부터 분리된 flavonoid 화합물임을 확인할 수 있었다.

Table. 8. Soluble solid and total polyphenol contents of *Rhododendron mucronulatum* Flos

Solvents	Extraction yield ¹⁾	Total polyphenol content($\mu\text{g/g}$) ²⁾
Distilled water	19.85%	384.41 \pm 10.12 ³⁾
70% Ethanol	20.01%	471.96 \pm 18.33
70% Acetone	24.37%	508.51 \pm 10.12
Supercritical fluid CO ₂ (Co-solvent : 100% Ethanol)	5.02%	532.21 \pm 13.40
1, 3-Butylene glycol	– ⁴⁾	124.12 \pm 8.15

¹⁾ g soluble solid /20g dry matter, mean of triple

²⁾ Milligram of total polyphenol content/g of plant based tannic acid as standard

³⁾ Each value is mean \pm S.D. (n \geq 3)

⁴⁾ no extraction yield

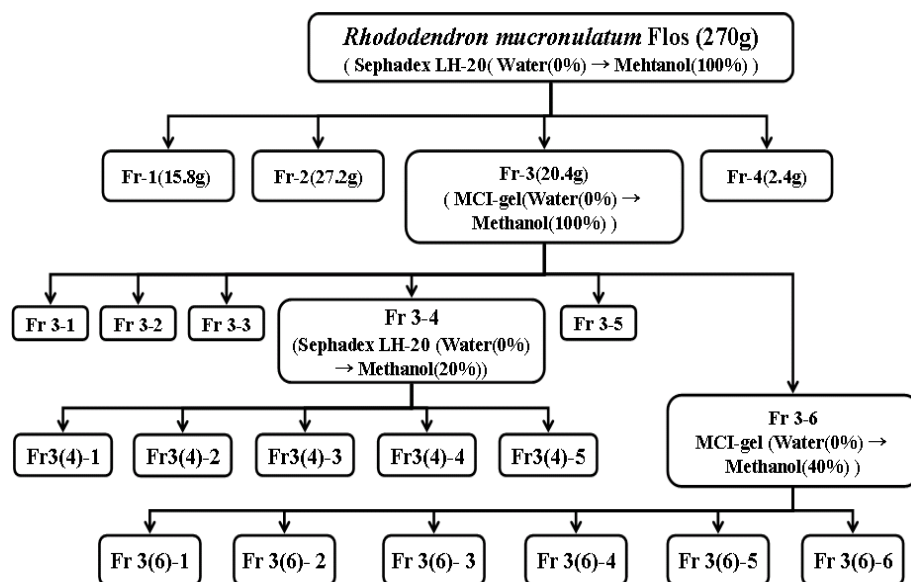


Fig. 9. Procedure for polyphenol isolated from *Rhododendron mucronulatum* Flos.

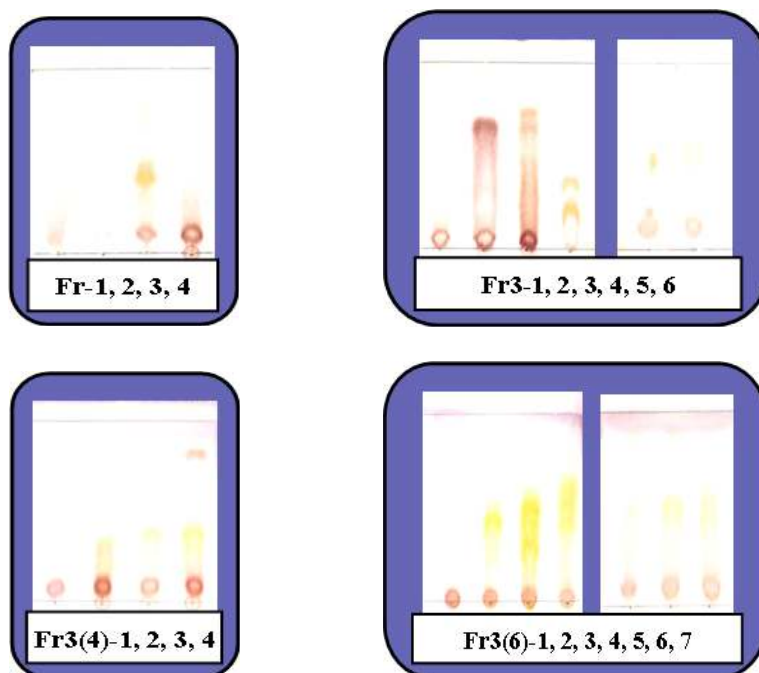


Fig. 10. Thin layer chromatogram of the polyphenols isolated from *Rhododendron mucronulatum* Flos.

·Developing solvent – benzen : ethylformate : formic acid=2 : 7 : 1

·Colorization reagent – A : anisaldehyde – H₂SO₄

Table. 9. The contents of total polyphenol isolated from *Rhododendron mucronulatum* Flos

Sample	Phenol contents ($\mu\text{g/g}$)			
	Fr-1	Fr-2	Fr-3	Fr-4
<i>Rhododendron mucronulatum</i> Flos	$2.6 \pm 0.11^{1)}$	737.5 ± 0.4	1937.5 ± 0.7	1815.7 ± 0.3

¹⁾ Milligram of total polyphenol content/g of plant based tannic acid as standard.

2. 항산화능 측정 결과

가. 전자공여능 확인

전자공여능 측정에 사용된 1, 1 - diphenyl - 2 - picryl hydrazyl(DPPH)는 자신이 가지고 있는 흡수 스펙트럼을 보이나, 페놀성 화합물과 같이 수소 에 전자를 제공해 주는 전자 공여체와 반응하게 되면 전자 hydrogen radical을 받아 phenoxy radical을 생성하게 되며, 흡수 band도 사라지게 되고 안정한 분자가 된다. 또한 공여된 전자는 비가역적으로 결합하여 그 수에 비례하여 진보라색의 DPPH의 색깔이 점점 없어지게 된다^{26,46,47}.

진달래꽃 추출물과 진달래꽃 분획물의 전자공여능 측정 결과를 Fig. 11, 12와 같이 나타내었다. 진달래꽃 열수, 에탄올, 아세톤, 초임계 추출물이 각각 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 50% 이상의 전자공여능을 나타내었으며, 1, 3-BG 추출물의 경우 500배 희석한 농도에서 50% 이상의 전자공여능 활성을 나타내었다. 이는 조 등⁴⁸의 유기노의 항산화 활성을 측정하는 실험에서 0.1 mg/mL의 농도에서 70% 유기노 에탄올 추출물 및 클로로포름, 부탄올, 열수 분획물에서 각각 60.2, 17.7, 47.9, 37.1%를 나타내어 0.1 mg/mL의 농도에서 진달래 추출물 모두 60% 이상의 효과를 나타내어 진달래꽃 추출물이 free radical에 대한 전자공여능이 우수함을 알 수 있었으며, 이 등⁴⁹의 느릅나무 추출물의 항산화 효과 측정에서 느릅나무 추출물의 부탄올, 에틸아세테이트, 클로로포름 및 헥산 추출물이 0.5 mg/mL의 농도에서 약 80% 이하의 저해능을 보인 반면, 동일 농도에서 진달래꽃 열수, 에탄올 초임계 추출물은 각각 81.2, 87.0, 94.8%로 느릅나무 추출물보다 우수한 전자공여능을 나타내었다. 진달래꽃 분획물의 경우 시료 농도 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 Fr-3, Fr-4 분획물이 70% 이상의 전자공여능을 나타내었으며 이는 같은 농도의 양성 대조군인 ascorbic acid 와 BHA보다도 높은 수치이다. 이는 김 등⁵⁰이 보고한 천연 식물자원으로부터의 항산화 활성 탐색에서 전체 시료 농도가 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 일 때 박쥐나물과 박하가 각각 74.4, 85.6%로 나타났으며, 그밖에 잣 강아지풀, 갯무, 냉이 및 미나리 냉이가 50% 미만의 전자공여능을 나타내어 진달래꽃 분획물의 전자공여능이 우수함을 확인할 수 있었으며, 김 등⁵¹의 가시오갈피(*Acanthopanax senticosus*) 열매의 항산화 효과 측정 결과, 열수, 에탄올, 메탄올, 75% 에탄올 및 75% 메탄올 추출물들이 각각 57.3, 630.1, 248.5, 198.9, 96.7의 IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)을 나타내어 역시 진달래꽃 분획물의 전자공여능이 우수함을 확인할 수 있었다.

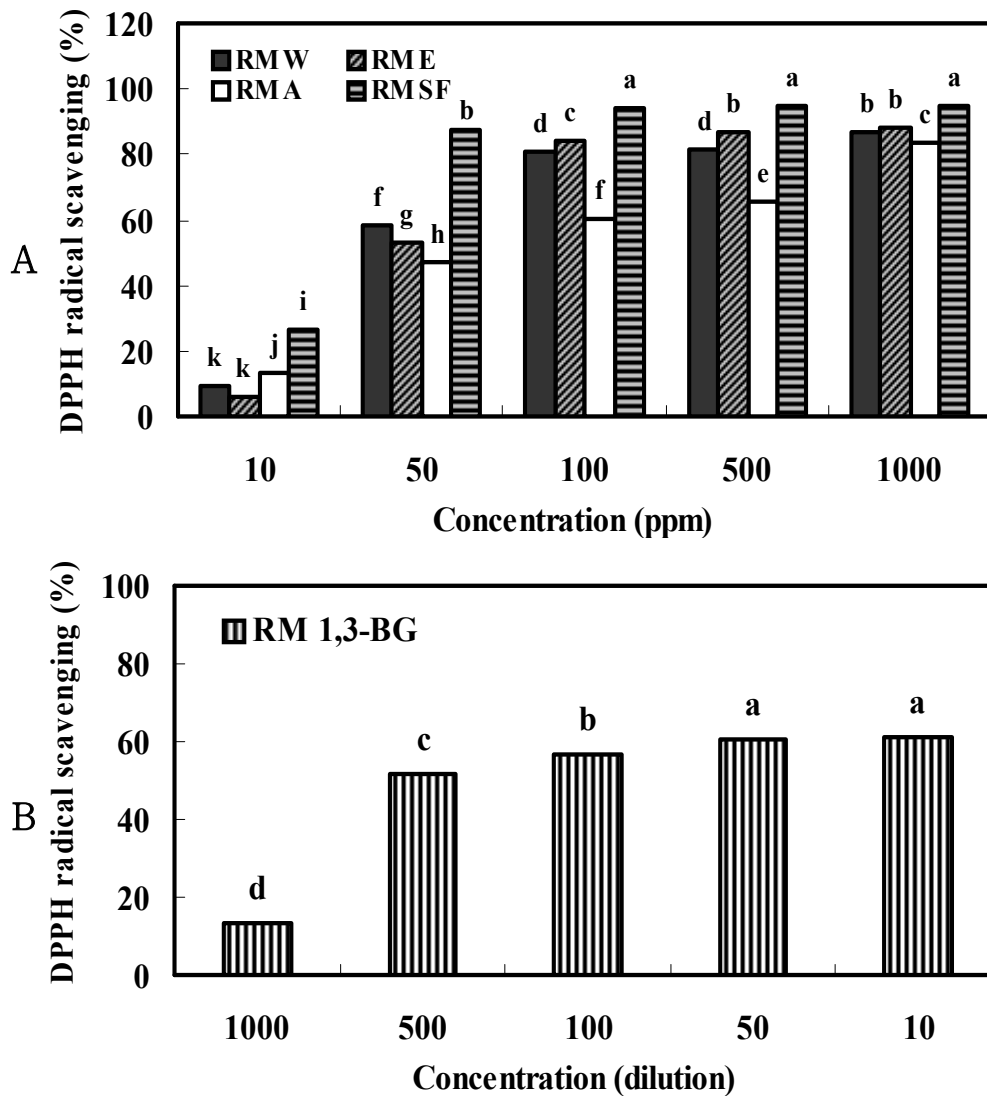


Fig. 11. DPPH radical scavenging of *Rhododendron mucronulatum* Flos extracts.

RM W : *Rhododendron mucronulatum* Flos water extract

RM E : *Rhododendron mucronulatum* Flos ethanol extract

RM A : *Rhododendron mucronulatum* Flos acetone extract

RM SF: *Rhododendron mucronulatum* Flos supercritical fluid extract

RM 1,3-BG : *Rhododendron mucronulatum* Flos 1,3-butylene glycol extract

Values are means of 3 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$.

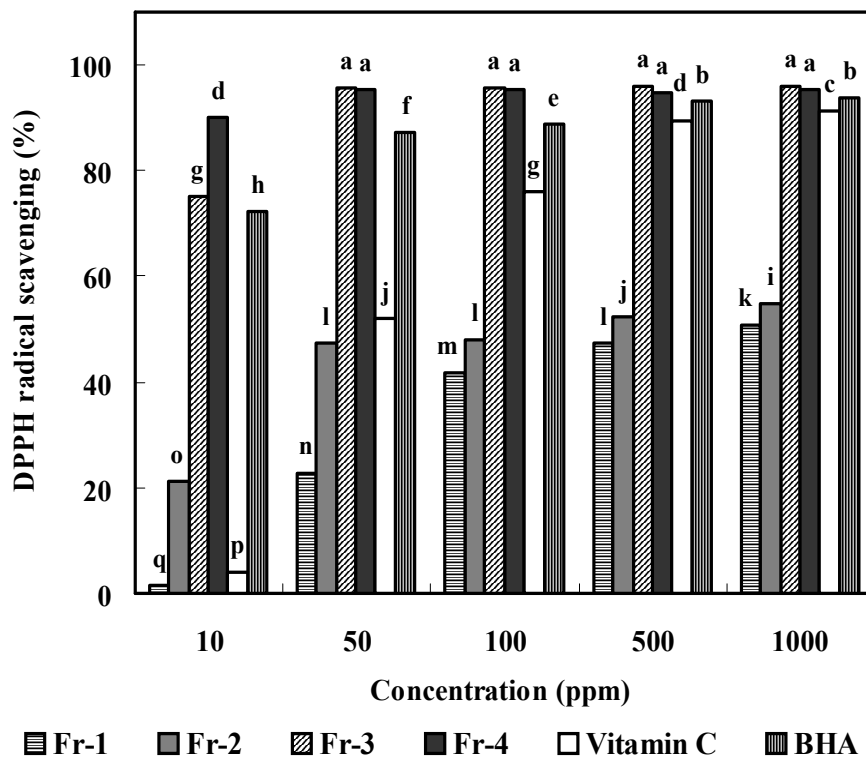


Fig. 12. DPPH radical scavenging of isolated *Rhododendron mucronulatum* Flos.

Fr-1 : fraction 1

Fr-2 : fraction 2

Fr-3 : fraction 3

Fr-4 : fraction 4

Vitamin C : *L*-ascorbic acid

BHA : butylated hydroxyanisole

Values are means of 3 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$.

나. SOD(Superoxide dismutase) 유사활성 확인

호기성 유기체의 생명활동 중에 불가피하게 생성되는 환원 산소종은 세포구성요소에 유해한 수산화나 그 유도체를 생성시키는 근원이 되며, superoxide dismutase(SOD)는 세포에 유해한 이 환원산소종을 과산화수소로 전환시키는 반응($2O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$)을 촉매하는 효소로서 SOD에 의해 생성된 H_2O_2 는 peroxidase나 catalase에 의해 무해한 물분자와 산소분자로 전환된다^{52,53}). 또한, SOD 유사활성을 측정하기 위해 pyrogallol 수용액은 superoxide와 반응하여 빠른 자동 산화를 일으키며 SOD와 유사한 역할을 하여 superoxide anion radical의 활성을 억제시킬 수 있다⁵⁴).

진달래꽃 추출물과 진달래꽃 분획물의 superoxide anion radical 소거능을 측정한 결과 Fig. 13, 14와 같이 나타내었다. 우선, 진달래꽃 추출물의 경우 진달래꽃 열수 및 에탄올 추출물이 0.5 mg/mL의 농도에서 50% 정도의 SOD 유사 활성을 나타내었으나, 1,3-BG 추출물의 경우 모든 농도에서 30% 미만의 낮은 저해 활성을 나타내었다. 이는 이 등⁵⁵의 싸리 추출물 SOD 유사 활성 측정에서 싸리 열수 추출물, 에탄올 추출물 및 압력 열수 추출물이 0.5 mg/mL의 농도에서 30% 미만의 유사 활성을 보인 반면, 동일한 0.5 mg/mL의 농도에서 진달래 열수 및 에탄올 추출물이 40% 이상의 저해능을 나타내었다. 또한, 홍 등⁵⁶의 뜰보리수 (*Elaeagnus multiflora* Thunb) 열매 추출물의 항산화 효과에 관한 연구에서 뜰보리수 열매 메탄올 추출물이 2 mg/mL의 농도에서 27.7%의 유사 활성을 나타내어 진달래꽃 추출물의 SOD 유사 활성이 우수함을 알 수 있었다. 진달래꽃 분획물의 경우 Fr-3과 Fr-4 분획물이 0.5 mg/mL의 농도에서 40% 이상의 효과를 나타내어 같은 농도의 진달래꽃 열수 및 에탄올 추출물과 유사했으며 또한, 대조군인 BHA보다 우수한 활성을 나타내었다. 이는 김 등⁵⁷의 구기자 추출물의 SOD 유사 활성 효과에 관한 보고에서 구기자 50% 에탄올 추출물이 시료 농도 1 mg/mL에서 37.3%의 유사 활성을 나타내었으며, 나 등⁵⁸의 생약재 추출물의 SOD 유사 활성을 측정한 결과 감초 열수 및 에탄올 추출물이 동일한 1 mg/mL 각각 37.5, 42.8%의 SOD 유사 활성을 나타내어 진달래꽃 분획물의 SOD 유사 활성이 우수함을 알 수 있었다.

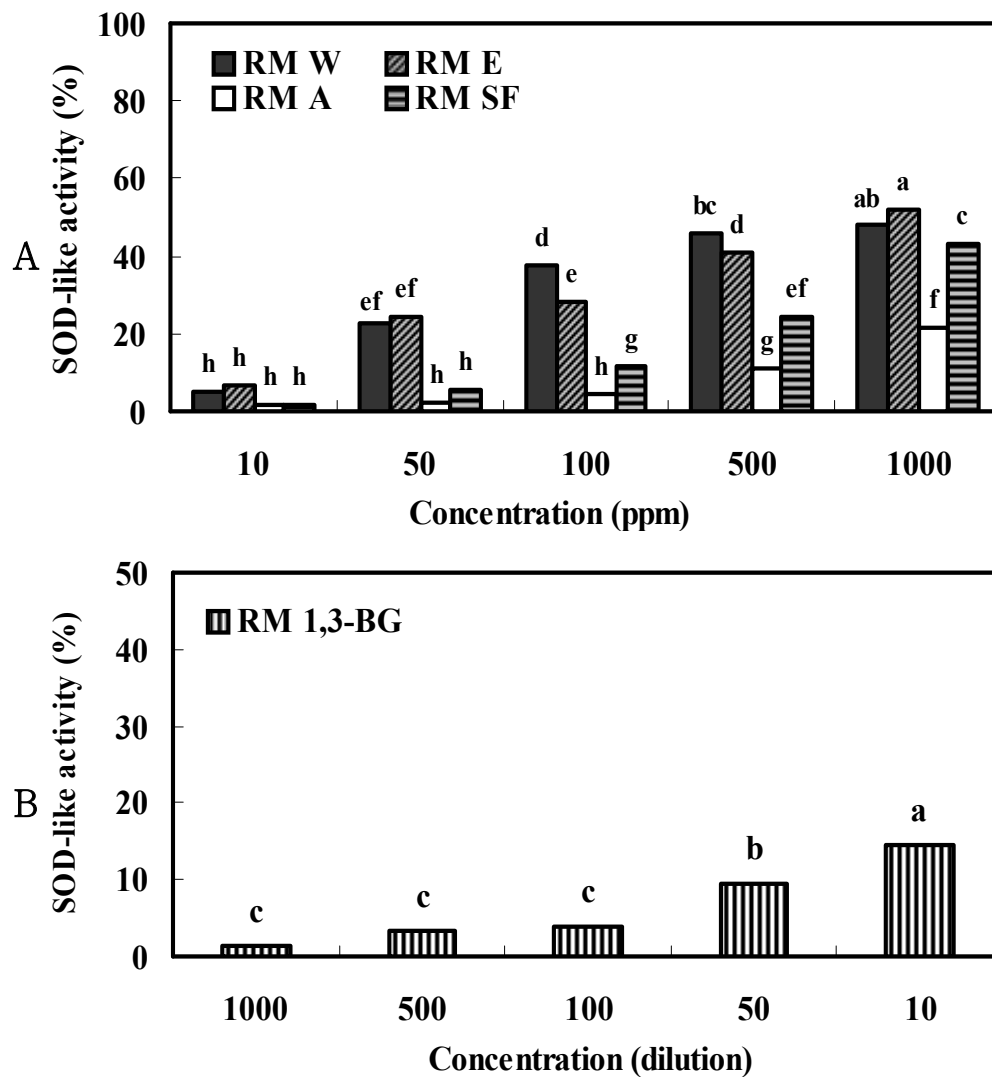


Fig. 13. SOD-like activity of *Rhododendron mucronulatum* Flos extracts.

RM W : *Rhododendron mucronulatum* Flos water extract

RM E : *Rhododendron mucronulatum* Flos ethanol extract

RM A : *Rhododendron mucronulatum* Flos acetone extract

RM SF: *Rhododendron mucronulatum* Flos supercritical fluid extract

RM 1,3-BG : *Rhododendron mucronulatum* Flos 1,3-butylene glycol extract

Values are means of 3 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$.

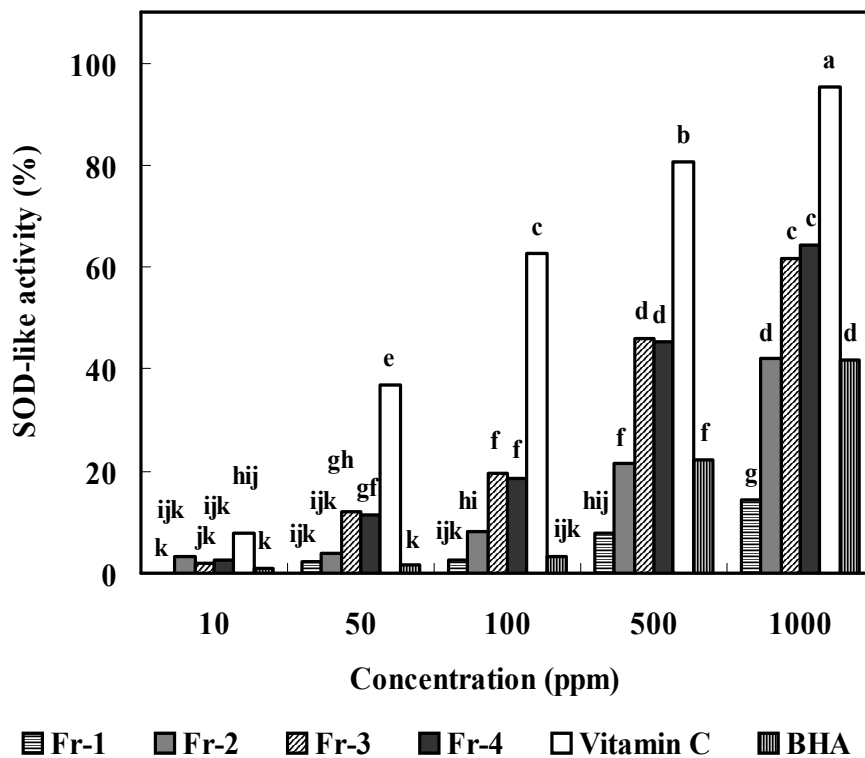


Fig. 14. SOD-like activity of isolated *Rhododendron mucronulatum* Flos.

Fr-1 : fraction 1

Fr-2 : fraction 2

Fr-3 : fraction 3

Fr-4 : fraction 4

Vitamin C : *L*-ascorbic acid

BHA : butylated hydroxyanisole

Values are means of 3 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$.

다. Xanthine oxidase 저해 활성 확인

생체 내에서 활성산소의 생성은 대부분의 경우는 산화효소가 분자산소를 이용하여 기질을 산화시키는 반응이 이루어질 때이며 특히, xanthine oxidase는 분자상의 산소를 수소 수용체로 이용하여 xanthine을 uric acid형으로 전환하는 반응에서 촉매 작용을 하는 대표적인 산화 효소이므로 xanthine oxidase의 저해 효과는 유리 라디칼의 생성 억제와 더불어 생물학적으로 중요한 의의를 가진다고 할 수 있다⁵⁹⁻⁶¹). 진달래꽃 추출물과 진달래꽃 분획물의 xanthine oxidase 저해 활성 측정한 결과를 Fig. 15, 16에 나타난 바와 같이 시료 농도 1 mg/mL에서 진달래 열수추출물을 제외한 에탄올, 아세톤, 초임계 추출물이 40% 이상의 효과를 나타내었다. 특히, 초임계 추출물의 경우 80%에 달하는 높은 xanthine oxidase 저해 활성을 나타내었으나 1,3-BG 추출물의 경우 모든 농도에서 10% 이하의 낮은 xanthine oxidase 저해 활성을 나타내었다. 이는 전 등⁶²)의 감마선 조사한 오미자 추출물의 xanthine oxidase 저해 효과를 측정한 결과 2 mg/mL의 농도에서 오미자 열수, 에탄올, 메탄올, 아세톤 추출물이 약 90% 정도의 저해 활성을 나타내어 진달래 초임계 추출물의 xanthine oxidase 저해 효과가 우수함을 알 수 있었다. 진달래꽃 분획물에서는 Fr-2 분획물이 시료 농도 0.1 mg/mL의 농도에서 약 60%의 xanthine oxidase 저해 활성을 나타내어 0.1 mg/mL의 농도의 BHA와 ascorbic acid보다 우수한 xanthine oxidase 저해 활성을 나타내었다. 또한, 시료 1 mg/mL의 농도에서 진달래꽃 추출물 Fr-3, Fr-4가 80% 이상의 xanthine oxidase 저해 활성을 나타내었으며 이는 김 등⁶³)이 보고한 황금으로부터 항산화 활성 성분의 분리에서 황금의 열수 분획물 0.1 mg/mL의 농도에서 40% 미만의 저해능을 보였으며, column chromatography에 의한 분리된 fraction 6이 0.1 mg/mL의 농도에서 36.3%의 저해활성을 나타내어 진달래꽃 fraction 2가 높은 xanthine oxidase 저해 활성을 나타냄을 알 수 있었다. Xanthine oxidase의 활성 저해를 나타내는 천연물에 대한 연구가 많이 진행되고 있으며, 식물체에 함유된 flavonoid류 성분 중 분자내 존재하는 hydroxy기의 위치에 따라 그 저해도가 각각 다르게 나타나며 gallate기를 함유한 flavonoid 화합물의 경우 경쟁적인 저해 작용이 나타난다는 보고가 있다⁶⁴⁻⁶⁶). 또한, 녹황색 채소류에 존재하는 folate 및 붕잎⁶⁷), 녹차⁶⁸⁻⁷⁰) 감잎⁷¹), 양파⁷²), 해조류⁷³)에서 분리한 polyphenol 화합물에 의한 xanthine oxidase 저해 활성이 보고되어 있다.

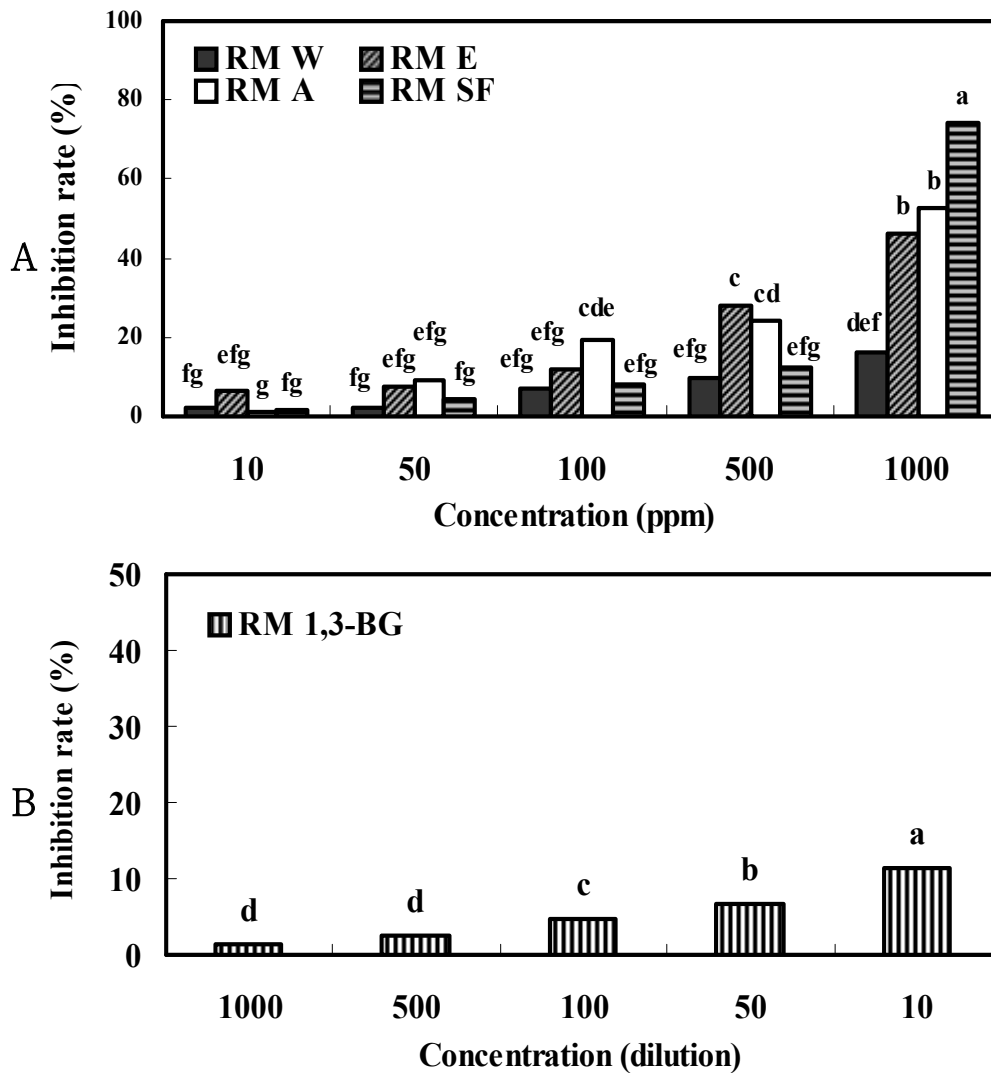


Fig. 15. Inhibition rate of *Rhododendron mucronulatum* Flos extracts on xanthine oxidase.

RM W : *Rhododendron mucronulatum* Flos water extract

RM E : *Rhododendron mucronulatum* Flos ethanol extract

RM A : *Rhododendron mucronulatum* Flos acetone extract

RM SF: *Rhododendron mucronulatum* Flos supercritical fluid extract

RM 1,3-BG : *Rhododendron mucronulatum* Flos 1,3-butylene glycol extract

Values are means of 3 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$.

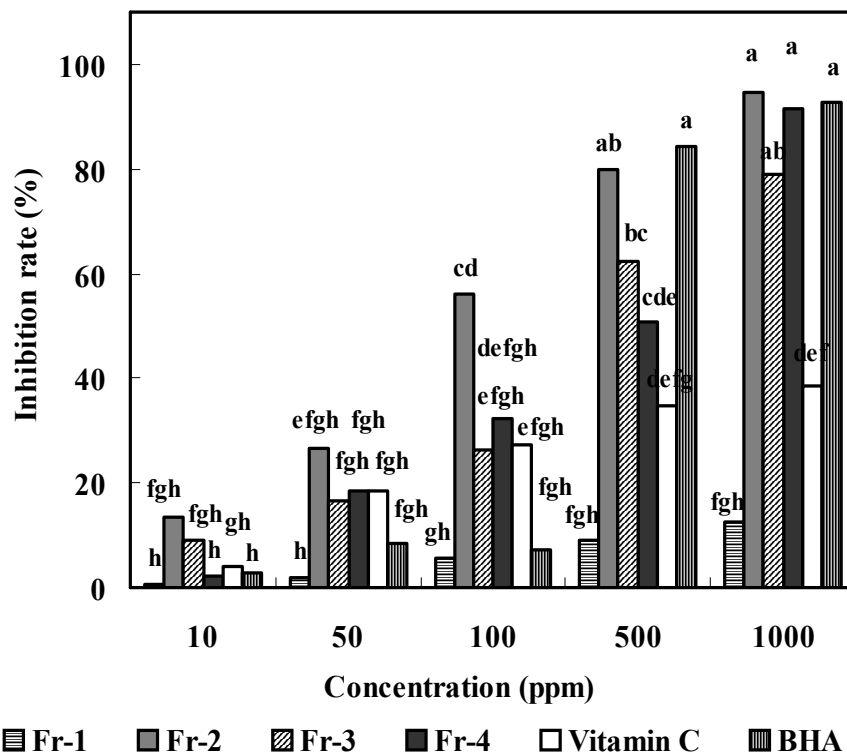


Fig. 16. Inhibition rate of isolated *Rhododendron mucronulatum* Flos on xanthine oxidase.

Fr-1 : fraction 1

Fr-2 : fraction 2

Fr-3 : fraction 3

Fr-4 : fraction 4

Vitamin C : *L*-ascorbic acid

BHA : butylated hydroxyanisole

Values are means of 3 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$.

라. Fe^{2+} , Cu^{2+} 의 첨가에 따른 지방산패 억제능 확인

2-thiobarbuturic acid reactive substance(TBARS)는 불포화 지방산이 자동산화하는 과정 중 지방산화의 2차 산물인 malonaldehyde(MA)가 발생하며, 이는 높은 반응성을 가지고 있다. 이러한 malonaldehyde(MA)는 TBA(2-thiobarbuturic acid)시약과 반응하는 주된 물질이며, 531 nm에서 형광을 갖는 물질을 만든다. 생체 내에서 세포막에 존재하는 인지질 및 당지질과 혈관에 존재하는 지질은 산소와 결합하여 과산화물을 만들고 이들의 연속반응에 의하여 alcohol류, aldehyde류, ketone류 등을 생성하여 생체 내에서 DNA를 손상시켜 암을 유발하기도 하며, 세포의 노화와도 관련이 있는 것으로 알려져 있다⁷⁴⁻⁷⁶). 이러한 지방산패의 억제 효과를 측정하기 위해 산화촉진제인 Fe^{2+} , Cu^{2+} 이온첨가에 따른 지방산패 억제능 측정 결과를 Fig. 17~20과 같이 나타내었다. 진달래꽃 추출물의 경우 산화촉진제인 Fe^{2+} 에 대한 지방 산패 억제능을 측정한 결과 0.5 mg/mL의 농도에서 80% 정도를 나타내었으며 1,3-BG 추출물의 경우 50배 희석한 농도에서 약 80%의 지방 산패 억제능을 나타내었다. 또한, Cu^{2+} 이온첨가에 의한 지방 산패 억제능을 측정한 결과 0.5 mg/mL의 농도에서 진달래 에탄올 추출물이 40% 이상의 지방 산패 억제능을 나타내었으나 진달래꽃 추출물 모든 농도에서 50% 미만의 낮은 억제능을 나타내었다. 진달래꽃 분획물의 Fe^{2+} , Cu^{2+} 이온첨가에 따른 지방 산패 억제능 측정 결과, 50 μ g/mL의 농도에서 Fr-3과 Fr-4 분획물이 60% 이상의 Fe^{2+} 에 대한 지방 산패 억제능 나타냈으며 이는 동일 50 μ g/mL의 농도인 대조군 BHT보다 우수한 결과를 나타내었으며 Cu^{2+} 이온첨가에 따른 지방 산패 억제능 측정 결과, Fr-4 분획물이 시료 농도 50 μ g/mL에서 40% 정도의 지방 산패 억제능을 나타내었다. 산화촉진제인 Fe^{2+} , Cu^{2+} 이온첨가에 따른 지방산패 억제능을 측정한 결과, Cu^{2+} 이온보다는 Fe^{2+} 에 대한 지방산패 억제능이 더 우수했으며 진달래추출물보다 진달래 분획물의 지방산패 억제능이 우수함을 알 수 있었다.

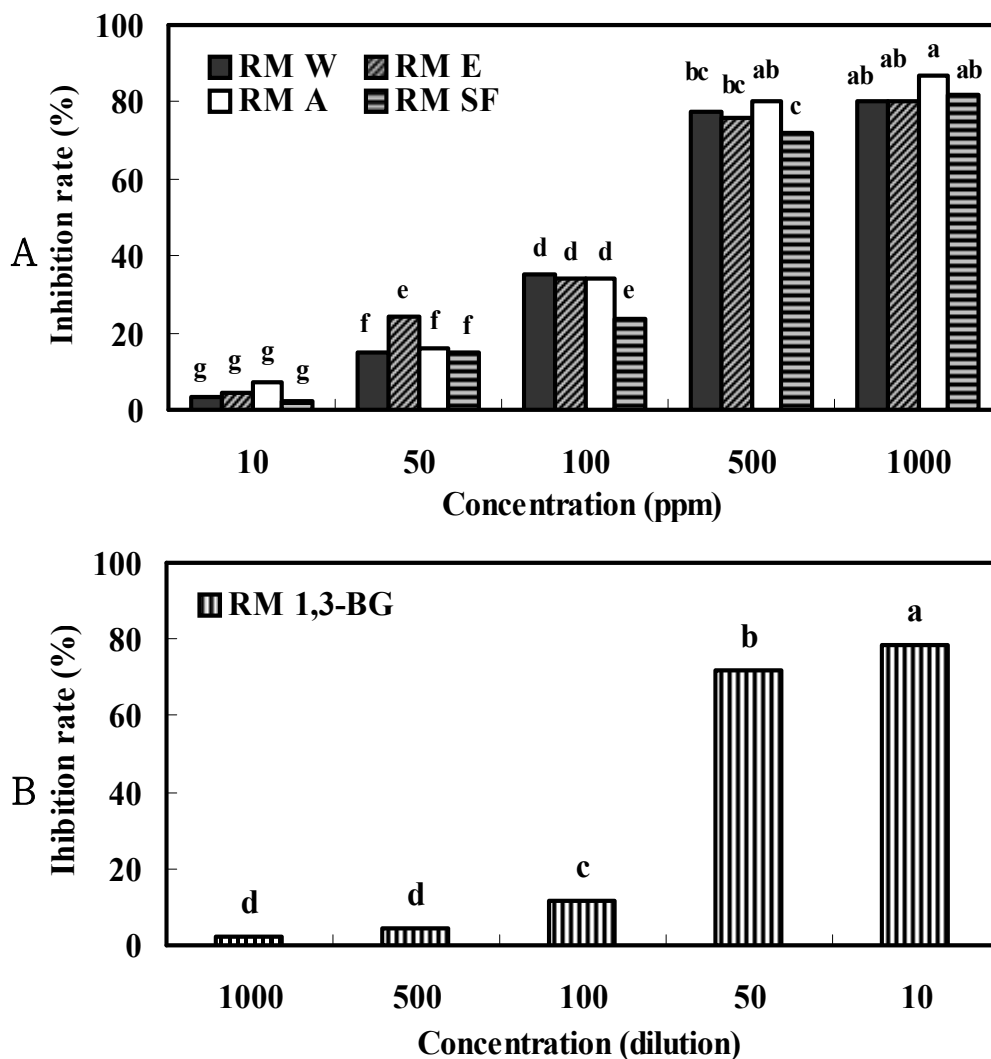


Fig. 17. Effect of *Rhododendron mucronulatum* Flos extracts on lipid oxidation in the presence of ferrous ion(Fe^{2+}).

RM W : *Rhododendron mucronulatum* Flos water extract

RM E : *Rhododendron mucronulatum* Flos ethanol extract

RM A : *Rhododendron mucronulatum* Flos acetone extract

RM SF: *Rhododendron mucronulatum* Flos supercritical fluid extract

RM 1,3-BG : *Rhododendron mucronulatum* Flos 1,3-butylene glycol extract

Values are means of 3 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$.

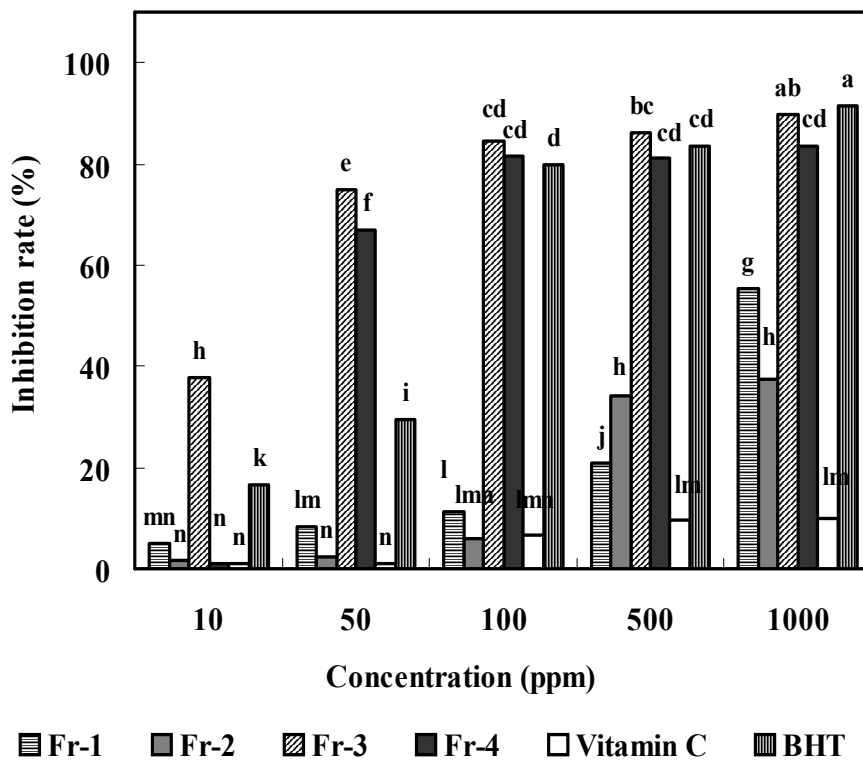


Fig. 18. Effect of isolated *Rhododendron mucronulatum* Flos on lipid oxidation in the presence of ferrous ion(Fe^{2+}).

Fr-1 : fraction 1

Fr-2 : fraction 2

Fr-3 : fraction 3

Fr-4 : fraction 4

Vitamin C : *L*-ascorbic acid

BHA : butylated hydroxyanisole

Values are means of 3 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$.

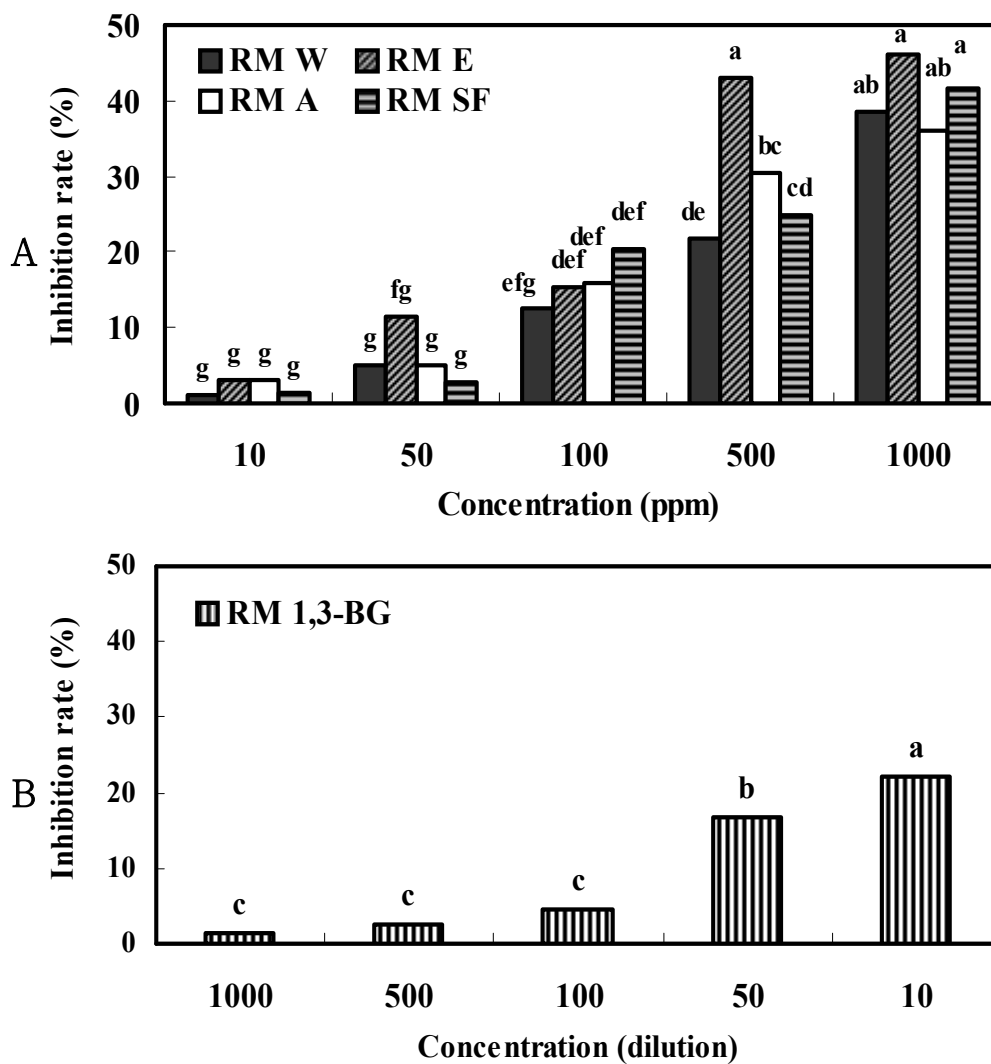


Fig. 19. Effect of *Rhododendron mucronulatum* Flos extracts on lipid oxidation in the presence of copper ion(Cu^{2+}).

RM W : *Rhododendron mucronulatum* Flos water extract

RM E : *Rhododendron mucronulatum* Flos ethanol extract

RM A : *Rhododendron mucronulatum* Flos acetone extract

RM SF: *Rhododendron mucronulatum* Flos supercritical fluid extract

RM 1,3-BG : *Rhododendron mucronulatum* Flos 1,3-butylene glycol extract

Values are means of 3 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$.

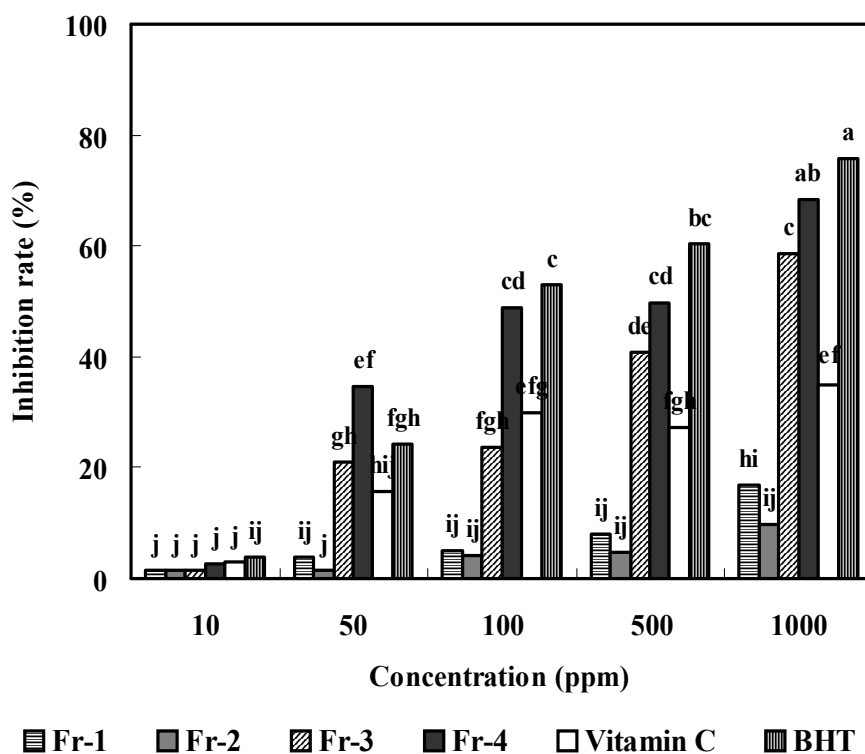


Fig. 20. Effect of isolated *Rhododendron mucronulatum* Flos on lipid oxidation in the presence of copper ion(Cu^{2+}).

Fr-1 : fraction 1

Fr-2 : fraction 2

Fr-3 : fraction 3

Fr-4 : fraction 4

Vitamin C : *L*-ascorbic acid

BHA : butylated hydroxyanisole

Values are means of 3 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$.

3. 미백효과 측정 결과

가. Tyrosinase 저해 활성 확인

Tyrosinase는 동·식물계에 넓게 분포하는 polyphenol oxidase로서 체내에서 두 가지 반응을 촉매 한다. 그 하나는 monophenol를 *o*-diphenol로 산화시키는 tyrosinase oxidase로서의 반응이며 다른 하나는 *o*-diphenol를 *o*-quinone으로 산화시키는 dopa oxidase로서의 기능이다⁷⁷⁾. Tyrosinase는 생체 내에서 이러한 기능 때문에 melanin polymer를 생합성하는데 중요한 역할을 하며 특히, melanocyte에서 멜라닌을 생성할 때 결정적인 영향 미친다⁷⁸⁻⁸⁰⁾. 생성된 멜라닌은 기미, 주근깨, 멜라닌 과색소침착 등의 병변으로 피부에 나타나며 이를 치료하기 위해 hydroquinone, kojic acid, azelaic acid, corticosteroid, retinoic acid 등이 사용되고 있으나⁸¹⁾, 제제의 불안정성 및 피부자극, 피부염 등의 부작용등으로 피부에 안정한 다른 미백제를 천연물에서 찾기 위한 연구가 활발히 진행 중이다. 본 연구에서는 DOPA oxidase의 방법⁸⁴⁾으로 tyrosinase 저해 활성을 측정하였다. 진달래꽃 추출물에서 진달래꽃 열수 추출물 및 아세톤 추출물이 1 mg/mL의 농도에서 40% 이상의 tyrosinase 억제 활성을 나타낸 반면 이를 제외한 진달래 에탄올, 초임계, 1,3-BG 추출물에서는 모든 농도에서 30% 미만의 낮은 저해 활성을 나타내었다 (Fig. 21, 22). 이는 최 등⁸⁵⁾의 해조류 메탄올 추출물의 tyrosinase 저해 활성 검색에 관한 보고에서 10 μ g/mL의 농도에서 갈조류인 미역, 기끌서실, 큰서실, 마디잘록이, 명주도발 및 발동풀가사리, 주릅신두발 등이 동일한 10 μ g/mL의 농도의 진달래 추출물과 유사한 효과를 나타내었다. 진달래꽃 분획물의 tyrosinase 억제 활성의 경우, 0.1 mg/mL의 농도에서 Fr-4 분획물이 50% 정도의 저해 활성을 나타내었으며 1 mg/mL의 농도에서는 대조군인 ascorbic acid 및 kojic acid와 유사한 90% 이상의 tyrosinase 저해 활성을 나타내었다. 이는 김 등⁸⁶⁾의 고등식물로부터 피부 멜라닌 생성에 관여하는 tyrosinase 활성 억제 물질의 탐색에 대한 보고에서 무작위로 수집된 130여종의 고등식물체 메탄올 추출물에서 분리한 클로로포름, 에틸아세테이트 및 열수 분획물의 tyrosinase 억제 활성에서 길경, 고련피, 세신, 토복령, 구기자 및 진피, 승마 등에서 IC₅₀ 200(μ g/mL)을 나타내어 진달래꽃 Fr-4 분획물이 우수한 tyrosinase 억제 활성을 나타낼 수 있었다.

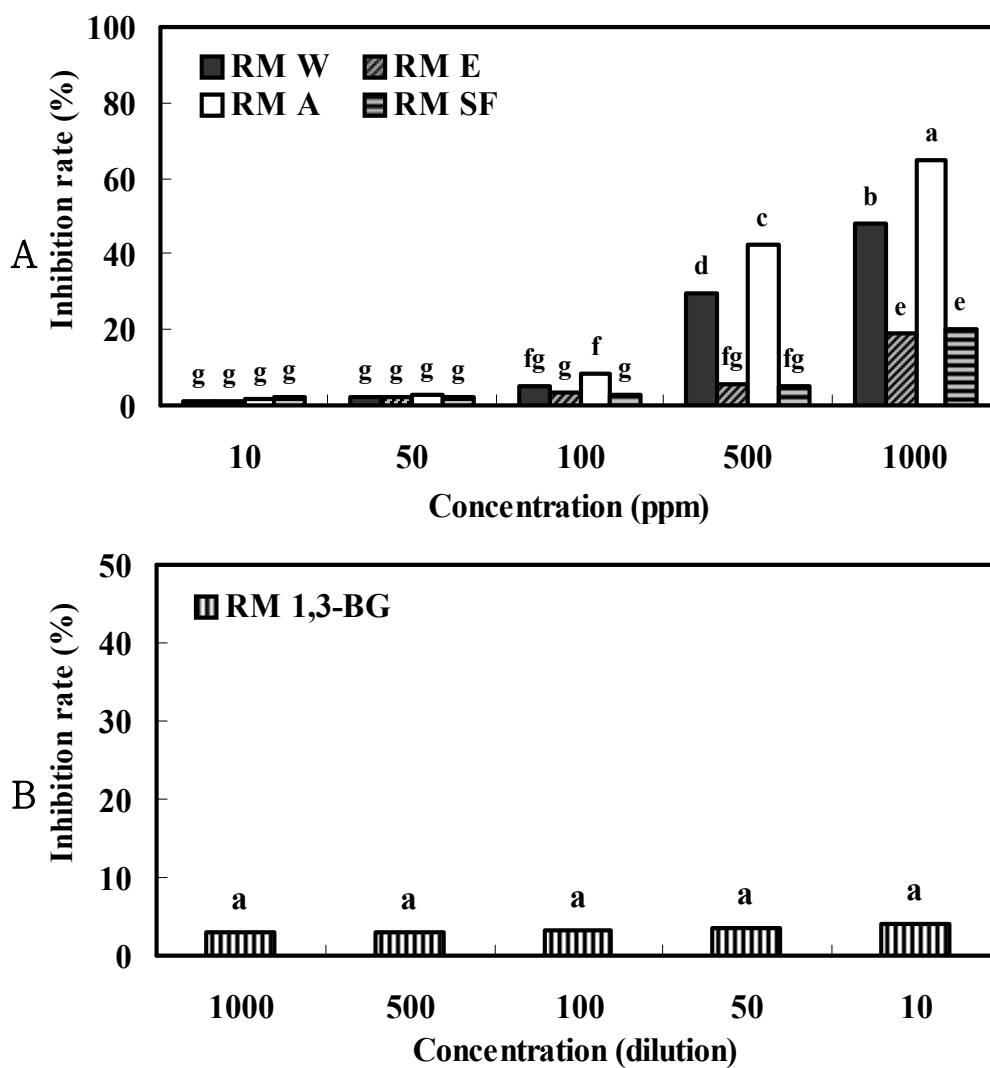


Fig. 21. Inhibition rate of *Rhododendron mucronulatum* Flos extracts on tyrosinase.

RM W : *Rhododendron mucronulatum* Flos water extract

RM E : *Rhododendron mucronulatum* Flos ethanol extract

RM A : *Rhododendron mucronulatum* Flos acetone extract

RM SF: *Rhododendron mucronulatum* Flos supercritical fluid extract

RM 1,3-BG : *Rhododendron mucronulatum* Flos 1,3-butylene glycol extract

Values are means of 3 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$.

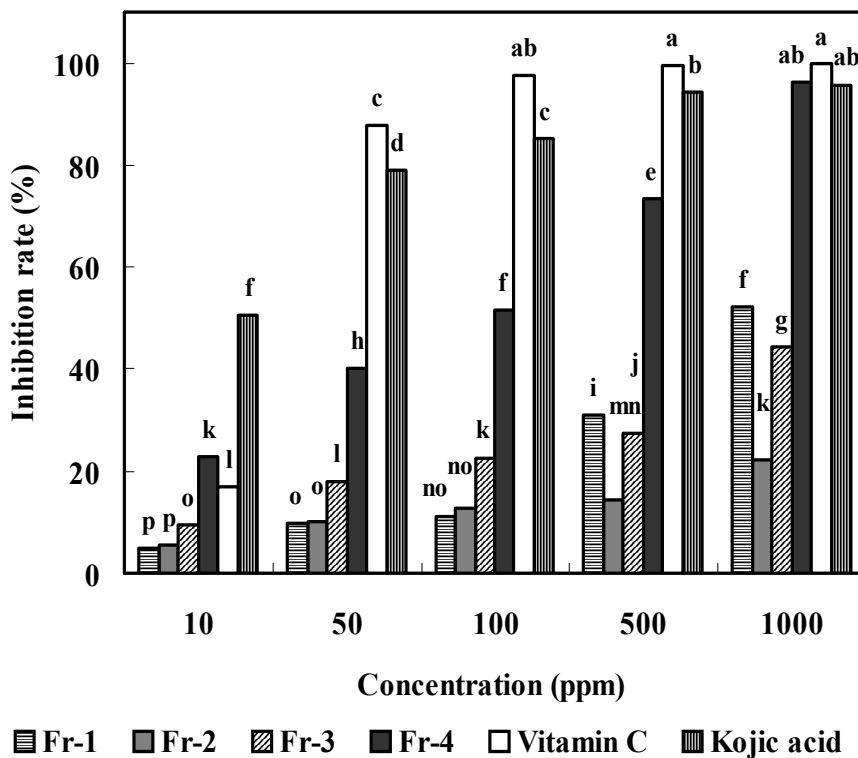


Fig. 22. Inhibition rate of isolated *Rhododendron mucronulatum* Flos on tyrosinase.

Fr-1 : fraction 1

Fr-2 : fraction 2

Fr-3 : fraction 3

Fr-4 : fraction 4

Vitamin C : *L*-ascorbic acid

BHA : butylated hydroxyanisole

Values are means of 3 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$.

나. Melanoma에서의 melanin합성 저해 확인

Melanin의 생성 인자로서 tyrosinase 이외에도 dopachrome conversion factor, prostaglandin(PG), interferon(IFN) 또는 melanocyte stimulating hormone(MSH), vitamin D₃, histamine 등이 보고되고 있다⁸²⁾. Melanin의 생성 억제제는 크게 두가지 타입으로 나뉘며 그 하나는 melanin 생성의 주요 효소인 tyrosinase 효소를 억제하는 것이고, 다른 하나는 tyrosinase 효소를 억제하진 않으나 색소형성세포 내에서 melanin 합성을 억제하는 것이다. Melanin 생성 메카니즘은 복잡하고 다원적이기 때문에 *in vitro*에서 tyrosinase 저해 활성 실험 결과만으로는 melanin 생성 억제 작용을 말하기엔 불충분하다. 그러나 *in vitro* 방법인 tyrosinase 저해 활성 실험과 melanoma를 이용한 실험은 광범위한 천연물에서 신규 melanin 생성 억제 물질을 검색하는 수단이며 또, 실험 시료의 melanin 생성 억제의 작용기전을 이해하는데 매우 유용한 실험법이다⁸³⁾.

진달래꽃 추출물과 진달래꽃 분획물의 멜라닌 생합성 저해 활성을 측정한 결과 진달래꽃 추출물의 경우, 모든 농도에서 30% 이하의 낮은 멜라닌 저해 활성 결과를 나타내었으며 진달래꽃 분획물의 경우 농도가 증가할수록 멜라닌 저해 활성은 증가하는 경향을 보이거나 모든 농도에서 대조군인 알부틴보다 낮은 저해 활성을 나타내었다 (Fig 23, 24). 이는 이 등⁸⁷⁾이 보고한 지실의 멜라닌 생성 억제물질 탐색결과에서 51종 식물체의 메탄올 추출물에서 분획한 클로로폼, 에틸아세테이트 및 물 분획물의 B16 mouse melanoma cell의 melanin합성 저해를 측정한 결과, 시료 농도 0.15 mg/mL에서 질경이 클로로폼 분획물이 36%를 나타내어 진달래꽃 추출물 및 분획물의 저해 활성과 유사함을 나타내었다. 또한, 황기, 사람주나무 및 개맥문동, 지모의 경우 모든 분획물에서 30% 미만의 낮은 저해 활성을 나타내어 진달래꽃 추출물 및 분획물의 저해 활성이 우수함을 알 수 있었으나 신이의 클로로폼 분획물 및 백출의 열수 분획, 지실의 클로로폼 및 열수 분획물에서 50% 이상의 melanin합성 저해능을 나타내어 진달래 추출물 및 분획물보다 우수한 melanin합성 저해능을 나타내었다.

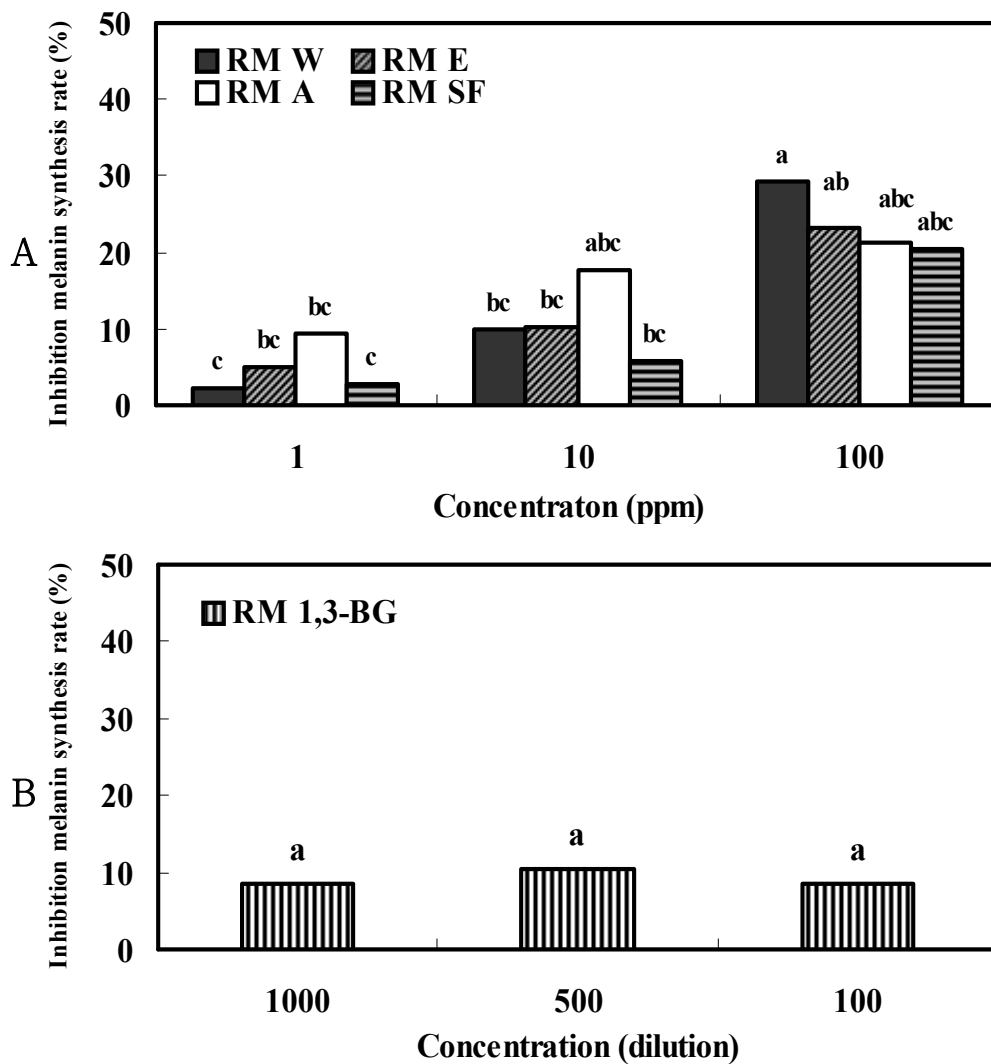


Fig. 23. Inhibition melanin synthesis rate of *Rhododendron mucronulatum* Flos extracts.

RM W : *Rhododendron mucronulatum* Flos water extract

RM E : *Rhododendron mucronulatum* Flos ethanol extract

RM A : *Rhododendron mucronulatum* Flos acetone extract

RM SF: *Rhododendron mucronulatum* Flos supercritical fluid extract

RM 1,3-BG : *Rhododendron mucronulatum* Flos 1,3-butylene glycol extract

Values are means of 3 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$.

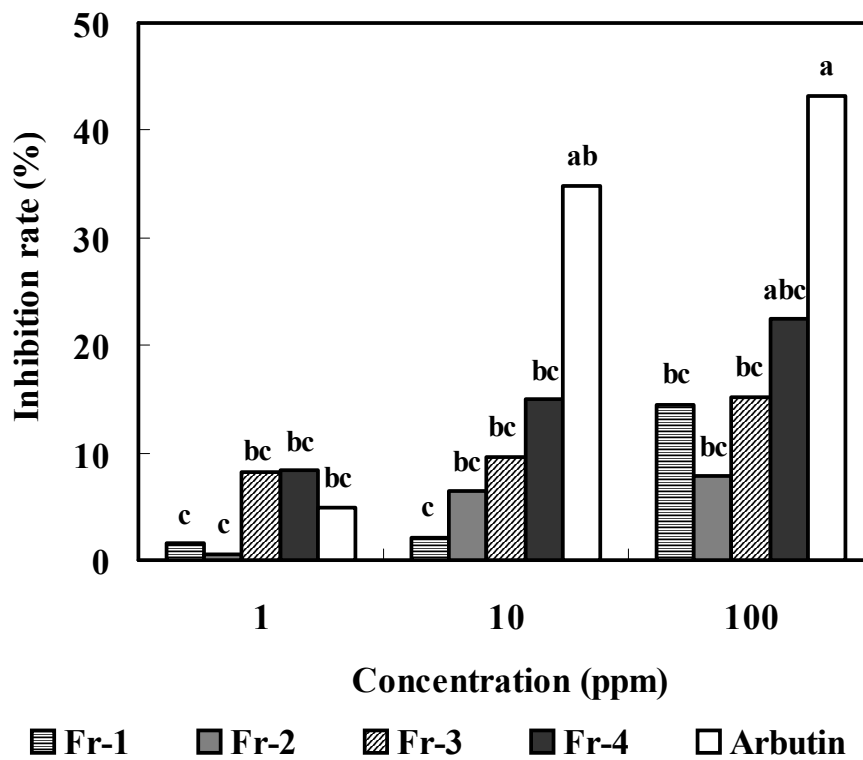


Fig. 24. Inhibition melanin synthesis rate of isolated *Rhododendron mucronulatum* Flos.

Fr-1 : fraction 1

Fr-2 : fraction 2

Fr-3 : fraction 3

Fr-4 : fraction 4

Vitamin C : *L*-ascorbic acid

BHA : butylated hydroxyanisole

Values are means of 3 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$.

4. 주름개선 측정 결과

가. elastase 저해 활성 확인

Elastase는 동물 결합조직의 탄성섬유 단백질인 elastin을 분해시켜 피부의 진피층 망상구조의 결합을 파괴하여 주름 생성의 주요한 원인인 효소로 알려져 왔다. 이 효소는 1949년 췌장 추출물에서 처음 발견되었으며⁸⁸⁾ 인체의 경우 단핵 백혈구(monocytes), 다형핵 백혈구(PMNs) 및 혈소판, 평활근에서 발견되며 특히, 중성구 과립구내에 존재하는 elastase는 체내의 elastin을 분해하는 백혈구 과립 효소 중의 하나로 이상조직에서 효소의 활성이 증대되어 조직 파괴에 직접적인 원인이기도 하다^{89,90)}. 이러한 주름 생성과 관련된 elastase 저해 활성 측정 결과를 Fig. 25, 26과 같이 나타내었다. 진달래꽃 추출물의 경우, 진달래꽃 에탄올 추출물이 0.1 mg/mL의 농도에서 30% 이상의 elastase 저해 활성을 나타내었으며 1 mg/mL의 농도에서 진달래꽃 에탄올, 아세톤, 초임계 추출물이 약 40% 정도의 저해활성을 나타내었다. 하지만, 진달래꽃 열수와 1,3-BG 추출물의 경우 모든 농도에서 30% 이하의 낮은 저해활성을 나타내었다. 진달래꽃 분획물의 elastase 저해 활성은 Fr-3과 Fr-4의 분획물이 모든 농도에서 대조군인 ascorbic acid보다 높은 활성을 나타내었으며 특히, 0.5 mg/mL의 농도에서 Fr-3과 Fr-4가 각각 43.6, 71.9%로 높은 elastase 저해 활성을 나타내었다. 이는 광 등⁹¹⁾의 각종 약용 식물로부터 elastase 저해물질의 탐색에 대한 보고에서 총 64종의 식물체를 채집해 피부노화 억제와 관련된 elastase 저해 물질의 탐색한 결과, 1mg/mL의 농도에서 쑥, 인동덩굴, 천궁이 40% 정도의 효과를 나타내어 진달래꽃 추출물과 유사하였으며 쇠무릎 및 당귀, 삼주, 초결명, 감초 열수 추출물이 20% 미만의 효과를 나타내어 진달래꽃 추출물의 elastase 저해 활성이 우수함을 알 수 있었다. 또한, 복분자 및 대황의 열수 추출물이 1 mg/mL의 농도에서 70% 이상의 효과를 나타내어 1 mg/mL의 농도에서 진달래꽃 분획물 Fr-4와 유사한 elastase 저해 활성을 나타내었다.

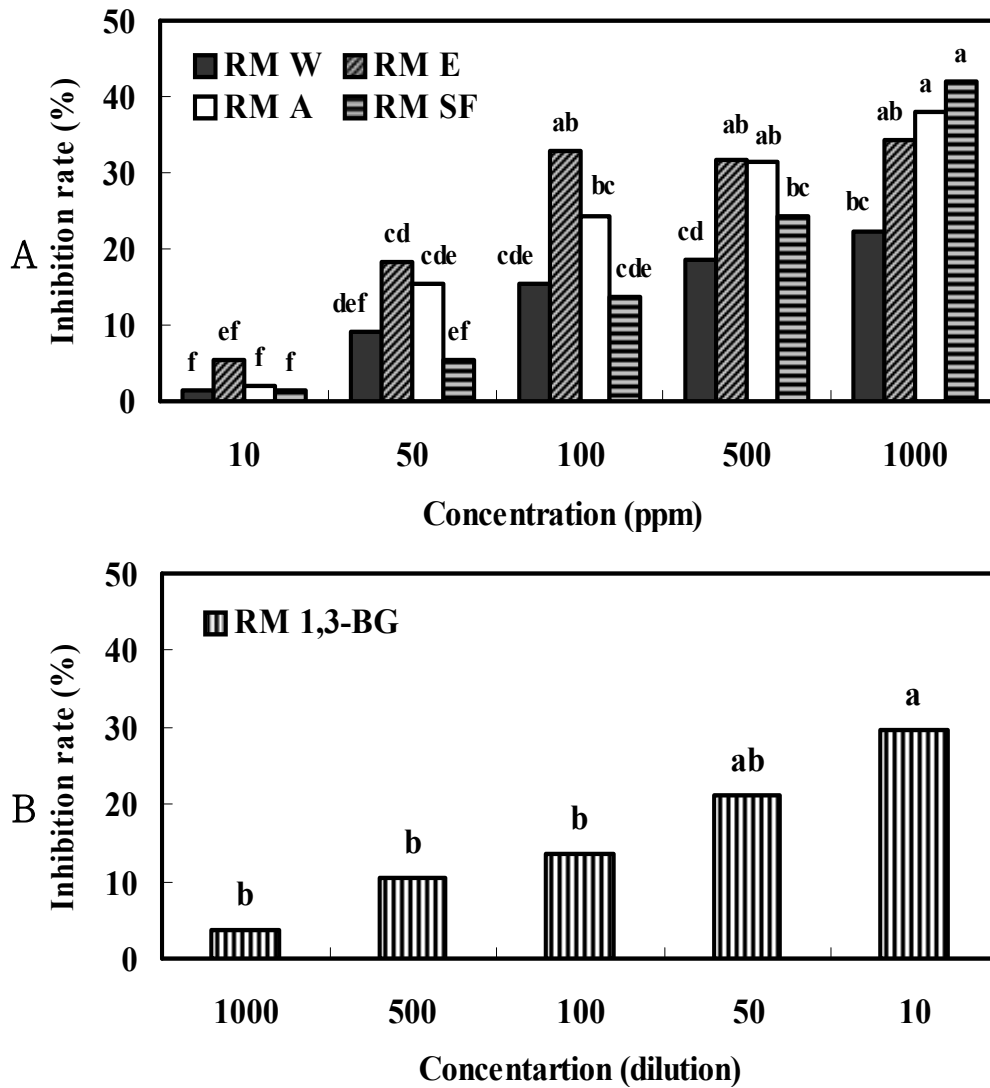


Fig. 25. Inhibition rate of *Rhododendron mucronulatum* Flos extracts on elastase.

RM W : *Rhododendron mucronulatum* Flos water extract

RM E : *Rhododendron mucronulatum* Flos ethanol extract

RM A : *Rhododendron mucronulatum* Flos acetone extract

RM SF: *Rhododendron mucronulatum* Flos supercritical fluid extract

RM 1,3-BG : *Rhododendron mucronulatum* Flos 1,3-butylene glycol extract

Values are means of 3 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$.

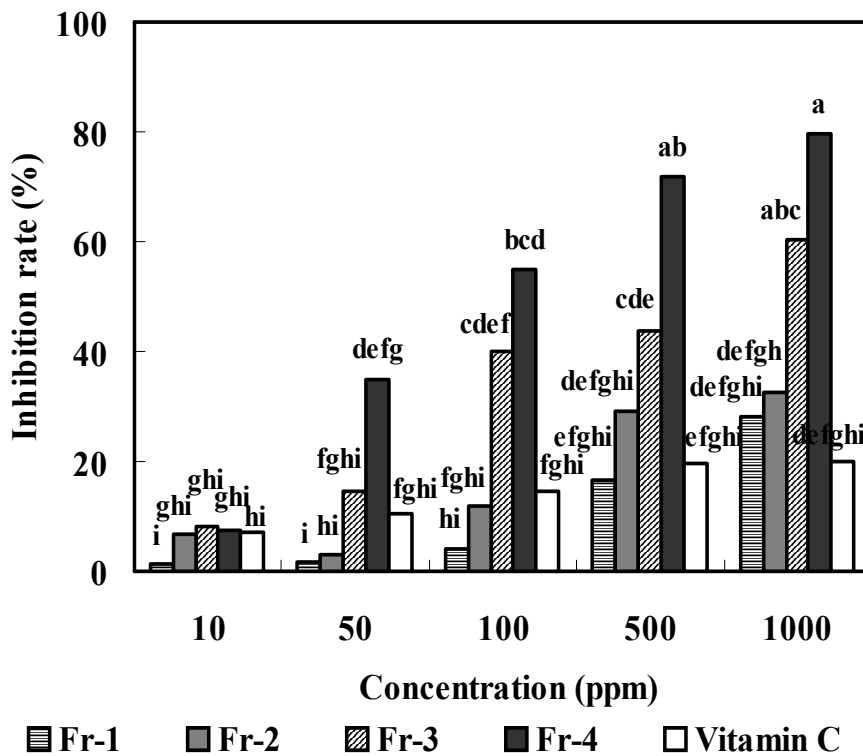


Fig. 26. Inhibition rate of isolated *Rhododendron mucronulatum* Flos on elastase.

Fr-1 : fraction 1

Fr-2 : fraction 2

Fr-3 : fraction 3

Fr-4 : fraction 4

Vitamin C : *L*-ascorbic acid

BHA : butylated hydroxyanisole

Values are means of 3 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$.

5. 수렴활성 측정 결과

가. Astringent 활성 확인

수렴제는 강한 단백질 결합 성질을 나타내며 원리는 피부 단백질이 고분자 flavonoid와 결합하여 가교결합을 형성하려 피부가 수축되는 현상을 의미한다. 피부에 작용하여 상처를 보호하고 진통효과 및 세균감염을 방지하는 효과를 가지며 모세혈관 벽의 투과성을 감소시키므로 혈장이 안에서 밖으로 유출되거나 백혈구가 소실되는 것을 억제하여 염증 및 지혈작용을 한다. 따라서 수렴작용의 실험에서 homoglobin의 단백질이 시료와 결합하는 정도에 따라서 수렴효과를 판단하였다⁹²⁾. 수렴 효과를 측정하기 위해 bovine hemoglobin의 침전효과를 측정한 결과를 Fig. 27, 28과 같이 나타내었다. 진달래꽃 추출물의 경우 모든 농도에서 농도 의존적인 상승효과를 나타내었다. 진달래꽃 열수 추출물이 1mg/mL의 농도에서 40% 이상의 수렴 효과를 나타내었으나, 이를 제외한 에탄올, 아세톤, 초임계, 1,3-BG 추출물의 경우 30% 이하의 낮은 수렴 효과를 나타내었다. 진달래 분획물의 수렴 효과는 진달래꽃 분획물 Fr-3과 Fr-4이 0.1 mg/mL의 농도에서 40% 이상의 수렴 효과를 보여 동일한 함량의 탄닌산 보다 우수한 수렴 효과를 나타내었다. 수렴 효과의 측정 결과 진달래꽃 추출물에 비해 진달래꽃 분획물이 높은 수렴 효과를 나타내었으며 특히, 0.5 mg/mL 이하의 농도에서는 진달래꽃 분획물 Fr-3과 Fr-4가 대조균인 탄닌산보다 높은 수렴 효과를 나타내었다. 이는 이 등³³⁾이 보고한 함초의 생리활성 기능과 화장품 소재로서의 응용에서 함초 열수 및 에탄올 추출물이 10 mg/mL의 농도에서 각각 50.8, 29.1%의 수렴 활성을 나타내어 진달래꽃 추출물과 진달래꽃 분획물의 수렴 활성이 높은 것을 확인할 수 있었다. 또한, 안 등⁹³⁾의 산사자 추출물의 생리활성에 관한 연구 보고에서는 산사자 열수 및 에탄올 추출물이 1 mg/mL과 5 mg/mL의 농도에서 각각 11.4, 42.2%의 수렴 활성을 나타내어 진달래꽃 Fr-3과 Fr-4 분획물의 수렴 활성 뛰어남을 알 수 있었으며 대조균으로 사용된 현초의 경우, 1 mg/mL의 농도에서 열수, 에탄올 추출물이 64.0, 71.6%를 나타내어 동일 농도의 진달래꽃 Fr-3과 Fr-4 분획물과 유사한 수렴 활성을 나타내었다.

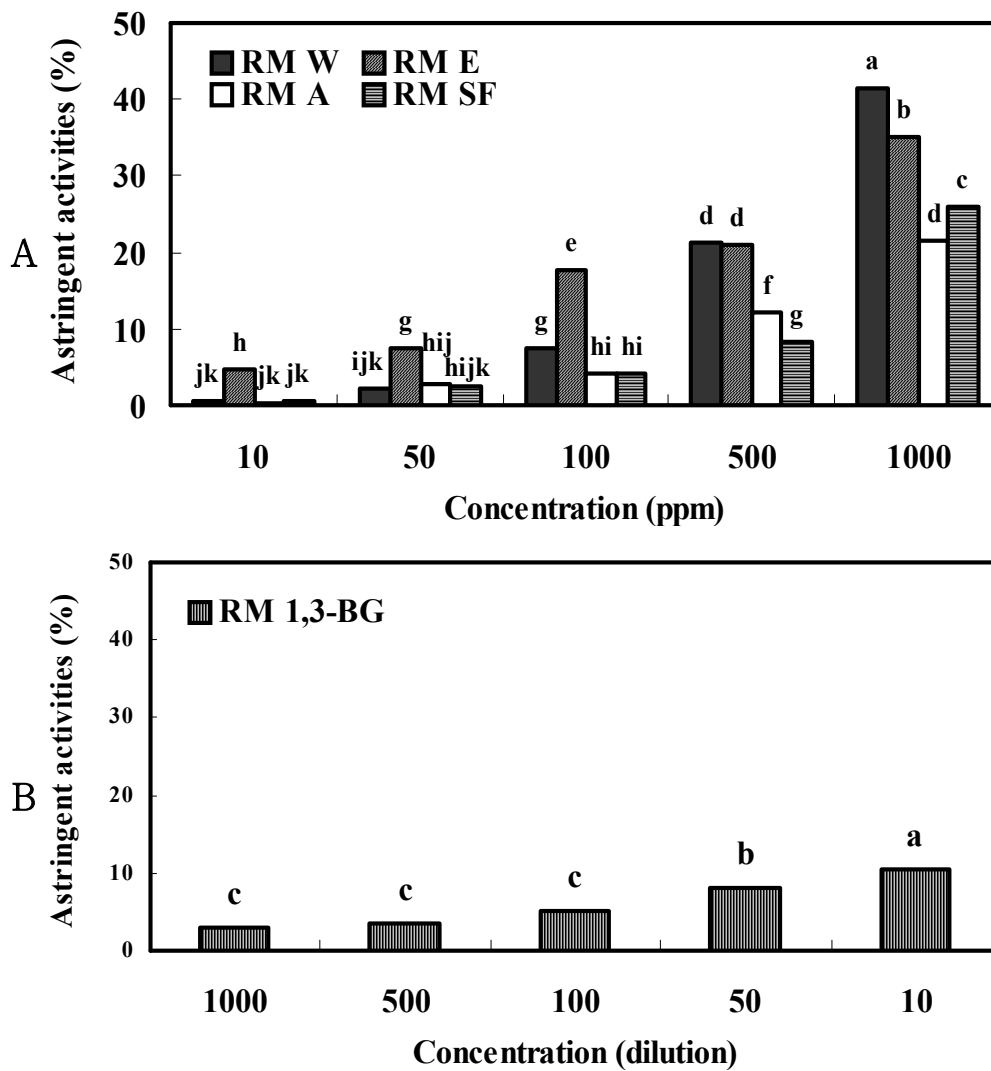


Fig. 27. Comparison of astringent activities of *Rhododendron mucronulatum* Flos extracts.

RM W : *Rhododendron mucronulatum* Flos water extract

RM E : *Rhododendron mucronulatum* Flos ethanol extract

RM A : *Rhododendron mucronulatum* Flos acetone extract

RM SF: *Rhododendron mucronulatum* Flos supercritical fluid extract

RM 1,3-BG : *Rhododendron mucronulatum* Flos 1,3-butylene glycol extract

Values are means of 3 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$.

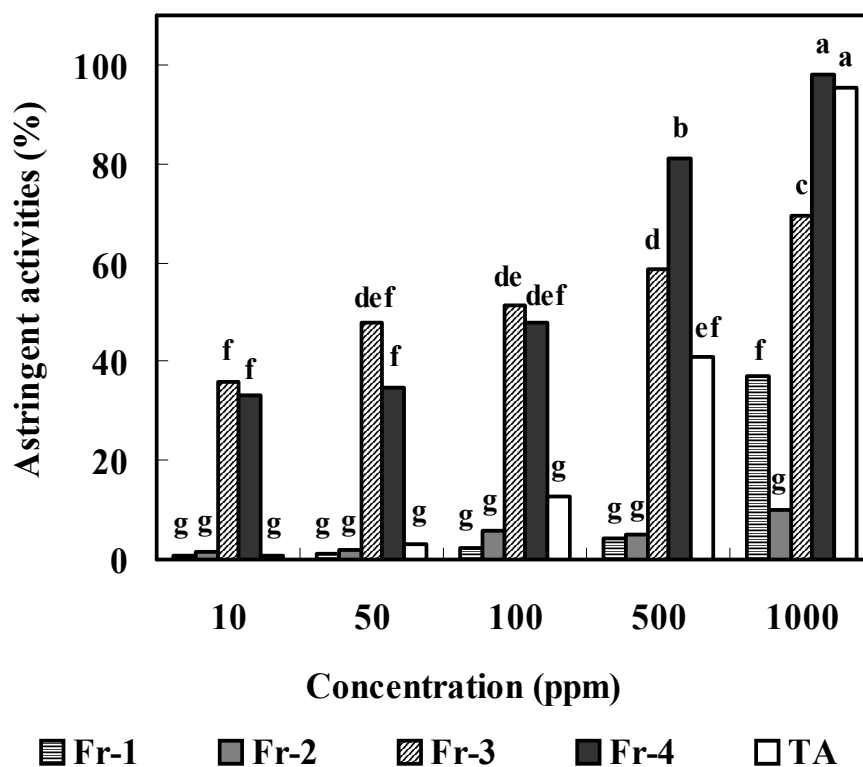


Fig. 28. Comparison of astringent activities of isolated *Rhododendron mucronulatum* Flos.

Fr-1 : fraction 1

Fr-2 : fraction 2

Fr-3 : fraction 3

Fr-4 : fraction 4

Vitamin C : *L*-ascorbic acid

BHA : butylated hydroxyanisole

Values are means of 3 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$.

6. 항암 효과 측정 결과

가. 적정 접종 세포수 결정

실험에 사용되는 암 세포들을 배양하면 2~24시간에서 세포증식이 이루어지지 않는 lag phase를 거쳐 대수성장을 하는 log phase로 이르게 된다. 이러한 log phase 는 각 세포주마다 특이하여 각 세포주 특유의 lag phase 시간, population doubling time, plateau phase에서의 세포 포화 밀도를 가지게 된다. 대수성장기에는 암세포의 성장이 활발하여 MTT의 환원작용도 활발하여 살아있는 세포의 수가 흡광도에 비례적으로 반영되므로 접종되는 세포의 수는 대수기의 세포농도를 기준으로 선택되어야 한다. 이 대수곡선에서 흡광도가 0.6~0.7인 부분에서의 흡광도는 세포농도가 세포의 농도에 정비례하여 감소 또는 증가함으로 이 대수성장기의 세포가 적정 세포 밀도가 된다. 따라서, 항암효과 측정을 위한 적정 세포수의 측정 결과는 Fig. 29와 같이 나타내었다. 흡광도 0.6~0.7의 부위에서 마우스로부터 유래된 흑색종(B16F10)은 0.78×10^3 cell의 농도로 결정하여 항암 효과를 측정하였다.

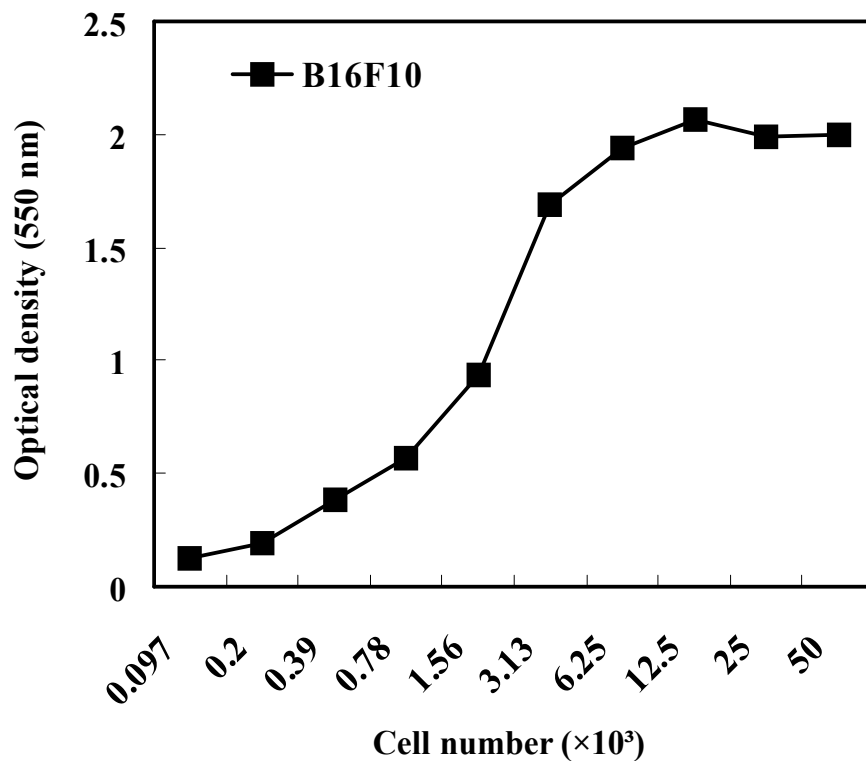


Fig. 29. Optimization of cell concentration on cancer cells. ■: mouse melanoma(B16F10) cell.

나. 항암 효과 확인

MTT 검색법은 96 well plate를 사용하며, 검사결과를 ELISA reader(multiwell microplate reader)를 이용하여 많은 시료를 간단하게 판독할 수 있어 세포독성 및 세포 증식 검색법으로서 널리 사용되고 있는 방법 중의 한 방법이다. 암세포의 경우 대사 과정에서 미토콘드리아의 탈수소 효소 작용에 의해 노란색 수용성 MTT tetrazolium을 자주색을 띠는 비수용성의 MTT formazan으로 환원시킨다. MTT formazan의 흡광도는 550 nm 근처 파장에서 최대가 되며, 이는 대사적으로 왕성한 세포의 농도를 반영하는 것이다⁹⁴⁾. SRB 검색법은 96 well plate의 내부에 점착되거나 부유하고 있는 세포 단백질을 염색하는 방법으로 Skehan에 의해 확립되었다. Sulforhodamine B dye는 세포수와 관련된 생존 세포질 내부의 단백질 기본 단위인 아미노산과 결합하여 염색되고, 이를 비색분석을 통해 세포독성 및 세포증식 검색한다. 1989년 미국국립암연구소(NCI)에서 항암제의 *in vitro* 항암 활성을 1차적으로 측정하기 위해 채택하였다⁹⁵⁻⁹⁸⁾. MTT 검색법의 경우 생성된 MTT formazan용액의 불안정성으로 인한 단점을 가지고 있으나, 실험조작의 자동화가 가능하며 실험 결과의 재연성과 객관성이 우수하여 대량 검색이나 초기검색 단계에서 사용되는 방법이다. SRB 검색법의 경우, 염색제를 제거하는 과정에서 오차가 발생할 수 있으나 염색제를 녹여 흡광도를 측정하기 때문 MTT assay에 비해 시간에 따른 흡광도의 변화가 적은편이다⁹⁹⁾.

진달래꽃 추출물 및 진달래 분획물의 항암 효과를 측정된 결과, Fig. 30~33과 같이 나타내었다. MTT 검색법에 의한 항암 효과의 측정 결과, 에탄올 추출물을 제외한 진달래꽃 아세톤 및 초임계, 열수추출물이 0.5 mg/mL의 농도에서 60% 이상의 항암 효과를 나타냈으며 특히, 열수 추출물의 경우 약 80%에 달하는 높은 항암 효과를 나타내었다. 하지만 진달래 1,3-BG 추출물의 경우 모든 농도에서 50% 이하의 낮은 저해활성을 나타내었다. 진달래 분획물의 경우, 동일한 0.5 mg/mL의 농도에서 Fr-1을 제외한 Fr-2, Fr-3, Fr-4에서 약60% 이상의 항암 효과를 나타내었으며 특히, Fr-3의 경우 87.4%의 높은 항암 효과를 나타내었다. 이는 김 등¹⁰⁰⁾의 다섯 가지 해조류 에탄올 추출물의 암세포 성장억제 효과에 관한 보고에서 다시마, 미역, 김의 에탄올 추출물이 0.15 mg/mL의 농도에서 Hela 세포를 각각 39.6, 48.5, 21.2%로 암세포의 성장을 억제하는 것으로 나타나 0.1 mg/mL의 진달래 추출물과 유사한 암세포 저해능을 나타내었으며, 1 mg/mL의 농

도에서는 김을 제외한 톳, 다시마, 미역, 파래가 90% 이상의 저해능을 나타내어 진달래꽃 Fr-3 분획물이 0.5mg/mL의 농도에서 이와 동일한 90% 이상의 효과를 나타내어 진달래꽃 Fr-3 분획물의 높은 항암활성 효과를 확인할 수 있었다. 또한, 이 등¹⁰¹⁾의 삼백초 (*Saururus Chinensis* Bail.) 열수 추출물의 항암 효과를 측정한 결과 혈액암 세포(U937) 0.5mg/mL의 농도에서 78.6%의 항암 활성을 나타내어 진달래 열수 추출물 및 진달래 Fr-3 분획물과 유사한 활성을 나타내었다. SRB 검색법에 의한 항암 효과의 측정 시, 0.5 mg/mL의 농도에서 1,3-BG 추출물을 비롯한 모든 진달래꽃 추출물이 40% 미만의 낮은 항암 효과를 나타내었으나, 1,3-BG 추출물이 1 mg/mL의 농도에서 61.0%의 항암 효과를 나타내어 MTT 검색법 보다는 높은 항암 활성을 나타내었다. 또한, 진달래꽃 분획물의 SRB 검색법에 의한 항암 효과 측정결과, Fr-3 분획물이 0.1 mg/mL의 농도에서 약 50% 이상의 항암 효과를 나타내었다. 이는 이 등¹⁰²⁾의 마가목의 항암 활성 탐색에 대한 보고에서 마가목의 잎, 줄기, 열매의 열수 추출물이 폐암세포(A459), 사람 유방암 세포(MCF7) 및 간암세포(HepG2)에 대한 항암 효과 측정결과 1 mg/mL의 농도에서 70% 이상의 항암 효과를 나타내어 진달래꽃 열수추출물과 유사한 항암 효과를 나타내었으며 진달래꽃 분획물의 경우 동일한 1 mg/mL의 시료 농도에서 진달래꽃 Fr-2, Fr-3 분획물이 마가목 잎, 줄기의 열수 추출물보다 우수한 항암 활성을 나타내었으며 마가목 열매 에탄올 추출물의 경우 진달래꽃 Fr-2, Fr-3 분획물과 유사한 91%의 높은 항암 활성을 나타내었다.

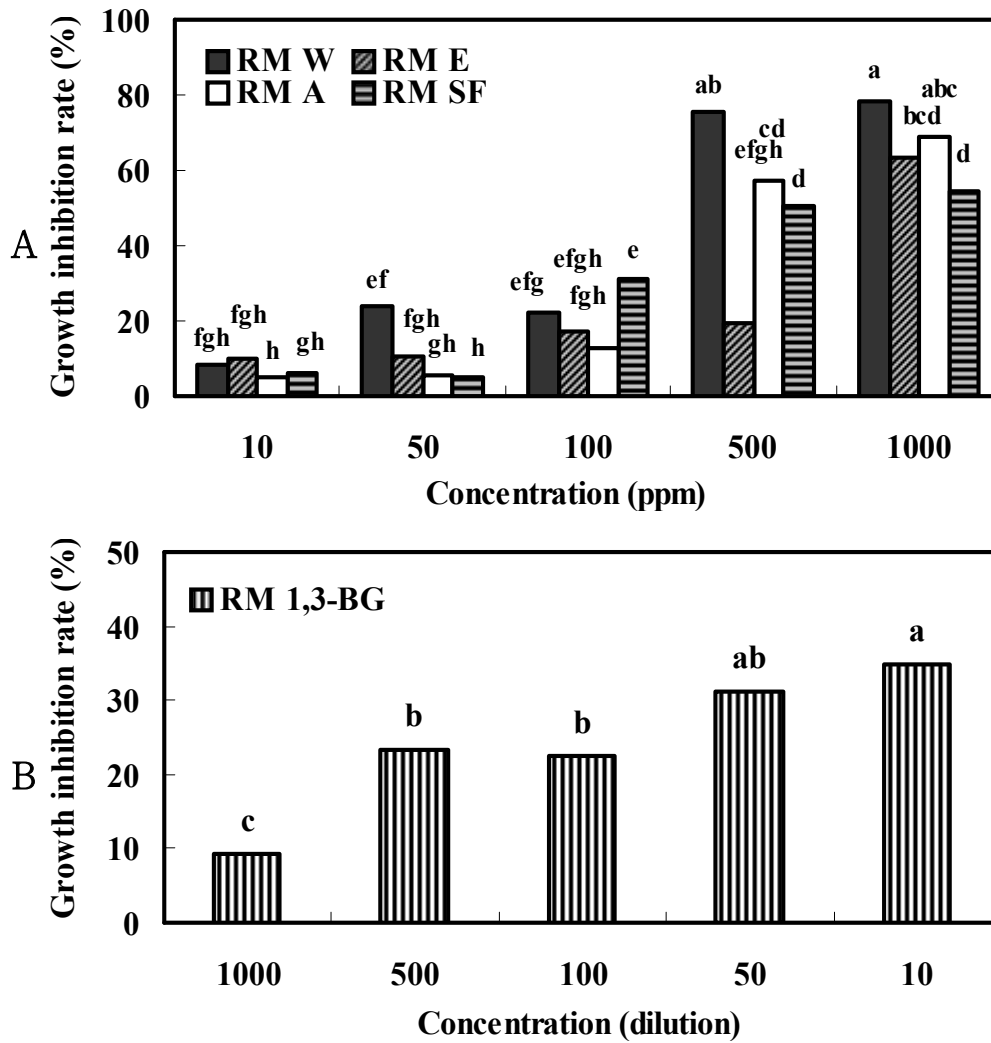


Fig. 30. Growth inhibition rate of *Rhododendron mucronulatum* Flos extracts on mouse melanoma(B16F10) by method of MTT.

RM W : *Rhododendron mucronulatum* Flos water extract

RM E : *Rhododendron mucronulatum* Flos ethanol extract

RM A : *Rhododendron mucronulatum* Flos acetone extract

RM SF: *Rhododendron mucronulatum* Flos supercritical fluid extract

RM 1,3-BG : *Rhododendron mucronulatum* Flos 1,3-butylene glycol extract

Values are means of 3 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$.

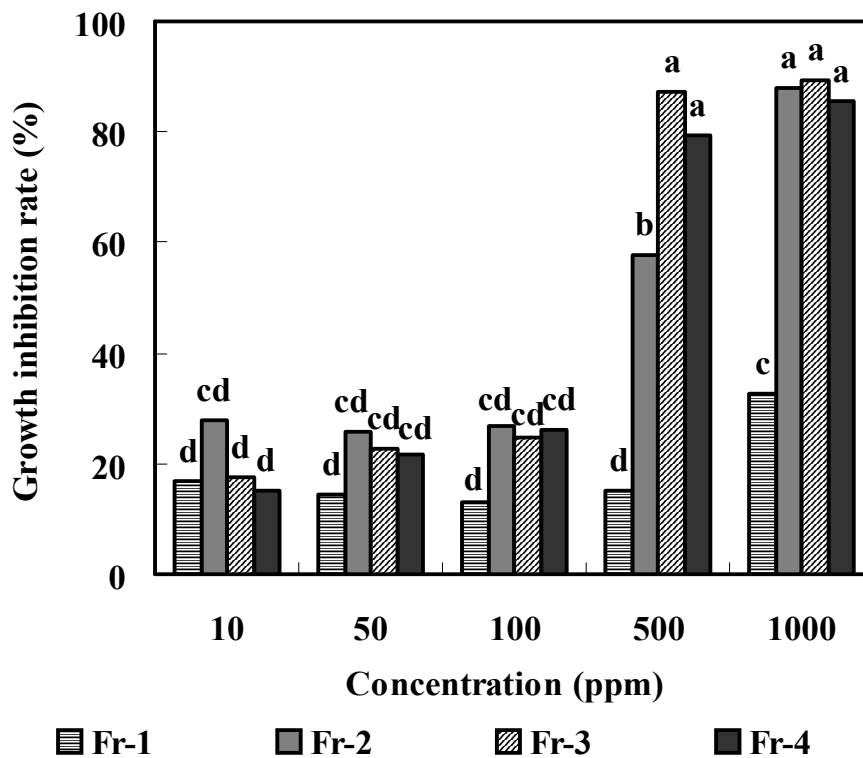


Fig. 31. Growth inhibition rate of isolated *Rhododendron mucronulatum* Flos on mouse melanoma(B16F10) by method of MTT.

Fr-1 : fraction 1

Fr-2 : fraction 2

Fr-3 : fraction 3

Fr-4 : fraction 4

Vitamin C : *L*-ascorbic acid

BHA : butylated hydroxyanisole

Values are means of 3 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$.

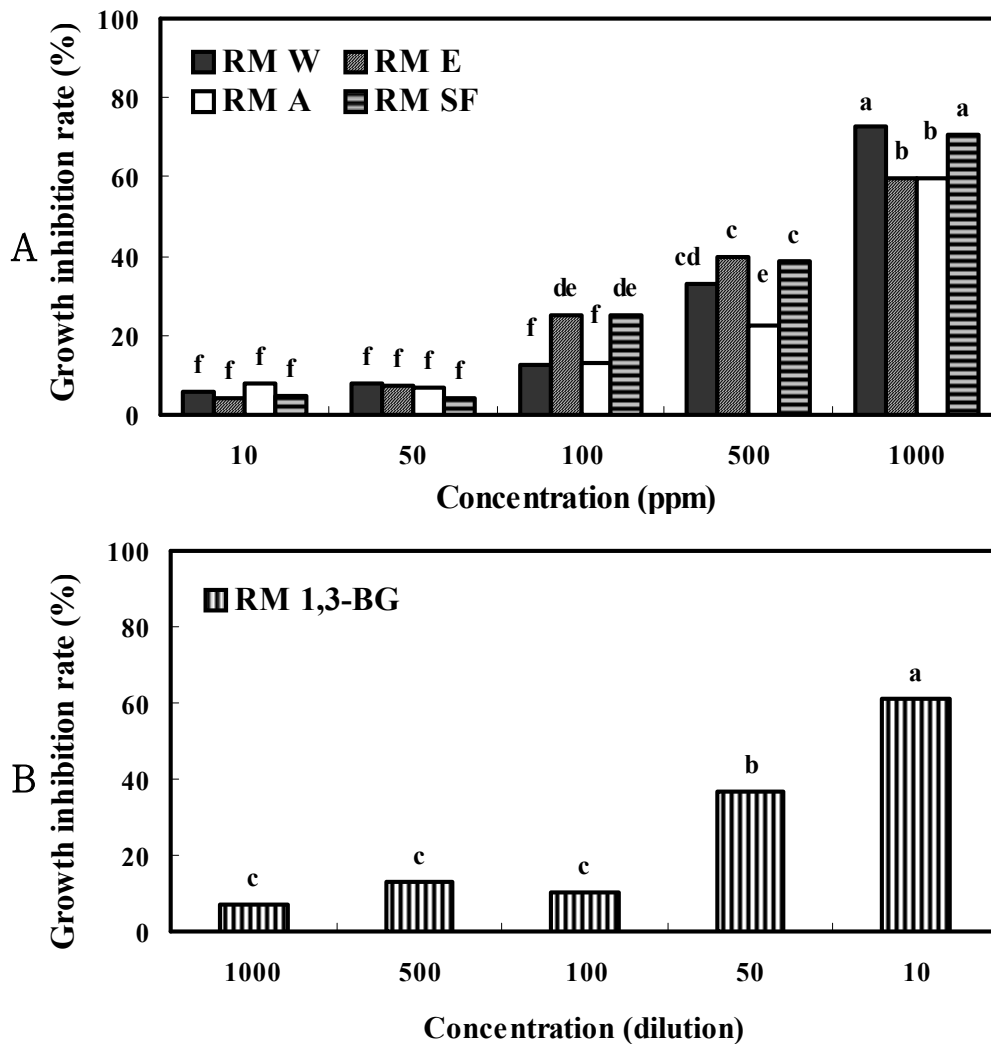


Fig. 32. Growth inhibition rate of *Rhododendron mucronulatum* Flos extracts on mouse melanoma(B16F10) by method of SRB.

RM W : *Rhododendron mucronulatum* Flos water extract

RM E : *Rhododendron mucronulatum* Flos ethanol extract

RM A : *Rhododendron mucronulatum* Flos acetone extract

RM SF: *Rhododendron mucronulatum* Flos supercritical fluid extract

RM 1,3-BG : *Rhododendron mucronulatum* Flos 1,3-butylene glycol extract

Values are means of 3 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$.

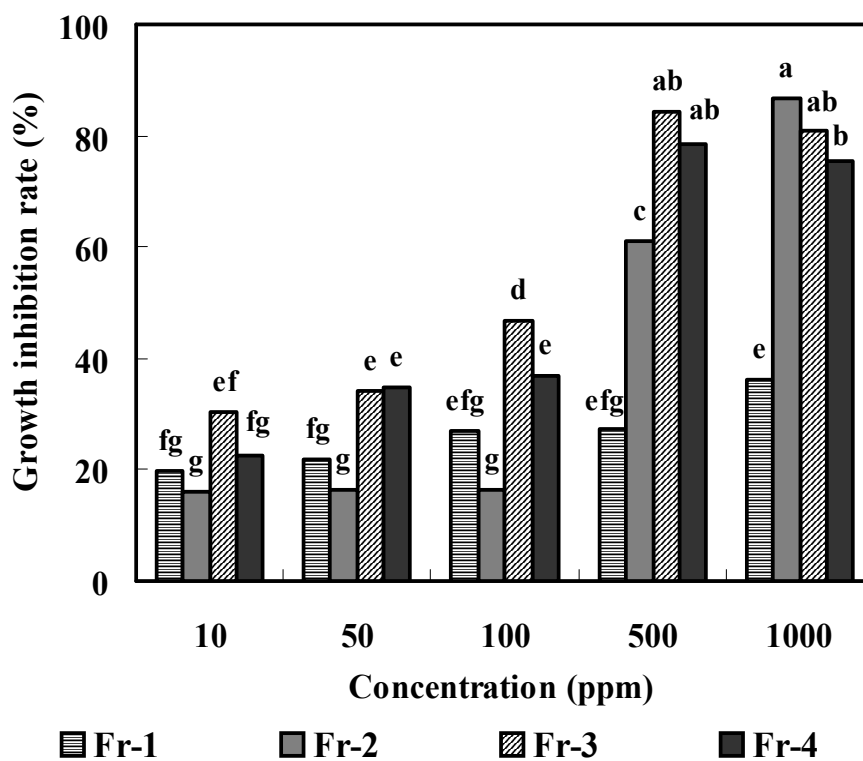


Fig. 33. Growth inhibition rate of isolated *Rhododendron mucronulatum* Flos on mouse melanoma(B16F10) by method of SRB.

Fr-1 : fraction 1

Fr-2 : fraction 2

Fr-3 : fraction 3

Fr-4 : fraction 4

Vitamin C : *L*-ascorbic acid

BHA : butylated hydroxyanisole

Values are means of 3 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$.

7. 항균 효과 측정 결과

가. 생육 저해환(Clear zone) 확인

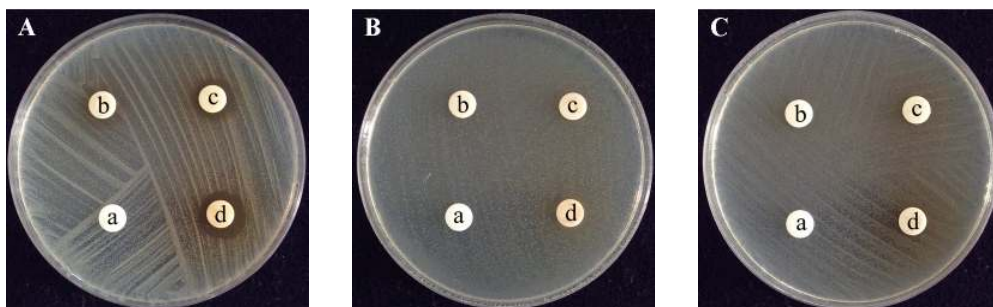
진달래 추출물 및 진달래 분획물의 항균 효과를 검토하기 위하여, 피부상재균인 *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* 및 *Staphylococcus epidermidis*에 대한 생육 저해환 형성을 관찰한 결과를 Table 10~14 및 Fig. 34~42와 같이 나타내었다. 진달래 추출물들의 항균 활성을 측정한 결과, 열수 추출물에서 시료 농도 0.5 mg/disc와 1 mg/disc에서 각각 *S. aureus*는 12.0 mm, 18.4 mm였으며 *S. epidermidis*의 경우 1 mg/disc에서 9.02 mm를 나타내었으며 진달래꽃 에탄올 추출물의 경우, 시료 농도 0.5 mg/disc와 1 mg/disc에서 *S. aureus*는 각각 13.0 mm, 13.2 mm였으며 *S. epidermidis*의 경우 1 mg/disc에서 17.4 mm로 우수한 항균 활성을 나타내었다. 진달래꽃 아세톤 추출물의 경우 *S. epidermidis*를 제외한 균에서 항균활성이 나타나지 않았으며 초임계 추출물의 경우, 시료 농도 0.5 mg/disc와 1 mg/disc에서 *S. aureus*는 9.0 mm, 11.6 mm였으며 *S. epidermidis*에서는 0.5 mg/disc와 1 mg/disc에서 각각 11.5 mm, 16.1 mm로 항균 활성이 나타났다. 열수와 에탄올 추출물에서는 *S. aureus*의 항균 활성이 강하게 나타난 반면 아세톤과 초임계 추출법에서는 *S. epidermidis*에 대한 항균활성이 강하게 나타났다. 1,3-BG 추출물의 경우, *S. aureus*와 *S. epidermidis*에서 각각 9.2, 10.0 mm로 낮은 활성을 나타내었다. 진달래꽃 분획물의 경우 Fr-1은 모든 균에서 항균 활성이 나타나지 않았으며, Fr-2는 고농도인 1 mg/disc에서 *S. epidermidis*만이 13.0 mm 정도의 항균 활성을 나타내었다. 진달래꽃 Fr-3 분획물의 경우 1 mg/disc의 농도에서 각각 *S. aureus*는 13.5 mm를 *S. epidermidis*는 25 mm의 높은 활성을 나타내었으며 분획물 Fr-4의 경우 *E. coli*에서 9.7 mm 정도의 약한 항균 활성이 나타났으며 모든 농도에서 *S. aureus*와 *S. epidermidis*에 대한 항균활성을 나타내었다. 항균효과의 측정결과 진달래 추출물은 *Escherichia coli*에 대한 항균 활성이 나타나지 않았다. 또한 진달래꽃 분획물이 진달래꽃 추출물에 높은 항균 활성을 나타내었으며, *S. aureus*균 보다는 *S. epidermidis*에 대한 항균활성이 높게 나타났다. 이는 이 등¹⁰³⁾의 추출방법에 따른 감귤과피 추출물의 항균 효과에 대한 보고에서 10% 감귤 과피 추출물이 *S. aureus* 22.0 mm의 항균활성을 나타내어 진달래꽃 추출물 및 분획물이 항균활성이 우수하다는 것을 알 수 있었으며, 김

등¹⁰⁴⁾의 동백나무(*Camellia japonica* L.) 잎 추출물이 *S. aureus*균 항균 활성은 진달래꽃 추출물 및 분획물과 유사한 11 mm의 생육 저해환을 나타내었다. 또한, 장 등¹⁰⁵⁾의 암대극(*Euphorbia jolkini* Boiss) 추출물의 *S. epidermidis*균에 대한 항균활성 측정한 결과 암대극 핵산 및 부탄올 추출물이 각각 20 mm, 18 mm로 나타나 진달래꽃 Fr-3 분획물의 항균활성이 우수함을 알 수 있었다.

Table 10. Antimicrobial activity of *Rhododendron mucronulatum* Flos extracts on several microorganisms

Strains	water extract (mg/disc)			ethanol extract (mg/disc)		
	0.25	0.5	1	0.25	0.5	1
<i>Escherichia coil</i> KCTC 1039	– ^a	–	–	–	–	–
<i>Staphylococcus aureus</i> KCTC 1621	–	12.0 ± 0.25 ^b	18.4 ± 0.17	12.1 ± 0.45	13.0 ± 0.11	13.2 ± 0.23
<i>Staphylococcus epidermidis</i> KCTC 1917	–	–	9.02 ± 0.15	–	10.1 ± 0.10	17.4 ± 0.20

*a: no inhibition, b: inhibition zone diameter (mm).



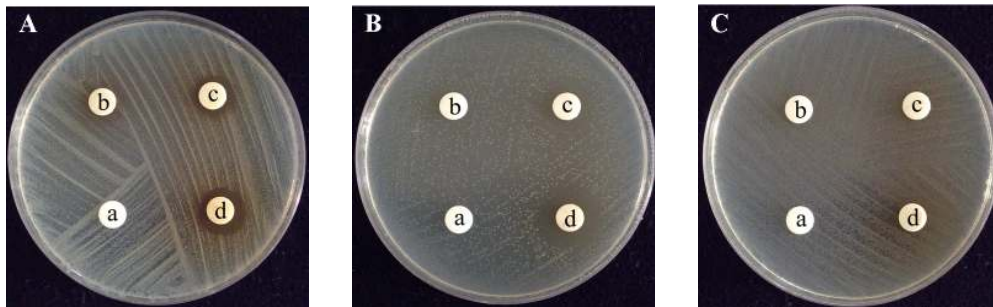
a : 0 mg/disc, b : 0.25 mg/disc, c : 0.5 mg/disc, d : 1 mg/disc

Fig. 34. Antimicrobial activity of *Rhododendron mucronulatum* Flos water extract on several microorganisms.

A : *Staphylococcus aureus* KCTC 1621

B : *Staphylococcus epidermidis* KCTC 1917

C : *Escherichia coli* KCTC 1039



a : 0 mg/disc, b : 0.25 mg/disc, c : 0.5 mg/disc, d : 1 mg/disc

Fig. 35. Antimicrobial activity of *Rhododendron mucronulatum* Flos ethanol extract on several microorganisms.

A : *Staphylococcus aureus* KCTC 1621

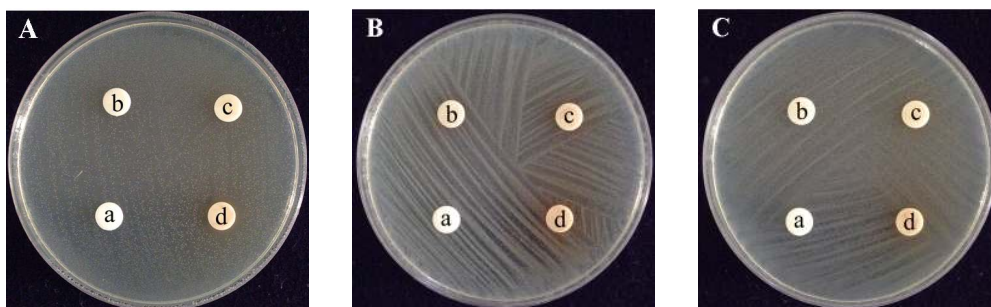
B : *Staphylococcus epidermidis* KCTC 1917

C : *Escherichia coli* KCTC 1039

Table 11. Antimicrobial activity of *Rhododendron mucronulatum* Flos extracts on several microorganisms

Strains	acetone extract (mg/disc)			supercritical fluid extract (mg/disc)		
	0.25	0.5	1	0.25	0.5	1
<i>Escherichia coil</i> KCTC 1039	– ^a	–	–	–	–	–
<i>Staphylococcus aureus</i> KCTC 1621				–	9.0 ± 0.11 ^b	11.6 ± 0.36
<i>Staphylococcus epidermidis</i> KCTC 1917	–		11.2 ± 0.13	–	11.5 ± 0.43	16.1 ± 0.27

*a: no inhibition, b: inhibition zone diameter (mm).



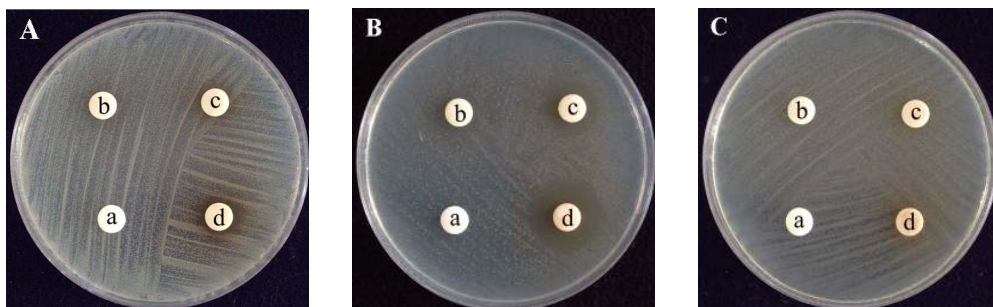
a : 0 mg/disc, b : 0.25 mg/disc, c : 0.5 mg/disc, d : 1 mg/disc

Fig. 36. Antimicrobial activity of *Rhododendron mucronulatum* Flos acetone extract on several microorganisms.

A : *Staphylococcus aureus* KCTC 1621

B : *Staphylococcus epidermidis* KCTC 1917

C : *Escherichia coli* KCTC 1039



a : 0 mg/disc, b : 0.25 mg/disc, c : 0.5 mg/disc, d : 1 mg/disc

Fig. 37. Antimicrobial activity of *Rhododendron mucronulatum* Flos supercritical fluid extract on several microorganisms.

A : *Staphylococcus aureus* KCTC 1621

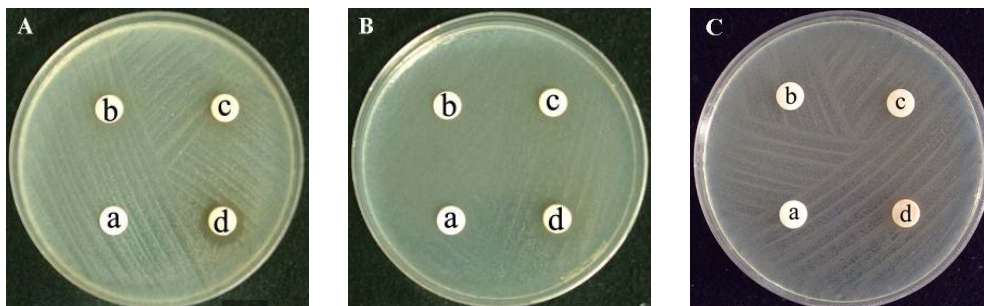
B : *Staphylococcus epidermidis* KCTC 1917

C : *Escherichia coli* KCTC 1039

Table 12. Antimicrobial activity of *Rhododendron mucronulatum* Flos extract on several microorganisms

Strains	1, 3-butylene glycol extract (mg/disc)		
	0.25	0.5	1
<i>Escherichia coli</i> KCTC 1039	– ^a	–	–
<i>Staphylococcus aureus</i> KCTC 1621	–	–	9.2 ± 0.11 ^b
<i>Staphylococcus epidermidis</i> KCTC 1917	–	–	10.0 ± 0.21

*a: no inhibition, b: inhibition zone diameter (mm).



a : 0 mg/disc, b : 0.25 mg/disc, c : 0.5 mg/disc, d : 1 mg/disc

Fig. 38. Antimicrobial activity of *Rhododendron mucronulatum* Flos 1,3-butylene glycol extract on several microorganisms.

A : *Staphylococcus aureus* KCTC 1621

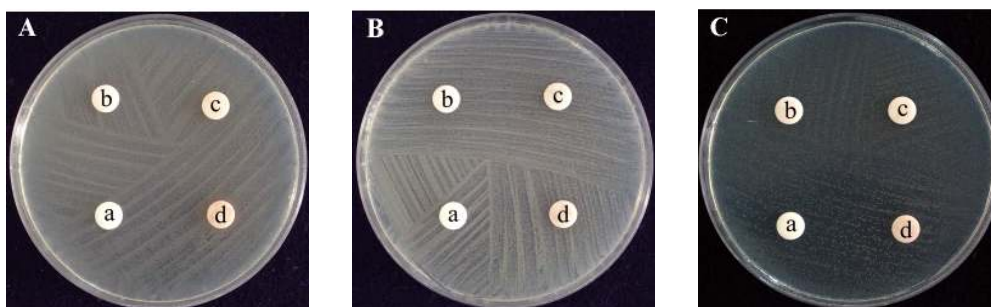
B : *Staphylococcus epidermidis* KCTC 1917

C : *Escherichia coli* KCTC 1039

Table 13. Antimicrobial activity of isolated *Rhododendron mucronulatum* Flos on several microorganisms

Strains	Fr-1 (mg/disc)			Fr-2 (mg/disc)		
	0.25	0.5	1	0.25	0.5	1
<i>Escherichia coil</i> KCTC 1039	- ^a	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> KCTC 1621	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> KCTC 1917	-	-	-	-	-	13.0 ± 0.23 ^b

*a: no inhibition, b: inhibition zone diameter (mm).



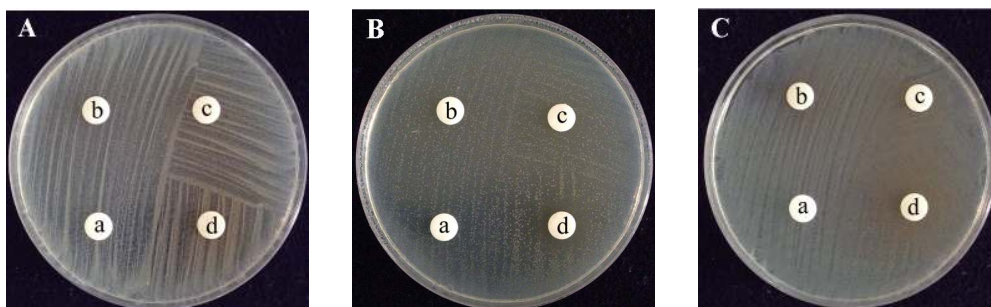
a : 0 mg/disc, b : 0.25 mg/disc, c : 0.5 mg/disc, d : 1 mg/disc

Fig. 39. Antimicrobial activity of isolated *Rhododendron mucronulatum* on several microorganisms (Fr. 1).

A : *Staphylococcus aureus* KCTC 1621

B : *Staphylococcus epidermidis* KCTC 1917

C : *Escherichia coli* KCTC 1039



a : 0 mg/disc, b : 0.25 mg/disc, c : 0.5 mg/disc, d : 1 mg/disc

Fig. 40. Antimicrobial activity of isolated *Rhododendron mucronulatum* Flos on several microorganisms (Fr. 2).

A : *Staphylococcus aureus* KCTC 1621

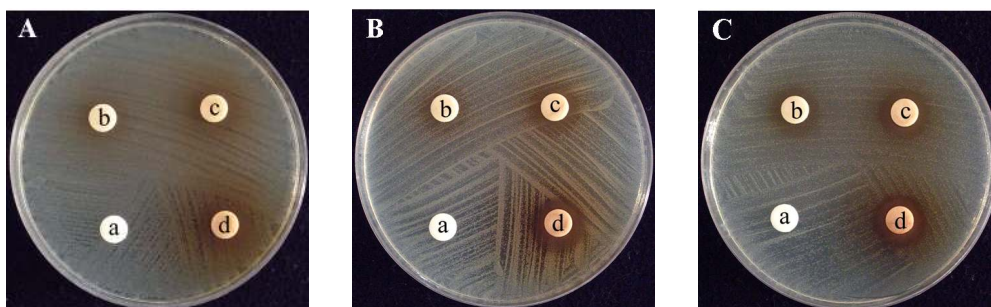
B : *Staphylococcus epidermidis* KCTC 1917

C : *Escherichia coli* KCTC 1039

Table 14. Antimicrobial activity of isolated *Rhododendron mucronulatum* Flos on several microorganisms

Strains	Fr-3 (mg/disc)			Fr-4 (mg/disc)		
	0.25	0.5	1	0.25	0.5	1
<i>Escherichia coil</i> KCTC 1039	- ^a	-	-	-	-	9.7 ± 0.12 ^b
<i>Staphylococcus aureus</i> KCTC 1621	-	-	13.5 ± 0.24	9.0 ± 0.05	11.0 ± 0.17	13.2 ± 0.15
<i>Staphylococcus epidermidis</i> KCTC 1917	-	20.0 ± 0.13	25.1 ± 0.17	15.2 ± 0.53	18.0 ± 0.3	21.3 ± 0.41

*a: no inhibition, b: inhibition zone diameter (mm).



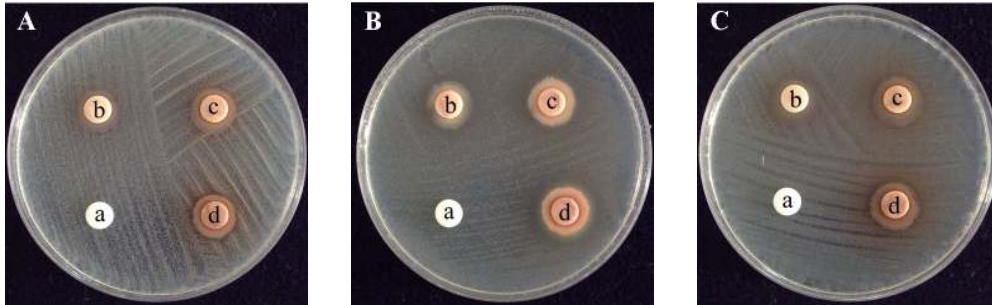
a : 0 mg/disc, b : 0.25 mg/disc, c : 0.5 mg/disc, d : 1 mg/disc

Fig. 41. Antimicrobial activity of isolated *Rhododendron mucronulatum* Flos on several microorganisms (Fr. 3).

A : *Staphylococcus aureus* KCTC 1621

B : *Staphylococcus epidermidis* KCTC 1917

C : *Escherichia coli* KCTC 1039



a : 0 mg/disc, b : 0.25 mg/disc, c : 0.5 mg/disc, d : 1 mg/disc

Fig. 42. Antimicrobial activity of isolated *Rhododendron mucronulatum* Flos on several microorganisms (Fr. 4).

A : *Staphylococcus aureus* KCTC 1621

B : *Staphylococcus epidermidis* KCTC 1917

C : *Escherichia coli* KCTC 1039

8. 진달래꽃 추출물을 첨가한 화장품의 제조

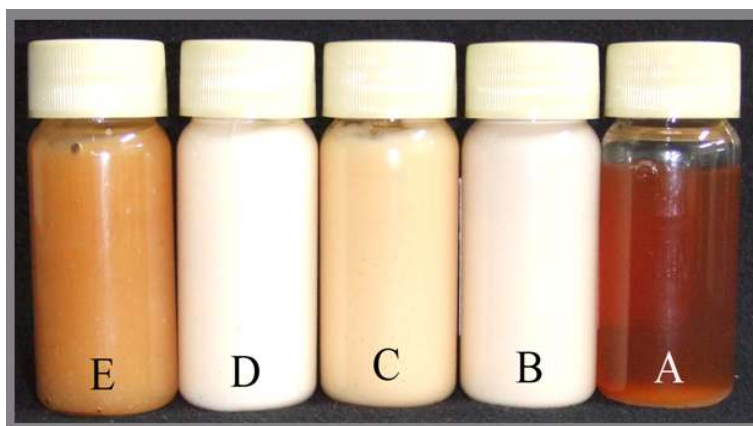
가. 진달래꽃 추출물을 첨가한 화장품의 제조

진달래꽃 추출물의 생리활성 결과를 바탕으로 추출물중 모든 실험에서 전반적으로 우수한 결과를 나타낸 진달래꽃 에탄올 추출물을 이용하여 화장품을 생산하였다. 진달래꽃 에탄올 추출물이 20,000 ppm이 첨가된 화장품을 제조한 결과 Fig. 43, 44와 같이 스킨, 에센스, 팩의 경우 진한 갈색을 띄었으나, 동일한 양을 첨가한 로션과 크림의 경우 진달래꽃 추출물 무첨가 화장품과 유사한 옅은 노란색을 나타내었다. 또한, 진달래꽃 추출물을 첨가한 스킨, 로션, 에센스, 크림, 팩을 60일 동안 실내에서 관찰한 결과, 상의 분리가 없었으며 응집이나 침전 현상 역시 일어나지 않아 안정성을 육안으로 확인할 수 있었다.



A : normal skin (20,000 ppm), B : normal lotion (20,000 ppm)
C : normal essence (20,000 ppm), D : normal cream (20,000 ppm)
E : normal pack (20,000 ppm)

Fig. 43. Photograph of the normal cosmetics.



A : RM-skin (20,000 ppm), B : RM-lotion (20,000 ppm)
C : RM-essence (20,000 ppm), D : RM-cream (20,000 ppm)
E : RM-pack (20,000 ppm)

Fig. 44. Photograph of the cosmetics containing *Rhododendron mucronulatum* Flos.

9. 진달래꽃 추출물을 첨가한 화장품의 생리활성 측정

가. 진달래꽃 추출물을 첨가한 화장품의 전자공여능 확인

진달래꽃 추출물을 화장품에 응용 시 항산화능에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 진달래꽃 추출물을 첨가한 화장품의 전자공여능을 측정한 결과 Fig. 45와 같이 나타내었다. 진달래꽃 추출물이 무첨가된 화장품의 경우 모든 농도에서 10% 미만의 낮은 효과를 나타낸 반면 진달래꽃 추출물이 첨가된 화장품인 스킨, 로션, 에센스, 크림 및 팩 모두 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 60% 이상의 전자공여능을 나타내어 진달래꽃 에탄올 추출물과 비교 시 유사한 값을 나타내었다.

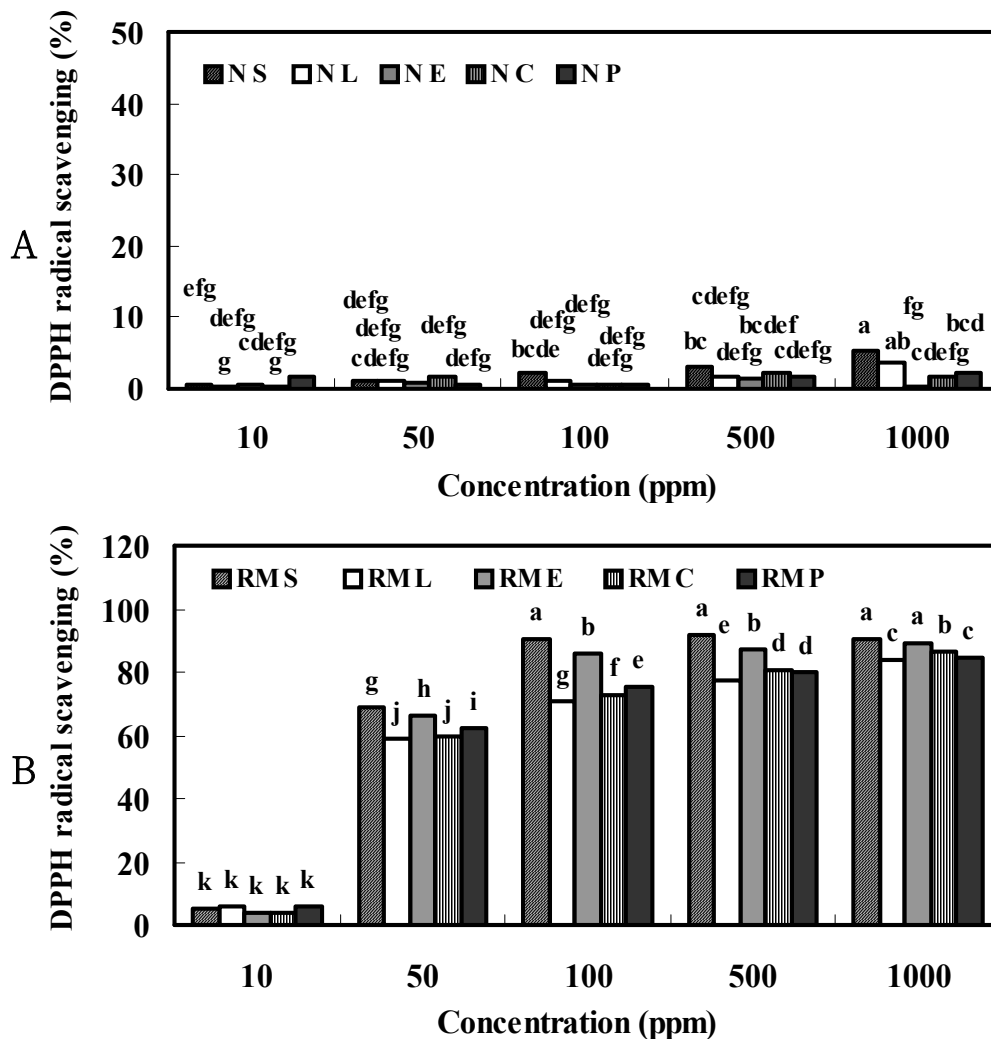


Fig. 45. DPPH radical scavenging of cosmetics containing *Rhododendron mucronulatum*

Flos.

N S : normal skin, RM S : *Rhododendron mucronulatum* Flos containing skin

N L : normal lotion, RM L : *Rhododendron mucronulatum* Flos containing lotion

N E : normal essence, RM E : *Rhododendron mucronulatum* Flos containing essence

N C : normal cream, RM C : *Rhododendron mucronulatum* Flos containing cream

N P : normal pack, RM P : *Rhododendron mucronulatum* Flos containing pack

Values are means of 3 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$.

나. 진달래꽃 추출물을 첨가한 화장품의 SOD 유사활성 검증

진달래꽃 추출물을 화장품에 응용 시, SOD 유사 활성을 통한 항산화 활성에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 진달래꽃 추출물을 넣은 화장품의 SOD 유사활성을 측정한 결과를 Fig. 46과 같이 나타내었다. 진달래꽃이 무첨가된 화장품의 모든 농도에서 10% 미만의 낮은 효과를 나타내었으나, 진달래꽃 추출물이 첨가된 스킨 및 로션, 에센스, 크림, 팩의 경우 농도가 증가할수록 유의적으로 증가하는 경향을 나타내었다 ($P < 0.05$). 하지만, 진달래꽃 추출물이 첨가된 화장품의 모든 농도에서 50% 이하의 낮은 SOD 유사활성을 나타내었다.

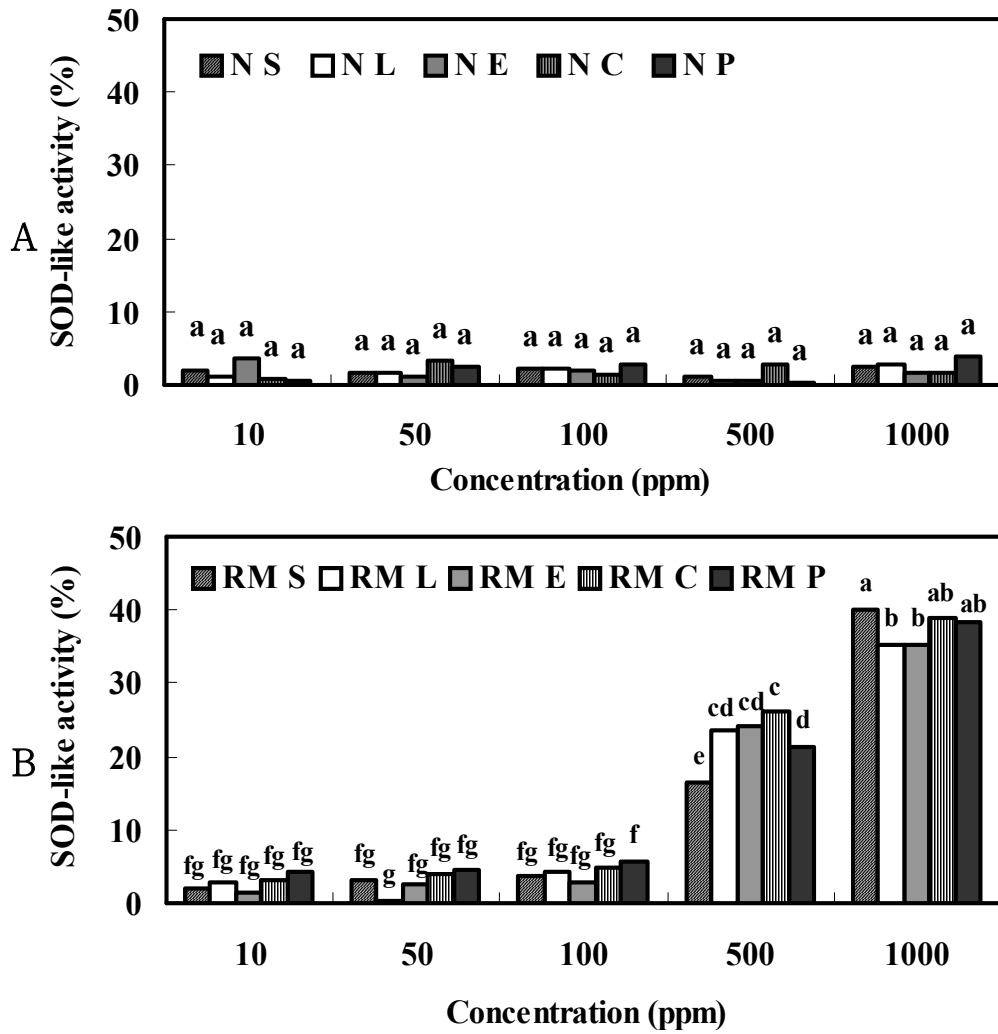


Fig. 46. SOD-like activity of cosmetic containing *Rhododendron mucronulatum*

Flos.

N S : normal skin, RM S : *Rhododendron mucronulatum* Flos containing skin

N L : normal lotion, RM L : *Rhododendron mucronulatum* Flos containing lotion

N E : normal essence, RM E : *Rhododendron mucronulatum* Flos containing essence

N C : normal cream, RM C : *Rhododendron mucronulatum* Flos containing cream

N P : normal pack, RM P : *Rhododendron mucronulatum* Flos containing pack

Values are means of 3 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$.

다. 진달래꽃 추출물을 첨가한 화장품의 xanthine oxidase 저해활성 확인

진달래꽃 추출물의 화장품 응용 가능성을 판단하기 위해 진달래꽃 추출물을 함유한 화장품의 xanthine oxidase 저해활성을 측정한 결과를 Fig. 47과 같이 나타냈다. 진달래꽃 추출물을 무첨가한 노말 화장품의 모든 농도에서 10% 미만의 효과를 나타내었으나, 진달래꽃 추출물이 함유된 로션을 제외한 스킨, 에센스, 크림, 팩이 1 mg/mL의 농도에서 60% 이상의 xanthine oxidase 저해활성을 나타내었다. 이는 동일한 농도의 진달래꽃 에탄올 추출물의 xanthine oxidase 저해활성과 유사한 값으로서 진달래 추출물의 첨가에 의해 진달래꽃 추출물이 무첨가된 화장품과의 유의적 차이가 나타났다 ($P < 0.05$).

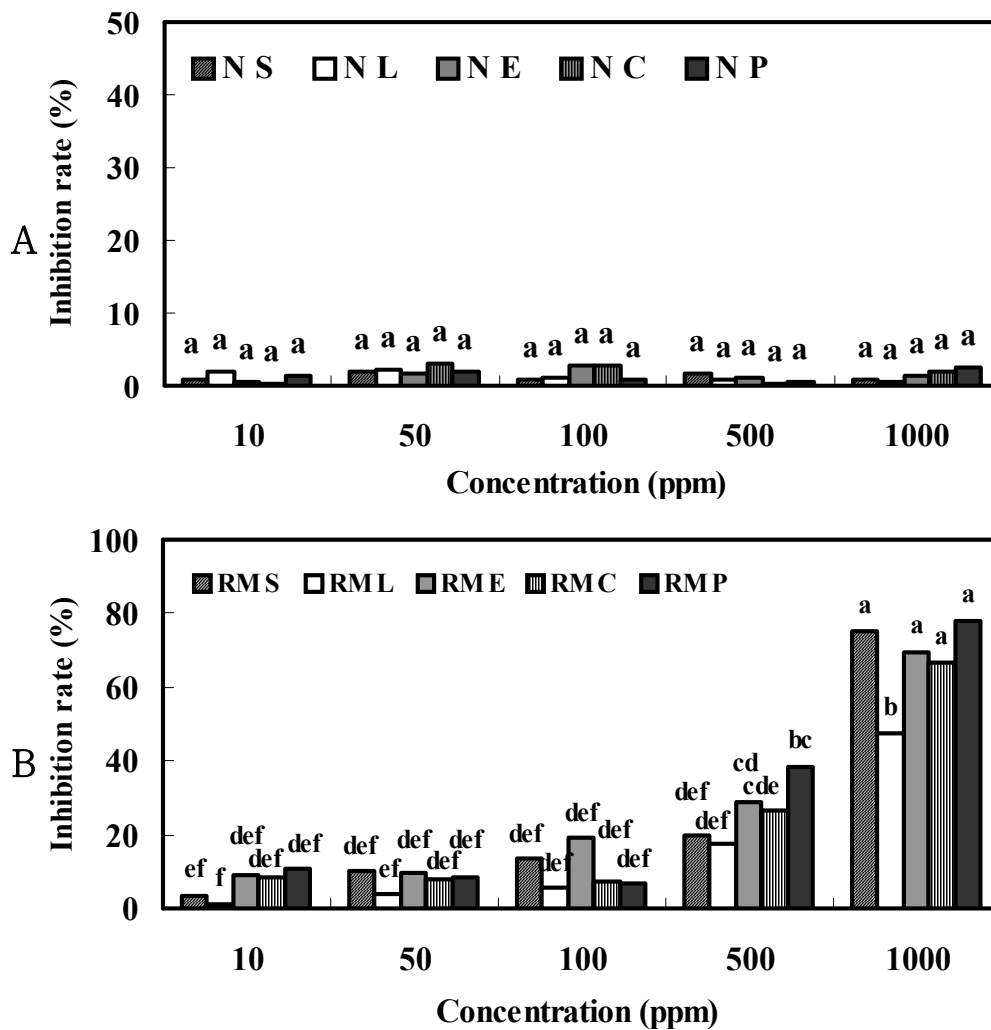


Fig. 47. Inhibition rate of cosmetic containing *Rhododendron mucronulatum* Flos on xanthine oxidase.

N S : normal skin, RM S : *Rhododendron mucronulatum* Flos containing skin

N L : normal lotion, RM L : *Rhododendron mucronulatum* Flos containing lotion

N E : normal essence, RM E : *Rhododendron mucronulatum* Flos containing essence

N C : normal cream, RM C : *Rhododendron mucronulatum* Flos containing cream

N P : normal pack, RM P : *Rhododendron mucronulatum* Flos containing pack

Values are means of 3 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$.

라. 진달래꽃 추출물을 첨가한 화장품의 Fe^{2+} , Cu^{2+} 의 첨가에 따른 지방산패 억제 능 확인

진달래꽃 추출물을 첨가한 화장품의 지방산패 억제 효과를 측정하기 위해 산화촉진제인 Fe^{2+} , Cu^{2+} 이온첨가에 따른 지방산패 억제능에 대한 결과를 Fig. 48, 49와 같이 나타내었다. 진달래꽃 무첨가군의 경우, 모든 농도에서 Fe^{2+} , Cu^{2+} 를 첨가한 양쪽 모두 10% 이하의 낮은 억제능을 나타낸 반면, 진달래꽃 추출물이 함유된 스킨의 경우에서 Fe^{2+} 를 첨가한 군과 Cu^{2+} 를 첨가한 군 모두 40% 이상의 억제능을 나타내었다. 또한, Fe^{2+} 를 첨가한 지방산패 억제능의 경우 진달래꽃 추출물을 첨가한 로션, 팩의 시료 농도 1 mg/mL에서 30% 정도의 지방산패도 저해능을 나타내었다. 하지만, Cu^{2+} 를 첨가한 지방산패 억제능에서는 진달래꽃 추출물을 첨가한 로션, 에센스, 크림, 팩의 모든 농도에서 진달래꽃 무첨가군과 동일한 10% 미만의 낮은 저해활성을 나타내었다. 이는 화장품을 제조할 때 사용된 지질성분 Fe^{2+} , Cu^{2+} 에 의한 산화가 다른 방해 요인으로 작용했을 것으로 사료된다.

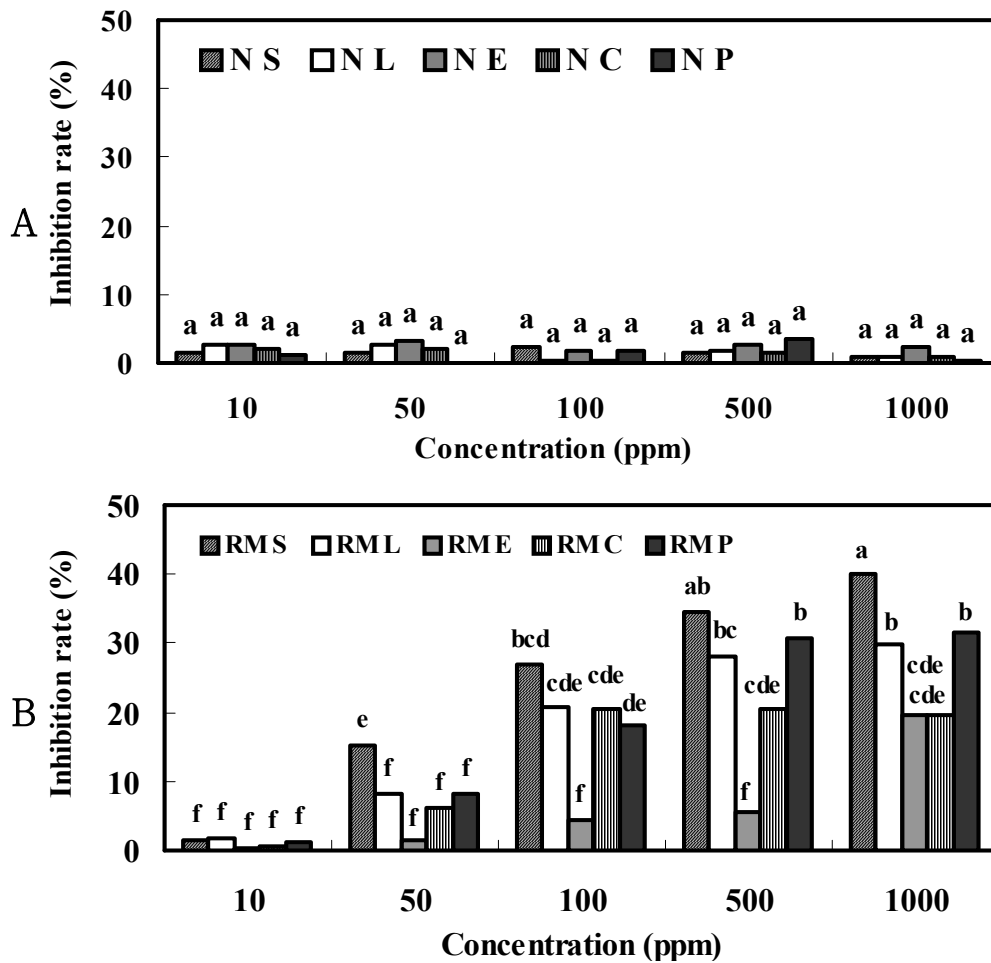


Fig. 48. Effect of cosmetic containing *Rhododendron mucronulatum* Flos on lipid oxidation in the presence of ferrous ion(Fe^{2+}).

NS : normal skin, RMS : *Rhododendron mucronulatum* Flos containing skin
 NL : normal lotion, RML : *Rhododendron mucronulatum* Flos containing lotion
 NE : normal essence, RME : *Rhododendron mucronulatum* Flos containing essence
 NC : normal cream, RMC : *Rhododendron mucronulatum* Flos containing cream
 NP : normal pack, RMP : *Rhododendron mucronulatum* Flos containing pack

Values are means of 3 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$.

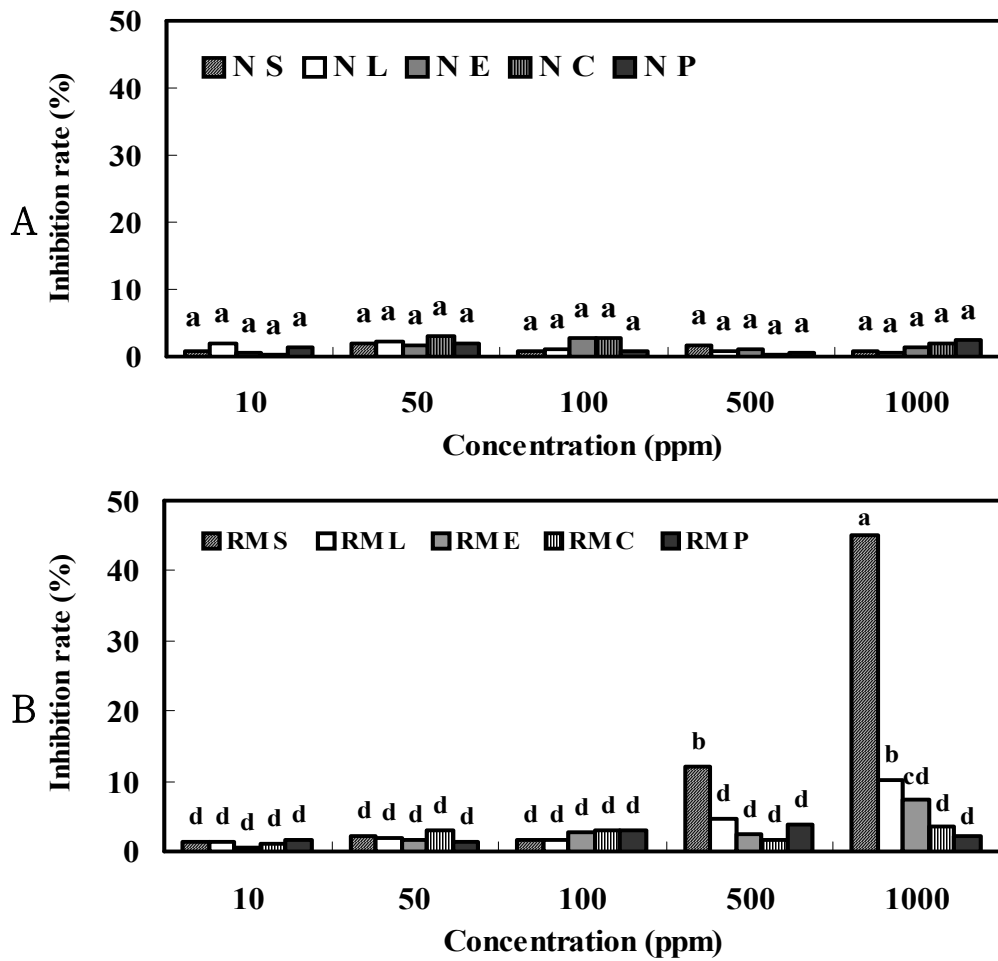


Fig. 49. Effect of cosmetic containing *Rhododendron mucronulatum* Flos on lipid oxidation in the presence of copper ion(Cu^{2+}).

NS : normal skin, RMS : *Rhododendron mucronulatum* Flos containing skin
 NL : normal lotion, RML : *Rhododendron mucronulatum* Flos containing lotion
 NE : normal essence, RME : *Rhododendron mucronulatum* Flos containing essence
 NC : normal cream, RMC : *Rhododendron mucronulatum* Flos containing cream
 NP : normal pack, RMP : *Rhododendron mucronulatum* Flos containing pack

Values are means of 3 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$.

10. 진달래꽃 추출물을 첨가한 화장품의 미백효과 측정

가. Tyrosinase 저해활성 확인

진달래꽃 추출물을 화장품에 응용 시 피부 미백효과에 미치는 영향을 알아보기 위하여 진달래꽃 추출물을 넣은 화장품의 tyrosinase 저해활성을 측정한 결과를 Fig. 50과 같이 나타내었다. 그 결과 진달래꽃이 무첨가된 화장품은 모든 농도에서 10% 이하의 낮은 활성을 나타내었다. 진달래꽃 추출물이 첨가된 화장품의 모든 농도에서 30% 미만의 tyrosinase 저해활성을 나타내었다.

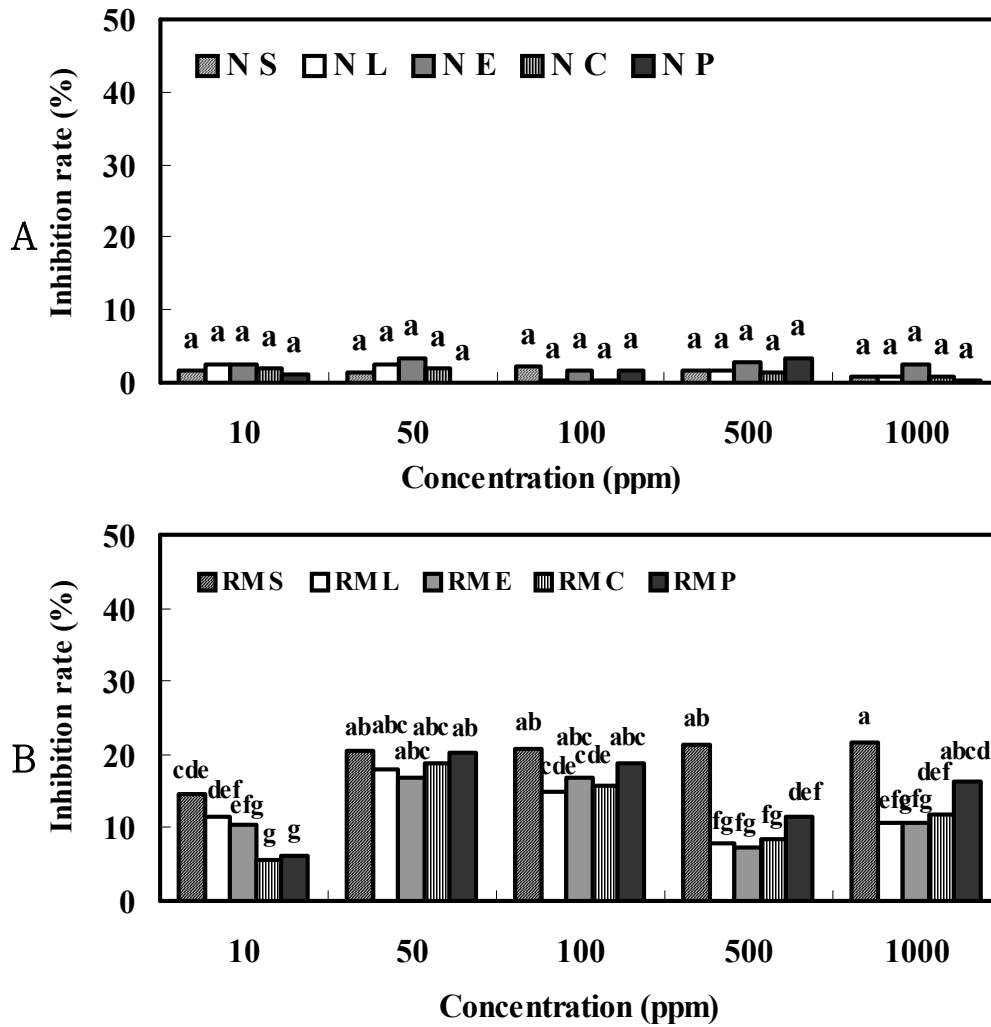


Fig. 50. Inhibition rate of cosmetic containing *Rhododendron mucronulatum* Flos on tyrosinase.

NS : normal skin, RMS : *Rhododendron mucronulatum* Flos containing skin
 NL : normal lotion, RML : *Rhododendron mucronulatum* Flos containing lotion
 NE : normal essence, RME : *Rhododendron mucronulatum* Flos containing essence
 NC : normal cream, RMC : *Rhododendron mucronulatum* Flos containing cream
 NP : normal pack, RMP : *Rhododendron mucronulatum* Flos containing pack

Values are means of 3 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$.

11. 진달래꽃 추출물을 첨가한 화장품의 안정성 측정

가. 진달래꽃 추출물이 첨가된 화장품의 pH 측정 결과

진달래꽃 추출물이 첨가된 화장품의 pH 측정 결과, Fig. 51과 같이 나타났다. 진달래꽃 추출물을 첨가한 스킨과 진달래꽃 추출물이 무첨가된 스킨의 경우 각각 $\text{pH } 5.0 \pm 0.16$, 5.3 ± 0.17 로 60일 동안 큰 변동 없이 안정함을 나타내었다. 또한, 진달래꽃 추출물을 첨가한 로션, 에센스, 크림, 팩의 경우 $\text{pH } 5.41 \pm 0.21$, 5.8 ± 0.32 , 5.3 ± 0.81 , 5.9 ± 0.07 로 나타났으며 진달래꽃 추출물이 무첨가된 로션, 에센스, 크림, 팩의 경우에서도 각각 $\text{pH } 6.1 \pm 0.08$, 6.47 ± 0.14 , 5.3 ± 0.12 , 6.4 ± 0.16 으로 나타났다. 스킨, 로션 에센스, 팩의 경우에는 진달래꽃 추출물이 첨가된 화장품이 진달래꽃 추출물이 첨가되지 않은 화장품에 비해 낮은 pH 값을 나타내었으나, 진달래꽃 추출물을 첨가한 화장품과 진달래꽃 무첨가된 화장품 모두 pH 7.0을 넘지 않는 약산성의 pH 분포를 나타내었다. 진달래꽃 추출물을 함유한 크림의 경우 진달래꽃 추출물이 무첨가된 크림과는 달리 30일차까지 pH가 증가함을 나타내었으나, 역시 pH 7.0을 넘지 않는 pH 분포를 나타내었다.

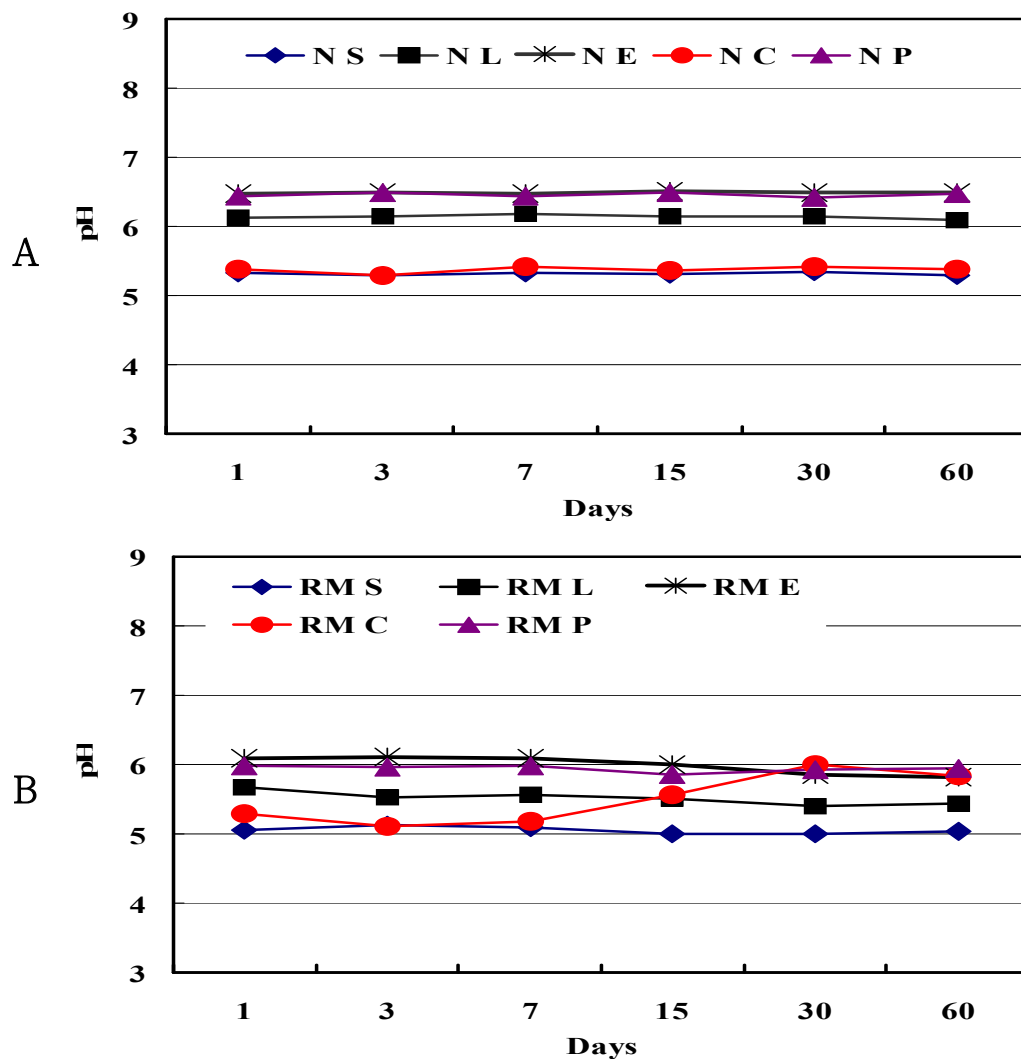


Fig. 51. pH change of the cosmetic containing *Rhododendron mucronulatum* Flos.

A: normal cosmetics, B : *R. mucronulatum* Flos containing cosmetics.

N S : normal skin, RM S : *R. mucronulatum* Flos containing skin.

N L : normal lotion, RM L : *R. mucronulatum* Flos containing lotion.

N E : normal essence, RM E : *R. mucronulatum* Flos containing essence.

N C : normal cream, RM C : *R. mucronulatum* Flos containing cream.

N P : normal pack, RM P : *R. mucronulatum* Flos containing pack.

나. 진달래꽃이 첨가된 화장품의 점도 측정 결과

진달래꽃 추출물이 첨가된 화장품의 점도 측정 결과, Fig. 52와 같이 나타났다. 진달래꽃이 무첨가된 로션, 에센스, 크림, 팩의 경우 각각 56,188~58,988 cP, 47,690~50,690 cP, 66,980~67,690 cP, 86,990~88,690 cP로 60일차까지 큰 변동 없이 안정한 경향을 보이고 있으며, 진달래꽃 추출물이 첨가된 로션, 에센스, 크림, 팩의 경우에는 18,896~21,069 cP, 21,195~24,125 cP, 25,994~31,393 cP, 34,994~36,692 cP로 60일차까지 측정한 결과, 무첨가한 화장품과 동일하게 점도가 큰 변동 없이 안정한 경향을 보이고 있다. 또한 진달래꽃 추출물을 첨가한 화장품이 진달래꽃 추출물이 무첨가된 화장품보다 더 낮은 점도를 나타내었는데, 이는 진달래꽃 추출물이 화장품의 제형에서 점도를 저하시키는 역할을 한 것으로 사료된다. 그러나 60일 동안 분리, 변색, 변취 및 산패 등의 변화 없이 외부적으로 안정함을 보였다.

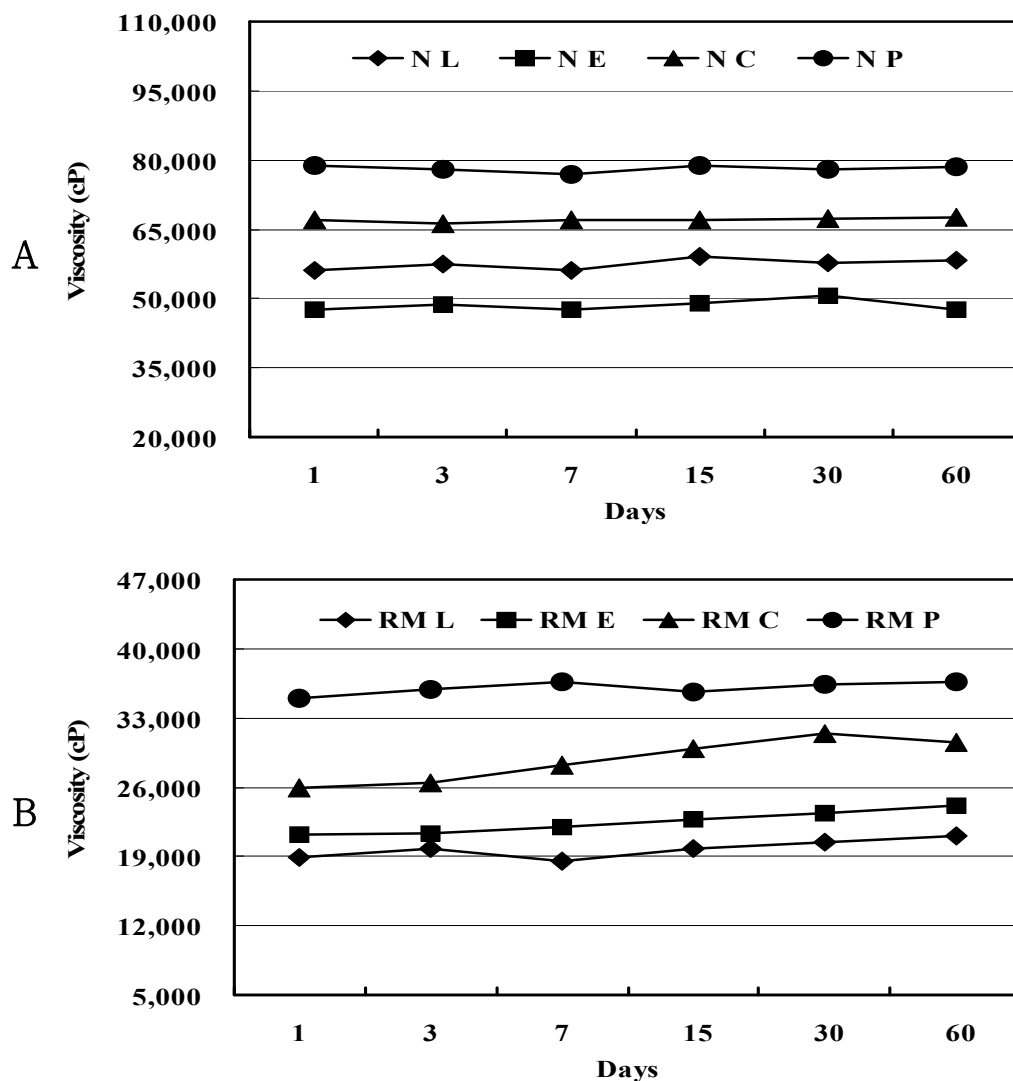


Fig. 52. Viscosity change of the cosmetic containing *Rhododendron mucronulatum* Flos.

A: normal cosmetics, B : *R. mucronulatum* Flos containing cosmetics.

N L : normal lotion, R M L : *R. mucronulatum* Flos containing lotion.

N E : normal essence, R M E : *R. mucronulatum* Flos containing essence.

N C : normal cream, R M C : *R. mucronulatum* Flos containing cream.

N P : normal pack, R M P : *R. mucronulatum* Flos containing pack.

다. 일반적 보존 시험

1) 온도 (Incubation)에 따른 안정성

화장품의 열화(劣化)현상으로 인한 화학적·물리적 변화를 알아보기 위해서 온도 안정성 평가를 실시한 결과를 Table 15와 같이 나타내었다. 고온(40℃)에서는 외관의 산패, 변색, 변취, 점도, 증발, 부유, 침전, 탁도(투명도), 분리 등을 관찰하였고, 저온에서는 응고, 침전, 탁도(투명도), 결정 석출, 분리 등의 변화를 관찰하였다. 0, 25, 40℃의 온도에 보관한 진달래꽃 추출물을 첨가한 스킨, 로션, 에센스, 크림, 팩의 화장품은 60일 동안 모든 온도 조건에서 외관의 변색, 변취, 분리 없이 안정함을 나타내었다.

Table 15. Result of stability test of the cosmetic containing *Rhododendron mucronulatum* Flos in constant temperature conditions(0, 25, 40 °C)

Day Temp.	1	3	5	7	15	30	60
0°C	0	0	0	0	0	0	0
25°C	0	0	0	0	0	0	0
40°C	0	0	0	0	0	0	0

O : Stable X : Unstable

2) 광안정성

가) 인공광 (Artificial sun lamp) 노출

화장품은 출시 후 직접 또는 간접적으로 태양광과 형광등의 빛에 노출됨으로 빛에 대한 물리·화학적으로 품질의 특성이 변하는 것을 사전에 조사하여 미연에 방지하기 위하여 광안정성 실험을 실시한다. 진달래꽃 추출물을 첨가한 스킨, 로션, 에센스, 크림, 팩의 인공광에 대한 안정성을 실시한 결과를 Table 16과 같이 나타냈다. 1시간 동안의 변색, 발색, 변취, 산패 등의 변화를 육안으로 관찰하였는데 모두 안정함을 나타내었다.

나) 자연광 노출

진달래꽃 추출물을 함유한 화장품과 진달래꽃 추출물을 함유하지 않은 화장품을 햇빛이 잘 드는 실외에 보관하여 7, 15일 동안의 색조변화 및 냄새 변화를 관찰한 결과를 Table 17과 같이 나타내었다. 진달래꽃 추출물을 함유하지 않은 화장품은 색조변화 와 냄새 변화 모두 안정함을 나타내었다. 진달래꽃 추출물을 함유한 스킨, 로션, 에센스, 크림, 팩의 경우 변취는 나타나지 않았으나, 진달래꽃 추출물이 20,000 ppm 첨가된 로션과 에센스, 크림 3종류에서 15일차 보관 시 색의 분리를 나타내었다. 이것으로 보아 진달래꽃을 함유한 로션, 에센스, 크림을 상품화 할 시, 진달래 추출물의 함유량을 줄여 광안정성을 증대시키거나 광을 차단하는 차광용기를 이용하는 것이 안전할 것으로 사료된다.

Table 16. Results of artificial sun lamp test of the cosmetic containing *Rhododendron mucronulatum* Flos

Temperature : 40°C					
Distance from light source : 20.3 cm					
Storage 3 hours					
Condition	Skin	Lotion	Essence	Cream	Pack
Stability	O	O	O	O	O

O : Color unchanged X : Color changed

Table 17. Results of sun test of the cosmetic containing *Rhododendron mucronulatum* Flos

Sample	7 day		15 day	
	Discoloration	Smell change	Discoloration	Smell change
Sample (無)	O	O	O	O
¹ RM S	O	O	O	O
² RM L	O	O	X	O
³ RM E	O	O	X	O
⁴ RM C	O	O	X	O
⁵ RM P	O	O	O	O

O : Color unchanged X : Color changed

¹ RM S : *Rhododendron mucronulatum* Flos containing skin

² RM L : *Rhododendron mucronulatum* Flos containing lotion

³ RM E : *Rhododendron mucronulatum* Flos containing essence

⁴ RM C : *Rhododendron mucronulatum* Flos containing cream

⁵ RM P : *Rhododendron mucronulatum* Flos containing pack

3) 특수·가혹 보존 시험

가) 온도순환 (Cycle chamber)에 따른 안정성

온도순환 (Cycle chamber)에 따른 안정성 시험법은 4계절의 변화에 따른 화장품의 물성변화를 체크하는 것으로서 저온 및 고온의 보관조건에 따른 화장품의 변화를 관찰하기 위하여 실시하며 또한, 다양한 온도 변화에 따른 유화·가용화 제품에 대한 물성변화를 관찰하기 위하여 실시한다. 제품의 대부분은 40℃ 이상의 고온에서 가수분해 현상 등이 일어나며, 저온인 경우는 부피팽창, 용해도 차에 의한 계면막 손상, 침전 등이 일어난다. 온도순환 (Cycle chamber)에 따른 안정성 시험법은 이런 현상을 짧은 기간 내에 체크할 수 있다.

진달래꽃 추출물이 첨가된 스킨, 로션, 에센스, 크림, 팩을 -15, -10, -5, 0, 5, 10, 15, 25, 37.5, 40℃에서 각각 24시간 보관한 후 온도 순환에 따른 안정성을 관찰한 결과, 10 cycle 모두에서 상의 분리와 변색, 변취, 침전 없이 안정함을 육안으로 확인할 수 있었다 (Table 18).

Table 18. Results of stability test of the cosmetic containing *Rhododendron mucronulatum* Flos in cycle chamber condition

Cycle	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Stability	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

O : Stable X : Unstable

나) 냉·해동순환 (Freeze & Thaw cycling)에 따른 안정성

가혹조건에서 화장품의 여러 가지 물리화학적 변화를 관찰하기 위하여 freeze-thaw 시험법을 실시하였다. Freeze와 thaw를 반복, 변화시켜 그 과정에서 물성의 불안정성에 대해 체크한 결과는 Table 19와 같이 나타내었다. 진달래꽃 추출물이 첨가된 스킨, 로션, 에센스, 크림, 팩을 급격한 온도 조건인 실온(25℃)과 저온(-10℃)의 온도 변화에서 각각 24시간 보관하여 3일과 7일차에 안정성을 관찰한 결과, 스킨, 로션, 에센스, 크림, 팩 모두 상의 분리와 변색, 변취 없이 모두 안정함을 육안으로 관찰할 수 있었다.

Table 19. Results of stability test of the cosmetic containing *Rhododendron mucronulatum* Flos in freeze & thaw cycling condition

Temp.	Day	3	7
	-10°C / 25°C		0

O : Stable X : Unstable

12. 피부 유·수분량 측정 결과

가. 유분측정

피부 유분 측정을 위하여 Corneometer CM 825(Courage & Khazaka, Germany)를 사용하여 측정한 결과 Table 20과 같이 나타내었다. 세안 후 30분이 지난 후 아무것도 바르지 않은 상태에서 볼 부위의 유분을 측정한 결과 $24.56 \pm 19.68 \text{ ug/cm}^2$ 를 나타내었으며, 크림을 바른 후 1시간 후에 유분 값을 측정한 결과 진달래꽃이 첨가되지 않은 크림의 경우 $26.55 \pm 22.75 \text{ ug/cm}^2$, 진달래꽃이 첨가된 크림의 경우 $30.26 \pm 18.33 \text{ ug/cm}^2$ 를 나타내어, 진달래꽃이 첨가된 크림이 피부에 발랐을 경우 가장 많은 유분을 생성함을 확인할 수 있었다.

나. 수분측정

피부 수분 측정을 위하여 Sebummeter SM 810(Courage & Khazaka, Germany)을 사용하여 측정한 결과 Table 21과 같이 나타내었다. 세안 후 30분이 지난 후 아무것도 바르지 않은 상태에서 볼 부위의 수분을 측정한 결과 65.23 ± 20.12 를 나타내었으며, 크림을 바른 후 1시간 후에 수분 값을 측정한 결과 진달래꽃이 첨가되지 않은 크림의 경우 266.79 ± 18.36 , 진달래꽃이 첨가된 크림의 경우 72.64 ± 21.96 을 나타내어 진달래꽃이 첨가된 크림이 피부에 발랐을 경우 가장 많은 수분을 생성함을 확인할 수 있었다.

위와 같은 결과로 미루어 보아 진달래꽃이 첨가된 크림의 경우 첨가되지 않은 크림에 비해 유분과 수분 값이 모두 높아 보습 및 피부개선에 도움을 주며, 노화방지에 효과적인 소재가 될 것으로 판단된다.

Table 20. Measure value of cheek on oiliness–feeling

Check Points	Oiliness (ug/cm ²)
Standard	24.56 ± 19.68
Cream not containing <i>Rhododendron mucronulatum</i> Flos	26.55 ± 22.75
Cream containing <i>Rhododendron mucronulatum</i> Flos	30.26 ± 18.33

Table 21. Measure value of cheek on moisture–feeling

Check Points	moisture (AU)
Standard	65.23 ± 20.12
Cream not containing <i>Rhododendron mucronulatum</i> Flos	66.79 ± 18.36
Cream containing <i>Rhododendron mucronulatum</i> Flos	72.64 ± 21.96

13. 진달래꽃이 첨가된 크림의 사용감 결과

진달래꽃이 첨가된 크림의 사용감 시험 결과를 Fig. 53에 나타내었다. 5가지 문항에 대해서 설문조사를 실시한 결과 끈적임이 없고 바름성이 좋은 크림은 20,000 ppm의 진달래꽃 에탄올 추출물이 첨가된 크림이며, 보습감과 바른 후의 피부상태가 가장 좋은 것은 20,000 ppm의 진달래꽃 열수 추출물이 첨가된 크림이었다. 크림을 사용한 후 다른 사람에게 추천해주고 싶은 농도의 크림은 20,000 ppm의 진달래꽃 열수 추출물이 첨가된 크림으로 나타났다. 이 결과는 계절이 겨울이기 때문에 좀 더 보습성을 요하는 크림이 인기가 더 있었던 것으로 판단된다.

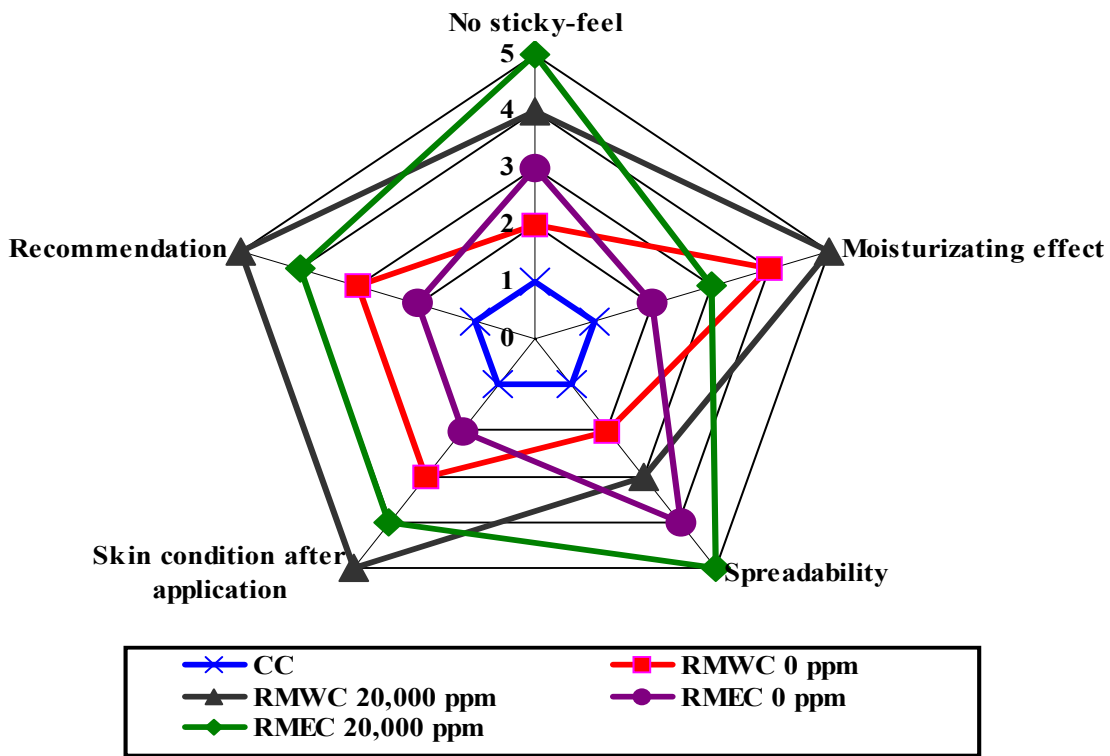


Fig. 53. Results of user test in the cream containing *Rhododendron mucronulatum* Flos.

14. 진달래꽃 분획물의 구조분석

가. 진달래꽃 활성물질 분리, 정제

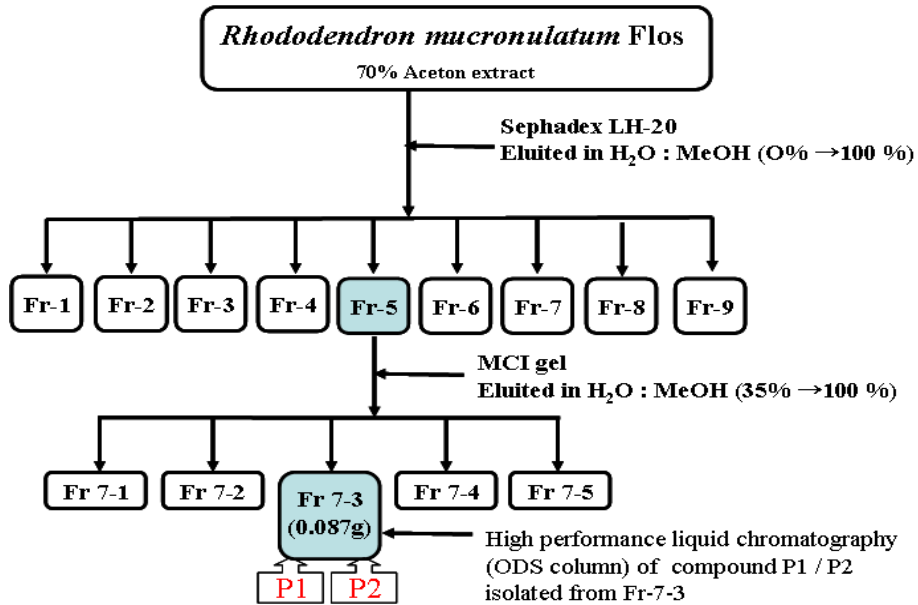


Fig. 54. Purification procedure for the fractions isolated from *Rhododendron mucronulatum* Flos.

나. High performance liquid chromatograph(HPLC)를 통한 진달래꽃 분획물의 순도 확인

진달래꽃 분획물의 thin layer chromatography(TLC)를 이용해 단일 band를 확인한 후 순도를 확인하기 위하여 High performance liquid chromatograph (HPLC, Water, USA)에 의해 분석한 결과 Fig. 55, 56와 같이 나타내었다. Compound P1의 경우 retention time 8분, compound P2의 경우 retention time 12분에서 단일 peak를 확인할 수 있었다.

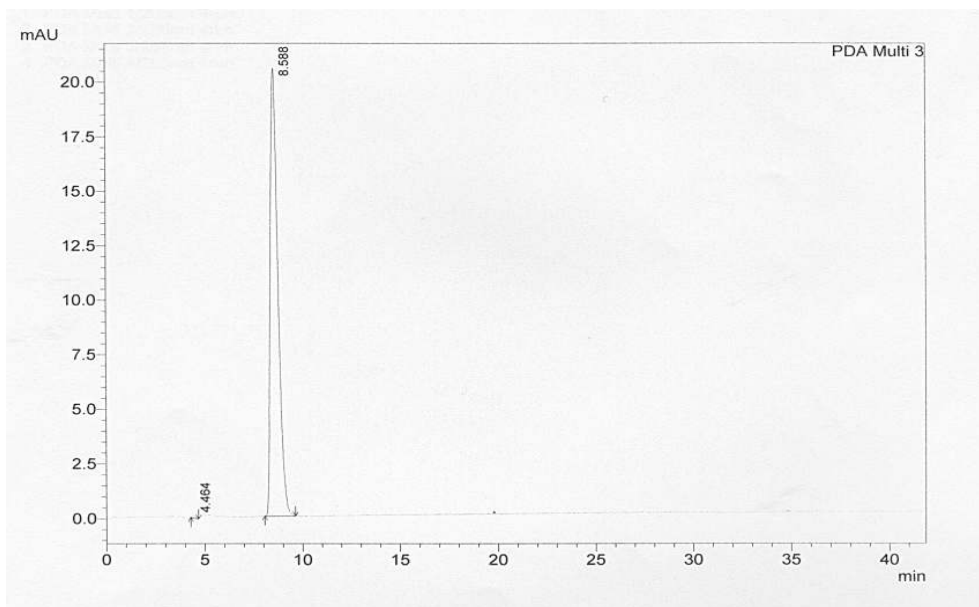


Fig. 55. High performance liquid chromatograph(HPLC) of compound P1 isolated from *Rhododendron mucronulatum* Flos.

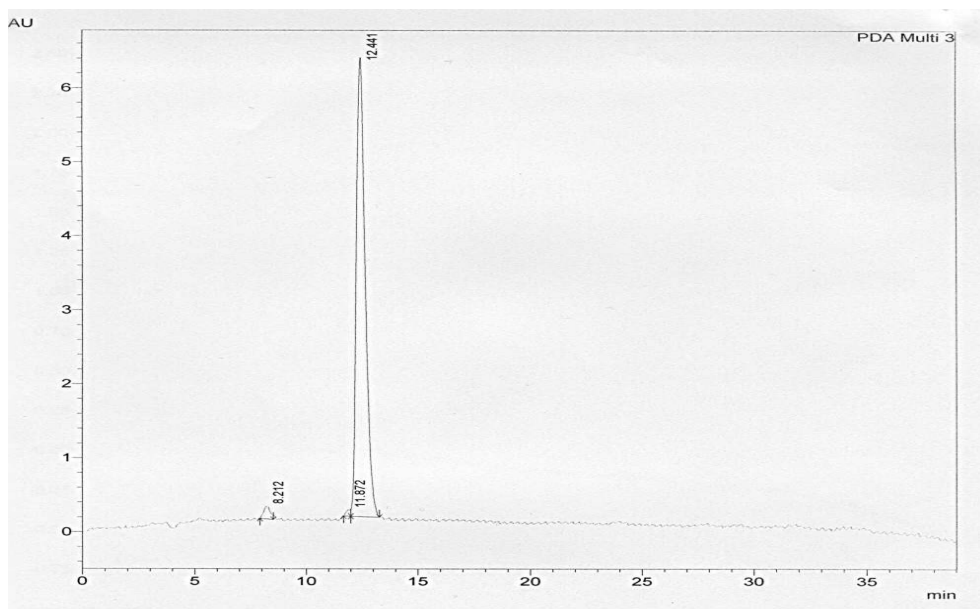


Fig. 56. High performance liquid chromatograph(HPLC) of compound P2 isolated from *Rhododendron mucronulatum* Flos.

다. 진달래꽃 정제 화합물의 ^1H - 및 ^{13}C -NMR 분석 결과

1) 진달래꽃 정제 화합물 P1의 구조 결정

진달래 70% 아세톤 추출물의 각종 column chromatography로 부터 얻어진 순수화합물 중 P1은 pale yellow powder로 얻어졌으며, ^1H -NMR spectrum으로 부터 얻어진 data중 aromatic 영역에서 A_2B_2 계 signal 한 쌍(δ_{H} 7.02ppm) 및 서로 meta-coupling 한 시그널 (δ_{H} 6.43, 6.22ppm)이 관찰 된 점과 flavonoid 화합물의 특징적인 $\text{UV}_{\lambda\text{max}}$ 가 271, 352nm에서 확인 되었고, rhamnose 유래의 특징적인 시그널인 δ_{H} 5.31, δ_{H} 0.86가 관찰되었다. 본 화합물의 결합위치를 확인 하기위해 HMBC를 측정한 결과 rhamnose 1번 위치의 δ_{H} 5.31 와 C-3인 $\delta_{136.4}$ 와의 cross peak가 확인된 점으로부터 rhamnose 1번 위치와 quercetin의 3번 위치에 결합함을 알 수 있었다. FAB-Mass spectrum 측정으로 분자량이 m/z 465 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 임을 확인 할 수 있었으며, ^{13}C -NMR spectrum의 데이터를 참고 문헌과 비교했을 때 잘 일치 하였으므로, 본 화합물 P1은 myricetin-3-*O*-rhamnoside로 결정 하였다. (Table 22, Fig. 57~60)

Table 22. ^1H - and ^{13}C -NMR spectral data of compound P1 in (Aceton, 500MHz)

Position	^1H -NMR	^{13}C -NMR
1'	—	120.5
2'	7.34 (1H, d, $J=1.5$ Hz)	157.8
3'	7.31 (1H, dd, $J=8.0, 1.5$ Hz)	108.5
b'	6.91 (1H, d, 8.5Hz)	
4'	—	145.4
5'	—	135.0
6'	—	122.4
1	—	
2	—	157.1
3	—	136.4
4	—	178.2
4a	—	104.5
5	—	161.5
6	6.37 (1H, s)	102.1
7	—	164.4
8	6.20 (1H, d, $J=1.5$ Hz)	93.8
8a	—	157.0
1''	5.35 (1H, d, $J=1.5$ Hz)	103.5
2''	4.24 (1H, brs)	72.3
3''	3.75 (1H, dd, $J=9.5, 3$ Hz)	72.4
4''	3.42 (1H, m)	73.7
5''	3.31 (1H, m)	72.1
6''	0.94 (3H, s, $J=6.0$ Hz)	16.8

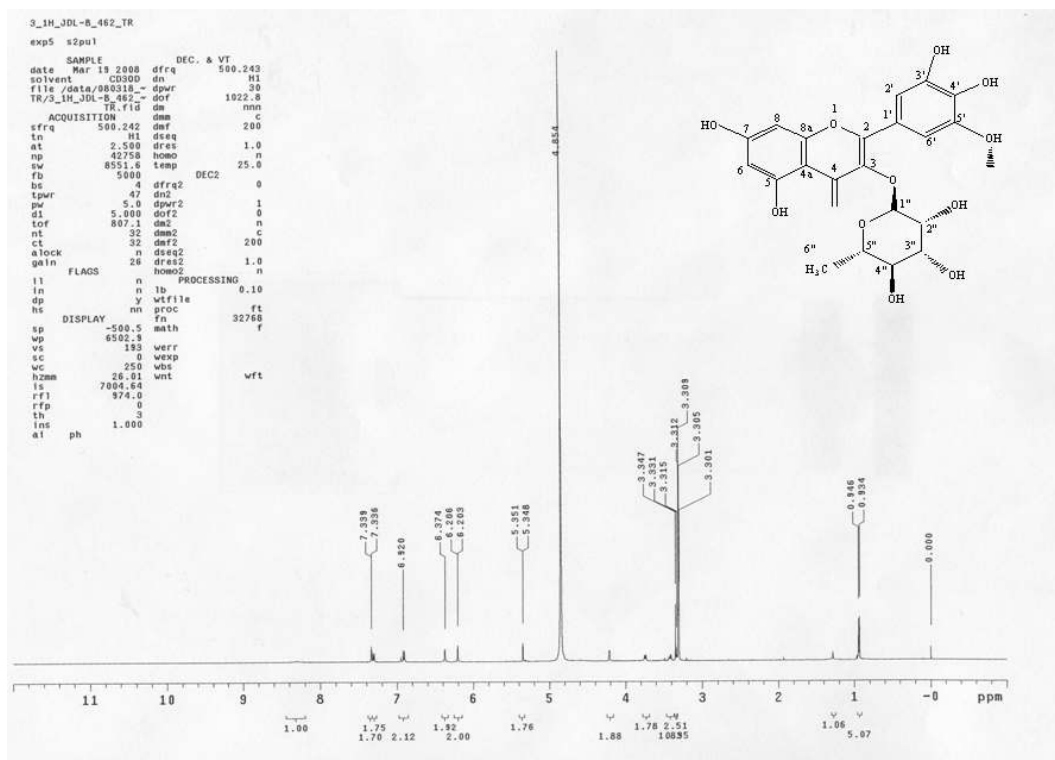


Fig. 57. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of compound P1 isolated from *Rhododendron mucronulatum* Flos.

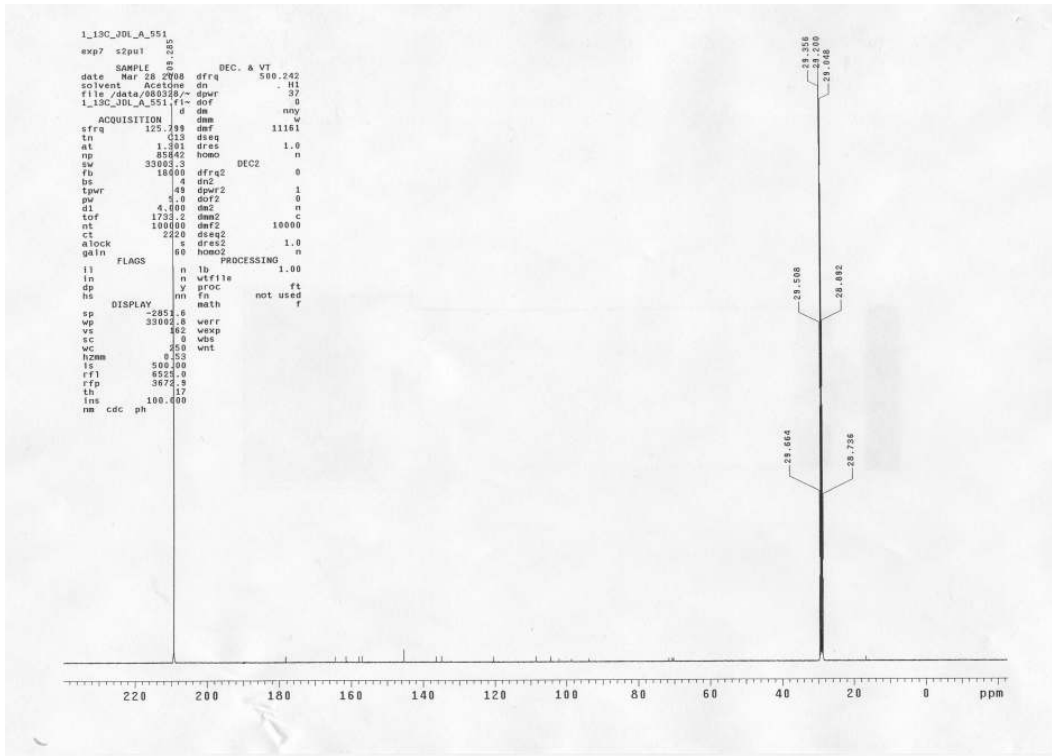


Fig. 58. ^{13}C -NMR spectrum of compound P1 isolated from *Rhododendron mucronulatum* Flos.

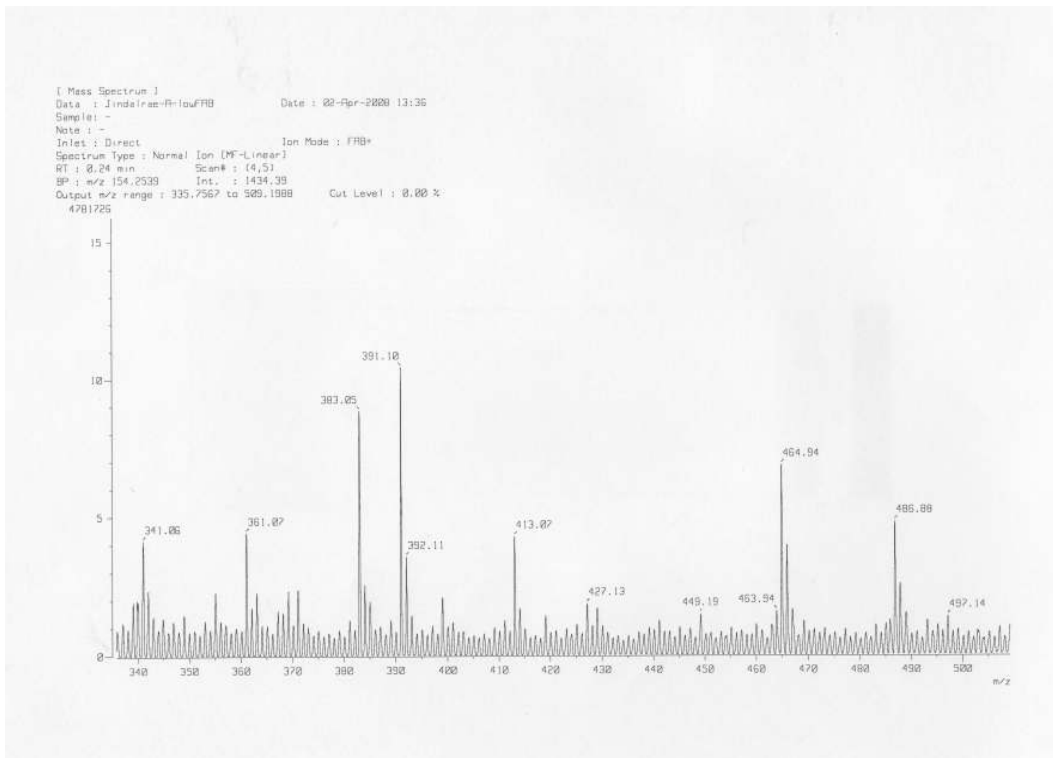
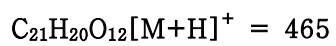
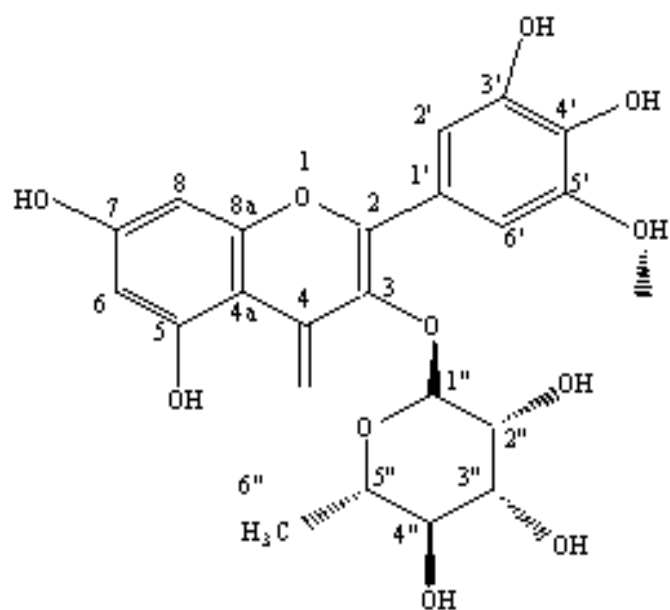


Fig. 59. FAB-Mass spectrum of compound P1 isolated from *Rhododendron mucronulatum* Flos.



Myricetin-3-O-rhamnopyranoside

Fig. 60. Structure of compound P1 isolated from *Rhododendron mucronulatum* Flos.

2) 진달래꽃 정제 화합물 P2의 구조 결정

진달래 70% 아세톤 추출물의 각종 column chromatography로 부터 얻어진 순수화합물 중 P2는 pale yellow powder로 얻어졌으며, $^1\text{H-NMR}$ spectrum으로 부터 얻어진 data중 aromatic 영역에서 ABX계 signal 한 쌍(δ_{H} 7.34, 7.31, 6.91ppm) 및 서로 meta-coupling 한 시그널 (δ_{H} 6.37, 6.20ppm) 이 관찰 된 점과 flavonoid 화합물의 특징적인 $\text{UV}_{\lambda\text{max}}$ 가 271, 352nm에서 확인 되었고, rhamnose 유래의 특징적인 시그널인 δ_{H} 5.35, δ_{H} 0.94가 관찰되었다. 본 화합물의 결합위치를 확인 하기위해 HMBC를 측정한 결과 rhamnose 1번 위치의 δ_{H} 5.35 와 C-3인 $\delta_{13\text{C}}$ 136.4 와의 cross peak가 확인된 점으로부터 rhamnose 1번 위치와 quercetin의 3번 위치에 결합함을 알 수 있었다. FAB-Mass spectrum 측정으로 분자량이 m/z 449 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 임을 확인 할 수 있었으며, $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum의 데이터를 참고문헌과 비교했을 때 잘 일치 하였으므로, 본 화합물 P2는 quercetin 3-*O*-rhamnoside로 결정 하였다. (Table 23, Fig. 61~64)

Table 23. ^1H - and ^{13}C -NMR spectral data of compound P2 in (CD_3OD , 500MHz)

Position	^1H -NMR	^{13}C -NMR
1'	7.02 (1H, s)	124.1
2'	—	110.2
3'	—	109.9
b'	7.02 (2H, s)	—
4'	—	136.5
5'	—	147.2
6'	—	109.9
1	—	—
2	—	157.8
3	—	136.5
4	—	178.2
4a	—	106.0
5	—	163.5
6	—	102.1
7	—	164.4
8	6.43 (1H, d, $J=2.5$ Hz)	95.0
8a	—	157.0
b	6.23 (1H, d, $J=2.5$ Hz)	—
1''	5.31 (1H, d, $J=1.5$ Hz)	102.1
2''	4.23 (1H, m)	72.3
3''	3.81 (1H, dd, $J=9.5, 3.5$ Hz)	71.1
4''	3.44 (1H, dd, $J=9.5, 6.0$ Hz)	70.6
5''	3.56 (1H, t, $J=9.5$ Hz)	70.3
6''	0.86 (3H, d, $J=6.0$ Hz)	16.8

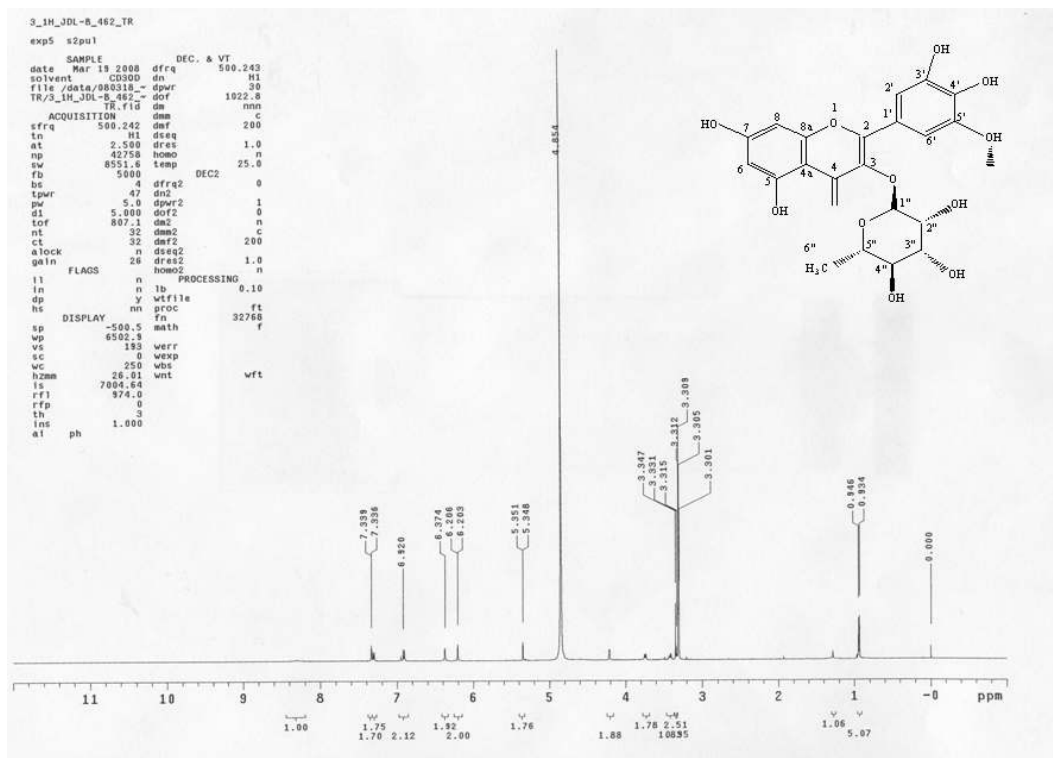


Fig. 61. ^1H -NMR spectrum of compound P2 isolated from *Rhododendron mucronulatum* Flos.

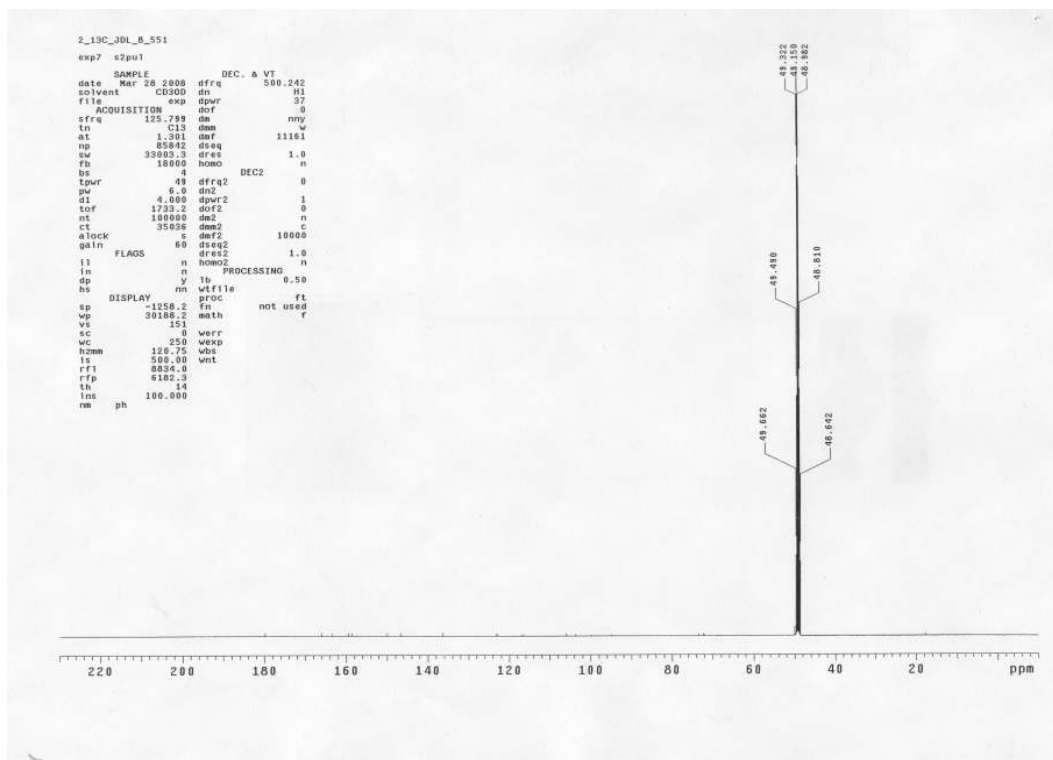


Fig. 62. ^{13}C -NMR spectrum of compound P2 isolated from *Rhododendron mucronulatum* Flos.

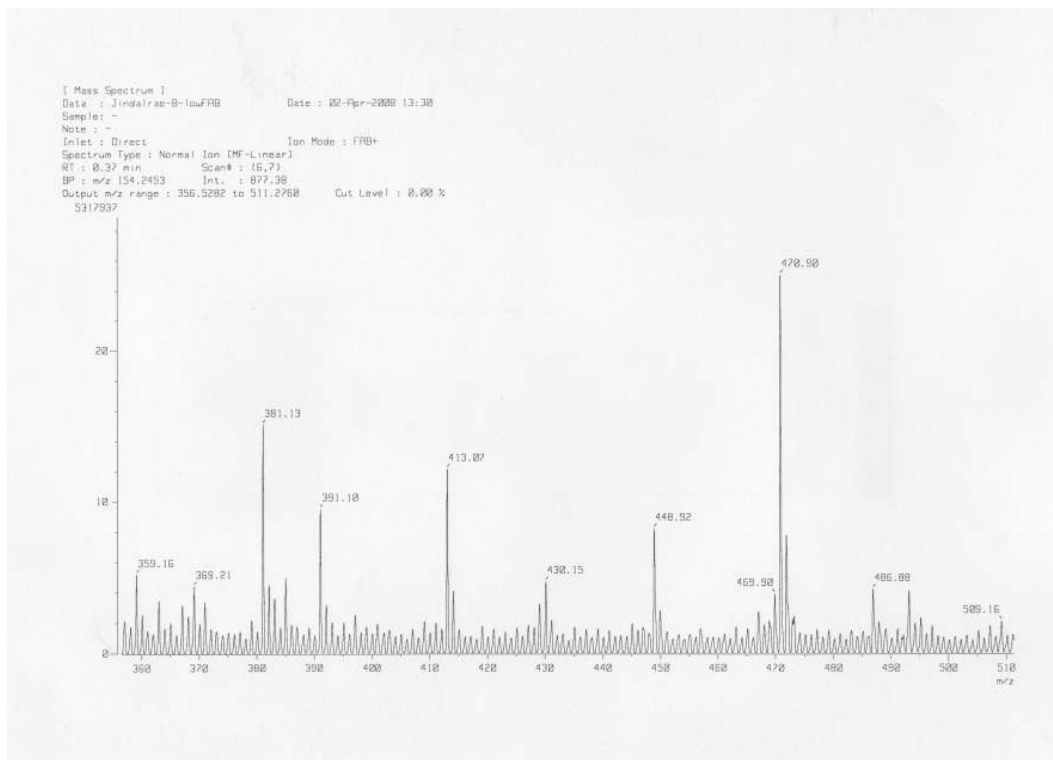
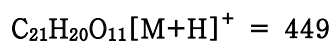
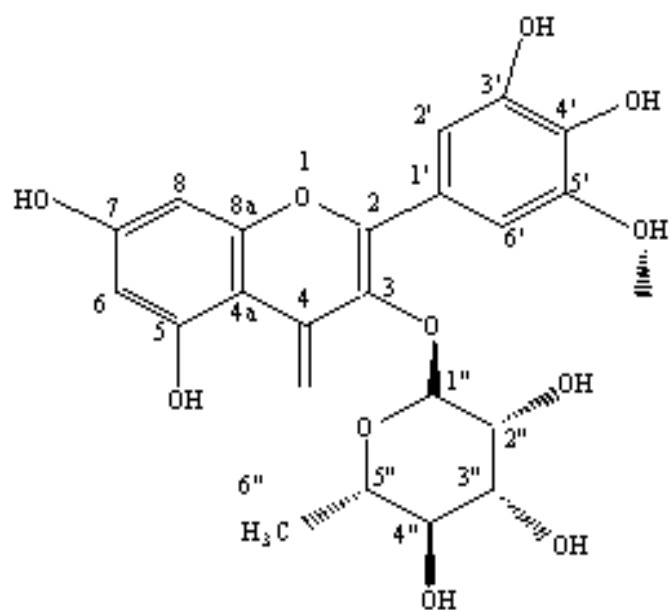


Fig. 63. FAB-Mass spectrum of compound P2 isolated from *Rhododendron mucronulatum* Flos.



Quercetin 3-*O*-rhamnoside

Fig. 64. Structure of compound P2 isolated from *Rhododendron mucronulatum* Flos.

[협동연구기관 - 경북대학교]

제 4 절 재료 및 방법

1. 실험 재료

가. 재료

본 실험에 사용한 진달래꽃은 2006년 5월 경북 상주시 갑장산 인근에서 채취하여 분쇄 후 저온저장 하면서 이용하였다.

2. 실험방법

가. Phenol성 물질의 추출 및 정량

1) 추출물의 조제

진달래 꽃잎 분말 1 g를 물과 60% 에탄올 100 mL에 넣고 6시간 동안 추출한 후 상등액을 Whatman No. 1로 여과하여 여액을 시료로 사용하였다.

2) Phenol 화합물 정량

시료 1 mL를 95% ethanol 1 mL와 증류수 5 mL를 첨가하고 1 N Folin-ciocalteu reagent 0.5 mL를 넣어 잘 섞어주고, 5분간 방치한 후, Na_2CO_3 1 mL를 가한 후, 흡광도 725 nm에서 1시간 이내에 측정하여 gallic acid를 이용한 표준곡선으로 양을 환산하였다.

나. 진달래 추출물의 생리활성 탐색

1) 항산화 활성 측정

가) 전자공여능 측정

DPPH radical에 대한 소거활성은 Blois의 방법을 변형하여 측정하였다. 각 시료 0.5 mL에 60 μ M DPPH 3 mL를 넣고 vortex한 후 15분 동안 방치한 다음 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여능은 다음 식으로 나타내었다.

$$\text{전자공여능 (\%)} = 1 - \left(\frac{\text{반응구의 흡광도}}{\text{대조구의 흡광도}} \right) \times 100$$

나) ABTS radical cation decolorization의 측정

ABTS radical cation decolorization의 측정은 Pellegrin등의 방법에 의해 측정하였다. 즉, 7 mM ABTS와 140 mM $K_2S_2O_8$ 을 5 mL : 88 μ L로 섞어 어두운 곳에 14~16시간 방치시킨 후, 이를 absolute ethanol과 1:88비율로 섞어 734 nm에서 대조구의 흡광도 값이 0.7 ± 0.002 가 되도록 조절한 ABTS solution을 사용하였다. 시료용액 50 μ L와 ABTS solution 1 mL를 30초 동안 섞은 후 2.5분간 incubation하여 734 nm에서 흡광도를 측정하여 아래의 식에 의해 저해율을 계산하였다.

$$\text{저해율 (\%)} = \left(1 - \frac{\text{반응구의 흡광도}}{\text{대조구의 흡광도}} \right) \times 100$$

다) Antioxidant Protection Factor(PF) 측정

PF는 Andarwulan과 Shetty의 방법으로 측정하였다. 10 mg의 β -carotene을 50 mL의 chloroform에 녹인 용액 1 mL를 evaporator용 수기에 넣고 40°C water bath에서

chloroform을 증류시킨 후 20 μL linoleic acid, 184 μL Tween 40과 50 mL H_2O_2 를 가하여 emulsion을 만들고, 5 mL의 emulsion에 시료용액 100 μL 를 혼합하여 vortex로 잘 섞어준 뒤 50°C에서 30분간 반응 시켜 냉각시킨 다음, 470 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{PF} = \frac{\text{반응구의 흡광도}}{\text{대조구의 흡광도}}$$

라) Thiobarbituric acid reactive substances(TBARS)측정

TBARS는 Burge와 Aust의 방법²⁴⁾에 따라 측정하였다. 1% linoleic acid와 1% Tween 40으로 emulsion을 만들고 emulsion 0.8 mL와 시료 0.2 mL를 섞은 후 50°C water bath에서 10시간 반응시켰다. 반응 후 반응액 1 mL에 TBA reagent 2 mL를 가하고 15분간 boiling한 다음 10분간 냉각시킨 후 15분간 1000 rpm(vision, VS-5500N)으로 원심분리하여 실온에서 10분간 방치 후 상등액을 532 nm에서 흡광도를 측정하였으며, TBARS값은 흡광도 수치 \times 0.0154로 1 mL 반응혼합물에 대해서 생성된 1,1,3,3tetraethoxy propane(TEP)의 μM 으로 표시하였다.

$$\text{저해율 (\%)} = \left(1 - \frac{\text{반응구의 TBARSs } \mu\text{M}}{\text{대조구의 TBARSs } \mu\text{M}}\right) \times 100$$

2) 항균효과 측정

가) *Helicobacter pylori* 배양

실험에 사용한 균주는 위, 십이지장 궤양 원인균인 *Helicobacter pylori*로서 표준균주인 ATCC 43504를 사용하였다. *Helicobacter pylori*의 배양에는 최적배지(special peptone 0.5 g, agar 0.75 g, NaCl 0.25 g, yeast extract 0.25 g, beef extract 0.2 g 및 pyruvic acid 0.025 g)를 사용하여 미호기성 조건을 유지시켜주기 위해서 10% CO_2 incubator를 이용하였으며, incubator의 습도는 항상 95% 이상으로 유지하였으며, agar

plate상에서 배양은 37°C로 48~72시간 동안 실시하였다.

나) 추출물의 *Helicobacter pylori* 항균활성 검색

*Helicobacter pylori*에 대한 추출물의 항균활성 검색은 disc agar diffusion method로 실시하였다. Disc agar diffusion법은 *Helicobacter pylori* 최적배지 plate에 *Helicobacter pylori*균 100 mL를 분주하여 멸균 유리봉으로 도말한 다음, 멸균된 disc paper(φ 8 mm)를 올리고 0.45 μm membrane filter로 제균한 각 추출물을 vacuum evaporator로 농축한 후 멸균수로 희석하여 phenol 함량이 50~200 μg/100 μL가 되도록 조절한 후 각각의 추출물 100 μL를 disc paper에 흡수시키고, 대조구로는 멸균수를 흡수시킨 후 37°C의 미 호기성 조건에서 48시간 동안 incubation한 다음, disc 주위의 clear zone 생성 유무를 확인하였다.

다) 항고혈압 효과 측정

ACE 저해효과 측정은 Cushman등의 방법으로 행하였다. 즉, 반응구는 0.3 M NaCl을 함유하는 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 8.3)에 기질인 HHL 2.5 mM을 녹인 액 0.15 mL, ACE(0.25 unit/mL, Sigma사) 0.1 mL와 각 추출시료 용액 0.1 mL를 혼합하였으며, 대조구는 추출시료 대신 증류수 0.1 mL를 첨가하여 37°C에서 30분간 반응시키고, 1 N HCl 0.25 mL 첨가로 반응을 중지시킨 뒤 3 mL의 ethylacetate를 첨가하였다. ethylacetate 층으로부터 용매를 휘발시킨 후 잔사에 증류수 2 mL를 첨가하여 추출된 hippuric acid를 spectrophotometer를 사용하여 흡광도 280 nm에서 측정한 후 다음 식에 따라 저해율(%)을 구하였다.

$$\text{저해율 (\%)} = \left(1 - \frac{\text{반응구의 hippuric acid의 생성량}}{\text{대조구의 hippuric acid의 생성량}} \right) \times 100$$

라) 항 관절염 효과 측정

XOase 활성저해 측정법은 Stirpe와 Corte 의 방법에 준하여 측정하였다. 즉, 반응구는 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.5)에 xanthine 2 mM을 녹인 기질액 3 mL에 효소액 0.1 mL와 추출용액 0.3 mL를 넣고 대조구에는 추출용액 대신 증류수를 0.3 mL 첨가하여 37°C에서 30분간 반응시키고 20% trichloroacetic acid(TCA) 1mL를 가하여 반응을 종료시킨 다음 원심분리하여 단백질을 제거한 후 반응액 중에 생성된 uric acid를 흡광도 292 nm에서 측정하여 다음 식으로 저해율을 구하였다.

$$\text{저해율 (\%)} = \left(1 - \frac{\text{반응구의 uric acid의 생성량}}{\text{대조구의 uric acid의 생성량}}\right) \times 100$$

마) 항 당뇨 효과 측정

(1) α -amylase 저해 측정

Pancreatin α -amylase 활성억제 측정은 agar diffusion method를 이용하여 측정하였다. 즉, plate는 5 g의 agar와 5 g의 soluble starch를 500 mL 증류수에 녹여 끓인 후, 121°C로 15분간 멸균하고 15 mL씩 petridish에 분주하여 식힌 뒤 시료액 0.8 μ L와 효소액 0.2 μ L (1000 U/mL)를 섞어 plate위에 놓인 disc paper 위에 각각 분주하고 대조구에는 시료액 대신 증류수를 넣어 37°C에서 3일간 배양한 후 I₂/KI (5 mM I₂ in 3% KI) 5 mL를 가하여 15분간 발색시킨 후 다음의 식으로 저해율을 계산하였다.

$$\text{저해율 (\%)} = \left(1 - \frac{\text{반응구의 면적}}{\text{대조구의 면적}}\right) \times 100$$

(2) α -glucosidase 저해 측정

α -Glucosidase 활성억제 측정은 Tibbot 등의 방법에 따라 측정하였다. 50 mM sodium succinate buffer(pH 4.2)에 ρ -nitrophenol- α -D-glucopyranoside(PNPG)를 용해 시켜 1 mg/mL의 농도로 기질을 만들고, 기질 1 mL와 효소액 0.1 mL를 혼합하고 대조구에는 증류수 0.1 mL, 반응구에는 시료 0.1 mL를 넣어 37°C에서 30분간 반응시킨 후 1 N-NaOH 0.1 mL를 첨가하여 발색시켰다. 이 때 생성된 ρ -nitrophenol(PNP)은 400 nm 에서 spectrophotometer를 이용하여 흡광도를 측정하였으며, 그 양은 ρ -nitrophenol로부터 작성한 표준곡선으로부터 구하여 다음의 식으로 저해율을 구하였다.

$$\text{저해율 (\%)} = \left(1 - \frac{\text{반응구의 } \rho\text{-nitrophenol 생성량}}{\text{대조구의 } \rho\text{-nitrophenol 생성량}} \right) \times 100$$

다. 진달래 추출물의 정제 및 동정

1) 진달래 추출물 제조

건조된 진달래 꽃잎 5 kg에 60% ethanol을 가하여 실온에서 24시간 추출한 후 원심 분리 (10,000 rpm, 15 min)하여 상징액과 침전물을 얻었고, 이 침전물은 다시 60% ethanol을 가하여 위와 같은 추출과정을 4회 반복하였다. 각각의 상징액을 모아 농축하여 rotary evaporator로 농축한 후 ethanol 추출물로서 분획을 위한 시료로 사용하였다.

2) Thin layer chromatography

Colum에 의해 분리된 용출액을 silica gel plate (5.0 × 5.0 cm)로 CHCl₃ : BuOH : H₂O : Acetic acid : MeOH (10 : 6 : 2 : 1 : 3, v/ v/ v/ v/ v)의 용매를 사용하여 전개한 다음 건조시키고, 10% H₂SO₄를 분무하여 100°C 부근에서 발색 시켰다.

3) Phenol 화합물의 정제

가) Sephadex LH-20에 의한 정제

Sephadex LH-20 column을 충전한 후 흡착성의 성질에 의해 분리하였다. 용출용매는 normal phase type으로서 EtOH→H₂O 및 60% EtOH과 reverse phase type으로 H₂O→EtOH의 순으로 용출시켜 TLC 상에서 phenol성 물질의 유무 및 종류를 확인하고 농축, 건조하였다.

나) MCI-gel CHP 20P에 의한 정제

MCI-gel은 다공성 polystyren gel로서 흡착성을 이용하였으며 용출용매는 일반적인 reverse phase type인 H₂O→EtOH로 용출하여 TLC 상에서 확인하였다.

4) 진달래 추출물에서 분리한 phenol 화합물의 물리 및 화학적 성질

가) Melting point 및 $[\alpha]_D$ 측정

용해점은 시료 1 mg을 취하여 미량용점 측정 장치를 이용하여 측정하였으며, $[\alpha]_D$ 는 시료 5 mg을 Me₂O 및 MeOH에 용해하여 polarimeter에 의해 측정하였다.

나) Infrared Spectrum (IR) 측정

IR spectrum은 할로젠화 알칼리 정제법을 이용하였다. 순수 분리된 시료 1 mg을 KBr 100 mg 분말과 잘 섞어 배합한 후 압력을 가해 가압 정제를 만들어 측정하였다.

다) 핵자기 공명 분광기(Nuclear Magnetic Resonance ; NMR) spectrum의 측정

NMR spectrum은 FT 방법(Pulse Fourier Transform method)을 이용하여 순수 정제물 10 mg을 측정 용매 $\text{CDCl}_3 + \text{DMSO}-D_6 + \text{D}_2\text{O}$ 에 5~20% (W/V) 비율로 용해시키고 TMS [Tetramethylsilane ; $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$] 를 기준 물질로 하여 PMR (300 MHz)로 측정하였다.

라) Mass spectrum 측정

고체 시료 1 mg을 감압상태 ($10^{-4} \sim 10^{-6}$ mmHg)에서 negative ion FAB-mass spectrum을 이용하여 화학적 분석법에 의해 측정하였다. 이때 측정 용매로서는 thioglycerol을 사용하였으며, 측정조건에서 emitter 전류는 22~28 eV이며, 이온원의 가속가압이 6~7 KV에서 질량분석을 하였다.

제 5 절 결과 및 고찰

1. Phenol성 물질의 추출 조건

가. 추출 용매에 따른 phenol성 물질의 용출량

추출용매를 달리하여 진달래 추출물의 phenol성 물질의 용출량을 알아본 결과 Fig. 1과 같이 Acetone을 이용하여 추출 하였을 때 32 mg/g이상으로 본 실험에 사용한 용매 중 가장 높은 함량의 phenol이 용출 되었으며, ethanol과 methanol을 용매로 하였을 때 용출량은 각각 31.1, 30.8 mg/g 으로 비슷하였다. Butanol과 ethylacetate를 제외한 다른 유기용매로 추출한 실험구에서 물 추출물보다 높은 phenol성 물질이 용출되어 phenol성 물질은 극성용매에서 용해도가 높다는 신의 결과와 부분적으로 일치하였다.

나. Ethanol 농도에 따른 phenol성 물질의 용출량

진달래 추출물의 추출 조건을 확립하기 위하여 다양한 농도의 ethanol을 추출용매로 하여 phenol성 물질의 용출량을 측정하였다. 그 결과 Fig. 2와 같이 60% ethanol 농도에서 용출량이 가장 높게 나타났다. 이는 60% ethanol에서 추출한 cereal grain의 phenol성 물질의 추출수율이 가장 높았다는 Zeilinski와 Kozłowska의 보고와 유사하였다.

다. 추출 시간에 따른 phenol성 물질의 용출량

추출물을 식품에 적용하고자 물과 인체에 유해하지 않으며 phenol성 물질의 용해도가 높은 ethanol을 이용하여 30시간동안 3시간 간격으로 phenol성 물질의 용출량을 측정하였다. 그 결과 Fig. 3과 같이 3시간에서 12시간까지 용출량이 서서히 증가하다가 12시간 이후 용출량의 변화가 나타나지 않았다. 또한, 물과 ethanol 추출물의 용출량의 차이는 ethanol 추출물이 높았으나, 시간에 따른 용출량의 변화는 비슷하여 12시간 추출 하였을 때 가장 높은 용출량을 나타내었다

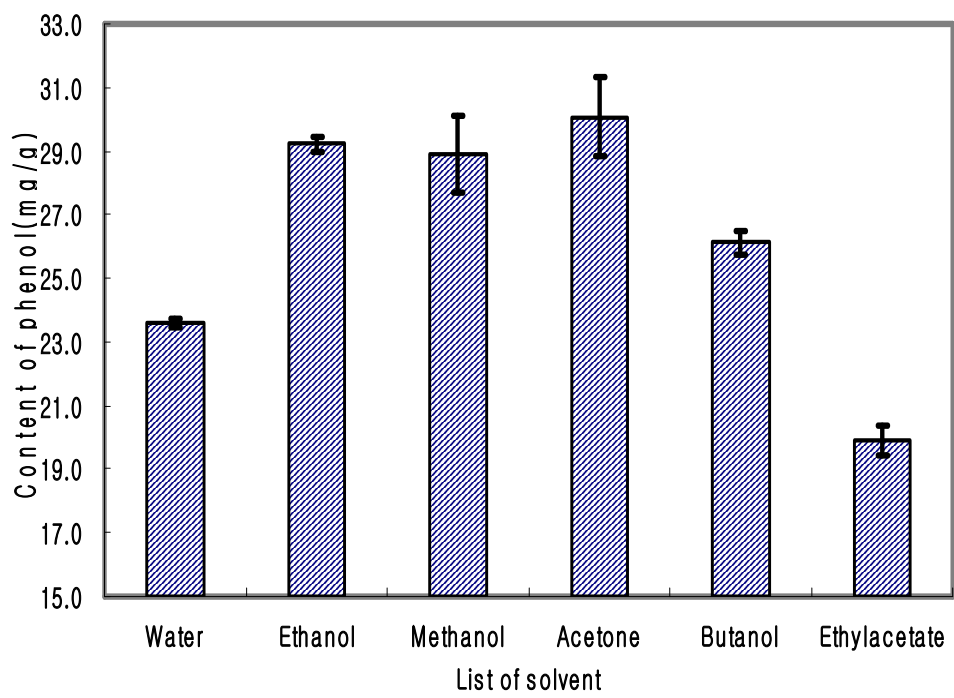


Fig. 1. Effect of different solvent on extraction of phenol from *Rhododendron mucronulatum* Flos.

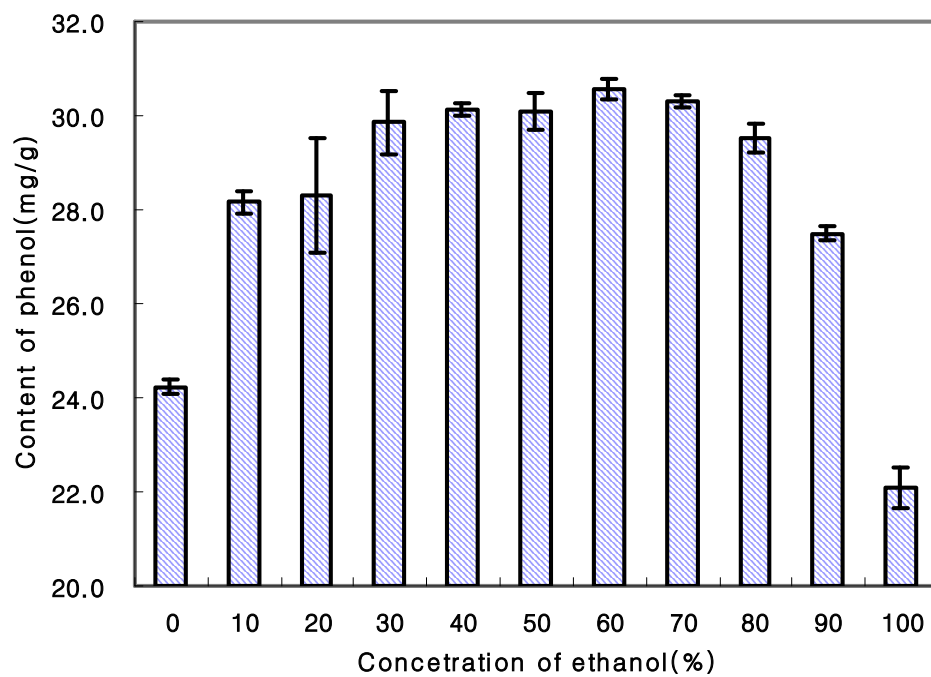


Fig. 2. Effect of ethanol concentration on extraction of phenol from *Rhododendron mucronulatum* Flos.

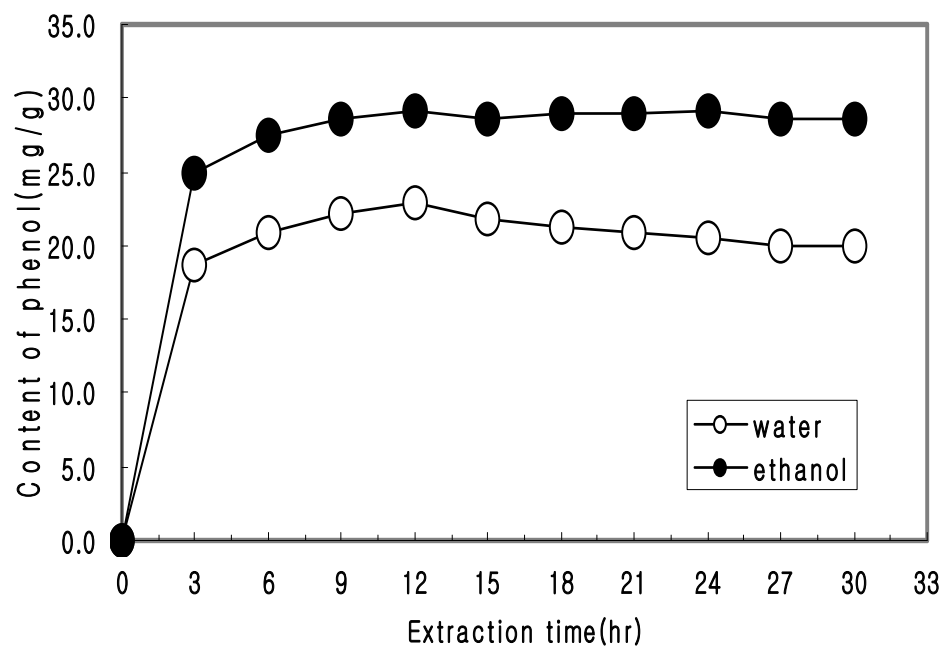


Fig. 3. Effect of extraction time on extraction of phenol from *Rhododendron mucronulatum* Flos.

2. Ethanol 농도에 따른 진달래꽃 추출물의 항산화 효과

가. DPPH 측정 결과

항산화활성 중 oxidavtive free radical 반응을 이용한 환원성 물질의 분석시약인 1-1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)는 아스코르빈산, 토코페롤, polyhydroxy 방향족 화합물, 방향족 아민류에 의해 환원되어 짙은 자색이 탈색되는 DPPH법으로 측정하였다. 진달래꽃 추출물을 에탄올 농도별로 추출하여 전자공여능을 측정한 결과 Fig. 4와 같이 모든 추출물에서 80% 이상의 높은 전자공여능을 나타내었으며, 그 중 물 추출물에 89%로 가장 높게 나타났다.

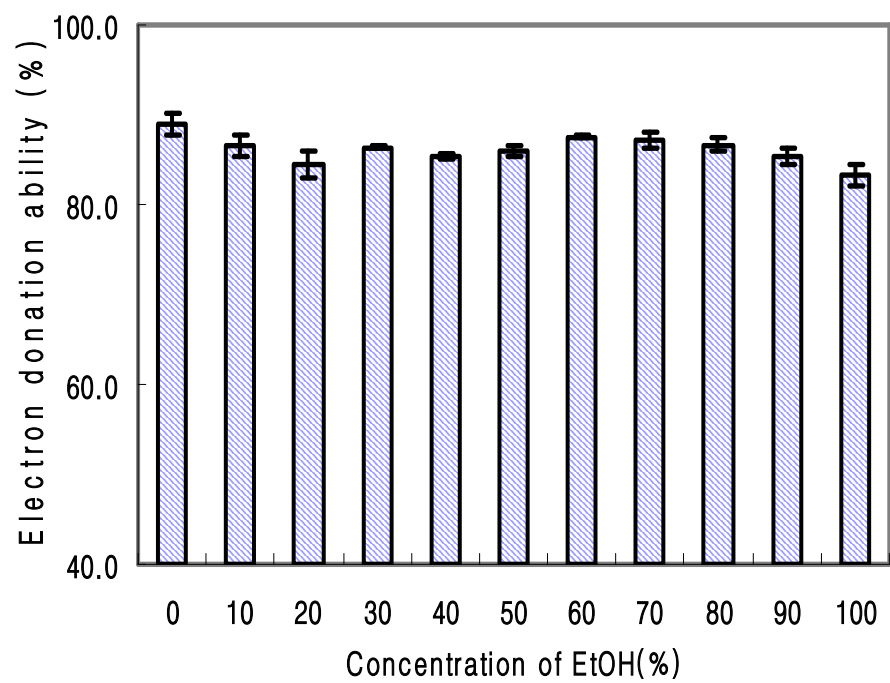


Fig. 4. Antioxidant effect of ethanol extracts from *Rhododendron mucronulatum* Flos by DPPH radical.

나. ABTS 측정 결과

추출물들의 상대적인 항산화 측정은 hydrogen-donating antioxidant와 chain breaking antioxidant 모두를 측정할 수 있고 aqueous phase와 organic phase 모두에 적용이 가능하며 표준물질의 사용으로 추출물의 상대 비교가 가능하도록 potassium persulfate와의 반응에 의해 생성된 $ABTS^+$ free radical이 추출물속의 항산화 물질에 의해 제거되어 radical 특유의 색인 청록색이 탈색되는 것을 이용하여 측정하였다. 그 결과 Fig. 5와 같이 100% 에탄올 추출물을 제외한 모든 추출물에서 95% 이상의 높은 항산화력을 나타내어 추출물이 친수성 및 lipophilic 물질에 대한 항산화력이 우수한 것으로 판단된다.

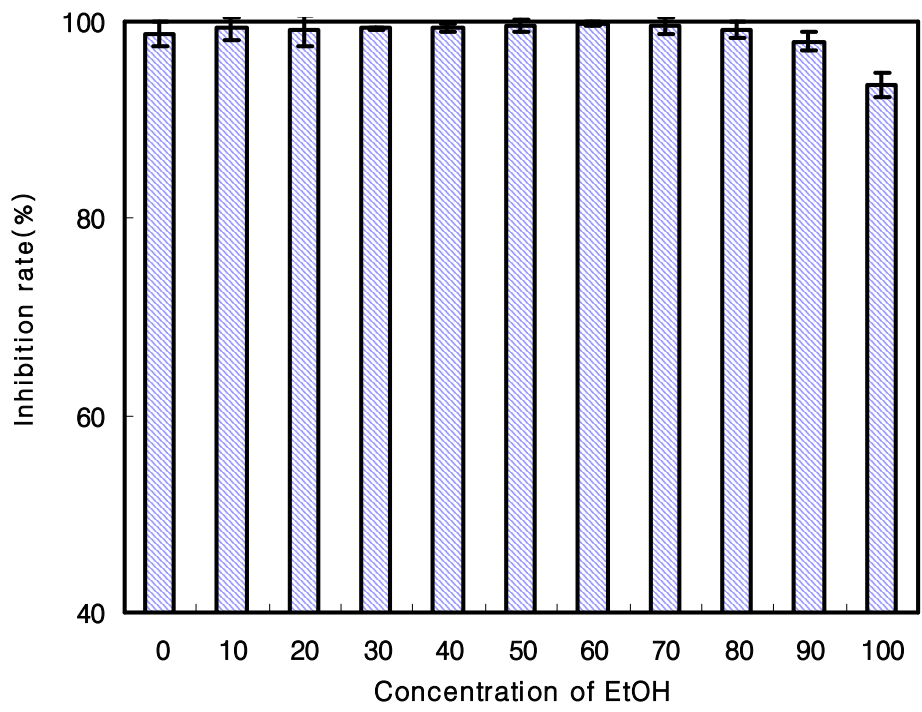


Fig. 5. Antioxidant effect of ethanol extracts from *Rhododendron mucronulatum* Flos by ABTS radical cation decolorization.

다. Antioxidant protection factor 측정 결과

에탄올 농도에 따른 antioxidant protection factor를 측정한 결과 Fig. 6과 같이 10-50% ethanol 추출물과 80-100%의 에탄올 추출물에서 1.2이상의 PF값을 나타내었으며 물 추출물에서는 1.0 PF로 가장 낮게 나타났다. PF의 경우 일반적으로 1.2 PF를 기준으로 그 이상의 경우 지용성 물질에 대한 항산화력이 높다고 판단할 수 있는데, 이 결과로 보아 진달래 추출물의 지용성물질에 대한 항산화력은 비교적 우수하다고 판단되었다. 또한 30, 40% 추출물에서 1.4이상의 PF로 지용성 물질에 대한 항산화력이 비교적 높게 나타났다.

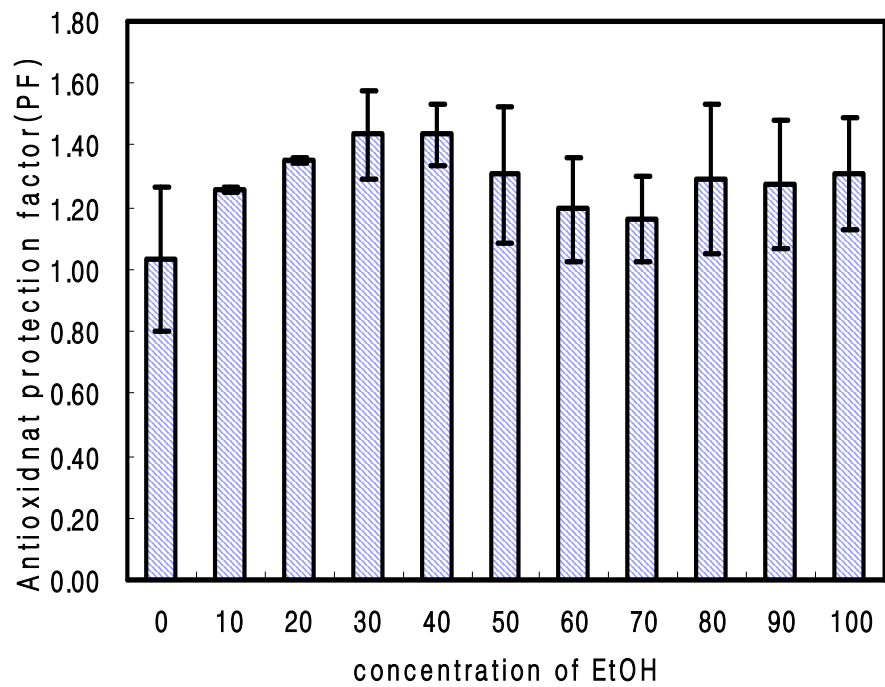


Fig. 6. Antioxidant effect of ethanol extracts from *Rhododendron mucronulatum* Flos by antioxidant protection factor.

라. TBARs 측정 결과

에탄올 농도별 진달래꽃 추출물의 thiobarbituric acid reactive substance를 측정한 결과 0에서 50% 에탄올 추출물까지 항산화력이 증가하다 50% 에탄올 추출물에서 67%로 가장 높은 항산화력을 나타내었으며, 그 이후 점차 항산화력이 낮아져 100% 에탄올 추출물에서 23%의 낮은 항산화력을 나타내었다. 이는 김 등의 유기용매에 의한 대두 추출물의 항산화 실험에서 열수 추출물에 비해 유기 용매 추출물의 항산화 효과가 우수하다는 보고와 유사한 패턴을 나타낸 것으로 판단되었다.

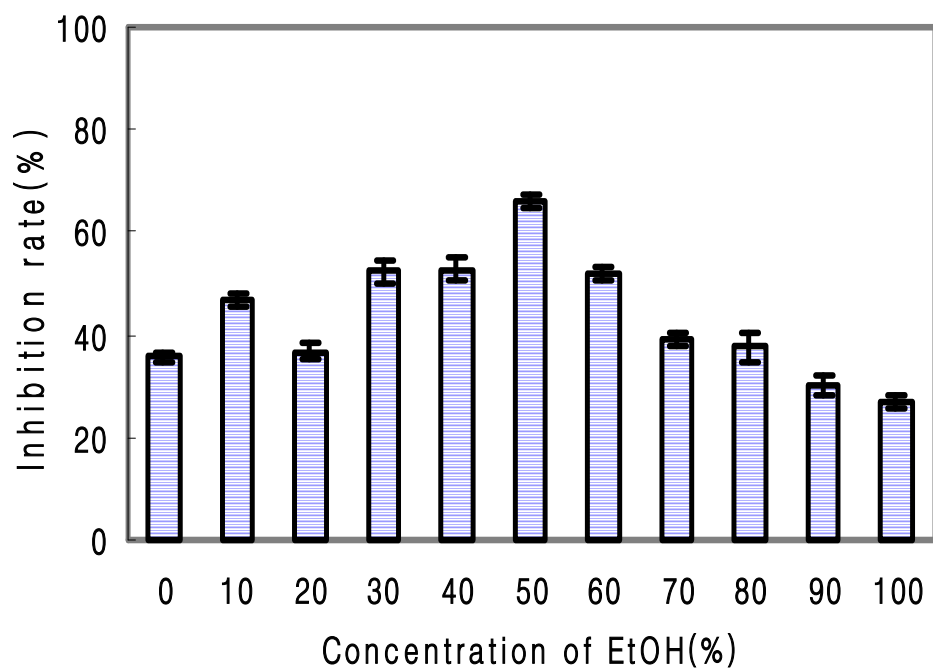


Fig. 7. Antioxidant effect of ethanol extracts from *Rhododendron mucronulatum* Flos by TBARs of antioxidation.

3. Ethanol 농도에 따른 진달래꽃 추출물의 *Helicobacter pylori* 항균활성 측정

Helicobacter pylori 평판 최적배지 plate에서 항균활성을 측정한 결과 Table 1에서와 같이 0~30% 에탄올 추출물에서 clear zone이 나타나지 않았으며 40% 에탄올 추출물 200 µg/mL을 주입하였을 때부터 13 mm의 저해 환이 나타나기 시작하였으며, 60% ethanol 추출물 200 µg/mL를 주입 하였을 때 가장 높은 항균력을 (22 mm)나타내었다.

Table 1. Antimicrobial activity of *Rhododendron mucronulatum* Flos extracts with according to ethanol concentration against *Helicobacter pylori*

Concentration of ethanol	Clear zone(mm)				
	content of phenol compounds(µg/mL)				
	control	50	100	150	200
0	ND	ND	ND	ND	ND
10	ND	ND	ND	ND	ND
20	ND	ND	ND	ND	ND
30	ND	ND	ND	ND	ND
40	ND	ND	ND	ND	13
50	ND	14	15	15	16
60	ND	12	15	19	22
70	ND	16	18	19	19
80	ND	17	17	18	20
90	ND	18	20	20	21
100	ND	15	17	18	20

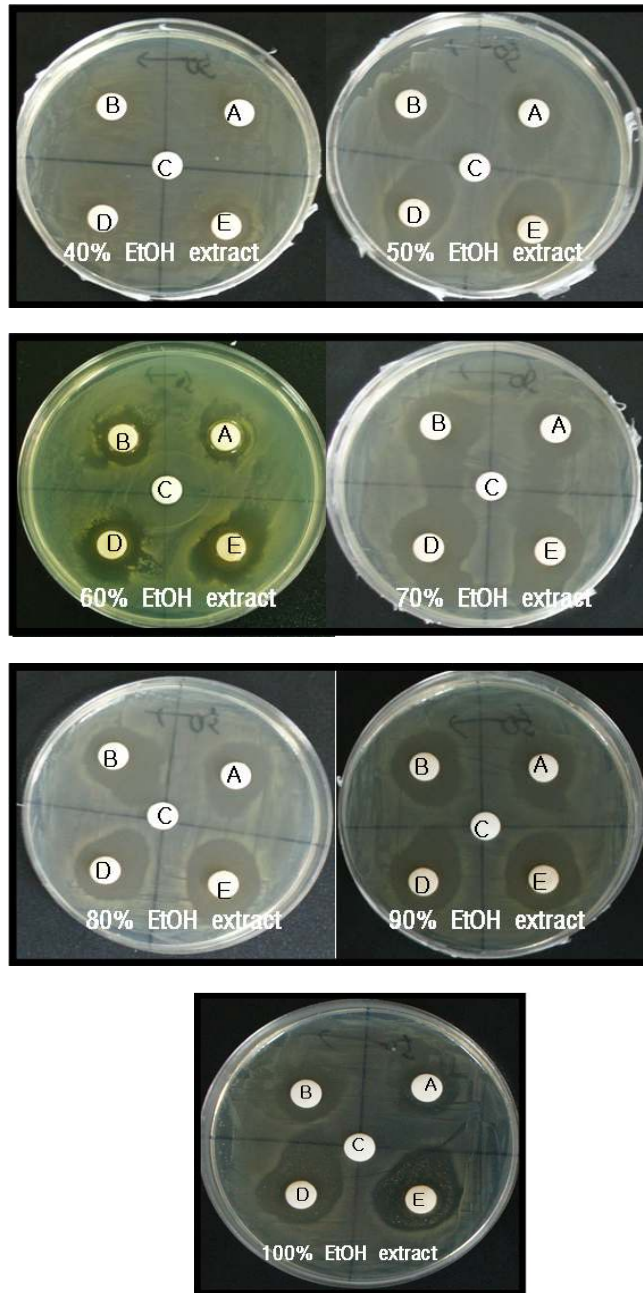


Fig. 8. Antimicrobial activity of *Rhododendron mucronulatum* Flos extracts with according to ethanol concentration against *Helicobacter pylori*.

4. Ethanol 농도에 따른 진달래꽃 추출물의 항 고혈압 효과 측정

고혈압을 유도하는 효소인 angiotensin converting enzyme의 활성 억제효과를 살펴본 결과 Fig. 9와 같이 60% 에탄올 추출물에서 68%의 저해활성을 나타내어 다른 농도의 추출물 중 가장 높은 저해 활성을 나타내었으며 물 추출물에서는 10% 이하의 낮은 저해활성을 나타내었다. 이는 조 등의 오미자를 이용한 항고혈압 효과 측정에서 물 추출물에서 보다 60% 에탄올 추출물에서 더 높은 효과를 나타내는 것과 같은 패턴을 보였다.

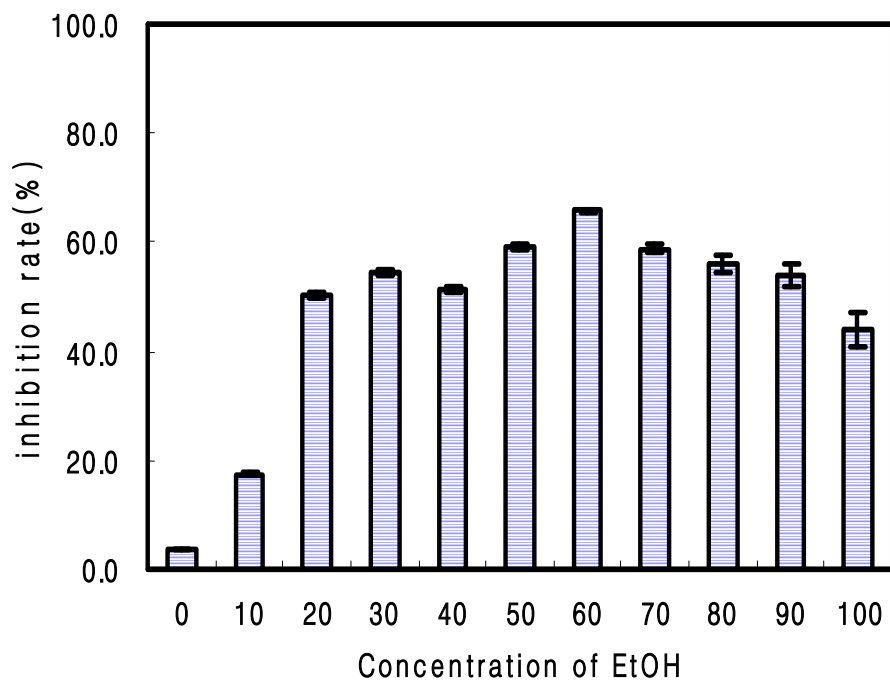


Fig. 9. Effect of inhibition on angiotensin converting enzyme of ethanol extracts from *Rhododendron mucronulatum* Flos.

5. Ethanol 농도에 따른 진달래꽃 추출물의 항 관절염 효과 측정

통풍은 생합성에 의한 purine 뉴클레오티드의 과다생성을 일으키는 여러 가지 대사이상에 기인하는 요산의 과다 생성이 원인이다. 이러한 요산을 생성하는 xanthine oxidase에 대한 활성저해 능력을 측정한 결과 Fig. 10과 같이 0~70% 에탄올 추출물까지 진달래꽃 추출물의 저해 활성이 증가하다가 80% 에탄올 추출물부터 감소하는 것으로 나타났다. 60~80% 에탄올 추출물에서 40% 이상의 저해활성을 나타내었다.

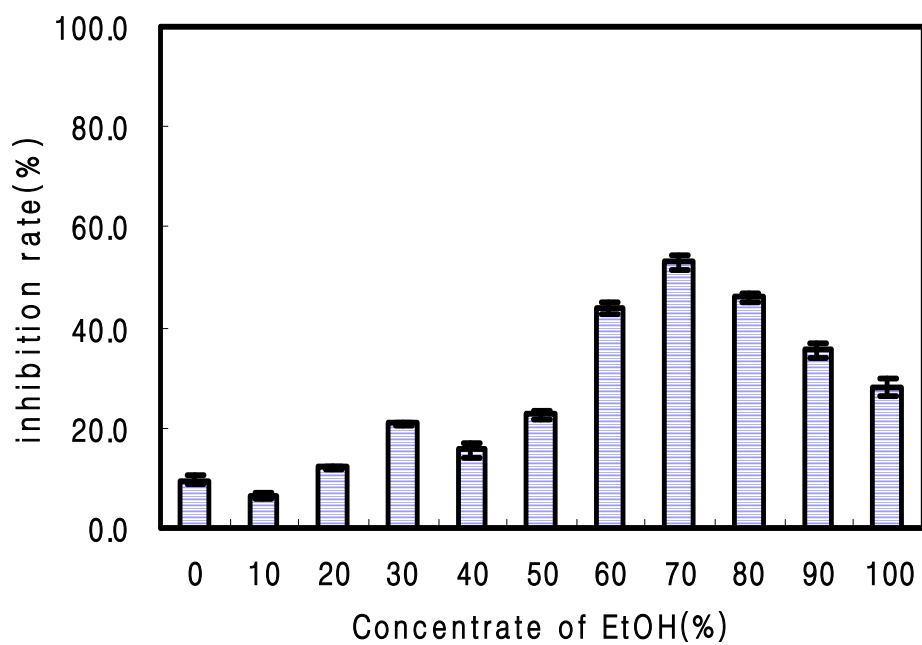


Fig. 10. Effect of inhibition on xanthine oxidase of ethanol extracts from *Rhododendron mucronulatum* Flos.

6. 에탄올 농도에 따른 진달래꽃 추출물의 항 당뇨 효과 측정

가. α -amylase 저해 측정

탄수화물 대사작용에 필수적인 효소인 α -amylase를 저해하는 물질을 여러 부위의 진달래 추출물로부터 탐색하였다. 그 결과 Fig. 11과 같이 0% 에탄올 추출물에서 75% 저해율로 가장 높은 α -amylase저해활성 효과를 나타내었으며 10~50% 에탄올 추출물까지 저해율이 감소하다가 60% ethanol 추출물에서 54%의 저해율로 조금 증가하다 다시 낮아지는 경향을 나타내었다.

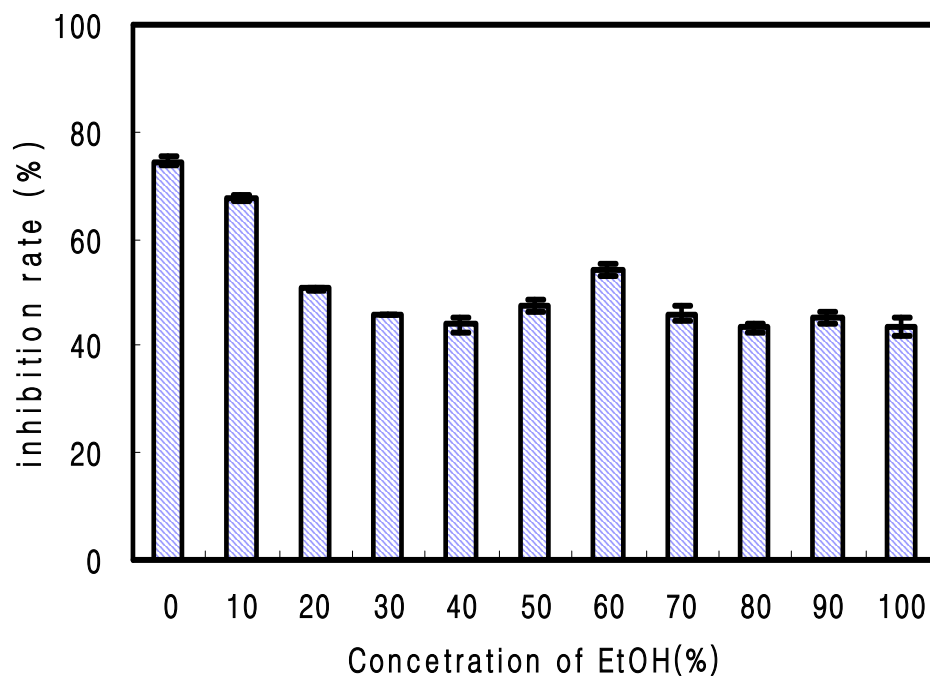


Fig. 11. Effect of inhibition on α -amylase of ethanol extracts from *Rhododendron mucronulatum* Flos.

나. α -glucosidase 저해 측정

효모기원의 α -glucosidase 활성 저해 효과를 측정한 결과 Fig. 12와 같이 40% ethanol 추출물에서 62%의 저해 활성으로 가장 높게 나타났으며, 60~100% ethanol 추출물에서 40%이상의 저해 활성을 나타내었다.

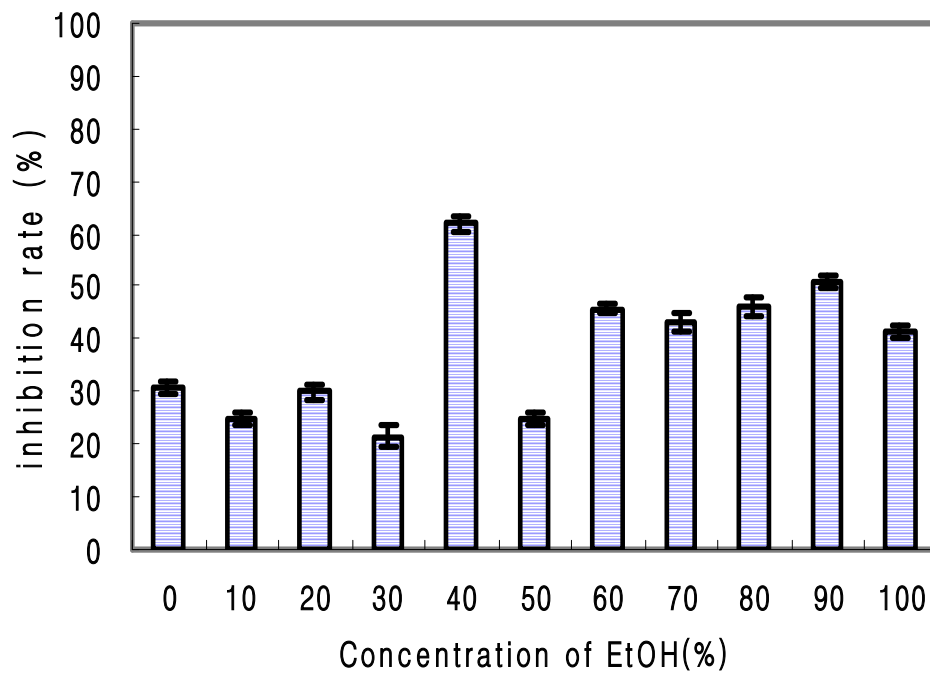


Fig. 12. Effect of inhibition on α -glucosidase of ethanol extracts from *Rhododendron mucronulatum* Flos.

7. 진달래 부위별 phenol성 물질의 함량

Phenol성 물질은 phenolic hydroxyl기를 가지기 때문에 단백질 및 기타 거대 분자들과 결합하는 성질을 가지며, 항산화 효과 등의 생리활성기능을 가지는 것으로 알려져 있어 진달래 각 부위별로 물과 ethanol을 이용하여 phenol성 물질을 추출하고, 그 추출물의 phenol 함량을 측정하였다. 그 결과, Table 2와 같이 물을 추출용매로 하였을 때 진달래 꽃에서 18.7 mg/g 으로 여러 부위 중 가장 높은 phenol 함량을 나타내었고, 다음으로 진달래 잎, 뿌리, 줄기 순으로 나타났다. 또한 60% 에탄올을 추출 용매로 하였을 때 꽃 추출물의 phenol 함량이 31.1 mg/g 으로 여러 추출물중 가장 높게 나타났으며, 물 추출물과 달리 60% 에탄올 추출물에서는 뿌리, 잎, 줄기 순으로 phenol 함량의 차이를 나타내었다. Choi는 홍차, 녹차, 한차의 총 페놀함량이 10.1, 9.5, 7.7 mg/g 라고 보고하여 본 실험에서 나타난 진달래꽃 추출물의 phenol 함량이 비교적 높음을 알 수 있었다.

Table 2. Phenol content with respective region of *Rhododendron mucronulatum* Flos

Solvent	Flower	Stem	Leaf	Root
Water	18.69 ± 1.45	2.23 ± 0.07	7.98 ± 0.40	4.06 ± 0.12
60% EtOH	31.12 ± 0.89	6.56 ± 0.12	7.53 ± 0.73	14.67 ± 0.34

8. 진달래 부위별 항산화 효과

가. DPPH 측정 결과

Kang 등은 전자공여능이 phenolic acids와 flavnoids 및 기타 phenol성 물질에 대한 항산화작용의 지표라 하였으며, 이러한 물질은 환원력이 큰 것 일수록 전자공여능이 높다고 하였다. DPPH는 아스코르빈산, 토코페롤, polyhydroxy 방향족 화합물, 방향족 아민류에 의하여 환원되어 짙은 자색이 탈색됨으로써 전자공여능의 차이 측정이 가능하다. 따라서 항산화물질의 전자공여능을 측정할 때는 DPPH 법이 편리하다고 알려져 있으나, 색소가 함유된 추출물의 경우 DPPH법의 적용에는 많은 경험이 요구된다. 항산화 효과의 지표라 할 수 있는 전자공여능을 측정한 결과 Table 3에서와 같이 물 추출물에서 꽃잎 추출물이 88.9%로 가장 높은 전자공여능을 나타내었고, 60% 에탄올 추출물에서는 모든 부위에서 75%이상의 전자공여능을 나타내었으며, 그 중 진달래 잎 추출물에서 91.9%로 가장 높은 전자공여능을 나타내었다.

Table 3. Effect of extracts with respective region of *Rhododendron mucronulatum* Flos on DPPH

Solvent	Flower	Stem	Leaf	Root
Water	88.9 ± 1.45	59.6 ± 0.07	77.9 ± 0.40	65.2 ± 0.12
60% EtOH	87.5 ± 0.89	75.8 ± 0.12	91.9 ± 0.73	83.5 ± 0.34

나. ABTS 측정 결과

ABTS radical cation decolorization은 Table 4와 같이 물과 60% 에탄올 추출물 모두 진달래 꽃잎 추출물이 98.6, 99.6%로 다른 부위에 비해 가장 높은 항산화력을 나타내었으며, 다음으로 잎 추출물이 각각 75.3, 99.0%로 나타났다. 또한 모든 부위에서 물 추출물보다 60% ethanol 추출물이 높은 항산화력을 나타내었다.

Table 4. Effect of extracts with respective region of *Rhododendron mucronulatum* Flos on ABTS

Solvent	Flower	Stem	Leaf	Root
Water	98.6 ± 1.45	22.1 ± 0.07	75.3 ± 0.40	40.2 ± 0.12
60% EtOH	99.6 ± 0.89	65.1 ± 0.12	99.0 ± 0.73	92.1 ± 0.34

다. Antioxidant protection factor 측정 결과

진달래 추출물의 항산화 효과를 β -carotene linoleate system을 이용하여 조사한 결과 Table 5와 같이 물 추출물에서는 뿌리를 제외한 꽃, 줄기, 잎에서 각각 1.35, 1.23, 1.75 PF로 1.20 이상의 높은 PF 값을 나타내었으며, 60% 에탄올 추출물에서는 줄기와 잎 추출물이 1.38, 1.52 PF로 다른 부위보다 높은 PF 값을 나타내어 지용성 물질에 대한 항산화력이 우수한 것으로 나타났다.

Table 5. Effect of extracts with respective region of *Rhododendron mucronulatum* Flos on antioxidant protection factor

Solvent	Flower	Stem	Leaf	Root
Water	1.35 ± 1.45	1.23 ± 0.07	1.75 ± 0.40	1.00 ± 0.12
60% EtOH	1.38 ± 0.89	1.38 ± 0.12	1.52 ± 0.73	1.18 ± 0.34

라. TBARs 측정 결과

진달래 추출물을 이용하여 산화과정 중 과산화물은 저분자화합물로 점차 분해되며 이러한 화합물 중 하나인 malondialdehyde의 함량을 측정하여 항산화력을 알아본 결과 Table 6과 같이 물 추출물에서는 진달래 꽃과 잎이 각각 36.2, 42.3%의 항산화력을 나타내었으며, 60% 에탄올 추출물에서는 잎에서 83.3%로 여러 추출물 중 가장 높은 항산화력을 나타내었다.

Table 6. Effect of extracts with respective region of *Rhododendron mucronulatum* Flos on TBARs

Solvent	Flower	Stem	Leaf	Root
Water	36.2 ± 1.45	0 ± 0.07	42 ± 0.40	4.3 ± 0.12
60% EtOH	47.8 ± 0.89	0 ± 0.12	83 ± 0.73	69.6 ± 0.34

9. 진달래 부위별 *Helicobacter pylori* 항균활성 측정

*H. pylori*에 대한 항균물질을 탐색하고자 진달래 부위별로 채취하여 그 추출물의 항균 활성에 대한 실험을 하였다. 그 결과 Table 7과 같이 물 추출물에서는 모든 부위 추출물에서 저해 활성이 나타나지 않았으며, 60% EtOH 추출물에서는 꽃 추출물이 phenol 화합물 50 µg/0.1mL 주입시부터 200 µg/0.1mL 주입하였을 때 각각 10, 15, 19, 22 mm의 저해환을 나타내었다.

Table 7. Effect of extracts with respective region of *Rhododendron mucronulatum* Flos against *Helicobacter pylori*

Sample	Water extracts					60% EtOH extracts				
	Clear zone(mm)					Clear zone(mm)				
	Phenol content(µg/0.1mL)					Phenol content(µg/0.1mL)				
	0	50	100	150	200	0	50	100	150	200
Flower	-	-	-	-	-	-	10 ± 1.4	15 ± 1.2	19 ± 1.1	22 ± 1.5
Stem	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Leaf	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Root	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

10. 진달래 부위별 항 고혈압 효과 측정

인체 내에서 ACE는 renin에 의하여 생성된 decapeptide인 angiotensin I로부터 C-말단의 dipeptide (His-Leu)를 가수분해시킴으로써 강력한 혈관수축작용을 나타내는 angiotensin II를 생성하고 고혈압의 원인이 되고 있다. 이러한 ACE의 저해인자로서는 저분자 peptide들과 그 유도체들, 차(tea)에 존재하는 catechin과 메밀의 rutin같은 polyphenol 성분들이 대표적으로 알려져 있다. 생리활성 성분들 중 flavonoids와 catechin 등은 polyphenol류에 속하는 물질로써 항균작용은 물론 항고혈압 등의 생리활성을 나타내는데, 이는 한 분자 내에 2개 이상의 phenolic hydroxyl기를 가진 방향족 화합물로서 식품계에 다량으로 존재하며 높은 극성과 열, pH에 대해 민감하게 작용한다고 하였다. 이에 진달래 추출물의 항고혈압효과를 살펴본 결과 Table 8과 같이 물 추출물에서는 진달래 잎 추출물에서 55.1%의 ACE저해 효과를 나타내었으며, 60% ethanol 추출물에서는 모든 부위에서 50% 이상의 저해율로 물 추출물 보다 높은 저해율을 나타내었으며, 그중 뿌리 추출물이 69.4%로 가장 높은 저해율을 나타내었다. 일반적으로 phenol 유래의 화합물과 단백질과의 결합은 단백질의 아미드 결합과 페놀성 수산기간의 수소결합에 의한 반응으로 단백질과 복합체의 침전물을 형성한다. 이런 현상은 pH, 이온강도, 단백질 및 phenol 농도에 의한 상호작용으로 비경쟁적 효소를 저해함으로써 효소의 용해성 및 안정성을 저하, 효소 불활성화를 일으키는 것으로 판단되었다.

Table 8. Effect of inhibition on angiotensin converting enzyme by extracts with respective region of *Rhododendron mucronulatum* Flos

Solvent	Flower	Stem	Leaf	Root
Water	3.6 ± 1.45	19.8 ± 0.07	55.1 ± 0.40	—
60% EtOH	65.8 ± 0.89	52.7 ± 0.12	60.1 ± 0.73	69.4 ± 0.34

11. 진달래 부위별 향 관절염 효과 측정

통풍은 생합성에 의한 purine 뉴클레오티드의 과다생성을 일으키는 여러 가지 대사이상에 기인하는 요산의 과다 생성이 원인이다. 이러한 요산을 생성하는 xanthine oxidase에 대한 활성 저해 능력을 측정한 결과 Table 9와 같이 물 추출물에서는 15% 이하의 낮은 저해효과를 나타내었으며, 60% 에탄올 추출물에서는 진달래 꽃과 잎이 각각 43.9, 43.7%의 xanthine oxidase에 대한 저해효과를 나타내어, 물 추출물은 gout의 예방 또는 생약 치료물질로 활용하기에 어려울 것이나, 60% 에탄올 추출물의 경우 정제를 통하면 활용이 가능할 것으로 판단된다.

Table 9. Effect of inhibition on xanthine oxidase by extracts with respective region of *Rhododendron mucronulatum* Flos

Solvent	Flower	Stem	Leaf	Root
Water	9.6 ± 1.45	2.5 ± 0.07	13.1 ± 0.40	—
60% EtOH	43.9 ± 0.89	8.5 ± 0.12	43.7 ± 0.73	—

12. 진달래 부위별 항 당뇨 효과 측정

가. α -amylase 저해 측정

탄수화물 대사작용에 필수적인 효소인 α -amylase를 저해하는 물질을 여러 부위의 진달래 추출물로부터 탐색하였다. 그 결과 Table 10과 Fig. 13, 14와 같이 진달래꽃은 물과 60% 에탄올 추출물 모두 50%이상의 저해활성을 나타내었으며, 줄기, 잎, 뿌리 추출물들은 40%이하의 저해활성을 나타내었다. 모든 추출물 중 진달래 꽃 열수 추출물이 75.6%의 저해 활성으로 가장 높은 활성을 나타내었다.

Table 10. Effect of inhibition on α -amylase by extracts with respective region of *Rhododendron mucronulatum* Flos

Solvent	Flower	Stem	Leaf	Root
Water	75.6 \pm 1.45	30.3 \pm 0.07	34.4 \pm 0.40	14.6 \pm 0.12
60% EtOH	54.1 \pm 0.89	27.5 \pm 0.12	35.7 \pm 0.73	6.0 \pm 0.34

나. α -glucosidase 저해 측정

진달래 부위별 추출물의 α -glucosidase 활성 억제 효과를 살펴본 결과 Table 11과 같이 물 추출물에서는 진달래 잎과 뿌리, 60% 에탄올 추출물에서는 꽃과 잎 추출물이 40% 이상의 활성 억제 효과를 나타내었다. 추출물들의 phenolic 물질이 α -glucosidase 활성을 억제 하는 것은 전분 소화의 최종단계에 작용하는 acarbose 같은 당뇨병 치료제가 가지는 단점을 보완하고 부작용을 해결 할 수 있는 당뇨병 치료제로 이용이 가능 할 것으로 판단되어진다.

Table 11. Effect of inhibition on α -glucosidase by extracts with respective region of *Rhododendron mucronulatum* Flos

Solvent	Flower	Stem	Leaf	Root
Water	30.6 \pm 1.45	12.9 \pm 0.07	48.4 \pm 0.40	48.7 \pm 0.12
60% EtOH	45.8 \pm 0.89	21.4 \pm 0.12	45.4 \pm 0.73	30.8 \pm 0.34

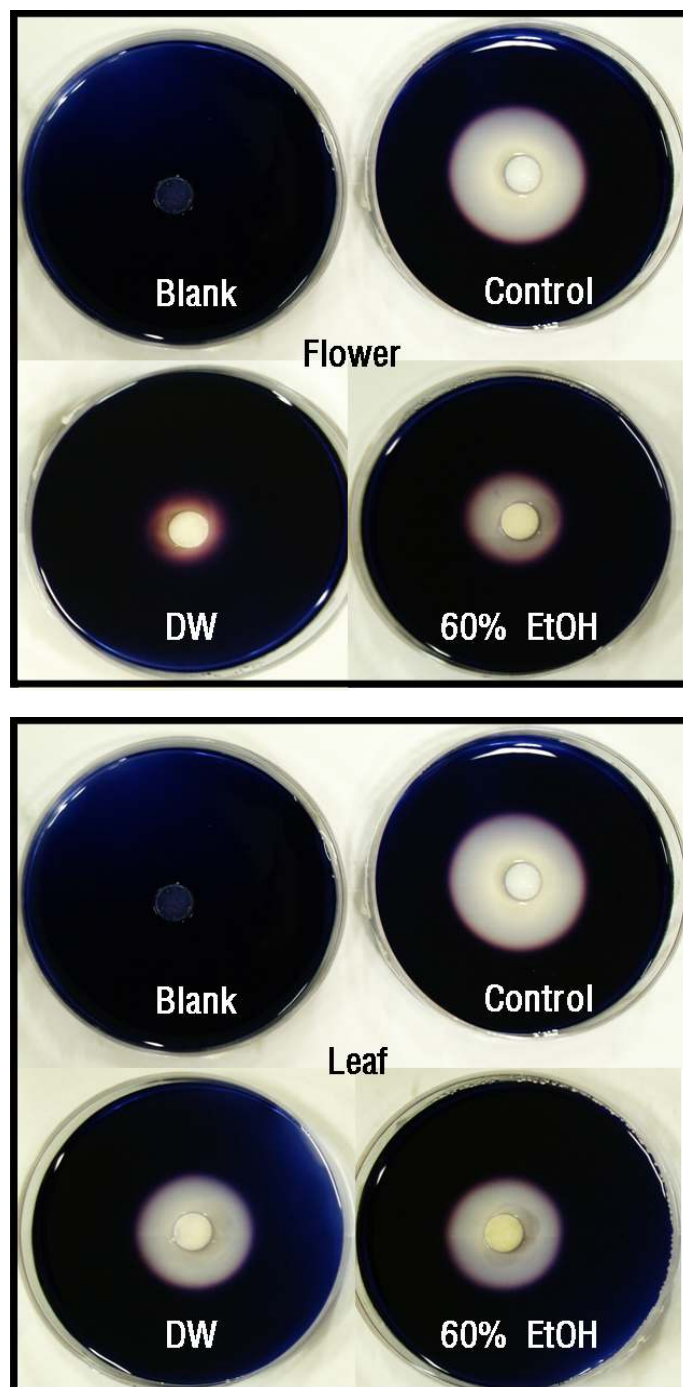


Fig. 13. Effect of inhibition on α -amylase by extracts with respective region of *Rhododendron mucronulatum* Flos. (1)

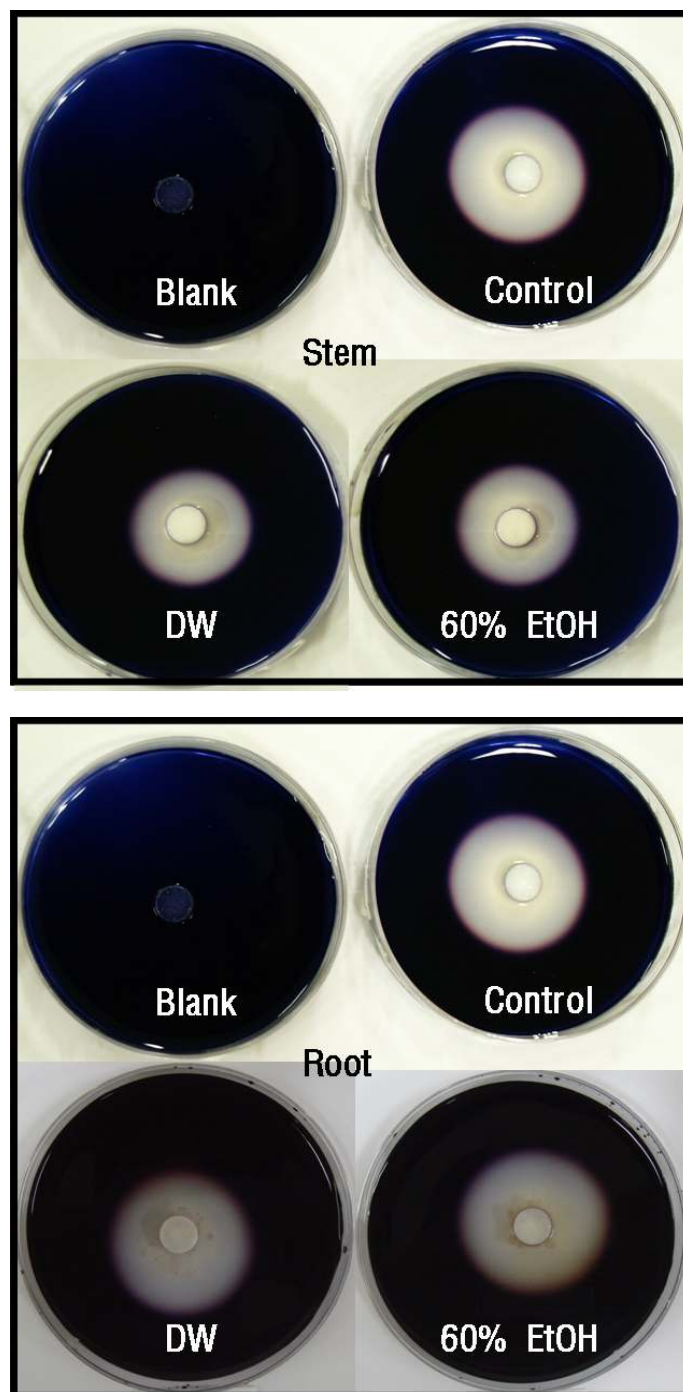


Fig. 14. Effect of inhibition on α -amylase by extracts with respective region of *Rhododendron mucronulatum* Flos. (2)

13. 진달래 추출물의 분리

진달래 500 g을 60% 에탄올로 추출한 후, Fig. 15~17과 같이 sephadex LH-20 column chromatography (pamachia. G)를 이용하여 ethanol : D.water (1 : 6, v / v)로 용출시키고, 용출액은 silica TLC plate를 이용하여 전개시킨 후 10% H₂SO₄로 발색시켜 확인, 분획한 결과 Fig. 15와 같이 A, B, C, D, E, F로 6개의 분획물을 얻었으며, 각 분획물의 페놀함량을 측정된 결과 Table 12와 같이 fraction F에서 285.6 µg/mL로 가장 높은 phenol 함량을 나타내었다.

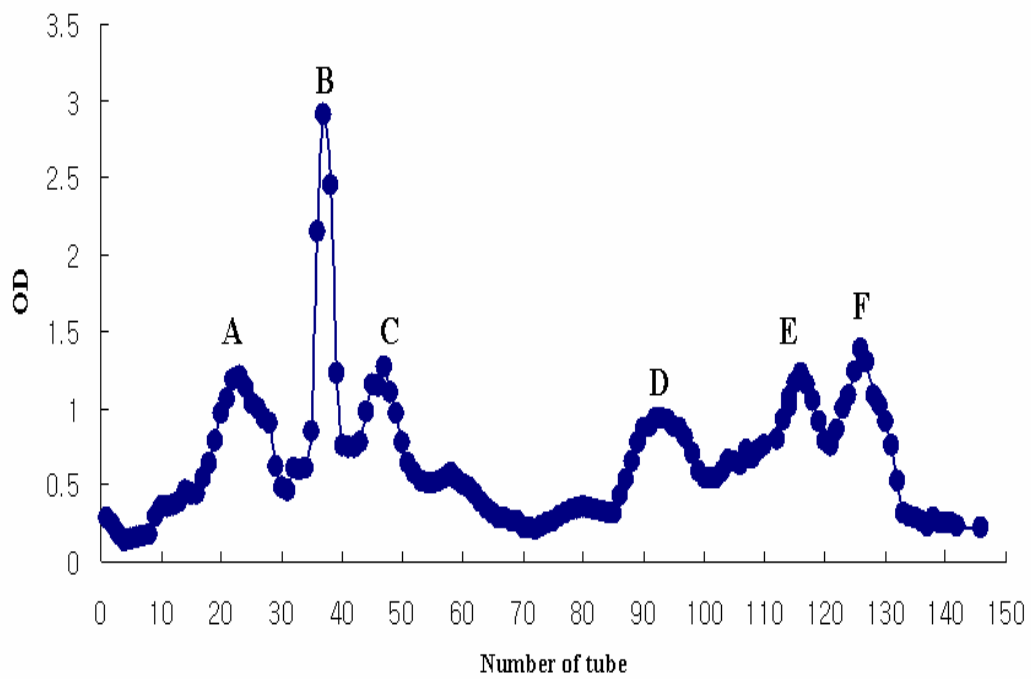


Fig. 15. Purification of phenolic compound from *Rhododendron mucronulatum* Flos extract by Sephadex LH-20.

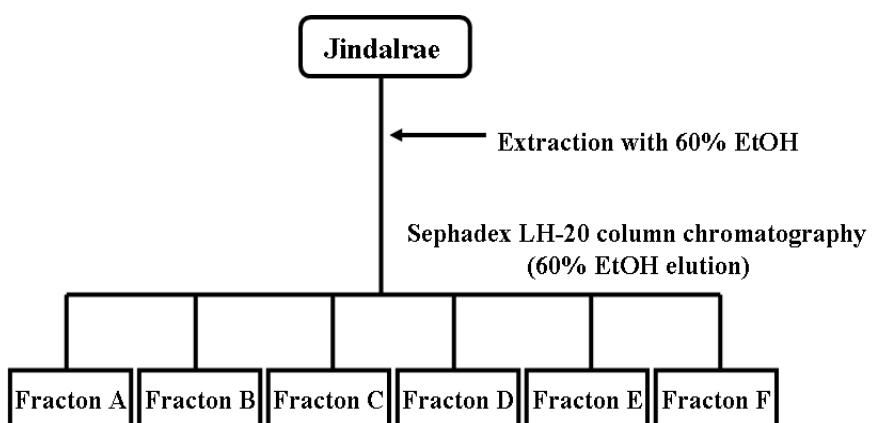


Fig. 16. A procedure for isolation of phenolic compounds from *Rhododendron mucronulatum* Flos.

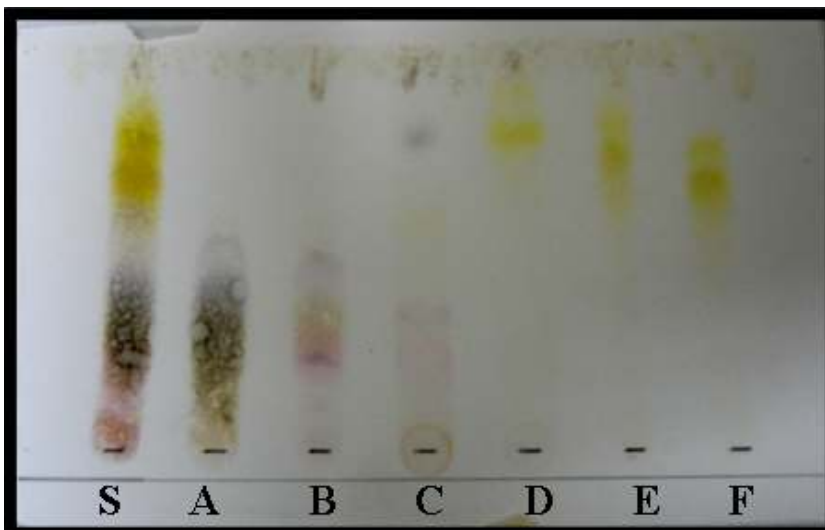


Fig. 17. Thin layer chromatography of phenolic compounds fraction from *Rhododendron mucronulatum* Flos.

Developing solvent – CHCl_3 : BuOH : H_2O : Acetic acid : MeOH
(10 : 6 : 2 : 1 : 3, v/v/v/v)

Detector reagent – 10% H_2SO_4

S – *Rhododendron mucronulatum* Flos extracts

A~F : Fraction

Table 12. Concentration of phenol compound from fraction by Sephadex LH-20

Fraction Number	Phenol content ($\mu\text{g/mL}$)
A	277.7 ± 0.14
B	283.0 ± 1.02
C	87.9 ± 1.02
D	53.8 ± 0.39
E	238.1 ± 0.39
F	285.6 ± 0.54

14. 진달래 분획물의 생리활성 검정

가. 항 고혈압 효과 측정

진달래 분획물을 angiotensin converting enzyme에 대한 저해 활성을 측정한 결과 Fig. 18과 같이 C, E 분획물에서 60% 이상의 저해활성을 나타내었고, 분획물 C가 74%의 저해 활성으로 여러 분획물 중 가장 높게 나타났다.

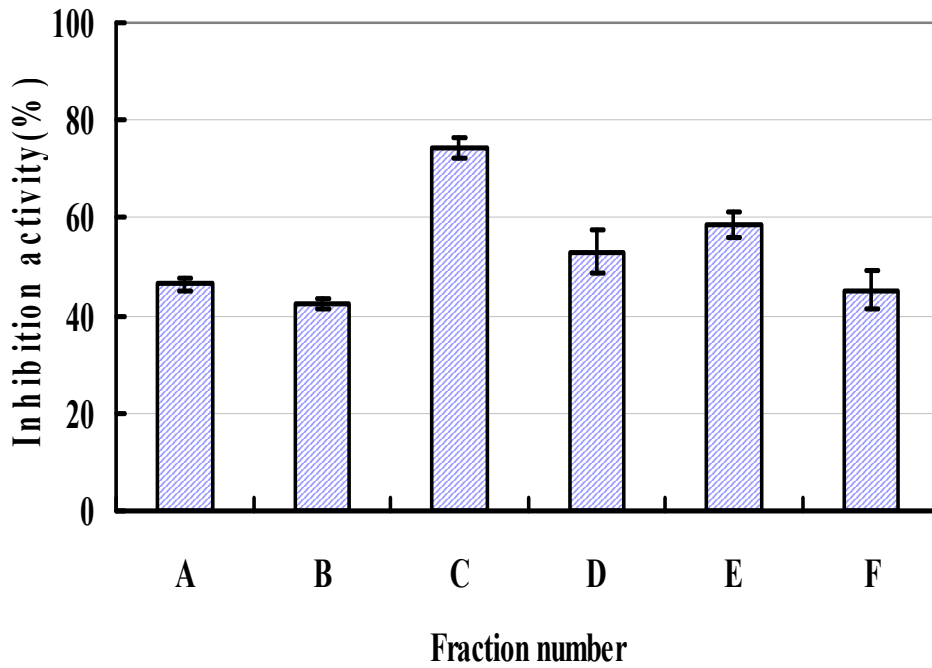


Fig. 18. Effect of inhibition on angiotensin converting enzyme of fraction from *Rhododendron mucronulatum* Flos.

나. 항 관절염 효과 측정

진달래 분획물을 xanthin oxidase에 대한 저해 활성을 측정한 결과 Fig. 19와 같이 fraction A가 30.2%의 저해활성으로 여러 분획물 중 가장 높은 저해활성을 나타내었다.

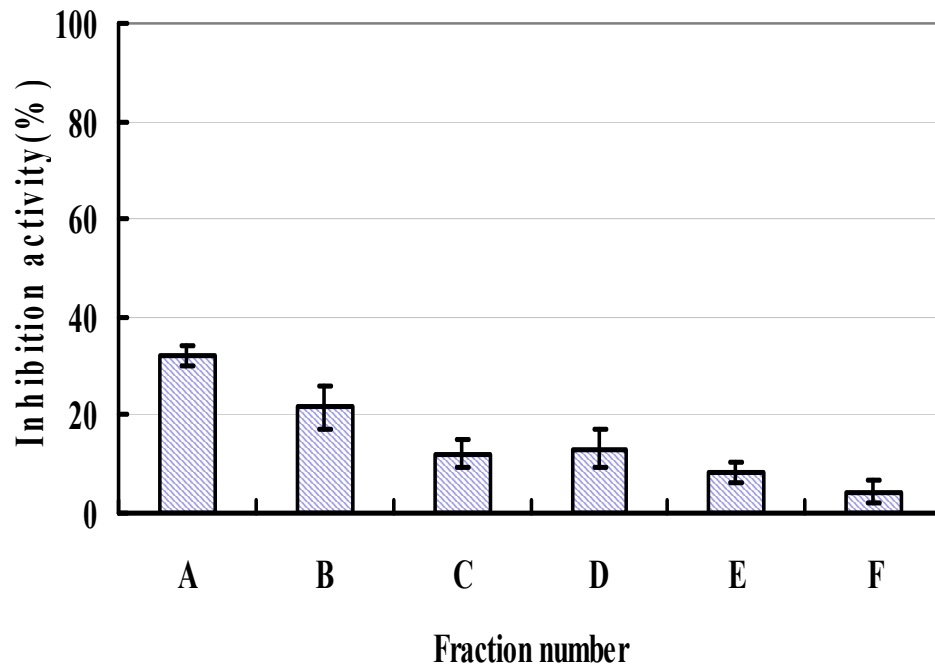


Fig. 19. Effect of inhibition on xanthin oxidase of fraction from *Rhododendron mucronulatum* Flos.

다. 항 당뇨 효과 측정

1) α -Amylase 저해활성 측정

각 분획물을 이용하여 α -Amylase 저해 활성을 측정한 결과 Fig. 20과 같이 분획물 A가 50% 이상, B가 80% 이상의 저해활성을 나타내었다.

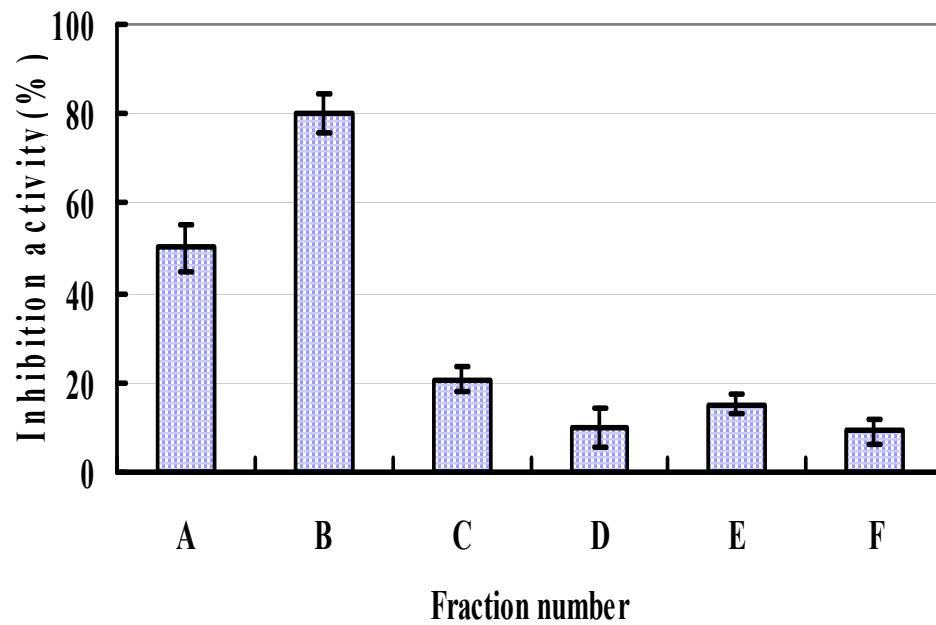


Fig. 20. Effect of inhibition on α -amylase of fraction from *Rhododendron mucronulatum* Flos.

2) α -Glucosidase 저해 활성 측정

각각의 분획물을 이용하여 α -glucosidase 저해 활성을 측정한 결과 Fig. 21과 같이 α -amylase 저해 활성이 50%이상으로 나타난 A분획물에서는 α -glucosidase 저해 활성이 나타나지 않았으며, B분획물에서 25%의 저해율을 나타내었다. phenolic 물질을 함유한 식물 추출물을 분리할 경우 특정 분획물 내에서 효소저해가 높게 나타난다는 Hulme과 Johnes의 보고와 일치 하였다.

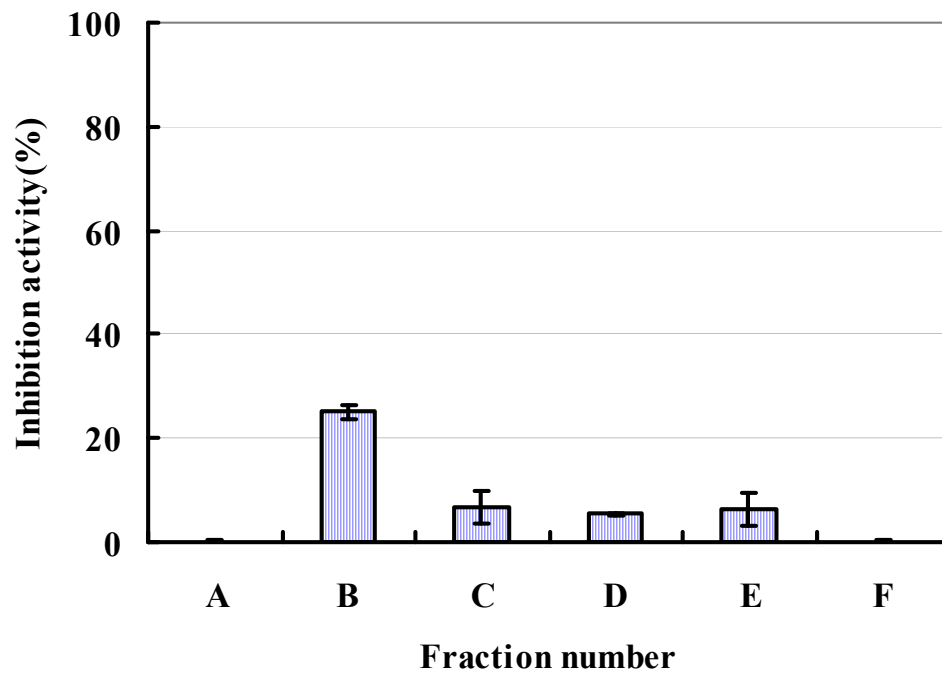


Fig. 21. Effect of inhibition on α -glucosidase of fraction from *Rhododendron mucronulatum* Flos.

라. *Helicobacter pylori* 항균활성 측정

*Helicobacter*는 사람과 동물에게 장염, 위염, 유산을 일으키며, *Helicobacter*들은 숙주 동물이나 감염부위가 약간씩 상이하다. 인체에서 가장 많은 감염을 일으키는 것은 *H. pylori*로 위점막에 주로 존재하며, 위궤양, 십이지장궤양, 위암 등의 원인 균으로 알려져 있다. 이러한 균에 대하여 진달래 추출물을 분획하여 그 분획물이 가지는 *H. pylori*에 대한 항균활성을 측정하였다. 그 결과 Table 13, Fig. 22와 같이 C, D 그리고 E 분획물이 각각, 11, 18, 13 mm의 저해환을 나타내었다. 이러한 활성 분획물을 정제하여 *H. pylori*에 대한 항균활성을 가지는 물질을 동정하고 이를 식품 및 의약품으로서 응용하기 위한 연구가 지속되어야 될 것이다.

Table 13. Inhibitory activity of *Rhododendron mucronulatum* Flos extracts fraction with sephadex LH-20 against *Helicobacter pylori*

Fraction of <i>Rhododendron mucronulatum</i> Flos extracts	Clear zone(mm)
	content of phenol compounds($\mu\text{g}/\text{m}l$)
	200
W(control)	ND
A	ND
B	ND
C	11
D	18
E	13
F	ND

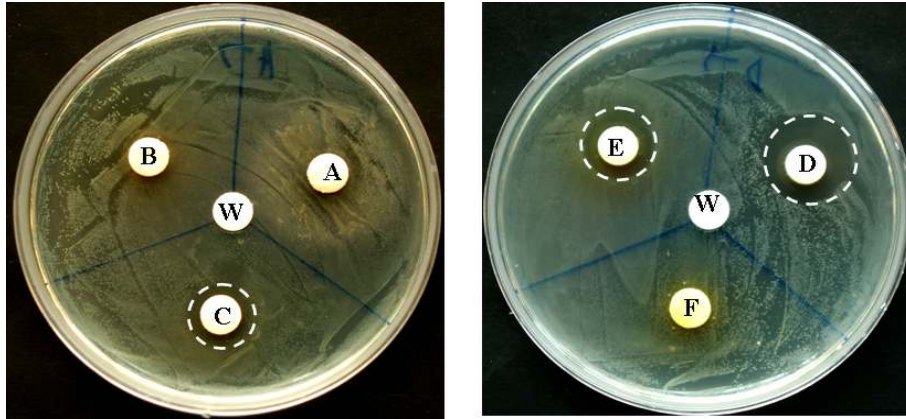


Fig. 22. Inhibitory activity of *Rhododendron mucronulatum* Flos extracts fraction with sephadex LH-20 against *Helicobacter pylori*.

A~F : fraction from *Rhododendron mucronulatum* Flos extracts

W : control

15. 진달래 추출물로부터 *Helicobacter pylori*균 저해 물질 분리 및 정제

식품위생법규상으로 food-borne pathogen으로 *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni*, *Colstridium perfringens*, *C. botulinum*, *E. Coli* O157:H7, *Listeris monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* 등이 주로 관리되고 있으나 *Campylobacter*에 의한 감염은 미국, 영국, 호주 등의 서구 선진국의 경우 *Salmonella*, *E.coli* O157:H7 등의 food-borne pathogen과 비교 했을 때 유사하거나 계속해서 증가하고 있는 추세이다. 이와 같은 *Campylobacter*는 분류학적으로 *Arcobacter*, *Helicobacter* 등과 같이 rRNA super family VI로 분류되고 있다. 그러나 최근에는 이들 *Arcobacter*, *Helicobacter*도 식중독 및 위암들의 건강장애를 유발시키고 있는 것으로 알려지고 있으며, 국내에서는 그 연구가 선진국에 비해 그리 활발히 진행되고 있지 않아 전체 장염환자의 0.4~30.5%까지 분리율을 나타낸다는 보고가 있어 국내에서도 역시 그 유해성은 증대되고 있는 실정이다. *H. pylori*는 *Campylabacter*와 마찬가지로 생육 조건이 어렵게 되면 coccoid 형태의 VBNC 형태로 아주 오랜 기간 생존할 수 있다. 식품 중에 오염되어 VBNC 상태로 있을 때에는 균의 검출이 어려워 PCR에 의한 검출이 요망된다. 이렇듯 제 1 발암물질이라 불리는 *Helcobacter pylori*균의 감염을 줄이고 그 균의 생육을 저해 시킬 수 있는 식품이나 의약품 개발이 지속적으로 이루어 져야 할 것이다. 그 연구의 일환으로 *Helcobacter pylori*균에 대한 항균활성을 나타내는 진달래 추출물을 분획하고 그 분획물을 정제 및 동정하고자 하였다.

가. 추출물의 용매 분획

60% 에탄올을 이용하여 진달래꽃을 추출하고 그 추출물을 sephadex LH-20 column chromatography 한 결과 활성성분인 D fraction을 모아 농축, 동결건조 한 후 Fig. 23과 같이 ethyl acetate, butanol, aqueous를 이용하여 용매 분획하여 *H. pylori*균에 대한 분획물이 가지는 항균활성을 측정하였다 그 결과 Table 14, Fig. 24와 같이 ethyl acetate 층과 butanol층에서 각각, 14, 18 mm의 저해환을 나타내었다. 이 분획물들을 CHCl_3 : BuOH : H_2O : Acetic acid : MeOH = 50 : 30 : 10 : 5 : 15 전개용매 조건으로 thin layer chromatography를 한 결과 Fig. 25와 같이 ethyl acetate와 butanol 층에서 동등한 RT값을 나타내는 물질이 활성 물질인 것으로 추정되었으며, butanol 층의 항균활성이 가장 높아 butanol 층을 sephadex LH-20 column을 이용하여 분획하였다.

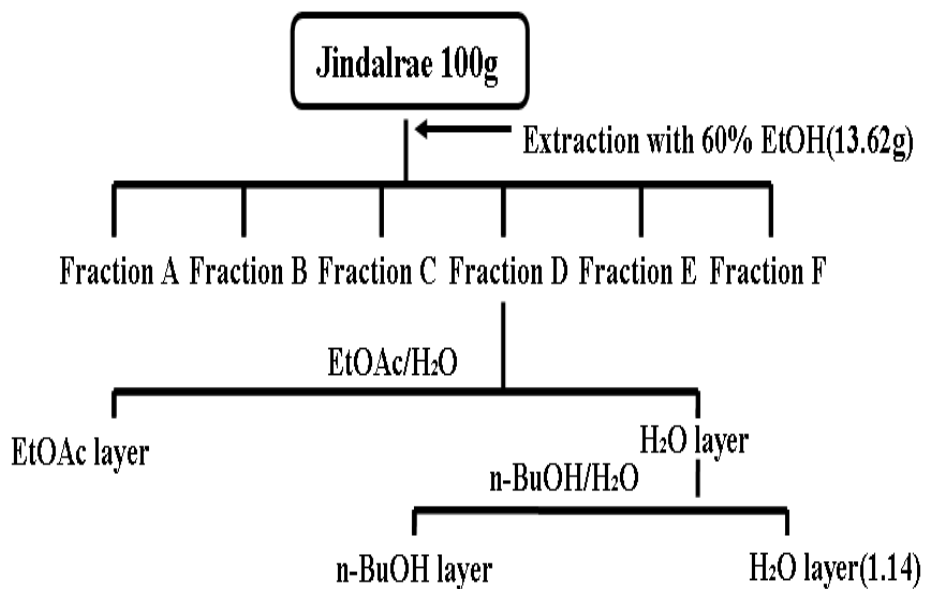


Fig. 23. Fractionation procedure from *Rhododendron mucronulatum* Flos.

Table 14. Inhibitory activity of *Rhododendron mucronulatum* Flos extracts fraction with solvent against *Helicobacter pylori*

Content of ethanol	Clear zone(mm)
	content of phenol compouds($\mu\text{g}/\text{m}l$)
	200
Control	ND
Ethyl acetate layer	14
Butanol layer	18
Aqueous	ND

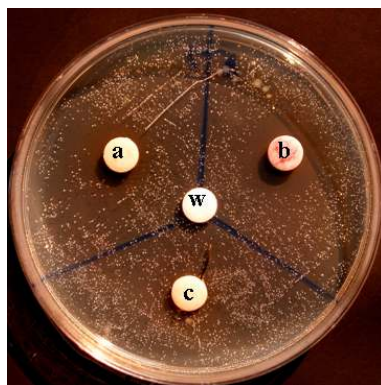


Fig. 24. Inhibition activity of *Rhododendron mucronulatum* Flos extracts fraction.

a : Ethylacetate layer

b : Butanol layer

c : Aqueous layer

w : Control

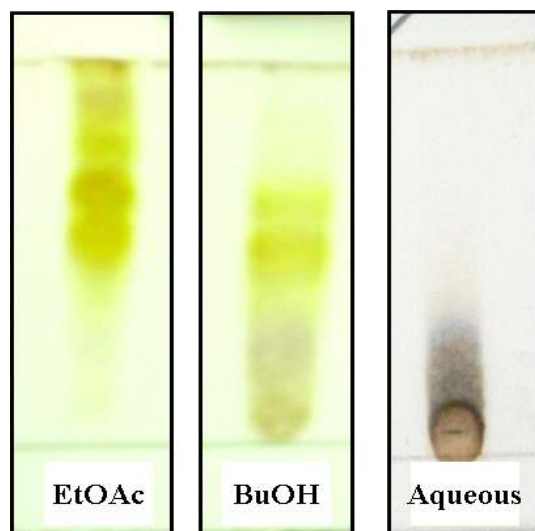


Fig. 25. Thin layer chromatography of fraction with solvent.

Developing solvent – CHCl_3 : BuOH : H_2O : Acetic acid : MeOH
(10 : 6 : 2 : 1 : 3, v/v/v/v)

Detector reagent – 10% H_2SO_4

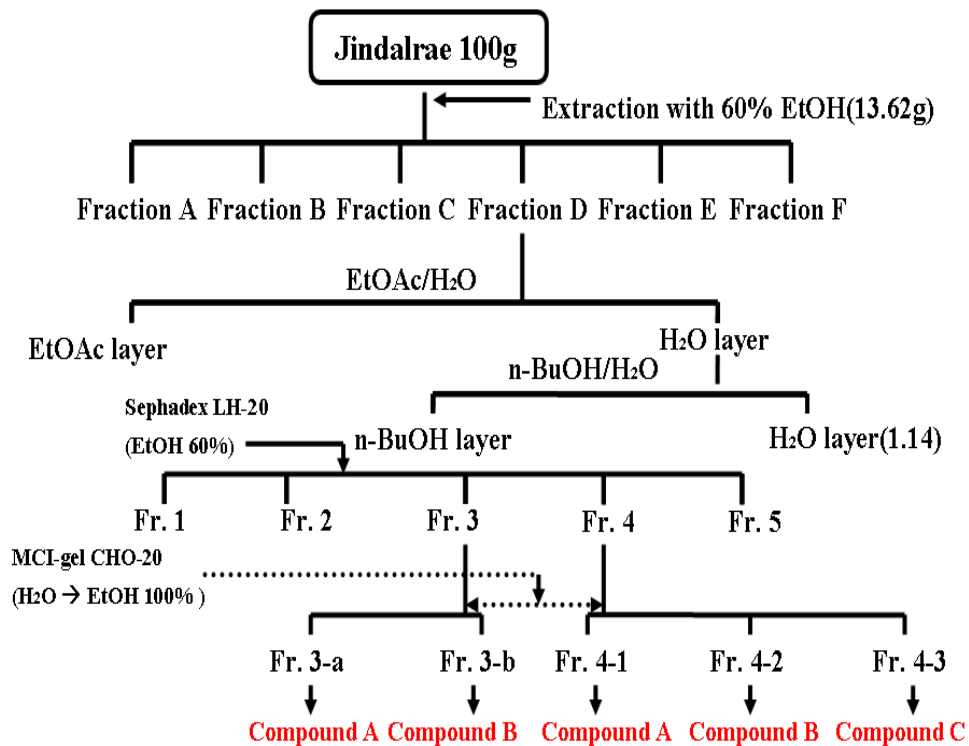


Fig. 26. Isolation procedure of 60% ethanol extracts from *Rhododendron mucronulatum* Flos.

나. *Helicobacter pylori* 저해 물질의 정제

Butanol 층의 항균활성이 가장 높아 butanol 층을 sephadex LH 20 column으로 100% ethanol에서 0%까지 추출용매로 하여 gradient로 elution 하였다. 그 결과 Fig. 26과 같이 Fr. 1에서 Fr. 5의 5가지 분획물을 얻을 수 있었으며, 각 분획물을 농축하여 100 mL로 맞추고, 각각의 페놀 화합물의 함량을 측정한 결과 Table 15와 같이 Fr. 3이 200.1 μ g/mL, Fr. 4가 192.8 μ g/mL, 순으로 높게 나타났다. 각 분획물의 항균활성을 측정한 결과 역시 Fr. 3과 Fr. 4에서 항균활성을 나타내어 이 두 분획물을 선택하여 구조적 이성질체 phenol류 분리가 용이한 MCI-gel을 이용하여 reverse phase type인 H₂O→EtOH로 농도를 증가 시키며 용출한 결과 Fig. 26과 같이 6 종류 comp. A~comp. F로 분리하고 CHCl₃ : BuOH : H₂O : Acetic acid : MeOH = 50 : 30 : 10 : 5 : 15 전개용매 조건으로 thin layer chromatography를 한 결과 Fig. 27과 같이 단일 밴드를 형성하였다.

Table 15. Concentration of phenol compound from fraction by Sephadex LH-20

Fraction Number	Phenol content (μ g/mL)
Fr. 1	48.2 \pm 0.25
Fr. 2	187.6 \pm 0.69
Fr. 3	200.1 \pm 0.57
Fr. 4	192.8 \pm 0.14
Fr. 5	87.8 \pm 0.11

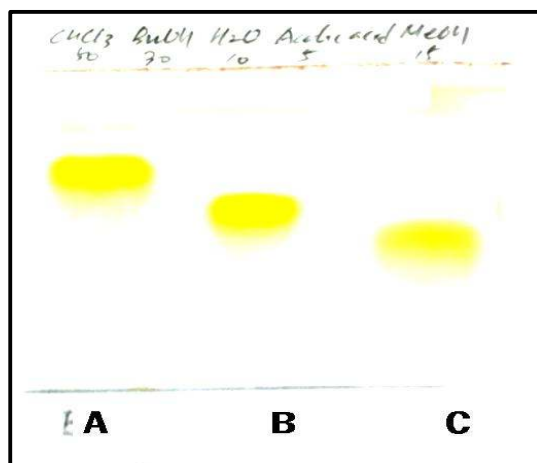


Fig. 27. Thinlayer chromatography of compounds isolated from *Rhododendron mucronulatum* Flos.

Developing solvent – CHCl₃ : BuOH : H₂O : Acetic acid : MeOH
(10 : 6 : 2 : 1 : 3, v/v/v/v)

Detector reagent – 10% H₂SO₄

다. 정제 활성 물질의 구조 동정

1) Compound A

Compound A는 연한 황색의 분말상이었으며, melting point는 240°C였고, FAB-MS spectrum 상에서 분자량 449를 나타내었다. IR spectrum에서는 3455(OH), 1657(C=O), 1611(conjugated diene), 1512(phenyl), 1455(rhamnosyl CH₃) 및 1060(ether) 등이 확인되었으며, ¹H NMR spectrum에서 7.39 ppm(1H, d, J=2 Hz, H-2'), 7.36 ppm(1H, dd, J=2, 8 Hz, H-6'), 6.92 ppm(1H, d, J=8 Hz, H-5'), 6.41 ppm(1H, d, J=2 Hz, H-8), 6.25 ppm(1H, d, J=2 Hz, H-6), 5.36 ppm(1H, d, J=2 Hz, H-1''), 4.25 ppm(1H, dd, J=2, 3 Hz, H-2''), 3.75 ppm(1H, dd, J=3, 9 Hz, H-3''), 3.42~3.46 ppm(1H, m, H-4''), 3.38~3.32 ppm(1H, m, H-5'') 및 0.96 ppm(3H, d, J=6 Hz, H-6'')이 관찰되었고, ¹³C NMR에서 158 ppm(s, C-2), 137 ppm(s, C-3), 179 ppm(s, C-4), 169 ppm(s, C-5), 101 ppm(d, C-6), 167 ppm(s, C-7), 95 ppm(d, C-8), 158 ppm(s, C-9), 106 ppm(s, C-10), 123 ppm(s, C-1'), 117 ppm(d, C-2'), 146 ppm(d, C-3'), 149 ppm(s, C-4'), 117 ppm(d, C-5'), 122 ppm(d, C-6'), 104 ppm(d, C-1''), 73 ppm(d, C-2''), 72 ppm(d, C-3''), 74 ppm(d, C-4''), 71 ppm(d, C-5'') 및 18 ppm(q, C-6'')이 확인되어 정 등의 분석결과와 비교한 결과 compound A는 quercetin (quercetin-3-O-rhamnopyranoside)으로 동정하였다.

2) Compound B

Compound B는 연한 황색의 분말 형태이었으며, melting point는 270°C 정도였고, FAB-MS spectrum 상에서 분자량 465를 나타내었다. IR spectrum상에서 3400(OH), 1662(C=O), 1605(conjugated diene), 1508(phenyl), 1463(rhamnosyl CH₃) 및 1063(ether) 등이 확인되었고, ¹H NMR spectrum에서 7.18 ppm(2H, s, H-2', H-6'), 6.41 ppm(1H, d, J=2 Hz, H-8), 6.20 ppm(1H, d, J=2 Hz, H-6), 5.36 ppm(1H, d, J=2 Hz, H-1"), 4.20 ppm(1H, dd, J=2, 3 Hz, H-2"), 3.76 ppm(1H, dd, J=3, 9 Hz, H-3"), 3.38~3.31 ppm(2H, m, H-4", H-5") 및 1.01 ppm(3H, d, J=6 Hz, H-6")이 확인되었고, ¹³C NMR spectrum에서 159 ppm(s, C-2, C-9), 136 ppm(s, C-3), 181 ppm(s, C-4), 163 ppm(s, C-5), 100 ppm(d, C-6), 166 ppm(s, C-7), 95 ppm(d, C-8), 105 ppm(s, C-10), 122 ppm(s, C-1'), 108 ppm(d, C-2', C-6'), 146 ppm(d, C-3', C-5), 135 ppm(s, C-4'), 103 ppm(d, C-1"), 74 ppm(d, C-2"), 72 ppm(d, C-3"), 73 ppm(d, C-4"), 71 ppm(d, C-5") 및 17 ppm(q, C-6")이 확인되어 정 등의 분석결과와 비교한 결과 compound B는 myricitrin (myricetin-3-O-rhamnopyranoside)로 동정하였다.

3) Compound C

Compound C는 황색의 crystal을 형성하였고 melting point는 313~314°C였으며, FAB-MS spectrum상에서 분자량이 303을 나타내었다. IR spectrum에서는 3382에서 OH기가, 1667에서 unsaturated ketone기가 검출되었으며, 1615 및 1509에서 aromatic C=C가 관찰되었다. $^1\text{H-NMR}$ spectrum에서는 12.71 ppm(1H, br s, C-5-OH), 7.71 ppm(1H, d, J=8 Hz, H-2'), 7.56 ppm(1H, dd, J=2, 8 Hz, H-6'), 6.82 ppm(1H, d, J=16 Hz, H-5'), 6.39 ppm(1H, d, J=2 Hz, H-8) 및 6.16 ppm(1H, d, J=2 Hz, H-6)이 확인되었고, $^{13}\text{C-NMR}$ 에서 178 ppm(C-4), 164 ppm(C-7), 160 ppm(C-5), 156 ppm(C-9), 146 ppm(C-4'), 148 ppm(C-2), 145 ppm(C-3'), 136 ppm(C-3), 122 ppm(C-1'), 116 ppm(C-5'), 115 ppm(C-2'), 103 ppm(C-10), 98 ppm(C-6) 및 94 ppm(C-8)등이 관찰되었다. 이상의 결과로 정 등과 treatise on asian herbal medicines에 나오는 분석결과와 일치하여 compound C는 quercetin으로 동정하였다.

4) 정제한 compound의 *Helicobacter pylori* 저해 효과

정제한 물질 compound A, B, C를 사용하여 *Helicobacter pylori*에 대한 항균효과를 알아보기 위해 disc method로 측정된 결과 Table 16, Fig. 28과 같았다. Phenol함량을 200 µg/100 µL로 하여 compound A, B, C 단일물질로 실험하였을 때 clear zone이 형성되지 않았고 compound A와 B, compound A와 C, compound B와 C를 혼합처리 한 경우에도 *Helicobacter pylori*에 대한 저해는 관찰되지 않았으며, compound A, B, C 세 가지 물질을 혼합하고 disc paper에 200 µg/0.1 mL의 농도로 하여 항균활성을 측정된 결과 18 mm의 저해 환을 나타내었다. Rosemary를 분리 정제하여 *H. pylori*에 대한 항균활성 물질을 동정한 Yoon의 연구 결과에서는 단일 물질로 분리 하였을 때 *H. pylori*에 대한 항균활성이 높지 않고 여러 가지 물질이 혼합되었을 때 synergy effect에 의해 *H. pylori*에 대한 항균활성을 나타낸다고 보고 하였고, Shetty 등은 Oregano 등 spice의 추출물에 존재하는 simple phenol 등이 단일 물질에 의한 *H. pylori* 저해보다는 synergy effect에 의해 그 효과가 높다고 보고하였으며, 본 연구의 결과 또한 compound A, B, C 3가지가 혼합되어야지만 synergy effect에 의해 *H. pylori*에 대한 항균 효과가 나타나는 것으로 판단되었다. 따라서, 진달래 추출물로부터 단일물질로 분리하여 *H.pylori* 억제 효과를 얻기는 어려우므로 추출물 그 자체를 활용하는 것이 항균효과와 가공비용의 절감 면에서 훨씬 유용할 것이라 사료되었다.

Table 16. Inhibition activity on *Helicobacter pylori* by phenol compounds from *Rhododendron mucronulatum* Flos

NO	Compounds	Diameter of clear zone (mm)	
		Phenol content ($\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$)	
		0	200
1	Comp. A	- ¹⁾	-
2	Comp. B	-	-
3	Comp. C	-	-
4	Comp. A + Comp. B	-	-
5	Comp. A + Comp. C	-	-
6	Comp. B + Comp. C	-	-
7	Comp. A + Comp. B + Comp. C	-	18

-¹⁾ : Not detected

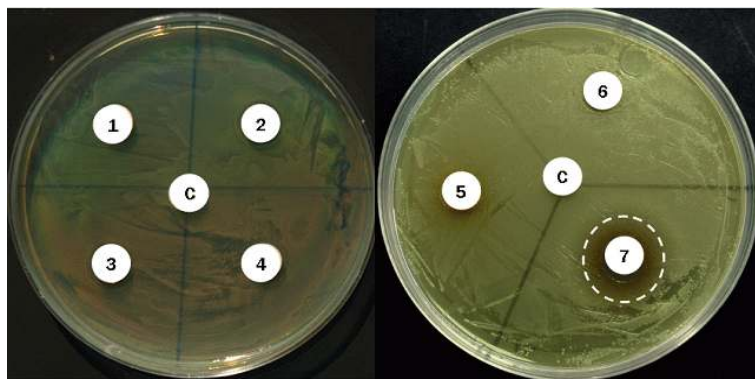


Fig. 28. Inhibition activity of isolated compounds from *Rhododendron mucronulatum* Flos.

16. 진달래로부터 분리한 *Helicobacter pylori* 억제물질을 이용한 진달래 과립차 시제품 개발

가. 재료

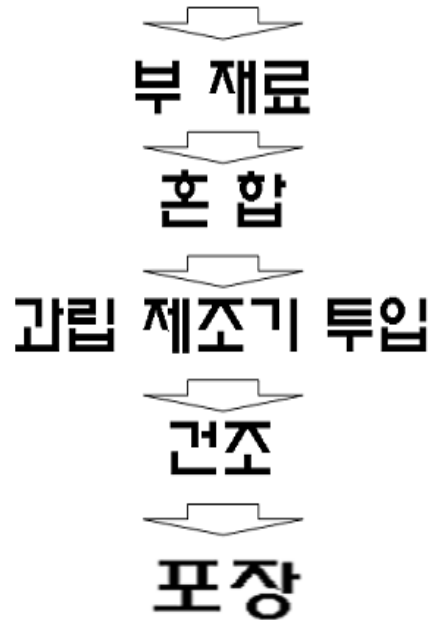
진달래는 경상북도 상주시 일대에서 자생한 것을 수확하여 최적 추출조건에 따라 추출 농축하여 사용하였으며, 부재료로 함수 결정 포도당과 오미자즙, 포도즙, 텍스트린 및 비타민 C를 사용하여 적절한 배합비로 첨가하였다.

나. 제조 방법

진달래로부터 추출 정제된 생리활성물질 분획은 70°brix가 되도록 진공 농축기를 이용하여 농축하고 혼합기를 이용하여 부재료와 완전히 혼합이 되도록 한 다음 과립 제조기에 원료를 투입하여 사출되어 나오는 과립을 건조기 틀에 받아 39℃ 온도에서 하루 동안 건조 시켜 포장하였다.

다. 과립 제조 공정

진달래 농축액 70° brix



라. 배합비 설정

제품의 배합비는 진달래 정제물 농축액과 오미자와 포도 농축액 및 포도당의 혼합비를 Table 17~21에서와 같이 조절하고, 나머지 부재료의 배합은 dextrin 2.5%, vitamin C 0.1%로 고정하여 배합하였다.

Table 17. Recipe of mixing ratio of *Rhododendron mucronulatum* Flos granule tea A

Ingredients	Content (%)
Extracts of Jindalrae (70°brix)	4.0
Extracts of Omija (70°brix)	6.0
Extracts of Grape (70°brix)	6.0
Glucose	81.4
Dextrin	2.5
Vitamin C	0.1
Total	100.0

Table 18. Recipe of mixing ratio of *Rhododendron mucronulatum* Flos granule tea B

Ingredients	Content (%)
Extracts of Jindalrae (70°brix)	5.0
Extracts of Omija (70°brix)	5.0
Extracts of Grape (70°brix)	5.0
Glucose	82.4
Dextrin	2.5
Vitamin C	0.1
Total	100.0

Table 19. Recipe of mixing ratio of *Rhododendron mucronulatum* Flos granule tea C

Ingredients	Content (%)
Extracts of Jindalrae (70°brix)	6.0
Extracts of Omija (70°brix)	6.0
Extracts of Grape (70°brix)	6.0
Glucose	79.4
Dextrin	2.5
Vitamin C	0.1
Total	100.0

Table 20. Recipe of mixing ratio of *Rhododendron mucronulatum* Flos granule tea D

Ingredients	Content (%)
Extracts of Jindalrae (70°brix)	7.0
Extracts of Omija (70°brix)	6.0
Extracts of Grape (70°brix)	6.0
Glucose	78.4
Dextrin	2.5
Vitamin C	0.1
Total	100.0

Table 21. Recipe of mixing ratio of *Rhododendron mucronulatum* Flos granule tea E

Ingredients	Content (%)
Extracts of Jindalrae (70°brix)	7.0
Extracts of Omija (70°brix)	7.0
Extracts of Grape (70°brix)	7.0
Glucose	76.4
Dextrin	2.5
Vitamin C	0.1
Total	100.0

마. 관능검사에 의한 평가

과립차를 제조한 후에 백색 사기 용기에 sample을 40 g씩 담아서 준비하고, 생수 20 mL을 준비하여 과립차를 용해시켜 마실 수 있게 하였다. 이때 생수의 온도는 약 15℃ 정도였다. 그리고 반드시 한 시료가 끝나면 물로 입안을 헹구어 뱉을 수 있도록 20℃의 물과 종이컵을 제공하였다. 평가 내용은 색(Color), 풍미(Flavor), 감칠맛(Savory taste), 전반적인 기호도(Overall acceptability)등을 9점 척도법으로 평가하였으며, 아주 나쁜 것은 1점, 보통은 5점, 아주 좋은 것은 9점으로 점수화 하였다. 진달래 과립차의 관능평가 결과, Table 22에서와 같이 진달래 농축액 함량의 증감에 따른 기호도의 변화는 크지 않은 것으로 판단되나, 진달래 농축액의 함량이 많아질수록 색깔의 관능평점이 낮아지는 것을 알 수 있었고, 7%의 진달래 농축물과 부재료들이 첨가되었을 때 색, 맛, 향 전반적인 기호도 다소 낮아지는 것으로 확인되었다. 특히 진달래 농축액의 향과 색의 영향이 전반적인 기호도의 관능평점을 떨어뜨리는 요인이 되었다. 전체적인 기호도로 판단하였을 때 *Rhododendron mucronulatum* Flos granule tea C의 배합비가 8.6의 가장 좋은 평가를 받았다.

Table 22. Sensory evaluation of *Rhododendron mucronulatum* Flos granule tea

Group	Color	Sensory taste	Flavor	Overall acceptability
A	8.3	7.2	7.1	7.3
B	8.2	7.9	7.7	7.9
C	8.6	8.5	8.7	8.6
D	7.3	8.1	8.2	8.3
E	7.1	7.0	7.3	7.5

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

구 분		최 종 목 표	구체적 실적 예상치
화 장 품 (주관)	1차 년도	<ul style="list-style-type: none"> 진달래 추출물의 효능 검증과 칼럼에 의한 유효성분 분리 및 유효분획물 효능 검증 	<ul style="list-style-type: none"> 진달래로부터 후보물질 2종 이상 screening 각 생리기능별 억제율 70% 이상 물질 개발 미백, 주름, 항염증 개선 물질 50% 이상의 유효 분획물 개발
	2차 년도	<ul style="list-style-type: none"> 진달래 유효성분 함유 화장품 개발과 효능 검증 및 제품 개발 	<ul style="list-style-type: none"> 진달래 유효성분 함유 화장품에서의 효능 검증 70% 이상의 효과를 가진 화장품 진달래 유효성분 함유 화장품 브랜드 제품 개발(5종)
식 품 (협동)	1차 년도	<ul style="list-style-type: none"> 진달래로부터 항과킨슨, 항관절염, 항산화, 위궤양예방, 항당뇨, 항고혈압 및 항암효과 등 생리활성물질의 screening 및 활성검증 	<ul style="list-style-type: none"> 진달래로부터 후보물질 2종 이상 screening 각 생리기능별 억제율 70% 이상 물질 개발 Design food concept 개발 <ul style="list-style-type: none"> ▶분말제품
	2차 년도	<ul style="list-style-type: none"> 진달래 추출물로부터 생리활성 물질의 정제 및 구조 동정 정제물질을 이용한 기능성 design food의 개발 	<ul style="list-style-type: none"> 진달래 추출물로부터 생리활성 물질의 정제 및 구조 동정 기능성 Design food 개발 <ul style="list-style-type: none"> ▶분말제품 개발

□ 주관기관

구분	세부연구개발 목표	평가의 착안점 및 기준	목표 달성도
1차 년도	진달래 screening	-	100%
	진달래 추출조건 검토	최적추출조건 확립	100%
	진달래 추출물의 효능 검증	BHA, Vitamin C의 항산화 효과 (억제율 70% 이하)	100%
	진달래꽃 추출물의 미백효과 검증	기준물질(arbutin)의 미백효과 (억제율 약 50%)	100%
	진달래꽃 추출물의 주름개선효과 검증	Vitamin C의 주름개선 효과 (억제율 약 50%)	100%
	Sephadex LH-20 칼럼에서의 유효성분 분획	순수화합물 분리 여부	100%
	MCI-gel CHP 칼럼에 의한 유효성분 분획	순수화합물 분리 여부	100%
	TLC, HPLC를 이용한 유효분획물의 순도 검증	-	100%
	Mass에 의한 유효성분 분획물의 주요 지표물질 동정	-	100%
	유효분획물의 효능검증	Vitamin C의 효과 (억제율 70%)	100%
2차 년도	진달래 유효성분 함유 다기능 화장품 개발 처방 연구	총 5종 개발	100%
	진달래 유효성분 함유 다기능 화장품 안정성 및 안전성 검토	-	100%
	진달래 유효성분 함유 화장품에서의 효능 검증	BHA, Vitamin C의 항산화 효과 기준물질(arbutin)의 미백효과 (억제율 약 50%)	100%
	진달래 유효성분 함유 화장품 브랜드 시제품 개발	스킨, 로션, 에센스, 크림, 팩 (5종 시제품 생산)	100%
	브랜드화 화장품 사용성 조사	-	100%

□ 협동기관

구분	세부연구개발목표	평가의 착안점 및 기준	목표 달성도
1차 년도	항관절염효과 (Xanthin oxidase 억제효과)	XOase 억제율 80% 확보	100%
	항고혈압효과 (Angiotensin converting enzyme 억제효과)	ACE 억제율 70% 확보	100%
	항당뇨효과 (혈당강화효과, 당분해 억제효과)	당분해억제율 80% 확보	100%
	항위염효과 (<i>Helicobacter pylori</i> 억제효과)	H.P 억제율 70% 확보	100%
	항산화효과	천연항산화율 70% 이상 확보	100%
	추출조건의 검토	최적추출조건 확립	100%
2차 년도	생리활성 물질의 정제 (chomatography 법)	순수화합물 분리 여부	100%
	정제물의 생리활성 검증	순수물질에 의한 생리활성의 증대효과	100%
	정제물에 의한 Design food 개발	분말제품 1종 시제품 생산	100%

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 1 절 기술적 측면에서의 활용방안 및 기대성과

1. 관상용 원예와 일부 식품 첨가제로 사용되어 온 진달래꽃의 생리활성기능 및 생리활성 물질을 분리함으로써 기술 획득함.
2. 진달래꽃에 함유된 새로운 물질의 분리 및 규명함.
3. 진달래꽃에 함유된 항산화효과와 미백효과, 주름개선효과를 나타내는 기능물질의 분리하여 여성음료와 화장품원료로 이용 가능함
4. 진달래꽃에 함유된 항염증, 항암효과 및 항균효과를 나타내는 기능물질의 분리하여 아토피에 우수한 원료로 이용 가능함.
5. 환경 친화적이고 자연친화적인 추세에 맞추어 계절에 피는 꽃잎을 이용하였으며, 또한 폐자원의 이용 가치를 높이고, 먹을 수 있는 천연물을 사용함으로써 피부친화적인 제품을 만들 수 있음.
6. 현재 *H. Pylori* 균은 특정 유제품의 선전을 위해 매체를 이용한 광고로 일반인들에게도 잘 알려진 위염의 주요 발병원인. 이러한 *Helicobacter pylori*의 억제에 위한 여러 종류의 연구결과물들이 나오고 있으나, 이는 주로 젖산균을 이용한 것들임. 따라서 본 연구 결과, 천연 plant source를 이용한 저해기술을 전문화, 보편화 할 수 있음.
7. 또한 국내에 1000만에 육박하는 당뇨병 환자들의 치료제 또는 대응식이 개발되지 않아 치료에 어려움을 겪고 있는 실정을 해결할 수 있는 대응 방안이 마련될 수 있을 것임.
8. 본 개발팀은 수차례의 예비 실험을 통하여 효과적인 저해력을 가질 수 있음을 확인하였음. 또한 미백, 주름억제, 항균력 및 항당뇨 등 실험에 관한 다수의 논문을 국내외에 투고하여 know how를 확보한 상태임.

제 2 절 경제적·산업적 측면에서의 활용방안 및 기대성과

1. 자연 친화적인 원료를 원하는 소비자 needs에 맞춘 새로운 기능성 원료로 의약, 식품 및 화장품산업 전 분야에 이용 가능함으로 산업적 부가가치의 증대에 기여함.
2. 해발 50~2,000m에 군생하는 야생화를 이용함으로써 폐자원에 경제적 파급효과를 부여함.
3. 민간요법이나 고서에만 알려진 임상 결과를 뒷받침하고 활용할 수 있는 장을 마련할 수 있음.
4. 봄의 꽃이라는 탄생적 배경과 서정적 이미지에 부합하여 지역특화브랜드로서 진달래꽃을 활용한 화장품산업 및 미용식품 개발연구 등 시장 접근성이 빠를 것으로 판단됨.
5. *H. pyroli*의 억제에 효과가 있다고 나온 유제품들의 시장은 꾸준히 증가하여 현재 전년 대비 4.8% 신장한 것으로 나타남. 지난해 발효유 시장은 약 1조원 규모의 시장을 형성하고 있음이 조사 됨. 따라서, 새로운 소재로서 *H. pyroli*의 억제의 효과를 확인한 후 이를 사업화 한다면 시장 진입은 매우 용이할 것으로 사료됨.
6. 현재 당뇨병 치료제로는 Acarbose와 Vogliboser가 각각 2.79억\$, 1.75억\$의 시장을 형성하고 있으며 이들을 대체할 수 있는 천연물 소재의 당뇨억제 물질의 개발이 시급한 실정임.
7. 개개인의 피부상태나 취향에 따라 선택할 수 있게 기능성과 종류를 다양화할 수 있으며, 식품의 경우 유제품의 형식이 아닌 캡슐화, 분말화 및 식품에 직접 첨가 가능한 형태로 개발함으로써 적용범위를 확대할 수 있고, 최근 제정된 기능성 화장품 및 식품법에 적합한 제품의 개발이 가능함.
8. 소비자들의 접근성을 용이하게 하기 위해 또한 취향의 다양성을 소화하기 위해서도 천연물 소재 등을 이용한 물질의 개발이 필요함. 이는 국제시장을 겨냥할 때도 매우 긍정적인 결과를 가져올 수 있을 것이라 기대됨.
9. 위궤양의 주요 원인으로 알려진 *H. pyroli*는 현재 국내뿐만 아니라 세계적으로 매

우 혼한병이며 그 완치율은 매우 낮음. 위궤양의 발병율은 전체인구의 약 10% 정도로 보고 되어 있으며 그 빈도수에 있어서 매우 중요한 질병으로 인식되고 있음. 따라서 *H. pylori* 저해물질의 개발에 성공한다면 질병을 해소한다면 국가적 차원에서 국민보건 증진에 크게 이바지 할 수 있음.

10. 최근 여성과 남성에게 가장 관심 있는 분야가 미백과 주름개선임. 이 같은 시장 경향에 맞추어 천연물이 함유된 화장품이 개발되면 웰빙 트렌드와 현 시장에 매우 긍정적인 결과를 가져올 수 있을 것이라 생각됨.
11. 인근 구미 지역의 특징적인 명소인 대규모 화훼단지인 접해 있으며, 협동 기관인 상주대학교가 상주시 은척면의 한방자원단지 인근에 위치해 있어 재료의 선택과 다양화에 이점이 있음.

제 6 장 연구개발 관련 본 제품 생산

제 1 절 주관연구기관 - 대구한의대학교 화장품약리학과



素月の詩 산홍(山紅) 3중 세트



素月の詩 산홍(山紅) 세안 2중 세트



素月の詩 화안(華顔) 2중 세트



素月の詩 설안(雪顔) 2중 세트



제 2 절 협동연구기관 - 경북대학교 식품공학과

<진달래로부터 분리한 *Helicobacter pylori* 억제물질을 이용한 진달래 과립차 제품>



제 7 장 참고문헌

1. Ha TY. Development of functional food materials for healthy Life. *Korean J. Crop. Sci.* 2006;51:26-39.
2. Gross J. Aging changes in the collagenous connective tissue of rat skin. *J Natl Cancer Inst.* 1950;10:1353.
3. Ma ck, Cowdry EV. Aging of elastic tissue in human skin. *J Gerontol.* 1950;5:203-210.
4. Simon A. Psychological problems of aging. *Calif Med.* 1951 ;75:73-80.
5. Chakravarti B, Chakravarti DN. Oxidative Modification of Proteins: Age-Related Changes. *Gerontology.* 2006;53:128-139
6. Sprung J, Gajic O, Warner DO. Age related alterations in respiratory function-anesthetic considerations. *Can J Anaesth.* 2006;53:1244-1257.
7. Kim CH, Park JH, Lim JK, Lee KJ, Chung GY, Jeong HJ. The activity of antioxidants and suppression of cancer cell proliferation in extracts of *Orostachys japonicus* A. Berger.. *Korean. J. Medicinal. Crop Sci.* 2003;11:31-39.
8. Guo DA. Quality control of herbal medicines and their related products. *Korean J. Crop. Sci.* 2006;51:55-59.
9. Miyake T. Active oxygen and oxidative stress. *Masui.* 1988 ;37:137.
10. Videla LA, Fernandez V. Biochemical aspects of cellular oxidative stress. *Arch Biol Med Exp (Santiago).* 1988;21:85-92.
11. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem.* 1972;247:3170-3175.
12. Blaschko H. The mechanism of catalase inhibitions. *Biochem J.* 1935;29:2303-2312.
13. Etori J. The estimation of peroxidase activity. *Biochem J.* 1949;44:35-38.
14. Ridgway RR, Drummond JC, Wright MD. The biological activity of the

- oxidation products of alpha-tocopherol. *Biochem J.* 1940;34:1569–1573.
15. Quat-Hao Nguyen, Metche M, Urion E. Intermediary products in the autoxidation of quercetin. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D.* 1965;260:7047–7049.
 16. Afanas'ev GG, Pelevina II, Lipchina LP, Emanuel' NM. Increasing the effectiveness of ionizing radiation by inhibitors-antioxidants. *Izv Akad Nauk SSSR Biol.* 1968;3:333–344.
 17. An BJ, Lee CE, Son JH, Lee JY, Choi GH, Park TS. Antioxidant, anticancer and trosinase inhibition activities of extracts from *Rhododendron mucronulatum* T.. *J. Korean Soc Appl. Biol. Chem.* 2005;48:280–284.
 18. Hong TH. The degradation of hydrocarbons in petal of azalea by Gokja. *Koran J. Food & NUTR.* 1999;12:415–420.
 19. Chung TY, Lee SE. Volatile flavor components of Jindalrae flower(Korean azalea flower , *Rhododendron mucronulatum* Turczaninow). *J. Korean Agric Chem. Soc.* 1991;34:344–352.
 20. Caoa Y, Chub Q, Yeb J. Chromatographic and electrophoretic methods for pharmaceutically active compounds in *Rhododendron dauricum*. *Journal of Chromatography B.* 2004;812:231–240.
 21. Park SW, Kim SG, Kim MJ. Antioxidative activity and cytotoxicity on human KB cell of extracts from *Rhododendron mucronulatum* Turcz. flower. *Korean J. Food Preserv.* 2006;13:501–505.
 22. Chung TY, Kim MA, A. Daniel Jones. Antioxidative Activity of Flavonoids Isolated from Jindalrae Flowers.(*Rhododendron mucronulatum* Turz.) *Agricultural Chemistry and Biotechnologe.* 1996;39:320–3261.
 23. Chung TY, Kim MA, A. Daniel Jones. Antioxidative activity of phenolic acids isolated from jindalrae flowers.(*Rhododendron mucronulatum* Turz.) *Agricultural Chemistry and Biotechnologe.* 1996;39:506–511.
 24. An BJ, Lee JT, Lee CE, Son JH, Lee JY, Park TS. A Study on the Development of Cosmeceutical Ingredient, *Rhododendron mucronulatum*, and the

- Application of Rheology Properties. *J. Korean Soc Appl. Biol. Chem.* 2005;48:273–279.
25. Association of Analytical Chemists. Official methods of analysis of the AOAC. 14th ed. Washington (DC): Association of Analytical Chemists INC.: 1984.
 26. Blois MS. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature.* 1958;26:1199–1120.
 27. Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem.* 1974;47(3):469–474.
 28. Stirpe F, Della Corte E. The regulation of rat liver xanthine oxidase. Conversion in vitro of the enzyme activity from dehydrogenase(type D) to oxidase(type O). *J Biol Chem.* 1969;244 (14):3855–3863.
 29. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1978;52:302–310.
 30. Yagi A, Kanbara T, Morinobu N. The effect of tyrosinase inhibition for aloe. *Planta Medica.* 1986;3981:517–9.
 31. Hosoi J, Abe E, Suda T, Kuroki T. Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by 1 alpha, 25 – dihydroxy vitamin D3 and retinoic acid. *Cancer Res.* 1985;45(4):1474–8.
 32. Cannell RJP, Kellan SJ, Owsianski AM, Walker JM. Results of a large scale screen of microalgae for the production of protease inhibitors. *Planta Med.* 1988;54(1):10–14.
 33. Lee JT, Jeong YS, An BJ. Physiological activity of *Salicornia herbacea* and Its application for Cosmetic materials. *Kor. J. Herbology.* 2002;17:51–60.
 34. Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. Evaluation of a tetrazolium based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* 1987;47(4):936–942.
 35. Skehan P, Friedman SJ. A rapid naphthol yellow S method for measuring the cellular protein content of anchorage cultures. *In Vitro Cell Dev Biol.*

- 1985;21:288–290.
36. Conner DE, Beuchat LR. Sensitivity of heat-stressed yeasts to essential oils of plants. *Appl Environ Microbiol.* 1984;47(2): 229–233.
 37. Chung HS, Kim TW, Kwon MY, Kwon IC, Jeong SY. Oil components modulate physical characteristics and function of the natural oil emulsions as drug or gene delivery system. *J Controlled Release.* 2001;71(3):339–50.
 38. 김점식, 이승수, 이호식. 비이온 계면활성제의 HLB 변화에 따른 O/W 에멀전의 점성거동, 한국공업화학회, 추계연구논문. 1992:74.
 39. Kim SH, Nah JW, Song KD. Enhancement of mechanical properties of EVA emulsion. *Applied Chemistry.* 2000;4(1):280–3.
 40. J.B : Wilkinson, R.J. Moore (Eds.). Harry's cosmeticology. *Chemical Publishing Co., Inc*, New York, 1982:749.
 41. Gallarate M, Carlotti ME, Trotta M, Bovo S. On the stability of ascorbic acid in emulsified system for topical and cosmetic use. *Int J Pharm.* 1999;188(2):233–41.
 42. Carlo A, Anna MM, Chiara S, Donatella V. Stability studies of new cosmetic formulations with vegetable extracts as functional agents. *Il Farmaco.* 2001;56:427–31.
 43. Roland I, Piel G, Delattre L, Evrard B. Systematic characterization of oil-water emulsions for formulation design. *Int J Pharm.* 2003; 263(1–2):85–94.
 44. M Bury, J Gerhards, W Erni, A Stamm. Application of a new method based on conductivity measurements to determine the creaming stability of o/w emulsions. *Int J Pharm.* 1995;124: 183–194.
 45. Dennis M, Eva-Maria W, Angelika T, Christine T, Heinz H. O/W emulsions for cosmetics products stabilized by alkyl phosphates –rheology and storage tests. *Colloids and Surfaces.* 1999;152(1–2): 155–60.
 46. Aoshima H, Tsunoue H, Koda H, Kiso Y. Aging of whiskey increases 1,1 – diphenyl –2 – picrylhydrazyl radical scavenging activity. *J Agric Food Chem.* 2004;52(16):5240–5244.
 47. Kim HK, Kim YE, Do JR, Lee YC, Lee BY. Antioxidative activity and

- physiological activity of some Korean medicinal plants. *Korean J Food Sci Technol.* 1995;27(1):80–85.
48. Cho YH, Lee BC, Kim JH, Kim JH, Pyo HB, Park HD, Zhang YH. Effect of *Artemisia anomala* S. noore on antioxidant activity and melanogenesis. *Kor. J. Pharmacogn.* 2005;36:273– 277.
 49. Lee YJ, Han JP. Antioxidative activities and nitrite scavenging abilities of extracts from *Ulmus davidiana*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 2000;29:89–899.
 50. Kim MK, Jin YS, Heo SI, Shim TH, Sa JH, Wang MH. Studies for component analysis and antioxidant effect, antimicrobial activity in *Acanthopanax senticosus* HARMS. *Kor. J. Pharmacogn.* 2006;37:151–156.
 51. Kim DI, Lee SH, Hur EY, Cho SM, Park HJ. Screening of natural plant resources with acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 2005;34:427–432.
 52. Pryor WA. Oxy-radicals and related species : their formation, lifetimes, and reactions. *Annu Rev Physiol.* 1986;48:657–667.
 53. Radiation and aging : free radical damage, biological response and possible antioxidant intervention. *Med Hypotheses.* 1993;41(5): 473–482.
 54. Na GM, Han HS, Ye SH, Kim HK. Extraction characteristics and antioxidative activity of *Cassia tora* L. extracts. *KOREAN J. FOOD CULTURE.* 2004;19:499–505.
 55. Lee YS, Joo EY, Kim NW. Antioxidant activity of extracts form the *Lespedeza bicolor*. *Korean J.Food Preserv.* 2005;12:75–79.
 56. Hong JYe, Nam HS, Lee YS, Yoon KY, Kim NW, Shin SR. Study on the antioxidant activity of extracts from the fruit of *Elaeagnus multiflora* Thunb. *Korean J.Food Preserv.* 2006; 13: 413–419.
 57. Kim HK, Na GM, Ye SH, Han HS. Extraction characteristics and Antioxidative activity of *Lycium chinense* extracts. *Korean J.Food Preserv.* 2004;11:352–357.
 58. Na GM, Han HS, Ye SH, Kim HK. Physiological activity of medicinal plant extracts. *Korean J.Food Preserv.* 2004;11:388–393.

59. Kodama K. Studies on Xanthine Oxidase: The Oxidation Reduction Potential of the Oxidase System. *Biochem J.* 1926;20:1095–1103.
60. BeileR JM, Martin GJ. The inhibition of xanthine oxidase by flavonoids and related compounds. *J Biol Chem.* 1951;192: 831–834.
61. Hofstee BH. On the mechanism of inhibition of xanthine oxidase by the substrate xanthine. *J Biol Chem.* 1955;216:235–44.
62. Jeon TW, Jo CH, Kim KH, Byun MW. Inhibitory effect on tyrosinase and xanthine oxidase, and nitrite scavenging activities of Schizandrae Fructus extract by gamma irradiation. *Korean Journal of Food Preservation.* 2002;9:369–374.
63. Kim SC, Ahn KS, Park CK, Jeon BS, Lee JT, Park WJ. Isolation of antioxidative compound from scutellaria baicalensis G. *Korean J. Medicind Crop Sci.* 2006;14:212–216.
64. Robak J, Gryglewski RJ. Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochem Pharmacol.* 1988;37:837–841.
65. Chang WS, Lee YJ, Lu FJ, Chiang HC. Inhibitory effects of flavonoids on xanthine oxidase. *Anticancer Res.* 1993;13:2165– 2170.
66. Cotelle N, Bernier JL, Catteau JP, Pommery J, Wallet JC, Gaydou EM. Antioxidant properties of hydroxy-flavones. *Free Radic Biol Med.* 1996;20:35–43.
67. Cho YJ, Chun SS, Kim HJ, Kim JH, Lee KH, An BJ, Choo JW. Inhibitory effects of water and 80% ethanol extracts from *ulberry Leaves(Morus alba L.)* on angiotensin converting enzyme and xanthine oxidase. *J Korean Sic Appl. Biol. Chem.* 2006;49:114–124.
68. Yeo SG, Park YB, Kim IS, Kim SB, Park YH. Inhibition of xanthine oxidase by tea extracts from green tea , oolong tea and black tea. *J. Koeran Soc. Food Nutr.* 1995;.24:154–159.
69. Cho YJ, Chun SS, Choi C. Inhibitory effect of condensed tannjins isolated from korean green tea against xanthine oxidase. *J. Koeran Soc. Food Nutr.*

- 1993;22:418-422.
70. An BJ, Kim WK, Choi JY, Kwon IB, Choi C. Structure and isolation of xanthine oxidase inhibitor from oolong tea. *KOREAN J. FOOD SIC TECHNOL.* 1992;24:558-562.
71. Moon SH, Lee MK, Chae KS. Inhibitory effects of the solvent fractions from persimmon leaves on xanthine oxidase activity. *Korean J. Food & Nutr.* 2001;14:120-125.
72. Ra KS, Chung SH, Suh HJ, Son JY, Lee HK. Inhibitor of xanthine oxidase from onion Skin. *KOREAN J. FOOD SIC THCHNOL.* 1998;30:697-701.
73. Kim OK, Lee TG, Park YB, Park DC, Lee YW, Yeo SG, Kim IS, Park YH, Kim SB. Inhibition of xanthine oxidase by seaweed extracts. *KOREAN J. FOOD SIC THCHNOL.* 1996;25:1069-1073.
74. Cojocaru IM, Cojocaru M, Musuroi C, Botezat M, Lazar L, Druta A. Lipid peroxidation and catalase in diabetes mellitus with and without ischemic stroke. *Rom J Intern Med.* 2004;42(2):423-429.
75. Saito M, Sakagami H, Fujisawa S. Cytotoxicity and apoptosis induction by butylated hydroxyanisole (BHA) and butylated hydroxytoluene (BHT). *Anticancer Res.* 2003;23(6C):4693-4701.
76. 신동화. 식용 식물성 향산화제의 검색과 식품에 이용. 한국음식문화연구원, 연구보고서. 1996:695-714.
77. Lerner AB, Fitzpatrick TB, Calkins E, Sunneron WH. Mammalian tyrosinase; action on substances structurally related to tyrosine. *J Biol Chem.* 1951;191:799-806.
78. Mishima Y. Melanosomes in phagocytic vacuoles in Langerhans cells. Electron microscopy of keratin-stripped human epidermis. *Cell Biol.* 1966 ;30:417-23.
79. McGuire J. Three sites for hormonal control of the pigment cell. *Adv Biol Skin.* 1972;12:421-445.
80. Wolff K, Konrad K. Melanin pigmentation: an in vivo model for studies of melanosome kinetics within keratinocytes. *Science.* 1971 3;174:1034-1035.

81. Korytowski W, Sarna T. Bleaching of melanin pigments. Role of copper ions and hydrogen peroxide in autooxidation and photooxidation of synthetic dopa-melanin. *J Biol Chem.* 1990;265:12410-12406.
82. Hearing VJ, Tsukamoto K. Enzymatic control of pigmentation in mammals. *FASEB J.* 1991 Nov;5(14):2902-2909.
83. Shin NH, Ryu SY, Choi EJ, Kang SH, Chang IM, Min KR, Kim Y. Oxyresveratrol as the potent inhibitor on dopa oxidase activity of mushroom tyrosinase. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998; 243:801-803.
84. Laskin JD, Piccinini LA. Tyrosinase isozyme heterogeneity in differentiating B-16/C3 melanoma. *J. Biol. Chem.* 1986;261(35) :16626-16635.
85. Choi SY, Kang NJ, Kim HC. Inhibitory effects of root extracts on melanin biosynthesis in *Rodgersia podophylla* A. Gray. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 2006; 14:27-30.
86. Kim SA, Kim J, Woo MK, Kwak CS, Lee MS. Antimutagenic and cytotoxic effects of ethanol extracts from five kinds of seaweeds. *J. Korean Soc Food Sci. Nutr.* 2005;34:451-459.
87. Lee SH, Park JS, Kim SY, Kim JJ, Chung SR. The screening of the inhibitory compounds on tyrosinase activity from the natural product. *Yakhak Hoeji.* 1997;7:209-214.
88. Roth GJ, Siok CJ, Ozols J. Structural characteristics of prostaglandin synthetase from sheep vesicular gland. *J Biol Chem.* 1980;255(4):1301-1304.
89. Dewitt, DL, Rollins TE, Day JS, Gauger JA, Smith WL. Orientation of the active site, and antigenic determinants of prostaglandin endoperoxide synthase in the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 1981;256(20):10375-10382.
90. Chua F, Laurent GJ. Neutrophil elastase: mediator of extracellular matrix destruction and accumulation. *Proc Am Thorac Soc.* 2006; 3:424-427.
91. Kwak YJ, Lee DH, Kim NM, Lee JS. Screening and extraction condition of anti-skin aging elastase inhibitor from medicinal plants. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 2005;13:213-216.

92. Roberts EA, Sarma SN. Tannins as hydrogen carriers in biological oxidation. *Biochem J.* 1940 ;34:1517–1523.
93. An BJ, Lee JT. Studies on biological activity from extract of *Crataegi Fructus*. *Kor J. Herbologie.* 2002;17:29–38.
94. Park JG, Kramer BS, Steinberg SM, Carmichael J, Collins JM, Minna JD, Gazdar AF. Chemosensitivity testing of human colorectal carcinoma cell lines using a tetrazolium–based colorimetric assay. *Cancer Res.* 1987;47:5875–5879.
95. Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S, Boyd MR. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer–drug screening. *Natl Cancer Inst.* 1990 ;82:1107–1112.
96. Keepers YP, Pizao PE, Peters GJ, van Ark–Otte J, Winograd B, Pinedo HM. Comparison of the sulforhodamine B protein and tetrazolium (MTT) assays for in vitro chemosensitivity testing. *Eur J Cancer.* 1991;27:897–900.
97. Garbin F, Eckert K, Maurer HR. Evaluation of the MTT and SRB assays for testing LAK cell–mediated growth inhibition of various adherent and non–adherent tumor target cells. *J Immunol Methods.* 1994;170:269–271.
98. Re GJ, Summit JB. Detector dyes. *Br Dent J.* 1994 Oct 8;177:239.
99. Moritz KU, Ambrosius H. Sulforhodamine B, a good labelling stain suitable for immunohistology. *Acta Histochem.* 1964;19:191– 194.
100. Kim SA, KimJ, Woo MK, Kwak CS, Lee MS. Antimutagenic and cytotoxic effects of ethanol extracts from five kinds of seaweeds. *J. Korean Soc Food Sci. Nutr.* 2005;34:451–459.
101. Lee IS. Effect of water extract from *Aururus Chinensis (Lour.)* Bail water extracts on the cancer cells and antioxidative activity in cytotoxicity. *Korean J. Postharvest Sci Technol.* 2001;8: 213–216.
102. Lee MK, Lee HY, Lee JH, Oh JS, Choi GP, Kim JH, Kim JD. Anticancer effect of *Sorbus commixta* Hedl extracts. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 2002;10:403–408.
103. Lee SY, Hwang EJ, Kim GH, Choi YB, Lim CY, Kim SM. Antifungal and

- antioxidant activities of extracts from leaves and flowers of *Camellia japonica* L. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 2005;13:93–100.
104. Kim JY, Lee JA, Yoon WJ, Oh DJ, Jung YH, Lee WJ, Park SY. Antioxidative and antimicrobial activities of *Euphorbia jolkini* extracts. *Korean J. Food Sci Technol.* 2006;38:699–706.
105. Jang SY, Choi HK, Ha NY, Kim OM, Jeong YJ. Study on the antimicrobial effects of citrus peel by different extract methods. *Korean Journal of Food Preservation.* 2004;.11:319–324.

주 의

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