

자생 생강나무를 이용한 웰빙 기능성 신소재 및 식품 개발
(Development of food and a promising functional food material
using *Lindera obtusiloba* BL.)

제 1 세부: 생강나무 잎차 및 천연혼합음료 개발
(Development of *Lindera obtusiloba* BL. leaf tea and natural mixture beverage)

제 2 세부: 생강나무 추출물을 이용한 기능성 · 안전성 검증, 생리활성
물질의 정제 및 구조분석
(Validation of functionality and safety utilizing leaf extracts from
Lindera obtusiloba BL. and its structure analysis)

제 1 협동: 생강나무 추출물을 이용한 미백 효과 검색 및
분자생물학적 기전연구
(The whitening effects and molecular biology mechanism studies
through the *Lindera obtusiloba* BL. extracts)

고려대학교 산학협력단

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “자생 생강나무를 이용한 웰빙 기능성 신소재 및 식품 개발에 관한 연구”
과제의 보고서로 제출합니다.

2009 년 04 월 24 일

주관연구기관명 : 고려대학교 산학협력단

주관연구책임자 : 이 광 원

1세부연구책임자 : 박 권 우

연 구 원 : 박 성 옥

연 구 원 : 김 준 홍

연 구 원 : 목 민 균

2세부연구책임자 : 이 광 원

연 구 원 : 이 현 순

연 구 원 : 홍 충 의

연 구 원 : 구 윤 창

연 구 원 : 남 미 현

연 구 원 : 이 현 아

협동연구기관명 : 경희대학교 산학협력단

협동연구책임자 : 정 세 영

요 약 문

< 자생 생강나무를 이용한 웰빙 기능성 신소재 및 식품 개발 >

제 1 세 부: 고려대 박권우 교수팀

I. 제목

생강나무 잎차 및 천연 혼합음료 개발

II. 연구 목적

우리나라의 전국에 분포하고 있으며 고유방향성 자생 식물자원인 생강나무의 이용가치 높일 수 있고 효과적인 활용을 위하여 생강나무의 지역적인 방향성 성분분석, 가용 부위별 방향성 기능성 성분분석을 통해 국민건강증진에 기여하고 잎의 저장성, 건조법, 추출법을 실시하여 농가의 신소득원과 함께소비자의 이용 증대를 기할 수 있는 차 제조에 대한 연구를 하였다.

III. 연구 내용 및 방법

생강나무를 11개 지역에서 채취하여 정유를 SDE법을 이용하여 추출하였고, 채취한 생강나무의 가용 부위별 정유함량 및 성분을 분석하였다. 또한 채취시기별 유효성분함량의 변화, 생강나무와 생강향이 나는 생강을 정유를 추출하여서 GC/MSD를 이용 분석하였다.

생강나무 잎이 MA저장은 PE(30 μ m, 60 μ m), PP(30 μ m, 60 μ m)를 이용해서 5, 10, 15, 25 $^{\circ}$ C 등 총 16수준으로 처리하여 시험하였고, 생강나무의 잎을 장기저장해서 이용하기 위한 건조방법으로 sun dry, shade dry, oven dry, freeze dry방법을 처리하였다. 또한 정유추출방법에 따른 정유함량을 조사하기 위해 TDE(순수 수증기 증류법)과 SDE(수증기 연속추출법)법을 실시하였다.

생강나무 잎 및 꽃차 개발을 위해 열풍건조방법, 동결건조방법 및 찌 후 덩음방법 세가지 방법으로 생강나무잎차를 제조 후 관능검사를 실시하였다. 혼합음료 개발을 위해 로즈메리와 생강나무를 향, 맛, 색 및 선호도에 대한 관능검사를 실시하였다. 또한 기존에 판매되는 생강차와 제조한 생강나무 차를 관능검사를 비교조사하였다.

IV. 연구 결과

전국 11개 지역에서 채취한 생강나무의 분석에서 정유성분은 지역간 큰 차이는 없었다. 그러나 전주지역에서 가장 높은 함량을 보여, 최적의 자생군락지역으로 판명되었다. 또한 잎의 최적 채취시기는 8월이었고, 1년생 어린가지를 8~9월에 채취시 특히 정유함량이 높은 것으로 나타났다. 생강나무 잎의 최적 MA저장 조건은 PE 60 μ m, 5 $^{\circ}$ C였으며, 동결건조, 음건, 양건등 건조방법에 따라 구성성분은 변화가 거의 없음을 규명하였다. 또한 수증기 연속추출법이 가장 적합한 오일추출 방법임을 확인했다. 생강나무 잎을 가지고 소비자 이용증대를 위해서 잎차와 꽃차 제조방법을 확립하였으며 소비자 선호도 조사를 통해 열풍건조가 가장 좋은 것으로 조사하였다.

V. 연구 활용계획

생강나무의 생리활성 소재를 파악하고 잎의 MA저장법 확립을 통한 자생식물의 이용확대가 예상되며, 또한 자생식물의 건조와 차 제조에 따른 선호도 파악으로 새로운 소비시장을 창출할 수 있을 것이다. 생강나무 잎과 꽃을 이용한 차 시제품 개발을 통한 농민소득 증대에 기여할 수 있을 것이라고 생각된다.

제 2 세부: 고려대 이광원 교수팀

I. 제목

생강나무 추출물을 이용한 기능성·안전성 검증, 생리활성 물질의 정제 및 구조분석

II. 연구개발의 목적 및 필요성

전 세계적으로 현대 의학을 보완하는 대체의학에 대한 관심이 높아짐에 따라 부작용이 적은 천연물 소재의 의약 대체품들이 주목받고 있다. 그 중 천연식물이 많은 부분을 차지하고 있는데, 이는 천연 식물들의 우수한 기능성 때문에 의약품이나 기능성 식품으로서의 이용 가치가 점차 증가하고 있기 때문이다. 그러나 실제로 이용되고 있는 식물들이 어떠한 생리활성 기능을 가지는지, 그러한 기능을 하는 물질들이 무엇인지, 그와 더불어 기능을 가지는 물질들이 사람들이 섭취하였을 때 안전한지에 대한 검증이 되어 있지 않다. 그래서 본 과제의 구성팀은 후보 식물로서의 생강나무에 대해 기능성과 안전성을 검증함과 동시에 그러한 활성을 나타내는 물질이 무엇인지에 대해 규명하고자 한다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

본 연구의 목적은 생강나무 추출물의 기능성·안전성 검증, 생리활성 물질의 규명이다. 기능성은 1. *tert-butyl-hydroperoxide*(*t*-BHP)로 간세포 또는 랫드에 직접 산화스트레스를 유발하여 간보호 효과 연구, 2. Glycation inhibition과 streptozotocin으로 랫드에 직접 당뇨를 유발하여 항당뇨/항당뇨합병증 효과 연구로 *in vitro*, *in vivo*에서 검증을 한다. 안전성 검증은 단회 투여 독성과 14일 반복투여 독성의 일반독성 평가를 통하여 이루어진다. 마지막으로 기능원인 물질의 규명은 유기용매 분리법과 column 분리법을 통하여 단일물질로 정제하고, 이 단일물질에 대해 NMR 분석을 통하여 어떠한 물질인 규명한다.

IV. 연구개발 결과

생강나무잎의 70% 에탄올 추출물에서 분리한 에틸아세테이트 층이 간세포에 산화스트레스를 유발한 MTT 분석에서 다른 유기용매 층에 비해 가장 높은 셀 생존율을 보였다. *In vitro* 기능성 검증에서 간기능 보호능과 관련하여 에틸아세테이트 층이 DPPH radical scavenging, FRAP 분석, TBARS 분석에서 농도 의존적으로 높은 항산화 활성을 보였다. 또한 glycation 저해 시험결과 positive control로 사용한 aminoguanidine 보다 더 높은 항당뇨합병증 효과(500 ug/ml)를 나타냈다. 랫드를 이용한 간기능 보호와 항당뇨의 *in vivo* 기능성 검증에서 또한 *in vitro*와 마찬가지로 농도 의존적으로 간기능보호와 항당뇨에 효과를 나타내는 것을 확인하였

다. 전임상의 안전성 검증으로서 단회투여 독성과 14일 반복투여 독성의 일반독성 시험결과 생강나무잎 70% 에탄올 추출물은 식약청에서 고시하는 2000mg/kg 보다 더 높은 농도에서도 아무런 독성을 유발하지 않는 것을 검증하여 안전한 물질임을 확인했다. 또한 생강나무잎에서 이러한 기능을 하는 물질이 분리·정제를 거쳐 NMR분석을 한 결과 quercetin-3-O- α -rhamnoside(quercitrin)와 kaempferol-3-O- α -rhamnoside(afzelin)임을 규명하였다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

우리는 1차년도에 시행했던 항당뇨합병증에 관한 연구의 이론을 기초로 “Advanced Glycation Endproduct-induced Diabetic Complications”의 제목으로 “Food Sci. Biotechnol. Vol. 17, No. 6, pp. 1131 ~ 1138 (2008)에 논문 게재 하였다. 또한 지금 생강나무잎에서 분리한 추출물의 항산화 효과에 대해 논문 투고 중이며, 이 외에도 본 과제를 통해 나온 안전성 결과를 논문에 투고할 예정이다. 그리고 생강나무잎의 활성물질인 quercitrin과 afzelin에 대해서도 물질 특허를 준비 중이다.

향후 생강나무잎의 다른 여러 가지 기능성과 안전성을 심화검증하고, 이러한 결과를 바탕으로 건강기능식품 소재 등록 또는 제품화를 한다면 농가에 부가가치를 창출 할 수 있으며, 더불어 국가경쟁력을 제고 시킬 수 있다.

제 1 협동: 경희대 정세영 교수팀

I. 제 목

생강나무 추출물을 이용한 미백효과 검색 및 분자생물학적 기전연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

삶의 질을 향상시키고자 하는 소비자의 욕구 증대, 여성의 사회진출 확대 및 고령화 사회와 맞물려 미백 기능성 화장품에 대한 소비 욕구가 증가하고 있음. 이에 뛰어난 효능 뿐 아니라 소재의 안전성 및 저자극의 천연 소재의 개발이 시급함.

III. 연구개발 내용 및 범위

생강나무 추출물의 in vitro system에서의 항산화 활성 및 미백효과를 검색하고, 동물모델을 이용한 UVB 조사에 의해 생성된 멜라닌에 대한 생강나무 추출물이 미치는 영향과 이러한 멜라닌 합성에 관여하는 proteins expression을 분자생물학적 기법을 이용하여 증명하고자 함.

IV. 연구개발결과

생강나무 잎과 가지/줄기 혼합 추출물은 뛰어나지는 않지만 활성산소 소거 활성을 나타내었으며, 생강나무 잎 추출물의 B16 melanoma F10 cells과 동물모델 C57BL/6를 이용한 미백효과 검색에서는 뛰어난 멜라닌 합성 저해/감소 효과를 확인할 수 있었음. 특히, 동물모델 system에서는 중용량 (80 mg/kg)과 고용량 (120 mg/kg)에서 각각 양성대조군인 ascorbic acid 70 mg/kg과 비슷하거나 또는 더 뛰어난 멜라닌 감소효과를 나타내었음. 이러한 미백효과는 생강나무 잎 추

출물에 의해 유도된 ERK pathway signaling이 MITF와 tyrosinase를 down-regulation시킴으로써 멜라닌의 생성을 저해함을 증명할 수 있었음.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

B16 melanoma F10 cell과 동물모델 C57BL/6를 이용한 미백효과 결과에 대한 특허 “생강나무 잎 추출물을 포함하는 피부 미백 및 주름개선용 조성물”이 출원 중에 있음. 생강나무 추출물에 대한 미백 기능성 화장품 또는 기능성식품으로의 상업화가 이루어질 경우 안전성 확보와 저자극성 천연 소재에 대한 소비 욕구와 맞물려 수익 창출이 기대됨.

SUMMARY

< Development of food and a promising functional food material using *Lindera obtusiloba* BL. >

PART 1: Korea Univ. Team of Park, Kuen-Woo

I. The Title of the study

Development of *Lindera obtusiloba* B1. leaf tea and natural mixture beverage.

II. The purpose of the study

Lindera obtusiloba Bl. is distributed in all mountains in Korea. it is the unique fragrant native plant resources. The fragrant components in the regions and plant organs were analyzed. And a process of manufacture of *Lindera obtusiloba* tea was studied for storage quality, dry method and extract method. This study was expected by the creation of new income, increase of consumer use and promotion of health of a nation

III. The content and the scope of the study

The essential oil of *Lindera obtusiloba* in the regions was extracted by SDE method, and analyzed contents and components of the essential oil of plant organs. The change of essential oil contents of useful component were analyzed. The essential oil of ginger and *Lindera obtusiloba* were analyzed by GC/MSD. Compared condition combination were PE(30 μ m, 60 μ m), PP(30 μ m, 60 μ m) at 5, 10, 15 and 25 $^{\circ}$ C for MA-Storage of *Lindera obtusiloba* leaf. Methods of sun dry, shade dry, oven dry and freeze dry were compared to find long term storage condition. The essential oil contents were analyzed by TDE and SDE. For development of *Lindera obtusiloba* leaf tea and flower tea, *Lindera obtusiloba* tea were manufactured by oven dry, freeze dry and roasted tea after steaming. Sensory evaluation of *Lindera obtusiloba* leaf teas were analyzed. For the development mixture beverage, sensory evaluation of mixture between *Lindera obtusiloba* leaf tea extract(LTE) and rosemary tea extract(RTE) were analyzed. And sensory evaluation of the *Lindera obtusiloba* leaf tea, ginger tea, and ginger tea product were analyzed.

IV. The result

The essential oil contents of *Lindera obtusiloba* were shown highest in Chun-Ju region, annual branch, and period of August to September. The optimal MA-storage condition was shown at 5 $^{\circ}$ C, PE 60 μ m. No change component by dry methods. the traditional steam distillation/extraction(TDE) was the best method of oil extraction. The processing method of *Lindera obtusiloba* leaf tea and flower tea was established. The oven dry method was estimated to the best method.

V. The outcome of the study and further plans

To find physiologically active substance of *Lindera obtusiloba* and increase of native plant use through establish of leaf MA-storage. To create new consuming market was expected by palatability research about dry method and tea processing, and increase of farmer's income was expected by development of tea product to use *Lindera obtusiloba* leaf and flower.

PART 2: Korea Univ. Team of Lee, Kwang-Won

I. The Title of the Study

Validation of functionality and safety utilizing leaf extracts from *Lindera obtusiloba* Bl., and its structure analysis.

II. The Purpose of the Study

As an alternative medical science which complements contemporary medical science is getting attention globally, alternative medicines made of natural substances with less side-effects come into the spotlight. Among those, natural plants are dominant due to the fact that utility value as medicine or functional food is gradually increasing based on its outstanding functionality. However, it is yet to be proven that what sort of physiological vitalization function the plants contain, what kind of materials actually function and whether it would be safe or not if people ingest. In this regard, our team of study is to testify the functionality and safety of leaf extracts from *Lindera obtusiloba* Bl. as a candidate plant and to investigate the substances for physiological vitalization.

III. The Content and the Scope of the Study

The purpose of this study is to testify the functionality and safety of leaf extracts from *Lindera obtusiloba* BL as a candidate plant and to investigate the substances for physiological vitalization. 1.study of protective effect for liver by inducing oxidation stress on an interstitial cell or rat with *tert-butyl-hydroperoxide(t-BHP)*, 2.study of anti-diabetes complication effect with Glycation inhibition and streptozotocin by directly inducing diabetes on rat *in vitro* and *in vivo*. Safety test is conducted based on normal toxicity evaluations which comprises of one-time injection toxicity and 14-days repeating injection toxicity. Finally, substances for functional sources are investigated by NMR analysis after refining single substance through organic solvent separation method and column separation method.

IV. The result

EtOAc layer of leaf extracts from *Lindera obtusiloba* Bl. showed MTT assay shows utmost vitalization level. When it comes to functional test of in vitro, EtOAc layer had antioxidant activity on DPPH radical scavenging, FRAP assay, TBARS assay dose-dependently with respect to protective effect of liver. In addition, according to result of glycation inhibition experiment, it reveals more

efficacious in anti-diabetes/anti-diabetes complication effect(500ug/ml) than aminoguanidine used as positive control. It is also investigated that there is improvement in liver function and diabetes dependant on concentration, which is identified in test for liver protection function using rat and *in vivo* function test similar to *in vitro*. In accordance with normal toxicity evaluations comprised of one-time injection toxicity and 14-days repeating injection toxicity as a mean of safety test, leaf extracts from *Lindera obtusiloba* Bl. is identified not to induce any toxicity even at higher concentration level than 2000mg/kg that Korea Food & Drug Administration notices. Moreover, quercetin-3-O- α -rhamnoside(quercitrin) and a kaempferol-3-O- α -rhamnoside(afzelin) are confirmed to be substances from leaf extracts from *Lindera obtusiloba* Bl. based on the result of NMR analysis through separation and refining.

V. The Outcome of the Study and Further Plans

Based on the theory of anti-diabetes complication conducted in first year, we have published thesis paper with title of “Advanced Glycation Endproduct-induced Diabetic Complications”. Additionally, we are now contributing a thesis paper associated with the antioxidation effect of leaf extracts from *Lindera obtusiloba* Bl. and the result of safety test derived from this study will be also contributed. Moreover, vitalizing substances of leaf extracts from *Lindera obtusiloba* BL, quercitrin and afzelin, are being prepared to apply for a patent.

If various functions and safety of leaf extracts from *Lindera obtusiloba* Bl.L are testified and registered as a health care food based on the result of study, it will generate added value in agricultural industry and enhance national competency.

PART 3: Kyung-Hee Univ. Team of Chung, Se-young

I. The Title of the Study

The whitening effects and molecular biology mechanism studies through the *Lindera obtusiloba* BL. extracts.

II. The Purpose of the Study

Consumer desire increase to make quality of life better, the entry of women in public affairs and an aging society cause consumption of whitening functional cosmetics. So it is urgent for development of natural products, has excellent effects and safety.

III. The Content and the Scope of the Study

This study is performed to investigate the effect of 70 % ethyl alcohol leaf and branch extracts of *Lindera obtusiloba* BL. that on reactive oxygen species scavenging activity and inhibition of melanogenesis. The observed that whitening effects of leaf extract on melanin synthesis from UVB-induced pigmentation in C57BL/6 mice and improved that melanogenesis related proteins level.

IV. The result

Leaf and branch extracts from *Lindera obtusiloba* BL. showed had scavenging activities on DPPH radical, superoxide anion radicals, and hydroxyl radical dose-dependently. Also, leaf extract inhibited products of melanins in B16 melanoma cells and *in vivo* test. Especially, *in vivo* system, at the dose of 80, 120 mg/kg has whitening effects dose-dependently than that of ascorbic acid 70 mg/k, positive control. Also investigated as to whether ERK activation by leaf extract is related to MITF and tyrosinase down-regulation.

V. The Outcome of the Study and Further Plans

We patent applied for " The whitening and wrinkle improvement compositions contain *Lindera obtusiloba* BL. leaf extract" on B16 melanoma F10 cells and using animal model. We are expected to create of benefits about natural products, if commercialize into whitening cosmetic or health functional food using *Lindera obtusiloba* BL. extracts.

CONTENTS

Capter 1. Introduction of the Study.....	14
Section 1. Objectives of the Research.....	15
Section 2. Needs of the Research.....	15
1. The Side of Technology.....	15
2. The Side of Economy and Industry.....	17
3. The Side of Society and Culture.....	18
Section 3. Contents of the Research.....	19
Capter 2. Status of Technology Development at Home and Aboard.....	20
Section 1. The Outside Standards.....	21
Section 2. Domestic Standards.....	21
Capter 3. The Content and the Results.....	23
Section 1. Development of <i>Lindera obtusiloba</i> Bl. Leaf Tea and Natural Mixture Beverage.....	24
1. Study of <i>Lindera obtusiloba</i> Bl. on the Food Value of Used Part.....	25
2. Investigation of Changes in Essential Oil Yield and Component Contents of <i>Lindera obtusiloba</i> Bl. by Storage Condition, Drying and Processing Method.....	60
3. Development and Preference Research of <i>Lindera obtusiloba</i> Leaf Tea and Natural Mixture Beverage.....	83
Section 2. Validation of Functionality and Safety Utilizing Leaf Extracts from <i>Lindera obtusiloba</i> Bl. and Its Structure Analysis.....	96
1. Establishment of Separation Condition of Leaf Extracts from <i>Lindera obtusiloba</i> Bl. and Evaluation of Function <i>In Vitro</i>	96
2. Functional Evaluation <i>In Vivo</i> of Leaf Extracts from <i>Lindera obtusiloba</i> Bl.....	107
3. Safety Evaluation of Leaf Extracts from <i>Lindera obtusiloba</i> Bl. <i>In Vivo</i> , Isolation of Functional Materials and Structural Analysis.....	125

Section 3. The Whitening Effects and Molecular Biology Mechanism Studies Through the <i>Lindera obtusiloba</i> Bl. Extracts.....	146
1. Reactive Oxygen Species Scavenging and Cytokine Release Inhibition Effects of <i>Lindera obtusiloba</i> Bl. Extracts on Human Keratinocytes.....	146
2. The Whitening Effects from <i>In Vivo</i> System.....	163
3. The Whitening Effects Mechanism.....	168
4. Statistical Evaluation.....	173
Chapter 4. Goal Achievement and Contribution to Related Industries....	174
Section 1. Achievements of Goals and Contributions.....	175
Section 2. The Side of Technology.....	178
Section 3. The Side of Economy and Industry.....	178
Section 4. The Side of Society and Culture.....	178
Chapter 5. Result of the Study and Application Plan.....	179
Section 1. A Patent Application.....	180
Section 2. Papers.....	180
Section 3. Scientific Presentaion.....	181
Section 4. Other Application Plans.....	182
Chapter 6. International Science and Technology Information Collected in the Process of the Study.....	183
Section 1. Functional Studies of Tea and Beverages and Manufactural Approach.....	184
Section 2. Investigation of Fibrosis from Leaf Extracts from <i>Lindera obtusiloba</i> B.....	185
Section 3. Research of Molecular Biological Mechanisms Related in Whitening Effects.....	185
Chapter 7. Reference.....	186

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요.....	14
제 1 절	연구개발의 목적.....	15
제 2 절	연구개발의 필요성.....	15
1.	기술적 측면.....	15
2.	경제·산업적 측면.....	17
3.	사회·문화적 측면.....	18
제 3 절	연구개발의 범위.....	19
제 2 장	국내외 기술개발 현황.....	20
제 1 절	국외 수준.....	21
제 2 절	국내 수준.....	21
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과.....	23
제 1 절:	제 1 세부 생강나무 잎차 및 천연혼합음료 개발.....	24
1.	이용가능 부위별 식품적 가치 연구.....	25
2.	생강나무의 저장조건, 건조법, 가공법 등에 따른 수율 및 유효성분 함량 변화 구명.....	60
3.	생강나무 잎차 및 천연혼합음료개발 및 기호도 조사.....	83
제 2 절:	제2세부 생강나무 추출물을 이용한 기능성·안전성 검증, 생리활성 물질의 정제 및 구조분석.....	96
1.	생강나무의 용매별 추출분리 조건 확립 및 <i>in vitro</i> 기능성 평가.....	96
2.	생강나무 추출물을 이용한 <i>in vivo</i> 기능성 평가.....	107
3.	생강나무 추출물의 <i>in vivo</i> 안전성 평가 및 기능원인물질의 정제 및 구조해석.....	128
제 3 절:	제 1 협동-생강나무 추출물을 이용한 미백 효과 검색 및 분자생물학적 기전연구.....	149
1.	생강나무에서 생산된 시료를 이용하여 human keratinocyte에서 ROS 소거능 및 cytokine 생성 억제능 검색.....	149
2.	생강나무 추출물을 이용한 <i>in vivo</i> 에서 미백 효과 검색.....	163
3.	생강나무 추출물을 이용한 미백 효과의 분자생물학적 기전 연구.....	168
4.	자료 분석 및 통계처리.....	173

제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도.....	174
제 1 절	연구개발의 달성도 및 기여도.....	175
제 2 절	기술적 측면.....	178
제 3 절	경제·산업적 측면.....	178
제 4 절	사회·문화적 측면.....	178
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획.....	179
제 1 절	특허 출원.....	180
제 2 절	논문.....	180
제 3 절	학술발표.....	181
제 4 절	그 외 활용계획.....	182
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보.....	183
제 1 절	차와 음료를 대상으로 기능성과 제품화 연구.....	184
제 2 절	생강나무 추출물의 간섭유에 관련된 연구.....	184
제 3 절	미백에 관련된 분자생물학적 기전 정보.....	185
제 7 장	참고문헌.....	186

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적

연구개발 최종목적: 자생 생강나무를 이용한 웰빙 기능성 신소재 및 식품의 개발	
<p>생강나무의 잎차 및 천연혼합음료 개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> ● 부위별 수확량 측정 및 유용성분(에센셜 오일 등) 조사를 통한 식품적 가치 연구 ● 잎의 MA 저장법 개발 ● 가공용 생강나무 잎차 개발 ● 가공용 생강나무 천연혼합음료개발
<p>생강나무 추출물을 이용한 기능성·안전성 검증, 생리활성 물질의 정제 및 구조분석</p>	<ul style="list-style-type: none"> ● 생강나무로부터 기능성분 추출 ● 생강나무 추출물로부터 간기능 보호활성, 당뇨/당뇨합병증 억제 기능성 및 안전성 검증 ● 기능원인 물질의 정제 및 구조분석 연구
<p>생강나무 추출물을 이용한 미백효과 검색 및 분자생물학적 기전연구</p>	<ul style="list-style-type: none"> ● 배양한 사람 피부 세포를 이용한 여러 가지 생강나무 추출재료의 미백효과 검색 (<i>in vitro</i>) ● 세포실험에서 가장 효능, 경제성, 수율이 우수한 재료를 이용하여 brow guinea pig를 이용한 미백효과 검증 ● 미백효과 대한 분자생물학적 기전 연구

제 2 절 연구개발의 필요성

1. 기술적 측면

- 생강나무 (*Lindera obtusiloba* BL.)는 황매목이라고도 불리는 녹나무과 낙엽관목으로 우리나라 전역에 널리 자생하고 있으며, 잎을 따서 냄새를 맡으면 생강과 비슷한 냄새가 나는데, 생강처럼 톡 쏘지 않고 아주 은은하면서도 산뜻한 냄새가 남.
- 봄철에 산에서 가장 먼저 노란꽃을 피우는 등 관상가치가 매우 뛰어나나 임목갱신을 위하여 무분별하게 벌채되는 경우가 많으므로 앞으로 본 연구를 토대로 경제 수종으로 개발하는 것이 바람직함.

- 천연식물자원은 옛날부터 건강의 유지와 병의 치료에 널리 이용되어 왔으나 이에 대한 과학적인 기능성과 안전성에 대한 연구가 주요 식물별로 체계적으로 수행되어야만 향후 WTO 체제 및 FTA 협정에 따른 국제적인 무한경쟁시대에 대응하고, 이를 대처하지 못하면 국내 자생 식물성 소재에서조차 새로운 물질 소재생산과 이용적 측면에서 경쟁력을 잃게 됨.
- 생강나무를 달인 것을 조금씩 마시면 두통, 기침, 복통, 산후풍 등에 효과가 있어 민간에서는 이 나무를 기침약, 해열약, 산후조리용 보약으로 잎을 달여 먹기도 한 기록이 있음. 또한 간장 질환에도 효과가 있는 것으로 알려져 있어 황달에 머루덩굴, 찔레나무 뿌리를 함께 달여 먹기도 하고, 나무껍질은 삼참풍(三鑽風)이라 하여 생약으로 이용됨.
- 생강나무 씨는 예로부터 동백꽃이 자라지 않는 추운지방에서 최고급 기름을 짜는 데 사용하였으므로 동백나무라고도 불리며 예로부터 민간요법에 사용되어 온 재료로서 타박상, 어혈, 멍들고 뺨 데 등에 효력이 있는 약나무로 알려져 있음.
- 가지에는 방향성 정유를 함유하고 있고 특징적 성분으로는 녹나무과의 나무들에 들어있는, 캄파, 게피알데히드, 피넨 등의 성분이 독특한 향과 매운맛을 내며, geranyl acetate, L-phellandrene 등이 주성분으로 알려져 있음. 종자에는 linderic acid, tsudzuic acid, geranyl acetate, L-phellandrene 등을 함유하고 있음.
- 이와 같이 재료를 쉽게 구할 수 있고 건강효용가치가 높기 때문에 부가가치가 높은 상품의 개발이 가능하나 생강나무의 상업적 이용은 거의 시도된 바 없음.
- 자생 생강나무의 꽃, 잎, 줄기, 뿌리, 열매에 들어 있는 독특한 향과 특수 기능성 물질의 추출과 그 기능성 및 안전성과 그 구조분석이 필요함.
- 본 연구진은 생강나무 엽의 열수 및 메탄올 추출물에서 간세포보호활성이 유의적으로 관찰됨을 일차 간세포 배양시스템에서 예비실험을 통하여 확인하였고, 항산화 효과와 항글라이케이션 효과도 확인하였음.
- 2004년 1월부터 전면 시행된 건강기능 식품법에 따르면 기능성·안전성 부여에 대한 원천 연구 및 기술 확보가 반드시 필요하고, 전 임상단계 기능성·안전성 평가를 받은 식물성 가공 소재로 산업화를 시도하면 우리나라 고유의 자생식물을 이용한 제품개발과 농업발전에 큰 이익을 가져올 것으로 예상됨.
- 천연식물의 추출물을 이용한 미백원료는 효과와 제품의 안정성으로 인해서 날로 각광 받고 있는데 *in vitro*와 *in vivo* 실험을 통해 천연식물 추출물을 이용한 미백원료의 효과와 안정성을 확보함으로써 화장품 업계에 큰 이익을 가져올 것으로 예상됨.

- 최근 Well-being 에 관한 삶의 방식이 유행하면서 삶의 질을 향상시키는데 관한 소비자의 욕구는 매우 다양하게 나타나고 있음. 특히 고령화 사회로 진입하면서 노화에 대한 정서는 노화에 대한 두려움 또는 노화의 생리적 과정을 지연시키려는 노력으로 나타나고 있으며, 가능한 젊음을 유지하려는 successful ageing (아름답게 나이를 먹는 것)에 대한 정서가 사회 전반으로 늘어나고 있는 추세임. 이에 더불어 평소에 건강을 유지하기 위한 노력으로 건강기능성 식품 시장의 규모가 최근 몇 년 사이에 급격하게 성장하였으며, 화장품 업계 역시 'Cosmeceuticals' ('cosmetic'+ 'pharmaceuticals') 및 'Neutraceuticals', 'Beauty supplement' 등의 기능성 화장품 및 식이 화장품의 개발이 빠르게 이루어지고 있음. 또한 정보화 시대에 발맞추어 똑똑해진 소비자들에게 다가가기 위해서는 안전하고 효과적인 천연 소재의 조건은 물론, 그 효능에 대해 매우 구체적으로 설명될 수 있어야 함.

2. 경제·산업적 측면

- 웰빙시대를 맞아 아로마테라피 및 화장품용도, 미용기능식품, 음용차, 식품첨가 소재 등을 개발 및 상용화하여 급변하는 국내외 농업환경에서 농민의 안정적인 고소득을 확보하기 위한 차별화 작업이 필요함.
- 이에 대한 경쟁성과 차별성을 지니고 있고 아울러 국내 전역에 다량 서식하나 현재까지 크게 이용되지 못하고 있는 생강나무 꽃, 엽, 열매 등을 이용하여 부가가치가 높은 식품소재를 개발 및 생산함으로써 부존자원을 이용한 산간지역 농가소득에 획기적인 도움이 될 수 있음.
- 현대인의 건강에 대한 관심이 증가하면서 웰빙 식품에 대한 시장이 폭발적으로 증가하고 있으므로 경제 산업적 추세에 맞는 제품화 개발이 충분히 가능함.
- 업계에서는 건강기능식품법의 시행에 따라 건강기능식품 시장이 더욱 빠르게 성숙하고 있고 (2005년 4조원 시장규모 예상) 기능성과 안전성에서 경쟁력이 뒤떨어지는 제품을 생산하는 업체의 경우 향후 형성되는 시장에서 상당한 불이익이 예상됨.
- 최근 각광받는 농업과학 기술을 응용하여 경제적으로 국내 어느 산에서 얻을 수 있는 생강나무를 원료로 식품산업에 유용한 웰빙 기능성 첨가물 소재의 개발, 미용기능식품, 음용차를 개발하여 농가 소득 증대에 기여할 수 있음.
- 먹는 화장품 "Beauty Food"는 일본과 유럽 등지에서 매년 20%의 성장을 기록 중이며, 미국에서는 2004년 약 125억달러로 추정되는 영양보조제 시장의 5%를 차지함.

- 각종 생활습관성질환의 급격한 증가에 따른 경제적 비용이 급등.
 - 일례로 당뇨병의 경우 WHO에 따르면 전 세계에서 최소 20명당 1명이 당뇨병으로 사망하고 있으며 직접적인 의료비 지출은 국가 보건예산의 2.5~15 %, 간접적인 비용은 그 5 배에 이를 것으로 추산되며 전 세계적으로 미치는 경제적 손실은 1,300억 불 (150조원) 로 추정됨.
 - 국내에서도 당뇨병 관련 의료비 지출은 연간 1조 3천 억원을 상회하며 국가 경쟁력 손실에 커다란 부분을 차지.
- 생활습관성질환과 관련한 기능성 식품시장의 확대.
 - 미국의 각종 질환관련 건강기능 식품시장은 97년 650억불에서 2000년 1380억불의 높은 성장을 보이고 있으며 2005년도에는 97년 대비 10배 이상 규모로 증가할 것으로 예상되고 있음. 질환관련 건강 기능식품 가운데 콜레스테롤, 심장병 관련 상품은 97년 대비 130 억불 정도로 전체 시장의 20 %를 차지하고 있음. 일본은 기능성 식품 개념의 최초 도입국으로 시장규모는 2000년도 8,100억 엔으로 전년대비 8 % 성장.
 - 우리나라도 기능성 식품 시장은 99년부터 연간 10 % 이상의 빠른 증가세를 보이고 있어 2001년 전체 시장규모는 1조 2,000억 원 정도였으며 이는 최근 불고 있는 웰빙 열풍에 편승하여 더욱 가속화 될 전망이다(장경원 2003).
- 현대인의 미(美)에 대한 관심이 증가하면서 천연물질을 이용한 웰빙 시장이 폭발적으로 증가하고 있으므로 경제 산업적 추세에 맞는 제품화 개발이 충분히 가능함.
- 피부 기능성 화장품 시장은 매년 고급화, 다양화되는 소비자들의 수요에 의해 효과적인 소재의 개발이 매우 필수적임. 급격한 시대 변화와 함께 대두되는 환경오염 역시 자외선 투과도의 증가 및 피부 손상을 유발하며, 이러한 보고는 소비성 수요 뿐 아니라 건강 기능적 측면에서 새로운 소재 개발 연구가 매우 시급함을 알리고 있음.

3. 사회·문화적 측면

- 의학발달에 따라 평균수명이 증가하고 생활습관성 질환의 문제가 대두되면서 건강에 대한 관심이 급증함.
- 통계청이 2004년 12월 20일 발표한 '2002년 생명표 작성결과'에 따르면 2002년도 기준 남성의 평균 수명은 73.4세로 전년의 72.8세에 비해 0.6년이, 11년 전 인 지난 91년의 67.7세에 비해서는 5.6년이 각각 높아졌으며 현재 한국의 평균수명은 남성 73.4세, 여성 80.4세로 전체적으로는 77.0세에 도달한 것으로 조사됨.
- 그러나 순환기질환 등 생활습관성 질환의 사망률 비율은 점차 증가추세로 45세의 남성이 위암, 간암 폐암 등 각종 암이나 뇌혈관, 고혈압, 심장병 등 순환기계통 질환으로 사망할 확률은 점차 증가하여 50.38 %인 것으로 나타났음.

- 이러한 평균 수명의 증가 질병패턴의 변화와 함께 소득수준이 증가하면서 선진국형 생활패턴으로 가고 있는 국민의 필요에 맞는 우수한 건강 기능 식품 소재에 대한 관심이 증대되고 있음.
- 식습관의 서구화와 인구의 노령화에 따라 생활습관성 질환에 따른 사망률이 급격하게 증가하는 추세이므로 이를 예방하기 위한 웰빙 산업이 많은 관심을 끌면서 건강관련 소재가 소비자 계층에 크게 주목을 받고 있음.
- 농업기반의 상대적 상실로 인한 문제의 현실적인 대처방안으로 건강 추구를 목적으로 하는 유효성과 안전성에 대한 차별화전략을 취하여 이를 구현하는 새로운 사고의 전환이 필요한 실정임.
- 전국에 널리 자생하는 생강나무를 이용하여 웰빙 기능성 소재를 개발하고 생강나무 차를 상품화 할 경우 사회 문화적 코드에 상응하는 시장성 높은 제품을 개발 할 수 있을 것으로 기대됨.
- 경제 성장에 의한 생활수준의 향상으로 많은 사람들이 외모에 대한 관심이 급격하게 증가하는 추세이다. 따라서 웰빙 산업이 많은 관심을 끌면서 미에 관련된 소재가 소비자 계층에 크게 주목을 받고 있음.
- 특히 미백용 기능성 화장품 시장은 여성의 사회 진출 및 소득의 증가에 따른 시대적 요구와 젊고 탄력 있는 피부를 유지하기 원하는 여성들의 욕구 증대와 맞물려 매우 급격하게 성장하고 있음. 최근 미백, 자외선 차단 등의 복합적인 멀티 기능성 화장품 제품들은 매우 빠른 성장세를 보이며, 화장품 시장에서 강세를 보이고 있음. 피부 기능성 소재가 첨가된 기능성 화장품은 단순 경피 흡수에 의해서 피부를 관리하던 기존 단순 화장품의 기능을 넘어서 진피 이하 기저층까지 흡수되어 피부조직에 작용하는 성분의 작용이 필수적이며, 피부에 직접적으로 작용하므로 부작용을 유발할 가능성을 가지고 있음. 이를 볼 때 천연 소재는 뛰어난 효능과 함께 소재의 안전성 및 저 자극성의 조건이 충분히 검토되어야 할 것임.

제 3 절 연구개발의 범위

아이디어 개발	시작품 개발	제품 또는 공정개발	기타
		<ul style="list-style-type: none"> ● “자생 생강나무를 이용한 웰빙 기능성 신소재 및 식품 개발”에 초점을 맞추고 있으므로, 국내 전역에 다량 서식하나 현재까지 크게 이용되지 못하고 있는 생강나무 꽃, 잎 등을 이용하여 기능성·안전성 부여에 대한 원천 연구 및 기술을 확보하고, 전 임상단계 기능성·안전성 평가를 통해 식물성 가공 소재로 부가가치가 높은 식품소재를 개발 및 생산함으로써 부존자원을 이용한 산간지역 농가소득에 획기적인 도움이 될 수 있음. 산업화를 시도하면 우리나라 자생식물을 이용한 제품개발과 농업발전에 큰 이익을 가져올 것으로 예상됨. 	

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국외 수준

개념정립 단계	기업화 단계	기술 안정화 단계
현재 생강나무에 대한 연구는 정유성분에 관한 것이 주이며 근래에 들어와 부분적으로 활성물질에 대한 탐색 연구가 부분적으로 이루어지고 있음		

- 세계시장의 성격
 - 안정성이 큼
 - 영속성이 있음
 - 성장성이 있음

● 시장규모

1. 주시장 (국가 또는 지역) : 미국, 유럽, 중국 등 아시아 전역
2. 미백 기능성 화장품 시장규모

구 분	현재의 시장규모 (2006년)	예상 시장규모 (2010년)
세 계 시 장 규 모	10,000억원	15,000억원
한 국 시 장 규 모	2,000억원	3,800억원

* 산출근거 : 화장품 전문지 기사 참조(한국시장은 매년 10% 성장을 예상하여 산출함)

- 현재 대부분의 회사들이 한방 미백 성분을 이미 개발했거나 개발 진행 중에 있지만 본 연구에서 개발하고자하는 생강나무 추출물에서 추출한 미백 성분을 이용하여 미백기능성 화장품을 출시한 회사는 없는 상태임. 그러나 많은 회사들이 한방 미백 성분을 이용하여 기능성 화장품을 연구 개발하는 시도는 계속되고 있으며 향후 많은 연구가 이루어질 것으로 예상된다.

제 2 절 국내 수준

- 우리나라의 차 재배면적은 93년 이후 증가추세를 보여 98 현재 1,128 ha을 재배하여 1,417 톤을 생산. 재배 농가 수는 1,390 농가로 93년에 비해 651 농가가 증가.
- 최근 차는 낮은 칼로리의 자연 건강음료로서 인식되고 있고, 국민소득의 향상과 국민의 건강에 대한 욕구의 증대 등과 일치되어, 차의 소비가 날로 증가하고 있는 추세.

- 국내의 차 소비는 92년도에 국민 1인 당 10 g이던 것이 97년에는 30 g으로 늘어 매년 20~30 %씩 증가하고 있는 추세. 이대로 계속 증가할 경우 2002년에는 국민 1인 당 100 g 정도 소비할 것으로 추정. 그러나 커피의 수입량이 '97년 63,550 톤으로서 2억 달러가 소비되어 우리나라 총 농산물 수출액 10억 달러의 1/5을 차지하는 규모임.
- 다양한 차류의 개발로 수입대체는 물론 농가수입의 향상에 많은 기여를 할 수 있을 것으로 기대됨.
- 생강나무의 경우 cytotoxic butanoid, furanolignan 동정에 관한 연구 (Kwon HC, *et al.*), γ -lactone에 관한 연구 외에 생리적 기능에 관한 연구가 전무한 상태로 체계적인 연구를 할 경우 세계적 경쟁력을 갖출 수 있음.
- 생강나무의 경우 전통적으로 민간요법에 많이 사용되어 왔으나 관련 기술개발, 상품개발이 거의 전무한 상태이므로 시기적절한 연구로 기능성, 안전성이 검증된 부가가치 높은 상품을 개발 할 수 있음.
- 기능성 화장품의 고시 원료와 농도

1. 피부의 미백에 도움을 주는 제품의 성분 및 함량

구분	성분명	특성	함량
1	닥나무추출물	카지놀 F	2%
2	알부틴	천연, 합성	2%
3	에칠아스코빌에텔	비타민 C 유도체	2%
4	유용성감초추출물	글라브리딘 (일본개발)35%이상	0.05%
5	아스코빌글루코사이드	비타민 C당 유도체	2%
6	마그네슘아스코빌포스페이트	비타민 C 유도체	3%

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절: 제 1 세부 생강나무 잎차 및 천연혼합음료 개발

(고려대 박권우 교수팀)

생강나무(*Lindera obtusiloba* Blume var. *obtusiloba*)는 녹나무과(*Lauraceae*), 생강나무속(*Lindera* Thunb.)에 속하는 낙엽성 관목으로 동식물속에는 털조장나무(*L. sericea* Blume), 뇌성목(*L. angustifolia* Cheng var. *globata* T. Lee), 비목나무(*L. erythrocarpa* Makino), 감태나무(백동백, *L. glauca* Blume)가 있으며(Lee, 2003), 우리나라, 중국, 일본에 분포하며 수고가 3-6m 에 이른다. 지방명으로 아귀나무, 개동백나무, 아구사리, 동박나무로 불리기도 한다. 이른 봄(3월) 잎이 나오기 전 작은 황색의 꽃이 모여 피는 식물로서 잎은 호생하며 끝이 날카로우며 3줄기의 명료한 맥이 있다. 과실은 장과로 가을에 붉은 흑색으로 익는다. 가지를 꺾으면 생강 냄새가 나기 때문에 생강나무, 열매로 기름을 짜서 부인들이 머릿기름으로 사용되어 동백나무, 일찍 꽃이 피기 때문에 매화나무로 불리고 있으며, 생약으로의 이용은 주로 수피를 사용하며 단향매(檀香梅, *Linderae obtusilobae* Cortex)라 한다. 생강나무와 같은 녹나무과의 녹차는 노화방지, 항암, 독소제거, 항균, 혈당강하, 혈압강하, 혈중콜레스테롤 저하 및 치매 예방 등의 다양한 효능이 있는 약리적 성분을 함유하고 있다고 보고되고 있다. 녹차의 향기 성분은 불포화 지방산이 lipoxygenase 에 분해되어 C₆-alcohols, C₆-aldehydes 등의 신선한 풀향(grassy, greenish)과 terpenes와 terpenoid glycosides의 가수분해 반응으로 생성하는 monoterpene alcohols, aromatic alcohols 등의 향긋한 꽃향(floral), 그리고 carotenoid 의 산화반응 등으로 생성되는 미량의 달콤한 향(sweet, fruity, floral)의 특성을 가진다. 녹차의 짙은맛을 내는 일종의 polyphenol 계통의 tannin 성분이 입맛을 돋우어 주므로 기호성이 뛰어나 기호식품으로 오랜 음용의 역사와 함께 문화생활의 한 부분으로 자리매김 되어져 왔다. 식물이 향기를 만들어 내는 일을 하는 곳을 정유(精油)샘이라고 하며 이 정유샘 안의 정유는 대부분 잎의 뒷면에 많이 분포하고, 여러 가지 방향성화합물을 가지고 있어 각 식물의 고유의 향기를 낸다. 생강과 생강나무의 정유 성분을 비교한 자료에 따르면, 둘 다 β -eudesmol 과 phellandrene 이라는 성분을 가지고 있는 것으로 밝혀졌으며, 생강냄새는 이런 성분들 때문이라고 말할 수 있다. 생강 맛은 위에서 언급한 성분 외에도 여러 성분이 복합하여 만들어 지나, 생강나무에서 꼭 생강 맛이 난다고 하기는 어렵다. 생강나무, 차나무 등의 녹나무과 식물은 식물전체에 정유 성분을 함유하는 조직을 가지고 있어 방향성 성분을 다량 함유하고 있다.

본 연구는 우리나라 고유 방향성 식물자원의 효과적인 활용을 위한 연구로써 이용가치가 뛰어난 방향성 자생식물인 생강나무 잎의 다양한 생리적 기능성을 바탕으로 전국 각지에서 자생하는 생강나무의 정유함량을 분석하고, 이용가능한 부위별 에센셜 오일의 성분 분석 및 친숙한 향의 추출방법, 건조방법, 저장방법을 최적화함으로써 소비자의 이용증대를 기할 수 있는 차 제조에 적합한지에 대한 연구를 수행하였다.

1. 이용가능 부위별 식품적 가치 연구

가. 부위별 수확량 측정 및 유용성분(essential oil 등) 조사

(1) 시험방법

(가) 지역별 정유량 변화 및 차이조사

지역별 정유 함량 및 성분조사를 위하여 생강나무의 지역별 채취는 기후에 의한 생태 권역을 기준으로 생육지역을 예측하여 11곳의 지역을 선발 하였다. 선발 지역은 1차적으로 인공조림이 최대한 배제되어 있는 지역으로 자연림의 형상을 갖추고 인근 도시, 또는 대형 도로 등의 환경 영향이 최대한 적게 미치는 지역을 선발하였다.

각 채취지역은 우리나라의 산맥형태가 동쪽의 태백산맥을 중심으로 서쪽으로 뻗어나가는 형상을 가지고 있는데 이들 산맥은 식물이 이동하기에 다소 어려운 조건의 형성하고 있다. 또한 이들 산맥은 우리나라의 주요 기후대를 분류하는 기준이 되기도 하며 남해와 동해를 흐르는 난류의 영향으로 남부해안일대와 동부 해안지역은 아열대의 해양성 기후를 나타내며 중부지역을 중심으로 U 자형의 기후 분포를 만들어 낸다.¹⁾

주요 채취 지역은 다음의 Table 1 과 같다.

Table 1. Collected regions and location data.

Abbreviation	Region	Latitude	Longitude
W	Wonju	37°35.151	127°01.612
R	Gangneung	37°44.868	128°00.732
U	Uljin	36°52.807	129°24.960
P	Pohang	36°00.122	129°17.381
B	Busan	35°15.311	129°04.989
S	Suncheon	34°57.811	127°30.742
M	Mokpo	34°51.823	126°28.035
K	Gwangju	35°10.743	126°56.779
J	Jeonju	35°46.521	127°01.387
D	Daejeon	36°14.942	127°16.161
C	Cheonan	36°47.391	127°12.364

(나) Essential oil의 추출

Essential oil 의 추출²⁾은 수증기 연속 추출방법(SDE, Simultaneous stem distillation/extraction)으로 추출하였다(Fig. 1). 각각의 채취된 잎은 3시간동안 연속 추출하였으며, 생체 시료는 100g 을 사용하였고 4L의 증류수를 적용하였다. 가열기로는 전기 멘틀을 사용하였다. 1회 essential oil 추출 후 세척과정을 2시간동안 실시하여 샘플간의 영향을 줄였다. 추출용매로는 diethyl ether(J.T.Baker, Mexico, 99.9%)를 사용하였으며 항온수조를 이용하여 온도를 조절하였다. 제습제로 magnesium sulfate anhydrous를 사용하였고, over night 후 rotary evaporater(EYERA. Tokyo Rikakikai Co, LTD)로 감압 농축하여 최종적으로 정유 성분을 분리하였다. 이것을 정량하여 정유 수율을 측정하였으며, GC/MSD 분석에 적용하였다.

(다) GC/MSD 분석

Essential oil의 성분 분석을 위하여 GC는 agilent 6890N(Agilent, U.S.A.)를 사용하였으며, MSD는 agilent 5975MSD를 사용하였다. Inlet temp.는 230℃ spliness mode였으며, carrier gas는 He, flow ratio 는 69.1mL/min 였다. Oven 조건은 ininitial temp. 는 50℃, 5분간 유지하고 final temp. 는 230℃, 5℃/10min 으로 조정하였다. 컬럼은 agilent INNOWax polyethylene glycol(30.0m×250µm×0.25µm)를 사용하였다.

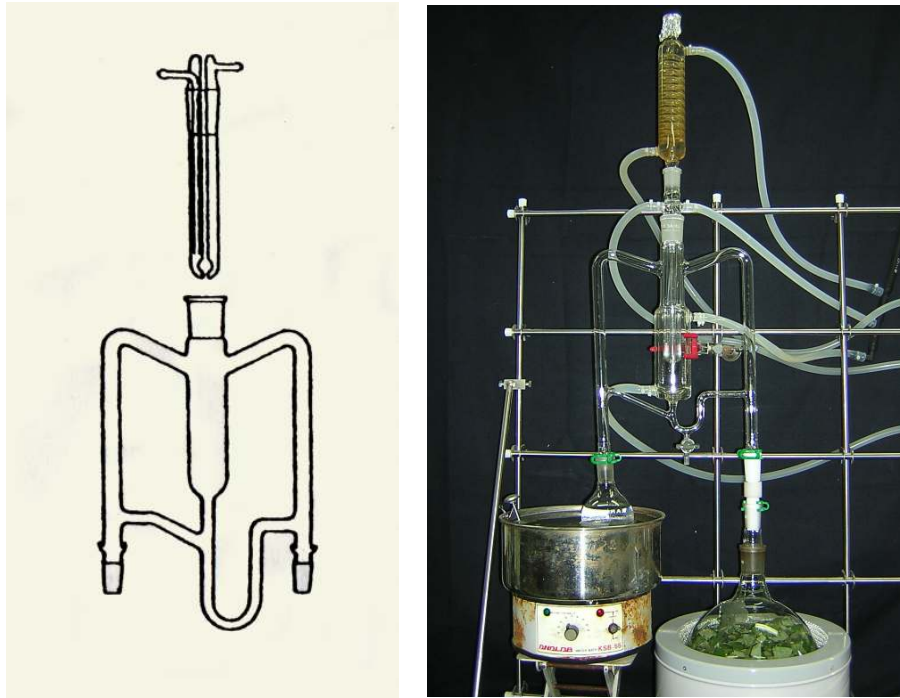


Fig. 1. Nickerson and Likens SDE(Simultaneous stem distillation/extraction) apparatus and using extract system of this study.

(2) 연구 결과 및 고찰

지역별 정유 성분의 차이를 분석하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

지역적으로 생강나무의 정유 수율을 전주 지역이 0.12%의 수율을 보여 가장 높은 수율을 나타내었다(Fig. 2). 전주 지역에서는 특히 자생 생강나무의 경우 키가 3m 를 넘지 않는다고 하였는데³⁾ 실제 채취지역 전체에서 초장이 3m 이내의 개체만을 발견하였으나 전주 지역에서만 유일하게 5m 이상의 초장을 가지는 개체의 균락을 발견하였다. 이와 같은 결과는 생강나무의 자생지의 최적 조건을 설명할 수 있거나 또는 전후 조림사업에 의하여 자생지 자체가 급격하게 감소한 후 다시 개체가 증가하기 시작하는 것으로 판단할 수 있다.

전주 지역을 중심으로 광주, 대전, 천안 지역에서 0.09%의 수율을 나타내 비교적 다른 지역에 비하여 높은 정유 함량을 보이며 가장 낮은 함량을 보인 지역은 목포, 포항, 원주 등으로 0.06% 수준의 수율을 나타내었다. 이것은 생강나무의 자생지 연평균 온도 분포가 15-13℃ 분포 지역으로 나타난 곳은 비교적 낮은 정유 함량을 보이며, 그 이외의 온도 지역은 다소 높은 경향을 나타내었다(Fig. 2). 이것은 생강나무의 자생지가 한국 전 지역이나, 온대지역이라고 할 수 있는 중부 지역에서 비교적 높은 정유 함량을 보이고, 아열대성에 가까운 남부지역에서는

다소 함량이 낮았으며, 원주와 같이 부위 40° 이상 최한월 평균기온 -3°C 이하 최한월 평균기온 10°C 이상인 아한대 지역에 속하는 중부 이북지역에서 비교적 낮은 함량을 보여 생강나무 자체가 온대 지방 특산 식물의 특징을 갖는다고 사료되었다. 지료로 나타내지는 않았으나 부산, 순천, 목포의 자생지에서는 유관적인 관찰로 중부 내륙지역에 비하여 나무 자체의 수세가 약하고 개체수가 적으며, 수령이 오래 되었을 것으로 판단되는 개체를 발견하기 어려웠다. 위의 결과를 통하여 생강나무의 생육 적지가 전주 지역을 중심으로 하는 중남부 지역으로 판단할 수 있었다.

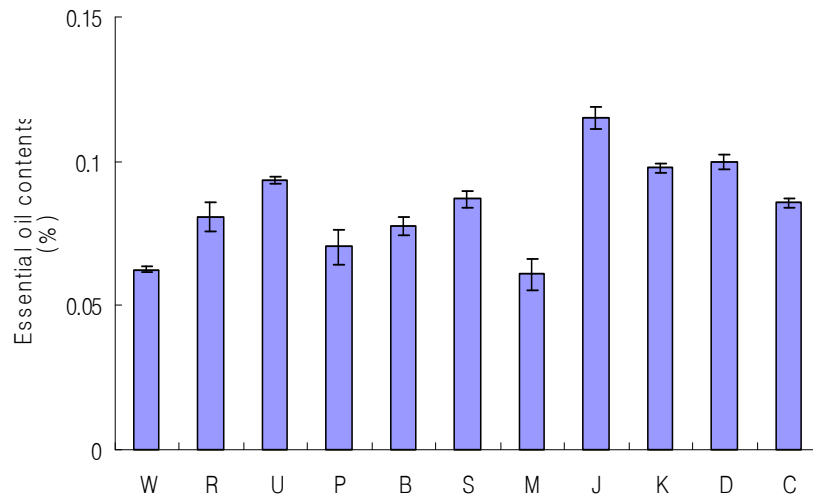


Fig. 2. Effect of collected regions on the essential oil contents of leaf of *Lindera obtusiloba* Bl.

W:Wonju, R:Gangneung, U:Uljin, P:Pohang, B:Busan, S:Suncheon, M:Mokpo, J:Jeonju, K:Gwangju, D:Daejeon, C:Cheonan

Vertical bars represent \pm S.E.(n=3)

생강나무의 잎에서 추출한 essential oil 의 GC/MSD 분석 결과 27가지 물질이 분리되었으며 이중 주요 물질로 α -pinene, camphene, β -pinene, α -phellandrene, β -phellandrene, caryophyllene, caryophyllene oxide, epiglobulol 의 8가지 물질이 주요 물질로 동정되었다 (Table 2). 이중 가장 높은 함량을 보이는 물질은 caryophyllene 으로 10.45-10.79%의 함량을 가지는 것으로 나타났다. Caryophyllene의 산화형인 caryophyllene oxide는 1.19-1.35%의 함량을 나타내었고, 다음으로 높은 함량을 나타내는 물질은 β -phellandrene 으로 2.72-3.42%의 함량을 나타내었고 α -phellandrene 은 1.59-2.55%를 나타내었다. 이외 α -pinene, camphene, β -pinene, epiglobulol은 0.3-0.4%의 유사한 함량을 나타 내었다. 지역적인 차이는 크게 나타나지 않았으나 caryophyllene, caryophyllene oxide, epiglobulol함량은 원주 지역에서 가장 높게 나타났으며, α -pinene, camphene, β -pinene, α -phellandrene 은 강릉 지역에서 가장 높게 나타났다.

위의 결과를 통해서 잎의 정유 성분은 지역적인 차이가 크지는 않으나 일부 차이가 나타나는 것으로 판단되었다. A, β -pinene, limonene, β -phyllandrene, camphor 등 의 정유성분이 *Picea glauca*에서 동서남북의 4방향으로 채취된 샘플을 분석한 결과 각기 서로 다른 함량을

보였다고 하였으며⁴⁾, white spruce tree에서 년도별 정유를 추출한 결과 년도에 따라서 α , β -pinene, limonene, camphor 등에서 함량 차이를 나타내었다.

국내에서는 초피나무와 산초나무의 성분을 지역적으로 분석한 결과 주요 물질의 조성이 서로 다를 것을 보고하였다.^{5, 6)} 꽃향유에 있어 채취지역 나타나는 chemotype에 있어 차이가 있으며 지역적으로 발견되지 않는 물질도 있다고 하였다.⁷⁾ 본 연구의 결과는 위의 선행 연구들의 결과와 유사한 경향을 나타내었으며 생강나무 잎의 정유 성분은 지역적 특성을 반영한다고 할 수 있다.

Table 2. Effect of collected regions on the essential oil components contents in leaf of *Lindera obtusiloba* Bl.

Region	Components contents(%)			
	α -pinene	Camphene	β -pinene	α -phellandrene
W ^z	0.29 \pm 0.09 ^y	0.33 \pm 0.03	0.36 \pm 0.02	1.59 \pm 0.45
R	0.43 \pm 0.05	0.47 \pm 0.02	0.45 \pm 0.03	2.55 \pm 0.64
U	0.36 \pm 0.08	0.40 \pm 0.08	0.41 \pm 0.09	2.07 \pm 0.35
P	0.36 \pm 0.09	0.40 \pm 0.01	0.41 \pm 0.01	2.07 \pm 0.22
B	0.38 \pm 0.01	0.42 \pm 0.02	0.42 \pm 0.02	2.23 \pm 0.33
S	0.37 \pm 0.01	0.41 \pm 0.04	0.41 \pm 0.03	2.12 \pm 0.59
M	0.37 \pm 0.18	0.41 \pm 0.04	0.41 \pm 0.02	2.14 \pm 0.65
J	0.37 \pm 0.06	0.41 \pm 0.02	0.42 \pm 0.06	2.16 \pm 0.62
K	0.37 \pm 0.11	0.41 \pm 0.04	0.41 \pm 0.07	2.14 \pm 0.22
D	0.37 \pm 0.08	0.41 \pm 0.06	0.41 \pm 0.05	2.15 \pm 0.44
C	0.37 \pm 0.03	0.41 \pm 0.02	0.41 \pm 0.03	2.15 \pm 0.47
	β -phellandrene	Caryophyllene	Caryophyllene oxide	Epiglobulol
W ^z	2.89 \pm 0.22	10.79 \pm 1.12	1.35 \pm 0.03	0.47 \pm 0.02
R	3.78 \pm 0.06	10.45 \pm 1.36	1.19 \pm 0.08	0.30 \pm 0.05
U	3.34 \pm 0.29	10.62 \pm 1.24	1.27 \pm 0.06	0.39 \pm 0.07
P	3.34 \pm 0.23	10.62 \pm 1.56	1.27 \pm 0.05	0.39 \pm 0.01
B	3.49 \pm 0.42	10.56 \pm 0.23	1.24 \pm 0.08	0.36 \pm 0.02
S	3.39 \pm 0.09	10.60 \pm 1.47	1.26 \pm 0.04	0.38 \pm 0.08
M	3.40 \pm 0.15	10.59 \pm 1.79	1.26 \pm 0.08	0.37 \pm 0.03
J	3.42 \pm 0.17	10.59 \pm 1.63	1.25 \pm 0.06	0.37 \pm 0.08
K	3.40 \pm 0.19	10.59 \pm 1.66	1.26 \pm 0.06	0.37 \pm 0.03
D	3.41 \pm 0.28	10.59 \pm 0.86	1.26 \pm 0.09	0.37 \pm 0.03
C	3.41 \pm 0.61	10.59 \pm 1.34	1.26 \pm 0.04	0.37 \pm 0.03

^zW:Wonju, R:Gangneung, U:Uljin, P:Pohang, B:Busan, S:Suncheon, M:Mokpo, J:Jeonju, K:Gwangju, D:Daejeon, C:Cheonan

^yStandard error

Table 3. GC/MSD analysis of leaf in Wonju.

No.	Area	Component
1	0.29	α -Pinene
2	0.33	Camphene
3	0.36	β -Pinene
4	1.59	α -phellandrene
5	2.89	β -Phellandrene
6	1.12	1,3,6-Octatriene, 3,7-dimethyl
7	1.08	1,3,6-Octatriene, 3,7-dimethyl-(Z)
8	0.82	2,4,6-Octatriene, 2,6-dimethyl-(E,Z)
9	0.50	Acetic acid
10	10.79	Caryophyllene
11	0.92	Butylated Hydroxytoluene
12	1.35	Caryophyllene oxide
13	0.47	Epiglobulol
14	2.51	(-)-Spathulenol
15	0.98	tau-Muurolol
16	0.75	Copaene
17	2.47	α -Cadinol
18	0.20	Dodecanoic acid
19	0.34	Tridecanoic acid
20	0.47	Tetradecanoic acid
21	0.08	Pentatradecanoic acid
22	1.00	n-Hexadecanoic acid

Table 4. GC/MSD analysis of leaf in Gangneung.

No.	Area	Component
1	0.43	α -Pinene
2	0.47	Camphene
3	0.45	β -Pinene
4	2.55	α -Phellandrene
5	2.72	β -Phellandrene
6	0.53	1,3,6-Octatriene, 3,7-dimethyl
7	0.75	1,3,6-Octatriene, 3,7-dimethyl-(Z)
8	0.27	Bicyclo[2.2.1]heptan-2-one, 1,3,3-trimethyl
9	10.45	Caryophyllene
10	0.85	γ -Elemene
11	0.52	Azulene
12	0.45	α -Caryophyllene
13	1.29	Butylated hydroxytoluene
14	1.19	Caryophyllene oxide
15	0.30	Epiglobulol
16	1.79	(-)-Spathulenol
17	1.37	Muurolol
18	2.3	α -Cadinol
19	1.69	Azulene
20	0.21	Dodecanoic acid
21	0.29	Tridecanoic acid
22	0.34	Tetradecanoic acid
23	0.52	n-Hexadecanoic acid

Table 5. GC/MSD analysis of leaf in Uljin.

No.	Area	Component
1	0.36	α -Pinene
2	0.40	Camphene
3	0.41	β -Pinene
4	2.07	α -Phellandrene
5	3.34	β -Phellandrene
6	1.05	1,3,6-Octatriene, 3,7-dimethyl
7	1.27	1,3,6-Octatriene, 3,7-dimethyl-(Z)
8	0.07	α -Cubebene
9	0.28	Isoledene
10	10.62	Caryophyllene
11	1.32	Azulene
12	0.9	α -Caryophyllene
13	1.29	γ -Elemene
14	0.52	Butylated Hydroxytoluene
15	1.27	Caryophyllene oxide
16	0.39	Epiglobulol
17	0.39	Ledol
18	0.94	tau-Muurolol
19	0.98	Copaene
20	0.28	Tridecanoic acid
21	0.25	Tetradecanoic acid
22	0.11	Pentadecanoic acid
23	0.37	n-Hexadecanoic acid

Table 6. GC/MSD analysis of leaf in Pohang.

No.	Area	Component
1	0.36	α -Pinene
2	0.40	Camphene
3	0.41	β -Pinene
4	2.07	α -Phellandrene
5	3.34	β -Phellandrene
6	2.31	1,3,6-Octatriene, 3,7-dimethyl
7	0.31	Benzene
8	0.32	2,4,6-Octatriene, 2,6-dimethyl
9	0.15	Nonanal
10	0.07	α -Cubebene
11	0.54	Acetic acid
12	10.62	Caryophyllene
13	2.7	α -Cayophyllene
14	0.71	Butylated hydroxytoluene
15	1.27	Caryophyllene oxide
16	0.39	Epiglobulol
17	1.1	Globulol
18	2.54	(-)-Spathulenol
19	0.96	tau-Muurolol
20	0.69	Copaene
21	2.52	α -Cadinol
22	0.34	Tridecanoic acid
23	0.29	tetradecanoic acid

Table 7. GC/MSD analysis of leaf in Busan.

No.	Area	Component
1	0.38	α -Pinene
2	0.42	Camphene
3	0.42	β -Pinene
4	2.23	α -Phellandrene
5	3.49	β -Phellandrene
6	0.89	Benzene
7	0.49	3-Hexen-1-ol
8	0.35	Camphor
9	0.65	Acetic acid
10	3.49	Caryophyllene
11	5.73	γ -Elemene
12	10.56	α -Caryophyllene
13	1.7	9-Octadecenal
14	0.25	β -Guaiene
15	1.19	Tetradecanal
16	1.24	Caryophyllene oxide
17	5.12	Spathulenol
18	1.22	9,12,15-Octadecatrienoic acid
19	1.14	tau-Muurolol
20	2.94	α -Cadinol
21	0.36	Epiglobulol
22	0.27	6-Isopropenyl-4,8a-dimethyl
23	0.36	Dodecanoic acid
24	0.46	Tridecanoic acid
25	0.57	Tetradecanoic acid
26	0.22	Pentadecanoic acid
27	1.04	n-Hexadecanoic acid

Table 8. GC/MSD analysis of leaf in Suncheon.

No.	Area	Component
1	0.37	α -pinene
2	0.41	Camphene
3	0.41	β -Pinene
4	2.12	α -Phellandrene
5	0.11	Limonene
6	3.39	β -Phellandrene
7	0.57	1,3,6-Octatriene, 3,7-dimethyl
8	0.16	1,3,6-Octatriene, 3,7-dimethyl-(Z)
9	0.21	2,4,6-Octatriene, 2,6,-dimethyl-(E,Z)
10	0.09	Nonanal
11	0.79	α -Caryophyllene
12	10.60	Caryophyllene
13	0.76	(-)-Isoledene
14	5.72	γ -Elemene
15	1.34	Butylated hydroxytoluene
16	1.26	Caryophyllene oxide
17	0.38	Epiglobulol
18	3.02	(-)-Spathulenol
19	1.25	α -Cadinol
20	0.3	Dodecanoic acid
21	0.43	Tridecanoic acid
22	0.42	Tetradecanoic acid
23	0.29	Pentadecanoic acid
24	1.53	n-Hexadecanoic acid

Table 9. GC/MSD analysis of leaf in Mokpo.

No.	Area	Component
1	0.37	α -Pinene
2	0.41	Camphene
3	0.41	β -Pinene
4	2.14	α -Phellandrene
5	0.1	D-Limonene
6	3.40	β -Phellrandrene
7	0.92	1,3,6-Octatriene, 3,7-dimethyl
8	0.25	Nonanal
9	10.59	Caryophyllene
10	1.26	Caryophyllene oxide
11	2.01	Butylated hydroxytoluene
12	3.43	(-)-Spathulenol
13	0.37	Epiglobulol
14	0.55	Tridecanoic acid
15	0.82	Tetradecanoic acid
16	0.49	Pentadecanoic acid
17	1.37	n-Hexadecanoic acid

Table 10. GC/MSD analysis of leaf in Jeonju.

No.	Area	Component
1	0.37	α -Pinene
2	0.41	Camphene
3	0.42	β -Pinene
4	2.16	α -Phellandrene
5	0.23	Limonene
6	3.42	β -Phellandrene
7	6.84	1,3,6-Octatriene, 3,7-dimethyl
8	3.38	1,3,6-Octatriene, 3,7-dimethyl-(Z)
9	0.73	2,4,6-Octatriene, 2,6-dimethyl-(E,Z)
10	10.59	Caryophyllene
11	4.82	α -Caryophyllene
12	3.93	Butylated hydroxytoluene
13	1.25	Caryophyllen oxide
14	0.37	Epiglobulol
15	0.64	(-)-Spathulenol
16	0.67	tau-Muurolol
17	0.53	Copaene
18	2.08	α -Cadinol
19	0.07	Dodecanoic acid
20	0.45	Phytol
21	0.08	Tetradecanoic acid
22	0.14	n-Hexadecanoic acid

Table 11. GC/MSD analysis of leaf in Gwangju.

No.	Area	Component
1	0.37	1R- α -Pinene
2	0.41	Camphene
3	0.41	β -Pinene
4	2.14	α -Phellandrene
5	0.12	D-Limonene
6	3.40	β -Phellandrene
7	2.4	1,3,6-Octatriene, 3,7-dimethyl
8	0.41	1,4,6-Octatriene, 2,6,-dimethyl
9	0.07	Nonanal
10	0.73	Acetic acid
11	10.59	Caryophyllene
12	2.09	α -Caryophellene
13	4.96	Cyclohexene
14	0.69	Bytylated hydroxytoluene
15	1.26	Caryophyllene oxide
16	0.37	Epiglobulol
17	3.65	Globulol
18	2.28	Spathulenol
19	0.94	tau-Muurolol
20	0.68	Copaene
21	2.43	α -Cadinol
22	0.26	2,6,10-Dodecatrien-1-ol, 3,7,11-trimethyl
23	0.18	Dodecanoic acid

Table 12. GC/MSD analysis of leaf in Daejeon.

No.	Area	Component
1	0.37	1R- α -Pinene
2	0.41	Camphene
3	0.41	β -Pinene
4	2.15	α -Phellandrene
5	3.41	β -Phellandrene
6	3.28	1,3,6-Octatriene, 3,7-dimethyl
7	0.49	1,4,6-Octatriene, 2,6,-dimethyl
8	0.06	α -Cubebene
9	0.56	Cyclohexane
10	10.59	Caryophyllene
11	3.47	α -Caryophyllene
12	5.66	γ -Elemene
13	1.26	Caryophyllene oxide
14	0.37	Epiglobulol
15	0.29	Globulol
16	2.73	Spathulenol
17	1.08	tau-Muurolol
18	2.94	α -Cadinol
19	0.46	2,6,10-Dodecatrien-1-ol, 3,7,11-trimethyl
20	0.23	Dodecanoic acid
21	0.3	Tridecanoic acid
22	0.44	Tetradecanoic acid
23	0.18	Pentadecanoic acid
24	0.6	n-Hexadecanoic acid
25	0.02	Hexadecenoic acid

Table 13. GC/MSD analysis of leaf in Cheonan.

No.	Area	Component
1	0.37	1R- α -Pinene
2	0.41	Camphene
3	0.41	β -Pinene
4	2.15	α -Phellandrene
5	3.41	β -Phellandrene
6	2.47	1,3,6-Octatriene
7	0.96	Benzene
8	0.04	Cyclohexen
9	0.26	1,4,6-Octatriene, 2,6,-dimethyl
10	0.42	3-Hexen-1-ol
11	0.17	Nonanal
12	0.02	1,3,8-p-Menthatriene
13	2.79	Cyclohexane
14	0.59	Acetic acid
15	10.59	Caryophyllene
16	0.68	Azulene
17	0.54	1H-Cycloprop[e]azulene
18	6.27	γ -Elemene
19	0.57	Butylated Hydroxytoluene
20	1.76	E-2-Tetradecen-1-ol
21	1.26	Caryophyllene oxide
22	0.37	Epiglobulol
23	0.39	Globulol
24	3.61	Spathulenol
25	1.03	tau-Muurolol
26	2.49	α -Cadinol
27	0.21	2,6,10-Dodecatrien-1-ol, 3,7,11-trimethyl

나. 식물 부위별 정유량 조사

(1) 연구 목적

생강나무의 강력한 방향성은 가지에서 나온다고 이미 많은 연구에서 알려져 있다. 특히, 가지를 꺾으면 강한 생강나무 향이 나기 때문에 생강나무라고 이름이 붙어 있다. 그러나 어린잎을 차로 마셨다는 기록과 열매를 짜서 부인들의 머릿기름으로 이용하였다는 기록 등으로 볼 때 다양한 부위에서 강한 향을 발하는 것으로 판단할 수 있다. 잎에서는 줄기와 유사한 향이 나고 어린 잎을 강원도 산간에서 쌈으로 이용하기도 하였다는 기록으로 보아 다양한 부위를 이용할 수 있는 가능성을 가졌다고 볼 수 있다.

대표적인 기능성 물질로 알려져 있는 식물 유래 essential oil은 2차대사 물질로 일반적으로 식물의 잎에 가장 많이 분포 되어 있는 것으로 알려져 있다. 생강나무의 경우 줄기를 정유 추출 부위로 적용할 경우 식물 생육에 매우 큰 영향을 미치므로 이들 부위 이외의 부위에서 정유를 생산할 수 있는 방법을 강구하는 것이 유리할 것으로 판단된다. 따라서 잎과 1년생 가지, 다년생 가지, 뿌리 등 여러 부위의 essential oil을 분석하여 최적의 부위를 판단하여야 하며 이들 부위를 기반으로 재배 방법이 강구되어야 할 것이다.

(2) 연구 방법

부위별 essential oil 성분의 함량 및 선분 조사를 위하여 꽃, 잎, 1년생 가지, 다년생 가지, 뿌리를 각각 경기도 북부 지역에서 채취하여 분석에 사용하였다(Fig. 3). 꽃은 개화 직후 채취하였으며, 가지는 생장기간으로 구분하여 1년생의 어린가지와 2년생 이상의 다년생 가지로 각각 구분하여 이용하였다. 다년생 가지의 경우 직경이 50mm를 초과하는 가지의 경우 사용하지 않았다. 뿌리 역시 직경 50mm를 초과하는 것은 이용하지 않았다. 채취된 시료는 채취 직후 이동용 냉장박스에 보관 후 실험실로 이동하여 정량 후 -70°C 저장고에 보관하며 시험에 이용하였다. 각 채취된 부위는 당일 세절하여 분석에 사용하였는데 잎은 상위 3엽까지 이용하고 $30\times 10\text{mm}$ 크기로 세절하였다. 가지와 뿌리는 $10\times 5\text{mm}$ 크기로 세절하였다. 각각의 이용부위는 Fig. 3과 같다.

정유 성분의 함량과 분석에 사용된 방법은 실험 1과 같이 SDE 법과 GC/MSD에 의하여 분석되었다.

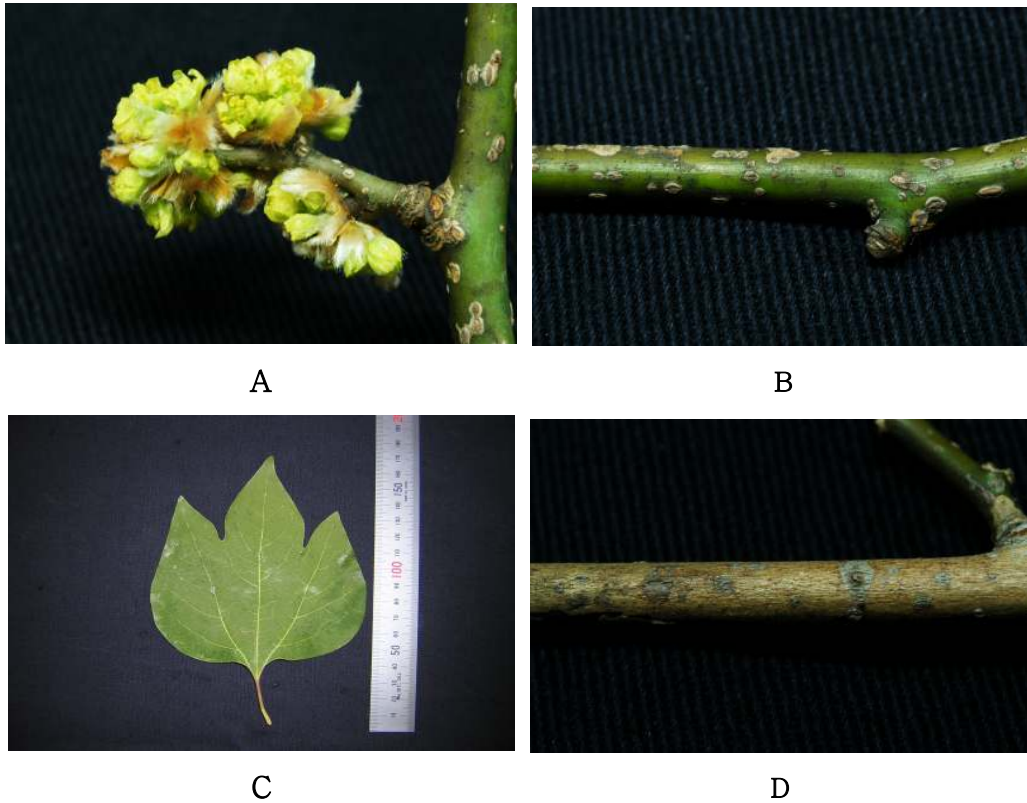


Fig. 3. Plant organs of *Lindera obtusiloba* Bl.

A: Flower, B: Young stem(1 year old), C: leaf, D: Old stem(more than 2 year old)

(3) 연구 결과

부위별 essential oil 함량 및 성분 분석은 그 이용 부위를 결정하거나 부위에 따른 적정 수확시기를 가늠할 수 있다는 점에서 매우 중요하다. 채취 부위별 essential oil 함량 및 성분 조사를 위하여 실험을 실시한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

생강나무의 부위는 꽃, 잎, 1년생 어린가지, 1년생 이상의 묵은 가지 및 뿌리로 실시한 결과 꽃에서 생체중당 0.25%로 매우 높은 함량을 나타내었다. 1년지 이하의 어린 가지는 생체중당 0.23%로 꽃과 유사하게 높은 정유 함량을 나타나는 결과를 얻었다. 잎에서는 0.08%, 1년지 이상의 묵은 가지에서는 0.05% 뿌리에서는 0.05%의 함량을 각각 나타내었다(Fig. 4).

꽃의 정유 함량이 높게 나타난 것은 개화기에 수분을 위한 각종 영양성분을 집적하기 때문으로 보이며, 1년지 이하의 어린 가지에서 높은 함량을 보인것은 생강나무를 한의학에서는 황매피 라고 부르며 약재로 사용하는데 이는 생강나무의 수피를 말린 것을 의미 한다. 따라서 약용으로 사용되는 부위의 정유 함량이 높게 나타났다고 볼 수 있다. 또한 이것은 잎에서 생성된 주요 essential oil 성분이 합성되어 신초 생장이 본격적으로 이루어지는 어린 가지로 주로 이동하는 것으로 판단되었다. 1년지 이상의 묵은 가지로의 이동 및 뿌리로의 이동도 보이는데 이것은 저장기관으로 잎에서 생성되어 신초 생장이나 식물생육에 필요한 곳으로 이동되는 증거라고 할 수 있다.

생강나무 essential oil을 추출한 다섯부위 모두에서 0.05%이상의 정유 수율을 나타낸 것은 생강나무가 매우 활발한 정유 생성을 하고 있으며, 대표적인 약용식물인 쪽의 경우 주요 활성 부위인 잎에서 생체중당 0.061%의 수율을 나타낸 것⁸⁾과 비교하면 매우 고무적인 결과로 생강

나무 전체가 essential oil 을 추출할 수 있다는 것을 보여준다고 할 수 있다.

이 같은 결과를 차후에 대량 재배 기술과 접목할 경우 강전정을 통해 매년 봄 많은 수의 분지를 유도하는 것이 대량의 essential oil 생산에 유리할 것으로 판단되었다.

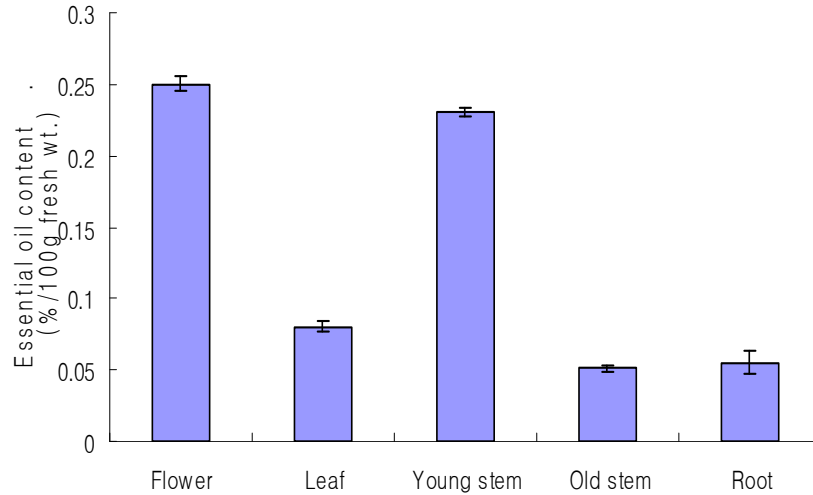


Fig. 4. Essential oil contents of the plant organs in *Lindera obtusiloba* Bl.

Vertical bars represent \pm S.E.(n=3)

부위별 essential oil 성분을 GC/MSD 분석 한 결과 꽃(Table 14), 잎(Table 15), 1년생 가지(Table 16), 2년생 이상 가지(Table 17), 뿌리(Table 18)는 130여가지 물질이 분석되었고 이중 순도 90%이상의 물질을 분리하여 생강나무 각 부위별 고유 물질로 30여가지를 분리 하였다. 대표적인 물질로 α -phellandrene, β -phellandrene, limonene, camphene, 그리고 caryophyllene 등이 주요 물질로 분석되었으며, 각 부위별로 서로 상이한 조성을 나타내었다. 꽃에서는 α -phellandrene, β -phellandrene 이 주요 물질로 분석되었으며, 잎에서는 caryophyllene 이 주요 물질로 분석되었다. 1년생 가지와 2년생 이상 가지 모두에서는 limonene이, 뿌리에서는 camphene이 주요 물질로 분석되었다.

이들 주요 물질 중 α -phellandrene, β -phellandrene, limonene, 그리고 caryophyllene 은 강한 방향성으로 널리 알려진 물질로 phellandrene은 후추와 유사하거나 오렌지와 유사한 향으로 알려져 있으며 limonene은 오렌지 향을 강하게 나타내는 물질로 이미 다양한 레몬향의 원료이기도 하다. Caryophyllene은 정향의 주요 향미 성분으로 나타나며 black pepper의 주요 물질이기도 하다.

생강나무는 아직 미개발 식물로서 각 부위의 주요 물질로 나타난 주요 성분들 모두가 강한 방향성을 나타내며 우리에게 이미 친숙하며 다양한 용도로 사용되는 성분을 포함하고 있다. 따라서 이러한 성분이 나타난 꽃, 잎, 가지 등은 방향제 또는 향수의 원료, 음식의 조미료로서의 큰 가치를 가지고 있다. 또한 뿌리에서 발견되는 camphene은 은 camphor의 전구물질로 매우 강한 방향성을 가지고 있다. 이와 유사한 물질인 isoborneol이 가지에서 발견되고 있다. camphor은 강력한 살균제 역할을 한다고 알려져 있는데 이것은 생강나무 가지를 꺾어서 먹거

리 곁에 두면 벌레를 쫓았다는 기록과 유사하다.⁹⁾ 뿌리에서 발견되는 camphene은 생강의 뿌리와 줄기에서도 주요 물질로 발견되는데 생강 역시 강력한 살균 효과가 있는 것으로 알려져 있는 만큼 이들을 폭넓게 적용하여 천연 농약등 산업적으로 적극 개발할 필요가 있다.

부위별 정유성분의 차이를 통해 정유 성분이 어린가지와 뿌리사이에 이동하며, 저장되고 요구도를 가지는 식물 부위로 이동되는 것이며, 목은 가지는 저장기관의 역할보다는 물질의 이동 통로의 역할을 하며, 이것은 정유 합성의 유전적인 요인과 환경적인 요인에 의해서 물질이동과 관련된 식물 부위별 정유 함량에 변이가 있는 것으로 사료되었다. 일반적으로 정유의 이동성은 밝혀진바 없으나 생강나무의 정유 성분이 뿌리에서 다량 존재 하는 결과는 앞으로 정유의 합성과 이동, 저장의 시기별 동태를 파악하는 연구가 더욱 필요하리라 사료되었다.

생강나무는 부위별 연구의 결과 식물 모든 부위에서 기존 식물과 동등하거나 그 이상의 기능성 2차 대사산물인 essential oil 함량이 높고 주요 구성 성분 또한 매우 이용도가 높은 성분으로 구성되어 있으며 일반적으로 이용가치가 낮은 뿌리에서 매우 높은 기능성 물질과 essential oil 함량을 보여 우수한 경제 작물로의 개발 가능성을 가지고 있음을 밝혔다. 또한 생강나무가 전국의 산야에 자생하고 있고 한국원산 식물인 점등으로 미루어 재배 및 생산은 손쉽게 가능할 것으로 판단되며 이를 통해 산업적 접근이 쉽고 빠른 다양한 용도로의 활용이 가능한 식물로 판단되었다.

Table 14. Essential oil components of the flower in *Lindera obtusiloba* Bl.

No.	Area(%)	Component
1	0.93	1R- α -Pinene
2	0.95	Camphene
3	0.87	β -Pinene
4	5.16	α -Phellandrene
5	4.32	β -Phellandrene
6	0.06	1S- α -Pinene
7	0.16	1,3,6-Octatriene
8	0.97	Benzene
9	0.1	Cyclohexene
10	0.01	5-Heptene-2-one
11	1.64	Nonanal
12	0.02	2-Furanmethanol
13	0.53	α -Cubebene
14	1.4	Camphor
15	0.14	Copaene
16	1.16	1,6-Octadien-3-ol
17	0.68	Acetic acid
18	10.91	Cyclohexane
19	0.7	Seychellene
20	1.18	gamma-Elemene
21	9.8	Naphthalene
22	2.85	Cyclohexanemethanol
23	3.53	2-Naphthalenemethanol
24	0.85	tau-Muurolol
25	7.81	2-Naphthalenemethanol
26	5.54	Azulene
27	0.09	Tricosane
28	0.3	Alanine
29	0.39	6-Isopropenyl-4,8a-dimethyl-1,2,3
30	0.29	Bicyclo[10.8.0]eicosane
31	0.25	Tetradecanoic acid
32	0.02	Cyclohexanol
33	0.33	Z-11-Tetradecenoic acid
34	0.02	Quinoline
35	0.06	Pentadecanoic acid
36	0.11	1,4-Benzenediol
37	0.53	n-Hexadecanoic acid
38	0.23	9-Octadecyne

Table 15. Essential oil components of the leaf in *Lindera obtusiloba* Bl.

No.	Area(%)	Component
1	0.41	1R- α -Pinene
2	0.49	Camphene
3	0.64	β -Pinene
4	0.39	D-Limonene
5	1.44	β -Phellandrene
6	0.89	Benzene
7	0.49	3-Hexen-1-ol
8	0.35	(+)-4-Carene
9	0.65	Acetic acid
10	11.06	Caryophyllene
11	5.73	gamma-Elemene
12	2.22	α -Caryophyllene
13	1.7	9-Octadecenal
14	0.25	β -Guaiene
15	1.19	Tetradecanal
16	2.82	Caryophyllene oxide
17	5.12	Spathulenol
18	1.22	9,12,15-Octadecatrienoic acid
19	1.14	tau-Muurolol
20	2.94	α -Cadinol
21	0.43	2,6,10-Dodecatrien-1-ol, 3,7,11-trimethyl
22	0.27	6-Isopropenyl-4,8a-dimethyl
23	0.36	Dodecanoic acid
24	0.46	Tridecanoic acid
25	0.57	Tetradecanoic acid
26	0.22	Pentadecanoic acid
27	1.04	n-Hexadecanoic acid

Table 16. Essential oil components of the young stem(1 years old) in *Lindera obtusiloba* Bl.

No.	Area(%)	Component
1	4.11	1R- α -Pinene
2	3.86	Camphene
3	4.67	β -Pinene
4	6.28	α -Phellandrene
5	10.31	Limonene
6	1.7	β -Phellandrene
7	1.7	1,4-Cyclohexadiene
8	0.5	1,3,6-Octatriene
9	4.17	Benzene
10	0.34	(+)-4-Carene
11	0.03	2H-Pyran
12	0.02	2,4,6-Octatriene
13	1.99	Bicyclo[2.2.1]heptan-2-one, 1,3,3-trimethyl-
14	0.06	Benzene
15	0.25	6-Octanal 3,7-dimethyl
16	2.99	Camphor
17	4.06	Isoborneol
18	0.9	1,6-Cyclodecadiene
19	0.92	Naphtalene
20	2.16	6-Octaen-1-ol, 3,7-dimethyl-
21	0.41	2-Cyclohexen-1-ol cis
22	0.91	2,6-Octadien-1-ol
23	0.1	2-Cyclohexen-1-ol trans
24	1.01	Butylated hydroxytoruene
25	0.82	Caryophyllene oxide
26	3.41	Cyclohexanemethanol
27	0.79	2-Naphthalenemethanol
28	0.25	1H-Cycloprop[e]azulen-7-ol
29	1.72	tau.-Muurolol
30	0.72	1H-Cycloprop[e]azulene
31	0.72	2,6,10-Dodecatrien-1-ol
32	0.13	Dodecanoic acid
33	0.04	Pentadecane
34	0.03	Cyclotetracosane
35	0.02	Nonadecane
36	0.03	Nonacosane
37	0.15	n-Hexadecanoic scid

Table 17. Essential oil components of the old stem(1 more years) in *Lindera obtusiloba* Bl.

No.	Area(%)	Component
1	0.59	1R- α -Pinene
2	0.64	Camphene
3	1.16	β -Pinene
4	0.02	(+)-4-Carene
5	2.35	α -Phellandrene
6	4.42	Limonene
7	1.61	β -Phellandrene
8	0.01	1,3,6-Octatriene, 3,7-dimethyl-, (E)-
9	0.09	1,4-Cyclohexadiene, 1-methyl-4-(1-methylethyl)-
10	0.13	Cyclohexene
11	1.74	Bicyclo[2.2.1]heptan-2-one, 1,3,3-trimethyl-
12	0.05	Benzene
13	0.35	α -Cubebene
14	2.28	Camphor
15	1.52	Acetic acid
16	0.9	2-Cyclohexen-1-one, 4-(1-methylethyl)-
17	4.77	Isoborneol
18	0.6	1,6-Cyclodecadiene
19	0.26	2-Cyclohexen-1-ol 3-methyl-6-(1-methylethyl)-, cis
20	0.59	Naphthalene
21	2.17	2-Octen-1-ol, 3,7-dimethyl-
22	0.18	2,6-Octadien-1-ol, 3,7-dimethyl-(Z)-
23	0.48	2-Cyclohexen-1-ol, 2-methyl-5-(1-methylethyl)-, cis
24	1.04	2,6-Octadien-1-ol, 3,7-dimethyl-
25	0.17	2-Cyclohexen-1-ol, 2-methyl-5-(1-methylethyl)-, trans
26	3.76	Butylated hydroxytoluene
27	0.33	4aH-Cycloprop[e]azulen-4a-ol
28	1.49	Caryophyllene oxide
29	4.16	Cyclohexanemethanol
30	1.28	2-Naphtalenemethanol
31	0.54	(-)-Spathulenol
32	0.76	2,6,10-Dodecatrien-1-ol, 3,7,11-trimethyl
33	0.09	Heptacosane
34	0.2	Tetradecanoic acid
35	0.1	Pentadecanoic acid
36	0.17	Nonacosane
37	1.14	n-Hexadecanoic acid

Table 18. Essential oil components of the root in *Lindera obtusiloba* Bl.

No.	Area(%)	Component
1	6.81	1R- α -Pinene
2	8.89	Camphene
3	1.47	β -Pniene
4	0.86	1S- α -Pinene
5	0.28	Cyclohexene
6	0.58	α -Phellandrene
7	5.73	Limonene
8	0.49	1,4-Cyclohexadiene, 1-mejthyl-4-(1-methylethyl)
9	1.24	Benzene
10	0.88	Cyclohexene, 1-methyl-4-(1-methylethylidene)
11	0.39	Bicyclo[2.2.1]heptan-2-one, 1,3,3-trimethyl-
12	0.88	Camphor
13	0.22	4-Acethyl-1-methylcyclohexene
14	11.62	Acetic acid
15	0.61	Caryophyllene
16	0.8	Isoborneol
17	0.52	Bornaol
18	1.69	Dodecanal
19	2.79	Hexadecenal
20	2.56	9-Octadecenal
21	0.08	2-Tridecanone
22	1.85	Butylated hydroxytoluene
23	0.46	Caryophyllene
24	0.5	1H-Cycloprop[e]azulene
25	0.6	Copaene
26	2.42	α -Cadinol
27	0.48	Tridecadiene
28	0.26	Teteradecadiene
29	0.39	Dodecanoic acid
30	0.48	Tridecanoic acid
31	0.36	Tetradecanoic acid
32	0.27	Pentadecanoic acid
33	0.22	Cyclopentadecanone
34	2.13	n-Hexadecanoic acid

다. 수확시기에 따른 유효성분 변화 조사

(1) 연구 목적

Essential oil 은 수확시기에 따라 함량과 성분 변화가 나타난다고 하였는데, basil 의 경우 여름철의 정유 함량이 높았다고 하였다.¹⁰⁾ 이것은 일반적으로 다량의 essential oil 을 함유하는 식물인 허브 식물의 경우 개화기를 직전의 essential oil 함량이 매우 높아지는 경향을 나타내며, 몇 가지 박하의 경우 생육시기가 지남에 따라 essential oil 함량과 성분이 변화 한다고 하였다.¹¹⁾ 따라서 본 시험에서는 생육시기의 변화에 따라 essential oil 함량과 성분 변화를 통해 최적의 추출시기를 선별하고 재배관리를 하기위한 기초연구를 수행하였다.

(2) 연구 방법

수확시기별 essential oil 함량 및 성분조사를 위하여 충청남도 천안, 원주 지역의 잎을 채취하여 6월, 8월, 10월 각각 3회 채취하여 오일 수율을 파악하고 정유 성분 변화를 분석하였다. 채취시기의 선별은 개화기가 끝나고 생육이 가장 왕성하게 일어나는 6월과 장마기가 지나고 생육최성기라고 할 수 있는 8월, 그리고 종자 결실기이면서 생육이 떨어지고 겨울 나기를 준비하는 시기인 10월을 각각 선택하였으며 잎을 채취해도 생육에 큰 영향을 주지 않게 하기 위하여 20주 이상에서 채취하였으며 채취 대상이 되는 잎은 완전한 생육이 이루어진 각각의 가지의 상위 3엽을 채취하였으며 또한 각각의 채취개체마다 별도의 표시를 하여 수확기마다 채취개체의 차이가 나지 않도록 관리 하였다.

채취 대상지역에서 채취된 생강나무 잎은 채취 직후 이동용 ice box에 보관하여 실험실로 이동 후 30×10mm 크기로 세절하여 정량 후 -70℃ 저장고에 보관하여 시험에 적용하였다.

Essential oil 함량 분석과 성분 분석은 실험 1에서의 조건과 동일하게 SDE 법을 적용하고, 이것을 GC/MSD 분석하였다.

(3) 연구 결과

수확시기별 essential oil 성분의 변화는 수확시기에 따른 essential oil 성분의 변화를 파악하여 적정 수확시기를 판별하기 위해 수행되었다. 수확시기는 6월, 8월, 그리고 10월 수확기로 나누었으며 강원도 원주 지역과 충청남도 천안 지역의 2곳의 essential oil 함량 및 성분을 비교하였다. 각 시기별 essential oil 함량은 두 지역 모두 8월에 가장 높음 함량을 나타내었으며 10월에 급격히 감소하는 경향을 나타내었다(Fig. 5). Basil의 essential oil 함량이 여름철에 높게 나타났다고 하였는데 이와 동일한 결과를 얻었다.¹⁰⁾ 이것은 대부분의 방향성을 가지는 식물은 1차대사 물질의 생성이 촉진된 이후에 다시 2차대사물질을 합성하는 것으로 성분 변화 역시 나타난다고 볼 수 있다.

전체적인 함량은 원주지역의 함량이 천안지역에 비해 다소 낮은 결과를 보였는데 이것은 실험 1에서와 같이 지역적인 차이에 의한 것으로 아한대 지역에 속하는 지역이기 때문에 천안 지역보다는 다소 낮은 함량을 보인 것으로 판단되었다. 일반적인 허브 식물의 경우 원사지가 대부분 지중해 연안으로 일교차가 크지 않고 생육기간 내내 큰 온도 편차를 가지는 곳이 아니다.

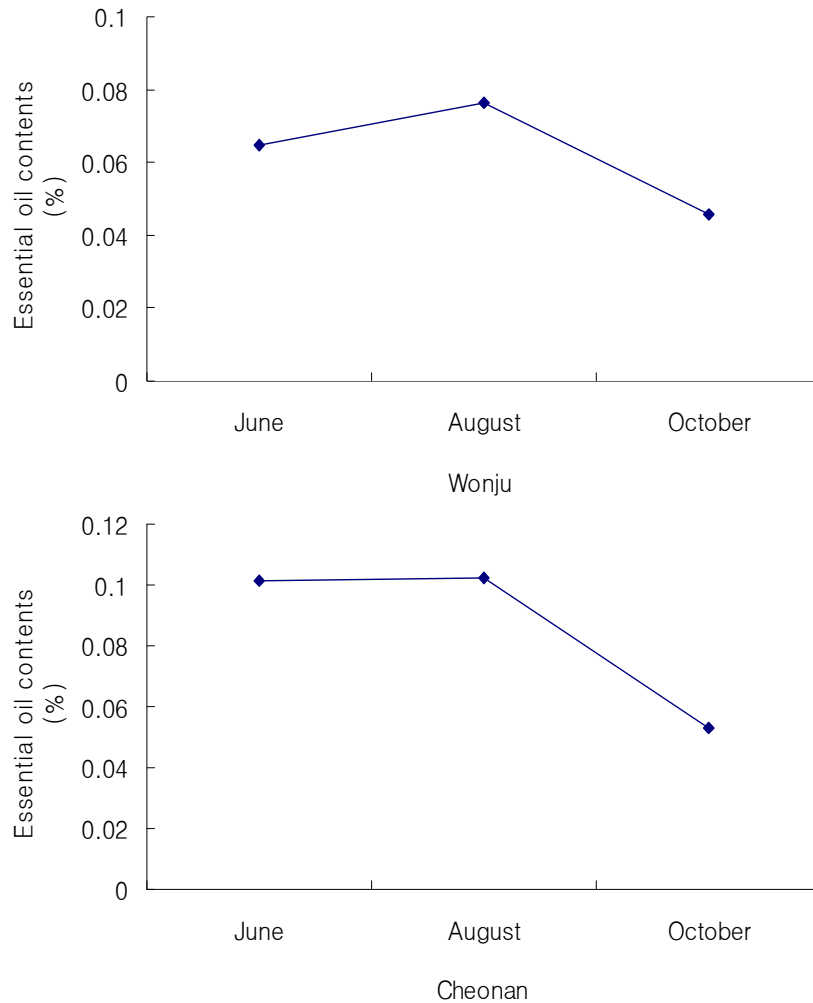


Fig. 5. Effects of harvesting periods on the change of essential oil contents in leaf of *Lindera obtusiloba* Bl.

Vertical bars represent \pm S.E.(n=3)

그러나 아시아 온대 원산의 약용식물들은 대부분의 경우 일교차가 크고 여름 혹서기와 겨울의 최한월간의 일교차가 클수록 그 기능성이 우수해지고 기능성 성분 함량이 증가하는 것으로 알려져 있다. 그러나 이것은 식물 본래의 생육 적정 범위 안에서의 성분 증가를 의미하는 것으로 이보다 더욱 가혹한 조건에서는 생육이 억제되고 생리적 스트레스의 집적으로 오히려 기능성 물질의 합성이 더더 지거나 저해 되는 것으로 나타난다고 볼 수 있다.

2차 대사물질인 essential oil 성분에 있어서도 쑥의 연구 결과 생육기간에 따라 정유 성분 조성의 급격한 변이가 나타나고 첫 수확기에는 존재 하지 않았으나 생육이 진전됨에 따라 새로운 물질이 나타난다고 하였다.⁸⁾ 이것은 생육 기간 동안 환경조건의 변화에 의해 재합성되는 과정을 거쳐 생육기간동안 다양한 변화가 나타나나 주된 성분으로 알려진 물질의 변화는 크지 않다고 하였다.

주요 물질로 분리된 α -pinene, camphene, β -pinene, α -phellandrene, β -phellandrene, caryophyllene, 그리고 caryophyllene oxide의 시기별 성분변화를 보면 다음과 같다.

α -pinene, camphene, β -pinene 은 시기별로 다소 감소하는 경향은 나타내고 α -phellandrene 은 6월부터 8월까지 다소 감소하다가 10월에는 증가하는 경향을 나타내고 β -phellandrene

은 시기별로 증가하는 형태를 나타낸다(Fig. 6,7,8,9,10). Caryophyllene 역시 시기별로 다소 증가하는 형태를 나타내는데 이와는 다르게 caryophyllene oxide는 8월부터 함량이 감소하는 결과를 나타내었다(Fig. 11,12).

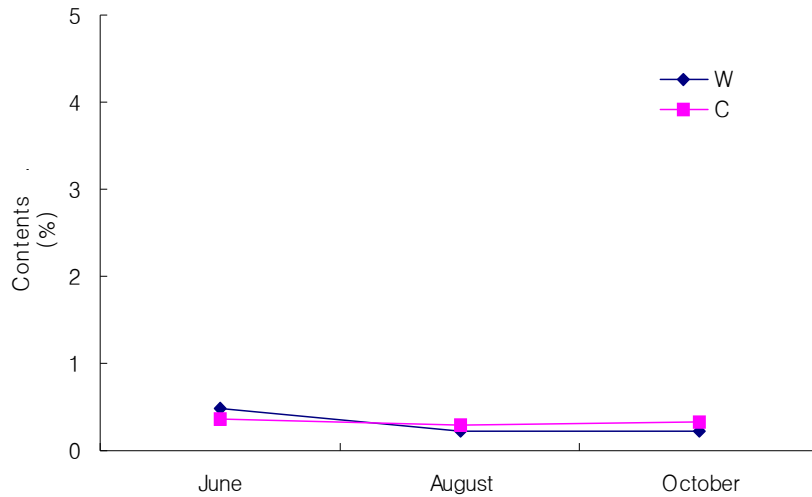


Fig. 6. Effects of harvesting periods on the change of α -pinene contents of essential oil in leaf of *Lindera obtusiloba* Bl.
W: Wonju, C:Cheonan

이 같은 essential oil 성분의 경시적인 변화에서 monoterpene 함량 변화를 보면 측정 후 30 일후부터 증가하다가 떨어지고 일시 증가하다가 다시 떨어지는 과정을 나타냈다.¹²⁾ 또한 mint의 수확시기별 성분변화에 있어 각각의 구성 성분별로 매우 다르게 나타나는 결과를 나타내었다.¹³⁾

위의 결과를 종합하면 가장 우수한 수확 시기는 8월경으로 선발되었으며 성분별로 조성에 있어 강력한 방향 물질이며 가장 많은 다량성분인 caryophellene 과 β -phyllandrene을 위해서는 8월에서 10월 사이에 수확하는 것이 좋을 것으로 사료되었다.

그러나 10월경은 사실상 낙엽이 지기 시작하는 시기로 정유 함량이 감소하여 지하부 또는 줄기부위로 이동되어 저장되기 때문에 잎에서의 유용성분 함량의 절대량이 감소한다고 판단된다. 따라서 늦어도 9월경에 수확하는 것이 가장 적절한 수확기로 판단된다.

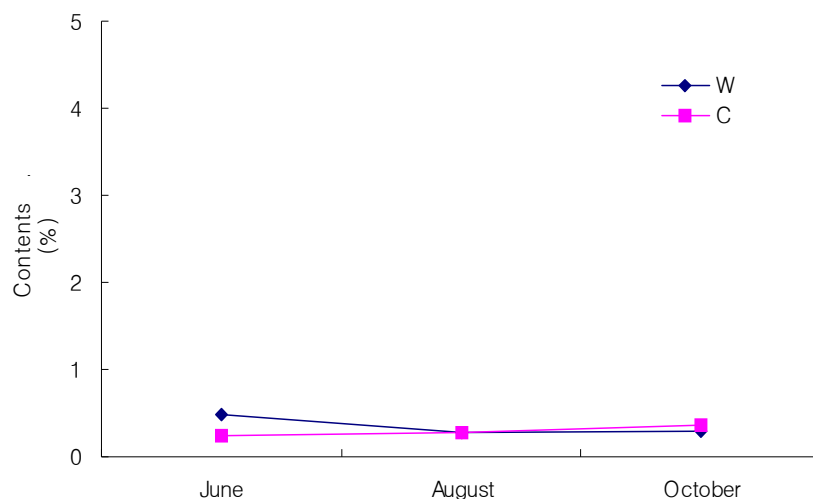


Fig. 7. Effects of harvesting periods on the change of camphene contents of essential oil in leaf of *Lindera obtusiloba* Bl.

W: Wonju, C:Cheonan

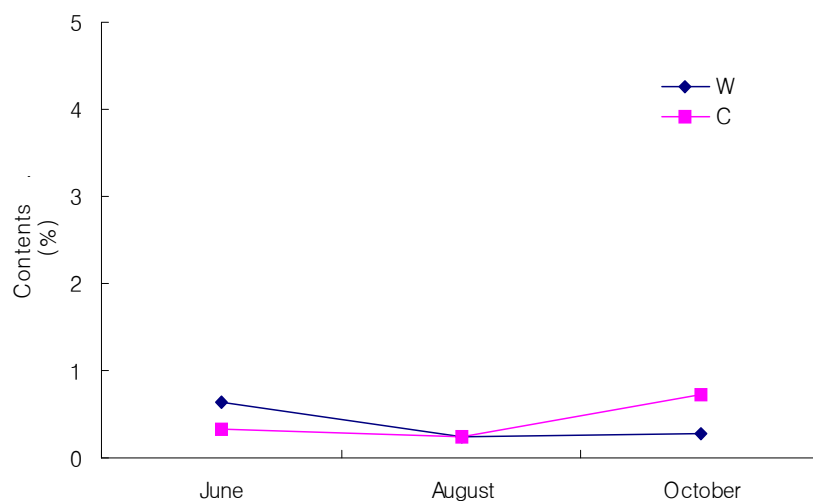


Fig. 8. Effects of harvesting periods on the change of β -pinene contents of essential oil in leaf of *Lindera obtusiloba* Bl.

W: Wonju, C:Cheonan

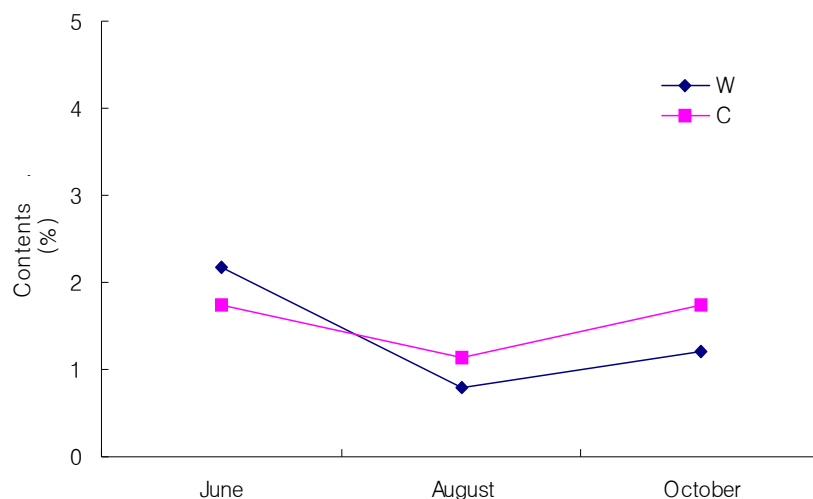


Fig. 9. Effects of harvesting periods on the change of α -phellandrene contents of essential oil in leaf of *Lindera obtusiloba* Bl.

W: Wonju, C:Cheonan

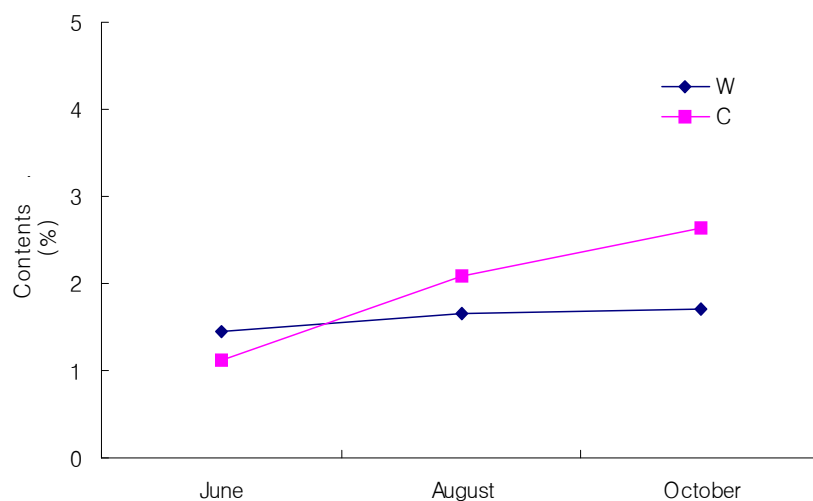


Fig. 10. Effects of harvesting periods on the change of β -phellandrene contents of essential oil in leaf of *Lindera obtusiloba* Bl.

W: Wonju, C:Cheonan

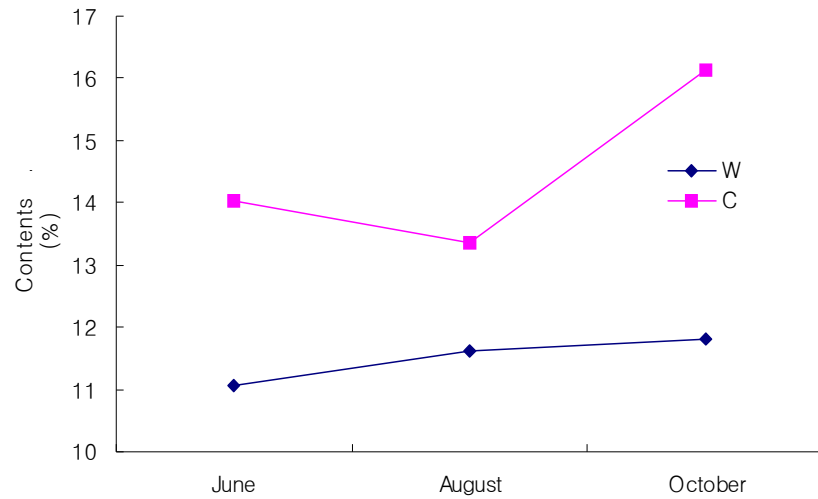


Fig. 11. Effects of harvesting periods on the change of caryophyllene contents of essential oil in leaf of *Lindera obtusiloba* Bl.

W: Wonju, C:Cheonan

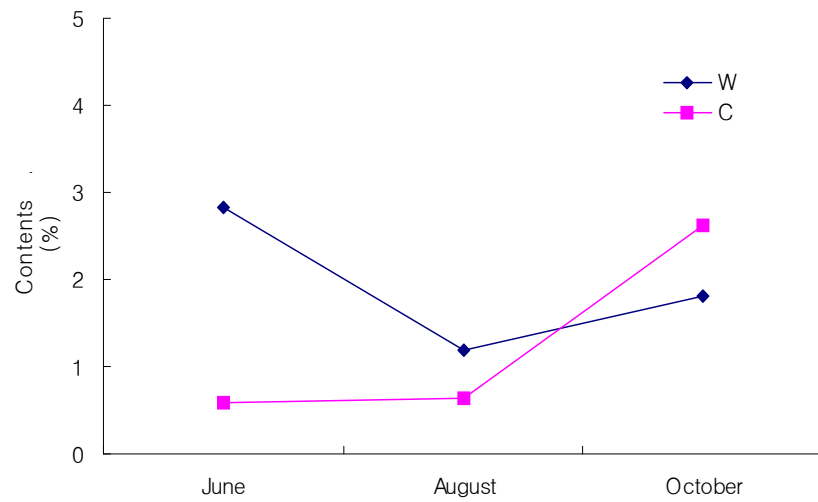


Fig. 12. Effects of harvesting periods on the change of caryophyllene oxide contents of essential oil in leaf of *Lindera obtusiloba* Bl.

W: Wonju, C:Cheonan

라. 생강과 유효성분 비교

(1) 연구 목적

생강은 주성분인 진저론은 규칙적으로 섭취하면 콜레스테롤을 낮추며, 구토를 멈추게 하고 위액분비를 촉진하는 효과가 있다고 한다. 아울러 간에서 담즙을 촉진시킨다. 생강은 생강차, 생강정, 진저엘(ginger ale), 진저비어 등으로 이용하고 있다. 생강나무는 생강과 유사한 향이 나타나나 생강나무 가지와 생강에 대한 향 성분 비교 연구는 연구 결과가 있으나 잎의 essential oil 성분 비교는 이루어 지지 않았었다. 본 연구는 이러한 두 가지 식물의 유사점을 이용하여 유사한 용도로의 개발과 음용수, 차등으로의 개발 가능성을 위해 수행하였다.

(2) 연구 방법

본 연구에 사용된 생강은 국내산으로 경기도 남부에서 생산된 것을 이용하였으며 정확한 산지가 표시된 대형 마트에서 구매하여 시험에 적용하였다. 구입한 생강은 세절하여 정량한 후 -70°C 저장고에 보관하며 시험에 사용하였다.

본 연구에 사용된 생강나무 잎은 경기도 북부 지역에서 채취된 것을 사용하였으며, 채취 후 이동용 냉장 보관용기에 보관 후 실험실로 이동하여 세절 후 정량하여 -70°C 저장고에 보관하였다. 또한 동일한 부위인 뿌리를 채취하여 깨끗하게 세척과정을 거친 후 외부의 습기를 음건한 후 세절하여 -70°C 저장고에 보관하여 생강나무 뿌리와 생강과의 성분비교를 실시하였다. Essential oil 함량 과 성분의 분석을 위하여 사용된 GC/MSD조건은 실험 1에서의 조건과 동일하게 하였다.

(3) 연구 결과

생강과의 정유 함량 및 성분 비교는 이용의 측면에서 생강의 향기를 적극 이용하는 것이 보다 유리하다. 본 실험의 결과 생강의 정유 수율은 0.13%로 생강나무의 잎과 뿌리의 0.08%, 0.05%의 수율보다 높은 경향을 나타내었다(Fig. 13). SDE법을 통한 생강과 생강나무의 정유 수율 비교에서 생강이 생강나무의 정유 수율보다 1-1.5배 높다고 하였는데 본 결과도 유사한 경향을 나타내었다. 같은 뿌리를 비교한 결과 수율 차이가 매우 큰 것으로 나타났다.⁹⁾

생강과 생강나무의 정유 성분을 GC./MSD 분석한 결과 분석물질은 총 80여 종류 물질이 분석되었으며 이 중 주요 물질로 20가지를 Table 19에 나타내었다. 생강의 주요 물질 중에 가장 큰 비중을 차지하는 것은 zingiberene 으로 29.28%를 차지하는 것으로 나타났다. 일반적으로 생강의 zingiberene 함량은 35%이상을 함유하고 있는 것으로 나타나는데 본 연구에서는 다소 낮은 함량을 나타내었다. 이것은 품종 또는 재배기간, 저장 기간에 따라 변할 수 있다. 또한 11.81%를 차지하는 citral과 8.81%를 차지하는 β -phellandrene이 주요 물질이었다. 이에 비하여 생강나무 잎의 주요 성분은 caryophyllene 과 β -phellandrene이 주요 물질이었고 뿌리에서는 acetic acid 와 limonene, pinene 등이 주요 물질로 분리되었다(Table 20, 21). 생강과 생강 잎에서의 공통으로 대량 물질로 나타난 β -phellandrene은 생강향을 나타내는 물질로 유추 할 수 있었다. 특히 phellandrene은 생강향기를 발하는 주요 성분이라고 보고하기도 하였다.¹⁴⁾

생강의 가장 많은 부분을 차지하는 zingiberene은 생강의 향기에 관여하기 보다는 매운 맛에 관여 하는 성분이라고 보고하였으며,¹⁵⁾ 이 같은 결과를 통하여 생강나무의 향기성분은 β

-phellandrene 을 중심으로 하는 유사 물질들이므로 판단되었다. 이를 바탕으로 다른 물질이 추가적으로 생강향에 관여할 수 있으며 생강나무와 생강의 향기는 쉽게 구분이 가능할 정도로 다르므로 이들 주된 향기 조성에 관한 추가적인 심도 있는 연구가 필요하다고 할 수 있다. 두 식물의 동일한 기관이 뿌리부의 결과를 보면 생강의 뿌리에서는 생강과는 다르게 주요 물질로 pinene이나 limonene 같은 향기가 강하나 생강에서도 다량의 citral 이 나오는 만큼 보다 다양한 연구가 사료된다.

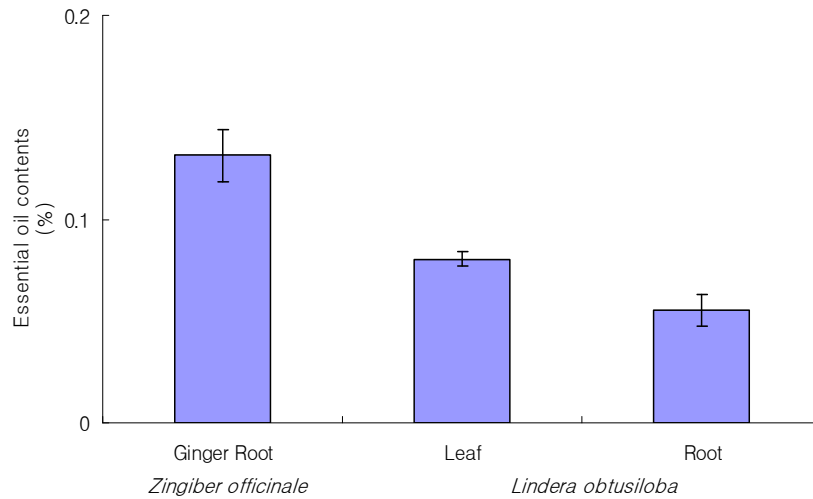


Fig. 13. Essential oil contents of Ginger and *Lindera obtusiloba* Bl.

Table 19. GC/MSD analysis of Ginger(*Zingiber officinalis* Roscoe) root.

No.	Area(%)	Component
1	2.84	α -Pinene
2	4.16	Camphene
3	2.69	β -Pinene
4	1.63	α -Phellandrene
5	8.81	β -Phellandrene
6	1.06	Linalool
7	0.32	Terpineol
8	0.35	Camphor
9	1.39	Isoborneol
10	11.81	Citral
11	0.28	Acetic acid
12	0.05	Trichloroacetic acid
13	0.29	Geraniol
14	0.41	α -Cubebene
15	1.16	Caryophyllene
16	29.28	Zingiberene
17	2.01	Azulene
18	0.81	α -Cadinol
19	1.03	Trans- α -Bergamotene
20	0.51	Caryophyllene oxide

Table 20. GC/MSD analysis of leaf in *Lindera obtusiloba* Bl.

No.	Area	Component
1	0.35	α -Pinene
2	0.4	Camphene
3	0.34	β -Pinene
4	1.2	α -Phellandrene
5	0.23	Limonene
6	2.11	β -Phellandrene
7	6.84	1,3,6-Octatriene, 3,7-dimethyl
8	3.38	1,3,6-Octatriene, 3,7-dimethyl-(Z)
9	0.73	2,4,6-Octatriene, 2,6-dimethyl-(E,Z)
10	17.72	Caryophyllene
11	4.82	α -Caryophyllene
12	3.93	Butylated hydroxytoluene
13	0.86	Caryophyllen oxide
14	0.33	Ledol
15	0.64	(-)-Spathulenol
16	0.67	tau-Muurolol
17	0.53	Copaene
18	2.08	α -Cadinol
19	0.07	Dodecanoic acid
20	0.45	Phytol
21	0.08	Tetradecanoic acid
22	0.14	n-Hexadecanoic acid

Table 21. GC/MSD analysis of root in *Lindera obtusiloba* Bl.

No.	Area(%)	Component
1	6.81	1R- α -Pinene
2	8.89	Camphene
3	1.47	β -Pniene
4	0.86	1S- α -Pinene
5	0.28	Cyclohexene
6	0.58	α -Phellandrene
7	5.73	Limonene
8	1.24	Benzene
9	0.88	Camphor
10	11.62	Acetic acid
11	0.61	Caryophyllene
12	0.8	Isoborneol
13	0.52	Bornaol
14	1.69	Dodecanal
15	2.79	Hexadecenal
16	2.56	9-Octadecenal
17	0.46	Caryophyllene
18	0.5	1H-Cycloprop[e]azulene
19	0.6	Copaene
20	2.42	α -Cadinol
21	0.48	Tridecadiene
22	0.26	Teteradecadiene

2. 생강나무의 저장조건, 건조법, 가공법 등에 따른 수율 및 유효성분 함량 변화 구명

가. 신선 재료로서 잎의 MA저장조건 구명

(1) 연구목적

신선 재료로서 채취시기가 한정된 생강나무 잎을 이용하기 위하여 품질유지를 목적으로 한 적절한 MA포장방법의 구명이 필요하다. 원예 산물의 호흡률에 따른 품질 유지에 적합한 O₂ 및 CO₂농도가 조성되도록 알맞은 산소투과율을 갖는 film의 선발이 우선 필요하여 본 시험을 실시하였다.

(2) 연구방법

신선 재료로서의 잎의 연중 이용 가능성 여부를 알아보기 위하여 생잎 30g을 정량하여, 저장온도를 5°C, 10°C, 15°C, 25°C(상온)로 달리 설정하였으며, 포장재는 현재 채소류 유통에 많이 이용하고 있는 PE 30 μ m, PE 60 μ m, PP 30 μ m, PP 60 μ m의 film을 30cm×20cm로 각각 재단하여 사용하였다. 생강나무 잎을 PE 30 μ m, PE 60 μ m, PP 30 μ m, PP 60 μ m film에 각각 세절한 신선 잎 30g을 정량하여 포장한 후, 포장별로 5°C, 10°C, 15°C, 25°C의 조건하에서 12일간 저장하면서 3일 간격으로 중량을 측정하였다.

저장기간 중에 생체중 감소와 포장재내의 CO₂, C₂H₄ 농도를 측정하였으며, 생체중(fresh wt.) 감소율은 저장 전 중량을 100%로 하여 저장 중 감소정도를 백분율로 나타냈다. 저장기간 중 포장 내부의 기체조성 CO₂의 함량은 각 film 표면에 septum을 부착한 뒤 가스분석기(PBI Dansensor Check Point O₂/CO₂, Denmark)를 이용하여 3일 간격으로 4회 측정하였고, ethylene(C₂H₄)함량은 1mL 기밀성 syringe로 포집하여 저장 6일 후부터 3일 간격으로 3회, 포집 즉시 GC(gas chromatography, agilent GC/FID 7890)로 측정에 사용하였으며, inlet temp.는 250°C split mode로, carrier gas는 H₂, flow ratio는 40mL/min였다. Oven 조건은 initial temp.는 100°C, 3분간 유지하고 final temp.는 150°C으로 조정하였다. Column은 agilent GS-/Alumina 30 × 0.53mm I.D. 을 사용하였다.

저장 간의 내적인 품질에 대한 성분을 비교하기 위하여 칼륨(K), 마그네슘(Mg), 철(Fe) 인(P), 아연(Zn), 망간(Mn)의 무기염을 정량하였다.

정량방법은 농업과학기술원 토양 및 식물체 분석법¹⁶⁾에 준하여 실시하였으며, 미세하게 분쇄한 건조시료를 0.5g 씩 삼각플라스크(50mL)에 정량한 후, H₂SO₄ 1mL 과 50% HClO₄ 10mL 을 첨가하여 처음에는 서서히 가열하다가 차츰 온도를 올려 300°C 에서 가열하다가 분해액이 백색이 되거나 갈색으로 투명하게 되면 분해를 중지하였다. 분해 후 냉각과 여과의 과정을 거친 다음 100mL mass flask 에 3차 증류수를 사용하여 100mL 정량 후 inductively coupled plasma(ICP, Varian, U.S.A.)를 이용하여 무기물함량을 측정하였다.

저장 간의 육안적 품질변화를 구체화하기 위해 온도별, 포장재별 저장기간 중인 생강나무 잎을 3일 간격으로 엽록소 함량을 측정하였다. 처리별 각각 0.2g 씩 취하여 10mL DMF(N,N-Dimethyl formamide) 를 추출용매로 하여 5°C 의 암기조건의 incubator 에서 24시간 침출한 후 spectrophotometer (BECKMAN, DU650)를 이용하여 664.5nm(a)와 647nm(b)의 파장으로 측정하였다.¹⁷⁾ 측정 후 엽록소 a, b와 총 엽록소 함량을 계산하였으며, 시료 간 3반복하였다.

$$\text{Chlorophyll a} = 12.70 \cdot A664.5 - 2.79 \cdot A647$$

$$\text{Chlorophyll b} = 20.70 \cdot A647 - 4.62 \cdot A664.7$$

$$\text{Total chlorophyll} = 17.90 \cdot A647 + 8.08 \cdot A664.5$$

저장 온도, 포장재별, 건조별 정유 성분 조사와 성분 함량을 조사하기 위한 GC는 agilent 6890N(Agilent, U.S.A)를 사용하였으며, MSD는 agilent 5975/MSD(U.S.A)을 사용 하였다.

각각의 분석조건은 inlet temp. 200°C splitless mode였으며, carrier gas는 He, 69.1mL/min였다. Oven조건은 initial temp.는 50°C, 5분간 유지하고 final temp.는 230°C, 5°C/15min으로 조정 하였으며, auto-sampler를 사용하였다. Column은 agilent DB-5ms(30.0m×250μm×0.25μm)를 사용 하였다. 분석 시 sample 은 용매에 10:1의 비율로 희석하여 NIST mass spectral library version 2.0(2005)의 mass spectral data 와 mass spectral search program 을 통해 비교 분석 하였다.

(3) 연구결과

저장 중 중량의 변화는 모든 film과 온도처리에서 감소하는 경향을 보였고, 특히, 두께가 얇은 PE 30μm, PP 30μm의 25°C 온도처리에서 급격히 감소하였으며, 대체로 낮은 온도처리에서 film의 두께와 종류에 상관없이 무게감소가 적었다. PE 30μm, PP 30μm의 얇은 두께의 포장이 PE 60μm, PP 60μm의 두꺼운 포장에 비해 5°C처리를 제외한 모든 온도처리가 상대적으로 크게 감소하였다(Fig. 14).

저장온도에 따른 PE 30μm film의 중량변화는 저장 시작부터 이후 조사까지 온도에 따라 중량감소가 확연하게 나타났다. 저장온도 5°C의 생체무게 변화는 적었고, 10°C, 15°C의 온도조건 하에서는 저장 6일째와 9일째 조사 시 변화가 적었을 뿐 저장온도가 높아질수록 중량의 감소를 또한 크게 나타났다.

엽채류 및 non-climacteric type에 속하는 과일의 film 포장은 주로 수분 손실의 방지와 수분 스트레스에 의한 생리적 장애 및 노화 지연에 주목적을 두고 있으며, 결구 상추의 포장용 필름으로 polyethylene(PE) film이 polypropylene(PP)이나 polystyrene film보다 효과적이며 PE film 저장 시 film에 바늘구멍을 뚫는 등 수분과 기타 가스의 투과율을 조절하여 과습에 의한 부패와 부적합한 가스의 집적을 방지할 수 있다고 보고한 바 있다.¹⁸⁾ 상추의 저장 실험에서 감모율은 저장온도가 높을수록 높았다는 발표 결과와 본 연구조사가 일치하였다.¹⁹⁾ 또한, 과실류인 바나나의 생육 중 film 밀봉처리는 수확 후 조기 숙성을 완만하게 하고 수확 후에 과실을 30μm PE film 포장과 ethylene 흡착제 처리하면 노화 과정을 지연시켜 유통 및 저장 중 상품성의 급격한 저하를 막을 수 있다고 하였다.²⁰⁾

이는 모든 원예 산물의 저장 시 품질을 저하시키는 가장 큰 환경적 요인은 온도이기 때문으로 본다. 온도 상승에 따른 호흡속도의 증가율은 작물에 따라 차이는 있으나, 온도가 10°C 높아지면 호흡속도는 2~3배 증가하기 때문에 감모율이 높았던 것으로 본다.²¹⁾

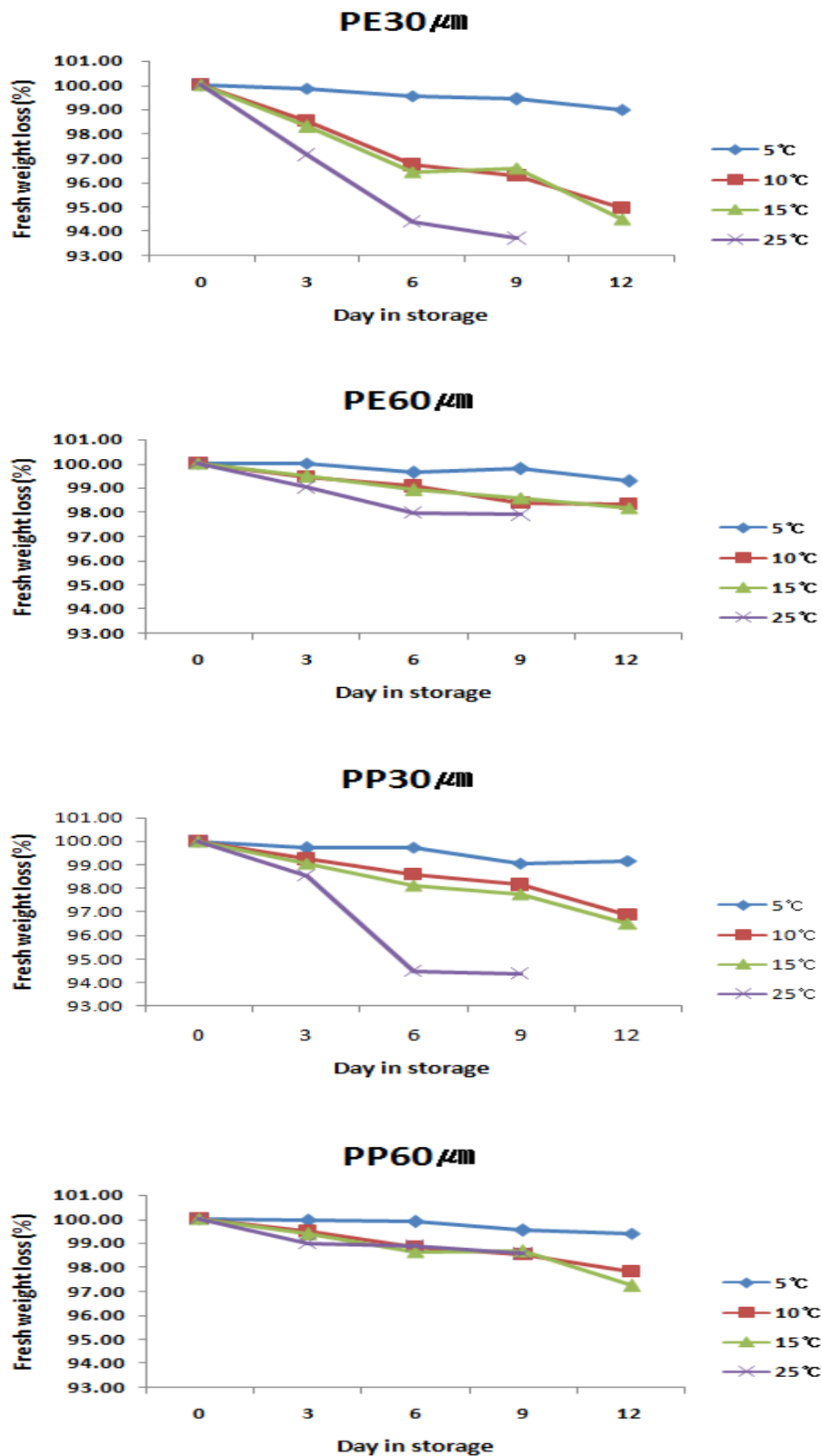


Fig. 14. Effect of storage temperature and packaging films on the fresh weight loss of *Lindera obtusiloba* Bl. leaf.

Vertical bars represent \pm S.E. (n=3)

비파 수확기 및 저장온도에 따른 저장 중 품질변화를 조사한 결과 온도가 높을수록 경도가 낮아지고 식미가 나빠진다고 하였으며, 부패율 역시 높아진다고 하였다.²²⁾ 특히 0℃의 경우 가장 우수하게 저장력이 증진 되었다고 하였는데 본 시험에서도 이와 유사하게 온도가 높아질수록 품질이 낮아지는 결과를 얻었다. 특히, 사과에 있어 수확시기가 저장 중 착색에 영향을 준다고 하였으며,²³⁾ 수확시기에 따라 저장기간이 연장된다고 하였으며,^{21,24)} 수확기에 따른 저장력은 과중에 따라 상이하다고 하였다.²⁵⁾ 이 같은 연구결과에 따라 본 연구에서도 생강나무 잎의 채취시기에 따른 부가적인 실험이 추후에 수행되어야 할 것으로 판단된다.

25℃ 저장온도조건에서는 저장 9일 이후 측정이 무의미 할 정도의 육안 상 갈변(Fig. 15)과 이취로 인해 모든 측정에서 제외하였다.

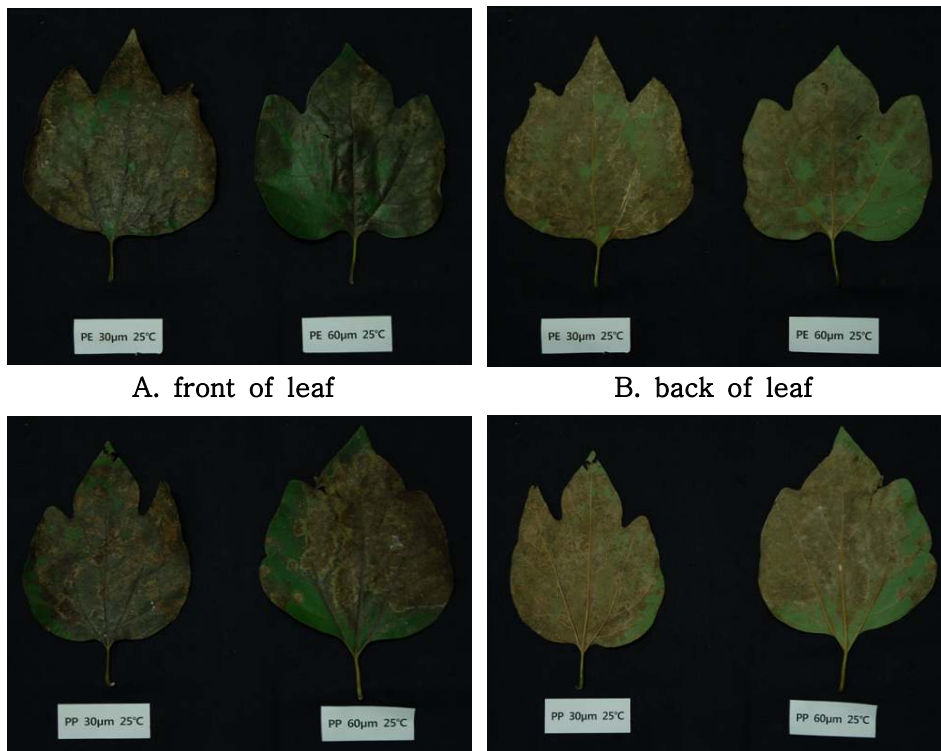


Fig. 15. Effect of packaging films on the leaf shape of *Lindera obtusiloba* Bl. stored after 12 day in 25°C temperature.

CO₂의 변화를 살펴보면, 높은 온도처리일수록 CO₂의 양이 저장 기간 내내 많았으며, PP 60µm film의 25℃ 온도처리에서 저장 초반 급격히 증가했다가 감소하는 경향을 보였다(Fig. 16). 이는 온도가 높을수록 식물체내의 호흡량이 많은 것 때문에 나타난 결과로 판단되며, 두께가 두꺼운 PE 60µm film과 PP 60µm을 비교해 보면 PP 60µm film이 포장 내 공기 유동이 적은 조건이기 때문으로 판단된다. 또한, 저장 온도가 낮을수록 포장재내 CO₂의 축적을 억제할 수 있다고 하였다.²⁶⁾ 본 연구에서도 온도가 낮을수록 CO₂ 농도가 낮은 결과를 얻었다. 저장 중 CO₂의 적정 농도는 2%이며, 고농도의 CO₂는 저장 중 이취의 원인이 되는 acetaldehyde의 발생을 증가시킨다고 알려져 있다.²⁷⁾

Japanese mint 저장시험과 lemongrass 시험에서도 저장 중의 CO₂가 증가하는데 대체로 얇은 film에서 저장 할 경우에 농도가 낮았다.^{28,29)} 이는 식물체 자체의 호흡으로 발생한 CO₂가

film내에 축적되기 전에 배출 되는 것 때문이라고 하였다. lemongrass 저장 시 저장초기에 CO₂ 함량이 저장온도가 높을수록 높았다고 하였는데 본 연구에서도 저장 초기 3일째에 온도가 높아질수록 증가하는 경향을 보였다.²⁹⁾

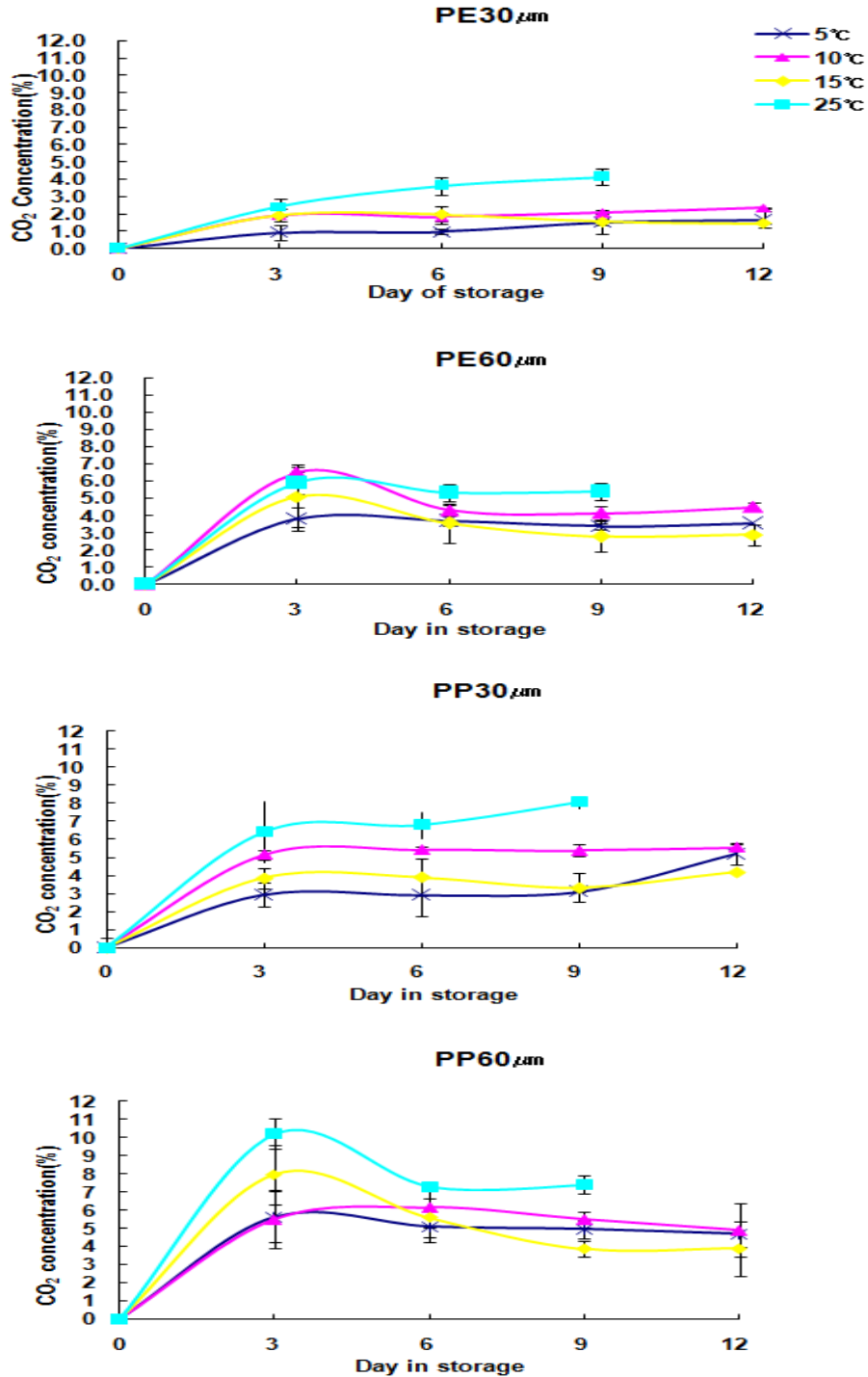


Fig. 16. Effect of packaged films on the CO₂ content in *Lindera obtusiloba* Bl. leaf. during storage.

Vertical bars represent ±S.E. (n=3)

저장 중 호흡량과 ethylene 발생량은 수확시기와 저장온도에 크게 영향을 받는 것으로 보고되고 있다.^{24,30,31,32)} 생강나무 잎의 저장 중 ethylene 함량의 변화를 살펴보면, film종류에 상관없이 25°C 온도 처리에서 저장초반부터 ethylene 함량이 크게 나타났으며, 저장 9일 이후에는 함량이 줄어들거나 유지되는 경향을 보였다(Fig. 17).

apanese mint 저장 시험에서 저장 15일까지는 온도가 높은 처리구에서 ethylene 함량이 높았다고 했다. Film 두께에 따라서도 차이가 났는데 80 μ m film 처리구에서 ethylene 함량이 20 μ m나 40 μ m film 처리구 보다 월등하게 높게 나타났다고 보고(Park, 2000a)한 바 본 연구와 일치 하였다.²⁸⁾

식물의 조직은 1ppm미만의 ethylene 에 노출 되어도 엽록소 감소 등을 비롯한 노화의 형태들이 시작되거나 가속화 되는데^{33,34)} 25°C처리의 경우 고농도의 ethylene gas 에 노출되어 결과적으로 많은 이취와 갈변이 발생한 것으로 판단된다.

엽록소 함량은 일반적으로 녹황색채소에서 가장 중요한 색소이며, 그 함량에 따라 채소의 외관이 크게 차이를 나타내기 때문에 신선도와도 밀접한 관계를 가진다. 품질변화에 가장 뚜렷하게 확인되는 황화현상(yellowing)은 보통 조직 내 엽록소가 파괴되면서 내부에 숨겨져 있던 카로티노이드가 육안으로 관찰되기 때문인 것으로 알려져 있다. 이 시험의 포장 내 엽록소 함량은 포장별, 저장온도에 상관없이 큰 차이를 보이지 않는 것으로 나타났으나 수치상으로는 미비하게 줄어드는 경향을 보였다(Fig. 18).

엽록소의 변화와는 상이하게 육안 상 갈변이 저장 6일째부터 높은 저장온도(25°C)에서부터 나타나기 시작했고, 15°C, 25°C의 온도 처리부터 잎의 맥을 따라 곰팡이가 나타났으며, 저장 9일 이후의 25°C 저장온도에서는 film의 종류와 두께와 관계없이 상품성이 없을 정도의 갈변이 진행되었다. 수치상 엽록소 함량의 변화가 크지 않은 것은 생강나무 잎의 조직이 일반채소에 비해 두껍고 치밀하며, 월계수, 녹나무, 감태나무등과 같은 녹나무과 식물대부분의 경우 잎이 두껍고 잎의 앞면에 wax층이 발달하는 특성을 가진 것으로 알 수 있다.³⁵⁾ 이러한 특성으로 생강나무 잎도 쉽게 무르지 않기 때문이라 판단된다. 산마늘 잎의 4°C저온저장 시에 40여일까지 저장이 가능하다고 보고 하였는데 이 같은 장기저장이 가능한 이유는 식물조직 특성상 매우 치밀한 조직 때문이라고 하였다.³⁶⁾ 그러나 잎에 비교적 수분을 많이 함유한 Japanese mint와 lemongrass 저장에서 온도가 높을수록 엽록소 함량의 파괴가 많았다고 보고한 바 있다.^{28,29)} 저장 중 엽록소 함량 변화는 저장 식물의 종류에 따라 차이가 있음을 알 수가 있었다. 이와 같이 높은 온도에서 엽록소 파괴가 큰 것은 호흡에 의한 저장 영양소의 파괴에 기인한 것으로 본다.²⁸⁾

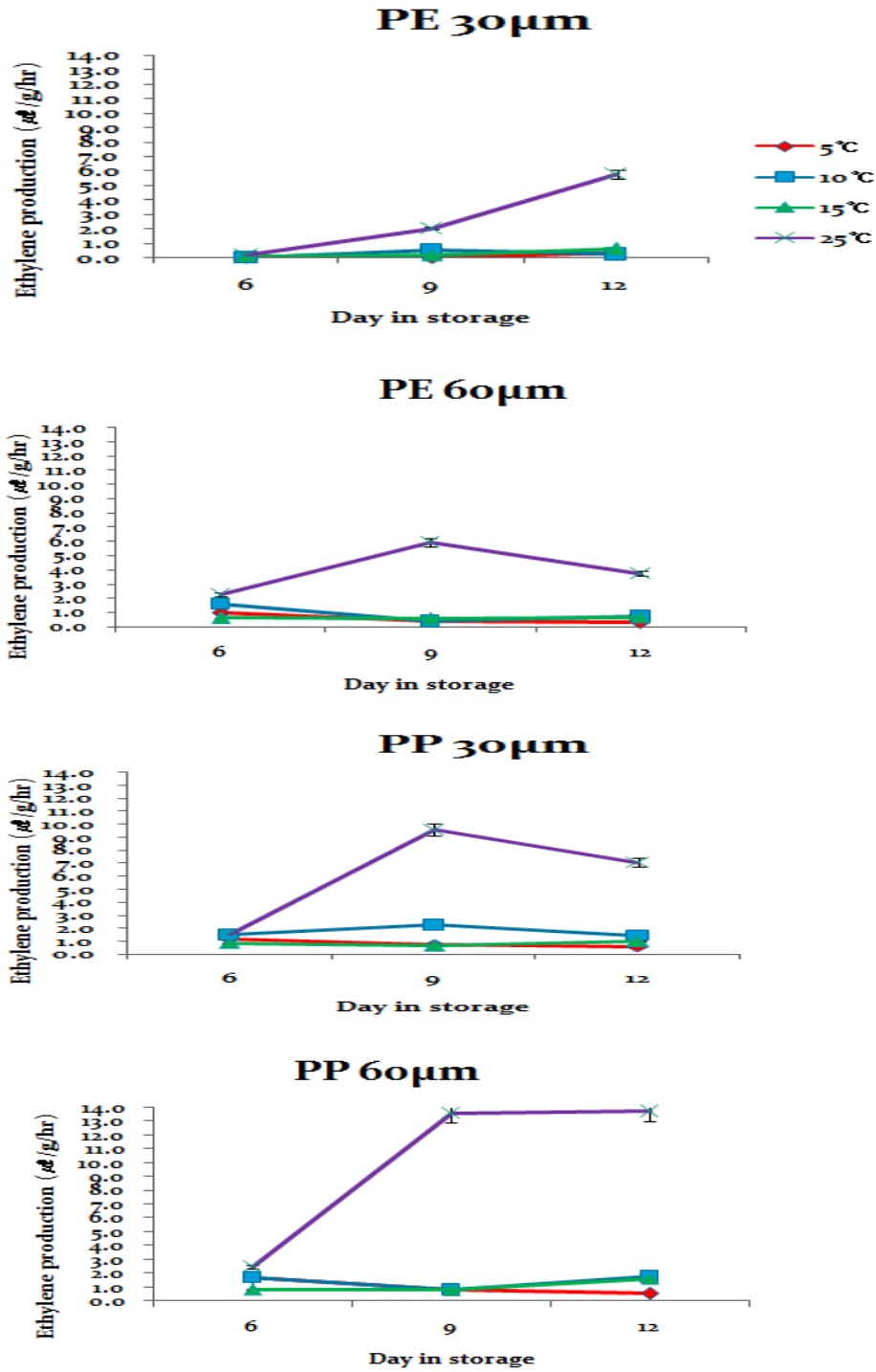


Fig. 17. Change of ethylene production of *Lindera obtusiloba* Bl. leaf packaged with different film during storage.

Vertical bars represent \pm S.E. (n=3)

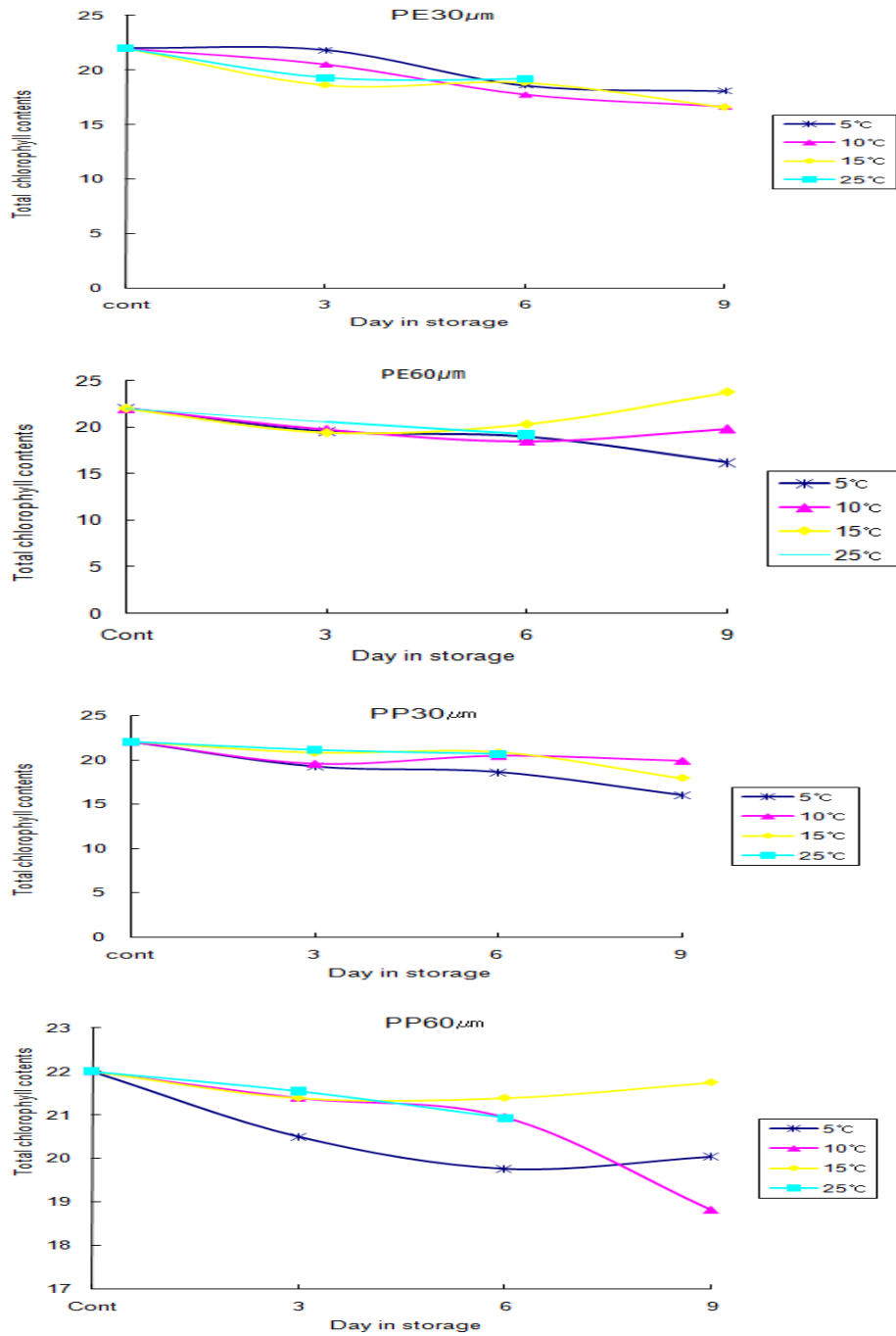


Fig. 18. Effect of different films on the chlorophyll contents during storage.

Vertical bars represent \pm S.E. (n=3)

인간에게 있어서 식물의 섭취는 무기물의 급원으로 적절한 함량도 중요하겠지만 이들 영양 원소 사이의 균형 또한 중요하다.³⁷⁾ 저장 중 내적 품질의 비교를 위해 온도에 따른 포장 별 무기물 함량을 분석한 결과 Mg함량은 film종류 간의 큰 차이를 나타나지 않았으며, 저장기간이 길어질수록 함량이 줄어드는 경향을 보였다(Fig. 19).

K의 함량 또한 저장기간이 길어질수록 함량이 유지되거나 미비하게 감소하는 경향이 나타났다(Fig. 20).

Mn함량은 저장기간 내에 증가하거나 감소하는 특별한 경향이 나타나지 않았다(Fig. 21).

Zn, Fe, P의 함량은 저장 기간 동안 함량의 변화가 미비하였으며, film에 따른 차이 또한 없었다(Fig. 22, 23, 24).

저장 중에 무기염류 변화에 대한 연구보고는 많지 않다. 그러나 일반적으로 다소 휘발성이 있는 K, Mg 같은 알칼리성원소는 저장 중에 생체중의 감소와 함께 어느 정도 감소 가능성이 있으나, Zn, Fe 같은 비교적 이동이 어려운 원소들은 저장 중에 변화가 없는 것이 원칙이기 때문으로 사료된다.³⁸⁾

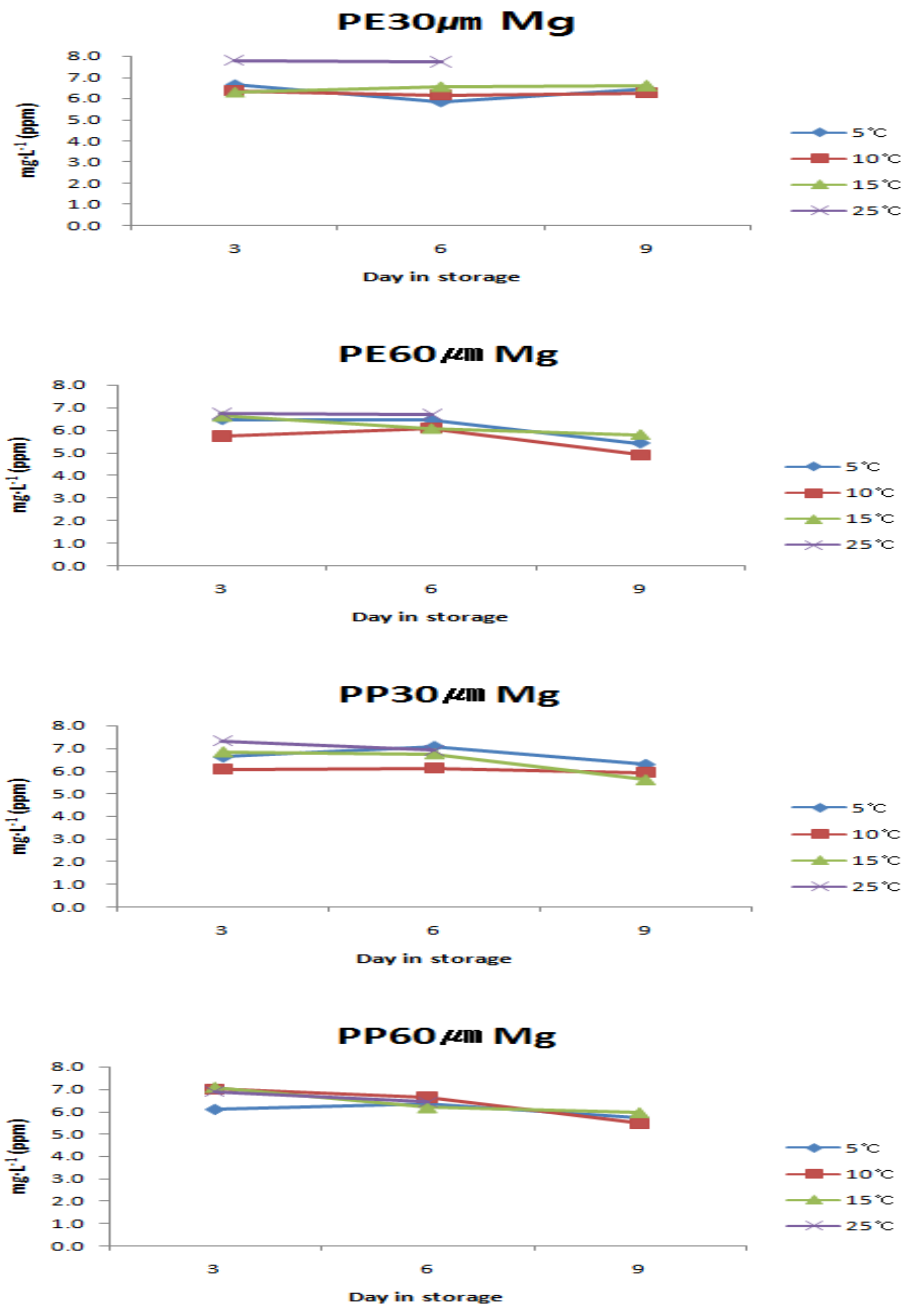


Fig. 19. Change of Mg in *Lindera obtusiloba* Bl. leaf packaged with different films during storage.

Vertical bars represent ±S.E. (n=3)

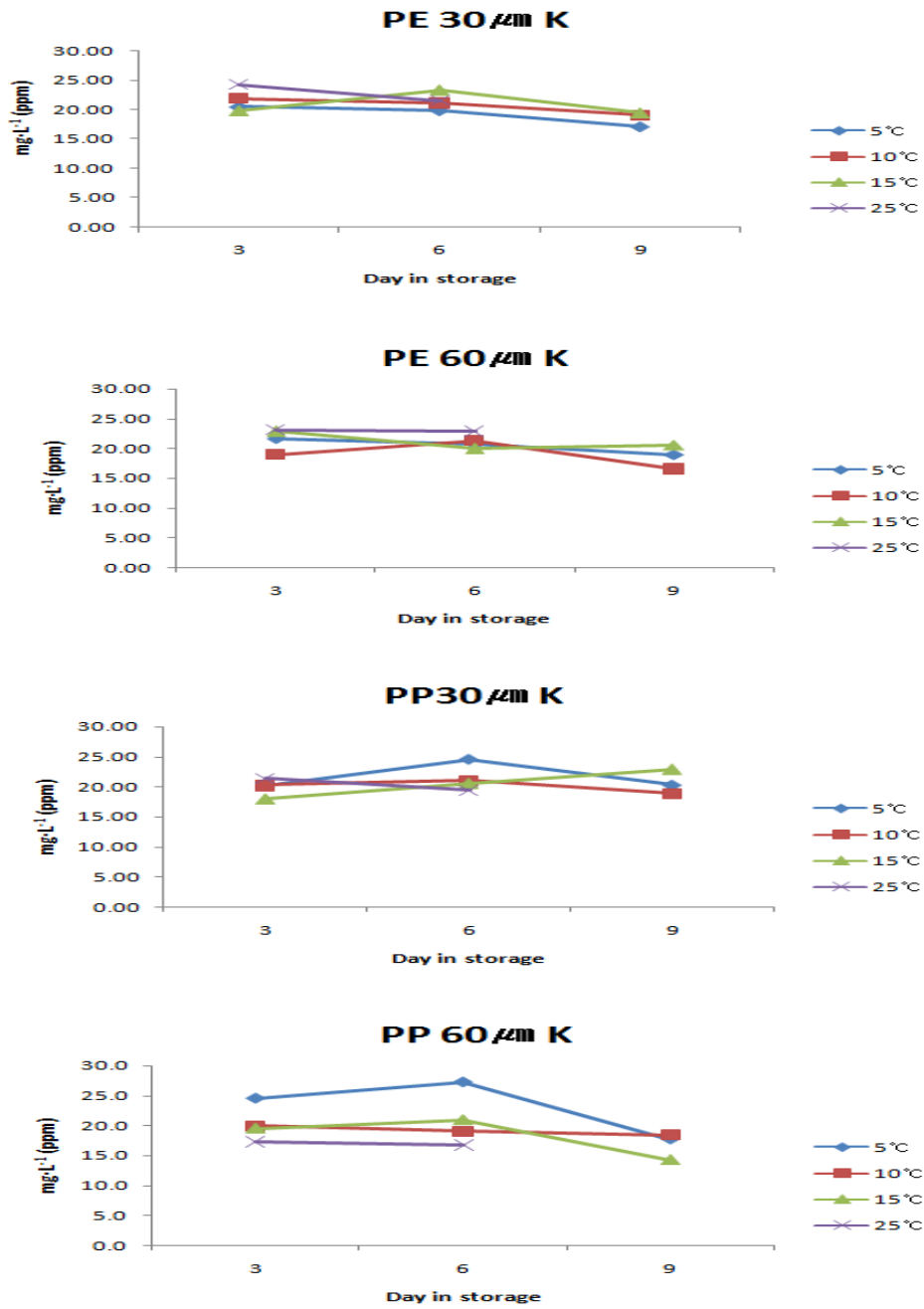


Fig. 20. Change of K in *Lindera obtusiloba* Bl. leaf packaged with different films during storage.

Vertical bars represent ±S.E. (n=3)

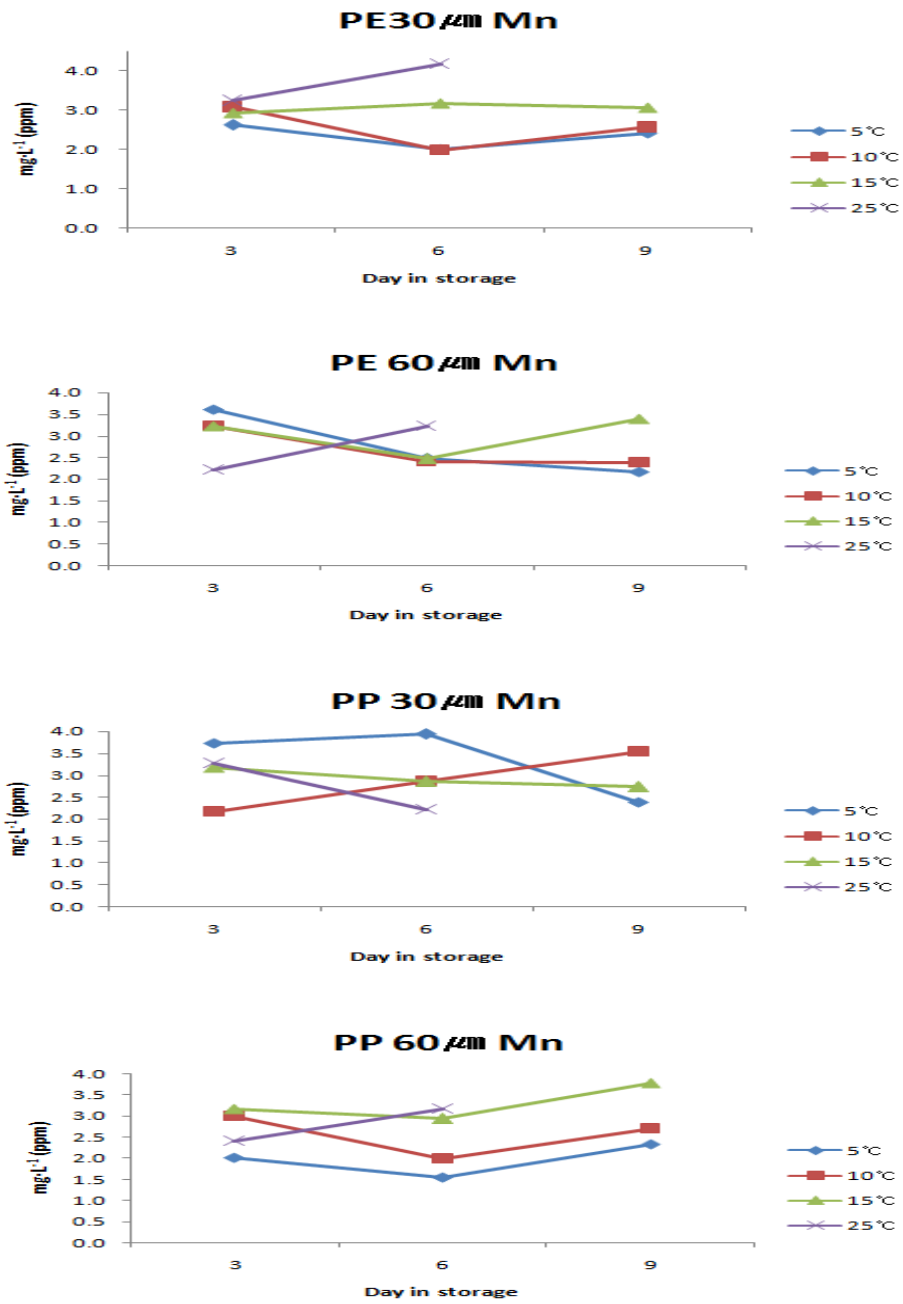


Fig. 21. Change of Mn in *Lindera obtusiloba* Bl. leaf packaged with different films during storage.

Vertical bars represent \pm S.E. (n=3)

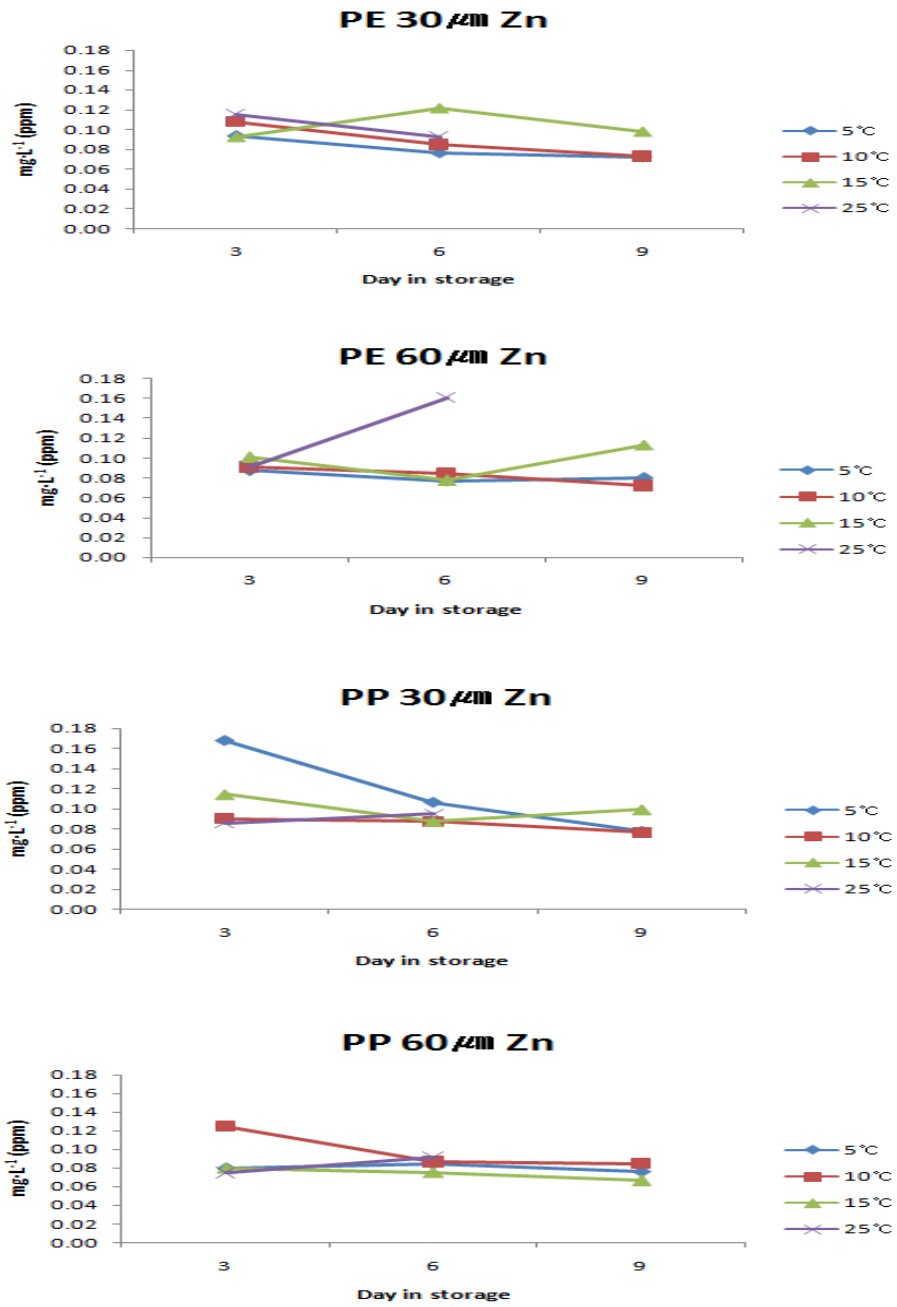


Fig. 22. Change of Zn in *Lindera obtusiloba* Bl. leaf packaged with different films during storage.

Vertical bars represent \pm S.E. (n=3)

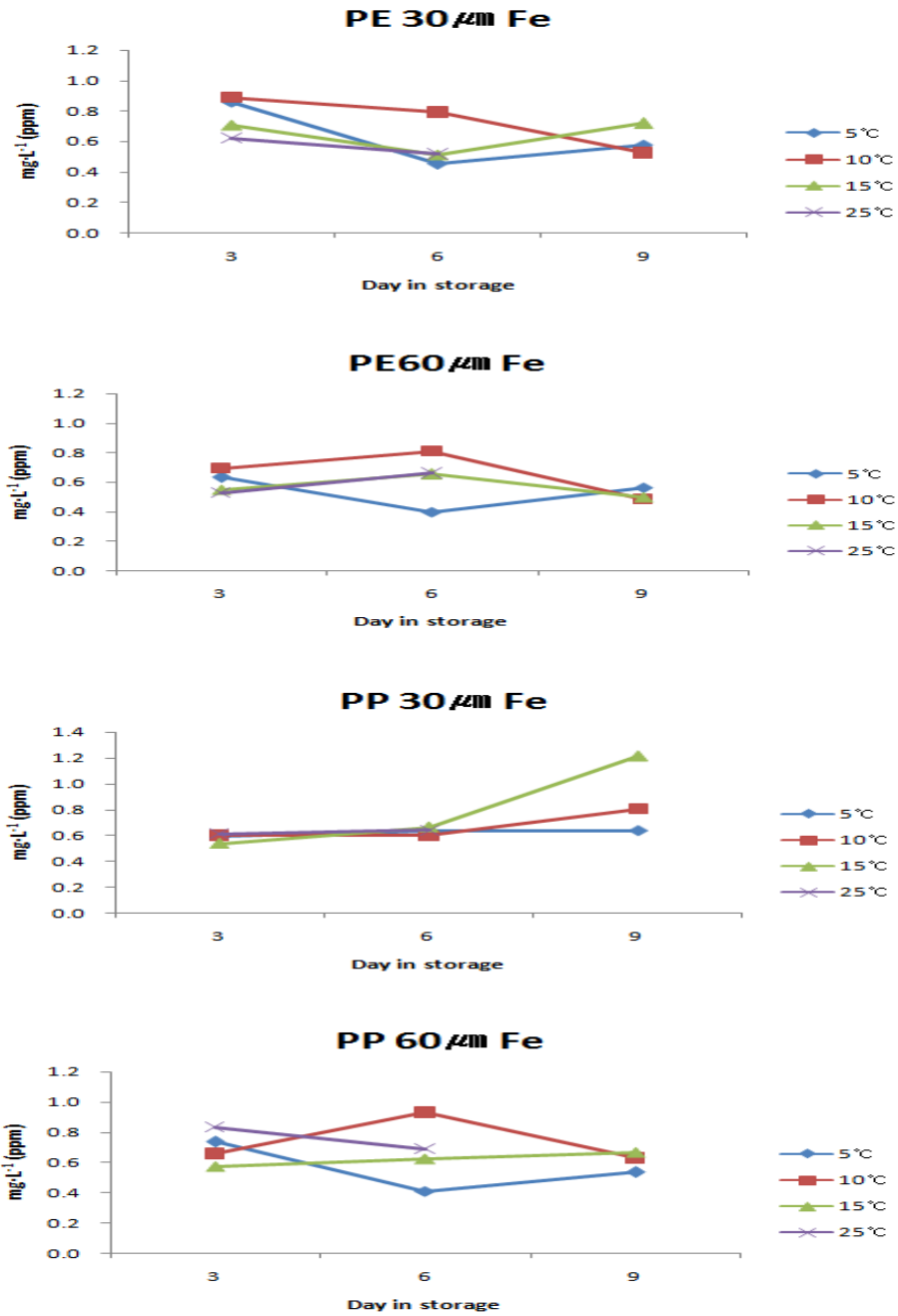


Fig. 23. Change of Fe in *Lindera obtusiloba* Bl. leaf packaged with different films during storage.

Vertical bars represent ±S.E. (n=3)

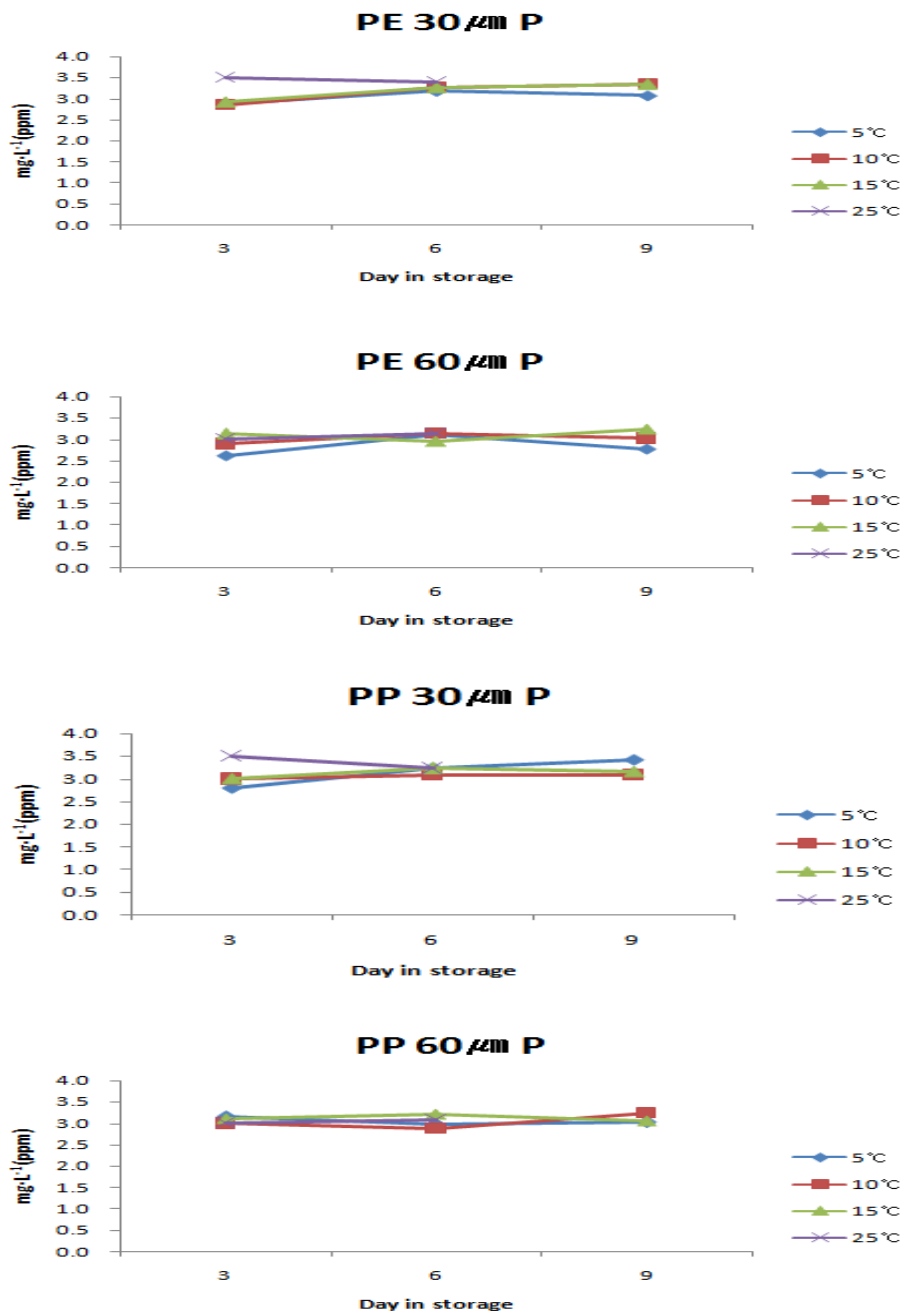


Fig. 24. Change of P in *Lindera obtusiloba* Bl. leaf packaged with different films during storage.

Vertical bars represent \pm S.E. (n=3)

이상의 시험을 종합해 본 결과, 두께가 두꺼운 PE 60 μ m, PP 60 μ m의 film이 CO₂함량변화의 결과 PE 30 μ m과 PP 30 μ m에 비해 호흡량은 많았으나, 포장 내 식물체내의 수분과 미세유공에 의한 공기 유동이 적으므로, PE 30 μ m나 PP 30 μ m보다 성숙이 지연되며, 특히 저온 저장 중에 신선도 유지가 가능함을 저장 중 ethylene 함량변화와 엽록소의 변화로 확인할 수 있었다. PP 60 μ m의 film은 PE 60 μ m과 비교 했을 때 ethylene 발생량이 상대적으로 많이 발생하였고, 육안상 갈변 등의 품질 저하 정도의 차이를 보였다. 마늘 저장 시 포장재료 별 인편 중량변화에서 PE film(50 μ m)포장의 저온저장 9개월까지도 5%미만으로 중량변화가 미비하다는 연구 결과로³⁹⁾ 생강나무 잎의 생체로서 일주일 이상이 지난 후의 이용 시에는 PE 60 μ m film이 적당하다고 판단된다.

나. 건조방법에 따른 수율과 향 성분 변화

(1) 연구 목적

채취시기가 한정되어 있는 야생식용식물은 물론 국내자생 방향성 식물의 건조방법에 따른 향기성분의 관한 연구는 이루어지지 않고 있다.⁴⁰⁾ 이에 장기간 저장을 위한 건조 과정 중 소실되거나 변화하는 기능성 물질에 대한 기초 자료를 조사하고 최적 건조 방법을 구명이 필요하다.

(2) 연구 방법

생강나무 생잎 100g를 자연건조(양건, 음건 ; 상온 25 $^{\circ}$ C), 온풍 건조(dry oven 70 $^{\circ}$ C), 동결건조의 4가지 방법(Fig. 25)으로 4일간 건조하여 정유 수율과 GC/MSD 분석의 시료로 사용하였다. 모든 건조는 건조 시작일부터 1일 간격으로 중량을 측정하여 중량변화가 없는 완전건조시점에서 추출 후 분석을 실시하였다. 실험의 대조구로 채취일이 같은 생강나무의 생잎을 사용하였다.

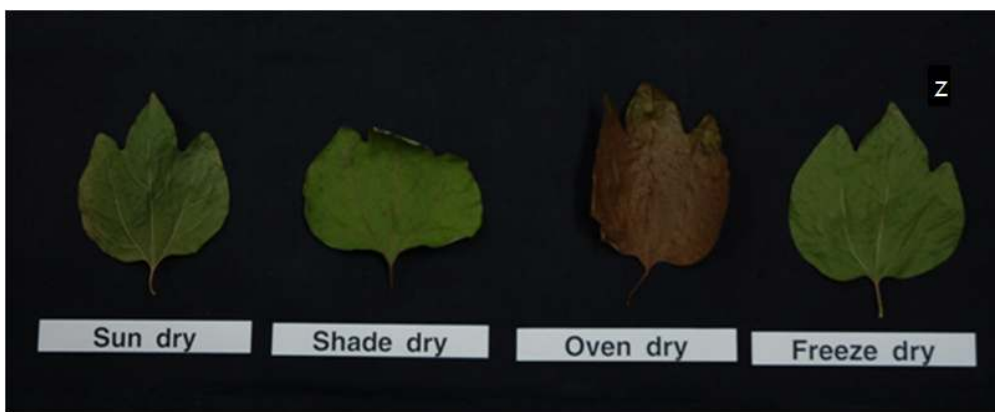


Fig. 25. Effect of drying methods on the leaf shape on 4 days after treatment.

(3) 연구 결과

장기저장과 가공이용을 위한 건조 방법별 시험의 중량 변화를 살펴보면, 열풍건조와, 동결건조가 거의 동일하게 건조 2일 후에 완전 건조 되었다. 양건보다는 음건이 건조가 서서히 진행되었으나 건조 4일후에는 동일한 수준으로 건조가 완료 되었다(Fig. 26).

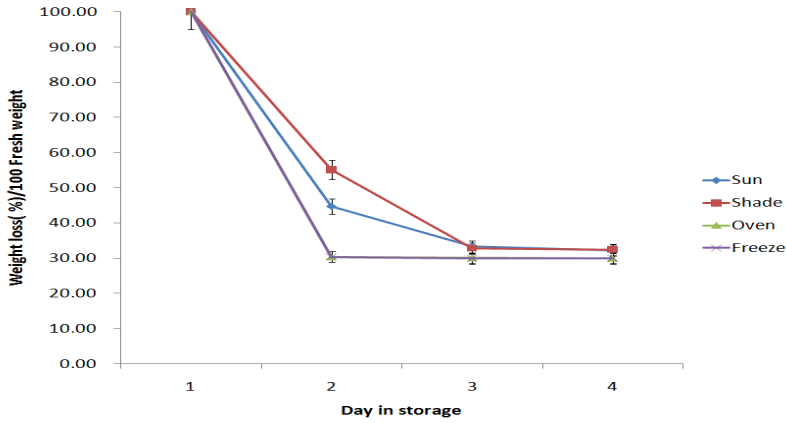


Fig. 26. Effect of drying methods on the weight loss of *Lindera obtusiloba* Bl. leaf.

Vertical bars represent \pm S.E. (n=3)

실험 결과 정유 수율은 대조구(fresh)가 0.095g 으로 가장 높았으며, shade dry(0.068g), sun dry(0.063g), freeze dry(0.055g), oven dry(0.034g)순으로 나타났다(Fig. 27). 중량변화가 없는 완전 건조 시점에서 수율이 높은 추출법인 수증기 연속 추출법(SDE)으로 추출하여 정유수율과 성분분석을 한 결과, 대조구인 생체시료가 수율이 가장 높았으며, 음건, 양건, 동결건조, 오븐건조 순으로 수율의 차이를 확연히 나타내었다. 동결건조 방법의 경우 vitamin 등의 유효성분을 장기간 저장하는데 우수한 방법이나 휘발성분의 경우 매우 낮은 결과를 얻었다, 이것은 동결 시 낮은 온도에 의하여 정유성분이 산화되거나 또는 건조한 찬 공기의 빠른 순환에 의하여 유실되는 것으로 판단된다(Fig. 27).

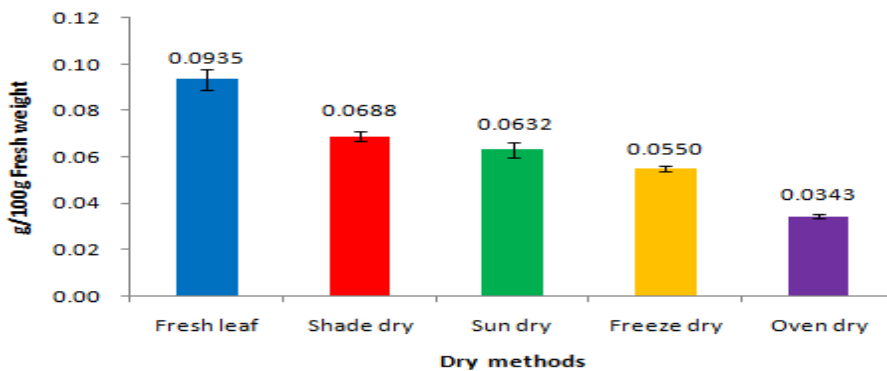


Fig. 27. Effect of different drying methods on the essential oil yield of *Lindera obtusiloba* Bl. leaf.

Vertical bars represent \pm S.E. (n=3)

건조별 정유 성분을 살펴보면, oven dry 는 114개, freeze dry 는 110개, sun dry 는 104개, shade dry 는 103개, 대조구는 100개의 성분이 검출 되었다. 주요 유효 성분으로 11개의 성분을 동정하였다(Table 22). 일차로 개발하기 위하여 몇 가지 제법을 사용하여 생강나무의 향기 성분을 분석하였는데 건조방법 및 제법에 따라 구성성분에 차이가 있었다고 한다.⁴¹⁾ 이것은 가공과정에 있어 효소대사과정이 서로 다르게 나타나는 결과로 보여지며 본 시험의 건조과정 중에도 유사한 과정이 나타났다고 판단된다. Sun dry와 shade dry가 대조구(Fresh leaf)와 거의 비슷한 성분 함량을 보였으며, estragole, caryophyllene, spathulenol 함량을 제외하고 oven dry 가 현저히 낮은 함량을 보였다(Table 22).

Table 22. Effect of drying methods on the major volatile flavor compounds of *Lindera obtusiloba* Bl. leaf.

Peak No.	Compounds	Peak area %				
		SD ^z	ShD	OD	FD	Fre
1	α -Pinene	0.86	0.86	0.09	0.50	0.77
2	β -Pinene	0.83	0.82	0.14	0.44	0.59
3	β -Myrcene	0.93	0.92	0.11	0.78	1.27
4	α -Phellandrene	1.09	0.96	0.13	1.39	1.82
5	Camphor	1.21	1.27	0.43	0.95	0.94
6	Borneol	0.27	0.26	0.33	0.23	0.23
7	Estragole	0.21	0.43	0.41	0.45	0.52
8	Acetic acid	2.58	2.55	0.84	2.12	2.53
9	Cyclohexane	4.98	5.00	2.69	5.34	5.59
10	Caryophyllene	12.04	10.98	10.88	10.05	12.63
11	Spathulenol	9.94	10.08	9.00	3.87	1.87

^zSD : Sun Dry, ShD: Shade Dry, OD: Oven Dry, FD: Freeze Dry, Fre:

Fresh leaf

α -pinene 과 β -pinene 함량은 건조방법 별 상호 비교한 결과 sun dry(0.86, 0.83%)와 shade dry(0.86, 0.82%)가 대조구(0.77, 0.59%)보다 0.1%, 0.2% 높게 나타났다(Fig. 28). Camphor 의 경우 효과적인 미생물제어 물질로서 fresh leaf 보다 sun dry, shade dry 에서 높게 나타났으며, oven dry 에서 가장 낮았다(Fig. 15). Phellandrene 은 terpenoid 에 속하며 α -phellandrene 은 eucalyptus, dill, lime, lemon, star anise, fennel, cinnamon, tea tree, thyme 등에 약 0.03~10.88% 함유하고 있으며,⁴²⁾ 특히, 생강 향을 발산하는 주요성분으로 생강에 약 6.60% 정도 함유하고 있고, 생강나무의 줄기에는 5.25%, 잎에는 1.96% 정도의 함량이 분석되었다.⁹⁾ 본 연구에서 생체시료(대조구)의 α -phellandrene 1.82% 함량의 분석은 선행연구와 유사하게 나타났으며, phellandrene 의 함량으로 살펴보면 건조별 생강나무 잎의 생강향기 보존은 동결건조, 양건과 음건, 오븐건조 순으로 유추할 수 있다(Fig. 28). Borneol 은 oven dry 0.33% 로 가장 높게 나타났고, spathulenol 은 sun dry, shady dry, oven dry 에서 각각 9.94, 10.08, 9.00% 로 비슷한 함량을 보였고, freeze dry 와 대조구 fresh leaf 에서 각각 3.87, 1.87% 로 나타났다(Fig. 28). Caryophyllene 은 대조구 12.63% 로 가장 높았으며, sun dry 12.04%, shade dry 10.98%, oven dry 에서는 10.88% , freeze dry 10.05% 로 비슷하게 나타났다. 그 외 대부분의 성분이

oven dry 처리에서 가장 낮게 나타났으며, 이는 열처리에 의한 성분의 휘발에 의한 것으로 판단된다. 또한, 썩의 건조방법 별 정유구성성분의 차이를 연구한 결과⁸⁾로 볼 때 동결건조방법이 낮은 온도에 의해 정유성분들이 산화되거나 해리되는 과정이 일어난 것으로 본 실험에서도 동일한 결과로 판단되었다. 생강나무 잎을 이용한 잎차 건조 생산 방법간에 성분의 차이가 있음을 보고 했는데 그 결과와 일치한다.⁴³⁾ 즉, acetic acid 의 경우에 찌차가 가장 높았고 양건차나 음건차가 낮았다고 했다. 또한, sun dry 와 shade dry 가 대조구인 fresh leaf 에서 검출된 함량과 비슷하게 나타났다(Fig. 28).

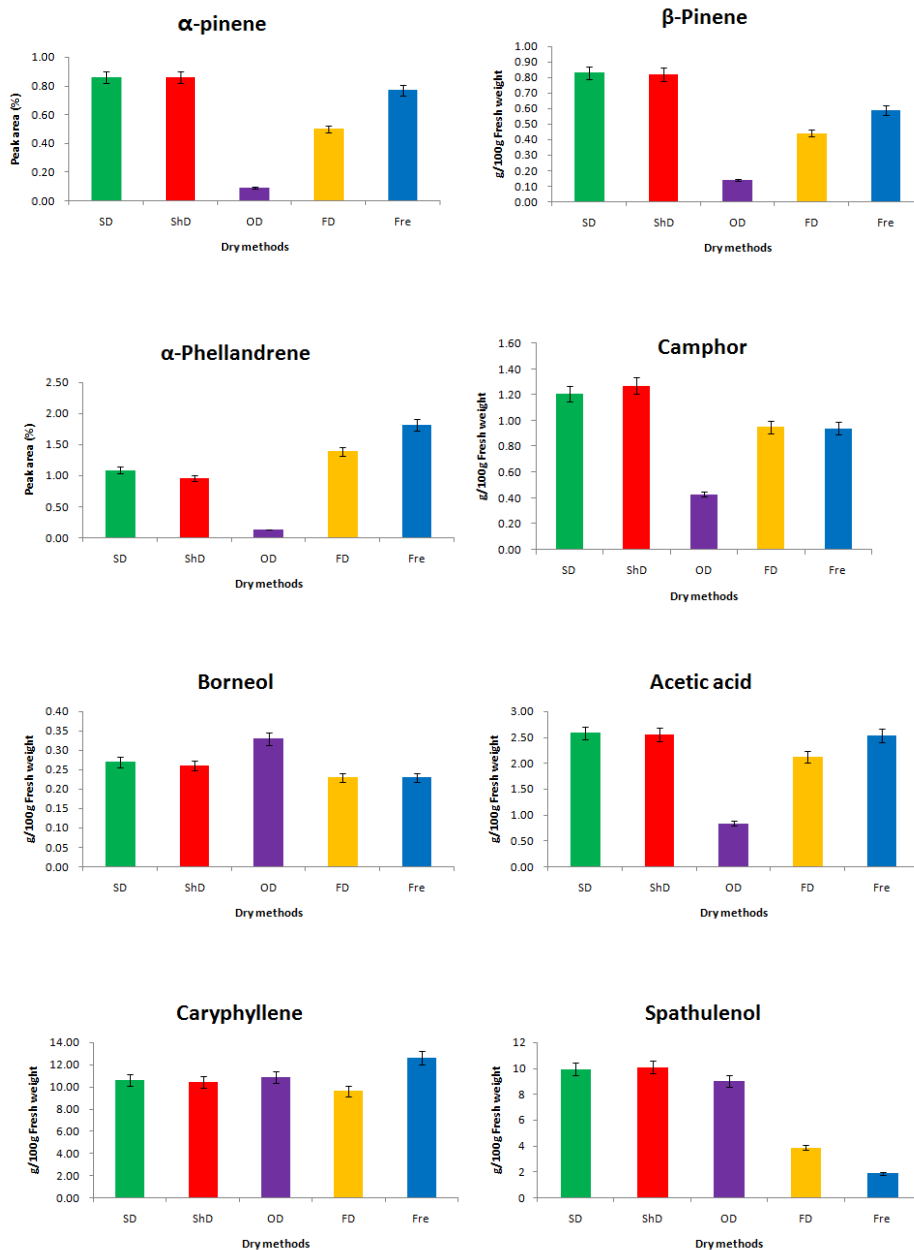


Fig. 28. Effect of drying methods on major volatile compounds of *Lindera obtusiloba* Bl. leaf.

SD : Sun Dry, ShD : Shade Dry. OD : Oven Dry, FD : Freeze Dry, Fre : Fresh leaf
Vertical bars represent \pm S.E. (n=3)

자연 건조방법(음건, 양건)은 단순하며 용이한 방법이나 복원성 및 위생상의 문제를 지니므로 동결건조방법 및 microwave oven 을 이용한 건조방법이 널리 이용되고 있다. 특히 동결건조방법은 식품가공 시 색을 보존시킨다는 측면에서 많이 시행되고 있다.⁴⁴⁾ 본 건조방법의 결과 상업적으로 다량 가공 시 많이 이용되는 oven dry와 freeze dry 방법을 상호 비교하면 oven dry 가 휘발성이 비교적 강한 α , β -pinene과 주요 향기성분인 phellandrene 함량이 낮았다. 따라서 생강나무 고유의 향기성분을 유지하기 위해서는 freeze dry법을 이용하는 것이 우수한 것으로 나타났다. 동결건조물과 오븐건조물의 무기성분 함량을 분석해본 결과 Ca, Mg, Mn, Zn 은 오븐건조물이 많은 함량이 나타났고, K, Fe, P는 동결건조물이 많게 나타났다(Fig. 29).

따라서, 생강나무의 잎을 건조하여 가정에서 소량 이용 시에는 전통건조 방법인 음건 이용이 적당하며, 상업적인 대량건조 이용 시 자연건조방법인 음건(shade dry), 양건(sun dry)의 이용이 제한이 있으므로 동결건조(freeze dry)의 방법이 경제성 있는 최선의 방법이라 판단된다.

결과적으로 기능성 물질인 essential oil 수율과 성분 이용을 위해서는 자연건조(sun dry, shade dry)방법이 ⁹⁾에서와 마찬가지로 가장 적당하다고 판단된다.

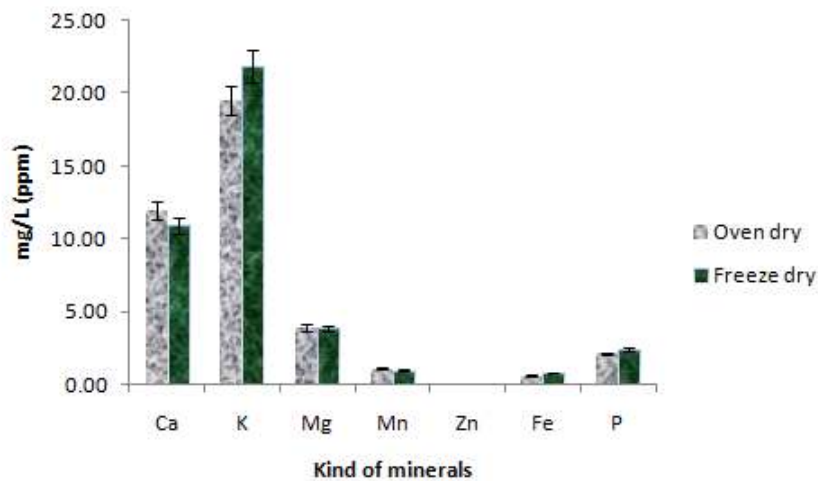


Fig. 29. Effect of drying methods on the mineral contents of *Lindera obtusiloba* Bl. leaf.

Vertical bars represent \pm S.E. (n=3)

다. 추출방법에 따른 성분 변화 연구

(1) 연구 목적

자생식물로부터 유용성 물질로 알려진 정유물질을 추출하기 위해서는 자원의 선발과 추출기술의 확보가 전제되어야 하는데, 천연 정유물의 추출 방법은 원료의 정유성분의 존재 상태 및 성질에 따라 다르다.⁴⁵⁾

추출 용매에 따라 식물체내에 있는 각각 다른 유효성분이 추출 될 수 있으며 같은 성분이라도 양의 차이가 있을 수 있다.^{46,47)} 용매를 달리 하여 성분별 분석과 정량을 함으로써 추출 후의 성분자체의 이용가능성을 확인하고자 하였다.

(2) 연구 방법

(가) 추출 방법에 따른 비교

추출방법에 따른 정유함량 및 성분조사를 위한 정유(essential oil)의 추출은²⁾ 순수수증기증류법(TDE, Traditional steam distillation/extraction)과 수증기연속추출방법(SDE, Simultaneous steam distillation/extraction)의 두 방법(Fig. 1.)으로 추출 후 비교 하였다. 시료는 세절(細切)하여 혼합한 시료에서 생잎 100g을 취하여 사용하였고, 추출시간은 1년차 연구를 기준으로 2시간, 3반복 추출 하였다.

(나) 순수수증기증류법(TDE; Traditional steam distillation/extraction)

생체시료 100g을 2구 joint round flask (5000mL)에 넣고 또 다른 joint round flask (5000mL)에 증류수를 채운 후 전열 bar 를 넣어 가열하여 수증기를 발생시켰다. 증기로 발생한 물과 정유 성분을 분리하기 위해 분획깔때기(funnel)에 추출용매[diethyl ether(J.T.Baker, Mexico, 99.9%)] 200ml 넣고, 15분 shaking 하여 정유와 섞인 용매만을 분리하였다.

(다) 수증기연속추출법(SDE; Simultaneous steam distillation/extraction)

생체시료 100g 과 증류수 4000mL 을 5000mL round flask 에 넣은 후 전기 heating mantle 로 가열하여 수증기를 발생시켰다. 추출용매는 1회 추출시마다 diethyl ether(J.T. Baker, Mexico, 99.9%) 200mL 사용하였으며, 항온수조를 이용하여 용매온도(60℃)를 조절하였다.

추출 후 용매내의 수분제거를 위한 탈수제로 Na₂SO₄ (황산화나트륨)를 적당량 넣은 후 5℃ incubator 에서 over night 하여 수분을 제거하였다. 수분제거 후 rotary evaporater(EYERA. Tokyo Rikakikkai Co., LTD)로 감압농축하여 정유만을 분리하여 수율을 측정하고, GC/MSD(GC: agilent 6890, MSD : 5975)로 성분을 측정하였다.

(라) 추출 용매에 따른 비교

① Diethyl ether (J.T. Baker, Mexico, 99.9%)이용 추출

SDE 법으로²⁾ 생체시료 100g를 1회 추출시마다 diethyl ether(J.T. Baker, Mexico, 99.9%) 200mL 사용하였으며, 항온수조를 이용하여 용매온도를 조절하여 분석 시료를 제조하였다.

② Dichloromethane (JUNSEI, Japan, 99.0%)이용 추출

생체시료 100g을 증류수 140mL을 이용하여 분쇄한 후 진100ml을 첨가하여 shaking incubator 에서 20℃ 50rpm 의 조건으로 2시간 반응 시킨 후, 반응 시킨 시료를 centrifuge 3000rpm 으로 30분간 원심분리하여 용매층을 분리하여 분석시료를 제조하였다.⁴⁸⁾

(3) 연구 결과

(가) 추출 방법에 따른 비교

생강나무 잎의 추출방법에 따른 정유의 함량을 비교한 결과 순수수증기증류법(TDE)이 신선 잎 100g 당 0.03g, 수증기연속추출법(SDE)이 0.09g이 추출되었다(Fig. 30). 이는 SDE 법이 물과 시료를 함께 boiling 함으로서 식물체가 증탕 되면서 체내 정유가 대부분 추출되며, 그에 따른 증기의 연속적인 순환으로 더욱 높은 수율이 나왔다고 본다. 반면에 TDE법은 수증기만으로 시료를 직접 추출함으로 체내 정유가 완전히 추출되지 않는 것으로 판단되며, 이에 따라 수율 차이가 나는 것으로 생각된다. 본 결과는 생강나무 부위 별 정유함량 1년차 실험에서 SDE 법에 의한 정유함량이 100g 당 0.08g 이 추출됐다는 보고와 유사한 경향을 보였다.

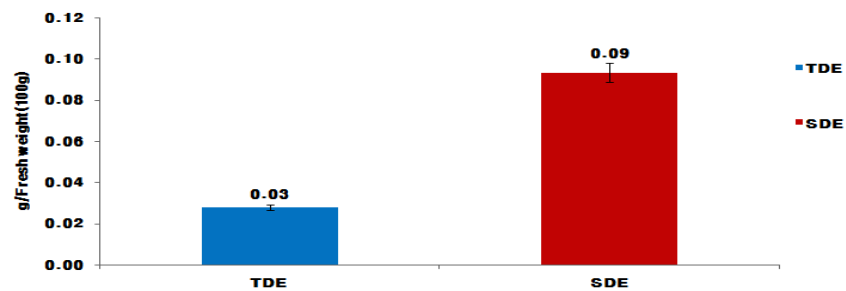


Fig. 30. Effect of different extraction methods on the essential oil yield in *Lindera obtusiloba* Bl. leaf.

Vertical bars represent \pm S.E. (n=3)

GC/MSD 분석을 하여 주요 오일성분의 차이를 비교한 결과 caryophyllene과 cyclohexane을 제외하고 SDE추출물이 2배 이상 높은 함량을 나타내었다(Table 23). 따라서 본 연구의 결과를 토대로 이 후 시험에서의 추출에서는 모두 SDE법을 적용하였다. 두 추출법을 비교하면 추출과정상 공기 중으로 휘발되는 성분이 적은 SDE법이 식물체 자체를 수증기로만 추출하는 TDE법에 비해 경제성 있는 추출법으로 판단된다.

Table 23. Volatile flavor compounds of *Lindera obtusiloba* Bl. leaf treated with different extraction methods.

Peak No.	Compound	Peak area(%)	
		TDE	SDE
1	α -Pinene	0.06	0.77
2	Camphene	0.09	1.15
3	β -Pinene	0.10	1.00
4	β -Myrcene	0.19	1.27
5	α -Phellandrene	0.45	1.82
6	Camphor	0.50	0.84
7	Borneol	0.11	0.23
8	Estragole	0.17	0.52
9	Acetic acid	1.22	2.53
10	Cyclohexane	6.86	5.59
11	Caryophyllene	15.70 ^z	12.63
12	Spathulenol	3.78	1.87

^z Highest compound

(나) 추출 용매에 따른 비교

추출 유기용매에 대한 수율 비교 시험에서 diethyl ether 와 dichloromethane의 용매를 이용하여 생잎 100g를 추출한 결과 분석된 성분종류와 함량에서 현저한 차이를 보였다. Diethyl ether 용매를 사용한 구에서는 약 11종의 물질이 분석되었으며, dichloromethane 용매에서는 3종의 물질이 나타났다. Essential oil의 구성성분 중 cyclohexane과 spathulenol의 함량은 오히려 dichloromethane 용매의 추출이 다소 높게 나타났다(Table 24).

이와 같은 추출 용매에 따른 오일 성분의 차이가 많이 나타나는 것은 보고된 바 있다.⁴⁹⁾ 따라서 앞으로 보다 다양한 유기용매를 이용한 시험을 실시 할 필요가 있다고 생각된다.

Table 24. Effect of different solvent using extraction on the volatile flavor compounds of *Lindera obtusiloba* Bl. leaf.

Peak No.	Compounds	Peak area(%)	
		Diethyl ether	Dichloromethane
1	α -Pinene	0.77	— ^z
2	β -Pinene	0.59	—
3	β -Myrcene	1.27	—
4	α -Phellandrene	1.82	—
5	Camphor	0.94	—
6	Borneol	0.23	—
7	Estragole	0.52	—
8	Acetic acid	2.53	—
9	Cyclohexane	5.59	7.8
10	Caryophyllene	12.63^y	4.1
11	Spathulenol	1.87	4.8

^z Not detection

^y Highest compound

3. 생강나무 잎차 및 천연혼합음료개발 및 기호도 조사

가. 건조방법 별 생강나무 잎차 개발

(1) 연구목적

생강나무 잎차를 음용하기 위한 최적의 잎차 제조방법 규명이 필요하다. 여러 가지 방법으로 제조한 생강나무 잎차의 선호도를 확인하고, 높은 선호도를 갖는 잎차 선발을 위해 본 실험을 실시하였다.

(2) 연구방법

생강나무 잎차를 제조하기 위해 생강나무 잎을 잘 수세한 후 물기를 제거하여 시료로 이용하였다. 잎차는 열풍건조방법, 동결건조방법, 찌 후 볶음방법 3가지 방법으로 제조하였다(Fig. 31).^{43,50,51)} 열풍건조방법은 80℃의 열풍 건조기에서 1시간에 1회 뒤집으면서 10시간동안 열풍 건조하여 제조하였다. 동결건조방법은 생강나무 잎을 동결건조기에서 48시간 동안 동결건조한 후 hotplate를 이용하여 160℃에서 10분 간 볶아 제조하였다. 찌 후 볶음 방법은 찌기를 이용하여 100℃에서 1분간 찌 생강나무 잎을 hotplate를 이용하여 200℃에서 10분간 1차 볶음 처리하여 5분간 유념하고 다시 150℃에서 10분간 2차 볶음 처리하여 5분간 유념하였다. 그 후 100℃에서 20분간 3차 볶음 처리하여 5분간 유념한 후 80℃에서 40분간 열풍 건조하여 제조하였다.

각 방법으로 제조한 시료 1g에 80℃의 생수 200ml를 가한 후 2분간 우려내어 색, 향, 맛, 전체적 선호도에 대한 관능검사를 실시하였다. 관능검사는 10점 기호척도법으로 평가하였으며 검사요원은 대학원생 17명으로 구성하였다.^{52,53)}



Fig. 31. *Lindera obtusiloba* Bl. leaf teas prepared by various process.

(3) 연구결과

각 방법으로 제조한 생강나무 잎차를 색, 향, 맛 및 전체적 선호도에 대한 관능검사를 실시한 결과는 Table 25와 같다. 향과 맛은 열풍건조방법으로 제조한 생강나무잎차에서 높은 선호도를 보이고, 색은 동결건조 방법으로 제조한 생강나무잎차에서 높은 선호도를 보였으나 큰 유의성은 보이지 않았다(Fig. 32). 그러나 전체적인 선호도에서는 차이를 보였는데 향과 맛에서 높은 점수를 보인 열풍건조방법이 전체적인 선호도에서 가장 높은 선호도를 보이고, 색에서 높은 점수를 보인 동결건조방법이 그 다음의 선호도를 보였다.

Table 25. Sensory evaluation of *Lindera obtusiloba* leaf teas prepared by various process.

Drying method	Flavor	Taste	Color	Total palatability
Oven dry	5.15±2.09 ^a	5.59±2.29 ^a	4.44±1.84 ^a	5.62±2.21 ^a
Roasted tea after steaming	4.35±1.67 ^a	4.48±1.52 ^a	4.59±1.91 ^a	4.15±1.54 ^b
Freeze dry	3.99±1.96 ^a	4.33±1.79 ^a	5.64±1.49 ^a	4.50±1.54 ^{ab}

Means with the same letter are not significantly different in a column($p < 0.05$)

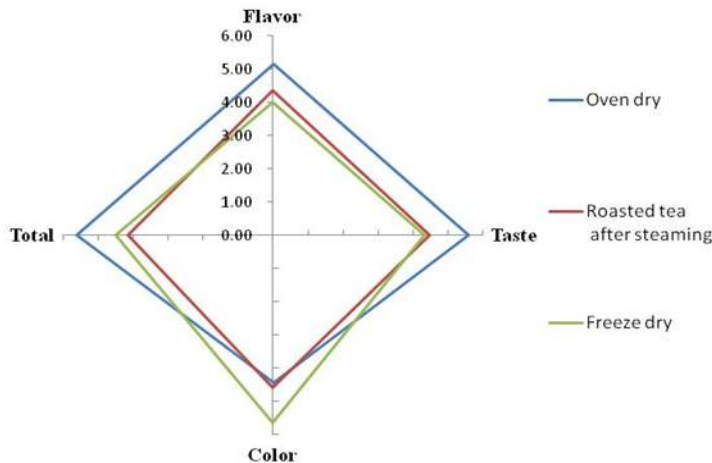


Fig. 32. Sensory evaluation of *Lindera obtusiloba* leaf teas prepared by various process.

선호도에 영향을 미치는 요인을 알아보기 위하여 각 제조방법별 생강나무잎차의 강도를 조사하였다(Table 26). 향의 경우 구수한 향은 제조방법별로 큰 차이가 없었으나 꽃내의 경우 볶음 처리를 한 열풍건조방법과 찢 후 덩어리 방법에서 꽃내의 강도가 낮은 반면에 동결건조방법은 다른 제조방법과 달리 유의적으로 높은 점수를 보였다(Fig. 33). 다른 제조방법은 건조되며 열을 접하지만 동결건조방법의 경우 건조 중에 열을 접하지 않고 저온상태에서 건조되기 때문에 가열로 인한 성분 변화의 폭이 적기 때문인 것을 판단된다. 맛의 경우도 구수한 맛의 경우는 유의적인 차이를 보이지 않았으나 떫은 맛의 경우 열풍건조방법이 다른 제조방법에 비해 유의적으로 낮은 강도를 보였다(Fig. 34). 색의 경우에는 동결건조방법이 다른 방법에 비해 색의 강도

가 높았으나(Table 26, Fig. 35), 색의 진한 정도가 개인의 선호도에는 영향을 미치지 못하는 것으로 판단된다. 이러한 결과로 볼 때 생강나무잎차의 음용에 적절한 제조방법은 열풍건조방법이라고 판단 할 수 있었다.

Table 26. Intensity evaluation of *Lindera obtusiloba* leaf teas prepared by various process.

Drying method	Flavor		Taste		Color
	Grassy	Sweet	Astringency	Sweet	
Oven dry	4.47±2.46 ^b	3.62±1.68 ^a	1.84±2.15 ^b	4.59±2.15 ^a	2.79±1.57 ^b
Roasted tea after steaming	4.03±2.48 ^b	3.86±2.21 ^a	4.16±2.32 ^a	3.75±2.08 ^a	3.66±1.59 ^b
Freeze dry	6.73±1.94 ^a	3.51±2.13 ^a	5.39±2.06 ^a	4.45±2.41 ^a	5.95±1.57 ^a

Means with the same letter are not significantly different in a column($p < 0.05$)

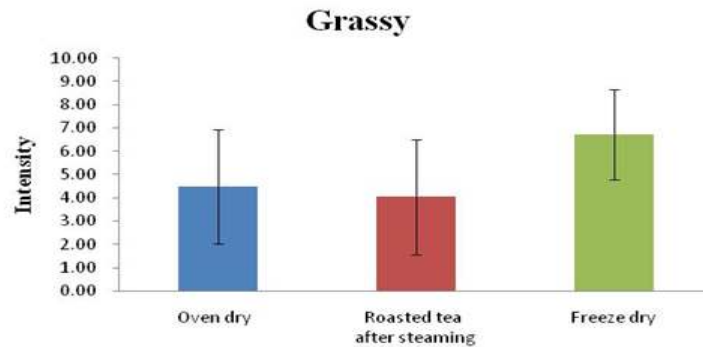


Fig. 33. Grassy intensity evaluation of *Lindera obtusiloba* leaf teas prepared by various process.

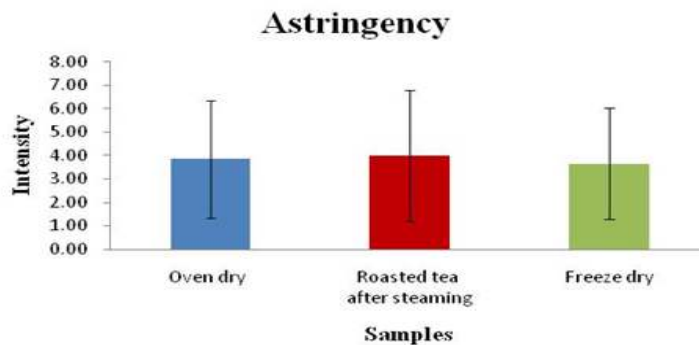


Fig. 34. Astringency intensity evaluation of *Lindera obtusiloba* leaf teas prepared by various process.

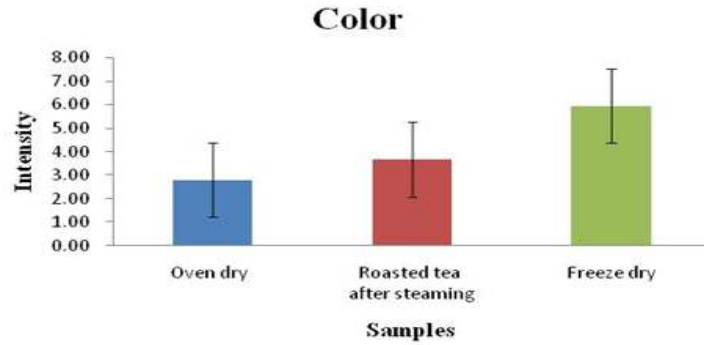


Fig. 35. Color intensity evaluation of *Lindera obtusiloba* leaf teas prepared by various process.

나. 건조방법 별 생강나무 꽃차 개발

(1) 연구목적

최근에 다양한 꽃차가 보급되고 있어 생강나무 꽃차 생산을 위해서는 최적 꽃차 제조방법 규명이 필요하다. 따라서 여러 가지 방법으로 제조한 생강나무 잎차의 선호도를 확인하고, 높은 선호도를 갖는 잎차 선발은 산업화를 위해서 필수적인 바 제조방법에 따른 꽃차 생산 실험을 실시했다.

(2) 연구방법

생강나무 꽃차를 제조하기 위해 생강나무 꽃을 잘 수세한 후 물기를 제거하여 시료로 이용하였다. 꽃차는 열풍건조방법, 동결건조방법, 찜 방법 3가지 방법으로 제조하였다(Fig. 36). 열풍건조방법은 80℃의 열풍 건조기에서 1시간에 1회 뒤집으면서 10시간동안 열풍 건조하여 제조하였다. 동결건조방법은 생강나무 꽃을 동결건조기에서 48시간 동안 동결건조한 후 hotplate를 이용하여 160℃에서 10분 간 볶아 제조하였다. 찜 방법은 찜기를 이용하여 100℃에서 1분간 찜 생강나무 꽃을 음지에서 건조시켜 제조하였다.

각 방법으로 제조한 시료 0.5g에 80℃의 생수 200ml를 가한 후 2분간 우려내어 색, 향, 맛, 전체적 선호도에 대한 관능검사를 실시하였다. 관능검사는 10점 기호척도법으로 평가하였으며 검사요원은 대학원생 17명으로 구성하였다.



Fig. 36. *Lindera obtusiloba* flower teas prepared by various process.

(3) 연구결과

각 방법으로 제조한 생강나무 꽃차를 색, 향, 맛 및 전체적 선호도에 대한 관능검사를 실시한 결과는 Table 27과 같다.

찜 방법으로 제조한 생강나무꽃차가 색을 제외한 향, 맛, 전체적 선호도에서 가장 높은 선호도를 나타냈지만 유의차는 크게 나타나지 않았다. 그러나 향의 경우에 있어서 각 방법에서 유의적인 차이를 보였는데 찜 방법에서 가장 높은 선호도를 보이고 다음이 동결건조, 가장 낮은 선호도를 보인 것이 열풍건조방법이었다. 선호도에 미치는 영향을 보기위해 강도에 대한 관능검사를 실시하였다(Table 28). 향에서 높은 선호도를 보인 찜 방법의 경우 유의적으로 큰 차이를 보이지는 않았지만 꽃내의 경우 강도가 낮을수록, 구수한 향의 경우 강도가 높을수록 향에 대한 선호도 또한 높게 나타나는 것으로 판단된다(Fig. 37). 이러한 결과를 토대로 생강나무꽃차의 음용에 적절한 제조방법은 열풍건조방법이라고 판단할 수 있다.

Table 27. Sensory evaluation of *Lindera obtusiloba* flower teas prepared by various process.

Drying method	Flavor	Taste	Color	Total palatability
Oven dry	4.78±1.44 ^b	5.01±2.51 ^a	6.29±2.61 ^a	4.96±2.10 ^a
Freeze dry	5.23±2.84 ^{ab}	5.00±2.78 ^a	6.79±2.19 ^a	5.43±2.60 ^a
Steam	6.42±1.77^a	5.66±2.35 ^a	6.78±2.00 ^a	6.00±2.18 ^a

Means with the same letter are not significantly different in a column(p<0.05)

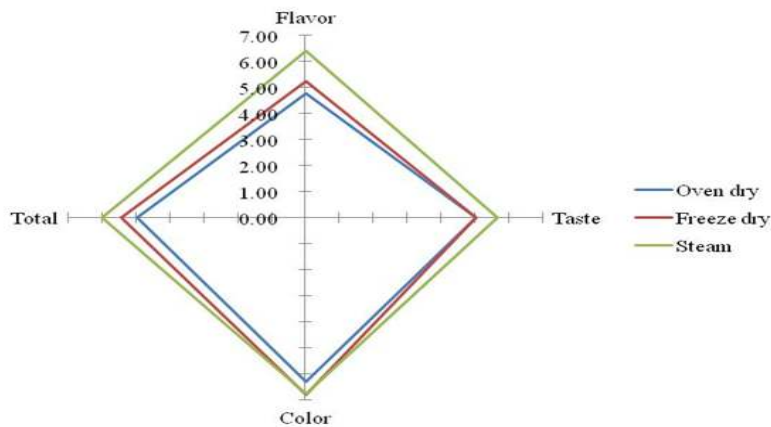


Fig. 37. Sensory evaluation of *Lindera obtusiloba* flower teas prepared by various process.

Table 28. Intensity evaluation of *Lindera obtusiloba* flower teas prepared by various process.

Drying method	Flavor		Taste		Color
	Grassy	Sweet	Astringency	Sweet	
Oven dry	3.61±2.35 ^a	4.15±2.62 ^a	3.85±2.52 ^a	4.32±2.82 ^a	6.38±2.12 ^a
Freeze dry	4.65±3.00 ^a	4.98±3.02 ^a	4.00±2.79 ^a	4.68±3.14 ^a	7.05±1.68 ^a
Steam	3.74±2.39 ^a	5.09±2.86 ^a	3.66±2.37 ^a	5.16±2.89 ^a	6.62±1.80 ^a

Means with the same letter are not significantly different in a column($p<0.05$)

다. 천연혼합음료 개발

(1) 연구목적

생강나무 잎차를 단용으로 할 경우에 선호도가 낮게 나타나 잎차의 맛과 향 색 등의 개선을 목적으로 생강나무 잎차 추출액에 한국인이 가장 선호하는 허브인 로즈매리 추출액을 첨가하여 기호성이 향상된 음료형태의 혼합음료를 개발하기 위해 본 실험을 실시하였다.⁵⁴⁾

(2) 연구방법

열풍건조방법으로 제조한 생강나무 잎차 10g을 추출기(HD7400, Philips Electric Co, China)에 넣고 500ml의 90℃ 열수를 100ml/min의 속도로 분사하여 추출하는 회분식 추출을 시행하였으며, 총 5회 추출하였다.⁵⁵⁾ 회수한 추출액은 생강나무잎차추출액(LTE : *Lindera obtusiloba* leaf tea extract)으로 칭하였다. 로즈매리도 동일한 방식으로 10g을 추출기에 넣고 추출하였으며, 총 5회 추출하였다. 회수한 추출액은 로즈매리차 추출액(RTE : rosemary tea extract)으로 칭하였다.

추출액의 색택과 가용성 고형분 함량을 확인하기 위해 LTE와 RTE의 색을 microplate spectrophotometer(PowerWaveXS, Bio-Tek)를 사용하여 흡광도를 측정하였다. 가용성 고형분 함량은 추출액을 105℃에서 건조하여 잔류물의 양으로부터 계산하였다.⁵⁶⁾

LTE와 RTE를 다양한 비율로 희석하여 혼합음료를 제조한 후 향, 색, 맛, 전체적 기호도에 관능검사를 실시하였다.⁵³⁾

(3) 연구결과

생강나무잎차를 추출 횟수를 달리하여 추출한 후 색택을 비교하기 위해 최대 흡수파장으로 확인된 670nm에서 흡광도를 측정하였다. 생강나무잎차 추출액의 흡광도는 Fig. 38과 같이 생강나무잎차를 1차로 추출한 추출액은 0.032값을 나타내었고 2차 추출액은 0.015값 나타내었는데, 이는 1차 추출액의 50%에 불과하다. 가용성 고형분 함량은 1차 추출액과 2차 추출액의 경우 큰 차이를 보였으나 2차 이후에는 그 차이가 미약하여 1차 추출에 의해 대부분의 가용성 고형분이 추출되는 것을 알 수 있다(Fig 39~40). 따라서 생강나무 잎차의 추출은 1차 추출이 적당한 것으로 판단되어 이후 실험에서는 1차 추출로 LTE를 제조하였다.

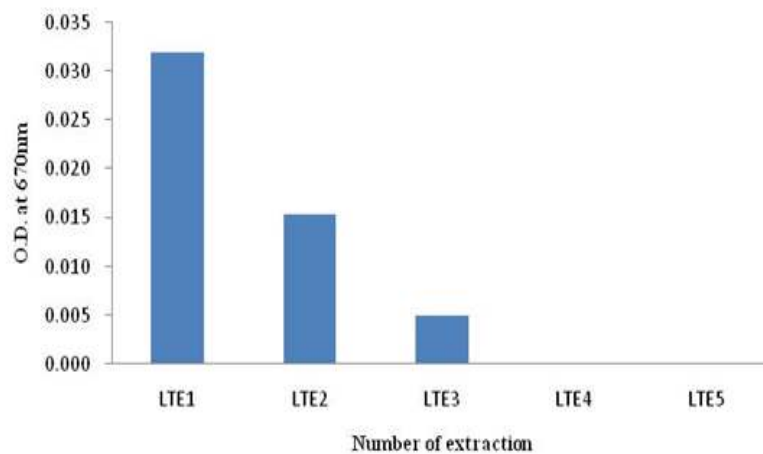


Fig. 38. Effect of number of *Lindera obtusiloba* leaf tea on absorbance of hot water extract.

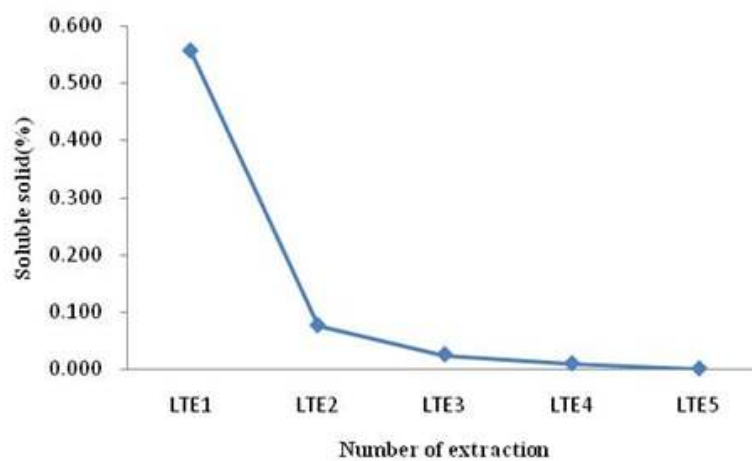


Fig. 39. Effect of number of *Lindera obtusiloba* leaf tea on soluble solid of hot water extract.



Fig. 40. Comparison of color of *Lindera obtusiloba* leaf tea extract.
(LTE 1 : first extract, LTE 5: last extract)

로즈매리 추출물의 경우도 생강나무잎차 추출액과 유사한 양상을 나타내었다(Fig. 41). 1차 추출한 추출액의 흡광도는 0.017을 나타내었고 2차는 0.011, 3차부터는 0.003이하를 나타내었다. 가용성 고형분의 함량은 1차 0.16g, 2차에 0.15g, 3차에 0.09g로 1차와 2차 추출시 대부분의 가용성 고형분이 추출되는 것으로 나타났다(Fig 42~43.) 흡광도와 가용성 고형분 함량을 볼 때 로즈매리차 추출물 또한 1차 추출물이 적절한 것으로 판단되어 이후 실험에서는 1차 추출로 RTE를 제조하였다.

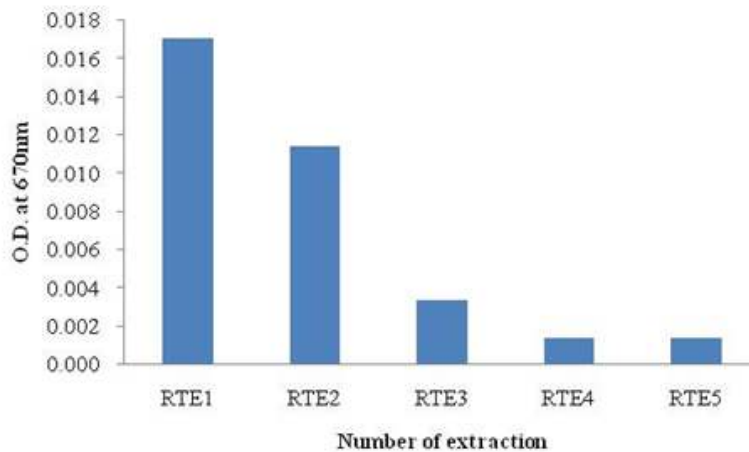


Fig. 40. Effect of number of rosemary tea on absorbance of hot water extract.

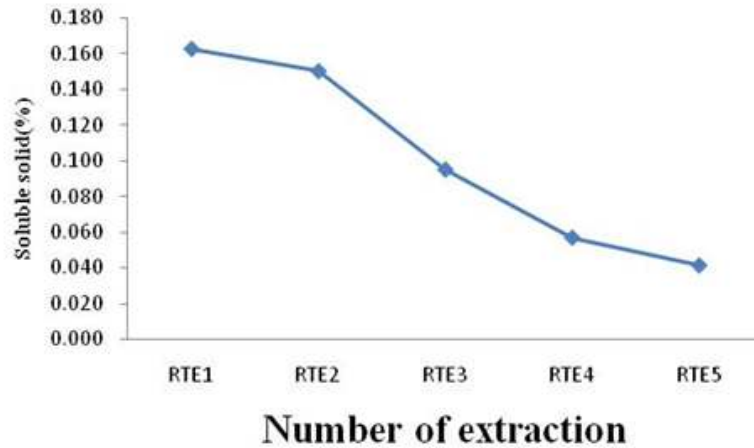


Fig. 41. Effect of number of rosemary tea on soluble solid of hot water extract.

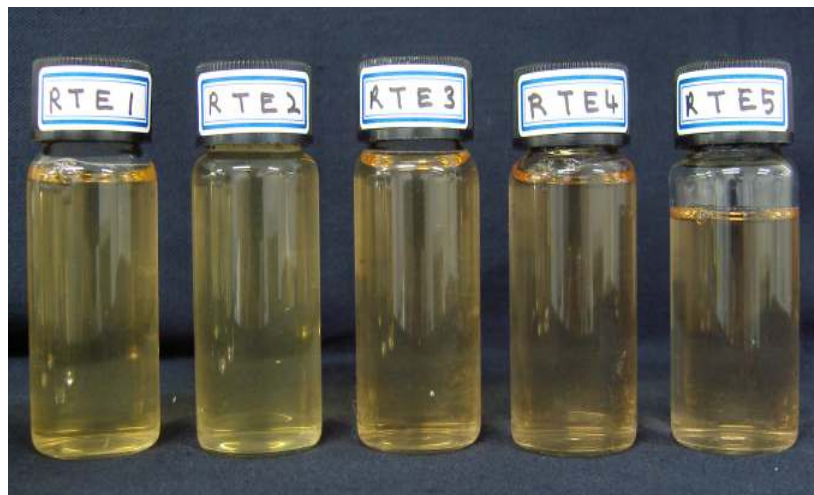


Fig. 42. Comparison of color of *Lindera obtusiloba* leaf tea extract. (RTE 1 : first extract, RTE 5 : last extract)

LTE와 RTE의 1차 추출물을 비율을 달리하여 혼합하고 음용에 적합한 농도가 되도록 2배 희석하여 생강나무 로즈매리 혼합음료를 제조하였다. 제조한 혼합음료를 가지고 향, 맛, 색 및 전체적 선호도에 대한 관능검사를 실시한 결과는 Table 29와 같다. LTE:RTE의 비율이 50:50(v:v)일 때 색과, 전체적 기호도에서 유의적인 차이를 보이지 않았으나 가장 높은 점수를 얻었고, 향에서는 6.67로 유의한 차이를 보이며 가장 높은 점수를 얻었다. 맛의 경우는 75:25(v:v)일 때 6.33으로 가장 높은 점수를 얻었으나 유의적인 차이를 보이지는 않았다.

이러한 결과는 로즈매리차 추출물이 증가함에 따라 향과 색의 기호도가 높아져 50:50(v:v)에서 가장 높은 점수를 보이다가 생강나무잎차 추출물과 로즈매리차 추출물의 비율이 그 이상을 넘어가게 되면 관능품질이 저하되는 것으로 보인다(Fig 43). 따라서 생강나무 로즈매리 혼합음료는 LTE:RTE의 비율이 50:50(v:v)일 때가 가장 적절한 것으로 판단된다.

Table 29. Sensory evaluation of *Lindera obtusiloba* leaf/rosemary tea beverage with different mixing ratios.

LTE:RTE(v:v) ^z	Flavor	Taste	Color	Total palatability
100:0	5.75 ^{ab}	5.25 ^a	6.08 ^a	5.50 ^a
75:25	6.25 ^{ab}	6.33 ^a	6.42 ^a	5.83 ^a
50:50	6.67 ^a	5.92 ^a	7.00 ^a	6.33 ^a
25:75	6.17 ^{ab}	5.75 ^a	6.67 ^a	5.92 ^a
0:100	5.27 ^b	4.53 ^a	4.80 ^a	4.67 ^b

^zMean LTE : *Lindera obtusiloba* leaf tea extract, RTE : Rosemary tea extract
Means with the same letter are not significantly different in a column(p<0.05)

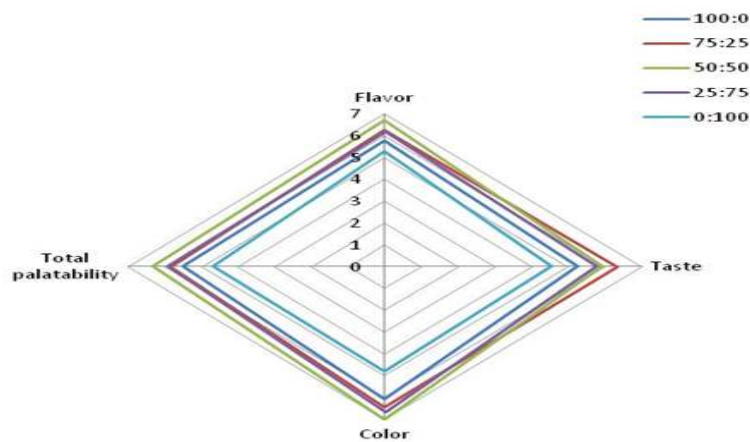


Fig. 43. Sensory evaluation of *Lindera obtusiloba* leaf/rosemary tea beverage with different mixing ratios.

라. 시중 판매 생강차와의 비교연구

(1) 연구목적

열풍건조방법으로 제조된 생강나무 잎차의 기호도와 경제성을 파악하기 위해 같은 방향성 성분을 함유하고 있는 생강차와 생강나무잎차의 기호도를 조사하고자 본 실험을 실시하였다.⁹⁾

(2) 연구방법

열풍건조방법으로 제조한 생강나무 잎차와 시중에서 유통되는 신선한 생강을 구입하여 세절한 다음 냉동 건조로 제조한 생강차, 시중에서 판매되는 제품화된 생강차(뉴 생강차, 국제식품)를 가지고 관능검사를 실시하였다.

생강나무 잎차 1g에 80℃의 물 100ml를 가한 후 2분간 우려내었고, 생강차는 동결건조기에서 24시간 동결건조 시킨 후 분쇄하였고, 분쇄된 시료 1g에 80℃의 물 100ml를 가한 후 잘 저어주었다. 제품화되어 판매생강차는 기재된 음용방법에 따라 한 포(15g)에 80℃의 물 100ml를 가한 후 잘 저어준 다음 색, 향, 맛, 전체적 선호도에 대한 관능검사를 실시하였다. 관능검사는 9점 기호척도법으로 평가하였으며 검사요원은 대학원생 17명으로 구성하였다.

(3) 연구결과

생강나무 잎차, 생강차, 제품화된 판매생강차를 색, 향, 맛 및 전체적 선호도에 대하여 관능검사를 실시한 결과 Table 30과 같다. 향의 경우 생강차가 6.67로 가장 높은 선호도를 보였으나 유의적인 차이는 보이지 않았다. 색의 경우에는 생강나무 잎차가 6.75로 유의적으로 가장 높은 선호도를 보였다. 맛과 전체적 선호도의 경우, 판매생강차가 가장 높은 선호도를 보였으나 생강나무 잎차와 유의적인 차이를 보이지 않았고, 생강차는 다른 차에 비해 유의적으로 낮은 선호도를 나타내었다(Fig 44). 관능검사를 통해 생강나무 잎차의 기호도가 시중에서 판매되는 생강차와 비교하여 유의차를 보이지 않으므로, 제품화되어 판매할 경우 경제성이 있을 것으로 판단되었다.

이와 같이 제품화된 차와 차이가 없었던 것은 다양한 재료(잣, 대추)가 오히려 맛을 떨어뜨린 결과로 생각된다.

Table 30. Sensory evaluation of *Lindera obtusiloba* leaf tea, ginger tea and ginger tea product.

Samples	Flavor	Taste	Color	Total palatability
<i>Lindera obtusiloba</i> Leaf tea ^z	6.25 a ^w	5.75 a	6.75 a	5.92 a
Ginger tea ^y	6.67 a	3.58 b	5.42 b	4.33 b
Ginger tea product ^x	6.08 a	5.92 a	5.17 b	6.00 a

^z Leaf tea made hot air drying method

^y Powder using freeze drying method with fresh ginger

^x Manufactured ginger tea mixed with different materials(pinus fruits and cutted jujuwe)

^w Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at $P=0.05$

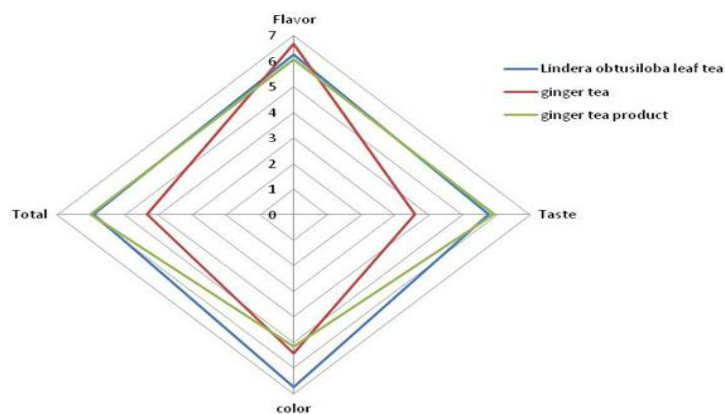


Fig. 44. Sensory evaluation of *Lindera obtusiloba* leaf tea, ginger tea and ginger tea product.

마. 적요

(1) 생강나무 채취량

생강나무의 서식지를 조사한 결과 일반적으로 경사가 심한 계곡과 골을 형성했던 곳을 중심으로 이루어져 있었으며, 주로 산에 높은 곳에 자생하는 식물이다. 또한 생강나무의 형태적 특징을 살펴보면 수고의 평균이 3~5m 정도로 교목이다.

생강나무 채취량은 시간당 채취량을 조사를 하였다. 조사한 결과 성인 1인이 1시간에 채취할 수 있는 양은 꽃은 350~450g, 잎은 1kg 이상이다. 이와 같은 결과로 성인 1인이 1일 8시간을 채취를 하였을 경우 꽃은 2.5kg ~ 3.0kg, 잎은 10kg ~ 11kg 만큼 채취를 할 수 있을 것이다 (Table. 31.). 하지만 이 측정량은 생강나무의 수고가 낮은 나무(1m~2m정도)와 높은 나무(2m 이상)의 아랫부분을 주로 채취한 결과로서 지역에 따라 수고의 높이가 채취량이 다른 양상을 보였다. 특히 생강나무 자생군락지의 일부 지역에서 채취한 결과로서 꽃과 잎의 채취량이 달라질 수 있을 것이며, 또한 식물보호차원에서 많은 양의 채취는 식물의 생육을 억제시켜 다음해 채취량에 영향을 미칠 것이라고 판단된다.

이러한 사항들을 고려해 볼 때 생강나무의 집단적 재배를 통해서 대량생산이 가능하면 기능성 식품으로 개발 할 수 있을 것이라고 판단된다.

Table 31. Harvesting amount of flower and leaf.

Standard	Flower	Leaf
1 Person / 1 day(8hr.)	2.5kg ~ 3.0kg	10kg ~ 11kg
2 Person / 1 day(8hr.)	5.0kg ~ 5.5kg	21kg ~ 22kg
3 Person / 1 day(8hr.)	7.5kg ~ 8.0kg	32kg ~ 33kg

(2) 원료 보관 방법

일반적으로 농가에서 채취하여 보관을 하였을 시 가장 문제가 되는 점이 어떻게 보관을 하는가에 대한 것이다. 잎의 저장 및 건조 실험을 하였을 경우 MA저장에서는 저온(5℃)에서 PE 60μm, 건조의 경우 동결건조가 최적 조건으로 구명하였다.

이러한 결과를 통해 채취 후 보관을 저온저장고, 열풍건조기, 및 동결건조기 등을 이용하여 처리하는게 가장 효과적이라고 볼 수 있다. 하지만 일반 농가에서는 대단위의 시설들이 미비하거나 없는 실정이다.

대단위 저온저장고, 동결건조기 및 진공건조기 시설물의 경우 설치비의 문제점을 가지고 있다. 하지만 일반적으로 보급형으로 나와있는 열풍건조기는 농가에서는 많이 보유하고 있다 (Table. 32.).

Table 32. Drying machine of hot pepper supplied in farmer.

	H Company	HY Company	D Company	DY Company
Size	1190*950*1900	1130*2180*1875	745*1040*2100	1395*2900*2275
Electricity	6Kw/h	8.31Kw/h	2.5Kw/h	425.6Kw/h
Dry hour	33 hour	1~2day	-	-
Drying amount	-	150~260kg	150~170kg	312~520kg
Method	Hot air circulation	Hot air	Inner hot air circulation	Air press injection /pressed air innet
Applied crop	Agri. product medicinal plant	Agri. product medicinal plant	Agri. product medicinal plant	Agri. product medicinal plant

설치비 가격을 조사한 결과 열풍건조기(100kg용)의 경우 1,500,000원으로 가장 저렴하였고, 저온저장고(3평 기준)는 5,000,000원, 진공건조기(500kg용) 120,000, 000원, 동결건조기(500kg용) 250,000,000원 순으로 조사되었다.

종합적으로 생강나무의 잎의 기능성 식품에 따른 이용 형태에 따라서 보관방식이 달라질 수 있다. 이용 형태가 차(tea)의 경우 소비자 선호도 조사 시험에서 열풍건조 후 제조한 제품에서 높은 기호도가 나타났다. 이 결과로 볼 때 채취 후 저렴한 열풍건조기에 처리 후 비닐백 등에 넣어서 보관을 하는 좋을 것으로 판단된다.

쌈용으로 판매되는 생잎은 저온저장고에 단기간 보관한 후 MA저장을 실시하여 유통해도 될 것이라고 판단된다. MA저장시는 현재 시중에 유통되는 1bag(크기에 따라 20, 50, 100g 등)단위로 하는 것이 좋다고 본다.

현재로서 생강나무의 대단위 재배가 이루어져 있지 않고 있으며, 또한 많은 양의 잎을 채취할 수 없는 실정이다. 이러하기 때문에 소단위로 하였을 경우에는 음건하거나 농가에 설치된 열풍건조기를 사용하고 과수나 채소 등의 저온저장고를 이용하여 할 수 있지만 산업화가 이루어질 경우에는 품질의 향상을 위해서 동결건조 등을 이용 단시간 원료를 처리하는 대단위 시설물들이 있어야 할 것으로 판단된다.

제 2 절: 제2세부 생강나무 추출물을 이용한 기능성 · 안전성 검증, 생리활성 물질의 정제 및 구조분석

(고려대 이광원 교수팀)

1. 생강나무의 용매별 추출분리 조건 확립 및 *in vitro* 기능성 평가

가. 검색연구를 위한 생강나무 활성성분 추출물 시료제조

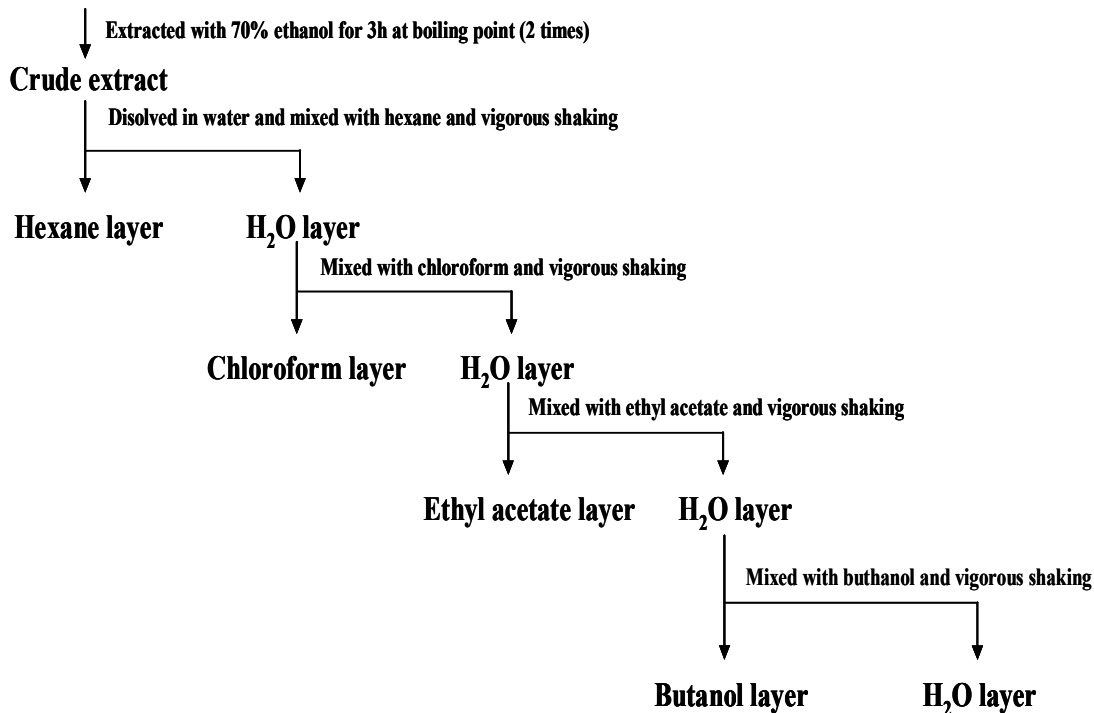
(1) 연구 목적

국내 자생하는 생강나무의 경우는 많은 성분을 함유하고 있기 때문에 이를 극성에 따라 분리시키고, 분리된 활성 화분은 차후 활성검색 연구에 쓰인다.

(2) 연구 방법

동결건조된 생강나무엽(*Lindera obtusiloba blume* leaves, LOBLs)을 분쇄하여 70 % 에탄올에서 3시간 동안 환류 냉각 추출 후, 추출물은 원심분리(7000 rpm, 30 min, 4 °C) 한 후 재차 상등액을 whatman No. 42 여과하였다. Filtering 된 상등액을 감압증류한 다음 동결건조를 하여 70 % 에탄올 추출물을 얻었다. 70 % 에탄올 추출물을 물에 녹인 뒤 순차적으로 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올 화분으로 극성에 따라 일차적 분리를 하였다⁵⁷⁾.

Lindera obtusiloba Blume



Scheme 1. The separation and purification steps of LOBLs.

(3) 연구 결과

생강나무 잎 70 % 에탄올 추출물 100.0 g 을 2 L의 물에 녹인 뒤 헥산 2 L와 섞어서 격렬하게 흔든 다음 층 분리가 일어나도록 3~4 시간 정치 시켜서 헥산층만을 얻었다. 이와 같은 과정을 3, 4번 반복하여 70 % 에탄올 추출물에서 헥산 층으로 옮겨 갈수 있는 물질들을 완벽하게 분리시킨 뒤 남은 물 층에 대하여 헥산 층과 같은 방법으로 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올 등으로 순차적으로 극성별로 70 % 에탄올 추출물을 1차적 분리를 하였다. 그에 대한 수율은 table 33와 같다.

수율은 헥산 층(27.3 g), 물 층(27.0 g), 부탄올 층(16.4 g), 에틸아세테이트 층(10.0 g), 클로로포름 층(0.9 g) 순으로 높았다.

Table 33. Yields of layer in the separation by different steps of organic solvent based on LOBLs's 70 % EtOH extract.

Refining step	Yield of total soluble (% , w/w)*
Hexane layer	27.3
Chloroform layer	0.9
Ethyl acetate layer	10.0
Buthanol layer	16.43
Water layer	27.0

*: yield of total soluble extracted from LOBLs's 70 % ethanolic extract by the solvents.

나. 생강나무 추출물의 간기능 보호(*in vitro*) 기능성 검증

(1) 연구 목적

분리 된 획분 층에 대하여 어느 획분 층이 활성이 있는지를 검색하기 위하여 간기능 보호를 기초 실험으로 하여 활성 검색을 하며, 선택된 활성 층에 대해서는 여러 방법으로 간기능 보호 효과를 검증한다.

(2) 연구 방법

(가) 간으로부터 간세포의 분리

Rat의 간으로부터 hepatocyte의 분리는 2단계의 collagenase perfusion 방법으로 Bissel과 Bonny 등의 방법을 일부 변형하여 사용하였다⁵⁷⁻⁶⁰. Rat을 ketamine hydrochloride와 xylazine hydrochloride(1:2)의 혼합액으로 마취시킨 후 perfusion medium(25 mM Na₂HPO₄, 3 mM KCl, 120mM NaCl, 11 mM glucose, 5 mg/L phenol red, 10% BSA) 200 ml을 20 ml/min의 유속으로 간 문맥에 약 7분간 관류시키고, 0.05% Type I collagenase, 4 mM CaCl₂, 5 mg trypsin inhibitor의 pH 7.5 perfusion medium을 15 ml/min분의 유속으로 7분 30초 동안 처리하였다. Collagenase의 작용이 끝난 간을 쥐로부터 분리한 후, nylon mesh를 이용하여 washing medium(L-15 medium, 18 mM HEPES, 0.2% BSA, 0.05% glucose, 5 µg/ml insulin)으로 분리, 세척한다(Alpini G *et al*, 1994). 세포 현탁액을 원심분리(500 rpm, 3 min.)하여 상

등액은 제거하고 cell pellet에 Percoll 용액을 처리한 후 0.4% trypan blue와 세포현탁액을 희석하여 세포수를 계산한다. 37°C incubator에서 세포가 collagen coating된 배양 용기 표면에 부착하도록 4시간 배양 후 plating media를 취하여 20시간 후, 각각의 시료를 처리한다.

Cell density는 24 well에 1.8×10^5 cells/well, 100 mm²은 5.0×10^6 cells/well을 원칙으로 한다.

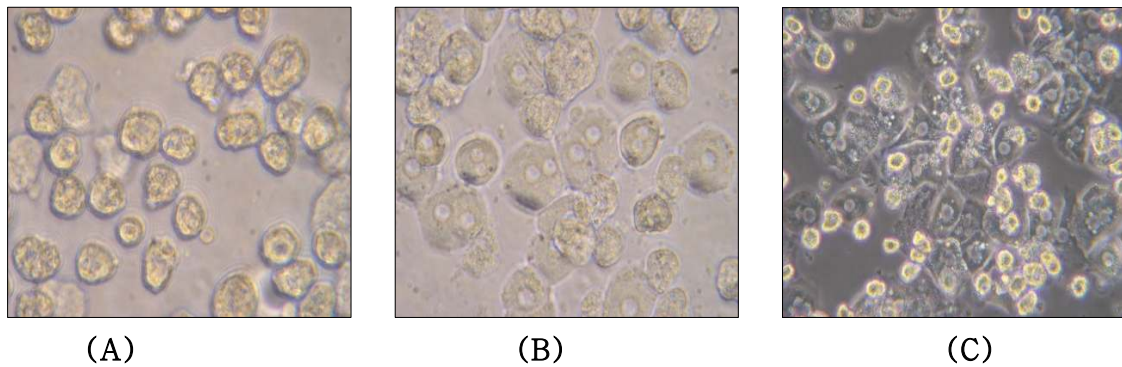


Fig. 45. Primary cultured hepatocytes from Sprague-Dawley rats.

(A) right after seeding, (B) 4hr after seeding, (C) 24hr after seeding (40X)

(나) 세포 생존율 측정

MTT assay는 노란색의 가용성 tetrazolium염이 살아있는 세포의 미토콘드리아에 의해 파란색의 불용성 formazan 생성물로 환원되는 원리를 이용한 실험이다. 따라서 살아있고 대사적으로도 왕성한 세포의 농도를 흡광도 값으로 반영하여 세포 생존율을 측정할 수 있다.

20시간 후에 배양 용기 표면에 부착된 hepatocytes를 대조군, 1.5 mM *t*-BHP만 처리한 실험군 또는 생강나무 잎의 70% 에탄올 추출물과 각 희분층(15.6 µg/ml ~ 1000 µg/ml)을 처리 후 1.5 mM *t*-BHP를 처리한 실험군으로 나누어 37°C incubator에서 30분 처리 후 Morten 등에 의한 방법을 일부 변형하여 MTT assay를 하였다⁵⁷⁾. 즉, L-15 HEPES medium에 5mg/mL MTT용액을 40 µl 넣고 37°C에서 3시간 처리 후 자주색을 띠는 비수용성의 MTT formazan으로 환원시킨 것에 1 N HCl에 녹아있는 10% SDS 200 µl를 넣고 ELISA reader를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 처리군의 MTT값은 대조구를 100%로 기준하여 viability 감소로 표시하였다.

(다) DPPH radical 소거능 측정

생강나무 잎의 활성 성분 에틸아세테이트 층의 *in vitro* system에서 radical scavenging activity를 가지고 있는지를 알아보기 위해 수행한 실험이다. 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)용액은 ascorbic acid, tocopherol과 방향족 화합물 등에 의하여 환원되어 짙은 자색이 탈색됨으로서 항산화 물질의 수소 공여능을 측정한다. 생강나무잎 에틸아세테이트 층의 radical scavenging property는 Fenglin^{57), 62)} 등에 의한 방법으로 유리기인 DPPH에 대한 소거능을 실험하였다. 에탄올에 녹인 100 mM DPPH reagent 900 µl에 농도별 시료 100 µl를 넣고 잘 섞

어주고 어두운 상태로 30분간 보관한 후 517 nm에서 시간에 따른 흡광도의 변화를 측정하였다. 대조군으로 ascorbic acid를 사용하였다.

DPPH radical scavenging activity (IC_{50})

$$=100 - \left[\frac{\text{시료 첨가군의 흡광도}}{\text{시료 무첨가군의 흡광도}} \times 100 \right]$$

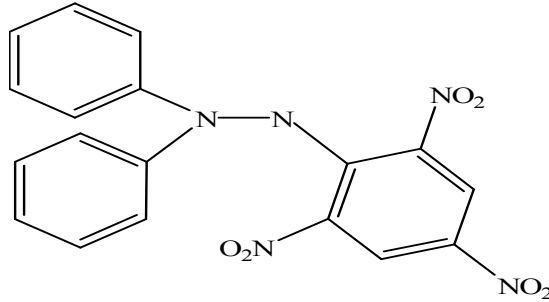


Fig. 46. The structure of DPPH..

(라) Ferric-reducing/antioxidant power assay 검색

Total antioxidant power를 측정하는 방법으로 낮은 pH에서 환원제에 의해서 Ferric - tripyridyltriazine 복합체가 Ferrous - tripyridyltriazine로 환원되는 방법으로 측정하였다⁵⁷⁾. FRAP reagent로서 40 mM HCl에 용해시킨 10 mM TPTZ 2.5 ml에 20 mM FeCl₃·6H₂O 2.5ml 과 pH 3.6의 0.3 M acetate buffer 25 ml을 가한다. 그 후 FRAP reagent 900μl에 증류수 60 μl를 넣고 농도별 에틸아세테이트 층 30 μl를 넣어 혼합한 것을 37°C에서 4분 경과 후에 595 nm에서 흡광도를 측정하고 표준 곡선으로 FeSO₄·7H₂O를 사용하여 산출하였다.

(마) Fe²⁺/ascorbate 유도 microsomes의 지질과산화억제 활성검색(Thiobarbituric acid reactive substances, TBARS)

이 방법은 지방의 산패가 진행됨에 따라 생성되는 carbonyl 화합물 중 malonaldehyde의 생성에 근거를 둔 것으로서 malonaldehyde는 두분자의 thiobarbituric acid와 한분자의 malonaldehyde가 반응하여 적자색의 복합체를 형성한다.

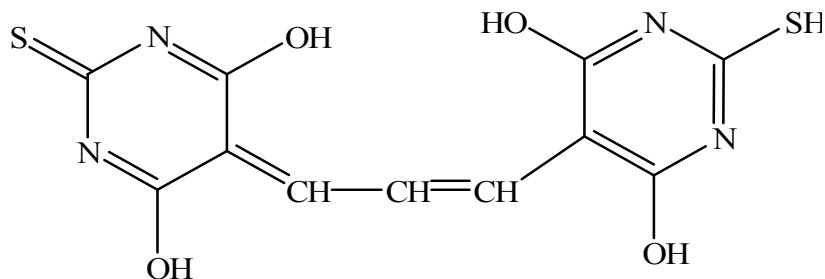


Fig. 47. The structure of TBA malonaldehyde complex.

2시간 배양 후 상등액은 측정시 까지 -20°C 에서 보관한다. Cell은 0.2% Triton X-100을 처리하고 TCA (trichloroacetic acid) buffer (0.25 N HCl, 15% trichloroacetic acid, 0.375% thiobarbituric acid, 0.01% butyl hydroxytoluene) 0.5ml을 첨가하여 상등액과 배양액을 합쳐서 95°C 수조에서 30분 동안 끓인 후 상온으로 식혀서 n-butanol을 넣고 격렬히 흔들어 준다. 원심분리(800 rpm, 10 min) 후 상층액은 excitation 515 nm와 emission 552 nm 에서 형광분석기를 이용하여 측정하였다. Thiobarbituric acid reactive substance (TBARs)는 1,1,3,3-tetraethoxypropane (TEP)의 산에 의한 가수분해로 얻어진 malondialdehyde (MDA) equivalent의 표준곡선을 작성한 다음, 이에 의거한 측정치를 MDA 농도(pmol / mg protein)로 표기하였다^{57), 63~64)}.

(3) 연구 결과

(가) 각 획분 층에 대한 활성 검사

각 획분 층의 활성 검사를 위하여 MTT assay를 실시하였다. 처리 group은 control과 *t*-BHP 1.5 mM, 생강나무의 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올, 물 층 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 과 *t*-BHP 1.5 mM 같이 처리한 group으로 나누어진다. *t*-BHP은 간 독성을 일으키는 물질이다. Fig. 48. 에서 보는바와 같이 세포 생존율은 에틸아세테이트 층이 가장 높았으며 비극성인 헥산 층이 가장 낮았다. 그래서 본 세부에서는 에틸아세테이트 층을 가지고 간 기능 보호 및 노화억제 유효성 검증 시료로 선택하였으며 세포 생존율의 크기는 에틸아세테이트, 부탄올, 클로로포름, 물, 헥산 층의 순으로 높았다.

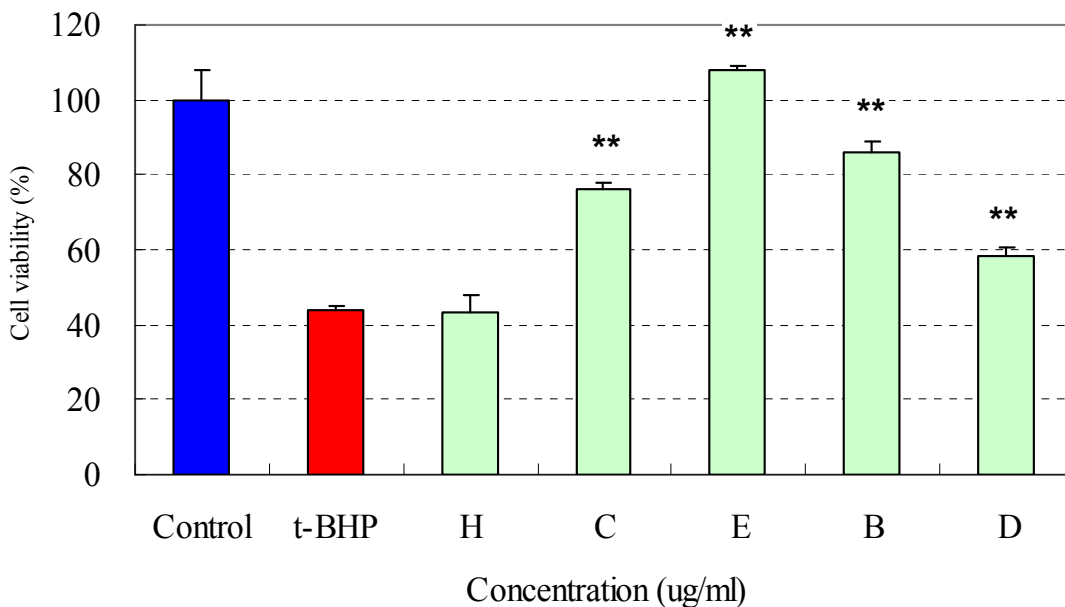


Fig. 48. Protective effects of each layer of LOBLs' 70% EtOH extract on *t*-BHP-induced oxidative stress in cultured rat hepatocytes.

Cells were treated with 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of each layer and 1.5 mM *t*-BHP for 30 min. Cell viability was determined by MTT assay. Results are expressed as mean \pm S.D. (n=3) ****P < 0.01**, compared with cell treated with *t*-BHP alone.

H, hexane layer; C, chloroform layer; E, ethyl acetate layer; B, *n*-butanol layer; W, water layer.

(나) DPPH radical 소거능 측정

생강나무 잎의 활성 층인 에틸아세테이트 층의 *in vitro* system에서 radical scavenging activity를 가지고 있는지를 알아보기 위해 수행한 실험에서 에틸아세테이트 층의 radical 소거능을 본 바 50% scavenging activity를 가지는 농도는 $4.21 \pm 0.09 \mu\text{g DM/ml}$ 이며, positive control로 쓰인 ascorbic acid는 $2.25 \pm 0.05 \mu\text{g DM/ml}$ 이다. 기존에 radical 소거능이 크다고 잘 알려진 ascorbic acid와 비교를 하였을 때 비슷한 값을 나타내는 것을 보아 radical 소거능이 큼을 알 수 있다.

Table 34. DPPH Radical Scavenging Activity Assay from LOBLs's EtOAc layer^a.

	DPPHEC ₅₀ ($\mu\text{g DM/ml}$) ^b
EtOAc layer	4.21 ± 0.09
Ascorbic acid	2.25 ± 0.05

^aEach value is mean \pm standard deviation of three replicate experiments. Results are expressed as mean \pm S.D. (n=3), ****P < 0.01.**

DM, dry matter.

^bAmount of sample necessary to decrease the initial DPPH concentration by 50%.

(다) Ferric-reducing/antioxidant power assay 검색

생강나무 에틸아세테이트 층의 FRAP assay에 의한 항산화력은 Table 35.과 같다. 전체 시료에 대한 FRAP 수치는 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 의 농도로 나타냈고 positive control로는 ascorbic acid를 사용하였다. Table 34.에서 보는 바와 같이 LOBLs's EtOAc layer의 FRAP 수치는 $2.45 \pm 0.01 \text{ mmol FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O/mg DM}$ 이고, 기존에 항산화 물질로 잘 알려져 있는 ascorbic acid는 $2.54 \pm 0.02 \text{ mmol FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O/mg DM}$ 을 나타내는 것을 보아 생강나무의 에틸아세테이트 층은 높은 항산화 활성이 있는 것을 확인 할 수 있었다.

Table 35. FRAP Assay from LOBLs's EtOAc layer^a.

	FRAP ($\text{mmol FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O/mg DM}$)
EtOAc layer	2.45 ± 0.01
Ascorbic acid	2.54 ± 0.02

^aEach value is mean \pm standard deviation of three replicate experiments. Results are expressed as mean \pm S.D. (n=3), ****P < 0.01.**

DM, dry matter.

(라) Fe²⁺/ascorbate 유도 microsomes의 지질과산화억제 활성검색(Thiobarbituric acid reactive substances, TBARs)

처리 group은 control과 *t*-BHP 1.5 mM, 생강나무의 에틸아세테이트 층 1000, 100, 10, 1 µg/ml과 *t*-BHP 1.5 mM 같이 처리한 group으로 나누어진다. *t*-BHP은 간 독성을 일으키는 물질이다. 실험 결과 *t*-BHP 1.5 mM 처리한 group은 control group보다 lipid peroxidation을 많이 일으켰다. 그리고 생강나무의 에틸아세테이트 층 1000, 100, 10 µg/ml을 *t*-BHP 1.5 mM와 같이 처리한 group에서 유의적 차이(***P* < 0.01, **P* < 0.05)를 보이며 MDA(Malondialdehyde) 생성을 감소시켰다. 특히 1000 µg/ml을 처리하였을 때는 control 대비 77.49 %, 100 µg/ml을 처리하였을 때는 control 대비 37.82 % 정도의 MDA 생성을 감소시킨다. 이를 결과를 토대로 우리는 생강나무 옆이 간 손상을 입었을 때 간 기능 보호를 하는 것을 알 수 있으며, 정상적인 생체대사 중에 생기는 지질과산화물 생성을 줄여주는 것을 알 수 있다.

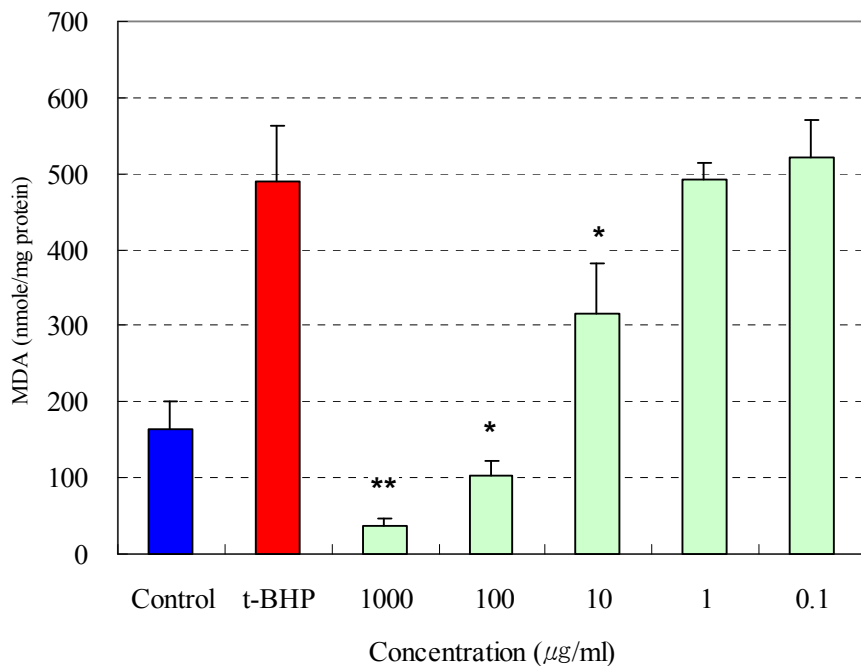


Fig. 49. Effect of LOBLs's EtOAc layer against oxidative stress induced by TBARS with 1.5 mM *t*-BHP for 30 min in primary cultured rat hepatocyte.

Values are expressed as mean ± SD (n=3), ***P* < 0.01, **P* < 0.05, compared with cell treated with *t*-BHP alone.

다. 생강나무 추출물의 항당뇨합병증 *in vitro* 유효성 검증

(1) 연구 목적

간기능 보호를 기초 실험으로 하여 활성이 검증된 에틸아세테이트 층에 대하여 항당뇨합병증 효과를 검증한다.

(2) 연구 방법

(가) 아마도리 화합물 및 AGEs 생성 억제 실험

1 mL 의 0.1 M phosphate buffer (pH7.4)에 5 mg의 BSA (bovine serum albumin), 25 mM ribose, 1 mM DTPA, 생강나무 에틸아세테이트 층 1000, 500, 100, 10 ug을 넣은 후, 37°C 배양기에 넣는다. 7일간 밀폐된 채로 반응시킨다^{65~66}).

(나) [¹⁴C]-lysine을 이용한 항당뇨합병증 glycation 저해 측정

① 단백질 crosslink assay 반응 혼합물의 제조

1 mL 의 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4)에 5 mg의 BSA (bovine serum albumin, fatty acid free), 2.5 mM threose, 1 mM DTPA, 2 μCi의 [¹⁴C]-lysine을 시험하고자 하는 물질에 넣고 0.2 μm 주사여과를 하여 2 mL의 살균 cryogenic vial 에 넣은 후, 37°C 배양기에 넣는다. 이들 vial은 7일간 밀폐된 채로 반응시킨다.

② 단백질 glycation- induced protein crosslinking 측정

반응 혼합물의 crosslinking 정도를 측정 하기 위하여 반응 혼합물 50 mL씩 채취하여 2.5cm 지름의 여과지 (Whatman international Ltd. England)에 각각 점착하여 여과지를 말린 후, 10% TCA (tricolate acetic acid)용액에 담아 1시간 이상 4°C에서 축적시켰다. 여과지를 다시 5% TCA (tricolate acetic acid)용액에 담아 15분 동안 실온에서 배양하였다. 30분 동안 여과지에 남아있는 RNA를 제거하기 위해 90°C 에서 배양시킨 후, 에테르 (ether)와 에탄올 (ethanol)을 2:3 비율로 30분 동안 실온에서 TCA와 지방을 제거하기 위해 다시 배양하였다. 최종적으로 15분 동안 알코올과 수분을 제거 하기 위해 에테르로 씻어주었다. 여과지를 말린 후 vial에 넣고 4 mL의 liquid scintillation counting cocktail solution (ICN, USA)를 함께 넣고 5분 동안 [¹⁴C]-*N*-formyl-lysine 과 2.5 mM threose 의 포집 정도를 liquid scintillation counter (Beckmann, Germany)로 측정하였다^{67~69}).

(3) 연구 결과

(가) 아마도리 화합물 및 AGEs 생성 억제 실험

처리 group은 control과 glycation, A.G.D 25mM (아마도리 화합물 및 AGEs 생성을 억제하는 것으로 잘 알려져 있는 물질), 생강나무의 에틸아세테이트 층 1000, 500, 100, 10 $\mu\text{g/ml}$ 으로 나누어진다. 실험 결과 에틸아세테이트 층 1000, 500, 100, 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 전 범위에서 유의적 차이($P < 0.01$)를 보이며 아마도리 화합물 및 AGEs 생성을 억제하는 것을 확인 할 수 있다. 특히 500 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도에서는 positive control 사용된 aminoguanidin 보다 효과가 더 큼을 보였다. 이 결과를 토대로 우리는 생강나무 옆이 아마도리 화합물 및 AGEs 생성을 억제하는 효과가 있음을 알 수 있다.

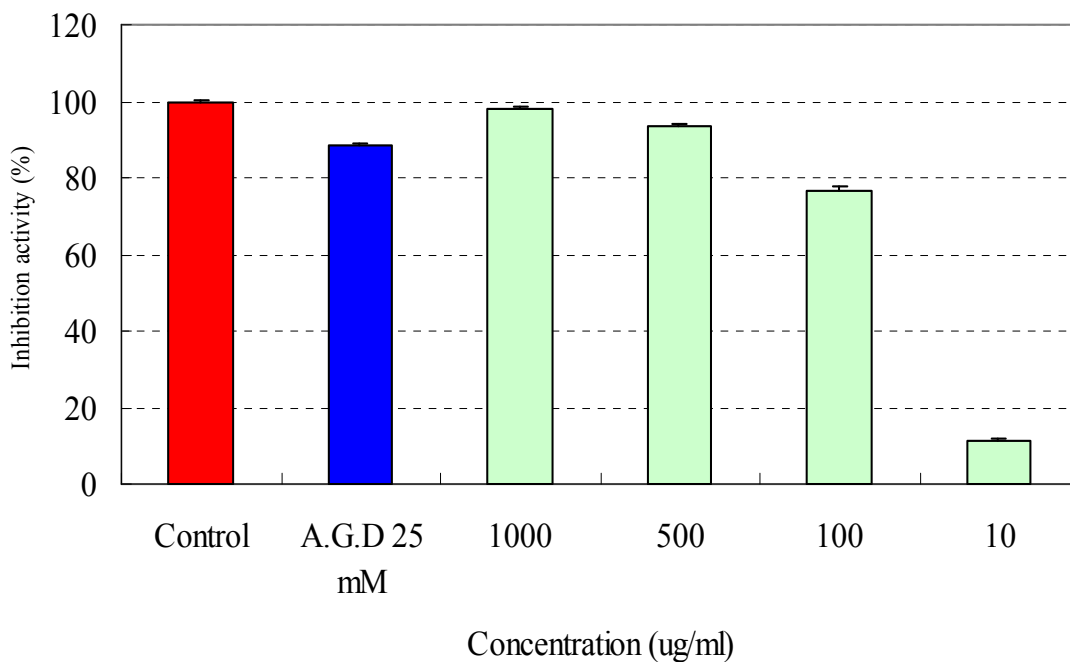


Fig. 50. Glycation inhibitory activity of LOBLs's EtOAc layer.

The percentage of glycation inhibitory activity calculated as compared to the blank group (100 %). Values represent the mean ($n=3$) \pm S.D. $P < 0.01$, compared with 100 % glycation alone.

A.G.D: aminoguanidin

(나) [¹⁴C]-lysine을 이용한 항당뇨합병증 glycation 저해 측정

처리 group은 control과 glycation, A.G.D 25mM (glycation 생성을 억제하는 것으로 잘 알려져 있는 물질), 생강나무의 에틸아세테이트 층 5000, 4000, 3000, 2000 µg/ml으로 나누어진다. 실험 결과 에틸아세테이트 층 5000, 4000, 3000, 2000 µg/ml의 전 범위에서 유의적 차이($P < 0.01$)를 보이며 glycation 생성을 억제하는 것을 확인 할 수 있다. 특히 5000, 4000 µg/ml 이상의 농도에서는 positive control 사용된 aminoguanidin 보다 효과가 더 크음을 보였다. 이 결과를 토대로 우리는 생강나무 옆이 glycation 생성을 억제하는 효과가 있음을 알 수 있다.

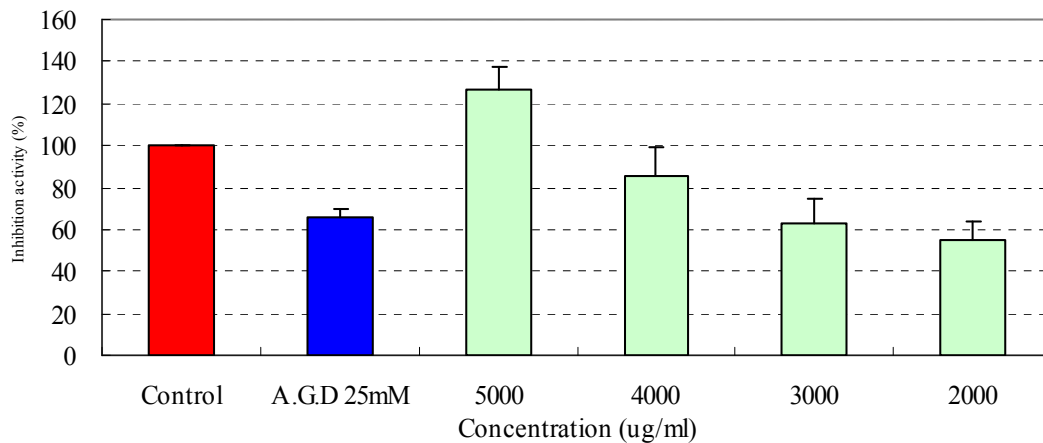


Fig. 51. Glycation inhibitory activity of LOBLs's EtOAc layer using [¹⁴C]-lysine.

The percentage of glycation inhibitory activity calculated as compared to the blank group (100 %).

Values represent the mean (n=3) ± S.D. $P < 0.01$, compared with 100 % glycation alone.

A.G.D: aminoguanidin

라. 적요

당해 연도 과제인 생강나무의 용매별 추출분리 조건 확립 및 *in vitro* 기능성 평가: 검색연구를 위한 활성성분 추출물 시료제조에서 각 획분 층의 활성 검사를 위하여 MTT assay를 실시하였다. 처리 group은 control과 *t*-BHP 1.5 mM, 생강나무의 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올, 물 층 500 µg/ml과 *t*-BHP 1.5 mM 같이 처리한 group으로 나누어지며, *t*-BHP은 간 독성을 일으키는 물질이다. 세포 생존율은 에틸아세테이트 층이 가장 높았으며 비극성인 헥산 층이 가장 낮았다. 그래서 본 세부에서는 에틸아세테이트 층을 가지고 간 기능 보호 및 항당뇨합병증 유효성 검증 시료로 선택하였으며 세포 생존율의 크기는 에틸아세테이트, 부탄올, 클로로포름, 물, 헥산 층의 순으로 높았다.

생강나무 추출물의 간기능보호(*in vitro*) 기능성 검증에서 생강나무 옆의 활성 층인 에틸아세테이트 층의 *in vitro* system에서 radical scavenging activity를 가지고 있는지를 알아보기 위해 수행한 DPPH 라디칼 소거활성 시험에서 에틸아세테이트 층의 radical 소거능을 본 바 50% scavenging activity를 가지는 농도는 $4.21 \pm 0.09 \mu\text{g DM/ml}$ 이며, positive control로 쓰인 ascorbic acid는 $2.25 \pm 0.05 \mu\text{g DM/ml}$ 이다. 기존에 radical 소거능이 크다고 잘 알려진 ascorbic acid와 비교를 하였을 때 비슷한 값을 나타내는 것을 보아 radical 소거능이 크음을 알 수 있다.

FRAP assay에 의한 항산화력은 전체 시료에 대한 FRAP 수치는 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 의 농도로 나타냈고 positive control로는 ascorbic acid를 사용하였다. LOBLs's EtOAc layer의 FRAP 수치는 2.45 ± 0.01 mmol $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}/\text{mg DM}$ 이고, 기존에 항산화 물질로 잘 알려져 있는 ascorbic acid는 2.54 ± 0.02 mmol $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}/\text{mg DM}$ 을 나타내는 것을 보아 생강나무의 에틸아세테이트 층은 높은 항산화 활성이 있는 것을 확인 할 수 있었다.

$\text{Fe}^{2+}/\text{ascorbate}$ 유도 microsomes의 지질과산화억제 활성검색에서 처리 group은 control과 *t*-BHP 1.5 mM, 생강나무의 에틸아세테이트 층 1000, 100, 10, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 과 *t*-BHP 1.5 mM 같이 처리한 group으로 나누어지며 *t*-BHP은 간 독성을 일으키는 물질이다. 실험 결과 *t*-BHP 1.5 mM 처리한 group은 control group보다 lipid peroxidation을 많이 일으켰다. 그리고 생강나무의 에틸아세테이트 층 1000, 100, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 *t*-BHP 1.5 mM와 같이 처리한 group에서 유의적 차이를 보이며 MDA(Malondialdehyde) 생성을 감소시켰다. 특히 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 처리하였을 때는 control 대비 77.49 %, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 처리하였을 때는 control 대비 37.82 % 정도의 MDA 생성을 감소시킨다. 이를 결과를 토대로 우리는 생강나무 옆이 간 손상을 입었을 때 간 기능 보호를 하는 것을 알 수 있으며, 정상적인 생체대사 중에 생기는 지질과산화물 생성을 줄여주는 것을 알 수 있다.

생강나무 추출물의 항당뇨합병증 *in vitro* 유효성 검증의 아마도리 화합물 및 AGEs 생성 억제 시험에서 처리 group은 control과 glycation, A.G.D 25mM (아마도리 화합물 및 AGEs 생성을 억제하는 것으로 잘 알려져 있는 물질), 생강나무의 에틸아세테이트 층 1000, 500, 100, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 으로 나누어진다. 실험 결과 에틸아세테이트 층 1000, 500, 100, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 전 범위에서 유의적 차이를 보이며 아마도리 화합물 및 AGEs 생성을 억제하는 것을 확인 할 수 있다. 특히 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 농도에서는 positive control 사용된 aminoguanidin 보다 효과가 더 큼을 보였다. 이 결과를 토대로 우리는 생강나무 옆이 아마도리 화합물 및 AGEs 생성을 억제하는 효과가 있음을 알 수 있었다.

$[^{14}\text{C}]$ -lysine을 이용한 항당뇨합병증 glycation 저해 측정에서 처리 group은 control과 glycation, A.G.D 25mM (glycation 생성을 억제하는 것으로 잘 알려져 있는 물질), 생강나무의 에틸아세테이트 층 5000, 4000, 3000, 2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 으로 나누어진다. 실험 결과 에틸아세테이트 층 5000, 4000, 3000, 2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 전 범위에서 유의적 차이를 보이며 glycation 생성을 억제하는 것을 확인 할 수 있다. 특히 5000, 4000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 농도에서는 positive control 사용된 aminoguanidin 보다 효과가 더 큼을 보였다. 이 결과를 토대로 우리는 생강나무 옆이 glycation 생성을 억제하는 효과가 있음을 알 수 있었다.

2. 생강나무 추출물을 이용한 *in vivo* 기능성 평가

가. 생강나무 추출물의 간기능 보호 *in vivo* 기능성 검증

간은 인체에 있어서 가장 큰 장기 중 하나로서 생활하는데 필수조직이며, 다른 조직의 기능들을 전체적인 맥락에서 조화롭게 관리한다. 그리고 동원 가능한 에너지의 근원을 쉽게 저장, 제공하므로 영양소의 대사기능, 해독기능, 순환조절기능에 관여하고 있으며, 간의 화학적 잠재력과 빠른 재생력 등의 이유로 ‘화학공장’, ‘저장고’, 침묵의 장기’라고도 한다.

간 손상의 원인으로는 알코올, 흡연 외에도 바이러스에 의한 감염, 독물 또는 약제에 의한 중독, 영양장애 및 순환장애에서 스트레스 같은 신변의 원인 등 여러 가지를 들 수 있다. 또한, 산화적스트레스에 의한 반응성 유해 산소종(reactive oxygen species; ROS)의 생성은 간섬유화, 신장염, 피부질환, 당뇨병 등의 여러 가지 질환의 원인이 될 수 있다. 특히 free radical($\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{O}_2^-$)은 분자상 산소가 활성산소로 변하여 다른 분자들과 반응하면서 생성되어 노화, 염증, 발암, 동맥경화)와 관련이 있는 것으로 알려져 있다. 불포화지방산이 풍부한 세포막은 생성된 free radical에 의해서 지질과산화의 표적이 되어 세포 소기관들이 정상적인 구조 및 기능을 잃게 되며, 국소적인 손상은 물론 알데하이드와 같은 지질과산화 분해산물이 생성부위에서 멀리 떨어진 부위로 이동하여 세포손상을 일으키게 된다. 이러한 지질과산화를 일으키는 대표적인 물질인 *t*-butyl hydroperoxide(*t*-BHP)를 투여 할 경우 간세포에서 cytochrome P-450 효소에 의해 세포 구성물들을 산화시킬 수 있는 alkoxy free radical이나 peroxy free radical로 분해되며, 이러한 산물들이 DNA의 손상을 가져와 결국 세포를 죽이는 결과를 초래하여 간세포의 산화적 손상을 일으키는 실험모델로 흔히 사용되고 있다. 또한 *t*-BHP는 간세포에서 malonedialdehyde (MDA) 형성 등을 초래한다고 보고되었다. 이러한 free radical에 의한 생체의 산화적손상은항산화 효소와 vitamine A, vitamine C, vitamine E와 같은 비효소적 항산화 물질에 의해 어느 정도 방어되어 진다. 특히 몇몇 천연물들은 지질과산화에 의한 손상을 효과적으로 보호함으로써 종양 및 노화의 예방에 있어서도 매우 중요한 역할을 수행 함을 보여주고 있다.

따라서 본 연구에서는 생강나무 추출물이 *t*-BHP에 의해 유도된 산화적 스트레스에 대한 간기능 개선효과를 확인하기 위하여 간 손상시 유도되는 효소인 ALT와 AST를 조사하고, 지질과산화 정도를 나타내는 MDA와 조직병리학적인 관찰을 통하여 간기능 개선효과를 알아보고자 한다.

(1) 연구 목적

국내 자생하는 생강나무 추출물을 가지고 이미 *in vitro*에서 검증된 간 보호 효과를 동물실험을 통한 *in vivo*에서 재검증하여, 생강나무 추출물의 간기능 보호효과를 검증한다.

(2) 연구 방법^{70~76)}

(가) 실험동물

실험동물은 체중 200g 정도 되는 7 주 주령의 Sparague-Dawley 수컷을 (주) 샘타코로부터 분양 받아 일주일간 적응 사육시킨 후 체중에 따른 난괴법에 의하여 각 군당 8마리씩 4군으로 나누어 총 1주 동안 사육하였다. 동물사육실의 온도는 20~22°C, 습도50%, 채광은 12시간 명암 조명(07:00~19:00)을 유지하였으며, 물과 식이는 자유급식을 시켰으며, 체중과 식이섭취량은 총 3회 측정하였다.

(나) *tert*-Butyl Hydroperoxide (*t*-BHP)에 의한 간 독성유발 및 동물처리

본 실험은 *tert*-Butyl Hydroperoxide (*t*-BHP)에 의해 유도된 랫드의 간독성에 대한 생강나무의 보호효과를 살펴보기 위해 진행하였다. 즉, 산화스트레스를 유발하는 *t*-BHP의 간보호 효과를 조사하기 위해 1일 1회 7일간 일정시간에 경구 투여법으로 생강나무 추출물 500, 2000 mg/kg을 투여한 후, 마지막 날 0.2 mmol/kg *t*-BHP를 복강 주사하여 급성 간 독성을 유발하였다. 대조군은 *t*-BHP 대신 생리식염수를 복강 주사하였다. 복강 주사한지 18시간 후, 에테르로 마취시켜 혈액 생화학적 분석을 위하여 복대 정맥으로부터 채혈하였고, 간은 생리식염수로 닦은 후 무게를 재고 조직학적 분석을 위해 10% 포르말린 용액에 고정시켰다. 나머지 간 조직은 생화학적 분석을 위해서 액체 질소로 급속 냉동 후 -70°C에 저장하였다. 채취한 혈액은 3000rpm, 4°C에서 15분간 원심 분리하여 혈청을 분리하고 장기와 혈청시료는 분석 전까지 -70°C에 보관하였다.

(다) 혈청 생화학적 수치 검사

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

(라) 간 조직병리학적 병소 억제 평가

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

(마) 지질과산화 (Thiobarbituric reactive substances, TBARS)의 억제활성 평가

t-BHP에 노출이 되면 생체메카니즘에 의해 산화반응이 일어나 그렇지 않은 정상군에 비해 많은 지질과산화물을 생성하게 되고, 이렇게 생성된 지질과산화물은 다시 생체메카니즘에 관여해 많은 산화생성물을 생성하게 해 생명체에 나쁜 영향을 끼치게 된다.

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

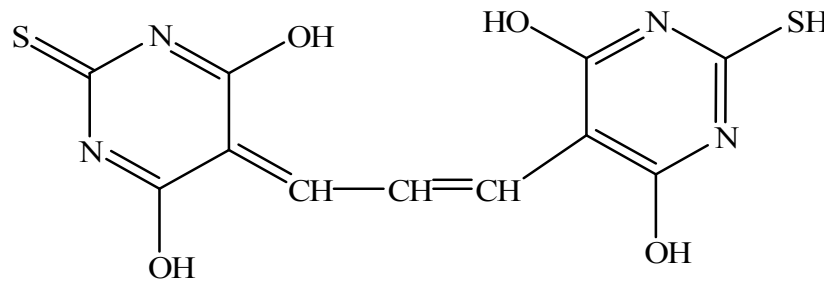


Fig. 52. The structure of TBA malonaldehyde complex.

간 조직을 homgenizer을 이용하여 1.15M KCl buffer에서 잘 마쇄 한 다음, 그 상등액 0.5 ml에 TCA (trichloroacetic acid) buffer (0.25 N HCl, 15% trichloroacetic acid, 0.375% thiobarbituric acid, 0.01% butyl hydroxytoluene) 0.5ml을 첨가하여 잘 혼합 한 다음 95°C 수조에서 30분 동안 끓인 후 상온으로 식혀서 *n* - butanol을 넣고 격렬히 흔들어 준다. 원심분리 (800 rpm, 10 min) 후 상층액은 excitation 515 nm와 emission 552 nm 에서 형광분석기를 이용하여 측정하였다. Thiobarbituric acid reactive substance (TBARS)는 1,1,3,3-tetraethoxypropane (TEP)의 산에 의한 가수분해로 얻어진 MDA equivalent의 표준곡선을 작성한 다음, 이에 의거한 측정치를 MDA 농도(nmol / mg protein)로 표기하였다.

(3) 연구 결과

(가) 실험 기간 중 몸무게의 변화와 식이 섭취량

Table. 36.에서 보는바와 같이 각 그룹 간에 식이 섭취나 몸무게의 변화, 조직의 무게에 유의적 차이를 나타나지 않았다. 실험 기간 중 식이의 섭취량은 각 그룹에서 40 g 내외의 비슷한 수준으로 섭취가 되었으며, 몸무게의 변화 또한 30 ~40 g 내외의 비슷한 수준에서 증가 하였다. 그리고 간이나 신장의 조직 무게 또한 9 g과 2 g 내외로 비슷한 무게를 보여, 위 결과를 토대로 그룹 간에 생강나무 추출물의 투여에 의해 생장이나 발육에 영향을 미치지 않았음을 확인 할 수 있다.

Table 36. Change in body weight of S.D. rats during treatment with LOBL extract for 7 days

Group	Food intake (g/day)	Initial body weight (g)	Final body weight (g)
Control	40.5 ± 4.78	218.75 ± 13.56	259.13 ± 13.62
t-BHP 0.2 mmol	36.0 ± 10.9	232.88 ± 6.36	261.75 ± 12.59
500 mg/kg	48.9 ± 9.43	228.00 ± 9.50	267.75 ± 9.00
2000 mg/kg	40.0 ± 6.05	230.38 ± 23.80	264.75 ± 22.04

Values are presented as means ± S.D. of 8 S.D. rats

Table 37. Organ weight of S.D. rats fed LOBL extract

Group	Liver (g)	Kidney (g)
Control	9.15 ± 0.58	2.61 ± 0.27
t-BHP 0.2 mmol	9.33 ± 0.57	2.84 ± 0.46
500 mg/kg	9.34 ± 0.54	2.69 ± 0.10
2000 mg/kg	8.78 ± 0.86	2.67 ± 0.24

Values are presented as means ± S.D. of 8 S.D. rats

(나) 혈청 생화학적 수치 검사

혈청 중 ALT (alanin aminotransferase)와 AST (aspirate aminotransferase)는 간세포 내에 있는 효소로 간독성으로 인한 간세포의 괴사와 간 조직의 파괴가 진행함에 따라 aminotransferase가 혈중으로 유리되어 높은 활성을 나타내는 것으로 간 손상의 지표로 사용되었다.

혈청 중 ALT와 AST는 간세포 내에 있는 효소로 GPT (glutamic pyruvic transaminase)와 GOT (glutamic oxaloacetic transaminase)라고도 한다. 이 효소들은 거의 모든 장기에 존재하며, 이 중 AST는 심장, 간, 골격, 혈구 내에 주로 존재하고, 80%가 세포 내의 미토콘드리아에 존재한다. 이에 비해 ALT는 주로 간에 분포하고 세포질에 존재한다. Fig. 53., 54.에서 보는 바와 같이 ALT 및 AST는 t-BHP 투여 이후 혈청생화학 수치가 대조군에 비해 각각 45.9 (U/L)와 176.1 (U/L)로 약 1.5배 및 1.4배의 증가를 나타낸다. 생강나무 추출물 투여군은 500 mg/kg 군에서 ALT 및 AST의 활성이 각각 34.4 (U/L) 와 141.0 (U/L)으로, 2000 mg/kg 군에서는 각각 30.1 (U/L) 와 129.3 (U/L)으로 t-BHP 투여군에 비해서 월등히 효소의 활성을 감소시키는 효과를 보여 t-BHP에 의한 간 독성에 대한 보호 효과가 있음을 보여 주었다. 또한 생강나무 추출물의 농도에 의존적으로 높은 농도로 투여 한 2000 mg/kg 투여군에서 500 mg/kg 투여군보다 더 높은 t-BHP에 의한 간 독성에 대한 보호 효과가 큼을 확인 할 수 있다.

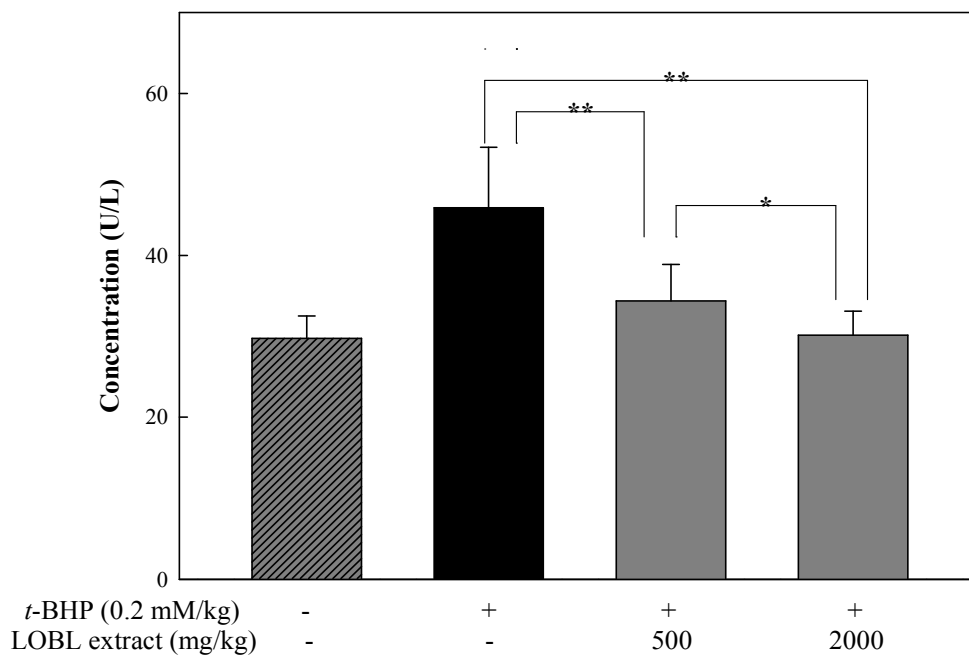


Fig. 53. Effects of LOBL extract on serum enzymes alanine aminotransferase (ALT) activities.

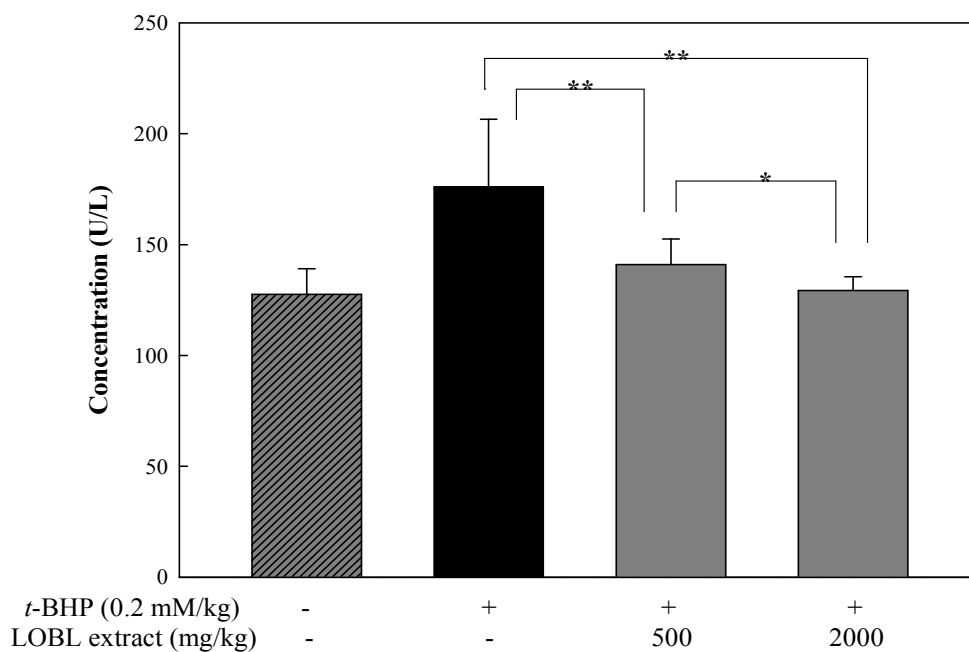


Fig. 54. Effects of LOBL extract on serum enzymes aspartate aminotransferase (AST) activities.

Values are presented as means \pm S.D. of 8 hamsters

(다) 간 조직병리학적 병소 억제 평가

간의 조직학적 검경은 생체의 형태 및 기능의 변화를 확인하여 질병의 원인, 발병 기전, 형태적 변화 및 기능적 장애를 관찰하여 질병의 진단과 예후 판정을 하는 것이다. Fig. 55.에서 보는 바와 같이 대조군(A)은 정상세포로서 핵이 뚜렷이 보이며 그 간격이 일정하고, 잘 짜여진 소엽구조를 관찰할 수 있으며, 생강나무 투여군(C, D)은 일부 간세포가 파괴되고 세포간극이 넓어져 있으나, 간세포의 necrosis 염증소견의 차이는 보이지 않아 *t*-BHP에 의한 간 손상을 미미하게 회복되었음을 확인할 수 있다.

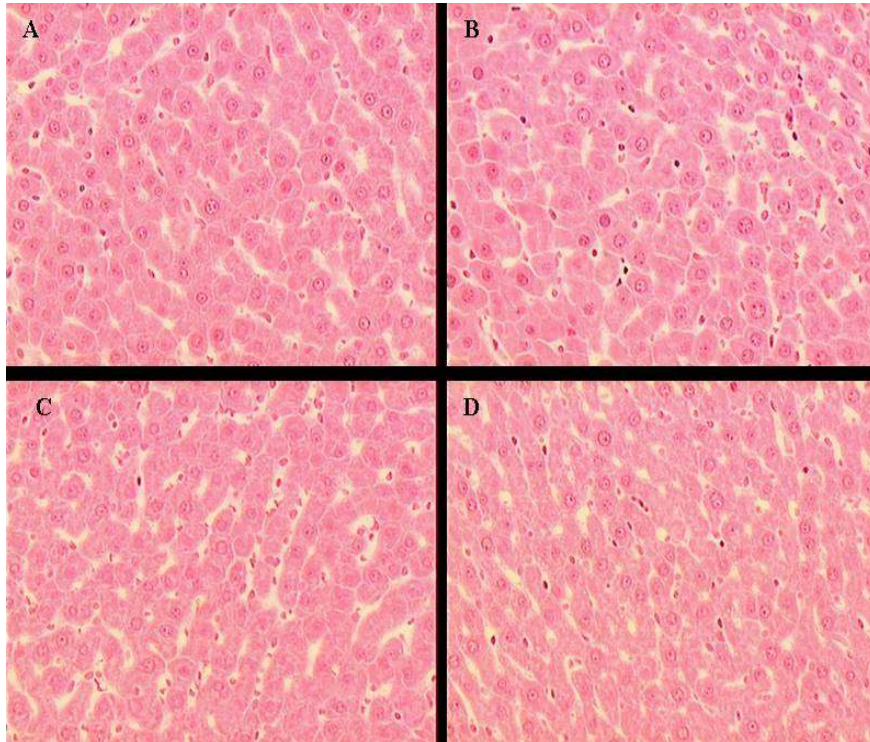


Fig. 55. Effect of LOBL extract on *t*-BHP-induced liver damage.

(A) Solvent control group (n=8); (B) Animals treated with *t*-BHP; (C) Animals pretreated with 500 mg/kg of LOBL, and then with *t*-BHP; (D) Animals pretreated with 2000 mg/kg of LOBL, and then with *t*-BHP. hematoxylin/eosin staining: magnification $\times 200$.

(라) 지질과산화 (Thiobarbituric reactive substances, TBARS)의 억제활성 평가

이 실험은 세포막 손상 정도와 관련된 것으로 세포 내 ROS (reactive oxygen species)가 발생하면 인지질 막에 다량 함유되어 있는 불포화지방산 수소원자를 제거하게 된다. 이로서 지질과산화의 연쇄반응이 유발되고 지방산 사슬에서 peroxy radical과 alkoxy radical이 생성된다.

이것들은 수소원자와 결합하여 lipid hydroperoxide를 생성하는데 이는 분해되어 malondialdehyde (MDA) 등의 aldehyde를 생성한다. 이렇게 생성된 지질과산화물은 세포막의 투과성을 증가시키고 체액의 손실을 일으켜 단백질 변화를 유발한다. 이는 암이나 동맥경화, 고혈압 등의 각종 질병을 일으킬 수 있다. 본 실험에서는 TBARS 법에 의해 지질과산화의 생성지표인 malondialdehyde (MDA)를 측정해보았다. TBARS 법에서는 thiobarbituric acid와 불포화지방산이 반응하여 malondialdehyde를 생성하며 이것은 붉은 빛을 띠게 한다. 이 붉은 빛을 띠는 물질을 excitation 515 nm/emission 552 nm에서 측정한다.

처리 그룹은 control과 *t*-BHP 만 처리한 그룹, 그리고 *t*-BHP와 500 mg/kg, 2000 mg/kg을 투여한 그룹으로 나누어진다. *t*-BHP은 간 독성을 일으키는 물질로 간에 산화스트레스를 유발하여 간독성에 관여되어 있다고 본다.

실험 결과 *t*-BHP 만 처리한 그룹은 control 그룹보다 lipid peroxidation을 많이 일으켜 많은 MDA를 생성한 것을 나타내고 있지만, 생강나무 추출물 500 mg/kg 과 2000 mg/kg 투여한 그룹은 모두 MDA 생성을 감소시킨 것을 나타내고 있다. Fig. 56.에서 보는 바와 같이 생강나무 추출물을 500 mg/kg 과 2000 mg/kg 투여한 그룹은 28.86 nmol/mg protein 과 20.25 nmol/mg protein으로 약 1.2배 및 1.7배 감소한 것으로 나타나 생강나무 추출물을 투여하지 않은 그룹에 비해서 월등히 MDA 생성을 줄여 *t*-BHP에 의한 간 독성에 대한 보호 효과가 있음을 보여 주었다. 또한 생강나무 추출물의 농도에 의존적으로 높은 농도로 투여 한 2000 mg/kg 투여군에서 500 mg/kg 투여군보다 더 높은 MDA 생성을 줄여 *t*-BHP에 의한 간 독성에 대한 보호 효과가 더 큼을 확인 할 수 있다.

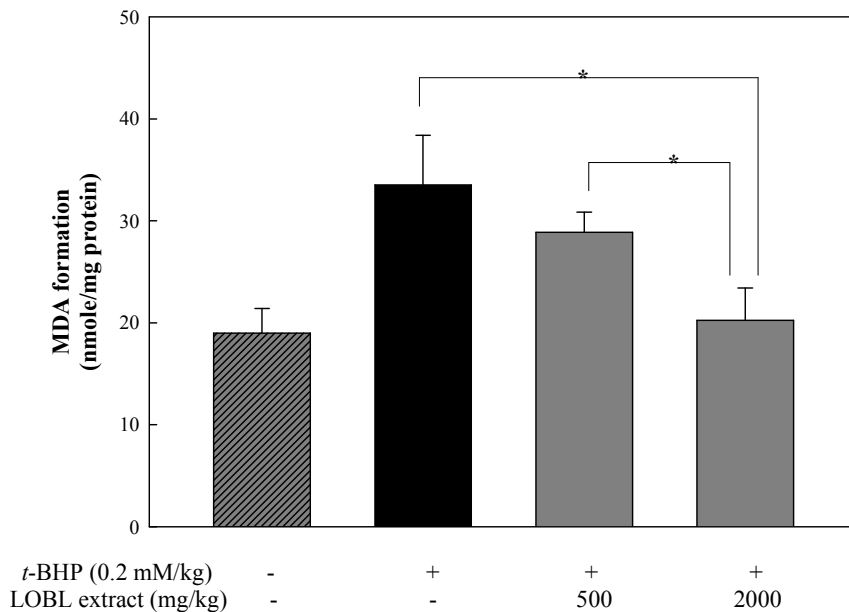


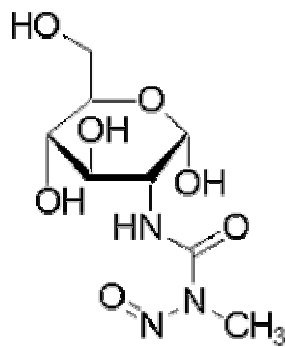
Fig. 56. Liver malondialdehyde levels in S.D. rats treated LOBL extracts.

Values are expressed as mean ± SD (n=8)

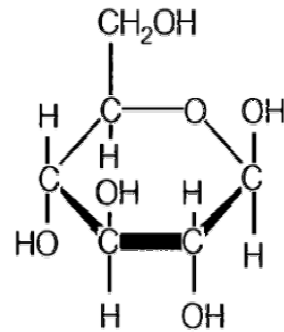
나. 생강나무 추출물의 당뇨억제 *in vivo* 기능성 검증^{77~80)}

우리 몸에서 당은 신체의 움직임 뿐 아니라 여러 대사 기능에 있어서 에너지원으로 사용되는 중요한 영양소이다. 이러한 당을 에너지원으로 사용하기 위해서는 인슐린(insuline)이 필요하며, 인슐린은 당을 세포 속으로 넣어주는 역할을 하여 에너지를 만들게 한다. 이러한 기능을 하는 인슐린은 췌장의 내분비샘인 췌도의 β -cell에서 만들어진다. 그러나 췌장에서 인슐린을 만들지 못하거나 제 역할을 못하는 인슐린을 만드는 경우 당뇨병에 걸리게 된다.

Type I 형인 당뇨병은 streptozotocin (STZ)를 투여하여 실험동물로부터 서서히 β -cell을 파괴하면서 고혈당의 당뇨를 유발하도록 한다. STZ의 경우 당과 비슷한 형태의 구조를 가지고 있어 인슐린을 만드는 β -cell에 잘 붙어 파괴함으로써 인슐린 결핍을 가져오게 한다.



STZ의 구조



Glucose의 구조

따라서 본 연구에서는 생강나무 추출물이 STZ로 유발된 당뇨쥐에 있어 얼마만큼의 효과를 혹은 간 조직에 어떤 특이적으로 반응을 보이는지를 알아보기 위해 Sprague-Dawley rat (Samtaco biokorea, Korea)의 실험동물로부터 β -cell을 파괴하여 고혈당의 당뇨를 유발시킨 후, 몇 주에 걸쳐 투여를 시킴으로 실험을 진행하였다. 그로인해 당뇨병이 유발된 실험동물에 생강나무 추출물을 경구투여한 후 혈당강하에 미치는 영향을 알아보려고 한다.

(1) 연구 목적

국내 자생하는 생강나무 추출물을 가지고 이미 *in vitro*에서 검증된 항당뇨합병증억제 효과를 동물실험을 통한 *in vivo*에서 재검증하여, 생강나무 추출물의 당뇨억제 효과를 검증한다.

(2) 연구 방법

(가) 실험동물

실험동물은 체중 200g 정도 되는 7 주 주령의 Sprague-Dawley rat 수컷을 (주) 샘타코로부터 분양 받아 일주일간 적응 사육시킨 후, streptozotocin (STZ)으로 당뇨를 유발하여 혈당에 따라 난피법에 의하여 각 군당 8마리씩 4군으로 나누어 총 4주 동안 사육하였다. 동물사육실의 온도는 20~22°C, 습도50%, 채광은 12시간 명암 조명(07:00 ~ 19:00)을 유지하였으며, 물과 식이는 자유급식을 시켰다.

(나) 당뇨유발 및 동물처리

실험동물은 생강추출물을 투여에 들어가기 전 12시간 동안을 절식시킨 다음, 당뇨군은 STZ를 0.1M citrate buffer (pH 4.5)에 용해시켜 STZ 60 mg/kg씩 1회 복강 주사하였다. 24시간 경과 후 당뇨 유발정도를 Abbott Diabete (USA)사의 혈당 측정기 (FreeStyle)를 이용하여 확인하였고, 혈당이 300 mg/dl 이하인 개체는 2회 복강 주사하고, 또 다시 24시간 경과 후 당뇨 유발정도를 확인하여 300 mg/dl 이하인 것은 3회 복강 주사하였다. 그리하여 최종 당뇨유발 후 12 시간 절식시켜 공복 시 혈당이 300 mg/dl 이상에 이르도록 하였다. 당뇨를 유발하지 않은 정상군은 동량의 saline 용액을 주사하였다.

당뇨 유발 rat에 대하여 생강나무 추출물을 4주간 500 mg/kg과 1000 mg/kg 씩 경구 투여법으로 투여하여 혈당 강하 정도를 매주 1회씩 혈당 측정하였다. 실험 마지막 날에는 에테르로 마취시켜 혈액 생화학적 분석을 위하여 복대 정맥으로부터 채혈하였고, 간은 생리식염수로 닦은 후 무게를 재고 조직학적 분석을 위해 10% 포르말린 용액에 고정시켰다. 나머지 간 조직은 생화학적 분석을 위해서 액체 질소로 급속 냉동 후 -70°C 에 저장하였다. 채취한 혈액은 3000rpm, 4°C 에서 15분간 원심 분리하여 혈청을 분리하고 장기와 혈청시료는 분석 전까지 -70°C 에 보관하였다.

(다) 음수 및 식이섭취량 측정

음수는 수돗물을 자율 섭취케 하였고, 음수 섭취량과 식이 섭취량은 주 1회씩 측정하였다.

(라) 체중 및 혈당 측정

체중과 혈당은 당뇨 유발 후 실험 식이에 들어가기 전에 측정 한 다음, 실험기간 중에는 주 1회씩 측정하였다. 혈당측정은 12시간 절식 시킨 후 꼬리정맥에서 혈액을 채취하여 공복 시 혈당을 혈당 측정기로 측정 하였다.

(마) 당 내성 검사

생강나무 추출물을 투여한 지 5주 후 12시간 절식시켜 공복 시 혈당을 측정한 뒤, glucose (500 mg/kg)를 복강주사 한 다음, 1시간 간격으로 3시간동안 꼬리정맥에서 혈액을 채취하여 혈당측정기로 혈당을 측정하였다.

(바) 혈청 생화학적 수치 검사

혈액 샘플을 진공 채혈관에 수거한 후 원심분리하여 혈청만을 모아 효소 활성을 측정한다. 효소 활성도 측정은 Bayer(USA)사의 AST reagent kit, ALT Reagent kit 와 glycated hemoglobin (HbA1c) reagent kit를 ADVIA(Japan) 분석기를 사용하여 혈청에서 측정하였다.

(사) 간 조직병리학적 병소 억제 평가

Hematoxylin & Eosin stain을 일반 염색이라 부르며, 가장 기본적인 조직 진단법으로서 사용되었다. 병리학적 영향을 측정하기 위하여 채취된 간을 10% 포르말린을 이용하여 고정 후, 24시간 동안 탈수 과정을 거쳐 조직을 투명화하여 paraffin을 침투시켜 포매한다. 완성된 블록은 $5\ \mu\text{M}$ 로 절편을 만들어 슬라이드에 도말, 건조한 후, xylene으로 paraffin을 제거함. Hematoxylin은 염기성이므로 핵산에 결합하여 핵을 자주색으로 염색, Eosin은 약산성이므로 염기성을 가진 단백질에 결합하여 세포질을 분홍색으로 대조 염색함. 질병에 의해 일어난 조직의 변화는 광학 현미경으로 검사하였다.

(3) 연구 결과

(가) 실험 기간 중 몸무게의 변화와 식이 및 음수 섭취량

실험기간 중 실험동물의 체중변화와 식이 및 음수 섭취량은 Fig. 57., 58., 59.에서 보는바와 같다. Fig 57. 에서 체중 변화를 보면 당뇨유발 직후 당뇨유발군과 당뇨를 유발하지 않은 그룹간에는 유의적 차이 ($p < 0.01$)를 보이며 체중 감소가 나타나는데, 이는 당뇨를 유발하는 과정에서 STZ를 복강주사 함으로써 당뇨를 유발하지 않은 그룹보다 더 많은 스트레스를 받았기 때문인 것으로 보인다. 그러나 3주 이후 부터는 당뇨유발군에서도 서서히 체중이 증가하는 것을 보임으로써 어느 정도 당뇨유발에 대한 스트레스가 수복이 되는 결과를 보였다. 이러한 체중감소는 STZ 투여로 당뇨가 유발된 그룹에서 췌장의 Langrehan's Islet 내에 인슐린을 생성하는 β -세포가 파괴되어 인슐린 생성이 저하되고 그에 따른 인슐린 부족현상이 나타나게 된다. 이로 인해 포도당이 세포내로 운반되지 못하기 때문에 당대사에 의한 에너지 생산이 생리적으로 필요한 양보다 부족하게 되며, 체내 단백질, 글리코겐 및 지질의 합성도 저하되고, 또한 그로 인하여 근육의 강도 증진도 저하되어 체중감소를 나타나는 것으로 해석된다 (Furuse M., 1993, *J. Nutr.* 123:59-65).

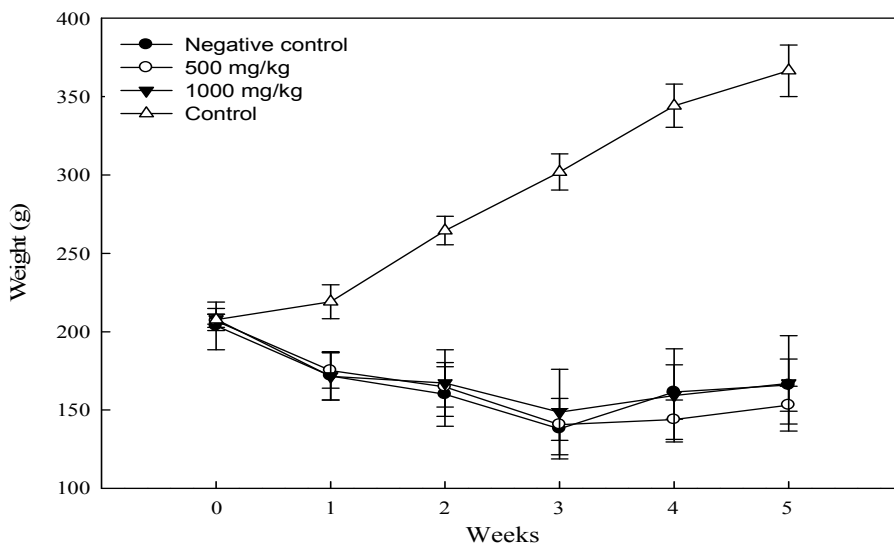


Fig. 57. Effect on weight change of S.D. rats treated LOBL extracts for 5 weeks.

Values are expressed as mean \pm SD (n=10)

Control: non-diabetic control

Negative control: diabetic control

500 mg/kg: diabetic + LOBL extract 500mg/kg

1000 mg/kg: diabetic + LOBL extract 1000mg/kg

Fig. 58.에서 식이 섭취를 보면 당뇨유발 직후 당뇨유발군과 당뇨를 유발하지 않은 그룹간에는 차이를 보이지 않으나, 3주차 이후부터는 당뇨유발군이 당뇨를 유발하지 않은 그룹에 비해 더 많은 식이 섭취 경향을 나타내었다. 이는 당뇨의 현상 중에 하나인 다식현상에 의한 것으로 혈 중 포도당 함량은 높으나 이를 세포 내에서 이용하지 못하므로 에너지 부족현상이 생기고, 이로 인해 식이 섭취량이 증가하는 것으로 여겨진다 (Koh J. B., 1998, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 27:313-318).

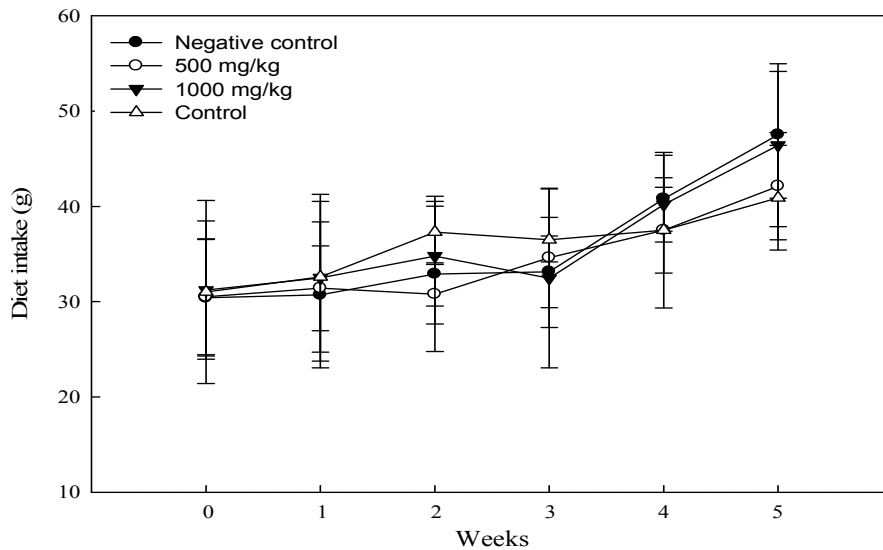


Fig. 58. Effect on diet intake of S.D. rats treated LOBL extracts for 5 weeks.

Values are expressed as mean \pm SD (n=10)

Control: non-diabetic control

Negative control: diabetic control

500 mg/kg: diabetic + LOBL extract 500mg/kg

1000 mg/kg: diabetic + LOBL extract 1000mg/kg

Fig. 59.에서 음수섭취를 보면 당뇨유발 후 당뇨유발군과 당뇨를 유발하지 않은 그룹간에는 지속적으로 유의적 차이($p < 0.01$)를 보이며 음수섭취가 현저히 증가하였다. 비당뇨군에 비해 당뇨유발군에는 약 254.66 % 이상 음수섭취가 증가하였다. 이것은 당뇨의 한 가지 증상으로, 정상적인 경우에는 신장은 소변으로 걸러지는 포도당을 어느 정도의 혈당농도까지 거의 완벽하게 재흡수 하지만, 일정 수준 이상으로 혈당이 높아지면 소변으로 걸러지는 포도당의 일부는 재흡수 되지 못하소 소변으로 빠져 나가게 된다. 이렇게 빠져 나가는 포도당은 체내 수분을 같이 끌고 체외로 배출되기 때문에 소변의 양이 많아지며, 따라서 체내 수분의 손실도 많아지므로 이를 보상하기 위해 음수량도 증가하게 된다. 이런 이유로 당뇨의 증상으로 다뇨(多尿)와 다음(多飲)이 나타나게 된다 (Lee and Jun, 2004, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 33:1273-1343).

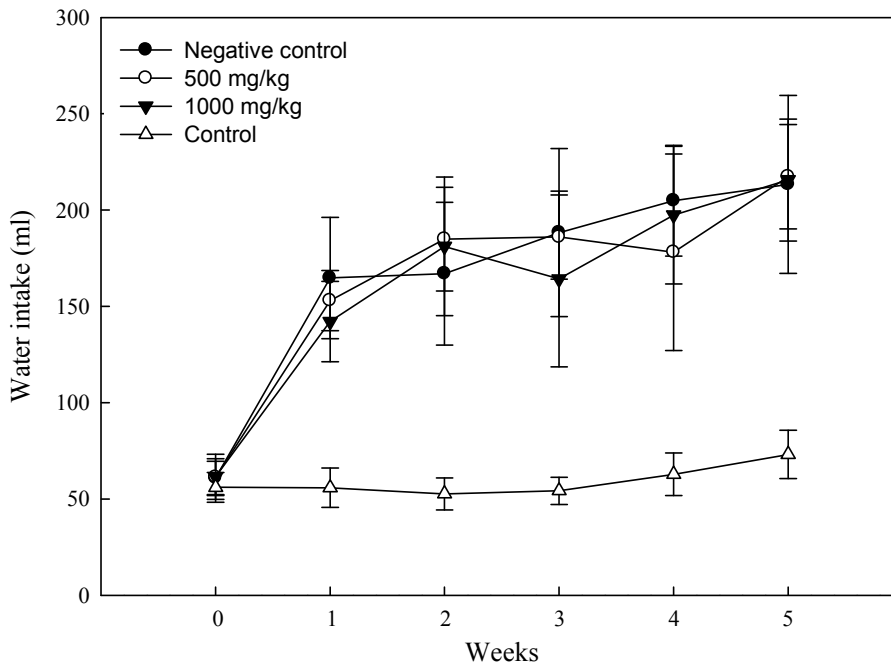


Fig. 59. Effect on water intake of S.D. rats treated LOBL extracts for 5 weeks.

Values are expressed as mean \pm SD (n=10)

Control: non-diabetic control

Negative control: diabetic control

500 mg/kg: diabetic + LOBL extract 500mg/kg

1000 mg/kg: diabetic + LOBL extract 1000mg/kg

(나) 혈당 측정

혈당은 혈액내로 흡수되어 유입되는 당, 혈액에서 간 조직으로 제거되는 당 및 간에서 glycogen 분해와 당신생작용에 의하여 혈액으로 배출되는 당에 의하여 영향을 받는다. STZ를 투여하여 췌장의 β -세포를 선택적으로 파괴시킨 쥐에서는 점차적으로 인슐린 분비가 감소하고 그로 인해 혈액 내에 당이 각 조직으로 유입되지 못하게 되고, 간에서 당신생작용에 의하여 혈액 내로 배출되는 당이 증가하여 고혈당을 초래한다(Ahmed I., 2004. *Mo l. Cell Biochem.* 261:63-70).

Fig. 60.을 보면 non-diabetic인 control 그룹은 투여 5주간 뚜렷한 혈당의 증가나 감소는 없었으며, STZ로 당뇨를 유발시킨 negative control 그룹에서는 확실히 혈당이 증가하였으며, 투여 5주동안 지속적인 증가를 보였다. 반면에 당뇨유발군에 생강나무 추출물을 투여한 그룹에서는 3주차까지는 증가를 보였으나 4주차 이후부터는 혈당이 감소하는 경향을 나타내었다. 특히 생강나무 추출물 500 mg/kg을 투여한 그룹에서는 10.42 % 혈당 감소를 보였으며, 1000 mg/kg의 그룹에서는 13.93 %의 유의적 차이 ($p < 0.01$)를 보이며 혈당을 감소시키는 결과를 나타내었다.

본 실험에서 나타난 혈당강화 효과는 생강나무 추출물의 혈당조절 가능성을 보였으며, 특히 농도의존적으로 고농도로 처리할수록 혈당강화 효과는 더 큰 것으로 나타나, 생강나무 추출물이 당뇨에 의한 고혈당을 감소시킬 수 있을 것으로 사료된다.

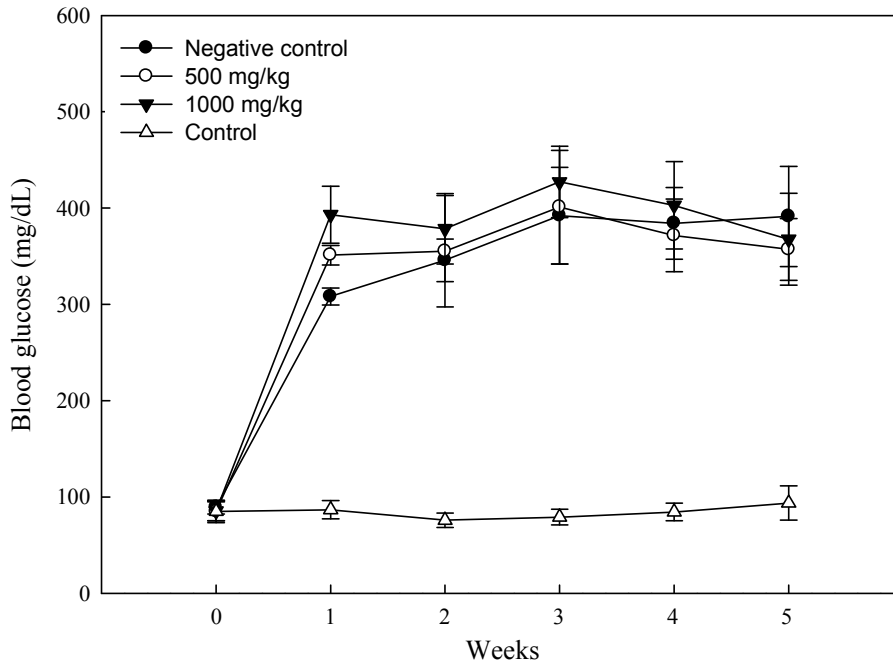


Fig. 60. Blood glucose levels in S.D. rats treated LOBL extracts for 5 weeks.

Values are expressed as mean \pm SD (n=10)

Control: non-diabetic control

Negative control: diabetic control

500 mg/kg: diabetic + LOBL extract 500mg/kg

1000 mg/kg: diabetic + LOBL extract 1000mg/kg

(다) 당 내성 검사

당내성 실험 (glucose tolerance test, GTT)은 혈액 내 포도당이 세포 내로의 유입되는 능력을 측정하기 위한 실험으로, 췌장에서의 인슐린 분비를 담당하는 β -세포의 능력을 알아보기 위함이다. 즉 당뇨가 유발되면 β -세포의 능력이 저하돼 일반 정상군에 비해 세포내 포도당 유입이 적게 된다. 본 실험에서는 일정량의 포도당을 투여한 후 혈액 내 포도당 유지능력을 첫 투여 전, 그리고 1시간 간격으로 3시간 동안 측정하였다.

모든 그룹은 첫 투여 후 1시간째에 최고치의 혈당을 보였으며, 1시간 후 부터는 조금씩 감소하는 경향을 보였다. 1시간째의 혈당 값을 최고치혈당치로 보고 3시간 후에 감소된 혈당을 보면, 당뇨유발군에서는 8.20 %의 유의적 차이($p < 0.05$)를 보이며 감소를, 당뇨유발군에 생강나무추출물 500 mg/kg을 투여한 그룹에서는 10.88 %의 유의적 차이($p < 0.05$)를 보이며 감소를, 1000 mg/kg을 투여한 그룹에서는 20.41 %의 유의적 차이($p < 0.01$)를 보이며 감소하였다. 특히 생강나무 추출물을 투여한 그룹에서는 당뇨유발군에 비해 높은 내당능 효과를 보였으며, 저농도에서 고농도로 투여할 경우 농도 의존적으로 내당능 효과가 커지는 것을 확인할 수 있었다.

당뇨유발군은 당뇨로 인해 인슐린의 작용이 저하되어 당분해 능력이 저하됨으로써 분해 속도가 느려지는 것으로 해석되며, 생강나무 추출물을 당뇨유발군에 투여하였을 경우 당뇨로 인한 췌장의 β -세포 능력을 증진시켜 줄 수 있을 것으로 판단된다.

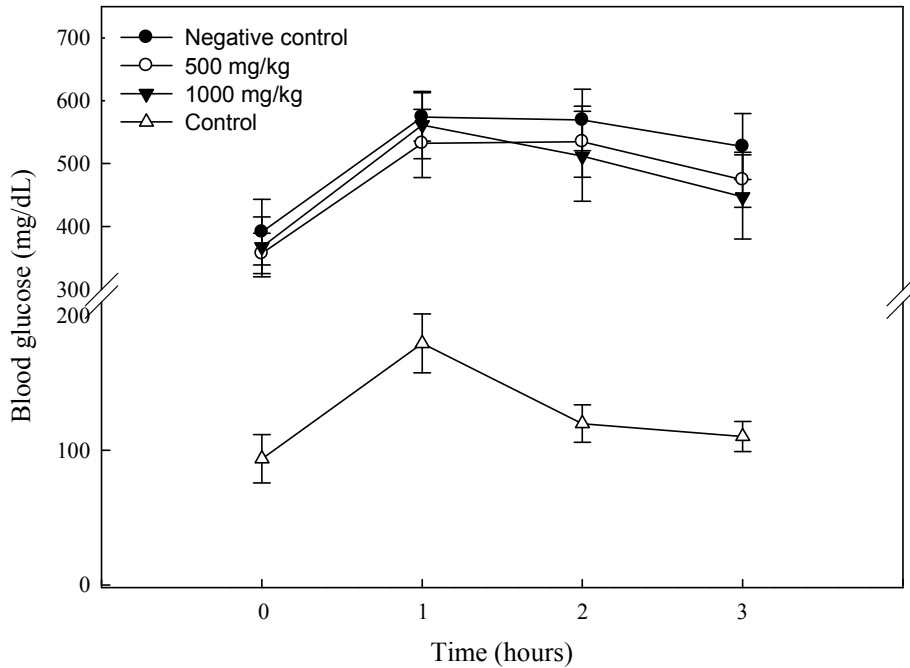


Fig. 61. Glucose tolerance test in control and diabetic S.D. rats treated LOBL extracts for 5 weeks.

Values are expressed as mean \pm SD (n=10)

Control: non-diabetic control

Negative control: diabetic control

500 mg/kg: diabetic + LOBL extract 500mg/kg

1000 mg/kg: diabetic + LOBL extract 1000mg/kg

(라) 혈청 생화학적 수치 검사

당뇨로 인한 간의 생화학적 기능에 미치는 영향을 보고자 혈청 AST (aspartate aminotransferase)와 ALT (alanine aminotransferase)의 활성도를 측정하는데, 이들은 간세포 내에 있는 효소로 각각 GOT (glutamate oxaloacetate transaminase)와 GPT (glutamate pyruvate transaminase)라고도 칭한다. 간이 손상되면 세포 내에 있던 이 효소들은 간세포 외부로 다량 유출되어 혈액 내의 농도가 증가함으로써 간 손상의 지표로 사용된다. Hunt (1990. *Diabetes*. 39:1420-1424) 등의 연구에 의하면 당뇨로 인해 고혈당이 유지되면 포도당 산화를 통해 활성산소 생성이 증가하며, MDA를 형성함으로써 막 인지질에 세포독성 작용을 일으켜 간세포의 손상을 가져온다.

AST와 ALT는 정상군에 비하여 당뇨유발군에서 유의적인 ($p < 0.01$)인 증가를 보여 당뇨유발에 의하여 간의 손상이 관찰되었다. 그러나 AST 측정결과(Fig. 62.) 당뇨유발군에 생강나무 추출물 1000 mg/kg을 같이 투여 하였을 때 당뇨유발군에 비하여 34.68 %의 유의적($p < 0.01$)인 감소를 보였다. 또한 ALT의 측정결과(Fig. 63.)도 AST와 비슷한 경향을 보여 생강나무 추출물 1000 mg/kg을 당뇨유발군에 같이 투여 하였을 시, 당뇨유발군에 비하여 36.04 %의 유의적($p < 0.05$)인 감소를 보였다. 이 결과에 비추어 생강나무 추출물을 당뇨유발군에 투여하였을 경우 당뇨로 인한 간 손상을 억제하는 효과를 가져다줄 수 있음을 확인하였다.

또한 HbA1c는 당뇨에서 발견되는 대표적인 바이오마커로서 Fig. 64.에서 보면 정상군에 비해 당뇨유발군에서 유의적인 ($p < 0.01$)인 증가를 보였다. 그에 반해 당뇨유발군에 생강나무 추출물 1000 mg/kg을 처리한 그룹에서는 16.90 %의 유의적 차이($p < 0.05$)를 보이며 감소한 효과를 보였다. 위의 두 결과(AST, ALT)와 마찬가지로 생강나무 추출물을 당뇨유발군에 투여하였을 경우 당뇨로 인한 손상을 억제하는 효과를 가져다줄 수 있음을 확인하였다.

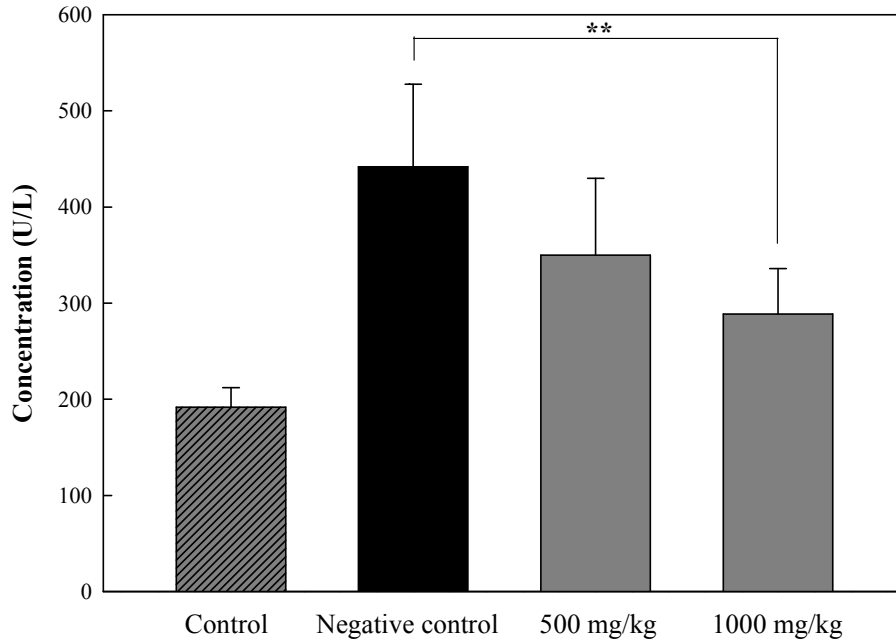


Fig. 62. Effects of LOBL extract on serum enzymes aspartate aminotransferase (AST) activities in S.D. rats for 5 weeks.

Values are expressed as mean \pm SD (n=5)

Control: non-diabetic control

Negative control: diabetic control

500 mg/kg: diabetic + LOBL extract 500mg/kg

1000 mg/kg: diabetic + LOBL extract 1000mg/kg

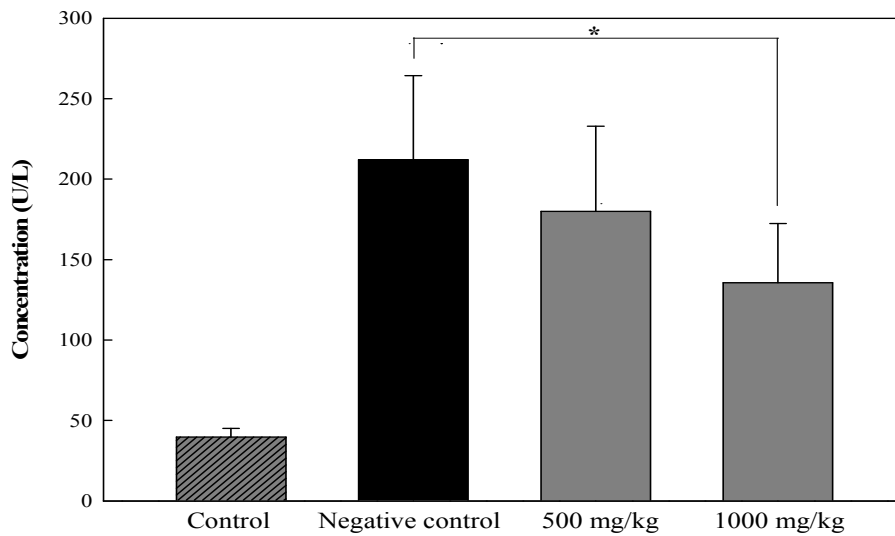


Fig. 63. Effects of LOBL extract on serum enzymes alanine aminotransferase (ALT) activities in S.D. rats for 5 weeks.

Values are expressed as mean \pm SD (n=5)

Control: non-diabetic control

Negative control: diabetic control

500 mg/kg: diabetic + LOBL extract 500mg/kg

1000 mg/kg: diabetic + LOBL extract 1000mg/kg

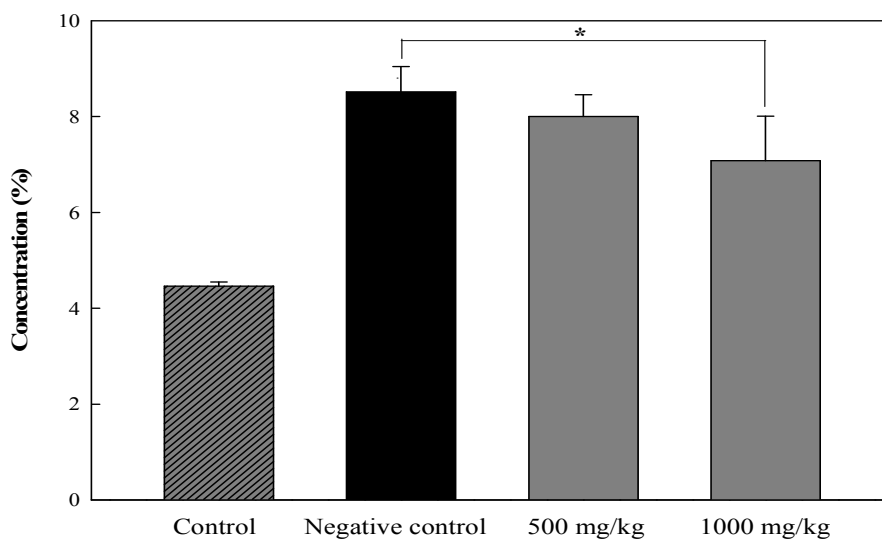


Fig. 64. Effects of LOBL extract on Glycated hemoglobin (HbA1c) in S.D. rats for 5 weeks.

Values are expressed as mean \pm SD (n=5)

Control: non-diabetic control

Negative control: diabetic control

500 mg/kg: diabetic + LOBL extract 500mg/kg

1000 mg/kg: diabetic + LOBL extract 1000mg/kg

(마) 간 조직병리학적 병소 억제 평가

각 그룹의 실험동물에서 간조직의 조직학적 변화를 관찰한 결과를 보면 Fig. 65.에 나타난 바와 같다. 정상군에서는 세포질이나 세포핵 등에 병리학적인 소견이 나타나지 않았으며 간세포의 배열도 규칙적이었다. 당뇨유발군에서도 간조직의 H&E 염색에서는 특이적인 소견이 없었으며, 당뇨유발군에 생강나무 추출물을 투여한 그룹에서도 같은 결과를 나타내었다.

본 실험에서 간조직 손상의 주요 지표가 되는 혈청 AST와 ALT 농도를 살펴보면 당뇨유발군에서 간 손상의 의심을 알 수 있음에도 불구하고 직접적인 간 조직의 H&E 염색에 의한 소견상으로는 그 차이가 미비하여 구분하기 어려웠다. 이것은 조직손상이 육안으로 식별 가능할 정도로 진행되려면 오랜 시간이 걸린다는 데에서 원인을 찾을 수 있다.

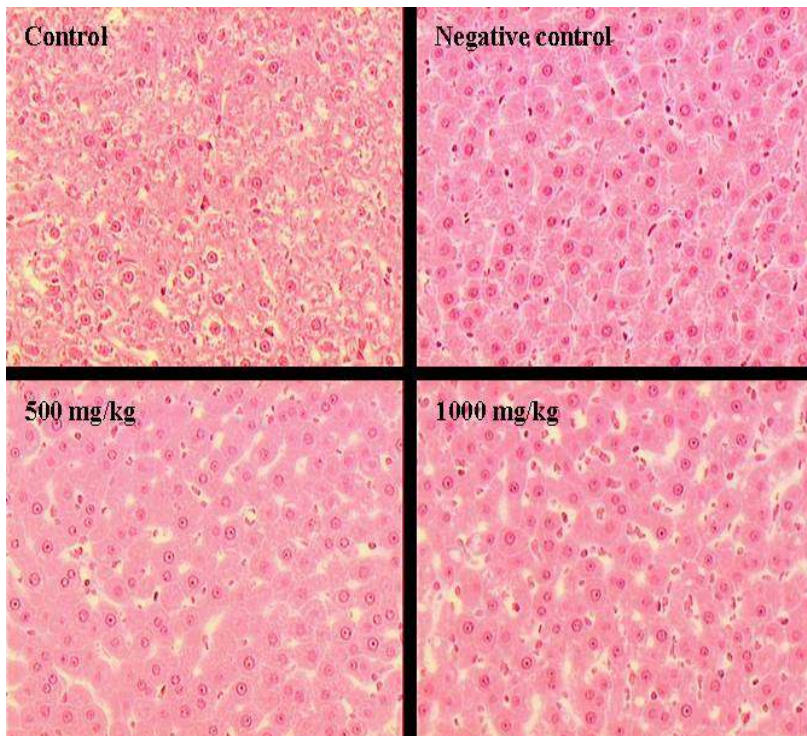


Fig. 65. Histopathological examination of hepatic tissue from S.D. rats treated LOBL extracts for 5 weeks.

Control: non-diabetic control

Negative control: diabetic control

500 mg/kg: diabetic + LOBL extract 500mg/kg

1000 mg/kg: diabetic + LOBL extract 1000mg/kg

Hematoxylin/eosin staining: magnification $\times 200$.

다. 적요

본 과제는 1차년도에서 생강나무 추출물의 용매별 추출분리 조건을 확립하였고, *in vitro* 기능성평가를 통하여 생강나무의 추출물이 항산화 효과와 간세포 보호효과 및 당뇨합병증과 관련된 glycation 저해 효과를 확인하였다. 그래서 본 해인 2차년도에서는 *in vitro*에서 검증된 간기능 보호 및 당뇨억제 효과를 *in vivo*에서 재차 확인하였다.

처음 생강나무 추출물의 간기능 보호효과에서는 각 그룹 간에 식이 섭취나 몸무게의 변화, 조직의 무게에 유의적 차이를 나타나지 않아 생강나무 추출물의 투여에 의해 생장이나 발육에 영향을 미치지 않았음을 확인 할 수 있었다. 그리고 혈청 중 ALT 및 AST는 *t*-BHP 투여 이후 혈청생화학 수치가 대조군에 비해 각각 45.9 (U/L)와 176.1 (U/L)로 약 1.5배 및 1.4배의 증가를 나타내었으며 생강나무 추출물 투여군은 500 mg/kg 군에서 ALT 및 AST의 활성이 각각 34.4 (U/L) 와 141.0 (U/L)으로, 2000 mg/kg 군에서는 각각 30.1 (U/L) 와 129.3 (U/L)으로 *t*-BHP 투여군에 비해서 월등히 효소의 활성을 감소시키는 효과를 보여 *t*-BHP에 의한 간 독성에 대한 보호 효과가 있음을 보여 주었다. 또한 생강나무 추출물의 농도에 의존적으로 높은 농도로 투여 한 2000 mg/kg 투여군에서 500 mg/kg 투여군보다 더 높은 *t*-BHP에 의한 간 독성에 대한 보호 효과가 더 큼을 확인 할 수 있었다. 간의 조직학적 검경에서는 대조군은 정상세포로서 핵이 뚜렷이 보이며 그 간격이 일정하고, 잘 짜여진 소엽구조를 관찰할 수 있으며, 생강나무 추출물 투여군은 일부 염증성 변명이 보이나 각 그룹의 간세포의 necrosis 염증소견의 차이는 보이지 않아 *t*-BHP에 의한 간 손상을 미미하게 회복되었음을 확인할 수 있다. 지질과산화물 생성에서는 *t*-BHP 만 처리한 그룹은 control 그룹보다 lipid peroxidation을 많이 일으켜 많은 MDA를 생성한 것을 나타내고 있지만, 생강나무 추출물 500 mg/kg 과 2000 mg/kg 투여한 그룹은 모두 MDA 생성을 감소시킨 것을 나타내고 있다. 생강나무 추출물을 500 mg/kg 과 2000 mg/kg 투여한 그룹은 28.86 nmol/mg protein 과 20.25 nmol/mg protein으로 약 1.2배 및 1.7배 감소한 것으로 나타나 생강나무 추출물을 투여하지 않은 그룹에 비해서 월등히 MDA 생성을 줄여 *t*-BHP에 의한 간 독성에 대한 보호 효과가 있음을 보여 주었다. 또한 생강나무 추출물의 농도에 의존적으로 높은 농도로 투여 한 2000 mg/kg 투여군에서 500 mg/kg 투여군보다 더 높은 MDA 생성을 줄여 *t*-BHP에 의한 간 독성에 대한 보호 효과가 더 큼을 확인 할 수 있다.

생강나무 추출물의 당뇨억제 효과에서 식이 섭취를 보면 당뇨유발 직후 당뇨유발군과 당뇨를 유발하지 않은 그룹 간에는 차이를 보이지 않으나, 3주차 이후부터는 당뇨유발군이 당뇨를 유발하지 않은 그룹에 비해 더 많은 식이 섭취 경향을 나타내었다. 음수섭취에서는 당뇨유발 후 당뇨유발군과 당뇨를 유발하지 않은 그룹 간에는 지속적으로 유의적 차이($p < 0.01$)를 보이며 음수섭취가 현저히 증가하였으며, 비당뇨군에 비해 당뇨유발군에는 약 254.66 % 이상 음수섭취가 증가하였다. 혈당의 변화는 비당뇨군에서는 5주간 뚜렷한 혈당의 증가나 감소는 없었으며, STZ로 당뇨를 유발시킨 당뇨유발군에서는 확실히 혈당이 증가하였으며, 투여 5주 동안 지속적인 증가를 보였다. 반면에 당뇨유발군에 생강나무 추출물을 투여한 그룹에서는 3주차까지는 증가를 보였으나 4주차 이후부터는 혈당이 감소하는 경향을 나타내었다. 특히 생강나무 추출물 500 mg/kg을 투여한 그룹에서는 10.42 % 혈당 감소를 보였으며, 1000 mg/kg의 그룹에서는 13.93 %의 유의적 차이($p < 0.01$)를 보이며 혈당을 감소시키는 결과를 나타내었다. 혈당 내당성 실험에서는 모든 그룹은 첫 투여 후 1시간째에 최고치의 혈당을 보였으며, 1시간 후 부터는 조금씩 감소하는 경향을 보였다. 1시간째의 혈당 값을 최고치혈당치로 보고 3시간 후에 감소된 혈당을 보면, 당뇨유발군에서는 8.20 %의 유의적 차이($p < 0.05$)를 보이며 감소를, 당뇨유발군에 생강나무추출물 500

mg/kg을 투여한 그룹에서는 10.88 %의 유의적 차이($p < 0.05$)를 보이며 감소를, 1000 mg/kg을 투여한 그룹에서는 20.41 %의 유의적 차이($p < 0.01$)를 보이며 감소하였다. AST와 ALT는 정상군에 비하여 당뇨병유발군에서 유의적인 ($p < 0.01$)인 증가를 보여 당뇨병유발에 의하여 간의 손상이 관찰되었다. 그러나 AST 측정결과 당뇨병유발군에 생강나무 추출물 1000 mg/kg을 같이 투여 하였을 때 당뇨병유발군에 비하여 34.68 %의 유의적($p < 0.01$)인 감소를 보였다. 또한 ALT의 측정결과도 AST와 비슷한 경향을 보여 생강나무 추출물 1000 mg/kg을 당뇨병유발군에 같이 투여 하였을시, 당뇨병유발군에 비하여 36.04 %의 유의적($p < 0.05$)인 감소를 보였다. 또한 HbA1c는 당뇨병에서 발견되는 대표적인 바이오마커로서 정상군에 비해 당뇨병유발군에서 유의적인 ($p < 0.01$)인 증가를 보였다. 그에 반해 당뇨병유발군에 생강나무 추출물 1000 mg/kg을 처리한 그룹에서는 16.90 %의 유의적 차이($p < 0.05$)를 보이며 감소한 효과를 보였다. 각 그룹의 실험동물에서 간조직의 조직학적 변화를 관찰한 결과를 보면 정상군에서는 세포질이나 세포핵 등에 병리학적인 소견이 나타나지 않았으며 간세포의 배열도 규칙적이었다. 당뇨병유발군에서도 간조직의 H&E 염색에서는 특이적인 소견이 없었으며, 당뇨병유발군에 생강나무 추출물을 투여한 그룹에서도 같은 결과를 나타내었다. 본 실험에서 간조직 손상의 주요 지표가 되는 혈청 AST와 ALT 농도를 살펴보면 당뇨병유발군에서 간 손상의 의심을 알 수 있음에도 불구하고 직접적인 간 조직의 H&E 염색에 의한 소견상으로는 그 차이가 미비하여 구분하기 어려웠다. 이것은 조직손상이 육안으로 식별 가능할 정도로 진행되려면 오랜 시간이 걸린다는 데에서 원인을 찾을 수 있다. 본 실험에서 나타난 혈당강하 효과, 내당능 효과, AST, ALT 생성억제는 생강나무 추출물의 혈당조절 가능성과 당뇨병으로 인한 간 손상을 억제하는 효과들을 보였으며, 특히 농도의존적으로 고농도로 처리할수록 이들 효과는 더 큰 것으로 나타나 생강나무 추출물이 당뇨병에 의한 고혈당을 감소시킬 수 있을 것으로 사료된다.

3. 생강나무 추출물의 *in vivo* 안전성 평가 및 기능원인물질의 정제 및 구조해석

가. 생강나무 추출물의 *in vivo* 안전성 검증^{81~83)}

전 세계적으로 현대 의학을 보완하는 대체의학에서 대한 관심이 높아짐에 따라 부작용이 적은 천연물 소재의 의약 대체품들이 주목받고 있다. (Yokozawa et al) 천연물을 기원으로 하는 생약은 기존에 한방에서 질병 치료제나 보약의 처방으로 널리 사용되어 왔으나, 최근에 들어서는 각종 기능성 식품, 기능성 화장품 등의 소재로 다양하게 개발되고 있다. 이러한 천연 식물들의 우수한 기능성 때문에 의약품이나 기능성 식품으로서의 이용 가치가 점차 증가하고 있으나, 이에 대한 안전성 평가 자료가 전무한 실정이다. 따라서 본 연구는 생강나무 추출물에 대하여 전임상 수준의 안전성 평가 실험의 일환으로 급성독성과 반복 투여시 발현 될 수 있는 독성을 질적, 양적으로 평가한다.

(1) 목표

전임상 수준으로 랫드에 있어서 생강나무 잎의 70% 에탄올 추출물의 단회 경구투여에 의한 급성 독성의 정보를 얻기 위하여 실시한다.

(2) 방법

(가) 시험물질

동결건조된 생강나무 엽을 분쇄하여 70 % 에탄올에서 3시간 동안 환류 냉각 추출 후, 70% 에탄올 추출물은 원심분리(7000 rpm, 30 min, 4 °C) 한 후 재차 상등액을 whatman No. 42로 여과하였다. Filtering된 상등액을 추출용매를 완전히 제거하기 위해 감압증류한 다음 동결건조를 하여 70 % 에탄올 추출물 분말을 얻었다. 생강나무 잎의 70% 에탄올 추출물은 차광 상태로 냉장보관하여 사용하였으며, 각 투여군의 농도에 따라 멸균 정제수에 현탁하여 사용하였다.

(나) 랫드를 이용한 독성시험

본 시험은 의약품 등의 독성 시험 기준과 비임상시험 관리기준을 참조하였다.

① 시험 동물 및 사육환경

본 시험에서는 샘타코(주)로부터 구입한 5주령의 Spargue-Dawley rat를 사용한다. 1주일간의 검역 및 순화를 거친 뒤 건강하다고 판정된 것 중 체중이 20 ± 5 g의 것을 시험에 공시한다. 실험동물은 온도 $23 \pm 3^\circ\text{C}$, 상대습도 $50 \pm 10\%$, 환기회수 10~20회/hr, 조명 시간 12시간(08:00 점등~20:00소등), 조도 150~300 Lux로 설정된 환경에서 사육한다. 사료와 물은 자유롭게 섭취하도록 하고, 매일 일정한 시간에 각각의 섭취량을 측정한다.

② 단회투여 용량설정

625, 1250, 2500, 및 5000 mg/kg의 용량으로 실시한 예비시험의 결과, 어떠한 독성소견도 관찰되지 않았다. 따라서 본 시험에서는 식약청 고시에 명시된 최고 농도인 2000 mg/kg 용량보다 더 높은 농도인 5000 mg/kg을 시험물질 투여군으로 하여 한계 용량군을 설정하였으며, 주사용 멸균 증류수를 투여하는 부형대조군을 두어 시험을 실시하였다.

③ 14일 반복투여 독성시험

아무런 독성 소견이 관찰되지 않는 농도인 2000 mg/kg/day를 고용량으로 하고, 공비 2를 적용하여 1000 mg/kg/day 및 500 mg/kg/day을 중간 용량과 저용량으로 투여한다. 대조군은 용매인 주사용 멸균 증류수만을 투여한다. 각 군당 암수 5마리를 시험에 사용한다.

④ 투여방법 및 투여기간

시험 물질은 임상적용경로를 따라 경구투여하며, 투여기간은 단회투여 독성 시험의 경우 시험 물질을 시험 개시 시 투여 전에 하룻밤 절식시킨 후 주사기를 사용하여 1회 투여 후 2주간 임상증상을 관찰하게 되며, 14일 반복투여 독성 시험의 경우 시험 물질을 1일 1회 14일 동안 주사로 경구투여 한다. 각 개체가 해당하는 군의 투여 당일 체중 평균을 기준으로 그 군에 해당하는 용량에 맞게 멸균증류수에 시험물질을 용해시켜 경구투여 한다.

⑤ 일반증상 및 사망동물의 관찰

단회투여 독성시험의 경우 투여당일은 8시간까지 매시간 일반증상을 관찰하고, 투여 다음날부터 15일까지는 매일 1회씩 일반 증상의 변화, 독성 증상, 운동성, 외관 및 사망동물의 유무를 주의 깊게 관찰한다. 14일 반복투여 독성시험의 경우 시험기간 중 모든 동물에 대하여 매일 2회 일정한 시간에 일반 증상의 변화, 독성증상, 빈사 및 사망 유무를 관찰한다.

⑥ 체중측정

단회투여 독성 시험의 경우 시험에 사용된 모든 동물에 대하여 투여개시 직전(1일)과 투여 후 2, 5, 8 및 15일째에 측정하였다. 14일 반복투여 독성시험의 경우 시험기간 중 모든 동물에 대하여 투여 직전과 투여 후 매일, 그리고 부검 직전까지의 체중을 측정한다.

⑦ 사료 및 음수 섭취량 측정

단회 및 반복투여 독성 시험 모두 동일하게 실험 개시 후 매일 일정량의 사료와 음수를 오전 10시에 공급하고 익일 같은 시각에 잔량을 측정하여 기록한다.

⑧ 부검 및 장기중량 측정

단회 및 반복투여 독성 시험 모두 동일하게 부검 전날 밤부터 절식시킨다. 이산화탄소로 마취시킨 다음, 복대정맥으로부터 채혈을 실시하고 방혈시켜 안락사를 시킨 후 육안으로 모든 장기를 관찰한다. 그 후 전 실험 동물에 대하여 흉선, 폐, 심장, 신장, 간, 비장, 고환, 난소의 중량을 측정한다.

⑨ 혈액학적 검사

단회 및 반복투여 독성 시험 모두 동일하게 혈액학적 검사를 위해 계획, 도살일에 복대정맥으로부터 채혈하여 EDTA-3K로 항응고 처리를 하고 자동혈구계산기를 이용하여 백혈구수(WBC, white blood cell count), 적혈구수(RBC, red blood cell count), 혈색소량(Hb, hemoglobin concentration), 헤마토크리트치(HCt, hematocrit), 평균적혈구용적(MCV, mean corpuscular volume), 평균적혈구혈색소농도(MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration), 혈소판(PLT, platelet)을 측정한다.

⑩ 혈액생화학적 검사

단회 및 반복투여 독성 시험 모두 동일하게 혈액생화학적 검사를 위해 계획 도살일에 복대정맥으로부터 채취한 혈액의 일부를 30분간 4℃에 냉장보관 후 원심분리(2000 rpm, 20 min)하여 혈청을 분리한다. 분리한 혈청은 자동생화학분석기를 이용하여 총 단백질(T.P, total protein), 알부민(ALB, albumin), 포도당(GLU, glucose), 콜레스테롤(CHOL, total cholesterol), 총 빌리루빈(T.BIL, total bilirubin), glutamate pyruvatetransaminase(GPT), glutamate oxaloacetate transaminase(GOT), alkaline phosphatase(ALP)를 측정한다.

⑪ 조직병리학적 검사

반복투여 독성 시험 후 간과 신장의 조직 병리학적 검사를 위하여 분리된 간과 신장을 10% 중성완충포르말린 용액에 충분히 고정시킨 후 일반적인 조직처리 과정을 거쳐 파라핀 포매, 박절한다. 간의 경우에는 hematoxylin & eosin(H&E) 염색을, 신장의 경우에는 periodic acid 염색(PAS)을 실시하여 광학현미경하에서 조직 병리학적 검사를 실시한다.

⑫ 통계처리

모든 실험 결과는 평균 ± 표준편차로 나타내며 Levene's test에서 분산이 균일하게 나온 검사항목은 일원배치분산분석(one-way analysis of variance)을 하며, 분석결과 군간 차이가 인정되면 Dunnett's test의 다중 비교법으로 $p < 0.05$ 의 수준에서 통계학적 유의성을 검정한다.

(3) 결과

(가) 단회 투여 독성시험

① 사망동물

사망동물은 시험기간 동안 암수의 모든 시험군에서 관찰되지 않았다.

Table 38. Mortality of Rats.

GROUP SUMMARY OF MORTALITY																
		DAYS ON TEST											MALE			
DOSE (mg/kg)		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
0	a	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	b	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5000	a	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	b	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

		DAYS ON TEST											FEMALE			
DOSE (mg/kg)		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
0	a	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	b	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5000	a	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	b	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

a = Number animals alive at the start of each study day

b = Number of mortalities during each study day

② 일반증상

암수의 시험물질 투여군에서 유연(salivation)이 투여직후에 각각 3례씩 관찰되었다. 수컷 시험물질 투여군의 1례에서 설사(liquid feces)가 투여당일에 관찰되었다.

③ 체중변화

시험기간 동안 암수의 모든 시험군에서 체중의 이상변화는 관찰되지 않았다.

④ 부검소견

암수 모든 동물에서 시험물질 투여와 관련된 육안적으로 이상이 있는 소견은 관찰되지 않았다.

Table 39. Clinical Signs of Rats.

SUMMARY OF OBSERVATION INCIDENCE		MALE
GROUP:	V. CONTROL	T1
PERIOD DOSE(mg/kg)	0	5000
DAY 1		
Normal	5/5	5/5
Salivation	0/5	3/5
Liquid feces	0/5	1/5
DAY 2		
Normal	5/5	5/5
DAY 3		
Normal	5/5	5/5
DAY 4		
Normal	5/5	5/5
DAY 5		
Normal	5/5	5/5
DAY 6		
Normal	5/5	5/5
DAY 7		
Normal	5/5	5/5
DAY 8		
Normal	5/5	5/5
DAY 9		
Normal	5/5	5/5
DAY 10		
Normal	5/5	5/5
DAY 11		
Normal	5/5	5/5
DAY 12		
Normal	5/5	5/5
DAY 13		
Normal	5/5	5/5
DAY 14		
Normal	5/5	5/5
DAY 15		
Normal	5/5	5/5

Number of Animals with Sing/Total Number of Animals Observed

Table 39. (Continued). Clinical Signs of Rats.

SUMMARY OF OBSERVATION INCIDENCE		FEMALE
GROUP:	V. CONTROL	T1
PERIOD DOSE(mg/kg)	0	5000
DAY 1		
Normal	5/5	5/5
Salivation	0/5	3/5
DAY 2		
Normal	5/5	5/5
DAY 3		
Normal	5/5	5/5
DAY 4		
Normal	5/5	5/5
DAY 5		
Normal	5/5	5/5
DAY 6		
Normal	5/5	5/5
DAY 7		
Normal	5/5	5/5
DAY 8		
Normal	5/5	5/5
DAY 9		
Normal	5/5	5/5
DAY 10		
Normal	5/5	5/5
DAY 11		
Normal	5/5	5/5
DAY 12		
Normal	5/5	5/5
DAY 13		
Normal	5/5	5/5
DAY 14		
Normal	5/5	5/5
DAY 15		
Normal	5/5	5/5

Number of Animals with Sing/Total Number of Animals Observed

Table 40. Body Weights of Rats. (Group summary)

SUMMARY OF BODY WEIGHTS (Grams)			MALE
PERIOD	GROUP:	V. CONTROL	T1
	DOSE(mg/kg)	0	5000
DAY 1	MEAN	160.1	161.8
Dosing	S.D.	8.65	5.34
DAY 2	MEAN	187.3	182.8
Dosing	S.D.	9.02	6.65
DAY 5	MEAN	223.6	222.6
Dosing	S.D.	10.26	8.90
DAY 8	MEAN	251.3	247.3
Dosing	S.D.	11.15	9.85
DAY 15	MEAN	328.8	322.8
Dosing	S.D.	18.18	19.54

			FEMALE
PERIOD	GROUP:	V. CONTROL	T1
	DOSE(mg/kg)	0	5000
DAY 1	MEAN	136.3	137.7
Dosing	S.D.	4.23	5.40
DAY 2	MEAN	156.8	151.5
Dosing	S.D.	3.94	5.96
DAY 5	MEAN	175.2	176.3
Dosing	S.D.	9.66	5.14
DAY 8	MEAN	186.2	190.1
Dosing	S.D.	6.88	5.59
DAY 15	MEAN	218.0	221.2
Dosing	S.D.	6.63	5.63

Table 41. Gross Findings of Rats.

INCIDENCE OF GROSS FINDINGS			MALE
GROUP:	V. CONTROL	T1	
DOSE(mg/kg)	0	5000	
NUMBERS OF ANIMALS:	5	5	
Observed/No remarkable finding	5	5	
No. of Observations	5	5	

			FEMALE
GROUP:	V. CONTROL	T1	
DOSE(mg/kg)	0	5000	
NUMBERS OF ANIMALS:	5	5	
Observed/No remarkable finding	5	5	
No. of Observations	5	5	

(나) 14일 반복투여 독성시험

① 사망동물

사망동물은 시험기간 동안 암수의 모든 시험군에서 관찰되지 않았다.

Table 42. Mortality of Rats.

GROUP SUMMARY OF MORTALITY																
		DAYS ON TEST												MALE		
DOSE (mg/kg)		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
0	a	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	b	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
500	a	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	b	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1000	a	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	b	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2000	a	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	b	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

		DAYS ON TEST												FEMALE		
DOSE (mg/kg)		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
0	a	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	b	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
500	a	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	b	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1000	a	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	b	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2000	a	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	b	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

a = Number animals alive at the start of each study day

b = Number of mortalities during each study day

② 일반증상

모든 시험 기간 동안 사망개체는 발생하지 않았으며 유의할 만한 이상 증상도 관찰되지 않았다.

Table 43. Clinical Signs of Rats.

SUMMARY OF OBSERVATION INCIDENCE					MALE
GROUP: PERIOD DOSE(mg/kg)	V. CONTROL 0	T1 500	T2 1000	T3 2000	
DAY 1					
Normal	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
DAY 2					
Normal	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
DAY 3					
Normal	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
DAY 4					
Normal	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
DAY 5					
Normal	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
DAY 6					
Normal	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
DAY 7					
Normal	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
DAY 8					
Normal	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
DAY 9					
Normal	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
DAY 10					
Normal	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
DAY 11					
Normal	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
DAY 12					
Normal	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
DAY 13					
Normal	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
DAY 14					
Normal	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
DAY 15					
Normal	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5

Number of Animals with Sing/Total Number of Animals Observed

Table 43. (Continued). Clinical Signs of Rats.

SUMMARY OF OBSERVATION INCIDENCE					FEMALE
GROUP:	V. CONTROL	T1	T2	T3	
PERIOD DOSE(mg/kg)	0	500	1000	2000	
DAY 1					
Normal	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
DAY 2					
Normal	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
DAY 3					
Normal	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
DAY 4					
Normal	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
DAY 5					
Normal	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
DAY 6					
Normal	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
DAY 7					
Normal	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
DAY 8					
Normal	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
DAY 9					
Normal	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
DAY 10					
Normal	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
DAY 11					
Normal	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
DAY 12					
Normal	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
DAY 13					
Normal	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
DAY 14					
Normal	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
DAY 15					
Normal	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5

Number of Animals with Sing/Total Number of Animals Observed

③ 체중변화

투여일로부터 시험 종료 시 까지 모든 암수 동물에서 정상적으로 체중이 증가되는 현상을 보였으며, 대조군 및 농도별 투여군을 비교 할 경우 모두 별다른 유의성 있는 체중 변화 현상이 관찰되지 않았다.

Table 44. Body Weights of Rats. (Group summary)

PERIOD	SUMMARY OF BODY WEIGHTS (Grams)				
	GROUP:	V. CONTROL	T1	T2	MALE T3
	DOSE(mg/kg)	0	500	1000	2000
DAY 1	MEAN	157.30	161.80	158.55	161.18
Dosing	S.D.	5.72	7.53	3.73	3.58
DAY 5	MEAN	196.08	205.56	200.40	201.01
Dosing	S.D.	7.98	7.22	5.55	4.48
DAY 10	MEAN	236.22	246.44	241.16	240.36
Dosing	S.D.	11.72	9.19	8.61	5.02
DAY 13	MEAN	257.10	267.19	262.59	258.64
Dosing	S.D.	11.25	11.38	9.01	6.07
DAY 15	MEAN	260.20	268.88	264.76	260.22
Dosing	S.D.	12.08	13.05	9.71	4.99
					FEMALE
PERIOD	GROUP:	V. CONTROL	T1	T2	T3
	DOSE(mg/kg)	0	5000	1000	2000
	DAY 1	MEAN	139.10	138.20	138.10
Dosing	S.D.	4.62	4.02	5.18	7.72
DAY 5	MEAN	158.36	159.82	157.02	158.66
Dosing	S.D.	5.56	5.56	8.16	11.66
DAY 10	MEAN	175.66	175.60	171.20	176.60
Dosing	S.D.	6.22	10.16	10.25	14.10
DAY 13	MEAN	181.78	184.11	183.40	181.46
Dosing	S.D.	12.00	8.23	7.50	14.83
DAY 15	MEAN	184.04	186.34	188.30	184.26
Dosing	S.D.	6.87	9.29	10.89	14.00

④ 사료 및 음수 섭취량

시험기간 동안 각 군당 사료섭취량과 음수섭취량의 변화는 대조군 및 농도별 투여군에서 암수 모두 유의할만한 차이가 인정되지 않았다.

⑤ 부검소견

부검결과 모든 생존 동물에서 본 시험물질 투여와 관련된 어떠한 육안병변도 관찰되지 않았다. 또한 장기무게를 측정해 본 결과 시험물질과 관련하여 어떠한 무게의 증감도 관찰되지 않았다.

Table 45. Organ weights in SD rats treated with *Lindera obtusiloba* Bl. extract for 14-day repeated toxicity test.

Organs	Male(mg/kg)				Female(mg/kg)			
	0	500	1000	2000	0	500	1000	2000
Thymus	0.83±0.23	0.88±0.19	0.76±0.10	0.68±0.18	0.62±0.14	0.62±0.10	0.50±0.11	0.65±0.10
Lung	1.35±0.18	1.43±0.10	1.40±0.04	1.31±0.07	1.19±0.16	1.04±0.52	1.11±0.06	1.08±0.09
Heart	1.01±0.07	1.08±0.12	1.09±0.09	0.96±0.13	0.79±0.07	0.76±0.10	0.80±0.08	0.79±0.05
Kidney	2.15±0.17	2.42±0.20	2.28±0.04	2.25±0.14	1.60±0.22	1.59±0.16	1.54±0.10	1.63±0.17
Liver	9.84±0.85	10.01±0.95	10.36±0.82	9.48±0.21	6.60±0.87	6.18±0.58	6.40±0.44	6.08±0.57
Spleen	0.7±0.05	0.76±0.12	0.74±0.09	0.7±0.10	0.51±0.03	0.51±0.04	0.54±0.14	0.50±0.08
Testis/Ovary	2.84±0.10	2.97±0.17	2.80±0.30	2.95±0.20	0.12±0.01	0.13±0.02	0.12±0.04	0.12±0.01

Values are presented as means ± S.D. for 5 rats.

⑥ 혈액학적 검사 및 혈액 생화학적 검사

대조군과 시험물질 투여군에서 시험물질 투여 후 혈액학적 및 혈액생화학적 검사에서 유의할 만한 변화가 없었다.

Table 46. Hematological values in SD rats orally administered with *Lindera obtusiloba* Bl. extract for 14-day repeated toxicity test.

Item	Male(mg/kg)				Female(mg/kg)			
	0	500	1000	2000	0	500	1000	2000
WBC ($10^3/mm^3$)	4.6±1.5	5.6±1.9	4.2±1.2	5.9±0.6	4.0±0.5	3.3±1.1	3.4±1.5	3.6±1.6
RBC ($10^6/mm^3$)	7.3±0.3	7.3±0.3	7.1±0.2	7.3±0.3	7.8±0.3	7.8±0.3	7.5±0.3	7.4±0.3
Hb (g/dl)	15.1±0.5	15.4±0.6	14.9±0.4	15.5±0.8	15.9±0.4	16.1±0.4	15.5±0.5	15.2±0.6
Hct (%)	46.5±2.2	46.6±2.9	46.2±1.4	47.2±2.3	47.6±0.7	47.4±0.9	46.0±2.0	45.2±2.1
MCV (μ^3)	63.7±1.6	63.8±2.2	64.7±0.7	64.6±2.1	61.3±2.3	60.7±2.2	61.2±1.5	61.0±1.1
MCH (pg)	20.7±0.5	21.1±0.6	20.9±0.4	21.2±0.4	20.6±0.5	20.7±0.7	20.6±0.4	20.5±0.2
MCHC (g/dl)	32.4±1.0	33.2±0.9	32.3±0.6	32.9±0.6	33.5±0.6	34.1±0.9	33.8±0.6	33.6±0.4
PLT ($10^3/mm^3$)	421.0±235.8	432.2±267.2	434.4±180.5	455.8±76.0	476.2±57.6	435.8±145.2	442.4±171.5	432.4±239.1

Values are presented as means ± S.D. for 5 rats.

Table 47. Serum biochemical values in SD rats orally administered with *Lindera obtusiloba* Bl. extract for 14-day repeated toxicity test.

Item	Male(mg/kg)				Female(mg/kg)			
	0	500	1000	2000	0	500	1000	2000
T.P (g/dl)	6.1±0.1	6.1±0.4	6.0±0.1	6.2±0.1	6.1±0.2	6.2±0.3	6.2±0.3	6.1±0.1
ALB (g/dl)	3.9±0.1	3.8±0.2	3.9±0.0	3.9±0.1	4.0±0.2	4.0±0.1	3.9±0.2	3.9±0.1
GLU (g/dl)	152.6±11.2	153.8±10.2	145.0±4.8	154.8±11.0	145.2±9.9	138.6±15.4	14.8±14.0	138.0±14.6
CHOL (mg/dl)	74.4±4.5	72.8±3.9	72.6±3.6	75.4±6.6	79.4±5.7	80.6±7.1	77.4±8.3	75.0±3.7
T.BIL (mg/dl)	≤0.1	≤0.1	≤0.1	≤0.1	≤0.1	≤0.1	≤0.1	≤0.1
GPT (IU/I)	45.4±5.1	45.2±4.3	42.8±3.9	42.0±3.7	43±7.9	40.4±8.1	38.0±7.1	39.0±4.4
GOT (IU/I)	123.8±16.0	112.2±10.6	128.2±6.6	125.2±15.6	119.0±21.7	128.6±15.6	124.8±20.5	119.4±12.5
ALP (IU/I)	318.6±43.1	338.4±42.2	348.6±31.9	332.8±25.5	206.2±27.0	194.2±41.5	213.0±48.2	197.4±37.6

Values are presented as means ± S.D. for 5 rats.

⑦ 조직병리학적 검사

대조군과 모든 용량의 투여군에서 간과 신장에서 병변이 관찰되지 않았다. 또한 특히 대조군을 포함하여 생강나무 추출물의 용량에 따른 병변의 수나 정도에 있어서 차이를 확인할 수 없었으며, 병변이 동물의 건강상태나 다른 실험 결과에 영향을 미칠만한 의미 있는 것으로 판단되지 않았다.

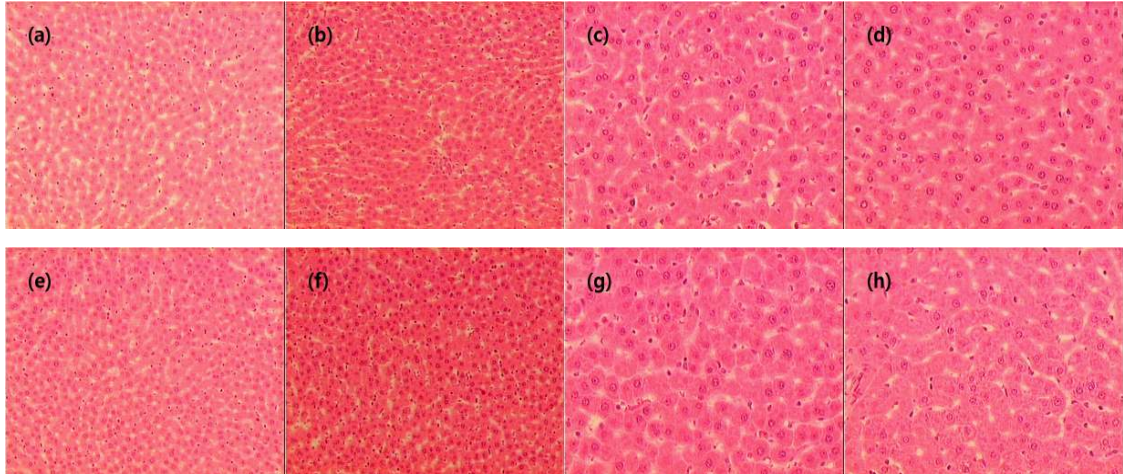


Fig. 66. Representative microscopic findings of the liver of SD rats treated orally with *Lindera obtusiloba* Bl. extract for 14 days.

The samples (a) through (d) are from female, and samples (f) through (h) are from male. (a) 0 mg/kg; (b) 500 mg/kg; (c) 1000 mg/kg; (d) 2000 mg/kg; (e) 0 mg/kg; (f) 500 mg/kg; (g) 1000 mg/kg; (h) 2000 mg/kg (hematoxylin-eosin stain, $\times 200$).

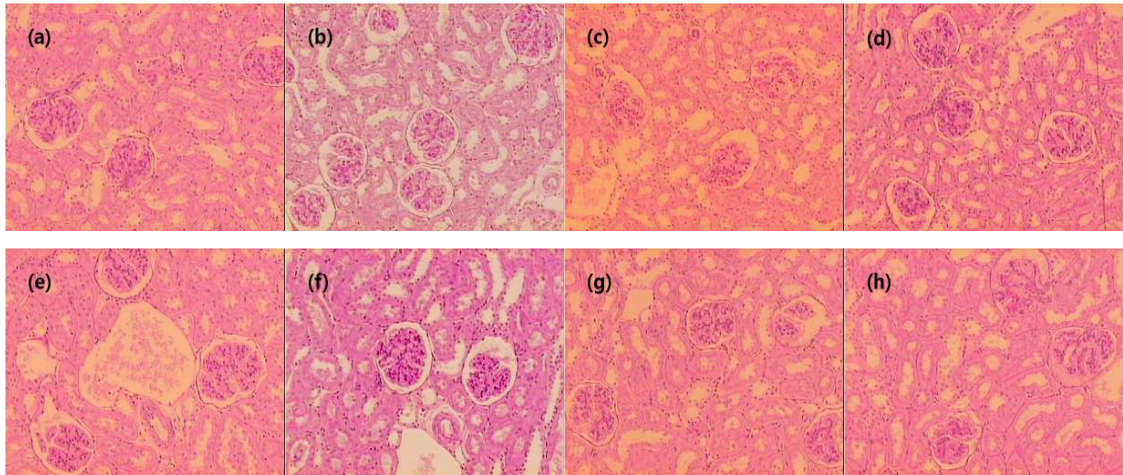


Fig. 67. Representative microscopic findings of the kidney of SD rats treated orally with *Lindera obtusiloba* BL extract for 14 days.

The samples

(a) through (d) are from female, and samples (f) through (h) are from male.

(a) 0 mg/kg; (b) 500 mg/kg; (c) 1000 mg/kg; (d) 2000 mg/kg; (e) 0 mg/kg; (f) 500 mg/kg; (g) 1000 mg/kg; (h) 2000 mg/kg (hematoxylin-eosin stain, $\times 100$).

나. 생강나무 추출 기능원인물질의 정제 및 구조해석^{57), 84~88)}

전 세계적으로 현대 의학을 보완하는 대체의학에서 대한 관심이 높아짐에 따라 부작용이 적은 천연물 소재의 의약 대체품들이 주목받고 있다. 그 중 천연식물이 주목받고 있는데 이는 천연 식물들의 우수한 기능성 때문에 의약품이나 기능성 식품으로서의 이용 가치가 점차 증가하고 있기 때문이다. 그러나 실제로 이용되고 있는 식물들 중에서 어떠한 물질들이 그러한 역할을 하는지 제대로 알려져 있지 않다. 따라서 본 연구는 생강나무 추출물에 대하여 어떠한 물질이 기능을 나타내는지 알기 위하여 컬럼 정제법과 HPLC 및 NMR 분석을 통하여 단일물질로 정제하고 그 물질이 무엇인가를 밝혀낸다.

(1) 목표

생강나무 추출물에서 기능원인 물질을 컬럼 정제법과 HPLC 및 NMR 분석을 통하여 단일물질로 정제하고 그 물질이 무엇인가를 밝혀낸다.

(2) 방법

(가) 활성이 높은 ETOAc 유기용매 분획층을 vacuum liquid chromatography (VLC)와 prep HPLC를 사용하여 단일물질로 정제

① VLC 조건

편넬에 역상 레진을 충전 시킨 후 증류수에 녹인 일정량의 샘플을 흡착 시킨 후, 용출 용매 MeOH을 0%(D.W.:100%)에서 100%(D.W.:0)까지 25% 단위로 단계별로 500mL씩 용출시켜 분획을 얻는다.

② Prep HPLC 조건 및 단일물질 확인 HPLC 조건

Table 48. Prep HPLC conditions

Apparatus	: Varian Pro Star (model 210)
Detector	: Varian Pro Star (model 335)
Column	: YMC, S'phere ODS-H 80, 250×20mm I.D.
Mobile phase	: 23% acetonitrile(isocratic elution)
Flow rate	: 8.0 mL/min
Injection volume	: 500 μ L

Table 49. Analytical HPLC conditions

Apparatus	: Varian Pro Star (model 210)
Detector	: Varian Pro Star (model 335)
Column	: Waters Spherisorb® 5 μ m ODS2 (4.6×250mm, Analytical column)
Mobile phase	: 20% → 100% MeOH (linear gradient elution)
Flow rate	: 1.0 mL/min
Injection volume	: 10 μ L

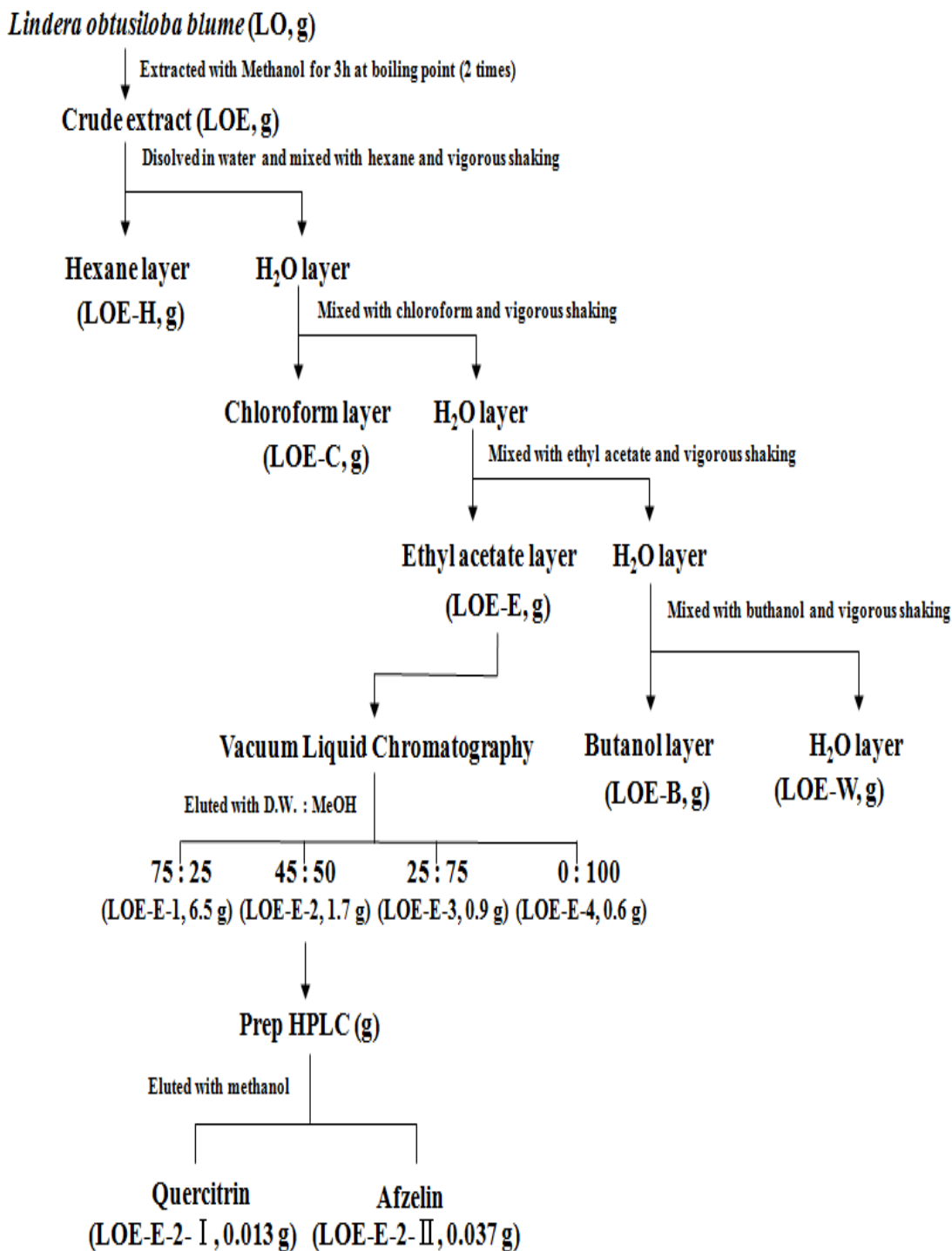
(나) NMR을 이용한 기능원인물질 구조해석

Varian 500 MHz NMR spectrometer를 이용하여 tetramethylsilane(TMS)를 internal standard로 사용하여 분석을 하고, chemical shifts는 δ values로 나타내었다.

(3) 결과

(가) 생강나무 추출물의 단일물질 정제

생강나무잎의 활성이 높은 EtOAc 유기용매 분획층을 scheme ?에서 보는바와 같이 VLC법을 이용하여 4개의 분획층으로 분리를 하고, 여기서 이들 분획층에 대하여 MTT 분석을 실시한 결과(Fig. ?) 50% 분획 층에서 높은 셀 생존율을 보이는 활성을 나타내어, 이 50% VLC 분획층을 가지고 prep HPLC를 이용하여 단일물질로 정제(Fig. ?) 및 분석 컬럼을 이용하여 HPLC로 확인(Fig.?)하였다. 이들 단일물질에 대해서는 추후 구조분석을 하기위한 NMR분석의 시료로 이용하였다.



Scheme 2. Purification scheme for the isolation of the active anti-oxidant compound from the ethanolic extract of *Lindera obtusiloba* Bl.

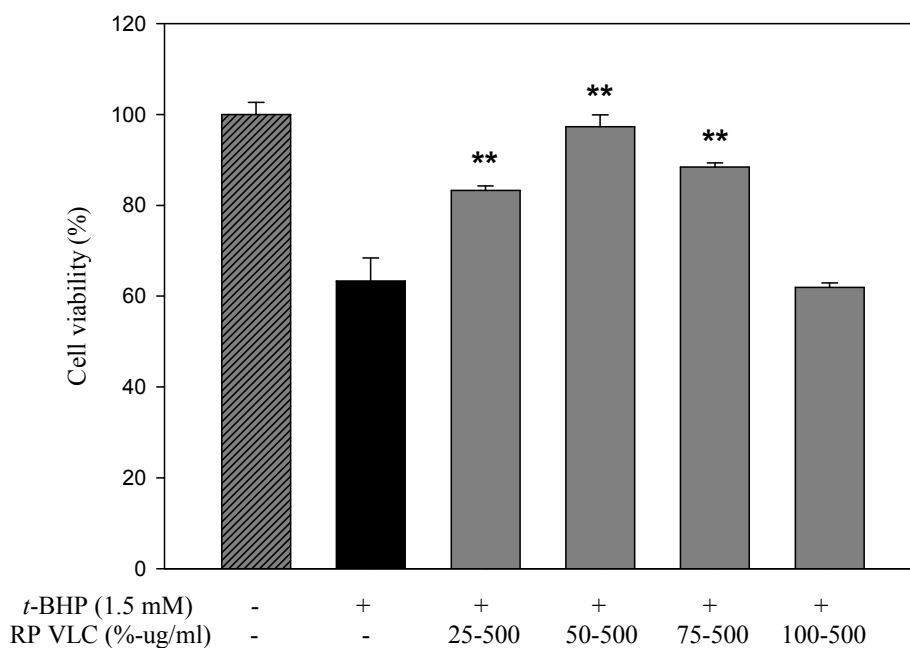
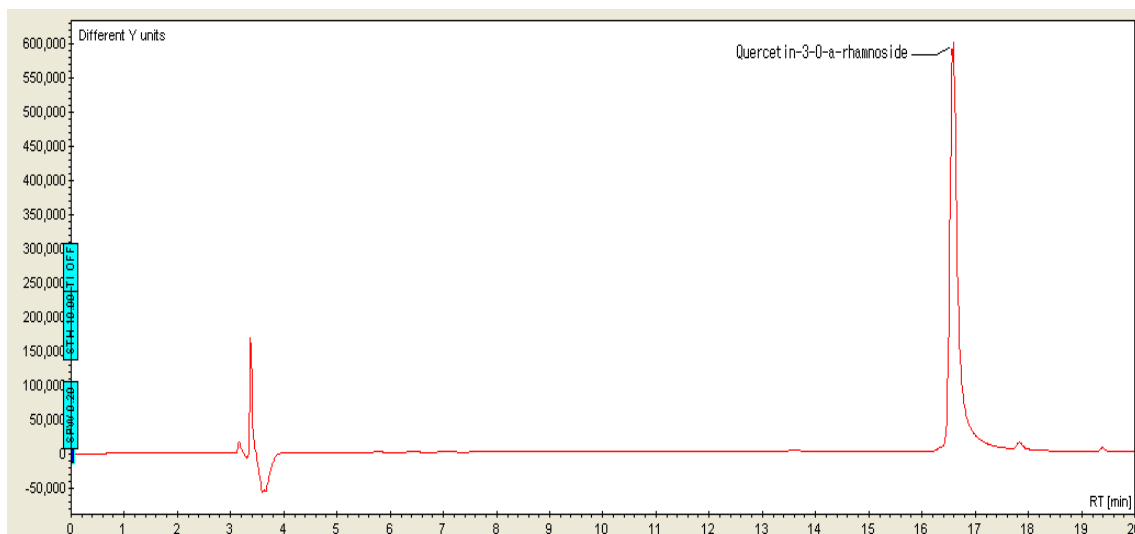


Fig. 68. Protective effects of each fraction of RP VLC on *t*-BHP-induced oxidative stress in Hep G2 cell line.

Cells were treated with 500 $\mu\text{g/mL}$ of each fraction and 0.7 mM *t*-BHP for 2 hr. Cell viability was determined by MTT assay. Results are expressed as mean \pm S.D. (n=3) ** $P < 0.01$, compared with cell treated with *t*-BHP alone.

(A)



(B)

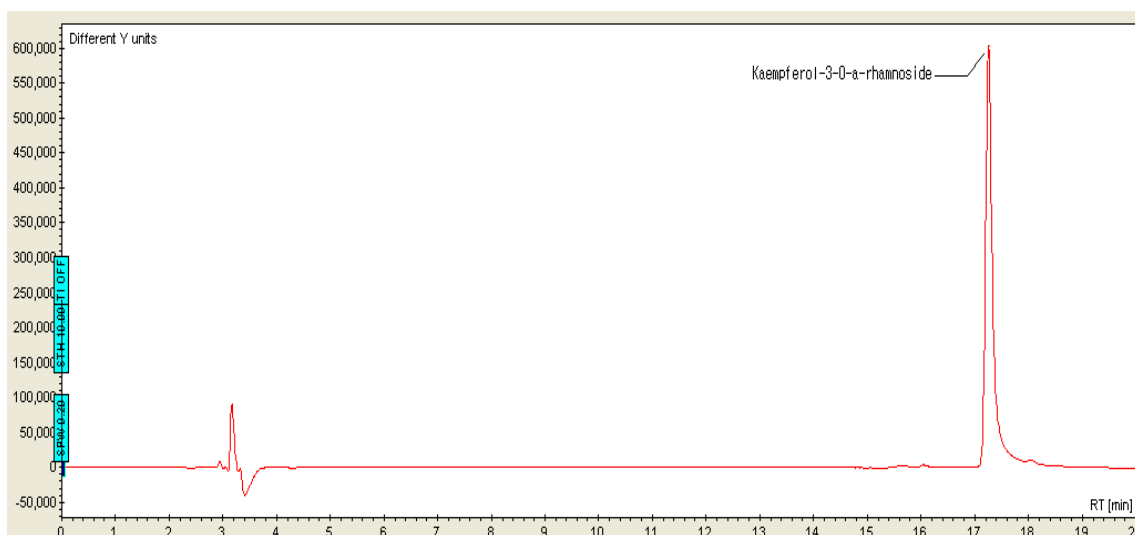


Figure. 69. HPLC chromatogram of purified quercitrin(A) and afzelin(B).

HPLC was performed with a Waters Spherisorb® 5um ODS2 column (4.6×250mm) system equipped with a PDA detector and a reverse phase column using a gradient solvent system of 20% → 100% MeOH at 1.0 mL/min for 20 min.

(나) NMR을 이용한 기능원인물질 구조해석

화합물 LOE-E-2-I 은 황색 분말로 FeCl₃ 시액과 Mg-HCl 반응에 양성이며, MeOH 용액의 UV spectrum에서 351, 257 nm의 흡수대가 나타나 flavonol 유도체로 추정할 수 있었다. ¹H-NMR spectrum에서는 H-6'의 signal이 δ_H 7.41 (1H, dd, *J* = 8.5, 2.0 Hz)에서 관찰되었고, δ_H 7.01 (1H, d, *J* = 8.5 Hz)은 H-6'과 *ortho* coupling을 이루고 있는 H-5'로 확인하였다. 또한 H-2'는 δ_H 7.52에서 *J* = 2.0 Hz인 doublet으로 추정되어 H-6'와 *meta* coupling하고 있음을 알 수 있었고, δ_H 6.48과 6.28에서 flavonoid A환의 H-6 및 H-8의 전형적인 *meta* coupling이 관찰되었으며, 이상의 분광학적 데이터로 aglycone은 quercetin으로 추정할 수 있었다. 또한, δ_H 5.54에서 anomeric proton과 δ_H 0.93 (3H, d, *J* = 6.0 Hz)의 signal은 rhamnose에 기인하는 signal로 확인하였다. ¹³C-NMR spectrum에서는 21 개의 signal을 확인하였으며, ESI-MS spectrum에서는 *m/z* 447 [M - H]⁻에서 molecular ion peak를 관찰할 수 있었다. 이상의 기기 분석 결과 및 문헌과의 비교로 화합물 LOE-E-2-I 은 quercetin C-3의 hydroxy에 rhamnose가 결합되어 있는 quercetin-3-*O*-α-L-rhamnopyranoside (quercitrin)로 동정하였다.

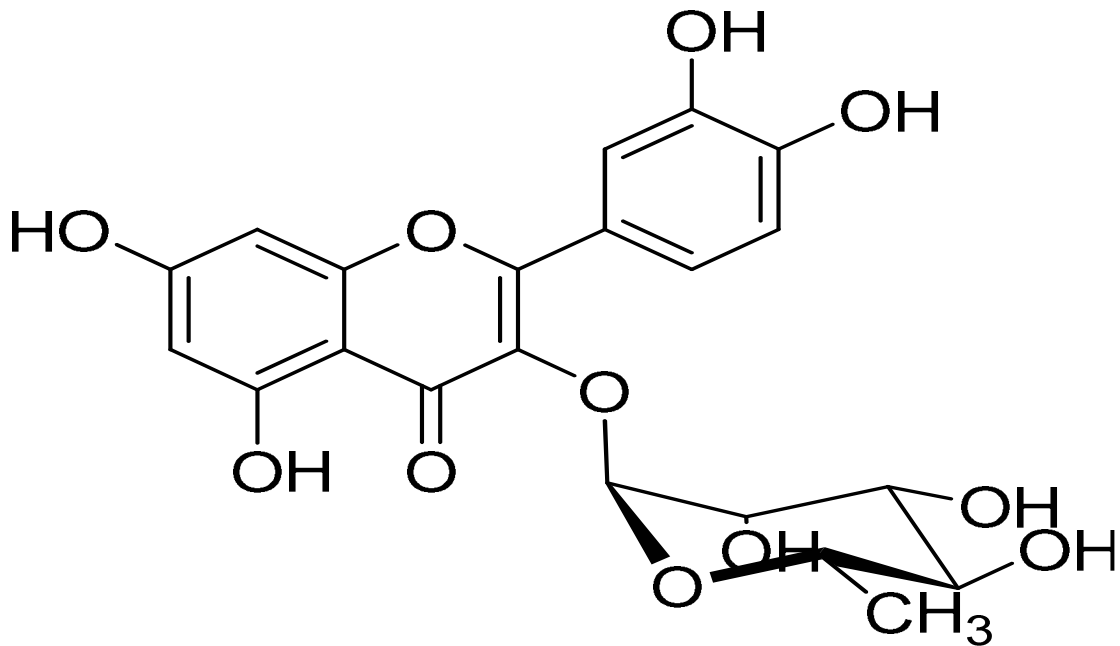


Fig. 70. Structure of quercitrin

화합물 LOE-E-2-II는 등황색의 분말상 결정으로 FeCl₃ test에서 오록색, Mg-HCl 반응에서 홍색을 각각 나타냈으며, ESI-MS spectrum에서는 m/z 431 [M - H]⁻에서 molecular ion peak를 관찰할 수 있었다. UV spectrum에서는 342 및 264 nm에서 흡수극대를 나타내어 flavonol 유도체로 추정할 수 있었다. ¹H-NMR 스펙트럼 중 aromatic field의 δ_H 6.49와 6.28에서 flavonoid A환의 H-6 및 H-8의 전형적인 *meta* coupling이 관찰되었으며, δ_H 7.87 (1H, d, $J = 8.0$ Hz)과 7.03 (1H, d, $J = 8.0$ Hz)에서 B환의 H-2', H-3', H-5', H-6'의 AA'BB' type 이 관찰되어, aglycone은 kaempferol로 추정할 수 있었다. 또한, δ_H 5.57 (1H, brs)와 0.91 (3H, d, $J = 5.5$ Hz) 그리고 δ_C 101.9, 72.1, 71.2, 70.6, 70.5, 16.9에서 rhamnose에 기인하는 signal을 확인하였다. 이상의 결과로 화합물 LOE-E-2-II는 afzelin (kaempferol-3-O- α -L-rhamnopyranoside)으로 추정하였으며, 보고된 문헌과의 비교로 일치함을 확인하였다.

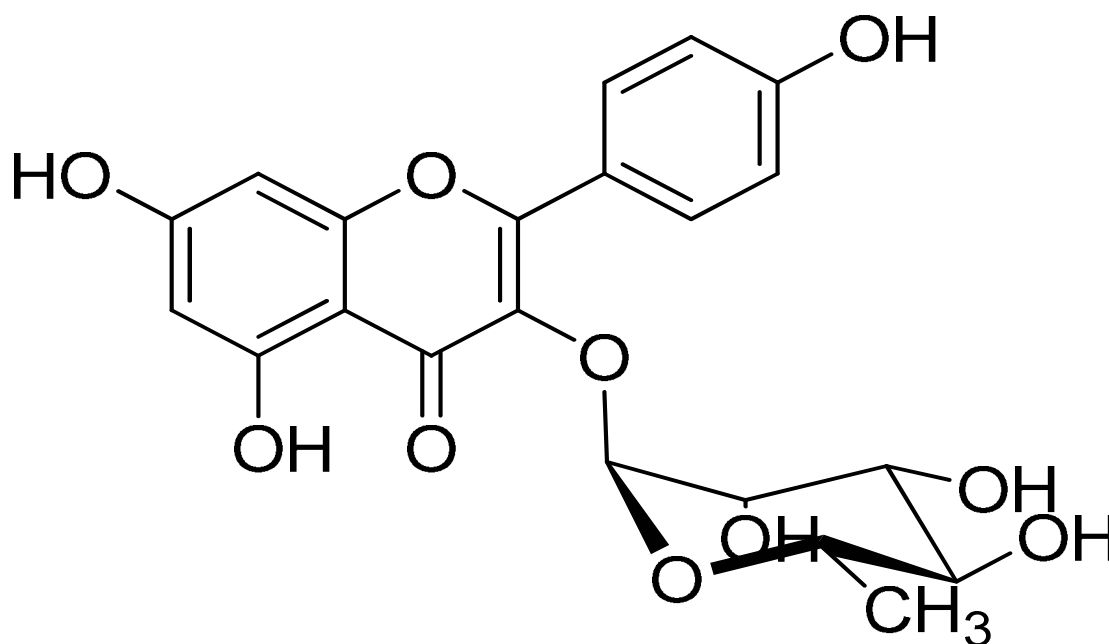


Fig. 71. Structure of afzelin

다. 적요

단회투여 독성시험의 결과, 시험물질 투여와 관련하여 유연이 투여직후에 일시적으로 관찰되었다. 수컷에서 투여당일에 관찰된 설사는 발생빈도가 낮은 것으로 보아 시험물질 투여와 관련되지 않는 것으로 사료되었다. 한편 암수 모든 시험군에서 시험물질 투여와 관련된 사망률, 체중변화 및 육안적인 부검소견은 관찰되지 않았으며, 본 시험에서 5000mg/kg의 용량은 경구투여 급성독성시험에서 실제적 무독성량(practically nontoxic)을 투여한 용량이었다. 결론적으로 생강나무 잎의 70% 에탄올 추출물의 암수 랫드에 5000mg/kg 용량으로 단회 경구투여는 유연의 일반증상을 유발하였지만, 암수 랫드에서 본 시험물질의 개략의 치사량은 5000mg/kg을 상회하는 것으로 판단된다.

14일 반복투여 독성시험의 결과, 생강나무 추출물을 14일간 경구투여한 후 일반증상 관찰시 모든 암수 동물에 이상 징후가 발견되지 않았고, 실험도중 사망한 개체도 없었으며 없었다. 체중변화 및 사료, 음수 섭취량 관찰 결과를 볼 때도 별다른 이상 징후가 발견되지 않았다. 실험 종료 후 부검을 실시하여 장기무게 및 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사를 실시했으나 대조군 및 시험물질 투여군에서 독성을 나타낸다고 인지할 수 있을 정도의 통계적으로 유의적인 차이가 발생하지 않았다. 조직 병리학적 검사에서 간과 신장을 현미경으로 관찰한 경우에도 독성 증상이 발견되지 않았기에 최소 치사량은 2000mg/kg을 상회하는 것으로 판단된다. 따라서 차후의 생강나무 추출물에 대한 13주 반복투여 독성평가를 위해서는 시험물질의 최고용량을 2000mg/kg으로 설정함이 타당하다고 판단된다.

생강나무 추출물에서 기능원인 물질을 분리·정제하기 위하여 1차년도에서 극성별 유기용매를 이용하여 1차 분리를 하고, 활성 검증을 통하여 활성이 높은 층이 EtOAc 층임을 확인하였다. 이 EtOAc 층을 RP VLC법을 이용 1차 정제를 하고, 재차 활성 검증을 통하여 50% MeOH 희분에서 활성이 높음을 확인함과 동시에 prep HPLC법을 이용 두 개의 단일물질로 정제를 하였다. 이 두 개의 단일물질은 분석컬럼을 이용한 HPLC로 단일물질로 확인하고, NMR 분석을 통하여 그 두 개의 단일물질이 quercetin-3-O- α -rhamnoside(quercitrin)와 kaempferol-3-O- α -rhamnoside(afzelin)임을 확인하였다.

이로써 생강나무 잎에서 강한 기능을 나타내는 주요물질이 quercitrin과 afzelin임을 확인 할 수 있다.

제 3 절: 제 1 협동-생강나무 추출물을 이용한 미백 효과 검색 및 분자생물학적 기전연구

(경희대 정세영 교수팀)

1. 생강나무에서 생산된 시료를 이용하여 human keratinocyte에서 ROS 소거능 및 cytokine 생성 억제능 검색

가. 여러 가지 생강나무 추출 재료의 Reactive oxygen species (ROS) 소거능 측정

자외선에 의해 생성된 활성산소는 표피 내 melanocyte의 증가, melanocyte에서의 melanin 생성증가, melanocyte의 keratinocyte로의 melanin 분비 촉진효과를 일으켜 표피의 색소침착^{8 9~93)}을 유도한다. 또한 keratinocyte에서 cytokine의 분비를 촉진^{94~96)}시켜 tyrosinase의 activity를 유도한다.

생강나무 추출물을 이용하여 활성산소 생성에 미치는 영향을 알아보려고 한다.

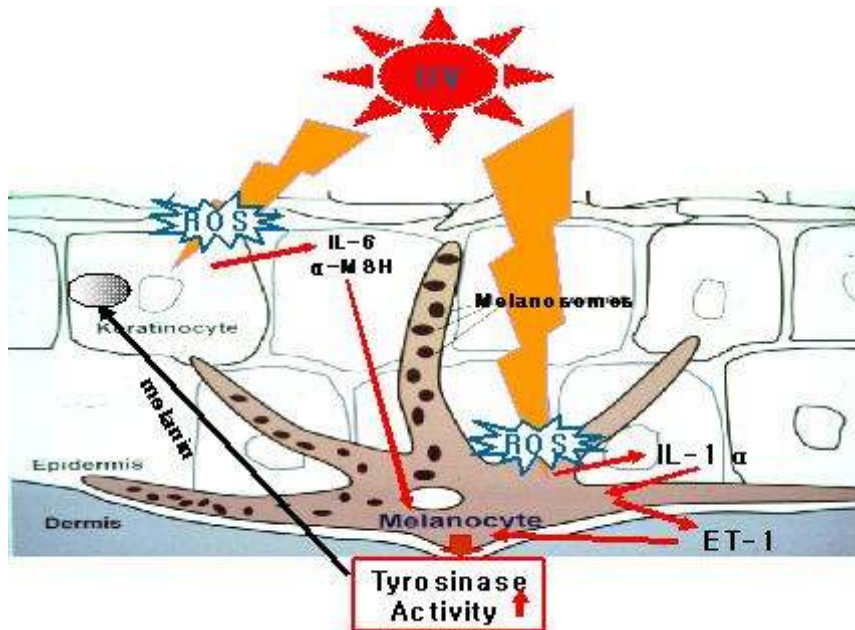


Fig. 72. 생체내 생성된 활성산소에 의한 melanosome 에서의 melanogenesis 과정.

(1) Cell-free system

(가) DPPH assay

각 농도 별로 조제한 생강나무 잎 추출물 5, 10 50, 100, 500, 1000 $\mu\text{g/ml}$ 의 용액과 가지·줄기 혼합 추출물 10, 50, 100, 500 $\mu\text{g/ml}$ 의 용액 20 μl 와 70% ethanol 100 μl , 95 % ethanol에 녹인 0.15 mM DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)용액 80 μl 를 넣고 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30분 동안 방치시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조 약물로서는 ascorbic acid(vitamin C) 0.5, 1.0, 5.0, 10, 50 $\mu\text{g/ml}$ 을 사용하였으며 결과는 시료를 처리하지 않은 군에 대한 percentage(%)로 표기하였다.

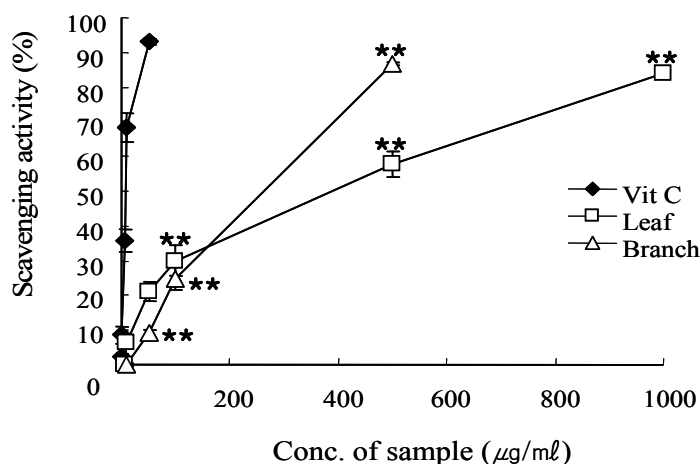


Fig. 73. DPPH radical scavenging activity of *Lindera obtusiloba* Bl. extract.

Values are mean \pm SD (n= 3), ** $p < 0.01$ vs CTL

생강나무 여러 부위별 (잎, 가지/줄기) 추출물의 DPPH radical 소거능은 잎의 경우 5.0~1000 $\mu\text{g/ml}$ 에서 농도 의존적인 경향을 나타냈으며, 가지/줄기 혼합 추출물의 경우 0.5~500 $\mu\text{g/ml}$ 에서 농도 의존적인 경향을 나타냈다. 잎 추출물 1000 $\mu\text{g/ml}$ (84%), 가지/줄기 추출물 500 $\mu\text{g/ml}$ (87%)에서 나타나는 소거능은, 생강나무 추출물이 가지는 고유의 짙은 색으로 인해 높은 농도에서의 흡광도 값이 일정하지 못하여 항산화 검색에 간섭을 최소화할 수 있는 농도 범위에서 검색한 결과이다 (Fig. 73.). IC_{50} 은 Vit C는 7.47 $\mu\text{g/ml}$, 잎은 243.14 $\mu\text{g/ml}$ 이며, 가지/줄기는 181.10 $\mu\text{g/ml}$ 이다.

(나) Superoxide radical assay

① Xanthine-xanthine oxidase

Xanthine-xanthine oxidase는 superoxide radical($O_2^{\cdot-}$)을 발생시키는 대표적인 실험계이다. 시험관에 55 mM Potassium phosphate buffer(pH 7.5) 1.8 ml, 0.15 mM xanthine 1ml과 각 농도별로 조제한 생강나무잎 추출물 1.0, 5.0, 10, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 과 가지·줄기 혼합 추출물 1, 10, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 용액 0.1 ml, xanthine oxidase 0.1 ml를 혼합하고 실온에서 20분 방치시킨 후 1 N HCl 1 ml을 가하여 반응을 정지 시키고 290 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조 약물로는 xanthine oxidase 억제 작용이 있는 약물로 널리 알려진 allopurinol 0.68, 1.36, 6.8, 13.36, 136 $\mu\text{g/ml}$ 을 사용하였으며 결과는 시료를 처리하지 않은 군에 대한 percentage (%)로 표기하였다.

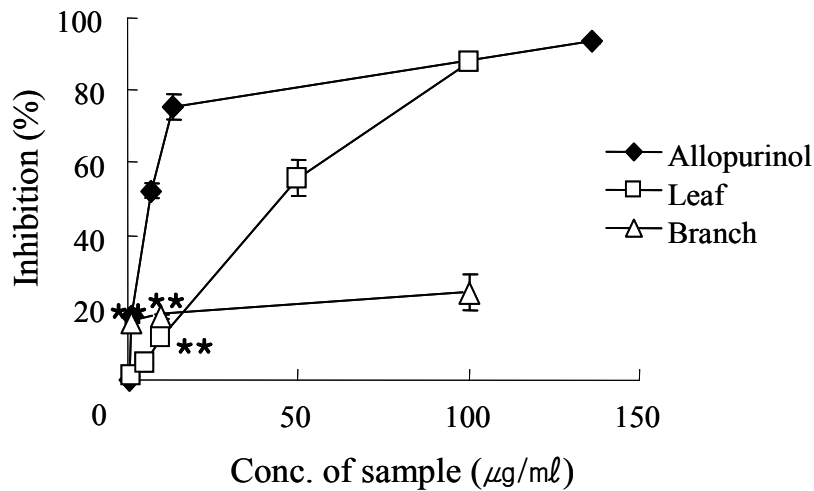


Fig. 74. Superoxide radical scavenging activity (enzymatic system) of *Lindera obtusiloba* Bl. extract.

Values are mean \pm SD (n= 3), ** $p<0.01$ vs CTL

효소적 superoxide radical 생성계인 xanthine-xanthine 계에서의 superoxide radical 소거능은 Fig. 74.에서 보는 바와 같이 잎의 경우 50 $\mu\text{g/ml}$ 에서 농도 의존적으로 소거되는 경향을 나타냈으며, 가지/줄기 혼합 추출물의 경우 10 $\mu\text{g/ml}$ 에서 농도 의존적으로 소거되는 경향을 보였다. IC_{50} 은 allopurinol은 68 $\mu\text{g/ml}$, 잎은 35.47 $\mu\text{g/ml}$ 이며, 가지/줄기는 $> 100 \mu\text{g/ml}$ 이었다.

② NADH-PMS

24 well plate에 각 농도 별로 조제한 생강나무 잎 추출물 1.0, 5.0, 10, 50, 100, 500 $\mu\text{g/ml}$ 과 가지/줄기 혼합 추출물 1.0, 10, 100, 1000 $\mu\text{g/ml}$ 용액 20 μl 에 30 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) 100 μl 와 100 μM PMS (Phenazine methosulfate) 20 μl , 0.5 mM NADH 40 μl , 0.5 mM NBT 20 μl 를 혼합하여 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 20분 동안 방치한 후 560 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조 약물로서는 ascorbic acid 0.01, 0.1, 1.0, 10, 100, 1000 $\mu\text{g/ml}$ 를 사용하였으며 결과는 시료를 처리하지 않은 군에 대한 percentage (%)로 표기하였다.

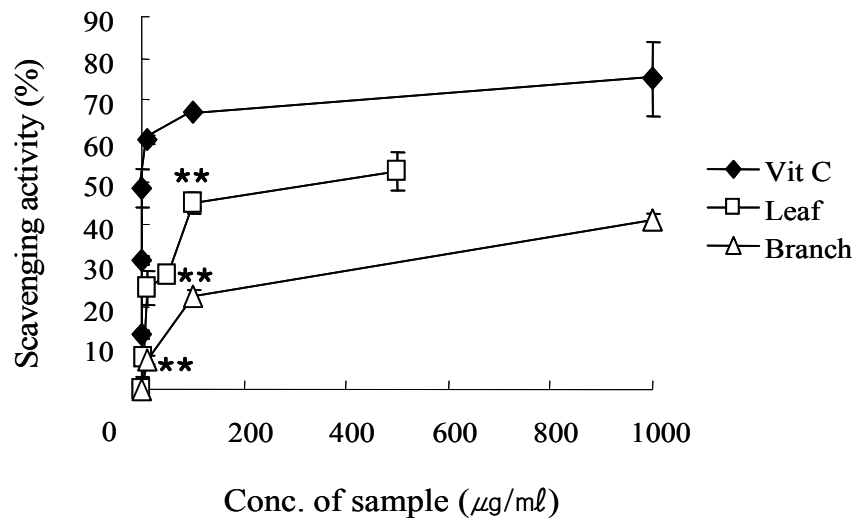


Fig. 75. Superoxide radical scavenging activity (nonenzymatic system) of *Lindera obtusiloba* Bl. extract.

Values are mean \pm SD (n= 3), ** $p < 0.01$ vs CTL

비효소적 superoxide radical 생성계인 NADH/PMS 에서의 superoxide radical 소거능은 잎의 경우 1~500 $\mu\text{g/ml}$ 에서 농도 의존적으로 소거되는 경향을 나타냈으며, 가지/줄기 혼합 추출물의 경우 1~1,500 $\mu\text{g/ml}$ 에서 농도 의존적으로 소거되는 경향을 보였다 (Fig. 75). IC_{50} 은 Vit C는 3.42 $\mu\text{g/ml}$, 잎은 165.77 $\mu\text{g/ml}$ 이며, 가지/줄기는 $> 1500 \mu\text{g/ml}$ 이다.

(다) Hydroxyl radical assay

시험관에 95% ethanol에 녹인 2.5 mM β -carotene 200 μ l에 5.94 mM H_2O_2 , 800 μ l와 26.4 mM $FeSO_4$ 의 농도가 되게 녹인 정제수 800 μ l, 각 농도 별로 조제한 생강나무 잎 추출물 0.5, 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5 mg/ml과 가지·줄기 혼합 추출물 0.5, 1.0, 1.5 mg/ml 용액 200 μ l를 혼합한 후 곧바로 536 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조 약물로서는 mannitol 0.0018, 0.0091, 0.0182, 0.091, 0.182, 0.91, 1.82 mg/ml을 사용하였으며 결과는 시료를 처리하지 않은 군에 대한 percentage (%)로 표기하였다.

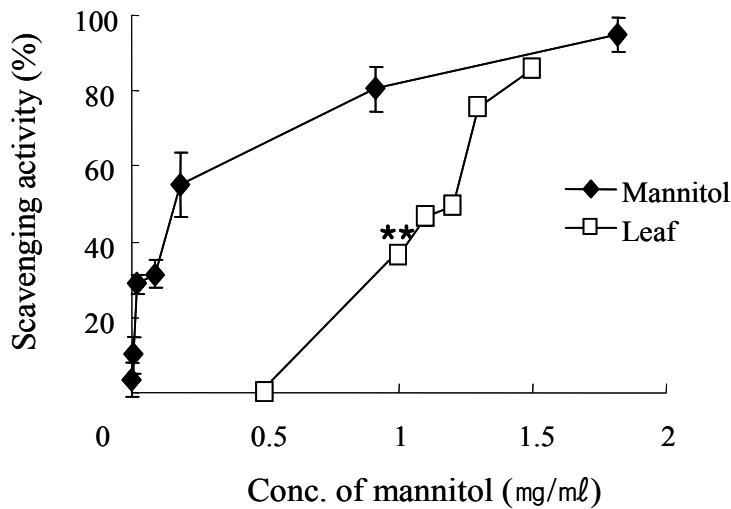


Fig. 76. Hydroxyl radical scavenging activity of *Lindera obtusiloba* Bl. extract.

Values are mean \pm SD (n= 3), ** $p < 0.01$ vs CTL

생강나무 잎 추출물의 hydroxyl radical 소거능은 생강나무 잎 추출물에서만 확인할 수 있었다. Fig. 76.에서 보는 바와 같이 잎 추출물 1.0~1.5 mg/ml 범위에서 농도 의존적으로 소거하였으며, 그 효과는 잎 추출물의 IC_{50} 수치가 1.21 mg/ml로 hydroxyl radical 소거제인 mannitol의 IC_{50} 수치 0.159 mg/ml과 비교했을 때 10배 정도의 활성 산소 소거능 차이를 알 수 있었다.

(라) Singlet oxygen assay

100 mM sodiumphosphate buffer (pH 7.1) 200 μ l, 10 mM histidine 200 μ l, 10 mM NaOCl 200 μ l, 10 mM H₂O₂ 200 μ l, 50 μ M N,N-dimethyl-*p*-nitrosoaniline 200 μ l에 농도별 생강나무 추출물 용액 200 μ l를 섞고 37 $^{\circ}$ C에서 40 분간 방치한 후 440 nm에서 측정한다. 대조 약물로는 ascorbic acid (vitamin C) 를 사용하였으며, 결과는 시료를 처리하지 않은 군에 대한 percentage (%)로 표기하였다.

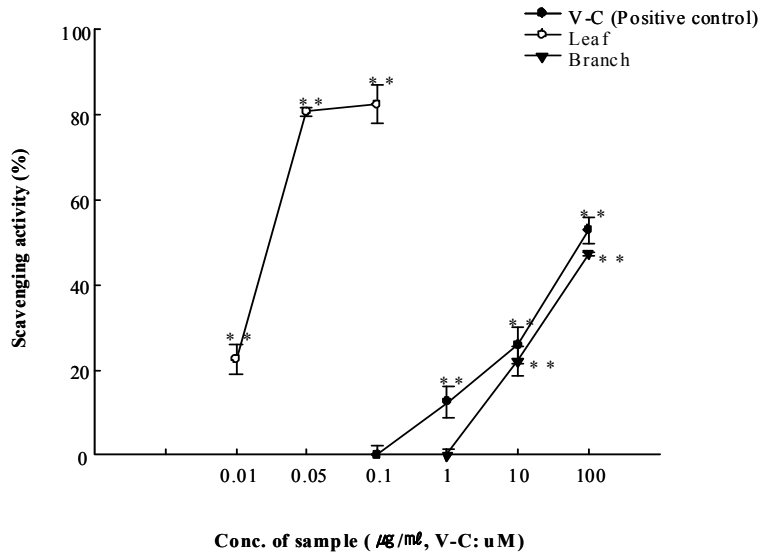


Fig. 77. Singlet oxygen scavenging activity of *Lindera obtusiloba* Bl. extract.

Values are mean \pm SD (n= 3), ** p <0.01 vs CTL

생강나무 추출물의 singlet oxygen radical 소거능은 잎 추출물 0.1 μ g/ml에서 82 %로 V-C 10 mM에서 보이는 소거능 (26%)에 비해 3 배 이상 탁월한 소거능을 보였다. 생강나무 추출물은 singlet radical 소거능 검색법에서 100 μ g/ml 이상의 농도에서는 색으로 인한 간섭을 보였으므로 그 이하의 농도에서 검색하였으며, 비교적 저농도에서 보이는 소거능이 매우 우수함을 알 수 있었다. IC₅₀은 V-C는 72.52 μ M, 잎은 0.02 μ g/ml 이며, 가지/줄기는 96.01 μ g/ml 이었다 (Fig. 77).

(2) Human keratinocyte에서의 ROS 생성 저해능 측정

(가) Human keratinocyte 의 배양

① 물질 독성

24-well plate에 human keratinocyte를 10^5 cells/well씩 seeding을 하고 17 시간 방치 후 농도별 생강나무 추출물을 처리하였다. 17시간 후 cell의 부착을 확인한 후 배지를 걷어내고 각 농도 별로 배지에 녹여 조제한 생강나무 잎 추출물 1.0, 5.0, 10, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 을 각 well에 1 ml씩 분주하였다. 24 시간 동안 CO_2 incubator에서 배양한 후 MTT 용액을 넣고, 다시 4 시간 동안 CO_2 incubator에서 배양하였다. 배지를 제거하고, DMSO로 cell을 녹여 560 nm에서 흡광도를 측정하였다. 결과는 시료를 처리하지 않은 군에 대한 percentage (%)로 표기하였다.

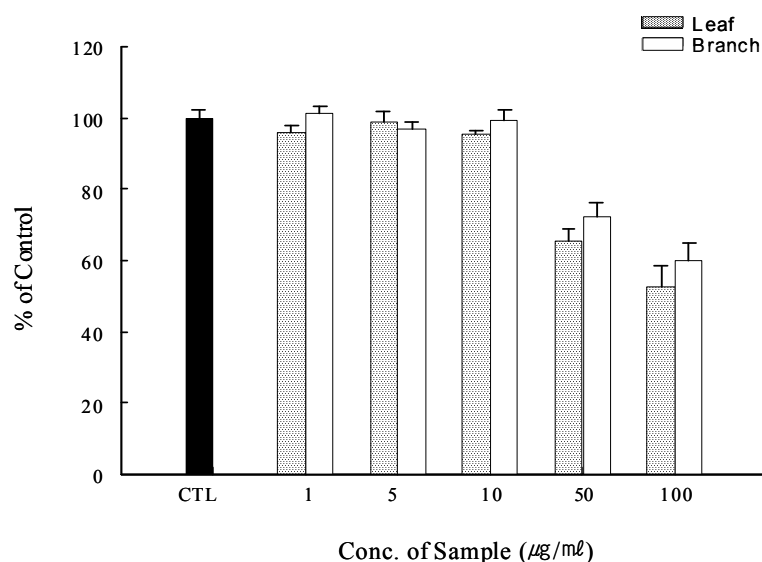


Fig. 78. Cytotoxicity of *Lindera obtusiloba* BL. extract on B16 melanoma F10.

Values are mean \pm SD (n= 3), ** $p < 0.01$ vs CTL

생강나무 추출물의 세포 독성은 잎, 가지/줄기 혼합 추출물이 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도 이상에서 독성이 있음을 확인하였다 (Fig. 78.). 이 후의 Human keratinocyte에서 ROS 소거능과 IL-6의 분비 억제능 측정은 독성이 나타나지 않은 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 실시하였다.

(나) ROS 생성 저해능 측정

피부에서 자외선에 의하여 자극을 받았을 때 keratinocyte에서 생성되는 ROS를 측정하기 위하여 keratinocyte를 24 well plate에 10^5 cells/well 씩 seeding을 하고, 17 시간 방치 후 cell의 부착을 확인한 후 배지를 걷어내고 배지에 녹여 조제한 생강나무 추출물 용액을 각 well에 2 ml씩 분주한 후 24 시간 방치한다. 방치가 끝나면 배지를 걷어내고 PBS (phosphate buffered saline)을 400 μ l씩 분주하고 UV (ultraviolet) B 조사광원으로 45 mJ/cm^2 로 조사한 뒤 60분까지 10분 간격으로 생성된 ROS의 양을 측정하였다.

① Superoxide radical assay

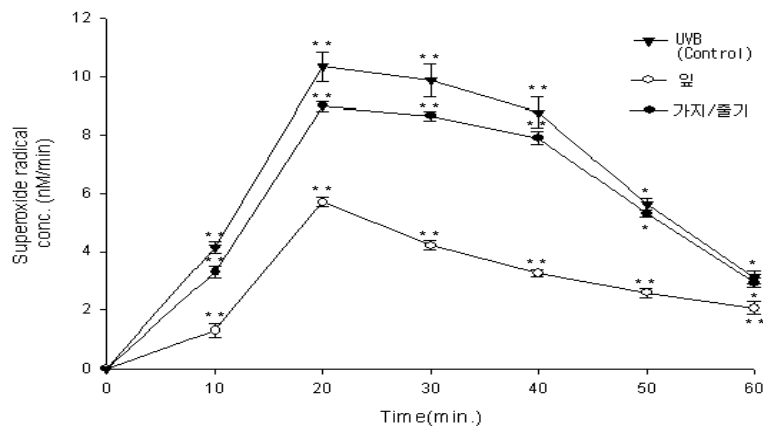


Fig. 79. Superoxide radical from keratinocyte treated extracts of *Lindera obtusiloba* Bl. after UVB irradiation.

Values are mean \pm SD (n= 3), * $p < 0.01$, ** $p < 0.01$ vs Positive CTL

Keratinocyte 에서 자외선을 조사한 후 생성되는 superoxide radical에 대해 생강나무 추출물의 radical 생성량은 잎 추출물의 경우 10, 20, 30, 40, 50, 60 분에서 대조군에 비해 31, 55, 42, 37, 45, 65 %의 생성량을 보였으며 가지/줄기 혼합 추출물은 79, 86, 87, 89, 94, 94 %의 생성량을 보였다. 10 분에서 40 분까지는 농도 의존적으로 감소하였으며 그 이후의 시간에서는 잎 추출물을 처리한 군에서 유의성있는 감소를 보였다 (Fig. 79).

② Hydroxyl radical

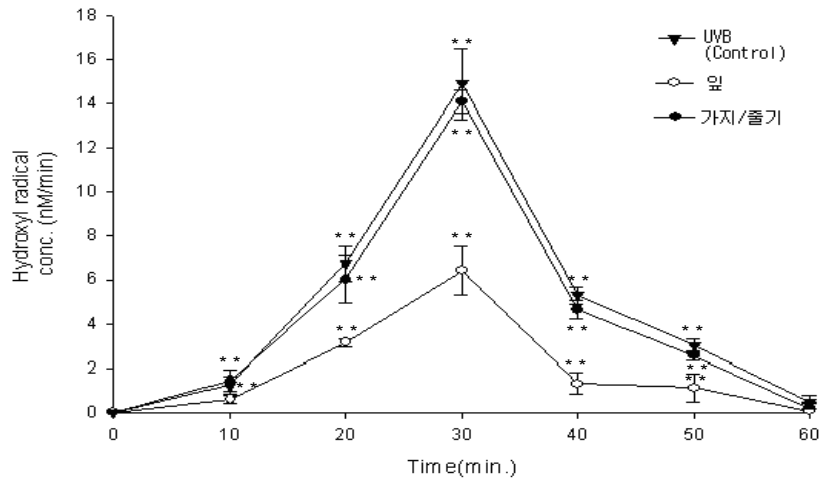


Fig. 80. Hydroxyl radical from keratinocyte treatedde xtracts of *Lindera obtusiloba* Bl. after UVB irradiation.

Values are mean \pm SD (n= 3), * $p < 0.01$, ** $p < 0.01$ vs Positive CTL

Keratinocyte 에서 자외선을 조사한 후 생성되는 hydroxyl radical에 대해 10 분에서 50 분까지 잎 추출물을 처리한 keratinocyte에서의 생성 량이 감소하였으며 대조군에 대한 생성량의 비율은 10, 20, 30, 40, 50 분에서 46, 46, 42, 24, 37 % 를 나타냈다 (Fig. 80.).

③ Hydrogen peroxide

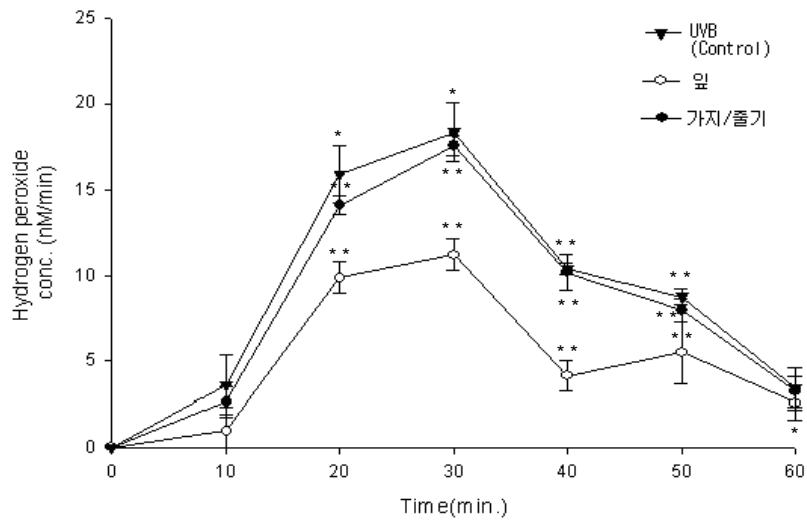


Fig. 81. Hydrogen peroxide from keratinocyte treated extracts of *Lindera obtusiloba* Bl. after UVB irradiation.

Values are mean \pm SD (n= 3), * $p < 0.01$, ** $p < 0.01$ vs Positive CTL

Keratinocyte에서 자외선을 조사한 후 생성되는 hydrogen peroxide에 대해서 20 분부터 50 분까지 잎 추출물을 처리한 keratinocyte에서의 생성량은 대조군에 비하여 유의적인 감소를 보였으며 대조군에 대한 생성량의 비율은 20, 30, 40, 50 분에서 61, 61, 39, 62 % 를 보였다 (Fig. 81.).

④ Singlet oxygen

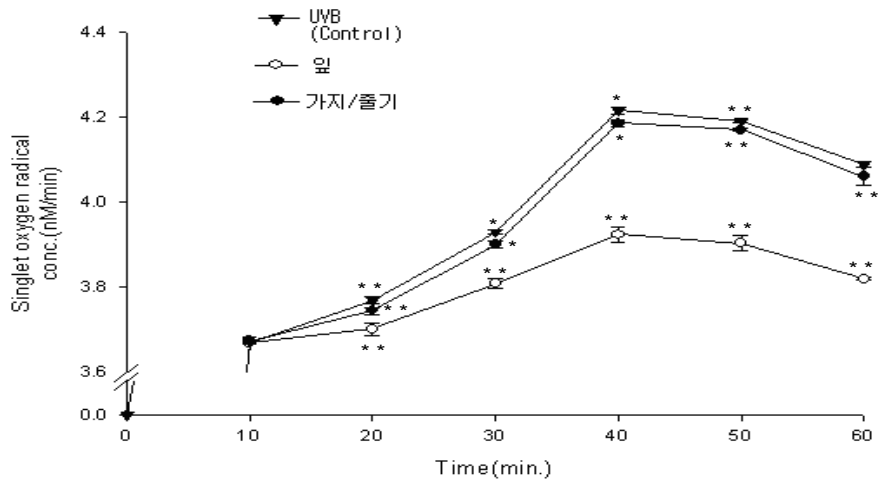


Fig. 82. Singlet oxygen from keratinocyte treated extracts of *Lindera obtusiloba* Bl. after UVB irradiation.

Values are mean \pm SD (n= 3), * $p < 0.01$, ** $p < 0.01$ vs Positive CTL

Keratinocyte에서 자외선을 조사한 후 생성되는 singlet oxygen radical에 대해서 20 분부터 그 이 후의 시간대에서 잎 추출물의 경우 농도 의존적으로 감소하였으며 대조군에 비하여 20 분에서 98 %, 30 분에서 96 %, 40 분에서 60 분까지는 93 %의 생성량을 보였으며 가지/줄기 혼합 추출물의 경우 99 %의 생성량을 보였다 (Fig. 82).

나. 생강나무 추출물의 미백 효과

(1) *In vitro*

(가) Cell-free system

① Tyrosinase activity inhibition

96 well plate에 0.1 M Tris-HCl (pH 6.5) 220 μ l와 농도별로 조제한 생강나무 추출물 용액 20 μ l, 그리고 2,000 U/ml tyrosinase용액 20 μ l를 순서대로 넣고 이 용액에 1.5 mM tyrosine 용액 40 μ l를 넣고 37°C에서 10분 동안 방치시킨 후 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 공시료액으로 0.1 M PBS (pH 6.5) 20 μ l를 넣어 실험하였으며, 대조군으로는 kojic acid를 처리한 군을 사용하였다. 미백능이 있는 시료와 tyrosinase가 있을 경우 시료가 tyrosinase의 활성을 저해하여 기질인 L-dopa와 만났을 때 Dopachrome을 만들지 못하게 하는 원리를 이용하였다.

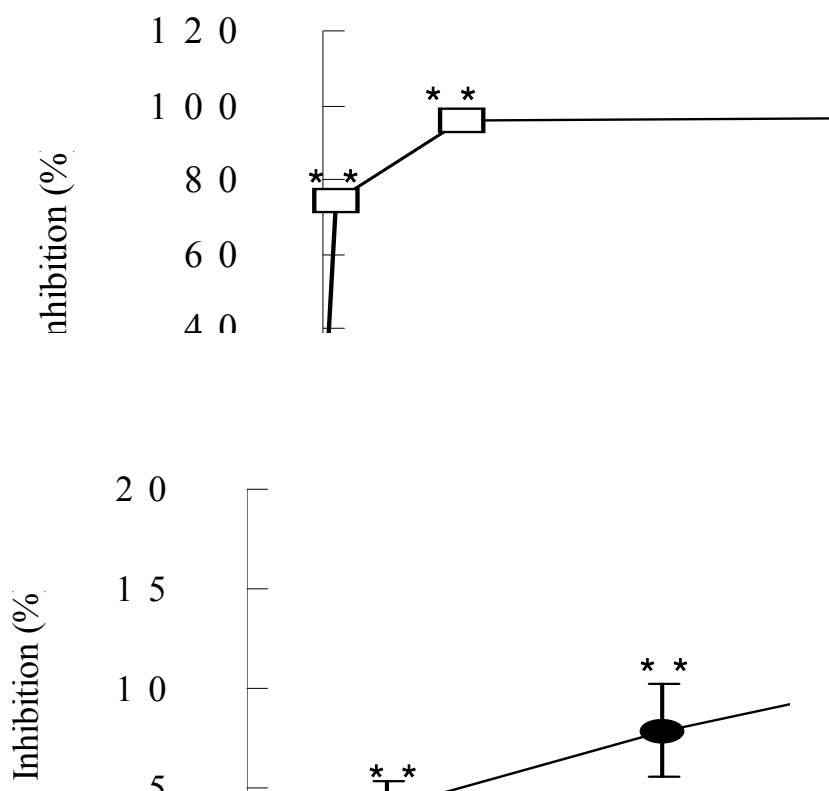


Fig. 83. Tyrosinase activity inhibition of *Lindera obtusiloba* Bl. extracts.

Values are mean \pm SD (n= 3), * p <0.01, ** p <0.01 vs CTL

Tyrosinase 효소 활성 저해 검색에서 생강나무 잎 추출물은 0.1~50 $\mu\text{g/ml}$ 범위에서 14.5 %, 가지/줄기 혼합 추출물은 1~10 mg/ml 의 농도에서 18 %의 활성 저해율을 보였다. 위 결과는 생강나무 추출물 고유의 색으로 인해 간섭을 일으키는 농도 이하에서 검색되었으며, kojic acid는 tyrosinase inhibitor로 0.01 mM에서 잎 추출물 10 $\mu\text{g/ml}$ 에서와 같은 활성 저해율을 나타냈다 (Fig. 83.).

(나) Cell system

① B16 melanoma F10 배양

B16 melanoma F10 cell은 10 % fetal bovine serum 과 penicillin 100 IU/ml, streptomycin 50 $\mu\text{g/ml}$ 을 함유한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)용액에서 37 °C, 0.5 % CO₂ 조건의 CO₂ incubator에서 배양하였다.

② Cell viability

B16 melanoma F10 cell을 24well에 well 당 10⁴cell씩 분주하였다. 17시간 후 cell의 부착을 확인한 후 배지를 걷어내고 각 농도 별로 배지에 녹여 조제한 생강나무 추출물 1.0, 5.0, 10, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 을 각 well에 1 ml씩 분주하였다. 72시간 동안 CO₂ incubator에서 배양한 후 MTT 용액을 넣고, 다시 4시간 동안 CO₂ incubator에서 배양하였다. 배지를 제거하고, DMSO로 cell을 녹여 560 nm에서 흡광도를 측정하였다. 결과는 시료를 처리하지 않은 군에 대한 percentage(%)로 표기하였다.

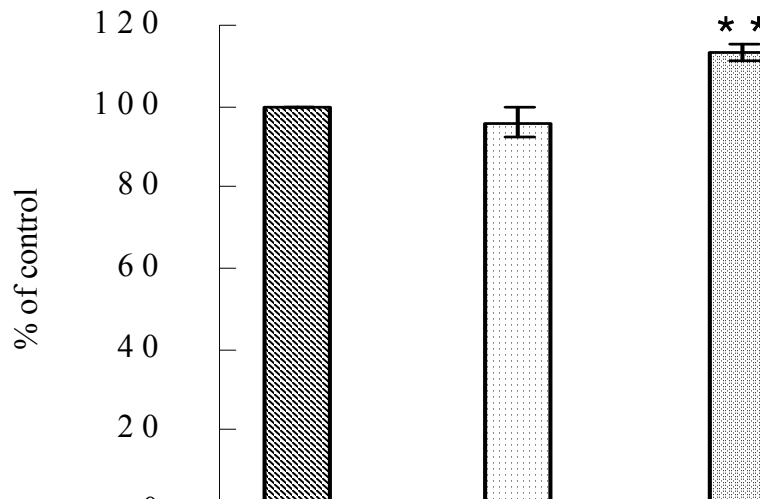


Fig. 84. Cell viability of *Lindera obtusiloba* Bl. extracts for 72 h on B16 melanoma F10 cells.

Values are mean \pm SD (n= 3), * $p<0.01$, ** $p<0.01$ vs Positive CTL

생강나무 추출물의 세포 독성은 잎 추출물의 경우 100 $\mu\text{g/ml}$, 가지/줄기 혼합 추출물의 경우 50 $\mu\text{g/ml}$,의 농도 이상에서 독성이 있음을 확인하였다 (Fig. 84.). 이 후의 tyrosinase activity 와 melanin content 측정 실험은 독성이 나타나지 않은 농도 범위 안에서, 잎의 경우 1, 5, 10, 50 $\mu\text{g/ml}$, 가지/줄기 혼합 추출물의 경우 1, 5, 10 $\mu\text{g/ml}$, 실시하였다.

③ Total melanin content

B16 melanoma F10 cell을 24well에 well 당 10^4 cells씩 분주하였다. 17시간 후 cell의 부착을 확인한 후 배지를 걷어내고 각 농도 별로 배지에 녹여 조제한 생강나무 잎 추출물 1.0, 5.0, 10, 50 $\mu\text{g/ml}$ 과 가지 줄기 혼합추출물 1.0, 5.0, 10 $\mu\text{g/ml}$ 을 각 well에 1 ml씩 분주하였다. 72시간 동안 CO_2 incubator에서 배양한 후 배지를 걷어내고 PBS 2 ml로 2회 세척하였다. 세척 후 1 N NaOH를 well당 500 μl 씩 넣고 37 $^\circ\text{C}$ 에서 20 분간 방치한 후 tube에 옮겨 99 $^\circ\text{C}$ 에서 30 분간 세포를 파괴하였다. 이 용액을 96well 에 200 μl 씩 분주한 후 470 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준용액을 제조하여 470 nm에서의 흡광도를 이용하여 standard curve를 구하고 이로부터 농도를 계산하였다.

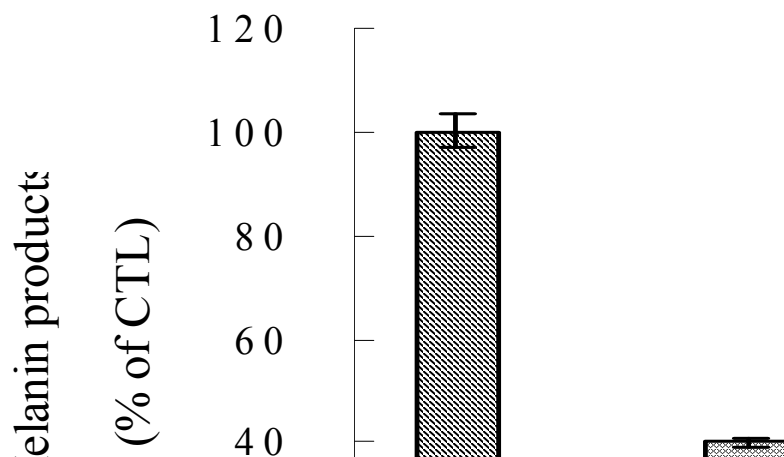


Fig. 85. Melanin contents of Lindera obtusiloba Bl. extracts on B16 melanoma F10 cells.

Values are mean \pm SD (n= 3), * $p < 0.01$, ** $p < 0.01$ vs Positive CTL

B16 melanoma F10의 total melanin content는 잎 추출물 농도 50 $\mu\text{g/ml}$ 에서 22 % 감소하였으며, 가지/줄기 혼합 추출물의 경우 멜라닌 감소효과를 보이지 않았다 (Fig. 85.). 잎 추출물은 세포의 증식을 억제하지 않는 범위에서 세포 내 total melanin content가 22 % 감소한 것으로 생강나무의 미백능을 확인할 수 있다.

④ Tyrosinase activity inhibition 측정

㉞ 자외선 조사에 의한 cytokine 분비 저해능 측정

a. 생강나무 추출물에 의 UV 조사에 의한 세포 독성

- B16 melanoma F10

24-well plate에 10^5 cells/well씩 seeding을 하고 17 시간 방치 후 배지를 걷어내고 PBS (phosphate buffered saline)을 400 μ l씩 분주하고 UV (ultraviolet) B 조사광원을 10, 20, 40, 60, 80 mJ/cm^2 로 조사하였다. 24 시간 동안 CO_2 incubator에서 배양한 후 MTT 용액을 넣고, 다시 4 시간 동안 CO_2 incubator에서 배양하였다. 배지를 제거하고, DMSO로 cell을 녹여 560 nm에서 흡광도를 측정하였다. 결과는 시료를 처리하지 않은 군에 대한 percentage (%)로 표기하였다.

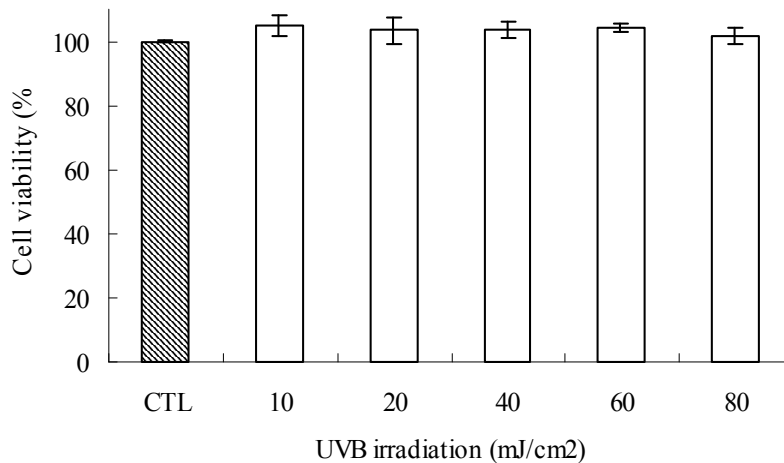


Fig. 86. Steady state after UVB (312 nm) irradiation, 0, 10, 20, 40, 60 80 mJ/cm^2 , for 24 h on B16 melanoma F10 cells.

UVB 조사 후의 세포 독성을 확인한 실험에서 80 mJ/cm^2 의 범위까지 세포 독성이 일어나지 않았다 (Fig. 86.) 위의 결과를 참고하여 세포 독성이 나타나지 않는 범위에서 IL-1 α 의 분비와 생강나무 추출물이 미치는 영향을 확인하였다.

b. IL- α 측정

Melanoma에 UV B를 80 mJ/cm²로 조사한 후 0 시간, 1 시간, 3 시간, 6 시간, 12 시간, 24 시간에서 supernatant를 걸어내어 IL-1 α 의 양을 IL-1 α ELISA assay kit를 이용하여 측정하였다. UV B에 의해 자극을 받으면 IL- α 가 분비되며 그로 인해 tyrosinase의 activity가 높아진다. 시료의 tyrosinase의 activity 저해 효과를 측정하였다.

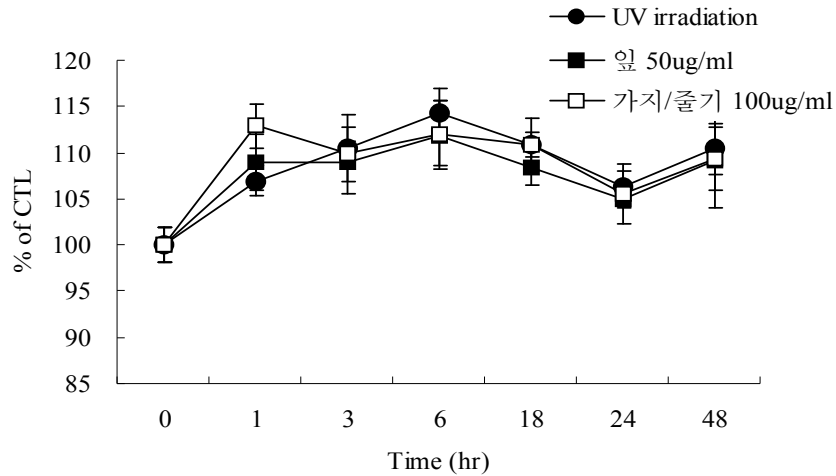


Fig. 87. Interleukin-1 α release from B16 melanoma F10 treated of *Lindera obtusiloba* Bl. after UVB (312 nm) irradiation 80 mJ/cm².

생강나무 추출물을 처리한 B16 melanoma F10 cell에서 UVB 조사로 인해 분비되는 IL-1 α 의 양을 0~24 시간동안 시간 순차적으로 확인한 결과, UVB 조사 6 시간 이후에 분비량이 감소하였다가 증가하는 것을 확인할 수 있다 (Fig. 87.). 이는 생강나무 추출물이 UVB 조사 이후에 급격히 증가하여 melanin의 양을 증가시키는 IL-1 α 의 분비량을 감소시키는데 효과를 미치고 있음을 알 수 있으며, 6 시간 이후에는 UVB 조사를 통해 자극을 받은 세포의 회복에 관여하는 IL-1 α 의 양이 증가함을 알 수 있다.

c. IL-6 측정

Keratinocyte에 UV B를 40 mJ/cm^2 로 조사한 후 0시간, 1시간, 3시간 6시간, 24시간에서 supernatent를 걷어내어 IL-6의 양을 IL-6 ELISA assay kit를 이용하여 측정하였다. UV B에 의해 Keratinocyte가 자극을 받으면 IL-6가 분비되며 그로 인해 tyrosinase의 activity가 높아진다. 시료의 tyrosinase의 activity 저해 효과를 측정하였다.

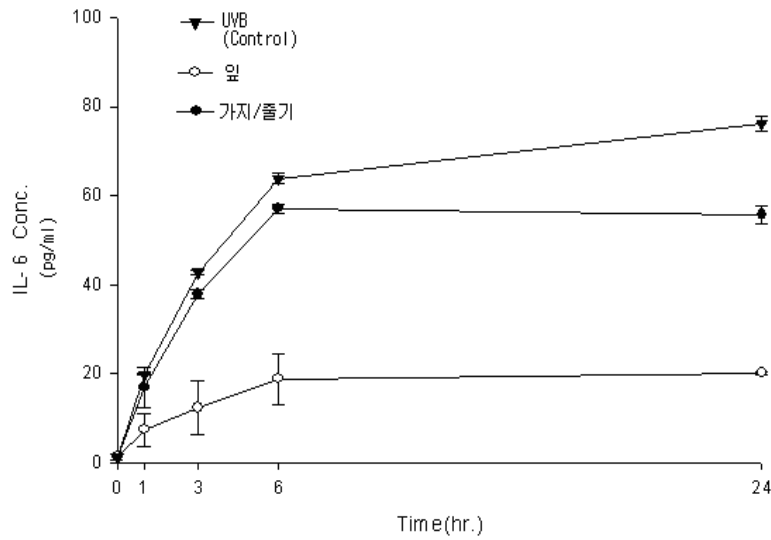


Fig. 88. Interleukin-6 release from human keratinocytes treated of *Lindera obtusiloba* Bl. after UVB (312 nm) irradiation 40 mJ/cm^2 .

자외선을 조사한 후 keratinocyte에서 생성되는 interleukin-6에 대하여 잎 추출물을 처리한 keratinocyte에서 그 생성량이 대조군에 비하여 유의적인 감소를 보였으며 생성량의 비율은 1, 3, 6, 24 시간에서 각각 37, 28, 29, 26 % 정도의 비율을 보였으며, 가지/줄기 혼합 추출물에서는 85, 88, 89, 73 % 정도의 비율을 보였다 (Fig. 88.).

2. 생강나무 추출물을 이용한 *in vivo*에서 미백 효과 검색

피부 태양 광선 노출에 의한 변화는 특히 자외선에 의해 생기는데 살균 및 비타민 D의 광합성 등과 같은 유의한 작용을 나타내기도 하지만 과도한 조사는 여러 가지 유해한 반응을 일으키게 되는데 급성 반응으로 일광화상이나 색소침착이 생기고 만성 반응으로 광노화, 광발암 현상 등이 있다^{97~101}.

UVB는 주로 표피에 작용하여 홍반, 부종, 동통 및 발열 반응을 일으키고 조사 72시간 후에 melanosome 의 크기와 숫자의 증가, tyrosinase 의 활성화, melanocyte 의 수적 증가와 수상돌기의 발달 및 melanosome 의 이동으로 keratinocyte 전 층에 멜라닌이 증가하여 색소 침착¹⁰²이 생긴다.

색소 침착에 의해 여러 과색소성 병변이 야기되는데 이를 치료하기 위해 여러 방법이 시행되지만 부작용이 발생할 수 있기 때문에 천연물에서부터 활성물질을 찾고 있는 경향이다.

본 실험에서는 멜라닌 세포의 증식에 미치는 영향이 잘 관찰될 수 있을 것으로 생각되는 양의 UVB 100 mJ/cm²을 C57BL/6 mouse 에 매일 1회씩 열흘간 UVB를 조사하여 인위적으로 pigmentation 을 유도하였다. C57BL/6 mouse model 은 출생 시 체간에 존재하던 멜라닌 세포가 생 후 12일경 소실되나, 귀, 발바닥, 꼬리부위에서는 정상적으로 활동성 멜라닌 세포가 성년까지 남아있고 조사 종료 후 20주까지는 세포가 분열¹⁰³하기 때문에 실험 종료까지 더 이상의 UVB 조사가 필요 없다.

UVB 조사에 의해 발생한 색소 침착에 미치는 영향을 알아보기로 생강나무 잎 추출물을 경구투여한 후 DOPA-staining 을 실시하여 melanocyte 의 수적, 형태학적 변화를 관찰하고 Fontana-Masson silver staining으로 멜라닌 색소의 분포를 관찰함으로써 생강나무 잎 추출물의 색소 형성 억제 효과를 검증하고자 하였다.

가. 실험재료

(1) 실험동물 : 체중 18-20g 인 C57BL/6 female 8주령¹⁰⁴을 실험에 이용하였다.

(2) 양성대조군인 Ascorbic acid와 생강나무 잎 추출물

Ascorbic acid 의 용량은 70 mg/kg¹⁰⁵, 생강나무 잎 추출물은 40, 80, 120 mg/kg 용량이 되도록 20 % propylene glycol에 용해하여 경구 투여하였다.

나. 실험방법

(1) 실험군 분류

Group	n=15
정상군 (Non-UVB)	20 % propylene glycol
대조군 (Only UVB)	20 % propylene glycol
양성 대조군 (Ascorbic acid)	70 mg/kg
실험군 (생강나무 잎 추출물)	40 mg/kg
	80 mg/kg
	120 mg/kg

(2) UVB 조사

양쪽 귀 배부의 털을 calcium thioglycolate로 제거한 후 매일 오전 한번씩 UVB를 100mJ/cm²로 10일 동안 조사¹⁰³⁾했다 (Waldmann UV 800, Herbert Waldmann GmbH, Philips TL/12 lamp emitting 280–305nm).

(3) 면역학적 염색법을 위해 3, 6, 9주에 각 군당 5마리씩 희생시켜 양쪽 귀를 절 단했다.

(가) Dopa staining¹⁰⁴⁾을 통한 dopa activity 확인

- 희생시킨 Mouse에서 귀 조직 분리
- 2N NaBr 용액에 2hr 배양 후 진표로부터 표피를 분리
- 0.1 % L-DOPA 용액에 담귀 37 °C에서 2 hr incubation
- 용액 바꿔 4 °C에서 12hr incubation
- Fixation : 10 % formalin
- Washing(조직 내 formalin 제거) : 1~2 h r
- Drying 2hr
- Dehydration : 70/80/90/95/100 % alcohol
- Clearing : Xylene
- cover glass로 봉입한다.
- Microscopy 로 관찰. X400

(나) Fontana–Masson silver staining을 통한 depigmentation 확인

- Fixation : 10 % formalin
- Technique : Cut paraffin sections 4 u
- Deparaffinize 와 hydrate 시켰다.
- Fontana silver nitrate solution 에 넣고 56°C 에서 2 시간 방치 했다.
- Distilled water 를 바꿔주면서 3번 wash했다.
- Gold chloride solution 에 1분 담겼다.
- Distilled water 로 wash했다.
- 5 % Sodium thiosulfate solution 에 1분 담겼다.
- Distilled water 로 wash했다.
- 핵을 red solution 에 2–5분 동안 착색시켰다.
- Distilled water 로 2번 wash했다.
- Dehydrate, clear 과정을 거쳐 cover glass로 봉입했다.
- Microscopy 로 관찰. 1000 ×

① Histology of exposed skin

⊗ Dopa activity

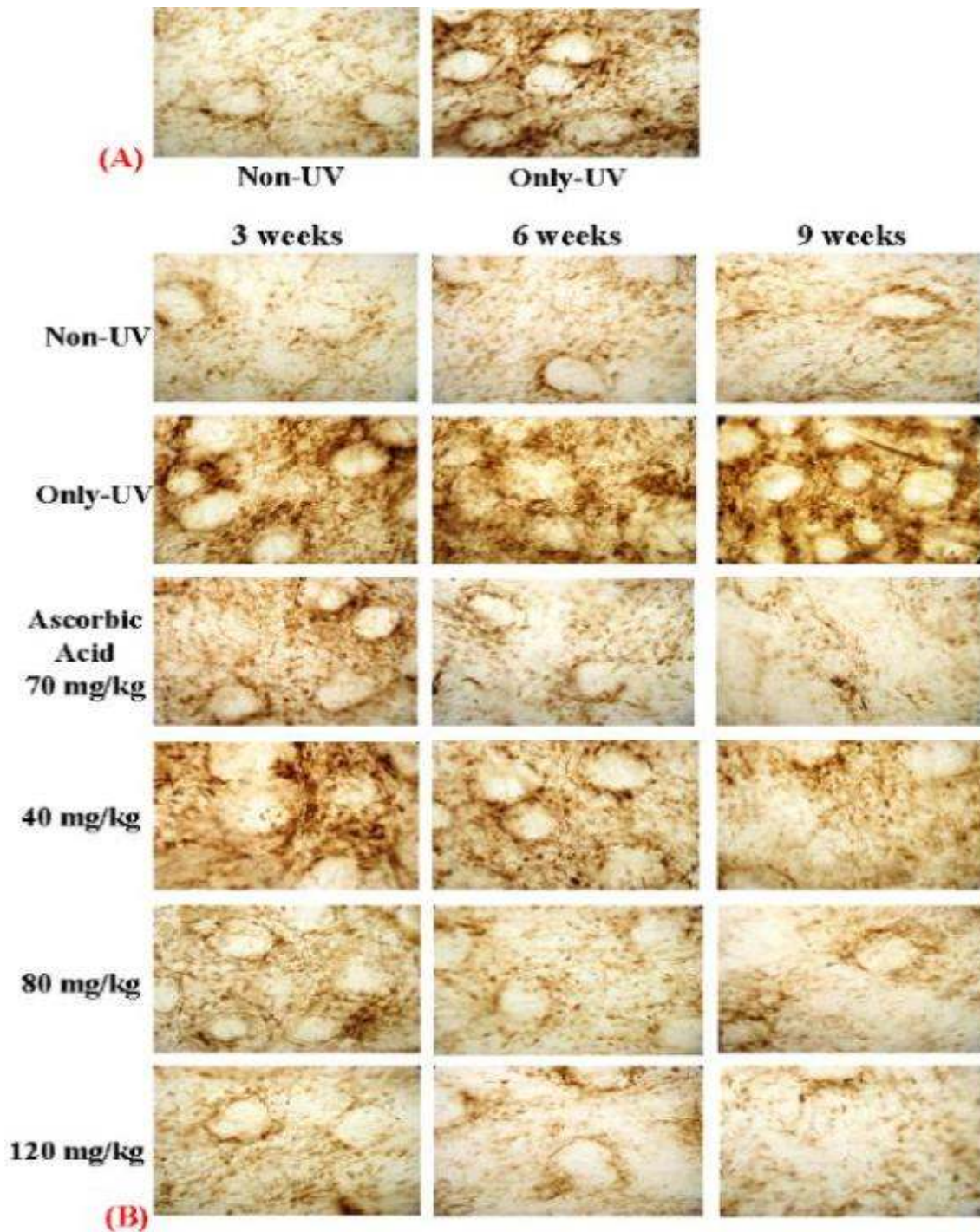


Fig. 89. Epidermis stained with Dopa reaction.

(A) DOPA-positive melanocytes in control (Non-UVB, Only UVB 100 mJ/cm² irradiation for 10 days) groups

(B) DOPA-positive melanocytes in control groups and Experimental groups. DOPA-staining × 400

⊕ Melanins

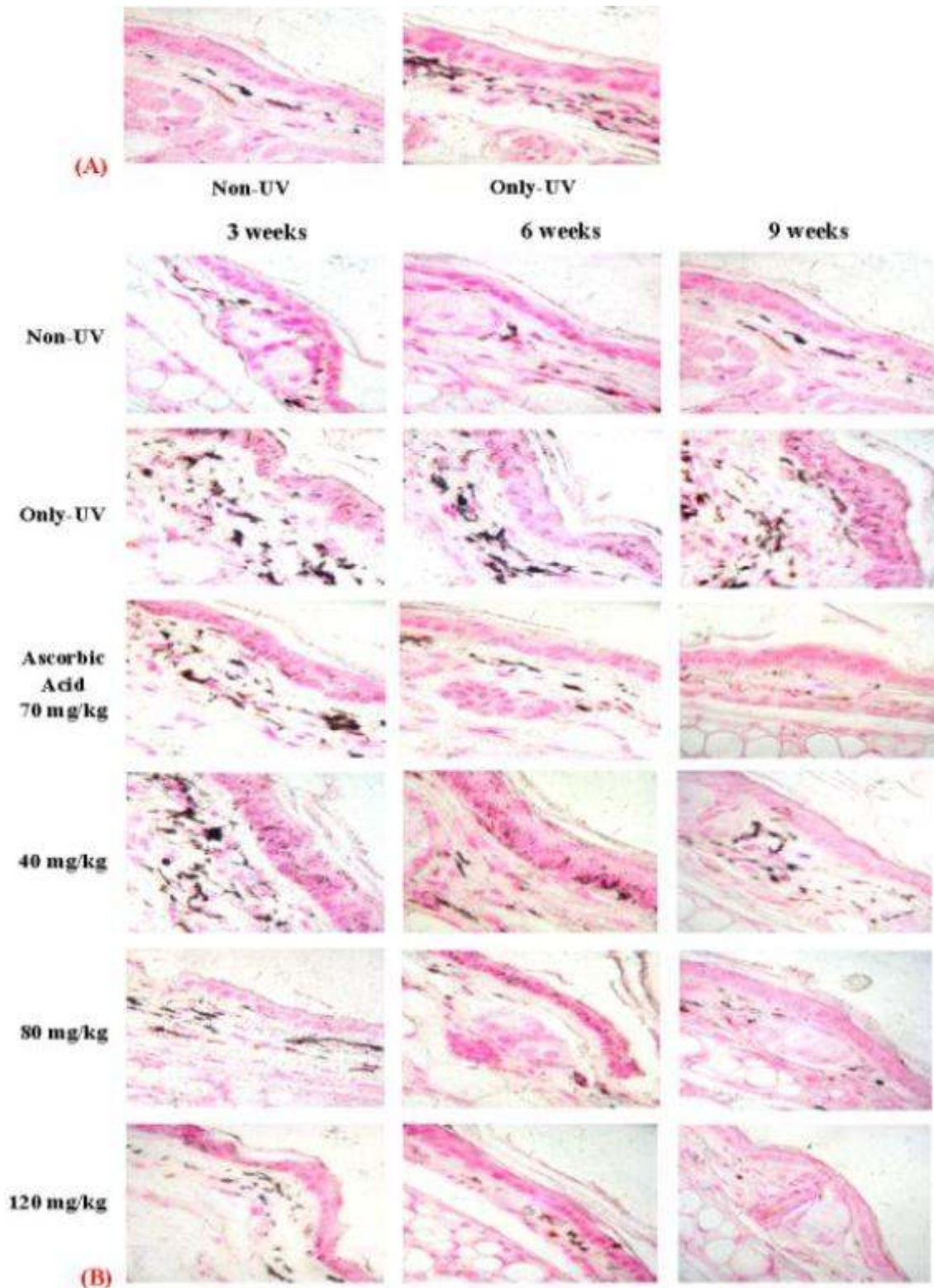


Fig. 90. Skin specimens were stained using the Fontana-Masson method.

(A) Melanin particles are stained in control (Non-UVB, Only UVB 100 mJ/cm² irradiation for 10 days) groups

(B) Melanin particles are stained in control groups and Experimental groups. × 1000

DOPA activity: DOPA-staining 은 epidermis에 있는 melanocyte 의 수를 알 수 있는 특징을 갖는 면역학적 조직 염색법이다. UVB 100 mJ/cm²에서 10일 동안 조사를 하게 되면 pigmentation 의 유도가 잘된다. UVB 조사 후 세포의 수는 조사 이전에 비해 3-4배 증가하였고 크기도 커졌으며 수상돌기가 현저히 발달하였다. UVB 조사 중단 후 20주까지는 조사 이전보다 증가한 상태가 유지 된다²⁾. 생강나무 잎 추출물을 농도 별로 경구 투여를 하게 되면 멜라닌세포의 증식에 영향을 미치게 되어 멜라닌 색소 형성 억제 작용을 하게 됨을 관찰 할 수 있었다. 생강나무 잎 추출물 40 mg/kg에서는 억제 작용이 다른 농도와 비교 시 미약함을 관찰 할 수 있었으나 only UVB 조사군과 비교해 보면 멜라닌 세포의 수와 크기가 감소됨을 확인할 수 있었다. 생강나무 잎 추출물 80 mg/kg과 120 mg/kg은 비슷한 양상을 보였으며 Ascorbic acid 70 mg/kg과도 비슷하거나 조금 더 우수한 멜라닌 색소 억제 작용이 있음을 알 수 있었다.

Melanins: Fontana-Masson silver staining 은 epidermis 전 층에 걸쳐 분포하는 멜라닌 색소를 알아보기 위한 면역학적 조직 염색법이다. Only UVB 조사군을 보면 epidermis 전 층에 걸쳐 멜라닌 색소가 분포 하게 됨을 알 수 있다. 하지만 Ascorbic acid나 생강나무 잎 추출물을 투여하게 되면 3/6/9 주로 갈수록 epidermis 일부 층에서만 멜라닌 색소의 분포를 확인할 수 있었으며, 잎 추출물 80 mg/kg, 120 mg/kg 농도의 투여군을 양성 대조군인 Ascorbic acid 70 mg/kg과 비교해 보면 epidermis 층의 멜라닌 색소가 비슷하거나 조금 더 적음을 관찰할 수 있었다.

표피의 두께 변화도 관찰 할 수 있었다. Figure. 90. 슬라이드 사진에서 보이는 바와 같이 조사되는 자외선에 의해 표피 층이 두꺼워짐을 알 수 있었다. 하지만 물질을 경구투여 하게 되면 시간이 지남에 따라 얇아지는 표피 층을 확인 할 수 있었다. 표피 층이 두꺼워지는 것은 광노화로 환경변화에 무관하게 피부의 구조와 생리적 기능이 나이를 먹음에 따라 계속 감퇴되는 자연노화와 달리 자외선에 반복 노출되는 어민, 농민, 실외작업자 등에 나타나는 특이한 피부에 반응을 보이는 조기노화에 의한 것이다. 즉, 자외선이 몸에 쌓이면서 피부 층이 두꺼워지고 melanocyte 의 증가와 collagen 의 형성도 줄어들고 elastin 함유도 딱딱해져 피부에 주름살이 생기고 늘어지는 탄력섬유변성 증상이 나타나 피부가 결하는 것이다. 이러한 결과를 바탕으로 주름개선에도 효과를 보일 것으로 예상 할 수 있다.

3. 생강나무 추출물을 이용한 미백 효과의 분자생물학적 기전 연구

가. Tyrosinase activity inhibition

B16 melanoma F10 cell 을 24 well에 well당 10^4 cells씩 분주하였다. 17 시간 후 cell의 부착을 확인한 후 배지를 걷어내고 각 농도 별로 배지에 녹여 조제한 생강나무 잎 추출물 1.0, 5.0, 10, 50 $\mu\text{g/ml}$ 을 각 well에 1 ml씩 분주하였다. 72 시간 동안 CO_2 incubator에서 배양한 후 배지를 걷어내고 PBS 2 ml로 2회 세척한 후 1 M tris-HCl 이 포함된 lysis buffer를 이용하여 cell을 lysis 시키고 $\times 10,000$ g에서 5 분 동안 원심분리하였다. 상층액의 protein 량을 측정하고 농도는 lysis buffer로 맞춰준다. 상층액 90 μl 와 10 mM dihydroxyphenylalanine(DOPA) 용액 10 μl 를 섞어 37 $^\circ\text{C}$ 에서 20분 동안 방치 시킨 후 470 nm에서 흡 광도를 측정하였다^{106~107}.

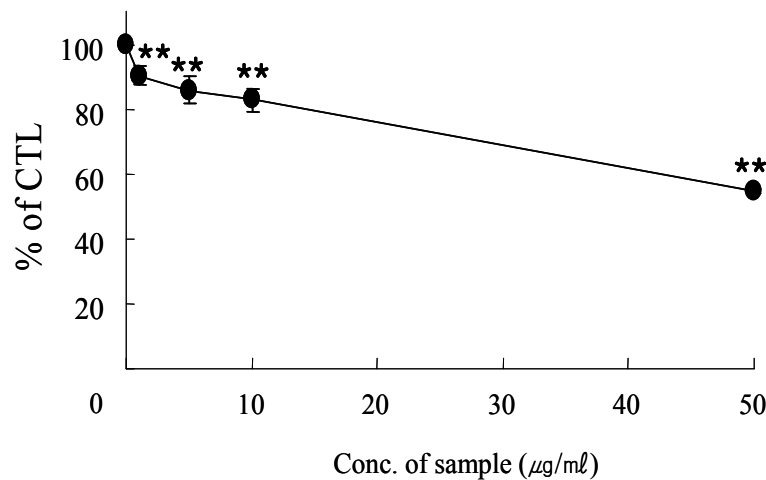


Fig. 91. Tyrosinase inhibitory activity of *Lindera obtusiloba* Bl. leaf extract on B16 melanoma F10.

Values are mean \pm SD (n= 3), ** $p < 0.05$ vs CTL

세포 독성이 나타나지 않는 1, 5, 10, 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도 범위에서 tyrosinase 활성 저해율은 각각 9.8, 14.3, 17.3, 45.2 % 를 보였다 (Fig. 91.).이로부터 생강나무 잎 추출물의 melanin 생성 억제 가능성이 있음을 확인 할 수 있었다.

나. UV 조사 후 생강나무 잎이 melanin 생성에 미치는 영향 측정

B16 melanoma F10 cell을 24 well에 well 당 10^4 cells씩 분주하였다. 17 시간 후 cell의 부착을 확인한 후 배지를 걷어내고 농도 별로 조제한 생강나무잎 추출물을 각 well에 1 ml 분주 후 1 시간 동안 preincubation 하였다. PBS로 2회 세척 후 40 mJ/cm^2 를 조사 한 후 농도 별 생강 나무 잎 추출물과 함께 72시간 동안 CO_2 incubator에서 배양한 후 배지를 걷어내고 PBS 2 ml 로 2회 세척하였다. 세척 후 1 N NaOH를 well당 500 μl 씩 넣고 37°C 에서 20 분간 방치한 후 tube에 옮겨 99°C 에서 30 분간 세포를 파괴하였다. 이 용액을 96 well 에 200 μl 씩 분주한 후 470 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준용액을 제조하여 470 nm에 서의 흡광도를 이용하여 standard curve를 구하고 이로부터 농도를 계산하였다.

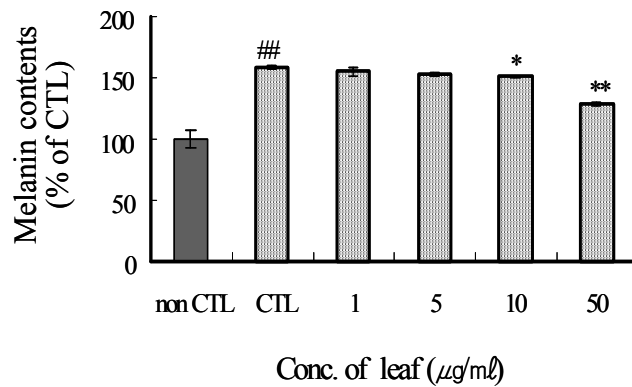


Fig. 92. Effects of leaf extract and UV irradiation on melanogenesis on B16 melanoma F10 cells. Cells were pretreated with leaf extract for 1 h before UV irradiate and the cultured with leaf extract for 3 days.

Values are mean \pm SD (n= 3), ## $p < 0.01$ vs CTL (non UV),
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs CTL (UV)

B16 melanoma F10 cell에 UVB 40 mJ/cm^2 를 조사하면 조사하지 않은 군에 비하여 유의적으로 멜라닌 양이 58.23 % 증가하였다. UVB를 조사한 후 생강나무 잎을 처리하게 되면 10, 50 $\mu\text{g/ml}$ 에서 각각 약 8 %, 30 % 유의성 있는 멜라닌 감소 효과를 나타냄을 확인할 수 있었다 (Fig. 92.).

다. 멜라닌 합성에 관여하는 proteins

Fig. 93.에서 보는 바와 같이 extracellular-related kinase pathway는 melanogenic signaling에 관여하는 인자로서 물질에 의한 ERK activation의 유도는 MITF(microphthalmia-associated transcription factor)를 down-regulation 시킴으로써 tyrosinase activity를 indirect 하게 inhibition하여 melanin 생성을 감소시킨다^{108~115}).

Western blot 기법을 통한 기전을 연구하기 전에 MEK inhibitor인 PD98059를 B16 melanoma F10에 생강나무 잎 추출물과 함께 처리하여 melanin 생성량 미치는 영향을 보았다.

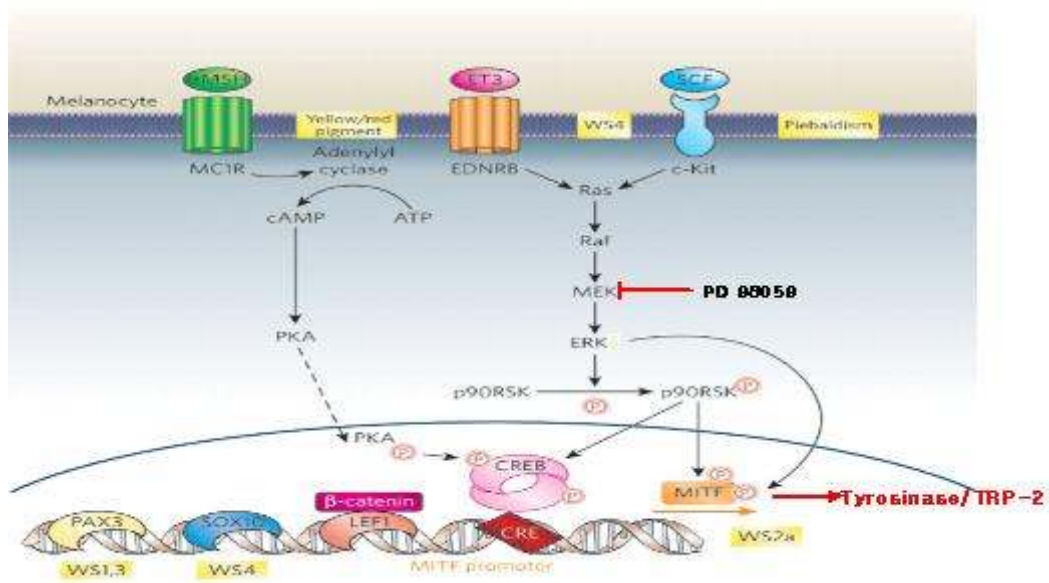


Fig. 93. Induces the expression of MITF and increase tyrosinase activity in melanocytes.

* Nature 2007; 445: 843-850

(1) Total melanin 생성량 측정

B16 melanoma F10 cell을 6 well에 well 당 5×10^4 cells씩 분주하였다. 17 시간 후 cell의 부착을 확인한 후 배지를 걷어내고 20 μ M PD98059를 1시간 동안 preincubation한 후 농도 별로 조절된 생강나무 잎 추출물과 함께²⁸ 72 시간 동안 CO₂ incubator에서 배양한 후 배지를 걷어내고 PBS 2 ml로 2회 세척하였다. 세척 후 1 N NaOH를 well당 500 μ l씩 넣고 37 °C에서 20 분간 방치한 후 tube에 옮겨 99 °C에서 30 분간 세포를 파괴하였다. 이 용액을 96 well에 200 μ l씩 분주한 후 470 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준용액을 제조하여 470 nm에서의 흡광도를 이용하여 standard curve를 구하고 이로부터 농도를 계산하였다.

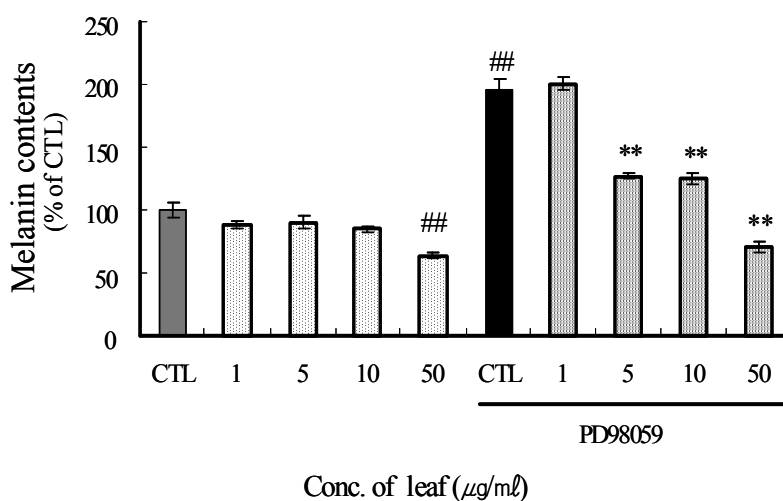


Fig. 94. Effects of leaf extract and PD98059 on melanogenesis on B16 melanoma F10 cells. Cells were pretreated with 20 μ M PD98059 for 1 h and the cultured with leaf extract for 3 days.

Values are mean \pm SD (n= 3), ## $p < 0.01$ vs CTL (non UV),

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs CTL (UV)

멜라닌 생합성에 관여하는 ERK pathway signaling의 specific inhibitor인 PD98059를 생강나무 잎 추출물과 함께 3 일 동안 배양하였다. PD98059를 처리하지 않은, 또는 처리한 control군을 비교해 보면 Fig. 94.에서 보는 바와 같이 처리한 군에서 유의적으로 멜라닌 양이 약 95 % 증가한 것을 확인할 수 있었다. PD98059와 함께 생강나무 잎 추출물을 처리한 군을 보면 5, 10, 50 μ g/ml 농도군에서 각각 약 69, 70, 125 %의 유의성있는 멜라닌 감소 효과를 나타내었다.

(2) Western blot기법을 이용한 생강나무 잎 추출물의 미백효과 검증

- Melanin contents 측정법과 동일하게 배양한 B16 melanoma F10을 lysis buffer (40 mM Tris (pH 7.5), 10 mM EDTA (pH 8.0), 120 mM NaCl, 1 mM NaF, 1 % Nonidet, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF), 1 mM DTT, proteinase inhibitor 1 tablet)를 이용하여 ice 상태에서 lysated 시켰다.
- 30 분 동안 ice상태에서 sonication
- 10,000 g에서 30 분 동안 원심분리하여 상등액을 모았다.
- 단백질을 Bradford reagent를 이용하여 측정 후 protein 농도를 20 μg 으로 맞췄다.
- 정량한 supernatant 를 $\times 4$ sample buffer와 섞은 후 5 분 동안 boiling 하였다.
- 10 % SDS-PAGE 를 이용하여 separation해 주었다.
- Membrane에 transfer를 한 후 5 % skim milk (soluble TBST)로 상온에서 최소 1 시간 shake blocking 실시 하였다.
- 5 % bovine serum albumin (soluble TBST)에 1:1000으로 희석한 primary antibody로 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 shake overnight 실시 하였다.
- 다음 날 TBST 로 10분씩 3번 wash 하였다.
- 5 % skim milk (soluble TBST)에 1:2000으로 희석한 2nd antibody로 상온에서 4 시간 shake 실시 하였다.
- TBST 로 10분씩 3번 wash 하였다.
- ECL solution 으로 primary antibody를 detection 하여 film으로 현상하였다.

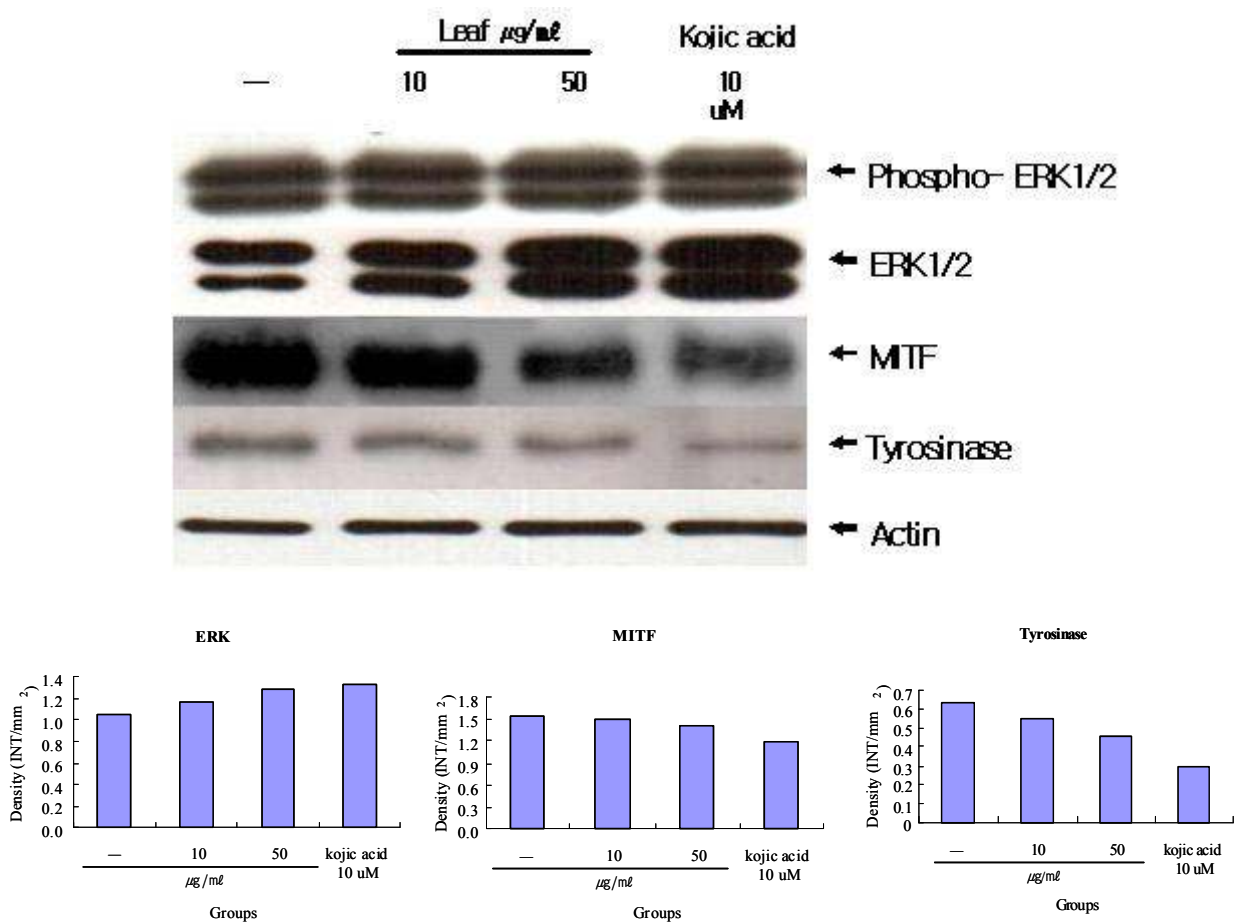


Fig. 95. Leaf extract of *Lindera obtusiloba* Bl. stimulates the ERK signaling pathway and down-regulates MITF and tyrosinase on B16 melanoma F10.

Fig. 95.을 보면, 생강나무 잎 추출물에 의해 유도된 extracellular-associated related kinases(ERK) pathway signaling이 Microphthalmia transcription factor (MITF)와 멜라닌 합성에 관여하는 중요한 효소 중의 하나인 tyrosinase의 activation을 down-regulation함을 알 수 있다. 이는 생강나무 잎 추출물의 미백효과는 결국은 이러한 proteins의 expression 경로를 거쳐 tyrosinase의 activity를 저해시킴으로써 멜라닌의 합성을 감소시킨다는 것을 확인할 수 있었다.

이상의 결과로 생강나무 추출물은 대조군과 비교하여 *in vitro* 시스템, 세포 상에서의 ROS 소거능과 미백효과가 우수하며, 추출물이 가지고 있는 색 간섭을 배제한다면 스크리닝이 실시되었던 이상의 농도에서 탁월한 효과가 검색될 것으로 예상된다.

동물모델을 이용한 생강나무 잎 추출물의 미백효과에서는 생강나무 추출물이 80 mg/kg 용량에서부터 Ascorbic acid 70 mg/kg 와 비슷하거나 더 우수한 멜라닌 색소 억제 효과를 보였지만 생강나무 잎 추출물이 crude한 물질이기 때문에 함유된 미량의 활성 물질을 분리하여 ascorbic acid 와 비교해 본다면 훨씬 더 강력한 미백효과를 나타낼 수 있는 천연물질임을 예상할 수 있다.

In vitro, *In vivo* 상에서의 항산화 활성과 미백효과의 기전을 검증하기 위한 western blot 을 이용한 protein level을 확인한 결과 생강나무 잎은 ERK pathway signaling을 유도함으로써 MITF와 tyrosinase의 activation을 down-regulation시킴으로써 멜라닌의 합성을 저해한다는 것을 증명할 수 있었다.

4. 자료 분석 및 통계처리

모든 실험결과는 평균±표준편차로 표기하였고, 통계적 유의성은 Student's *t*-test로 분석하였으며, *p*값이 0.01 미만일 때 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연구개발의 달성도 및 기여도

연차	목표 및 평가의 착안점	목표달성도	기여도
제 1 세 부 1 차 년 도	이용가능 부위별 식품적 가치 연구	지역별 산지에 따른 정유량 조사와 부위별 정유량 조사를 완료 했으며, 수확시기에 따른 유효성분 변화조사 및 생강과 유효성분 비교를 성실히 수행하여 100 % 완료 했기에 1차년도 과제목표를 완벽하게 달성함.	전국 생강나무 자생지별 정유 함량 차이 구명 수확시기에 따른 정유 성분 구명으로 가공용 최적 잎 수확시기 제시.
	2 차 년 도 생강나무의 저장조건, 건조법, 가공법 등에 따른 수율 및 유효성분 함량 변화구명	생강나무의 저장온도, 포장재질에 따른 MA저장 중의 CO ₂ , C ₂ H ₄ , 무기성분, 엽록소, 중량변화 측정을 완료 했으며, 건조방법과 추출법에 따른 정유의 수율 및 유효성분 변화 실험을 성실히 수행하여 100% 완료했기에 2차년도 과제목표를 완벽하게 달성함.	쌈용 어린 생강나무 잎의 MA 저장 방법을 구명하므로서 생산 농가에서 출하시 음용이 가능 생강나무 잎, 꽃의 건조 방법 확립에 따른 관련 농가 기술 적용.
	3 차 년 도 생강나무 잎차 및 천연혼합음료 개발 및 기호도 조사	생강나무의 잎과 꽃을 이용한 차 시제품 개발을 완료 했으며, 차 시제품에 관련 차 제조과정에 대한 동결건조, 덕음, 음건에 대한 소비자 선호도 조사를 성실히 수행하여 100% 완료 3차년도 과제목표를 완벽하게 수행함.	생강나무차의 단용 또는 혼합차 제조법 확립으로 농가 생산시 적용을 통한 소득 증대 기여.

연차	목표 및 평가의 착안점	목표달성도	기여도
1차년도	생강나무의 용매별 추출분리 조건 확립 및 <i>in vitro</i> 기능성평가	활성 검사에 따른 활성물질의 분획을 추출·분리 했으며, 이의 간기능 보호 및 당노합병증 억제에 기초 기능성 검사를 성실히 수행하여 100 % 완료 했기에 1차년도 과제목표를 완벽하게 달성함.	생강나무를 소재로 하여 처음으로 간기능 보호와 항당노합병증 기능을 <i>in vitro</i> 상에서 검증했으며, 그 기능원인 물질을 함유하는 부분을 유기용매 분리법 확립.
2차년도	생강나무 추출물의 <i>in vivo</i> 기능성 평가	생강나무 추출물을 가지고 간기능 보호를 <i>in vivo</i> 실험을 실시하여 간 손상시 발현되는 효소와 MDA 형성 및 조직학적 분석을 완료했으며, 당노 억제의 <i>in vivo</i> 실험을 통하여 혈당측정, 내당성의 측정 및 당노에 의한 간 손상 측정을 성실히 수행하여 100% 완료했기에 2차년도 과제목표를 완벽하게 달성함.	생강나무를 소재로 하여 처음으로 간기능 보호와 항당노 기능을 <i>in vivo</i> 상에서 검증.
3차년도	생강나무 추출물의 <i>in vivo</i> 안전성 평가 및 기능원인물질의 정제 및 구조해석	생강나무 추출물의 단회투여독성과 14일 반복투여 독성실험을 실시하여 안전성 검증을 완료했으며, 유기용매별 분리와 컬럼 정제법을 통하여 기능원인 물질을 분리하고 NMR 분석을 통하여 그 물질이 무엇인지를 규명하여 100% 완료했기에 3차년도 과제 목표를 완벽하게 달성함.	생강나무를 소재로 하여 처음으로 안전성을 확립했으며, 기능원인물질 규명과 분리·정제법을 확립함 생강나무를 이용한 제품은 단순 잎차 밖에 없는 수준이다. 그래서 기능성과 안전성 자료를 바탕으로 여러 가지 의약품이나 기능성 식품 소재로 활용할 수 있으며, 이러한 소재로 적용이 된다고 하면 안전성과 기능성 자료로 사용할 수 있음.

제 2 세 부

연차	목표 및 평가의 착안점	목표달성도	기여도
1차년도	생강나무에서 생산된 시료를 이용하여 human keratinocyte에서 ROS 소거능 및 cytokine 생성 억제능 검색	시료의 ROS 소거능, 미백효과, cytokine의 분비능 실험을 수행하여 100 % 완료했기에 1차년도 과제목표를 완벽하게 달성함.	생강나무를 소재로 하여 처음으로 항산화 효과와 미백효과를 <i>in vitro</i> 상에서 상세히 검증함.
제1협동	2차년도 생강나무 추출물을 이용한 <i>in vivo</i> 에서 미백 효과 검색	동물모델 UVB 조사 후 pigmentation 유도, 및 추출물 경구투여, Fontana-masson silver staining 과 L-DOPA staining 을 이용한 depigmentation 확인을 수행하여 100% 완료 했기에 2차년도 과제목표를 완벽하게 달성함.	생강나무를 소재로 하여 처음으로 미백효과를 <i>in vivo</i> 상에서 검증함.
3차년도	생강나무 추출물을 이용한 미백 효과의 분자생물학적 기전 연구	In vitro cell system에서의 생강나무 잎 추출물의 tyrosinase activity 저해 효과와 UVB 조사 후 생강나무 잎 추출물이 멜라닌 생성에 미치는 영향을 알아보았으며, western blot 기법을 이용하여 미백효과를 나타내는 기전을 증명하였기 때문에 3차년도 과제목표를 완벽하게 달성함.	생강나무 추출물을 이용한 미백기능성 화장품을 출시한 회사는 없지만 현재 많은 회사들이 천연물 유래의 미백 성분을 이용하여 기능성 화장품을 연구 개발하는 시도는 계속되고 있으며 향후 많은 연구가 이루어질 것으로 예상됨. 생강나무 추출물에 대한 상업화가 진행된다면 재배 농가에 대한 수익 창출을 기대할 수 있음.

제 1 절. 기술적 측면

- 생강나무의 기능원인 물질의 새로운 분리·정제법의 개발로 건강기능성식품 및 농산가공기술의 선진화
- 차별화 및 특화된 가공방법의 개발과 제품개발전략에 맞춘 차별화된 가공기술을 보유
- 현재까지 연구된 바가 없는 생강나무의 다양한 생리활성효과를 검증하여 생강나무제품 소비촉진
- 고부가가치 및 기능성 건강식품소재의 개발로 관련산업의 국제 경쟁력 향상에 이바지

제 2 절. 경제 · 산업적 측면

- 국내에서 재배가능한 생강나무를 수출가능한 고급화된 제품으로 개발하여 농민소득 증대에 기여
- 고급화된 생강나무의 제품화로 새로운 소비시장 창출
- 차시장 개방에 따른 생강나무의 고급화를 통한 값싸고 저품질의 외국산 수입 차와의 경쟁에서 비교우위 점유
- 생강나무의 생리활성연구로 기능성 소재로의 우수성 검증 및 홍보
- 고급화된 가공기술을 인도, 중국, 케냐 등의 주요 제품 생산국에 대한 기술수출을 통한 외화획득
- 생강나무의 우수한 생리학적 안전성 및 기능성이 검증으로 새로운 해외시장 확보 가능성
- 종래의 제품과는 차별되는 새로운 의미의 상품에 대한 수요창출과 동시에 건강 지향형 소비자의 다양한 욕구를 충족시키는 제품을 생산
- 기능성 생강나무잎이라는 상품의 브랜드로서의 가치를 높일 수 있는 효과

제 3 절. 사회 · 문화적 측면

- 생강나무를 이용한 고부가가치 웰빙 기능성 식·의약 소재 개발로 원예분야에서 주변 국가와의 경쟁에서 차별성과 우월성을 확보하여 농가 발전 도모.
- 생강나무의 우수한 생리적 안전성, 기능성이 검증 및 이용으로 국민보건 향상과 국가 위상 제고

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절. 특허 출원

1. 발명의 명칭: 생강나무 잎 추출물을 포함하는 피부 미백 및 주름개선용 조성물
출원일자: 2008. 12. 22
출원번호: 10-2008-0130799 (접수번호 1-1-2008-0876560-82)
출원인 명칭: 고려대학교/경희대학교 산학협력단 공동 출원
발명자 성명: 정세영, 이광원, 박권우
2. 발명의 명칭: 생강나무 천연 혼합음료 제조방법
출원일자: 2009. 04. 23.
출원번호: 10-2009-0035292 (접수번호: 1-1-2009-5016087-22)
출원인 명칭: 고려대학교 산학협력단
발명자 성명: 박권우, 김준홍, 이상용
3. 생강나무잎 추출물에서 분리한 quercitrin과 afzelin의 분리·정제법과 항산화 효과에 대해 항산화 기능물질 특허 출원준비 중.

제 2 절. 논문

1. 저널: Food Sci. Biotechnol.
저자: Hyun-Sun Lee, Chung-Oui Hong, and Kwang-Won Lee
제목: Advanced Glycation Endproduct-induced Diabetic Complication
게재 년도, 볼륨, 페이지: 2008; 17: pp1131-1138
2. 저널: 대한약학회지
저자: 방채영, 원은경, 박권우, 이광원, 정세영.
제목: 생강나무 추출물의 항산화 활성과 미백효과
게재 년도, 볼륨, 페이지: 2008; 52: pp355-360
3. 저널: 한국허브아로마테라피학회
저자: 목민균, 이광원, 정세영, 박권우
제목: 건조 방법에 따른 생강나무 잎의 성분 변화
게재 년도, 볼륨, 페이지: 2007; 3(2): 27-32.
4. 저널: 한국허브아로마테라피학회
저자: 목민균, 우진호, 박권우
제목: MA 저장 조건에 따른 생강나무 잎의 품질 변화
게재 년도, 볼륨, 페이지: 2008; 4(1): 25-32.

5. 생강나무 추출물의 항산화 효과에 대해 국제 저널에 투고 중임
(*Phytotherapy Research*, Antioxidative Effects of *Lindera obtusiloba* Blume and Structural Analysis of Its Active Compounds)
8. 생강나무 추출물의 ERK pathway의 활성화에 대한 연구를 국제 저널에 투고 할 예정
(*Pigment Cell Research*, ERK pathway activation induced by *Lindera obtusiloba* Bl. leaf extract)
7. 생강나무 추출물의 안전성에 대한 연구를 국내 저널에 투고 할 예정
(*J.Toxicol.Pub.Health*, Single & 14-Day Repeated Oral Toxicity Study of *Lindera obtusiloba* Bl.)

제 3 절. 학술발표

1. 국제

가. 학회: The first Asian Horticultural Congress

발표자: Park, K.W., M.G. Min, S.O. Park, J.H. Kim, and D.S. Yang

제목: Effect of packaging film and Temperature on the storage of leaves in *Lindera obtusiloba*

발표일시: 2008. 12 (p130)

나. 학회: 7th Joint Meeting of AFERP, ASP, GA, PSE&SIF

발표자: Bang CY, Won EK, Choung SY

제목: Lightening effect of *Lindera obtusiloba* BL. leaf extract from UVB-induced pigmentation in C57BL/6 mice

발표일시: August 3-8, 2008, , Athens, Greece (p. 42)

2. 국내

가. 학회: 2006년 한국식품과학회

발표자: Chung-Oui Hong, Hyun-Sun Lee, Sun-joo Lee, Yun-Chang Koo, Ho-Young Park and Kwang-Won Lee

제목: Liver Protection and Antiglycation, antioxidant Effects of a Refined Product of *Lindera obtusiloba* BL. *In Vitro*

발표일시: June 14-16, 2006 (p253)

나. 학회: 한국원예학회 및 한국생물환경조절학회

발표자: 박권우, 목민균, 우진호

제목: 생강나무 잎의 건조방법에 따른 정유성분

발표일시: 2007 (p116)

다. 학회: 2008년 추계 대한약학회

발표자: BANG Chae Young, CHOUNG Se Young

제목: Inhibitory Effects of *Lindera obtusiloba* BL. Extract on Melanin Synthesis from UV-induced Pigmentation in C57BL/6 Mice

발표일시: October 23-24, 2008 (p220)

라. 학회: 2008년 한국식품과학회

발표자: Chung-Oui Hong, Hyun-Sun Lee, Dong-Chul Shin, Su-jung Kim, Mi-Hyun Nam, Hyun-A Lee and Kwang-Won Lee

제목: Protective Effect of *Lindera obtusiloba* BL. Treatment on *t*-BHP-induced Hepatotoxicity and STZ-induced Diabetic Rats

발표일시: June 18-20, 2008 (p234)

마. 학회: 한국원예학회

발표자: 박권우, 이상용, 김준홍

제목: 제조방법별 생강나무잎차·꽃차의 선호도 조사

발표일시: 2009. 05. (발표예정)

제 4 절. 그 외 활용계획

- 생강나무 차 시제품 개발완료
- 생강나무 미백효과가 경제성이 있다고 판단되면 관련기업에 기술이전 한다.
- 개발된 생강나무엽을 차제품이외에도 건강기능성 식품이나 화장품 원료 등 관련산업에서 이용하도록 한다.
- 생리학적 안전성과 향미특성을 갖춘 생강나무 차의 제조 공정의 완성 후 각 지방기관과 협력하여 생강나무 차 생산자 및 가공업자를 선정하여 제품화 및 산업화 착수할 계획

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. 차와 음료를 대상으로 기능성과 제품화 연구

해외에서의 연구기술 동향을 살펴보면 차와 음료의 기능성에 대한 연구가 진행되고 있다. 차에 포함된 페놀화합물의 항산화 활성에 대한 연구가 상당수를 차지하고 있고 그 밖에 항암효과 등에 대한 연구들이 진행되고 있다.

대체적으로 볼 때 포장방법에 다소 뒤떨어지나 국내 연구개발 현황은 세계 수준의 95% 수준으로 큰 차이가 없는 것으로 판단된다.

2. 생강나무 추출물의 간섬유에 관련된 연구

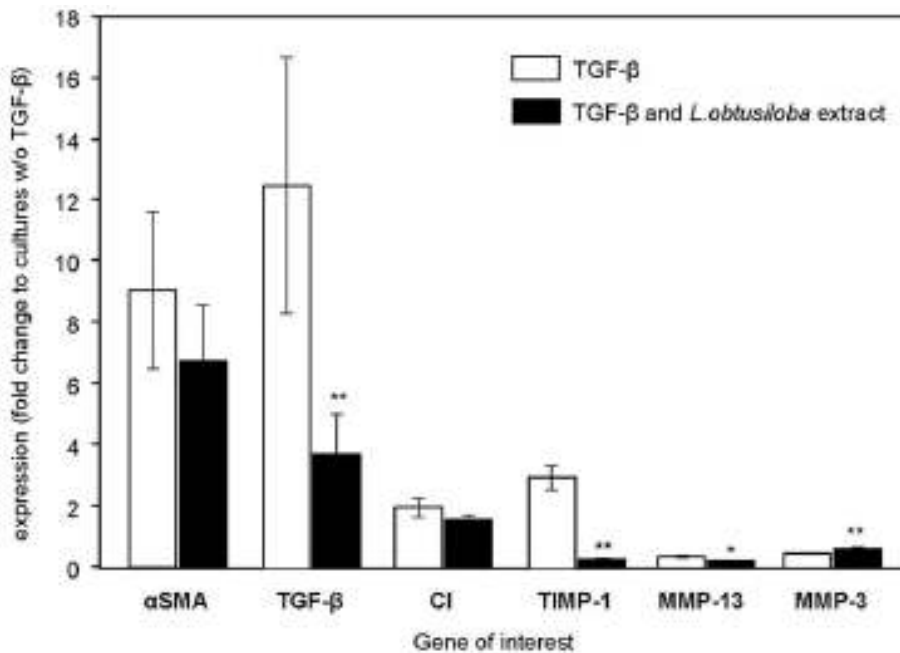


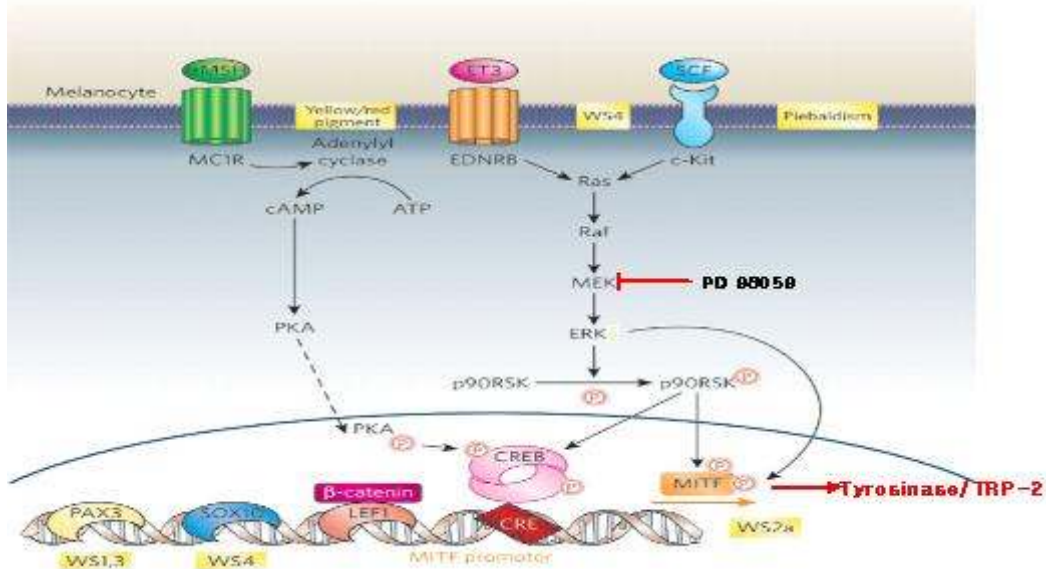
Fig. 4. TGF- β -induced gene expression pattern in CFSC after treatment with *L. obtusiloba* extract. Cell-cycle-synchronized CFSCs were incubated with TGF- β (2 ng/ml) alone or in conjunction with *L. obtusiloba* extract (270 μ g/ml) for 24 h or were left untreated for control. The expression of indicated fibrogenesis-associated markers was determined by specific quantitative real-time PCR. Individual transcription levels were normalized to constitutive GAPDH expression, and changes were calculated in relation to the control cultures without TGF- β . Results are given as mean values \pm S.D. of at least three measurements. One-way ANOVA [All Pairwise Multiple Comparison Procedure (Tukey test)] was performed. $P < 0.001$ was highly significant (**); $P < 0.05$ was considered significant (*).

*Journal of Nutritional Biochemistry, 2008, In Press

생강나무에 대한 연구는 거의 전무한 상태인데 생강나무 수추출물을 이용하여 간경화에 관련된 TGF- β , TIMP-1, MMP-3 등의 gene 발현을 억제하는 것으로 보아 간경화 억제에 도움이 된다는 사실을 보고하였으며, 이는 본 과제외 고려대 이광원 교수팀에서 연구한 간보호 기능 검증과도 상통하는 결과를 보여주고 있음.

3. 미백에 관련된 분자생물학적 기전 정보

-멜라닌 생합성에 관여하는 protein 발현 경로



Induces the expression of MTTF and increase tyrosinase activity in melanocytes.

* Nature 2007; 445: 843-850

Extracellular-related kinase pathway는 melanogenic signaling에 관여하는 인자로서 물질에 의한 ERK activation의 유도는 MTTF (microphthalmia-associated transcription factor)를 down-regulation시킴으로써 tyrosinase activity를 indirect하게 inhibition하여 melanin 생성을 감소시킨다^{108~115} .

제 7 장 참고문헌

1. Kim, S.O., M.S. Suh, and C.H. Kwak. 2005. Climatological characteristics in the variation of soil temperature in Korea. Jour. Korean Earth Science Society. 26: 93-105.
2. Nikerson G.B. and S.T. Likens. 1966. Gas chromatographic evidence for the occurrence of hop oil components in beer. J. Chromatog. 21:1-3.
3. Lee, C.H. 2003. Development of cosmetic products using diverse plants resources. Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology.
4. Harbone, J.B. and B.L. Turner. 1984. Plant chemosystematics. Academic Press. London. p.232-234.
5. Cho, M.G., C.S. Chang, and Y.A. Chae. 2002. Variation of volatile composition in the leaf of *Zanthoxylum schinifolium* Siebold et Zucc. and *Zanthoxylum piperitum* DC. Korean J. Medicinal Crop Sci. 10:162-166.
6. Cho, M.G., H. Kim, and Y.A. Chae. 2003. Analysis of volatile compounds in leaves and fruits of *Zanthoxylum schinifolium* Siebold et Zucc. and *Zanthoxylum piperitum* DC. by headspace SPME. Korean J. Medicinal Crop Sci. 11:40-45.
7. Song, S.E. and Y.A. Chae. 2004. Characteristics of volatile oil components in *Elsholtzia splendens* Nakai collected in Korea. Korean J. Medicinal Crop. Sci. 12:459-462.
8. Park, S.O. 2006. Influence of growth stages, fertilization levels, and dry methods on qualities, and lipoprotein metabolism of *Artemisia* sp. Thesis of Ph. D. Korea Univ. p.34.
9. Moon, H.I. and J.H. Lee. 1997. Volatile aromatic components of Ginger(*Zingiber officinalis* Roscoe) rhizomers and Japanese spice bush(*Lindera obtusiloba* BL.). Korean J. Crop Sci. 42:7-13.
10. Suh, E.J. and K.W. Park. 1999. Composition and content of essential oil in hydroponically-grown basil at different season. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 40:331-335.
11. Baek, J.P., T.J. Kim, C.H. Kim, B.C. Cho, and K.W. Park. 2006. Change if internal quality in basil(*Ocimum basilicum* L.) Journal of the Herbs and Aromatherapy. 2(1):19-25.
12. Loomis, W.D. and R. Croteau. 1973. Biochemistry and physiology of lower terpenoides. Academic Press. New York. p.147-186.

13. Kim, J.H. 2003. Variation of the leaf monoterpenes concentration of *Zanthoxylum schinifolium* at Mt. Muhak. J. Basic Science. 18:137-149
 14. Bendnarczyk A. and A. Kramer. 1975. Chem. senses Flav., 1:377.
 15. Macleod A.J. and N.M. Pieris. 1984. Phytochemistry, 23:353.
 16. National Institute of Agricultural Science and Technology(NIAST). 2000. Analysis method of soil and plant. NIAST. Suwon. Korea. p 103-142.
 17. Inskip, W.P. and P.R. Bloom. 1985. Extinction coefficients of chlorophyll a and b in N,N-dimethylformamide and 80% acetone. Plant Physiol. 77:483-485.
 18. Kwon, J.B., J.R. Kwon, Y.S. Shin, C.R. Kim, and B.S. Choi. 1996. Effect of organic matters on horticultural characteristics and yield of potato(*Solanum tuberosum* L.) in greenhouse. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 37:758-760.
 19. Lee, K.H. 2006. Present status of internal and external export and import of spices. Thesis of Mater. Korea. Univ., Seoul.
 20. Koh, H.Y., H.W. Park, and T.S. Kang. 1988. Effect of packaging methods on the storage of banana. Korean J. Food sci. Technol. 12:737-741.
 21. Kader, A.A. 1992. Postharvest technology of horticultural crops. University of California, Division of Agriculture and Natural Resources p. 15-18, 104-105, 211-213.
 22. Park, Y.S. M.Y. Park, and Y.S. Joo. 2005. Storability of loquat fruits as influenced by harvest date and storage temperature. Kor. J. Hort. Sci. Technol. 23:64-70.
 23. Hwang, Y.S., J.P. Chun, and J.C. Lee. 1998. Influence of harvest date and postharvest treatments on fruit quality during storage and simulated marketing in 'Fuji' apples. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 39:574-578.
 24. Simth, S.M. 1984. Improvement of aroma of Cox's orange pippin apple stored in low oxygen atmospheres. J. Hort. Sci. 59:515-522.
 25. Kang, M.H., J.H. Oh, and J.K. Kim. 1998. Effect of harvesting date on quality of pear fruit during cold storage. Kor. J. Hort. Sci. & Tech. 16:447.
- Kays, J.S. 1991. Postharvest physiology of perishable plant products. AVI Publishing. New York.

26. Kang, H.M. 1999. Chilling stress alleviation effect of pre-harvest heat treatment during cultivation in warm-season vegetables at low temperature storage. Thesis of Ph. D. Korea. Univ., Seoul.
27. Kays, J.S. 1991. Postharvest physiology of perishable plant products. AVI Publishing. New York.
28. Park, K.W., H.M. Kang, and C.H. Kim. 2000a. Comparison of storability on film sources and storage temperature for fresh Japanese mint in MA storage. J. Bio-Environment Control. 9:40-46.
29. Park, K.W., H.M. Kang and C.H. Kim. 2000b. MA storage reponse of fresh lemongrass depending upon film source and storage temperature. Korean J. Hort. Sci. & Tech. 18:18-21.
30. Jung, S.T., J.G. Kim, S.S. Hong, H.S. Jang, and Y.B. Kim. 1998. Influence of maturity and storage temperature on the respiration rate and ethylene production in 'Kosui', 'Chojuro', and 'Niitaka' pears. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 39:446-448.
31. Kim, Y.B., Y. Kubo, I. Akitsugu, and N. Reinosuke. 1996. Effects of storage temperature on keeping quality of tomato and strawberry fruits. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 37:526-532.
32. Park, Y.S., B.W. Kim, and J.S. Jung. 1998. Effects of storage temperature and CO₂-enriched atmospheres on the shelf life of fig fruits during storage. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 39:184-188.
33. Kader, A.A. 1980. Prevention for ripening in fruits by use of controlled atmospheres. Food Technol. 34:51-55.
34. Watada, A.E. 1986. Effects of ethylene on the quality of fruits and vegetables. Food Technol. 40:82-85.
35. Lee, C.B. 1985. Flora of Korea. Hyangmunsa. p. 376.
36. Jeong, J.C., H.C. Ok, O.S. Hur, and C.G. Kim. 2005. Food value and postharvest physiological characteristics of wild garlic(*Allium victorialis* var. *platyphyllum*) in korea. Kor. J. Hort. Sci. Technol. 23:164-169.
37. Varis, S. and R.A.T. George. 1985. The influenced of mineral nutrition on fruit yield and quality in tomato. J. Hort. Sci. 60:373-376.

38. Mengel, K. and E.A. Kirkby. 1987. Principle of plant nutrition. Int. Potash Institute, Bern. Swiss.
39. Choi, D.J., S.H. Lee, C.B. Kim, J.T. Yoon, and S.K. Choi. 2002. Effects of CA and MA storage on the quality of garlic (*Allium sativum*). J. Kor. Soc. Hort. Sci. 43:703-706.
40. Lee, H.S. 1997. Dietary fiber intake of Korea. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 25: 540-548:116-123.
41. Hwang, K.A., K.S. Kim, C.S. Park, and S.R. Shin. 2005. Changes on the characteristics of *Lindera obtusiloba* Bl. leaf teas by manufacturing process. Korean J. Food & Nutr. 16:365-371.
42. Kubeczka, K.H. 2002. Essential oils analysis by capillary gas chromatography and carbon-13 NMR spectroscopy. John Wiley & Sons Ltd, England.
43. Hwang, K.A., S.R. Shin, and K.S. Kim. 2003. Changes on the flavor components in the leaf teas of *Lindera obtusiloba* Bl. by processing methods. Korean J. Food Preserv. 12:68-74.
44. Lee, M.S. and H.S. Choi. 1996. Volatile flavor components of *Capsella bursa-pastoris* as influenced by drying methods. Korea J. Sci. Technol. 28:814-821.
45. Papadopoulous, K.I. and P.K. Koukos. 1997. Essential oils from *Juniperus communis* L. grown in northern Greece: variation of fruit oil yield and composition. J. Essential Oil Research 9:29-35.
46. Weurman, C. 1969. Isolation and concentration of volatiles in food odor research. J. Agric. Food Chem. 17:370-384.
47. Maarse H. and R. Belz. 1985. Isolation and identification of volatile compounds in aroma reserch. D. Reidel publishing, Dorolrecht, Holland.
48. Sultana, T., N.G. Porter, G.P. Savage, and D.L. McNeil. 2003. Comparison of isothiocyanates yield from wasabi rhizome tissues grown in soil or water. J. Agric. Food Chem. 51:3586-3591.
49. Shultz T.H., R.A. Flath, T.R. Mon, S.B. Egging, and R. Teranishi. 1977. Isolation of volatile components from a model system. J. Agric. Food Chem. 28:549-552.
50. Cha, Y.J., J.W. Lee, J.H. Kim, M.H. Park and S.Y. Lee. 2004. Major Components of Teas Manufactured with Leaf and Flower of Korean Native *Camellia japonica* L. Korean J. Medicinal Crop Sci. 12(3): 183 - 190.

51. Yoon, H.J. and H.K. Chang. 1996. The Sensory Characteristics of Ginseng Leaf Tea by Processing Method. *Korean J. Food & Nutr.* Vol. 9, No. 2, pp.181~188.
52. 김광옥, 이영춘. 1998. 식품의 관능검사. 학연사. 서울. pp.144~165.
53. 구난숙, 김향숙, 이경애, 김미정. 2006. 식품관능검사. 교문사. 경기. pp.141~151.
54. Shin, A.J. And K.W. Park. 2001. Status of herbal Industry and Aromatherapy in Korea. *Korean J. Hort. Sci. & Technol.* Vol. 19, No. Supplement(1): 139.
55. Mok, C.K. 2006. Process for Production of Brown Rice/Green Tea Beverage. *Food Engineering Progress.* Vol 10, No. 4. pp. 214~220.
56. AOAC. 1990. Official Methods of Analysis of the Association of official Analytical Chemists. 15th Ed. Arlington, U.S.A.
57. Lee H. S., Won N. H., Kim H. H., Lee H. J. Yun W. J. and Lee K. W. 2005. Antioxidant effects of aqueous extract of Terminalia chebular *in vivo* and *in vitro*. *Biol. Pharm. Bull.* **28**(9); 1639~1644.
58. Singleton V. L. & Rossi J. A. J. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Amer. J. Enol. Viticult.* **16**; 144~58.
59. Bissell D.M., Hammaker L.E., Meyer U.A. 1973. Parenchymal cells from adult rat liver in nonproliferating monolayer culture. I. Functional studies. *J Cell Biol.* Dec; **59**(3); 722~734.
60. Bonney, R. J., Becker, J. E., Walker, P. R., Potter, V. R. 1974. Primary monolayer culture of adult rat liver parenchymal cells suitable for study of the regulation of enzyme synthesis. *In Vitro.* **9**; 399-413.
61. Morten, B., H., Svend, E., N. and Kurt B. 1989. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth / cell kill. *J. Immuno. Meth.* **119**; 203~210.
62. Fenglin, H., Ruili, L., Bao, H., Liang, M. 2004. Free radical scavenging activity of extracts prepared from fresh leaves of selected Chinese medical plants. *Fitoterapia* **75**; 14~23.
63. Hogberg J., Orrenius, S., O'Brien, P.J. 1975. Further studies on lipid-peroxide formation in isolated hepatocytes. *European J. Biochem.* **59**; 449~455.

64. Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* **95**; 351~353.
65. Hyun-Kyung Park, Kwang-won Lee, Won Ryang Wee, Choun-Ki Joo. 2001. FGF2(bFGF) glycation induced by TGF- β 1 in human lens epithelial cells. *J Korean Ophthalmol Soc.* **42**; 1483~1489.
66. Kinae N, Shimoi K, Furugori, M. 1994. Suppression of the formation of advanced glycosylation products by tea extracts. *Lifesciences.* **214**; 369~374.
67. Kim HY, Kim YM. 2003. Protein glycation inhibitory and antioxidative activities of some plant extracts in vitro. *FoodChemistry.* **51**; 1586~1591.
68. Suarez G, Ajaram R, Oronsky AL. 1989. Nonenzymatic glycation of bovine serum albumin by fructose (fraction), comparison with the maillard reaction initiated by glucose. *J. Biol. Chemistry.* **44**; 3674~3679.
69. Seok-Jong Lee, Kwang-won Lee, Young-Shin Chung, Won Ryang Wee, Choun-Ki Joo. 2002. Antioxidant Assay of Extracted Fractions Xanthium Strumarium L Using Lens Protein Crosslinking Activity. *J Korean Ophthalmol Soc.* **43**; 257~273.
70. Chau-Jong Wang, Jin-Ming Wang, Wea-Lung Lin, Chia-Yih Chu, Fen-Pi Chou and Tsui-Hwa Tseng, 2000. Protective Extract of *Hibiscus* Anthocyanins Against tert-butyl Hydroperoxide-induced Hepatic Toxicity in Rats. *Food and Chemical Toxicology* **38** ; 411~416.
71. Chuen-Lan Liua, Jin-Ming Wangb, Chia-Yih Chub, Ming-Tzong Chengc, Tsui-Hwa Tseng, 2002. In vivo protective effect of protocatechuic acid on tert-butyl hydroperoxide -induced rat hepatotoxicity. *Food and Chemical Toxicology* **40**; 635~641.
72. GOW-CHIN YEN, CHI-TAI YEH, AND YEN-JU CHEN, 2004. Protective Effect of *Mesona procumbens* against tert-Butyl Hydroperoxide-Induced Acute Hepatic Damage in Rats. *J. Agric. Food Chem,* **52**; 4121~4127.
73. Hyun-Sun LEE, Nam Hee WON, Kyoung Heon KIM, Hojoung LEE, Woojin JUN, and Kwang-Won LEE, 2005. Antioxidant Effects of Aqueous Extract of *Terminalia chebula* in Vivo and in Vitro, *Biol. Pharm. Bull.* **28**(9); 1639~1644

74. Jin-Ming Hwang, Chau-Jong Wang, Feu-Pi Chou, Tsui-Hwa Tseng, Yih-Shou Hsieh, Wea-Lung Lin, Chia-Yih Chu, 2002. Inhibitory effect of berberine on tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative damage in rat liver. *Arch. Toxicol.* **76**; 664-670.
75. Jin-Ming Hwang, Tsui-Hwa Tsengb, Yu-Ying Tsaic, Hwei-Jane Leec, Feu-Pi Chouc, Chau-Jong Wangc & Chia-Yih Chub, 2005. Protective effects of baicalein on tert-butyl hydroperoxide-induced hepatic toxicity in rat hepatocytes. *Journal of Biomedical Science* **12**: 389-397.
76. Min-Koung Kim, Hyun-Sun Lee, Eun-Jin Kim, Nam-Hee Won, Young-Min Chi, Byoung-Chul Kim, and Kwang-Won Lee, 2007. Protective effect of aqueous extract of *Perilla frutescens* on tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative hepatotoxicity in rats. *Food and Chemical Toxicology.* **45**; 1738-1744..
77. Ahmed I., E. Adeghate, E. Cummings, A. K. Sharma and J. Singh, 2004. Beneficial effects and mechanism of action of *Momodica charantia* juice in the treatment of streptozotocin-induced diabetes mellitus in rat, *Mo l. Cell Biochem.* **261**; 63-70.
78. Furuse M., C. Kimura, R. T. Mabayo, H. Takahashi and J. Okumura, 1993. Dietary sorbose prevents and improves hyperglycemia in genetically diabetic mice, *J. Nutr.* **123**; 59-65.
79. Jeong-Ah Yang, sung-Ok Kim, Jeong-Hwa Choi, Oh-Gye Kwag, Soon-Jae Rhee and Hyen-wook Chang, 1998. Activities of Phospholipase A₂ and Cyclooxygenase, and Syntheses of Thromboxane and Prostacyclin in Streptozotocin Induced Diabetic Rats, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **27**(1); 178-181.
80. Koh J. B., 1998. Effect of raw soy flour (yellow and black) on serum glucose and lipid concentrations in streptozotocin-induced diabetic rats, *J. korean Soc. Food Sci. Nutr.* **27**:313-318.
81. Park B. G., Lee H. S., Jung S. H., Koo Y. C., Hong C. O., LEE S. J. and Lee K. W. (2007). Single& 14-Day Repeated Oral Toxicity Study and Genotoxicological Safety Estimate of Plantamajoside Isolated from *Plantago asiatica*. *J.Toxicol.Pub.Health.* **23**(1);79-86.
82. Park B. G., Lee H. S., Jung S. H., Koo Y. C., Hong C. O., Won H. J., Park H. Y., Ryu Y. S., LEE S. J., Kim K. H., Park H. W. and Lee K. W. 2007. A 90 day repeated oral toxicity study on Plantamajoside concentrate from *Plantago asiatica*. *Phytother Res.* **21**; 1118-1123.
83. 식품의약품안전청. 2005. 의약품 등의 독성 시험 기준, 식품 의약품 안전청 고시 제 2005-60호

84. 이광원, 이현순, 홍충의, 정성훈. 2006. 식물 유효성분의 추출정제법 (차전초의 플란타마조사이드), 한국특허청, 등록번호: 10-2006-0002721.
85. Kim, K.H., Kim, S.I. and Han, Y.S. 1999. Isolation and Identification of Antimicrobial Compound from Plantain (*PlantagoasiaticaL.*). *KorenJ.Soc.FoodSci.*, **15**; 410~417.
86. Komoda, Y., Chujo, H., Ishihara, S., and Uchida, M., 1989. HPLC quantitative analysis of plantagin in Shazenso (*PlantagoasiaticaL.*) extracts and isolation of plantamajoside. *Tokyo Ika Shika Daigaku Iuo Kizai Kenkuisho Hokoku*, **23**; 81~85.
87. Philippe Op De Beck, Marie- Geneviene Dijoux, Gilbert Cartier and Anne-Marie Mariotte. 1998. Quercitrin 3'-sulphate from leaves of *leeaguinensis*. *Phytochemistry*, **47**; 1171~1173.
88. Takehiko Fukunaga, Koichi Nishiya, Ikuko Kajikawa, Yoshikuni Watanabe, Nobuo Suzuki, Koichi Takeya and Hideji Itokawa. 1988. Chemical studies on the constituents of *Hypher Tanakae* HOSOKAWA from different host trees. *Chem.Pharm.Bull.* **36**; 1180~1184.
89. Johnson B. E., Mandell G., Daniels G. Melanin and cellular reactions to ultraviolet radiation. *Nat. New Biol.* 1972; **235**: 147-149.
90. Archambult M., Yaar M., Gilchrest B. A., Keratinocytes and fibroblasts in a human skin equivalent model enhance melanocyte survival and melanin synthesis after ultraviolet irradiation. *J.Invest.Dermatol.*1995; **104**: 859-867.
91. Barker D., Dixon K., Medrano E. E., Smalara D., Im S., Mitchell D., Babcock G., Abdel-Malek Z. A. Comparison of the responses of human melanocytes with different melanin contents to ultraviolet B irradiation. *CancerRes.*1995, 1995; **55**: 4041-4046.
92. Pugliese P. T., Christensen M. S., Nacht S., Walmer S. E. In Melanin: Its Role in Human Photoprotection (Zeise L., Chedekel M. R., Fitzpatrick T. B., Eds.). *Valdenmar*, Overland Park, 1995: 271-276.
93. Schmitz S., Thomas P. D., Allen T. M., Poznansky M. J., Jimbow K. Dual role of melanins and melanin precursors as photoprotective and phototoxic agents: inhibition of ultraviolet radiation-induced lipid peroxidation. *Photochem. Photo biol.* 1995; **61**: 650-655.
94. Kumar S., Millis A. J., Baglioni C. Expression of interleukin 1-inducible genes and production of interleukin 1 by aging human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1992; **89**: 4683-4687.

95. Croute F., Delaporte E., Bonnefoy J. Y., Fertin C., Thivolet J., Nicolas J. F. Interleukin-1 beta stimulates fibroblast elastase activity. *Br. J. Dermatol.* 1991; **124**: 538-541.
96. Mauviel A., Chen Y. Q., Kahari V. M., LedoI., WuM., Rudnicka L., Uitto J. Human recombinant interleukin-1beta up-regulates elastin gene gene expression indermal fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 1993; **268**: 6520-6524.
97. Norris P. G., Gange R. W. Acute effects of ultraviolet radiation on the skin. In: Fitzpatrick T. B., Eisen A. Z., Wolff K. et al. *Dematology in general medicine*, 4th ed. New York: Mc Graw-Hill Book. 1993: 1651-1658.
98. Young A. R. Chronic effect of ultraviolet radiation on the skin: experimental aspects. In: Fitzpatrick T. B., Eisen A. Z., Wolff K. et al. *Dematology in general medicine*, 4th ed. New York: Mc Graw-Hill Book. 1993: 1658-1660.
11. Pathak M. A. Topical and systemic photoprotection of human skin against solar radiation. In: Lim H. W., Soter N. A. *Clinical photomedicine*. 1st ed. New York: Marcel Dekker Inc. 1993: 287-306.
99. Deleo V. A., Masco M. J. Photosensitivity. In: Moschella S. L., Hurley H. J. eds. *Dermatology*, 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders Co. 1992: 507-531.
100. 김상태. 광보호. *대한의학협회지*. 1993; **36**: 765-773.
101. 김진환, 박재경, 허충립, 이무형. UVB 반복 조사가 배양 인체 멜라닌 세포의 형태학적 변화와 증식 및 멜라닌화에 미치는 영향. *대피지*. 1994; **32**: 1035-1045.
102. Rosdahl I. K. Local and systemic effects on the epidermal melanocyte population in UV-irradiated mouse skin. *J. Invest Dermatol.* 1979; **73**: 306-309.
103. 배주한, 이원우, 서기석, 김상태. Oleanolic Acid와 Ursodeoxycholin Acid가 Mouse에서 자외선 B 조사에 의한 색소 형성에 미치는 영향. *대한피부연구학회지*. 2000; **7**: 223-229.
104. Ratnam A. V., Brahmayya sastry P., Satyanarayana B. V. Asvorbic acid and me;anogenesis. *British Journal of Dermatology*. 1977; **97**: 201-204.
105. Busca R., Bwerolorro C., Ortonne J. P., Ballotti R. Inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/p70(S6)-kinase pathway induces B16 melanoma cell differentiation. *J. Biol. Chem* 1996; **271**: 31824.

106. Kim D. S., Park S. H., Kwon S. B., Park E. S., Huh C. H., Youn S. W., Park K. C. Sphingosylphosphorylcholine-induced ERK activation inhibits melanin synthesis in human melanocytes. *Pigment Cell Res.* 2005; **19**: 146.
107. Hodgkinson C. A., Moore K. J., Nakayama A., Steingrimsson E., Copeland N. G., Jenkins N. A., Arnheiter H. Mutations at the mouse microphthalmia locus are associated with defects in a gene encoding a novel basic-helix-loop-helix-zipper protein. *Cell.* 1993; **74**: 395-404.
108. Steingrimsson E., Moore K. J., Lamoreux M. L., Ferre-D'Amare A. R., Burley S. K., Zimring D. C., Skow L. C., Hodgkinson C. A., Arnheiter H., Copeland, N. G. Molecular basis of mouse microphthalmia (mi) mutations helps explain their developmental and phenotypic consequences. *Nat. Genet.* 1994; **8**: 256-263.
109. Steingrimsson E., Copeland N. G., Jenkins N. A. Melanocytes and the microphthalmia transcription factor network. *Annu. Rev. Genet.* 2004; **38**: 365-411.
110. Bentley N. J., Eisen T., Goding C. R. Melanocyte-specific expression of the human tyrosinase promoter: activation by the microphthalmia gene product and role of the initiator. *Mol. Cell Biol.* 1994; **14**: 7996-8006.
111. Bertolotto C., Abbe P., Hemesath T. J., Bille K., Fisher D. E., Ortonne J. P., Ballotti R. Microphthalmia gene product as a signal transducer in cAMP-induced differentiation of melanocytes. *J. Cell Biol.* 1998a; **142**: 827-835.
112. Yasumoto K., Yokoyama K., Takahashi K., Tomita Y., Shibahara, S. Functional analysis of microphthalmia-associated transcription factor in pigment cell-specific transcription of the human tyrosinase family genes. *J. Biol. Chem.* 1997; **272**: 503-509.
113. Yavuzer U., Keenan E., Lowings P., Vachtenheim J., Currie G., Goding, C. R. The microphthalmia gene product interacts with the retinoblastoma protein in vitro and is a target for deregulation of melanocyte-specific transcription. *Oncogene.* 1995; **10**: 123-134.
114. Englaro W., Bertolotto C., Bisca R., Brunet A., Pages G., Ortonne J. P., Ballotti R. Inhibition of the mitogen-activated protein kinase pathway triggers B16 melanoma cell differentiation. *J. Biol. Chem.* 1998; **273**: 9966-9970.
115. Kim D. S., Park S. H., Kwon S. B., Park E. S., Huh C. H., Youn S. W., Park K. C. Sphingosylphosphorylcholine-induced ERK activation inhibits melanin synthesis in human melanocytes. *Pigment Cell Res.* 2005; **19**: 146-153.

주 의

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