

와송의 유용 생리활성 물질의 구명 및
바이오식품 개발

(Study of biological activity component from
Orostachys japonicus and development of Bio-food)

와송의 항암면역에 관한 연구
와송의 항산화·항당뇨 활성에 관한 연구
와송으로부터 생리활성물질의 분리 및 조성물
개발에 관한 연구
와송의 가공특성 및 생산 자동화 공정 구축에
관한 연구

경상대학교

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “와송의 유용 생리활성 물질의 구명 및 바이오식품 개발”에 관한 연구” 과제

(제 1 세부과제 “와송의 항암면역에 관한 연구”

제 2 세부과제 “와송의 항산화·항당뇨 활성에 관한 연구”

제 3 세부과제 “와송으로부터 생리활성물질의 분리 및 조성물 개발에 관한 연구”

제 4 세부과제 “와송의 가공특성 및 생산 자동화 공정 구축에 관한 연구”)의 최종보고서로 제출합니다.

2009년 4월 24일

주관연구기관명 : 경상대학교

주관연구책임자 : 성 낙 주

세부연구책임자 : 김 인 수

협동연구기관명 : 한국국제대학교

협동연구책임자 : 서 종 권

협동연구기관명 : 경남농업기술원

협동연구책임자 : 이 상 대

요 약 문

I. 제 목

와송의 유용 생리활성 물질의 구명 및 바이오식품 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

과학의 발달과 더불어 현대 의학도 눈부신 발전을 하여 수많은 질병들을 다스릴 수 있게 되었으나 환경의 오염, 식생활의 변화, 복잡한 사회구조로 인한 스트레스의 증가 등은 새로운 질병의 원인이 되고 있다. 과거와는 달리 현대인의 생활 패턴의 변화와 관련된 당뇨, 비만, 심혈관계 질환 및 암 등은 현대인에게 가장 빈번히 발생하는 질병 중의 하나이며, 암의 경우 최근 10년간 년 평균 9% 정도씩 암 환자가 증가하고 있다. 당뇨병의 경우 장기간 치료기간이 요구되며 식요법이 필수적이므로 당뇨병 치료와 관련이 있는 다양한 제품의 개발이 이루어져 있으나, 혈당강하에 대한 뚜렷한 효과의 부족으로 새로운 식소재의 개발이 필요하며, 이러한 당뇨병은 혈당 상승뿐만 아니라 생체 내 자유라디칼과 과산화물의 생성을 증가시켜 동맥경화 등과 같은 합병증을 유발시키기도 한다. 이들 질병은 아직까지 명확한 치료의 해결책을 찾지 못하고 있으며 이러한 질병의 증가는 개인의 문제를 넘어서 지역사회, 나아가 국가적인 문제로 대두되고 있어 적절한 대응책의 마련이 시급한 실정이다. 이에 다양한 치료법과 의약품이 연구 개발되고 있는데 화학적 의약품의 경우 생체 내 환원성의 결여와 자유 라디칼의 생성에 따른 직접적인 DNA 손상, 내성 및 각종 부작용으로 인하여 치료율이 낮고 환자의 삶의 질을 저하시키는 등 새로운 문제점이 대두되고 있다.

따라서 최근에는 각종 생약이나 식용 추출물로부터 보다 안전하고 항산화력이 강한 천연 약제를 개발하기 위한 연구들이 활발히 진행되고 있다. 특히 천연 식물의 경우 과거로부터 꾸준히 섭취되어왔으므로 그 안전성이 확보되어 있으며 식물의 생리활성에 관여하는 다양한 기능성 물질인 phytochemical을 함유하고 있어 그 유용성이 인정되고 있다. 그러나 다종다양한 식물자원의 성분, 항산화, 항암, 면역 및 항당뇨 등과 같은 생리활성을 구명하기 위한 연구는 아직 미흡한 실정이며 이에 대한 과학적 연구 결과의 제시와 더불어 적절히 이용할 수 있는 방안의 모색이 요구되고 있다. 특히, 현

대인의 질병들 중 대부분이 식이원성임을 감안할 때 식품 중의 위해요소를 감소시키거나 동시에 섭취함으로써 위해물질의 활성을 저하시키는, 치료보다는 예방적 차원에서 건강을 영위할 수 있도록 하는 연구가 진행되어야 할 필요가 있다.

한편으로, 우리나라 농가는 쌀 시장의 개방으로 주 소득원이 위협을 받고 있어 기존의 농업을 대신할 수 있는 새로운 고부가가치 작물의 재배, 즉 기능성이 높고 단위 면적당 수익을 최대화 할 수 있는 대체 작물의 전환이 절실히 요구되고 있다. 아직까지 이에 대한 뚜렷한 대안이 마련되어 있지 못하며 정보력과 연구력을 지니지 못한 국내 농가는 점차 경쟁력을 상실해 가고 있어 고소득 특화 작물의 재배, 상품화 및 판로개척까지 이어지는 전반적인 인프라 구축이 필요하다.

따라서 본 연구에서는 과거부터 한방과 민간요법에서 항암제로 널리 이용되어 왔으며, 또 혈압강하, 이노작용, 호흡증강, 이습소종, 소변사림 등에 효능이 있고, 외용으로 치질, 부종, 동통 및 출혈의 치료 등에 사용되어온 와송의 생리활성을 과학적으로 규명하고 이를 활용한 다양한 건강보조 식품을 개발하고자 한다. 과거에는 와송의 생산량이 극히 적고 가격이 높아 귀한 약재로 이용되어 왔으며, 주로 자연산 와송에 의존해 왔다. 하지만, 고부가가치화 가능성이 높은 천연물 소재로 인식되면서 각 지역에서는 이러한 특화작물을 대량생산 할 수 있는 재배 연구 노력이 확대되고 있다(농림기술개발사업, 부가가치 증진을 위한 바위솔의 주년재배 체계 확립과 약리성분의 변화탐색, 2004년 선정). 또한 기존에 알려져 있던 여러 가지 기능성을 과학적인 연구 결과에 기초한 정확한 데이터의 제시를 통해 확인하고, 이러한 연구결과에 기초한 고부가가치 바이오헬스 제품과 식품류를 유형별로 개발하여 활용 방안을 제시함으로써 재배 농가의 지속적인 수익유지 및 지역경제 활성화에도 크게 기여할 것으로 기대된다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

민간요법 또는 한의학에서 항암치료제로 주목 받고 있는 와송(*Orostachys japonicus* A. Berger)의 항산화, 항당뇨 및 항암면역 활성을 검정한 후 유용성 생리활성 물질의 대량분리방법을 정립하고, 연구 결과에 기초한 유형별 바이오 헬스 제품을 개발하여 상품화하고, 동시에 대량생산을 자동화하여 참여기업에 기술 이전함으로써 지역특화 작물의 고부가가치화를 통하여 농가소득을 증대시키고, 나아가 국제 경쟁력을 갖는 기능성 작물로 육성하여 지역 경제 활성화에 기여하고자 한다.

1. 와송의 생리활성 및 상품화

가. 와송 유용물질의 분리 및 분석

- (1) 채취시기별 물질 분리
- (2) 용매별 물질 분리
- (3) 유용물질의 분리 및 동정

나. 와송 천연물소재를 이용한 최적조성물 개발

- (1) 항당뇨 활성 부원료 선정
- (2) 와송 및 선정생약재의 추출수율 측정
- (3) 와송 최적조성물의 배합조건 선정

다. 와송 및 최적조성물의 항산화활성 분석

- (1) 총페놀 및 플라보노이드 함량 측정
- (2) DPPH라디칼 소거능 측정
- (3) 환원력 측정
- (4) 개발조성물의 항산화활성 측정

2. 와송의 가공특성 및 생산공정 구축

가. 와송의 가공특성 연구

- (1) 건조방법에 따른 건조수율 측정
- (2) 건조방법을 달리한 와송의 물추출물 제조

나. 와송의 유용물질을 함유하는 조성물을 이용한 제형화

- (1) 바이오헬스 소재 및 기능성식품의 형태
- (2) 과립분말형 시제품 제형화 공정 확립
- (3) 액상형 시제품 제형화 공정 확립
- (4) 와송을 활용한 환형, 파우치형 및 정제형 제품 제형화 공정 확립
- (5) 대량생산시스템 설계

다. 와송 천연물소재 및 최적조성물 제조공정 확립

3. 와송의 항산화 활성 구명

가. 와송 채취시기별 항산화 활성 구명

나. 용매별 추출물의 항산화 활성

다. 처리조건별 와송 추출물의 항산화 활성

라. 식용유지 기질에서 와송 추출물의 항산화 활성

마. 생약재복합물 및 와송 추출물의 항산화 활성

4. 와송의 항당뇨 활성 구명

가. 와송 추출물의 항당뇨 활성

나. 한약재 복합물과 와송 추출물의 급이에 따른 항당뇨 활성

5. 와송의 항암·면역 활성 구명

가. 와송 추출물에 의한 NO 생산 측정

나. 와송 추출물에 의한 대식세포의 cytotoxicity 생산 측정

다. 와송 추출물의 암세포 성장 억제 효과 측정

라. 와송 추출물의 FACS에 의한 세포주기 변화 측정

마. 와송 추출물 및 생약재 혼합 조성물의 암세포 성장 억제능 측정

바. 와송과 상향 추출물 및 혼합 조성물의 암세포 성장 억제능 측정

6. 시제품 개발 및 상품화

가. 제품별 포장디자인 개발

나. 와송 건강기능식품 제조방법 및 규격

다. 특허출원

라. 제품홍보

IV. 연구개발결과

1. 와송의 생리활성 및 상품화

와송의 채취시기별, 용매별 유용물질을 분리하여 5개의 물질((+)-catechin, (-)-kaempferol, quercetin, 3,4-dihydroxybenzoic acid 및 gallic acid)을 동정하였다.

와송 천연물 신소재를 함유하는 항당뇨 활성이 우수한 최적조성물을 개발하기 위해 한방에 의한 처방수를 근거로 분야별 처방빈도가 가장 높은 부원료를 선정하였으며, 부원료 생약재에 대한 항산화 활성을 측정하므로써 최적의 개발조성물을 선정하였다.

2. 와송의 가공특성 및 생산공정 구축

와송의 건조조건을 달리하여 건조시킨 후 수율 등을 측정한 결과 열풍건조법이 최

적으로 판정되었다. 부원료인 생약재와 혼합하여 최적조성물을 이용한 바이오헬스 소재 및 기능성식품의 개발형태를 결정하였다. 과립분말형, 액상, 환형, 파우치형, 정제형 제품의 제형화 공정도 및 생산라인 설계도를 완성하였다.

3. 와송의 항산화 활성 구명

건조 방법을 달리한 와송의 항산화 활성을 측정한 결과, 총 페놀 및 플라보노이드의 함량은 물보다 에탄올추출물에서 높았으며, 건조방법에 따라서는 열풍건조 시료에서 유의적으로 높았다. 전자공여능, 환원력, hydroxyl radical 소거능, SOD 유사활성 및 아질산염 소거능은 열풍건조 > 동결건조 > 천일건조 시료의 순으로 높았으며, 물보다 에탄올추출물에서 항산화능이 높았다.

식용유지를 저장하는 동안 와송을 첨가했을 때 지질의 산화 정도를 측정한 결과 열풍건조한 와송의 에탄올추출물이 저장기간 및 가열시간에 따른 유지의 산화억제에 효과적이었다.

와송 추출물 및 생약재복합물이 혼합되었을 때 DPPH 및 ABTs 라디칼 소거에 의한 항산화능의 시너지효과가 100 µg/mL의 낮은 농도에서 두드러진 활성을 보였고, TBARS법에 의한 지질과산화능도 생약재복합물과 와송 추출물이 혼합된 실험군에 유의적으로 높았다.

생약재복합물 및 와송 추출물의 아질산염 소거능은 pH 2.5의 반응계에서 100 µg/mL의 농도에서는 2.68±1.02~5.07±0.49%의 소거능을 보였으며, MW-3(생약재복합물:와송 추출물=1:3/v:v)에서 유의적으로 소거능이 높았다. NO라디칼 소거능도 MW-3에서 가장 우수하여 생약재복합물이 와송 추출물에 대해 시너지효과가 있는 것으로 생각된다. α-glucosidase 활성 저해능은 시료 첨가량이 증가됨에 따라 와송 추출물 및 MW-3에서 유의적으로 상승되었다

4. 와송의 항당뇨 활성 구명

Streptozotoln 유발 당뇨쥐에 대한 와송 추출물 및 와송과 생약재복합물 급이시 항당뇨 활성을 분석하였다. 와송 추출물의 급이로 혈당은 점차 감소되는 경향이였으며, 와송 FW(동결건조 물추출물) 0.5% 급이군에서 유의적으로 낮았다. LDL-C 함량 및 동맥경화지수는 와송 추출물의 급이로 유의적으로 감소되었다. 간장 조직의 glycogen 함량은 모든 실험군에서 유의적 차이가 없었으나, 간장 조직의 단백질 함량은 HE(열풍건조 에탄올추출물) 0.5% 급이군과 FW(열풍건조 물추출물) 0.5% 급이군에서 유의적인

증가를 보였다. 간장 조직의 TBARS 함량, conjugated diene(C.D.) 함량 및 항산화 활성은 와송 추출물의 급이로 개선되는 경향이였다.

와송과 생약재복합물 급이시 경구당부하검사 결과 DMWW-3(생약재:와송=1:3)은 포도당 급이 후 180분 경에 202.00 mg/dL로써 공복시 혈당함량과 유사한 수준으로 회복되었다. 생약재 및 와송 추출물을 급이한 DMW-0 (생약재:와송=1:0), DMW-1 (생약재:와송=1:1) 및 DMW-3 (생약재:와송=1:3)에서는 와송의 첨가량이 증가됨에 따라 혈당이 유의적으로 감소되었다. 또한 생약재복합물과 와송 추출물의 혼합급이는 혈중 당화 헤모글로빈의 함량을 감소시켰다. 혈중 TBARS 함량은 와송 추출물의 급이량이 증가될수록 유의적으로 감소되었으며, DMW-3에서 정상군과 유사한 수준이었다. 항산화 활성은 생약재복합물과 와송 추출물을 급이한 실험군에서 정상군보다 유의적으로 높은 활성을 나타내었다. 혈중 지질함량은 생약재복합물 및 와송 추출물 급이군에서 정상군과 유사한 함량이었다. DMW-3은 간장 조직의 글리코겐 함량도 유의적으로 증가시킨 것으로 나타났다. 따라서 와송 추출물은 생약재 복합물과 혼합되었을 때 항당뇨 활성에 시너지효과를 나타내는 것으로 확인되었다.

5. 와송의 항암·면역 활성 구명

건조방법을 달리한 와송 추출물은 대식세포를 활성화시켜서 일산화질소 생산을 유도하였으며, 다양한 사이토카인을 분비하여 항종양 및 면역 활성을 유도하는 것을 확인하였다. 와송 추출물에 의한 인체 유방암 세포주인 MCF-7 세포에 대하여 높은 항암 활성을 보였으며 모든 추출물이 농도가 증가함에 따라 활성이 증가되었다.

인체 대장암 세포인 HT-29에 대한 동결건조 물추출물이 모든 농도에서 50% 이상의 활성을 보였고, 에탄올추출물에서도 농도 의존적으로 유의성 있는 활성을 나타내었다. HepG-2 세포에 대한 와송 추출물의 저해 효과는 열수추출물과 에탄올추출물간 유의적인 차이는 보이지 않았으나 FE(동결건조 에탄올추출물) 첨가군에서는 100 µg/mL 이상의 농도에서 30% 이상의 활성을 보였다. HeLa 세포에 대한 와송 추출물의 저해 효과는 에탄올추출물에 비해 열수추출물에서 높은 활성을 보였는데, 특히 HW(열풍건조 물추출물) 100 µg/mL 이상의 농도에서는 약 38%의 억제효과를 보여 다른 시료에 비해 우수한 항암 활성을 보였다.

4종류의 암세포에 대하여 와송 추출물의 항암 효과를 시험한 결과 대장암 세포주와 간암 세포주에서 유의적으로 높은 억제효과를 보였다.

MTT assay 결과 위암세포인 AGS 세포에 대한 생육저해 활성은 와송 추출물의 경우 26.90±2.81~ 46.49±1.17%로 농도 의존적으로 점차 증가하였다. HT-29 세포에 대한

와송의 활성은 와송 단독으로 사용하는 것 보다 생약재 조성물이 첨가되면서 상승효과를 보였다. 상황버섯 및 와송 추출물에서 1:2나 2:1 혼합 조성물의 활성은 MCF-7 세포에 대한 생육저해 활성이 각각 $56.55\pm 2.18\%$ 와 $73.59\pm 5.33\%$ 로 유의적으로 증가하였다.

6. 시제품 개발 및 상품화

와송을 함유하는 액상, 환, 정제형 제품에 대한 포장 디자인과 시제품을 제작하였으며, 시제품의 관능평가 결과 전반적인 기호도가 양호한 것으로 확인되었다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

- ▶ 와송으로부터 다기능성 바이오식품을 개발하여 특허출원하고, 이를 산업체에 기술 이전하여 상품화함으로써 천연물 소재 식품산업의 활성화, 재배농가 확대 및 농가 소득 증대에 기여하고자 함.
- ▶ 지리산 권역을 중심으로 한 한방 천연물소재를 고부가가치 명품브랜드로 집중 육성함으로써 수입개방화로 인한 특화작물 재배농가의 대외 경쟁력 향상이 기대됨.
- ▶ 무독성, 저비용의 약용식품 및 영양의학식품을 개발함으로써 천연물소재를 이용하는 기반기술을 제공하게 됨.
- ▶ 민간요법으로 사용되어온 와송의 항암면역 증강, 항산화 및 항당뇨 활성의 메카니즘을 현대과학으로 검증함으로써 개발대상 기술과 제품의 우수성 및 신뢰성 확보가 가능함
- ▶ 와송의 유용 생리활성물질을 이용한 천연물 식품소재를 개발하고 이를 상품화함으로써 특화작물의 활용가치 증대 및 지역 명품 브랜드가 가능하며, 이를 통해 농가소득 증대에 크게 기여할 것으로 예상됨.
- ▶ 와송으로부터 항암면역, 항산화 및 항당뇨 활성을 갖는 천연물 식품소재를 제품화 한다면, 향후 대부분 수입에 의존해 왔던 약용식품과 영양의학식품의 수입대체 효과가 기대되며, 또한 개발기술을 상품화하여 지속적으로 마케팅 전략을 병행한다면 국내 천연물 식품소재의 수출기반을 조성하는데 크게 기여할 것으로 사료됨.

SUMMARY

Wa-song(*Orostachys japonicus* A. Berger), in Korea, is a perennial herb known as a medicinal plant. It has been used as an anti-inflammatory agent for the treatment of hepatitis, boils and piles, and as a hemostatic agent for the treatment of hematemesis, rhinorrhagia and bloody excrement. Its major bioactive compound, gallic acid (GA), significantly enhanced hepatic ethanol metabolism.

Several phytochemicals, including triterpenes, sterols and flavonoids have been isolated from the plant. Some biological activities such as antioxidant, anti-complementary and cytotoxic have been reported by many authors in Korean. Furthermore, methanol extract of Wa-song also been shown to have a protective effect against H₂O₂-induced apoptosis in mouse hypothalamic neuronal cell. The active ingredients of Wa-song protecting neuronal cell from reactive oxygen species were proposed to be hydrophobic compounds. Water extract of the aerial part of Wa-song also been shown to have an inhibitory activity against HIV-1 protease.

Antioxidant activity of Wa-song was analyzed to clarify the influence of extractive solvent and drying method such as sun, hot-air and freeze drying. The contents of total phenols and flavonoids were higher in 95% ethanol extracts than water extracts, significantly. Ability of reducing power and DPPH radical, hydroxyl radical and nitrite scavenging ability were higher in the hot-air dring sample > freeze drng sample > sun dring sample, in order and their abilities were also higher in 95% ethanol extracts than water extracts. In conclusion of this experiment, antioxidant activities of Wa-song extracts were in proportion to the contents of total phenols and flavonoids. And, hot-air drying for enhancement of antioxidant activity of Wa-song is better than freeze and sun drying samples. In reaction system containing linoleic acid, the antioxidant activities against lipid oxidation enhanced in proportion to storage time. The antioxidant activity of ethanol extracts was higher than that of water extracts. In the drying methods, Wa-song extracts showed higher antioxidant activity in the order of hot-air, freeze and sun dring. The lipid oxidation the highest antioxidant activity, in system containing the promoting factors, such as Fe⁺² and Cu⁺² ions, also showed that in ethanol extract of hot-air

dring sample. The antioxidant activity of medicinal plants and Wa-song composites(MW) was analyzed. DPPH and ABTs radical scavenging ability were distinctly appeared in the low concentration of medicinal plants and Wa-song composites. The inhibitory activity of MW against α -glucosidase showed significantly increased by added amount of Wa-song.

The antioxidant activity of Wa-song was tested *in vitro* system containing oil and lard. Three kind samples of Wa-song was prepared water of hot-air drying(HW), ethanol extracts of hot-air drying(HE) and water extracts of freeze drying(FW). The different levels (0.1, 0.5 and 1.0 g/100 g) of HW, HE and FW were added to soybean oil and lard. Chromaticity, anisidine value, acid value, peroxide value(POV) and TBA value in oils were measured periodically during their storage for 28 days at 60°C and 48 hrs at 180°C. The chromaticity of edible oils was generally increased with prolonged storage days and increase in quantities of extracts at 60°C. The anisidine value showed not significantly increased during storage for 14 days. In soybean and lard added HE, its value was lower than control and BHT for storage for 28 days at 60°C. The acid value of HW was significantly increased during storage from 14 to 21 days in soybean oil and from 7 to 14 days in lard. POV was highly increased between storage for 7 and 14 days in reaction system of soybean oil. TBA values of all samples were lower than control and 0.02% BHT during their storage.

During the storage at 180°C, the chromaticity of edible oils was generally increased with prolonged heating time and HW was higher than FW. The anisidine value showed significantly increased during heating for 48 hrs. The acid value was not significant by added amount of Wa-song. Its value in HW added sample was lower than FW, after heating for 48 hrs. POV was lower HW than FW, also. After heating for 24 hrs, TBA values in soybean oil containing HW and FW added sample was lower than control. In lard, its value in HW and FW added sample was lower than control during heating for 12~48 hrs. In adding HE, it was significantly decreased by sample concentration after storage 36 hours at 180°C storage.

The antidiabetic potential of Wa-song in streptozotocin induced diabetic rats was conducted. Male Sprague-Dawley rats were divided into 8 groups at different dose

of 0.1% or 0.5% were as the diabetic experimental groups. The long time administration of extracts from Wa-song decreased the fasting blood glucose levels and serum glucose level in diabetic rats significantly decreased from the second week, and especially rats in the group fed with FW at dose of 0.5% showed the more significant effect comparing with the diabetic control group fed with basal diet. The significant decrease of serum low density lipoprotein cholesterol(LDL-C) levels in diabetic rats could reduce the risk of cardiovascular disease. There was no significant increase in hepatic glycogen levels of rats, but hepatic protein levels were increased significantly in rats of the group fed with HE at dose of 0.5% and FW at dose of 0.1%. From the results of hepatic TBARS levels, CD levels and hepatic antioxidant activity of rats, they demonstrated that antioxidant and anti-lipidperoxidant ability of diabetic rats were improved.

Effects of feeding diets containing medicinal plants and Wa-song composites(MW) in streptozotocin induced diabetic rats was examined. Groups were divided into MW-0(medicinal plants: Wa-song=1:0), MW-1(medicinal plants: Wa-song=1:1) and MW-3(medicinal plants: Wa-song=1:3) in induced diabetic rats. Oral glucose tolerant test(OGTT) was significantly decreased by time, group fed MW-3 shown 202.00 mg/dL after 180 min. And its level was same as the fasting blood glucose level. Blood glucose and glucosylated hemoglobin was significantly decreased by added amount of Wa-song. Glycogen content of liver was significantly increased by Wa-song contents.

Wa-song was activated macrophage and then elevated nitric oxide(NO) concentration. Secretion of cytokine was activated anti-tumor and immunostimulation. Anticancer activity of Wa-song was significantly decreased on HT-29 and HepG-2 cells. In MTT assay, growth inhibitory effects on AGS, HT-29 cells were significantly increased by adding amount of Wa-song. Anticancer activity of Sang-hwang mushroom extract and Wa-song composites(1:2 or 2:1/v:v) on MCF-7 cells was $56.55 \pm 2.18\%$, $73.59 \pm 5.33\%$. And its levels were significantly increased than control.

Package design and experimental products in a liquids, pills, tablets containing Wa-song were developed. In the organoleptic characteristics of products, the overall acceptability was relatively higher.

CONTENTS

| | |
|---|-----------|
| Chapter 1. Introduction of the research project ... | 17 |
| Chapter 2. Art status of domestic and abroad | 19 |
| Chapter 3. Results of the research project | 20 |
| Section 1. Biological activity and commercialization of Wa-song | 20 |
| 1. Introduction | 20 |
| 2. Identification and determination of functional compounds of Wa-song | 21 |
| 3. Development of the optimum composite using Wa-song | 26 |
| 4. Antioxidant activities of Wa-song and the optimum composite | 35 |
| Section 2. Implementation of processing quality and manufacturing process on Wa-song | 38 |
| 1. Study on processing quality of Wa-song | 38 |
| 2. Formulation of using contained useful material composite | 43 |
| 3. Manufacturing process of Wa-song naturally and optimal composite | 48 |
| Section 3. Investigation on antioxidant activities of Wa-song | 50 |
| 1. Introduction | 50 |
| 2. Materials and methods | 51 |
| 3. Results and discussion | 55 |
| Section 4. Investigation on anti-diabetic activities of Wa-song | 120 |
| 1. Introduction | 120 |
| 2. Materials and methods | 121 |
| 3. Results and discussion | 126 |
| Section 5. Investigation on Anticancer and immunity activity of Wa-song | 157 |
| 1. Introduction | 157 |
| 2. Materials and methods | 158 |
| 3. Results and discussion | 161 |
| Section 6. Development and commercialization of experiment products | 179 |
| 1. Development of specific Product package design | 179 |
| 2. Manufacturing method and standard of healthy functional foods of Wa-song | 184 |

| | |
|--|------------|
| 3. Patent application | 186 |
| 4. Products Publicity | 200 |
| Chapter 4. Accomplished degree of Purpose and Contributory degree in related fields | 201 |
| Chapter 5. Applicatory plans of results | 204 |
| Section 1. Necessity of additional research and improvement | 204 |
| Section 2. Application in other fields and post-effects | 204 |
| Chapter 6. Situation of external information collected in this subject | 207 |
| Chapter 7. References | 208 |

목 차

| | |
|---|----|
| 제 1 장 연구개발과제의 개요 | 17 |
| 제 2 장 국내외 기술개발 현황 | 19 |
| 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 | 20 |
| 제 1 절 와송의 생리활성 및 상품화 | 20 |
| 1. 서 론 | 20 |
| 2. 와송 유용물질의 분리 및 분석 | 21 |
| 가. 채취시기별 물질 분리 | 21 |
| 나. 용매별 물질 분리 | 21 |
| 다. 와송의 유용물질 분리 | 23 |
| 3. 와송 천연물소재를 이용한 최적조성물 개발 | 26 |
| 가. 항당뇨 활성 부원료 선정 | 27 |
| 나. 와송 및 선정생약재의 추출수율 | 33 |
| 다. 와송 최적조성물의 배합조건 | 34 |
| 4. 와송 및 최적조성물의 항산화활성 | 35 |
| 제 2 절 와송의 가공특성 및 생산공정 구축 | 38 |
| 1. 와송의 가공특성 | 38 |
| 가. 건조방법에 따른 건조수율 | 39 |
| 나. 건조방법을 달리한 와송의 물추출물 제조 | 40 |
| 다. 건조방법을 달리한 와송의 에탄올추출물 제조 | 41 |
| 2. 와송의 유용물질을 함유하는 조성물을 이용한 제형화 | 43 |
| 가. 바이오헬스 소재 및 기능성식품의 형태 | 43 |
| 나. 과립분말형 시제품 제형화 공정 | 44 |
| 다. 액상형 시제품 제형화 공정 | 45 |
| 라. 와송을 활용한 환형, 파우치형 및 정제형 제품 제형화 공정 | 45 |
| 마. 대량생산시스템 설계 | 47 |
| 3. 와송 천연물소재 및 최적조성물 제조공정 | 48 |
| 제 3 절 와송의 항산화 활성 구명 | 50 |
| 1. 서 론 | 50 |
| 2. 재료 및 방법 | 51 |

| | |
|---|-----|
| 가. 항산화 활성 측정 | 51 |
| 나. 식용유지기질에서 항산화 활성 측정 | 54 |
| 3. 결과 및 고찰 | 55 |
| 가. 외송 채취시기별 항산화 활성 | 55 |
| 나. 용매별 추출물의 항산화 활성 | 68 |
| 다. 처리조건별 외송 추출물의 항산화 활성 | 80 |
| 라. 식용유지 기질에서 외송 추출물의 항산화 활성 | 89 |
| 마. 생약재복합물 및 외송 추출물의 항산화 활성 | 110 |
| 제 4 절 외송의 항당뇨 활성 구명 | 120 |
| 1. 서 론 | 120 |
| 2. 재료 및 방법 | 121 |
| 가. 실험동물, 사육조건 및 식이조성 | 121 |
| 나. 당뇨 유발 | 121 |
| 다. 식이섭취량, 식이효율 및 체중측정 | 121 |
| 라. 경구 당부하 검사 | 122 |
| 마. 실험동물의 처리 | 123 |
| 바. 혈액 분석 | 123 |
| 사. 조직성분 분석 | 124 |
| 아. 통계처리 | 126 |
| 3. 결과 및 고찰 | 126 |
| 가. 외송 추출물의 항당뇨 활성 | 126 |
| 나. 생약재복합물과 외송 추출물의 급이에 따른 항당뇨 활성 | 140 |
| 제 5 절 외송의 항암·면역 활성 구명 | 157 |
| 1. 서 론 | 157 |
| 2. 재료 및 방법 | 158 |
| 가. 세포 주 배양법 | 158 |
| 나. 일산화 질소 측정법 | 159 |
| 다. Cytotoxicity 측정법 | 159 |
| 라. Sulforhodamine B (SRB) assay | 159 |
| 마. Cell morphology and nuclear staining | 160 |
| 바. Flow cytometric analysis of cell cycle | 160 |
| 사. MTT assay | 160 |

| | |
|--|-----|
| 3. 결과 및 고찰 | 161 |
| 가. 와송 추출물에 의한 NO 생산 | 161 |
| 나. 와송 추출물에 의한 대식세포의 cytotoxicity 생산 | 165 |
| 다. 와송 추출물의 암세포 성장 억제 효과 | 166 |
| 라. 와송 추출물의 DNA fragmentation | 169 |
| 마. 와송 추출물의 FACS에 의한 세포주기 변화 | 170 |
| 바. 와송 추출물 및 생약재 혼합 조성물의 암세포 성장 억제능 | 171 |
| 사. 와송과 상황버섯 추출물 및 혼합 조성물의 암세포 성장 억제능 | 174 |
| 제 6 절 시제품 개발 및 상품화 | 179 |
| 1. 제품별 포장디자인 개발 | 179 |
| 가. 와송 액상제품 포장디자인 | 179 |
| 나. 환제품 및 정제형 제품의 포장디자인 | 179 |
| 다. 액상 시제품의 품질평가 | 180 |
| 라. 개발시제품의 관능평가 | 181 |
| 2. 건강기능식품 제조방법 및 규격 | 184 |
| 3. 특허출원 | 186 |
| 4. 제품 홍보 | 200 |
| 제 4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 | 201 |
| 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획 | 204 |
| 제 1 절 연구개발결과의 활용방안 | 204 |
| 제 2 절 기대성과 | 204 |
| 1. 기술적 측면 | 204 |
| 2. 경제적·산업적 측면 | 205 |
| 3. 연구성과 | 205 |
| 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 | 207 |
| 제 7 장 참고문헌 | 208 |

제 1 장 연구개발과제의 개요

생활수준의 향상으로 평균수명이 연장됨에 따라 성인병의 발병이 증가되고 있는데, 성인병은 영양소의 과다섭취, 스트레스, 흡연 및 음주 등에 의해 생체 내 정상적인 세포대사 과정에서 생성되는 활성산소 및 유리라디칼이 세포막의 손상, 지질 산화, 단백질 분해 등을 초래함으로써 발병하게 된다(Kim SY. et al 1999a).

생체는 호흡이라는 과정을 통하여 끊임없이 산소를 체내로 유입하고 있으며, 이들 산소가 유발하는 산화적 스트레스는 심혈관의 기능장애, 동맥경화, 염증유발, 암, 약물독성, 재관류 손상, 신경변성의 손상을 포함하는 다양한 병리학적 증상을 유발하게 된다(Aruoma OI. 1998). 이러한 산화적 스트레스의 직접적인 원인으로 superoxide anion, hydroxyl radical 및 peroxy radical과 같은 활성 산소종이 지적되고 있다. 그러므로 인체는 이들 활성산소종의 소거와 이에 따른 세포질 분자의 손상을 방지하기 위한 다양한 효소적 및 비효소적 항산화 시스템을 가지고 있는데, 이러한 방어 시스템도 지속적인 산화적 스트레스에는 충분하지 못하므로 외부로부터 항산화 물질의 섭취가 요구되고 있다(Anderson D. 1999).

지금까지 생체내·외에서의 산화를 방지하기 위하여 수많은 항산화 물질들이 개발되어 왔는데, 이미 알려져 있는 항산화성 물질에는 BHA나 BHT 등의 합성 항산화제와 폴리페놀, 플라보노이드, 카로티노이드, 아스코르브산, 토코페롤, 인지질 등의 천연 항산화제가 있으나(Huang MT. et al 1992) 보다 안전하고 생체방어 시스템을 증가시킬 수 있는 강한 항산화제에 대한 요구는 날로 증가되고 있는 경향이다. 최근에는 건강식품의 수요 증대로 인해 천연식물자원을 이용한 기능성 식품의 개발에 활기를 띄고 있고, 또 약용식물의 재배가 증가되고 있는 바 이들을 유용하게 사용하기 위해서는 그 효능에 관한 과학적인 근거의 제시가 절실히 요구되고 있다.

와송(Wa-song, *Orostachys japonicus* A. Berger)은 오래된 기와지붕 위나 깊은 산의 바위 위에 자라고 있는 돌나무과(Crassulaceae)의 여러해살이 식물로 잎은 살이 찌고 버들잎 모양으로 줄기를 둘러싸고 무더기로 자라며, 여름~가을 중에 채취하여 뿌리를 제거한 지상부의 전초를 햇볕에 말려 약용으로 이용하는데, 기와지붕 위에서 자라는 모양이 소나무 잎이나 꽃을 닮아서 우리나라에서는 와송 또는 바위솔이라고 불린다. 와송은 우리나라에서 오래전부터 민간요법으로 간염, 종기에 대한 면역작용, 지혈제 및 암치료제 등으로 사용되어져 왔으며(Kim JK. 1984), 최근 와송에 존재하는 phytochemicals로 sterol, triterpenoid류, 플라보노이드류 및 페놀 화합물 등이 분리되

었고, 소화기 계통의 암에 효과가 좋은 것으로 알려지면서 이에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다(Park HJ. et al 1991a, Park JG. 2000).

이와 같이 와송의 항암작용 및 유효 생리활성 물질에 관하여 이미 많은 연구가 수행되어져 왔는데, 이들 연구에 사용된 대부분의 와송 시료는 음건하였거나, 건조방법이 뚜렷이 제시되지 않은 것 또는 생시료를 이용한 분석에 국한되어 있다. 일시적으로 수확되며, 수분의 함량이 높은 와송의 저장을 위해서는 건조가 불가피한데, 건조 방법, 온도, 시간, 태양 광선의 존재 여부 등의 다양한 조건은 식품에 함유된 유효 생리활성 성분에도 영향을 미칠 것으로 추정된다.

따라서 본 연구에서는 와송을 채취시기별, 용매별, 처리조건(건조 방법)에 따라 처리하여 생리활성의 차이를 비교 분석하였다. 와송 추출물의 항산화 및 항당뇨 활성을 분석하여 생리활성 효능을 측정함으로써 와송을 이용한 2차 가공 상품을 개발함에 있어 사용 효율의 증대 및 기능성 향상 방안 모색을 위한 기초자료로 사용하고자 하였다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

국내에서는 1990년대 이후부터 점진적으로 와송의 민간요법에 대한 효능을 규명하기 위한 연구가 진행되기 시작하였는데, 대량재배에 관한 연구가 대부분을 차지하며 성분조성이나 생리활성 연구는 미흡한 실정이며, 더욱이 제품화 연구는 전무한 상태이다. 대표적인 연구로 와송의 생육 및 재배에 관하여 일장과 광도가 생육과 개화에 미치는 영향 분석(Kang JH. et al 2005), 부위별 재분화를 통한 배양 결과(Choi SU. et al 1994), 인공재배 조건에 관한 보고(Shin DY. et al 1994), 인공배양체의 형태별 생화학적 성분변화에 관한보고(Yang MS, Choi SU. 1992) 등이 있으며, 사용된 대부분의 와송 시료가 음건되었거나(Park HJ. et al 1994), 건조방법이 뚜렷이 제시되지 않은 것(Yoon Y. et al 2000, Kim KH. et al 2004) 또는 생시료(Park HJ. et al 1991b, Choi SY. 2006)를 이용한 분석에 국한되어 있다.

와송의 생리활성에 관한 연구로는 Park 등(Park HJ. et al 1991b)은 와송의 *Salmonella typhimurium* TA 98 및 TA 100 균주를 사용한 실험에서 aflatoxin B₁에 대한 강한 항돌연변이 작용이 있으며, sterols, triterpenes, 플라보노이드 성분에 의한 복합작용에 의한 것으로 보고한 바 있다. 또한 와송 메탄올추출물은 마우스 시상하부 신경세포에서 H₂O₂에 의한 apoptosis에 방어효과를 내는데, 주된 생리활성 물질은 비극성 화합물이며(Yoon Y. et al 2000), 와송 지상부의 물추출물은 HIV-1 단백질분해효소에 대한 저해활성이 있는 것으로 보고되어 있다(Park JG. et al 2000). Kwon과 Han(2004)은 생쥐의 비장 및 흉선세포이 생존율을 증가시켰으며, 백혈병 세포의 apoptosis를 촉진하는 효과가 있음을 보고한 바 있다. Her와 Park(2006)은 와송의 지상부 추출물이 알콜 급이한 흰쥐의 간 알코올 대사에 효능이 있음을 보고한 바 있으며, gallic acid가 주요 유효물질인 것으로 보고한 바 있다.

와송의 분석연구로는 플라보노이드 화합물을 분리한 결과 kaempferol, quercetin과 isoquercetin, astragalín, cynaroside 등이 확인되었으며(Park HJ. et al 1991c), 와송에는 9종의 flavonoid 성분과 triterpene류 및 steroid 성분 등 총 31종의 화학성분이 규명되어 있으나(Park HJ. et al 1994), 이러한 유익한 소재를 활용한 생리활성물질의 분리정제 및 동물실험을 통한 생물활성 검증 연구는 미흡한 실정이다.

본 연구에서는 차세대 천연물소재로 각광받고 있는 와송의 다양한 유용물질을 이용한 항산화·항당뇨 및 항암면역 활성의 작용기작을 구명하고, 이러한 연구 결과에 기초한 기능성 상용 식품류 및 유형별 바이오헬스 제품을 개발하고자 한다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 와송의 생리활성 및 상품화

1. 서 론

와송(*Orostachys japonicus* A. Berger)은 들나물과 다년생 초본으로 주산지는 한국, 중국, 일본 등이며, 생육조건이 특이하여 오래된 기와나 바위에 자라는데, 근생엽은 로제트형으로 다발적인 출혈을 하며 가을철에 줄기 끝에 황백색의 작은 꽃이 이삭처럼 모여서 핀다. 약리적으로는 혈관수축 작용, 흥분 작용, 장관의 긴장도 증강 작용 등이 알려져 있으며, 한방에서는 해열, 소종, 지혈, 이뇨 등에 사용되고 있다. 와송은 주로 여름과 가을에 채취하여 뿌리를 제거한 전초를 햇볕에 말려 여러 질병의 치료제로 사용해 왔으며, 특히 암치료제로 널리 사용하고 있다.

와송의 생육 및 재배에 관한 연구로는 일장과 광도가 생육과 개화에 미치는 영향 분석, 부위별 재분화를 통한 배양 결과, 인공재배 조건에 관한 보고 등이 있다. 와송의 생리활성에 관한 연구도 다수 있으나, 시료의 출처나 전처리 조건 등이 명확하지 않을 뿐만 아니라 한약재로 사용되고 있는 건조 와송 역시 단순히 음건했다는 것 외에는 아무런 정보가 없다. 와송은 일정기간에 대량 수확되며, 수분의 함량이 높기 때문에 장기간 저장시 부패의 가능성이 높아 거의 대부분 건조한 후 일정기간 보관하면서 사용하기 때문에 건조 조건이 매우 중요하다.

식품의 건조과정에는 건조 방법, 온도, 시간, 태양 광선의 존재 여부 등 다양한 조건이 관련되어 있으며 이들 조건은 식품에 함유된 유효 생리활성 성분에도 영향을 미치는 것으로 알려져 있다.

따라서 본 연구에서는 와송의 채취시기 및 건조방법에 따라 와송의 생리활성에 어떤 영향을 미치며, 생시료에 존재하고 있는 유효 성분을 가장 잘 보유할 수 있는 최적 건조방법 및 추출조건을 실험하였고, 또 와송 이외에 생리활성을 지닌 생약재를 선정하여 혼합한 조성물을 개발함으로써 와송의 생리활성에 시너지 효과를 극대화할 수 있는 부원료를 선정하였다.

2. 와송 유용물질의 분리 및 분석

일반적인 와송의 종류 및 실험에 사용된 와송은 Photo. 1-1과 같으며, 처리조건에 따른 와송 추출물은 Photo. 1-2 ~ 1-5에 나타낸 바와 같다.

가. 채취시기별 물질 분리

와송의 메탄올 및 물추출물은 시료 중량에 대하여 20배의 용매를 가한 후 각각 65~80°C에서 5시간 동안 환류 냉각하면서 3회 반복 추출하였다. 추출된 시료의 여액은 60°C에서 감압농축하여 완전 건조시킨 다음 건조물의 무게를 측정하고 1000 µg/mL 농도가 되도록 만들어 냉동 보관하면서 실험에 사용하였다.

나. 용매별 물질 분리

2 kg의 건조된 와송에 1 L의 메탄올을 가하고 순환냉각장치를 이용하여 3시간 동안 추출한 후, 0.45 µm membrane filter로 여과하여 회전식 진공농축기로 감압농축하였다. 상기의 과정을 3회 반복하여 메탄올추출물을 얻은 뒤, 1 L의 H₂O-메탄올(9:1)에 재용해하고 Fig. 1-1과 같이 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올 및 수용성 획분으로 분획하여 각 용매별 추출물을 제조하였다.

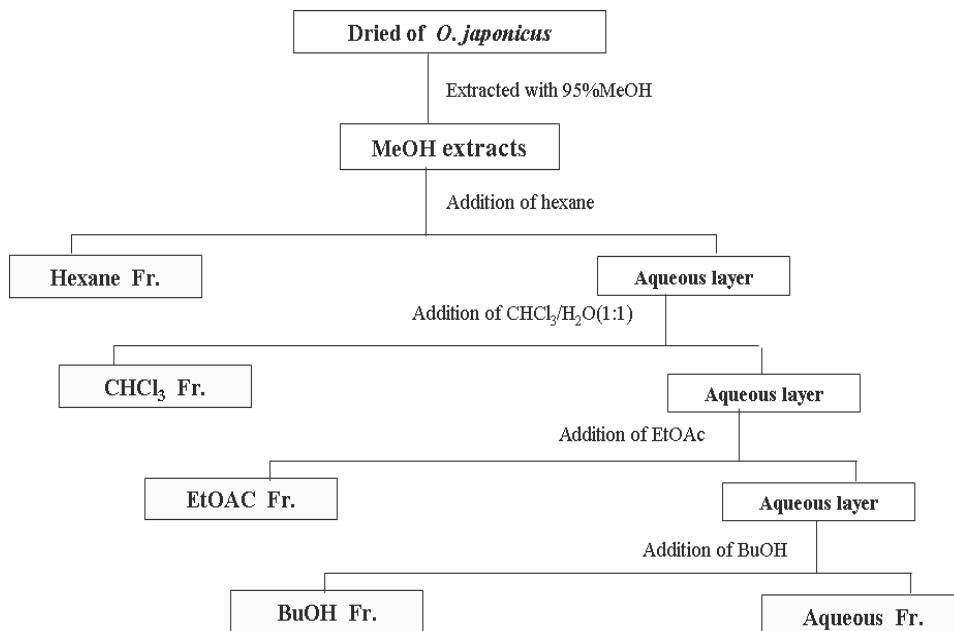


Fig. 1-1. Extraction and fractionation from various solvent.



Photo. 1-1. The kinds of Wa-song(*Orostachys japonicus* A. Berger).



Photo. 1-2. Wa-song by drying conditions.



Photo. 1-3. Wa-song by extracting solvents after freeze-drying.



Photo. 1-4. Wa-song by extracting solvents after sun drying.



Photo. 1-5. Wa-song by extracting solvents after hot air drying.

다. 와송의 유용물질 분리

와송의 용매별 추출물로부터 silica gel column chromatography(column size: 5×18 cm, 70~230 mesh, Merk)를 행한 후 TLC plate를 사용하여 상승 1차원법으로 전개시킨 후 UV 254 nm 조사, 10% H₂SO₄ 및 phosphomolybdic acid로 발색시키면서 나타나는 용출액의 TLC 패턴에 따라 7개의 물질을 분리하였으며, 재차 fraction 하여 5개의 물질을 분리한 결과, compound 1(Fig. 1-2)은 (+)-catechin, compound 2(Fig. 1-3)는 (-)-kaempferol, compound 3(Fig. 1-4)은 3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone인 quercetin, compound 4(Fig. 1-5)는 3,4-dihydroxybenzoic acid 및 compound 5(Fig. 1-6)는 3,4,5-trihydroxybenzoic acid(gallic acid)인 것으로 확인되었다.

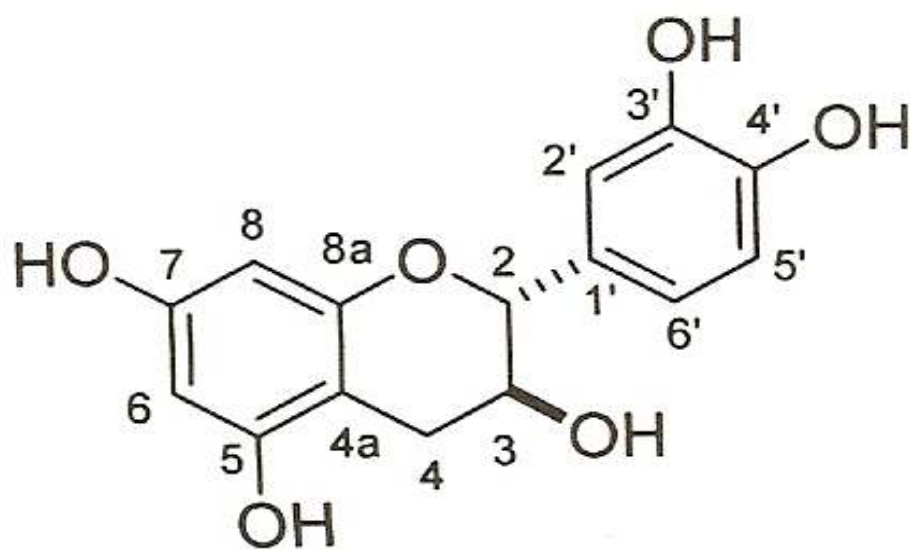


Fig. 1-2. Chemical structure of compound 1.

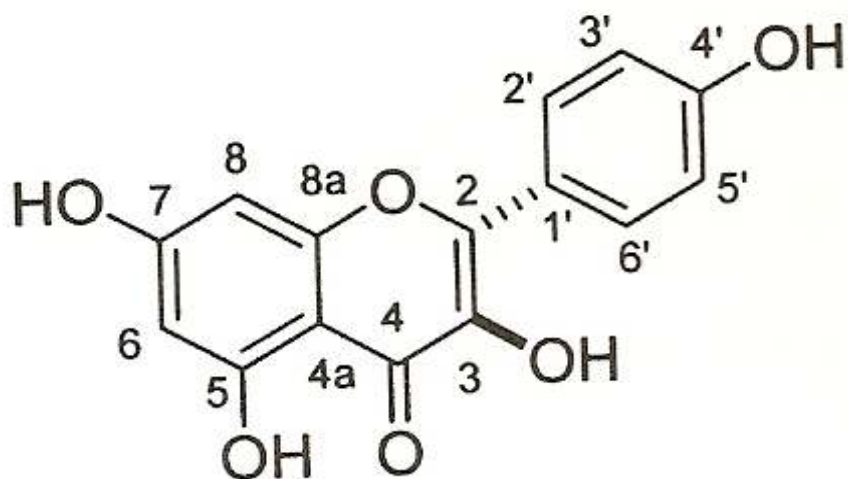


Fig. 1-3. Chemical structure of compound 2.

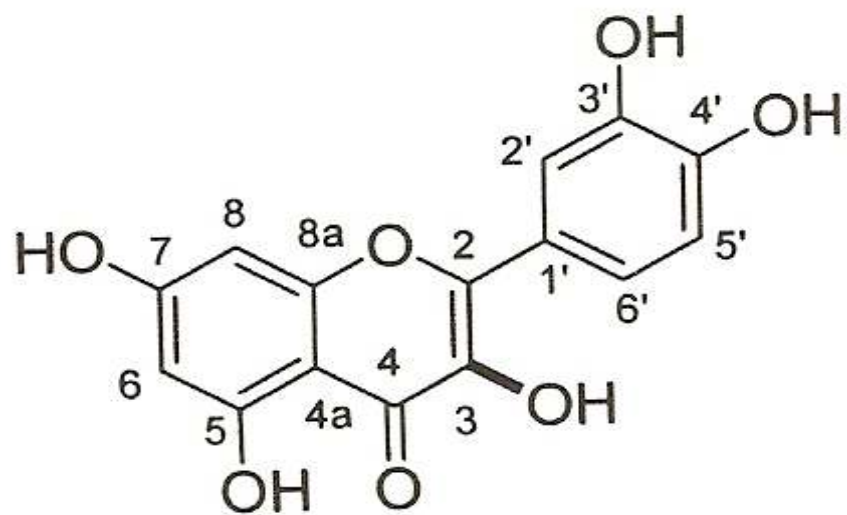


Fig. 1-4. Chemical structure of compound 3.

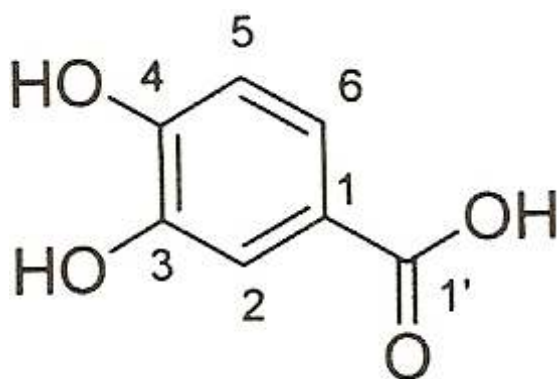


Fig. 1-5. Chemical structure of compound 4.



Fig. 1-6. Chemical structure of compound 5.

3. 와송 천연물소재를 이용한 최적조성물 개발

와송을 이용한 천연물 소재화 공정개발은 건강기능식품업체의 식품부재료나 식품첨가물 유통 조건 및 기준에 적합하도록 와송을 100℃에서 4시간동안 열수 추출하여 진공농축기로 감압농축한 후 10~15 Brix로 농도를 조절하고, 농축액과 식품첨가물 및 부형재를 혼합하고 재농축하여 농도가 45~55 Brix가 되도록 조절하였다. 제조된 액상 소재는 일반 가아제로 일차 여과한 후 다시 microfilter를 통과시켜 분무건조 및 동결건조하였다(Fig. 1-7).

또한 제조된 와송 천연물 소재를 주원료로 하여 3차 선정과정을 통해 최종 선정된 항당뇨 생약재 4종을 배합하여 생물활성 검증용 와송 최적조성물로 사용하였다.



Fig. 1-7. Scheme of optimum condition setting for *Orostachys japonicus* composites manufacture.

가. 항당뇨 활성 부원료 선정

와송 천연물 신소재를 함유하는 항당뇨 활성이 우수한 최적조성물을 개발하기 위해 한의학에 근거하여 처방빈도가 가장 높은 부원료를 선정한 결과는 Table 1-1 ~ 1-3과 같다.

Table 1-1로부터 항당뇨 활성을 지닌 부원료 1차 선정 결과는 인삼, 백출, 감초, 오미자, 맥문동, 지모 및 천화분이었다. 1차 선정된 부원료와 붉은맥, 상소, 이변 및 다뇨증세에 효능이 있는 부원료를 조사한 결과 인삼, 감초, 창출, 지모, 천화분 및 맥문동을 2차적으로 선정하여 Table 1-2에 나타내었다.

Table 1-1. Setting process of medicinal plants for antidibetic activity (1st)

※참고문헌: 동의보감

| 처방명 | 가미전씨백출산 (加味錢氏白朮散) | 맥문동음자 (麥門冬飲子) | 강심탕 (降心湯) | 인삼석고탕 (人蔘石膏湯) | 청심연자음 (淸心蓮子飲) | 비고 |
|----------|----------------------|------------------|------------------|------------------|--------------------|------|
| 효능 | 소중(消中)치료 | 격소(膈消)치료 | 변갈(煩渴) 인음(引飲) | 격소(膈消)치료 | 소변이 삼(澀) 한 증세치료 | |
| | 건갈(乾葛) | - | - | - | - | |
| | 인삼(人蔘) | 인삼(人蔘) | 인삼(人蔘) | 인삼(人蔘) | 인삼(人蔘) | 1차선정 |
| | 백출(白朮) | 백출(白朮) | - | - | 백출(白朮) | 1차선정 |
| | 백복령(白茯苓) | - | 백복령(白茯苓) | - | - | |
| | 곽향(藿香) | - | - | - | - | |
| | 감초(甘草) | 감초(甘草) | 감초(甘草) | 감초(甘草) | 감초(甘草) | 1차선정 |
| | 목향(木香) | - | - | - | - | |
| | 시호(柴胡) | - | - | - | - | |
| | 지각(枳殼) | - | - | - | - | |
| | 오미자(五味子) | 오미자(五味子) | 오미자(五味子) | - | - | 1차선정 |
| | - | 맥문동(麥門冬) | - | - | 맥문동(麥門冬) | 1차선정 |
| | - | 지모(知母) | - | 지모(知母) | - | 1차선정 |
| | - | 천화분(天花粉) | 천화분(天花粉) | - | - | 1차선정 |
| 부원 료명 | - | 갈근(葛根) | - | - | - | |
| | - | 복신(茯神) | - | - | - | |
| | - | 생지황(生地黃) | - | - | - | |
| | - | - | 원지(遠志) | - | - | |
| | - | - | 당귀(當歸) | - | - | |
| | - | - | 숙지황(熟地黃) | - | - | |
| | - | - | 황기밀초 (黃芪櫛炒) | - | - | |
| | - | - | - | 석고(石膏) | - | |
| | - | - | - | - | 연자(蓮子) | |
| | - | - | - | - | 적복령(赤茯苓) | |
| | - | - | - | - | 황기(黃芪) | |
| | - | - | - | - | 황금(黃芩) | |
| | - | - | - | - | 차전자초 (車前子炒) | |
| | - | - | - | - | 지골피(地骨皮) | |
| 계(총) | 10 | 10 | 9 | 4 | 10 | |

당뇨에 대한 한방에서의 처방빈도수를 중심으로 1, 2, 3차(Table 1-3)에 걸쳐 선정된 생약재를 기준으로 주원료인 와송과의 배합가능성 여부 및 배합기준을 추천 의뢰한 결과는 Table 1-4과 같이 처방빈도수가 가장 높은 생약재 중 추천횟수에 따라 최종 선정하였으며, 그 중 감초는 활성에 대한 영향보다는 최종제품 제조시 배합조절에 사용할 것을 권장하여 제외하였다. 또한 인삼은 와송과의 배합금기성에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료되어 2차년도 연구에서는 제외하였으며, 항당뇨활성이 우수한 사인은 연구자문에 참여한 4명의 한의사의 공통적인 추천에 의해 최종 부원료 선정에 포함시켰다.

Table 1-2. Setting process of medicinal plants for antidibetic activity (2nd)

※참고문헌: 동의보감

| 처방명 | 1차 선정결과 | 화혈익기탕 (和血益氣湯) | 생진양혈탕 (生津養血湯) | 황금탕 (黃芩湯) | 난향음자 (蘭香飲子) | 생진감로탕 (生津甘露湯) | 비고 |
|------|---------------|---------------|---------------|-----------|--------------|---------------|------|
| 효능 | 소갈(消渴) 상소(上消) | 붉은맥(脈) | 상소(上消) | 상소(上消) | 이변(二便) | 다뇨(多尿) | |
| 부원료명 | 인삼(人蔘) | - | - | 인삼(人蔘) | 인삼(人蔘) | - | 2차선정 |
| | 감초(甘草) | - | - | - | 生, 炙, 감초(甘草) | 감초(甘草) | 2차선정 |
| | 오미자(五味子) | - | - | - | - | - | |
| | 백복령(白茯苓) | - | - | - | - | - | |
| | 창출(蒼朮) | - | 창출(蒼朮) | - | - | - | 2차선정 |
| | 지모(知母) | - | 지모(知母) | - | 지모(知母) | 지모(知母) 주(酒) | 2차선정 |
| | 천화분(天花粉) | - | 천화분(天花粉) | 천화분(天花粉) | - | - | 2차선정 |
| | 맥문동(麥門冬) | - | 맥문동(麥門冬) | 맥문동(麥門冬) | - | - | 2차선정 |

Table 1-2. Setting process of medicinal plants for antidibetic activity (2nd)

※참고문헌: 동의보감

| 처방명 | 1차 선정결과 | 화혈익기탕 (和血益氣湯) | 생진양혈탕 (生津養血湯) | 황금탕 (黃芩湯) | 난향음자 (蘭香飲子) | 생진감로탕 (生津甘露湯) | 비고 |
|----------|------------------|------------------|-------------------|--------------|----------------|------------------|----|
| 효능 | 소갈(消渴) 상소(上消) | 붉은맥(脈) | 상소(上消) | 상소(上消) | 이변(二便) | 다뇨(多尿) | |
| | - | 황백주세 (黃柏酒洗) | - | - | - | - | |
| | - | 승마(升麻) | - | - | - | - | |
| | - | 생지황(生地黃) | 생지황(生地黃) | - | - | - | |
| | - | 황백병주세 (黃柏並酒洗) | - | - | - | - | |
| | - | 석고(石膏) | - | - | 석고(石膏) | 석고(石膏) | |
| | - | 행인(杏仁) | - | - | - | - | |
| | - | 도인(桃仁) | - | - | - | 도인(桃仁) | |
| | - | 지모(知母) | - | - | - | - | |
| | - | 방기(防己) | - | - | - | 방기(防己) | |
| | - | 강활(羌活) | - | - | - | 강활(羌活) | |
| | - | 당귀소(當歸消) | - | - | - | 당귀신(當歸身) | |
| | - | 시호(柴胡) | - | - | - | 시호(柴胡) | |
| | - | 마황(麻黃) | - | - | - | - | |
| | - | 근생(根生) | - | - | - | - | |
| | - | 감초구(甘草灸) | - | - | - | - | |
| | - | 홍화(紅花) | - | - | - | 홍화(紅花) | |
| | - | - | 당귀(當歸) | 당귀(當歸) | - | - | |
| | - | - | 백작약(白灼藥) | 백작약(白灼藥) | - | - | |
| | - | - | 박하(薄荷) | - | - | - | |
| 부원료 명 | - | - | - | - | - | - | |
| | - | - | 천궁(川芎) | - | - | - | |
| | - | - | 황련(黃連) | - | - | - | |
| | - | - | 황백병밀초 (黃柏並 蜜炒) | - | - | 황백 (黃柏) | |
| | - | - | 연육(蓮肉) | - | - | - | |
| | - | - | 오매(烏梅) | - | - | - | |
| | - | - | - | 편금(片芩) | - | - | |
| | - | - | - | 치자(梔子) | - | - | |
| | - | - | - | 길경(桔梗) | 길경(桔梗) | - | |
| | - | - | - | 생지황(生地黃) | - | - | |
| | - | - | - | 건갈(乾葛) | - | - | |
| | - | - | - | - | 난향엽(蘭香葉) | - | |
| | - | - | - | - | 연교(連翹) | - | |
| | - | - | - | - | 백두구(白苳蔻) | - | |
| | - | - | - | - | 승마(升麻) | 승마(升麻) | |
| | - | - | - | - | 반하(半夏) | - | |
| | - | - | - | - | - | 초룡담(草龍膽) | |
| | - | - | - | - | - | 황기주(黃芪酒) | |
| | - | - | - | - | - | 황금구(黃芩灸) | |
| | - | - | - | - | - | 방풍(防風) | |
| 계(총) | 8 | 10 | 9 | 9 | 4 | 9 | |

Table 1-3. Setting process of medicinal plants for antidibetic activity (3rd)

※참고문헌: 동의보감

| 처방명 | 1차 선정결과 | 2차 선정결과 | 인삼복령산 (人蔘茯苓散) | 가감신기환 (加減腎氣丸) | 보신지황원 (補腎地黃元) | 3차 선정 |
|------|---------------------|------------------------|-------------------------|--------------------------|----------------------------|------------------|
| 효능 | 상소(上消) 치료 다뇨(多尿) | 이변(二便) 치료 소변, 대변 증세 | 소변이 탁해 고약같은 증세 치료 | 입이마르고, 여위고 마른증세 치료 | 심화(心火)를 내리고 귀와 눈을 맑게 | 소갈(消渴) 치료 부원료 |
| | 인삼(人蔘) | 인삼(人蔘) | 인삼(人蔘) | - | 인삼(人蔘) | 인삼(人蔘) |
| | 감초(甘草) | 감초(甘草) | 감초(甘草) | - | - | 감초(甘草) |
| | 오미자 (五味子) | - | - | - | - | - |
| | 백복령 (白茯苓) | - | 적복령(赤茯苓) | 백복령(白茯苓) | 백복령(白茯苓) | 백복령(白茯苓) |
| | 창출 (蒼朮) | 창출(蒼朮) | 창출(蒼朮) | - | - | 창출(蒼朮) |
| | 지모(知母) | 지모(知母) | - | - | - | - |
| | 천화분 (天花粉) | 천화분(天花粉) | 천화분(天花粉) | - | - | 천화분(天花粉) |
| | 맥문동 (麥門冬) | 맥문동(麥門冬) | - | - | 맥문동(麥門冬) | 맥문동(麥門冬) |
| 부원료명 | | 석고(石膏) | - | - | - | - |
| | | 생지황(生地黃) | - | 숙지황(熟地黃) | - | - |
| | | 방기(防己) | - | - | - | - |
| | | 강활(羌活) | - | - | - | - |
| | | 당귀(當歸) | - | - | 당귀(當歸) | - |
| | | 시호(柴胡) | - | - | - | - |
| | | 홍화(紅花) | - | - | - | - |
| | | 황백(黃柏) | - | - | 황백(黃柏) | - |
| | | 승마(升麻) | - | - | - | - |
| | | 길경(桔梗) | 길경(桔梗) | - | - | - |
| | | 백작약(白灼藥) | - | - | - | - |

Table 1-3. Setting process of medicinal plants for antidibetic activity (3rd)

※참고문헌: 동의보감

| 처방명 | 1차 선정결과 | 2차 선정결과 | 인삼복령산 (人蔘茯苓散) | 가감신기환 (加減腎氣丸) | 보신지황원 (補腎地黃元) | 3차 선정 |
|------|------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------------|---------------------|
| 효능 | 상소(上消)치 료 다뇨(多尿) | 이변(二便)치 료 소변,대변 증세 | 소변이 탁해 고약같은 증세 치료 | 입이마르고, 여위고 마른증세 치료 | 심화(心火)를 내리고 귀와 눈을 맑게 | 소갈(消渴) 치료 부원료 |
| | | - | 활석(滑石) | - | - | |
| | | - | 한수석(寒水石) | - | - | |
| | | - | 건갈(乾葛) | - | - | |
| | | - | 황금(黃芩) | - | - | |
| | | - | 박하(薄荷) | - | - | |
| | | - | 대왕(大黃) | | - | |
| | | - | 연교(連翹) | | - | |
| | | - | - | - | - | - |
| | | - | 택사(澤瀉) | 택사(澤瀉) | - | |
| | | - | 치자(梔子) | | - | |
| | | - | 축사(縮砂) | | - | |
| 부원료명 | | - | - | 목단피(牧丹皮) | - | |
| | | - | - | 산수유 | - | |
| | | - | - | 오미자(五味子) | - | |
| | | - | - | 녹용(鹿茸) | - | |
| | | - | - | 산약(山藥) | - | |
| | | - | - | 육계(肉桂) | - | |
| | | - | - | 침향(沈香) | - | |
| | | - | - | - | 천문동(天門冬) | |
| | | - | - | - | 감국(甘菊) | |
| | | - | - | - | 조금주초 (條芩酒炒) | |
| | | - | - | - | 지각(枳殼) | |
| | | - | - | - | 편금생(편금생) | |
| | 8 | 17 | 16 | 10 | 10 | 6 |

Table 1-4. Setting process of medicinal plants for antidibetic activity

※참고문헌: 동의보감

| 구 분 | 한방 처방 빈도수에 의해 선정된 부원료명 | 한의사 추천 부원료명 | | | | 최 선 종 정 |
|------------------|------------------------------|-------------|-----|-----|-----|------------|
| | | 추천1 | 추천2 | 추천3 | 추천4 | |
| | - | 와송 | 와송 | 와송 | 와송 | 와송 |
| | 인삼 | 인삼 | - | - | 인삼 | |
| | 감초 | 감초 | 감초 | 감초 | 감초 | |
| | 백복령 | 백복령 | 백복령 | - | 백복령 | 백복령 |
| | 창출 | 창출 | - | 창출 | 창출 | 창출 |
| 부 원 료 명 | 천화분 | - | - | 천화분 | - | |
| | 맥문동 | - | 맥문동 | - | - | |
| | - | 행인 | - | - | - | |
| | - | 음양곽 | - | - | - | |
| | - | 사인 | - | 사인 | 사인 | 사인 |
| | - | - | 산약 | 산약 | - | |
| | - | - | 지모 | - | - | |
| | - | - | - | 길경 | - | |

나. 와송 및 선정생약재의 추출수율

와송 및 선정된 향당뇨 활성용 생약재 4종을 각각 100℃에서 4시간 동안 열수 추출하여 감압농축한 후 동결건조하여 수율을 측정한 결과는 Table 1-5와 같다. 농축물의 농도는 와송이 7.4 Brix였으며, 사인은 5.1 Brix, 백복령은 3.1 Brix, 창출은 0.8 Brix였다. 추출 후 건조 수율은 와송이 36.3%로 가장 높았고, 다음으로 백복령이 19.16%, 사인 및 창출은 5.0% 미만이었다.

Table 1-5. Yield of dried materials after hot-water extracting medicinal plants at 100°C

| | <i>Orostachys japonicus</i> (와송) | <i>Poria cocos wolf</i> (백복령) | <i>Atractylodis rhizoma</i> (창출) | <i>Amomum villosum</i> (사인) |
|-------------------------|-------------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------|
| Sample | 1.2kg | 1.2kg | 1.2kg | 1.2kg |
| Temperature | 100°C | 100°C | 100°C | 100°C |
| Time | 4hr | 4hr | 4hr | 4hr |
| Concentration (Brix) | 7.4 | 3.1 | 0.8 | 5.1 |
| Concentration condition | 650mmHg 2.4hr -70°C, 40°C | 650mmHg 2.4hr -70°C, 40°C | 650mmHg 2.4hr -70°C, 40°C | 650mmHg 2.4hr -70°C, 40°C |
| Extraction yield (%) | 36.3 | 19.16 | 2.16 | 4.66 |

다. 와송 최적조성물의 배합조건

선정된 부원료를 이용하여 와송의 최적조성물 조성을 위한 배합조건을 Table 1-6 과 같다. 백복령, 창출 및 사인의 농도를 동일하게 하고 와송의 농도를 0~1.0 µg/mL 범위로 첨가하였다.

Table 1-6. Optimum mixture of Wa-song and medicinal plants

| (µg/mL) | | | | |
|----------------------|-------------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|
| Samples Comp. No. | <i>Orostachys japonicus</i> (와송) | <i>Poria cocos wolf</i> (백복령) | <i>Atractylodis rhizoma</i> (창출) | <i>Amomum villosum</i> (사인) |
| Comp. 1 | 0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
| Comp. 2 | 0.05 | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
| Comp. 3 | 0.1 | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
| Comp. 4 | 0.3 | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
| Comp. 5 | 0.5 | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
| Comp. 6 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 |

4. 와송 및 최적조성물의 항산화활성

(1) 총 페놀 및 플라보노이드 함량

와송 천연물소재 및 선정된 생약재 각각의 총 페놀 함량을 측정한 결과는 Table 1-7과 같다. 와송의 총 페놀 및 플라보노이드 함량은 각각 14.65 ± 0.23 mg/100 g, 9.33 ± 0.12 mg/100 g 이었으며, 생약재 중에서는 사인의 총 페놀과 플라보노이드 함량이 각각 220.53 ± 1.25 mg/100 g, 19.59 ± 0.92 mg/100 g으로 다른 시료에 비해 월등히 높은 것을 확인할 수 있었다.

이러한 결과는 향후 와송 함유 첨가물과 선정된 부원료(생약재)와의 적절한 배합에 의한 제품개발이 이루어진다면 생물활성에 좋은 시너지 효과를 나타낼 수 있을 것으로 기대된다.

Table 1-7. Total phenolic compounds and flavonoids of Wa-song and medicinal plants

| Sample | Phenolic compounds | Flavonoids |
|-----------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|
| <i>Orostachys japonicus</i> | 14.65 ± 0.23 | 9.33 ± 0.12 |
| <i>Poria cocos wolf</i> | 13.53 ± 0.36 | 5.03 ± 0.06 |
| <i>Atractylodis rhizoma</i> | 23.23 ± 0.65 | 6.27 ± 0.10 |
| <i>Amomum villosum</i> | 220.53 ± 1.25 | 19.59 ± 0.92 |

(2) DPPH 라디칼 소거능

와송 함유 천연물소재 및 선정 생약재의 DPPH 라디칼 소거능을 측정한 결과는 Table 1-8과 같이 시료의 첨가량이 증가할수록 활성이 높아지는 것으로 나타났다. 100~1000 $\mu\text{g/mL}$ 첨가시에는 사인의 활성이 가장 높았으며, 그 범위는 $34.38 \pm 0.70 \sim 79.96 \pm 0.43\%$ 였다. 복령 및 창출은 500 $\mu\text{g/mL}$ 이상 첨가시 비슷한 활성을 보였다. 와송은 500 $\mu\text{g/mL}$ 이상 첨가시 활성이 급격히 상승되어 1000 $\mu\text{g/mL}$ 첨가시에는 $31.12 \pm 0.54\%$ 였다.

Table 1-8. Electron donation ability of Wa-song and medicinal plants

| Samples | Sample concentration($\mu\text{g}/\text{mL}$), (%) | | | |
|-----------------------------|--|------------------|----------------------------------|------------------|
| | 100 | 250 | 500 | 1000 |
| <i>Orostachys japonicus</i> | 5.09 \pm 0.33 | 9.71 \pm 0.35 | 16.92\pm0.78 | 31.12 \pm 0.54 |
| <i>Poria cocos wolf</i> | 3.61 \pm 1.59 | 5.57 \pm 0.41 | 7.66 \pm 3.28 | 15.12 \pm 0.26 |
| <i>Atractylodis rhizoma</i> | 0.27 \pm 0.05 | 1.90 \pm 0.22 | 6.12 \pm 0.06 | 12.91 \pm 1.31 |
| <i>Amomum villosum</i> | 34.38\pm0.70 | 69.63 \pm 0.43 | 75.27 \pm 0.22 | 79.96 \pm 0.43 |

(3) 환원력

시료의 환원력을 700 nm에서 흡광도의 값으로 나타낸 결과 Table 1-9에 나타낸 바와 같이 DPPH 라디칼 소거능과 비슷한 패턴이었다. 100~1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 첨가시 사인은 0.24 \pm 0.01~1.20 \pm 0.03의 흡광도 값을 보여 활성이 가장 우수하였다. 와송, 복령 및 창출은 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 첨가시 0.17~0.21의 범위로 비슷한 활성을 보였다. 선정된 생약재 중 사인의 활성이 전반적으로 높게 나타났는데, 이는 향후 제품개발 및 상품화에 크게 기여할 것으로 사료된다.

Table 1-9. Reducing power of Wa-song and medicinal plants

(O.D. value)

| Samples | Sample concentration($\mu\text{g}/\text{mL}$) | | | |
|-----------------------------|---|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| | 100 | 250 | 500 | 1000 |
| <i>Orostachys japonicus</i> | 0.09 \pm 0 | 0.10 \pm 0 | 0.14 \pm 0 | 0.21 \pm 0 |
| <i>Poria cocos wolf</i> | 0.08 \pm 0 | 0.09 \pm 0 | 0.12 \pm 0 | 0.17 \pm 0 |
| <i>Atractylodis rhizoma</i> | 0.08 \pm 0 | 0.10 \pm 0 | 0.14 \pm 0 | 0.21 \pm 0 |
| <i>Amomum villosum</i> | 0.24\pm0.01 | 0.43\pm0.01 | 0.71\pm0.01 | 1.20\pm0.03 |

(4) 개발조성물의 항산화 활성

와송 천연물소재와 선정된 부원료(생약재 3종)를 이용하여 최적조성물을 제조한 후 주원료인 와송 천연물소재의 첨가 농도별 항산화활성을 측정한 결과는 Table 1-10과 같다.

총 페놀 함량은 와송 천연물소재가 포함되지 않은 조성물보다 와송 천연물소재가 첨가된 최적조성물에서 높았으며, 특히 천연물소재의 농도가 3000 ppm 이상 첨가된 경우 총 페놀 함량의 증가폭이 높아진 것으로 관찰되었으며, 플라보노이드 함량 또한 와송 천연물소재가 첨가된 실험군이 무첨가군보다 높았으며, 첨가 농도에 따라 완만하게 증가함을 알 수 있었다.

개발조성물의 DPPH 라디칼 소거능은 와송 천연물소재 첨가 농도가 1000 ppm 이하에서는 유의적인 차이를 보이지 않았으나 3000 ppm, 5000 ppm에서는 유의적인 증가를 보이다가 10000 ppm에서는 급격히 증가함을 관찰할 수 있었으며, 조성물의 환원력은 5000 ppm에서 유의적인 증가를 보였다.

Table 1-10. Antioxidant activity from optimum mixture of Wa-song and medicinal plants

| Sample ¹⁾ | Phenolic compounds (mg/100 g) | Flavonoids (mg/100 g) | Electron donation ability (%) | Reducing power (OD value) |
|----------------------|-------------------------------|-----------------------|-------------------------------|---------------------------|
| Comp.1 | 56.77±0.99 | 31.94±0.06 | 54.13±0.26 | 0.33±0 |
| Comp.2 | 75.32±1.99 | 36.41±0.20 | 58.11±0.40 | 0.49±0 |
| Comp.3 | 77.34±0.56 | 38.03±0.46 | 57.96±0.87 | 0.51±0.01 |
| Comp.4 | 88.33±0.70 | 45.89±1.24 | 63.29±1.07 | 0.56±0.01 |
| Comp.5 | 97.01±1.43 | 50.16±0.94 | 64.14±0.67 | 0.63±0.01 |
| Comp.6 | 120.74±3.22 | 52.96±0.83 | 75.80±2.62 | 0.77±0 |

¹⁾ Comp.1: *Orostachys japonicus* 0% + 3 medicinal plants,
 Comp.2: *Orostachys japonicus* 20.0%(500ppm) + 3 medicinal plants,
 Comp.3: *Orostachys japonicus* 20.0%(1000ppm) + 3 medicinal plants,
 Comp.4: *Orostachys japonicus* 20.0%(3000ppm) + 3 medicinal plants,
 Comp.5: *Orostachys japonicus* 20.0%(5000ppm) + 3 medicinal plants,
 Comp.6: *Orostachys japonicus* 20.0%(10000ppm)+ 3 medicinal plants.

제 2 절 와송의 가공특성 및 생산공정 구축

1. 와송의 가공특성

건조 조건으로는 천일건조, 음건, 열풍건조, 동결건조 4종으로 구분하였으나, 음건의 경우 와송의 수분으로 인해 건조되기 전 부패되었기 때문에 최종 건조조건 실험으로는 천일건조, 열풍건조 및 동결건조 3종으로 결정하였다(Photo. 2-1).

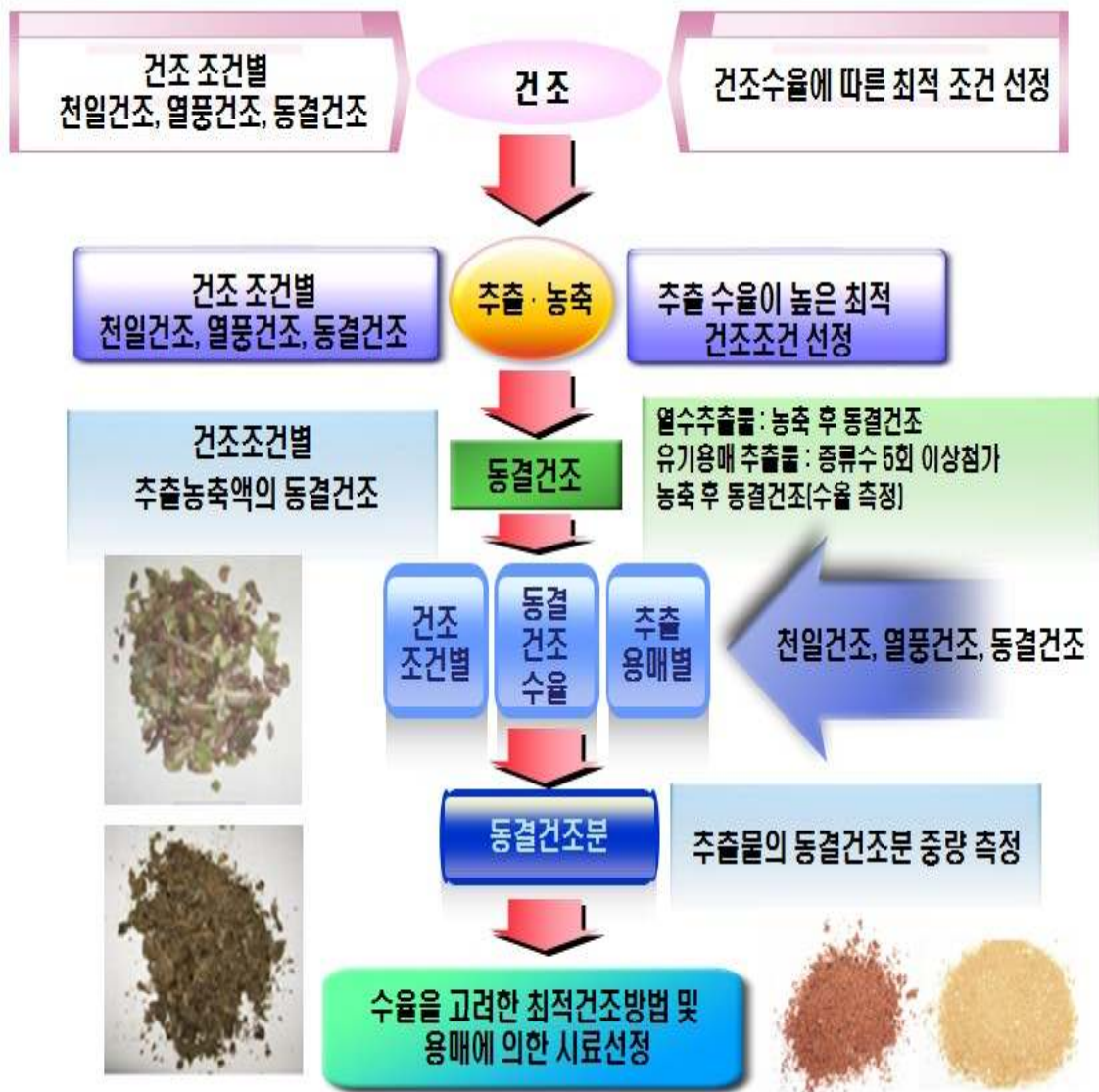


Photo. 2-1. Scheme for optimum condition setting of *Orostachys japonicus*.

가. 건조방법에 따른 건조수율

건조방법에 따른 와송의 건조 수율을 조사하기 위하여 Table 2-1과 같이 건조조건 (천일건조, 열풍건조, 동결건조)에 따라 시료 각 2 kg을 건조하여 건조수율을 측정한 결과 열풍건조, 동결건조, 천일건조 순으로 각각 10.0%, 8.20%, 6.25%로 나타났으며, 열풍건조 시료에서 수율이 가장 높았다(Fig. 2-1).

각각의 방법으로 건조된 와송 건조물을 이용하여 물추출물을 Table 2-2와 같이 제조하였다. 추출조건에 따라 제조된 열수추출물의 최종농도(Brix)를 측정한 결과, 천일건조시료에서 1.6 Brix, 열풍건조시료에서 5.0 Brix, 동결건조시료에서 2.4 Brix였다.

Table 2-1. Drying condition of Wa-song

| Drying methods | Sample (g) | Temperature | Time (min) |
|----------------|------------|-------------|------------|
| Sun drying | 2,000 | room temp. | 500~530 |
| Hot air drying | 2,000 | 70~80℃ | 450~550 |
| Freeze drying | 2,000 | 45~50℃ | 48~50 |

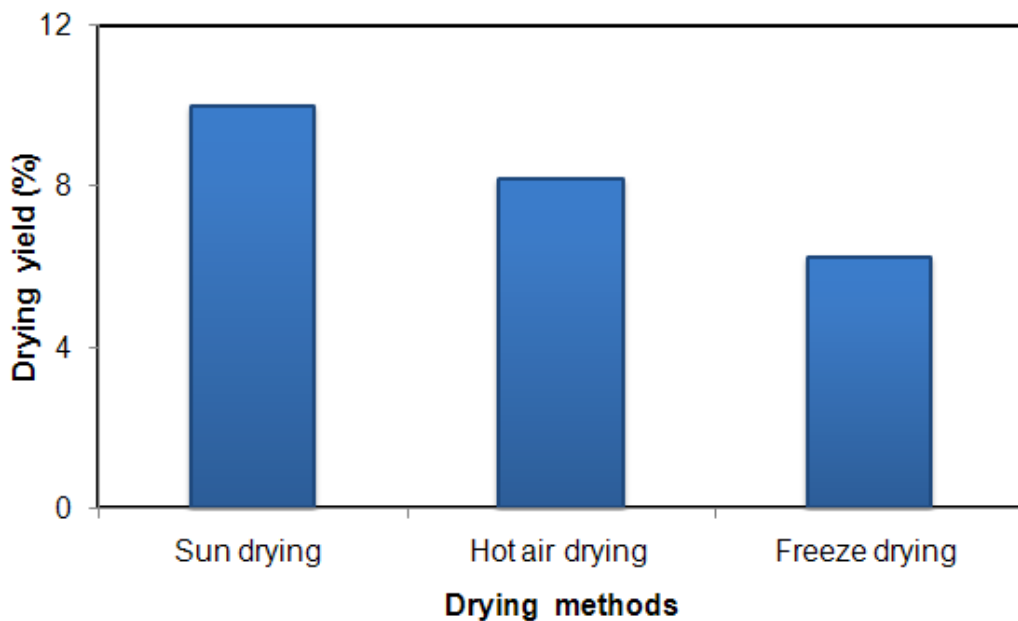


Fig. 2-1. Extraction yield of Wa-song on dry methods.

Table 2-2. Yield of water extracts from Wa-song

| Drying methods | Temperature | Time (hr) | Rate | Concentration of extract (Brix) |
|----------------|-------------|-----------|------|---------------------------------|
| Sun drying | 95~100℃ | 4~5 | 7:1 | 1.6 |
| Hot air drying | 95~100℃ | 4~5 | 7:1 | 5.0 |
| Freeze drying | 95~100℃ | 4~5 | 7:1 | 2.4 |

나. 건조방법을 달리한 와송의 물추출물 제조

와송의 건조방법을 달리한 열수추출물을 각각 동결건조하여 수율을 측정한 결과는 Fig. 2-2에 나타낸 바와 같다. 각각의 수율을 측정한 결과는 열풍건조 시료가 2.762%로 가장 높게 나타났으며, 다음으로 동결건조 시료(1.804%), 천일건조 시료(0.677%) 순이었다. 이와 같이 건조조건 및 열수추출물의 수율 측정에서 모두 열풍건조 조건에서 가장 높은 활성을 보여 향후 저장성 및 상품화 연구를 통해 최종 가공공정으로 선정하는 것이 타당할 것으로 판단되었다.

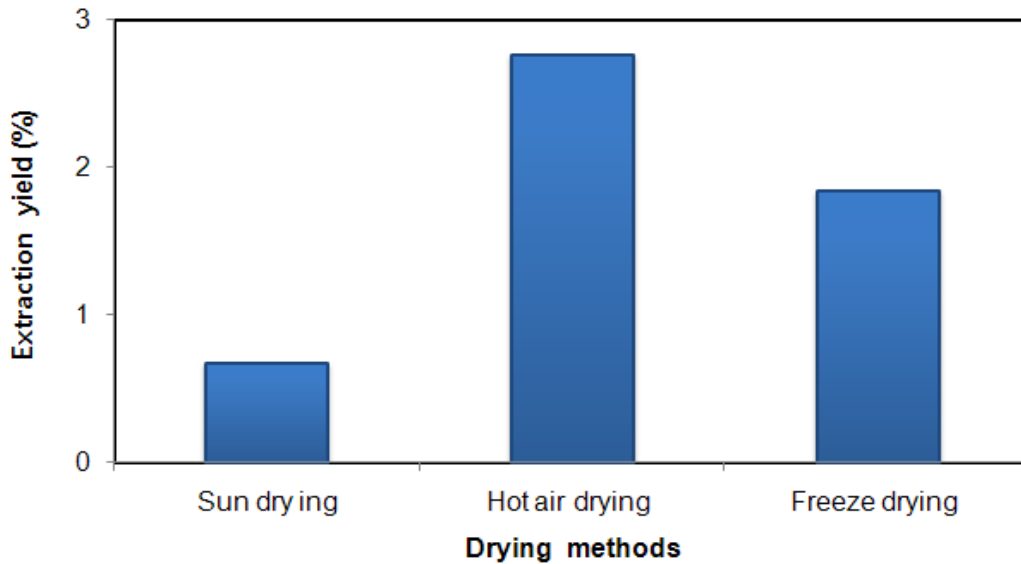


Fig. 2-2. Yield of water extracts from dried samples.

다. 건조방법을 달리한 와송의 에탄올추출물 제조

건조조건을 달리한 와송을 에탄올로 추출하였으며, 추출조건은 Table 2-3과 같다. 추출조건에 따라 제조된 에탄올추출물의 최종농도(Brix)를 측정한 결과, 천일건조시료에서 10.0 Brix, 열풍건조시료에서 15.5 Brix, 동결건조시료에서 6.0 Brix였다.

추출물의 농도와 각 추출물의 동결건조 후 건조 수율을 측정한 결과 Fig. 2-3과 같이 천일건조 시료 추출물의 건조 수율은 0.131%, 열풍건조 시료 추출물의 건조 수율은 0.723%, 동결건조 시료의 건조 수율은 0.205%로 나타났다. 이러한 결과는 열수추출물의 동결건조 수율과 유사하게 나타났으며, 향후 에탄올을 이용한 상품화 가공공정에도 열풍건조 시료를 사용하는 것이 타당할 것으로 사료되었다.

Table 2-3. Yield of ethanol extracts from Wa-song

| Drying methods | Temperature | Time (hr) | Rate | Concentration of extract(Brix) |
|----------------|-------------|-----------|------|--------------------------------|
| Sun drying | 70~80°C | 4~5 | 7:1 | 10.0 |
| Hot air drying | 70~80°C | 4~5 | 7:1 | 15.5 |
| Freeze drying | 70~80°C | 4~5 | 7:1 | 6.0 |

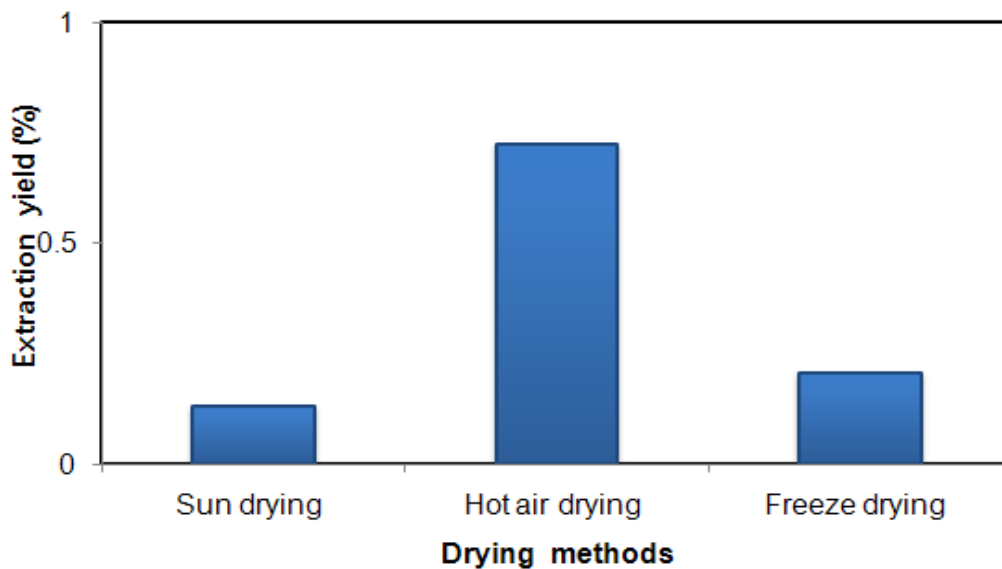


Fig. 2-3. Yield of ethanol extracts from dried samples.

추출용매에 따른 와송의 추출 수율을 조사하기 위하여 열풍건조된 시료를 물, 에탄올, 메탄올로 각각 추출·농축하였으며, 추출조건은 Table 2-4와 같다. 농축액은 다시 동결 건조하여 건조 수율로 계산하였으며, 에탄올 및 메탄올추출물은 증류수를 이용하여 5회 이상 반복 증류한 후 농축하였으며, 이 농축액을 동결건조한 결과, Fig. 2-4와 같이 물추출물에서 가장 높은 수율(2.762%)을 얻을 수 있었으며, 에탄올추출물 0.723%, 메탄올추출물 0.542%였다.

Table 2-4. Extracting condition of Wa-song from water, ethanol and methanol

| Solvents | Temperature | Time | Rate |
|----------|-------------|---------|------|
| Water | 95~100°C | 4~5 hr | 7:1 |
| Ethanol | 70~80°C | 4~5 hr | 7:1 |
| Methanol | soaking | 30 days | 7:1 |

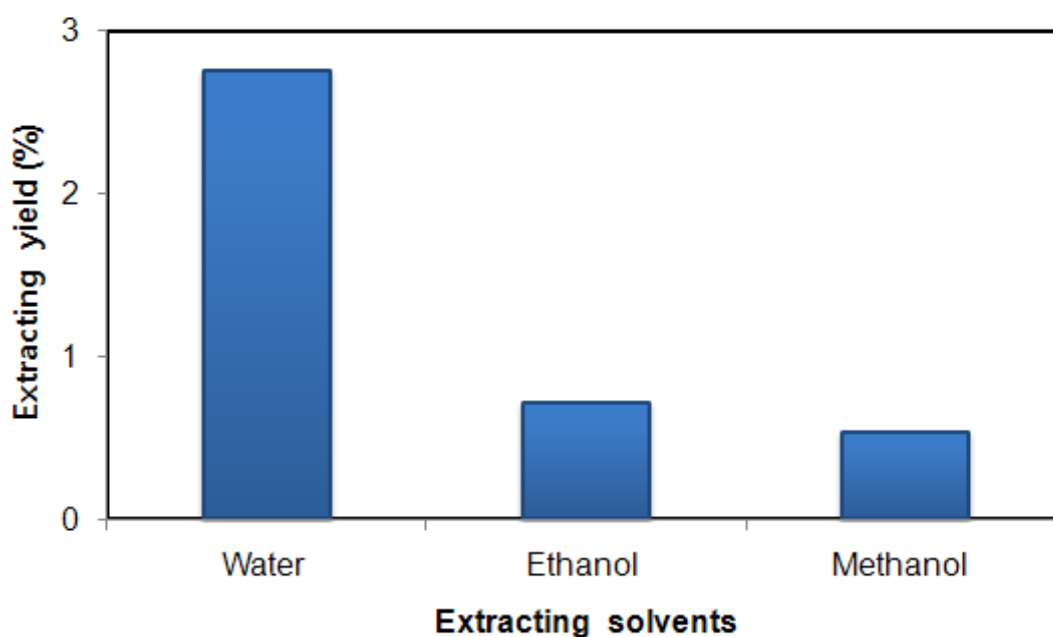


Fig. 2-4. Yield of water, ethanol and methanol extracts from dried samples.

이와 같이 와송의 건조조건별, 추출용매별 가공특성을 조사한 결과 열풍건조 조건에서 가장 높은 수율을 나타내었으며, 추출용매로는 유기용매 보다는 오히려 열수추출물에서 높은 수율을 보였다. 이러한 결과로 미루어 볼 때, 가장 적합한 가공특성 조건으로는 열풍건조 시료를 열수 추출하는 것이 상품화에 가장 적합할 것으로 사료되었다.

2. 와송의 유용물질을 함유하는 조성물을 이용한 제형화

가. 바이오헬스 소재 및 기능성식품의 형태

선정된 와송 천연물소재 및 최적조성물을 이용한 바이오헬스 소재 및 기능성식품의 개발형태는 Table 2-5와 같다.

Table 2-5. The form for development of Functional Foods

| 구 분 | 용 도 | 형 태 | 포장방법 | 비 고 |
|-----------------|-------------|---------------------|-----------------------|--------------------|
| 바이오 헬스 소재 | 항산화용 천연첨가물 | 분말형 2종 (120mesh) | 120g/병 | 기능성 식품화 |
| | 항당뇨용 천연첨가물 | | | |
| | 면역증진용 천연첨가물 | 분말형 2종 (150mesh) | 50g/병 | |
| 기능성 식품 | 항산화용 기능성식품 | 액상과우치 (최적조성물) | 100ml/포 | 고시형 건강기능 식품화 |
| | 항암용 기능성식품 | 정제형 (고형상 제품) | 6개입/tablet (PTP포장) | |
| | 항당뇨용 기능성식품 | 환(丸)형 (고형상 제품) | 200g/병 (2,000개입) | |

나. 과립분말형 시제품 제형화 공정

와송 천연물소재를 활용한 과립 제형화 공정 개발은 와송 추출·농축액(42 Brix)과 선정된 와송 천연물소재 분말 및 무수결정포도당을 이용하여 다음과 같은 공정에 의해 제조하였다(Photo 2-2).

와송의 함량을 20%로 조절한 분말을 와송 농축액과 혼합한 후 식품첨가물인 무수결정포도당을 첨가하여 반죽하고 과립으로 성형하였으며, 과립의 입자는 최소 50mesh, 최대 80mesh로 하였다. 또한 과립성형된 시제품은 65~75℃에서 3~4시간 동안 건조한 후 과립의 수분이 13% 이하가 되도록 조절하였다.



Photo. 2-2. The line for production of Wa-song experimental products

다. 액상형 시제품 제형화 공정

주원료인 와송과 함께 제3 세부과제에서 선정된 부원료의 혼합 추출 농축액을 이용하여 액상형 제품으로 제형화하는 공정은 Photo. 2-3과 같다.

와송을 주원료로 한 해당노 활성 활성용 액상제품의 배합조건은 다음과 같다. 주원료인 와송의 함유량 20%, 부원료로 선정된 생약재 백봉령(1~5%), 창출(1~3%), 사인(0.1~0.5%)의 범위로 하였으며, 시제품의 맛 조절을 위해 진피 및 감초를 첨가하였고, 색상조절을 위해서는 블루베리 추출물 및 식품첨가물을 사용하였다.

원료의 채취는 경남 함양군 지리산 일대 야생 와송(바위솔)을 채취하여 열풍건조하였으며, 약 2 cm 정도의 크기로 절단하여 95~100°C에서 4시간 동안 열수추출 하였다. 또한 농축공정에서는 열수추출액(1~2 Brix)이 30 Brix가 되도록 진공농축(동결건조 효율에 적합한 농도가 되도록 20~30 Brix도 가능) 하였으며, 농축된 시료는 동결건조하여 제품화 시료로 사용하였다



Photo. 2-3. The Scheme for manufacture of liquid Wa-song experimental products.

라. 와송을 활용한 환형, 파우치형 및 정제형 제품 제형화 공정

와송 천연물소재 및 선정된 부원료를 이용한 최종제품의 유형별 시제품 제조공정도는 Photo. 2-4와 같다.

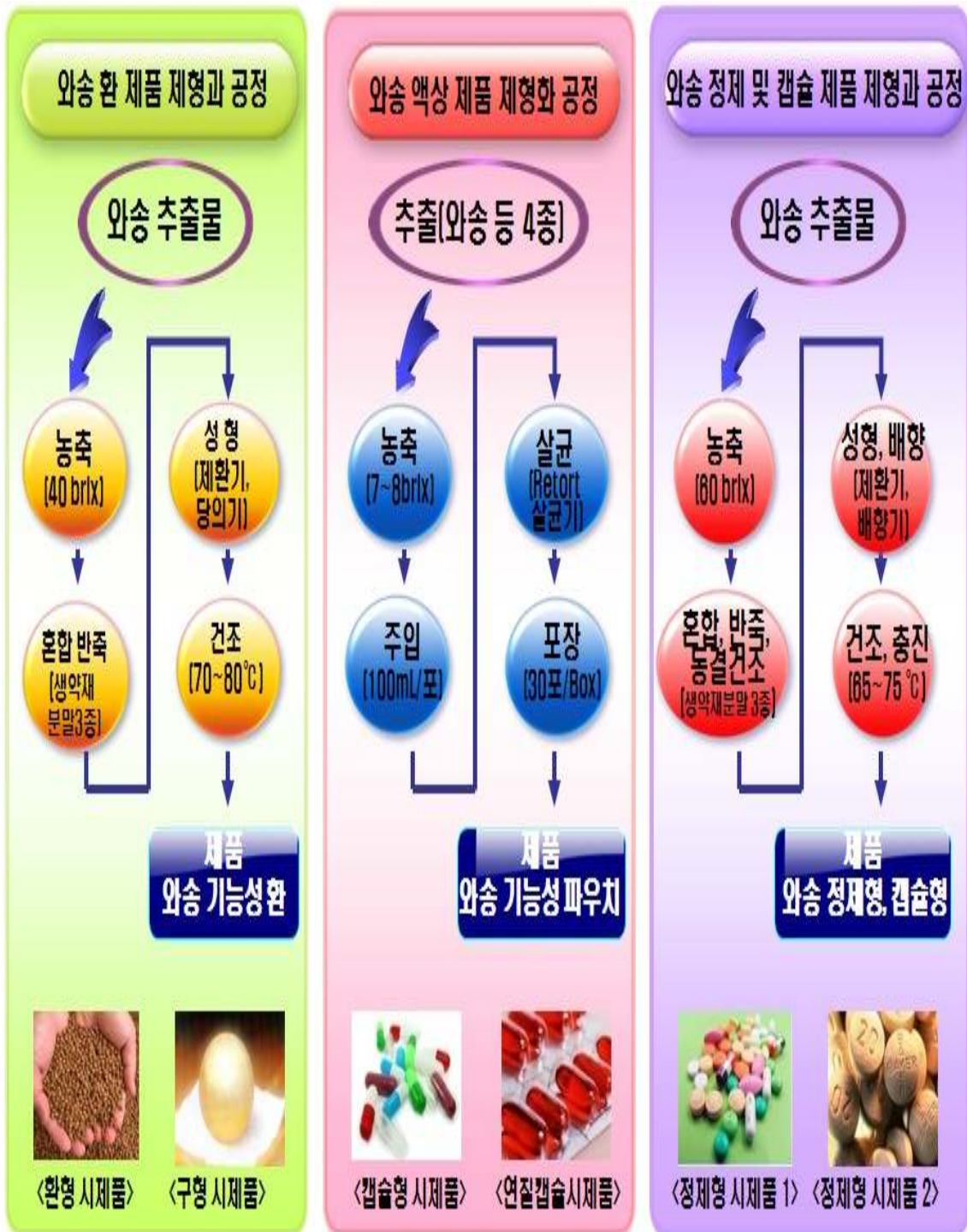


Photo. 2-4. The Scheme for formulation of Wa-song experimental products.

제3 세부과제 연구결과 와송의 추출수율이 36.3%로 아주 높게 나타난 점을 이용하여 추출온도는 95℃ 이하로 조절하였으며, 추출시간은 2~3시간, 농축 감압의 정도는 550 mmHg 이하로 설정하였다. 또한 환 제품 제조시에는 성형 후 당의기의 사용으로 인해 제품 고유의 이미지 보다는 가공된 이미지의 효과가 높아지는 단점을 보완하기 위해 당의기 사용시간을 10분 이하로 조절하였다.

과우치 제품의 경우 최종제품에 함유된 와송의 함량이 20% 이하가 되도록 선정된 생약재 3종의 함량으로 조절하였으며, 최종 시제품의 용량은 80~100 mL로 하였다. 또한 정제형 제품은 원형, 타원형 및 삼각형 모양의 PTP 포장으로 결정하였다.

마. 대량생산시스템 설계

상기와 같이 와송의 천연물 소재 및 선정 부원료를 이용한 액상형 제품의 대량생산 공정에 필요한 시설 Photo. 2-5와 같이 여과장치, 추출장치, 농축장치, 저장장치, 포장 시설 및 부원료 관리시설로서 세부적인 생산공정으로는 추출, 여과, 농축, 검사, 혼합, 농도 조절, 1차 살균, 품질 검사, 평가(색도, 산도, 관능평가), 주입, 2차 살균 및 제품 포장의 공정을 확정하였으며, 확정된 생산시스템 설계도는 3차년도 최종 제품생산연구에 활용할 계획이다.

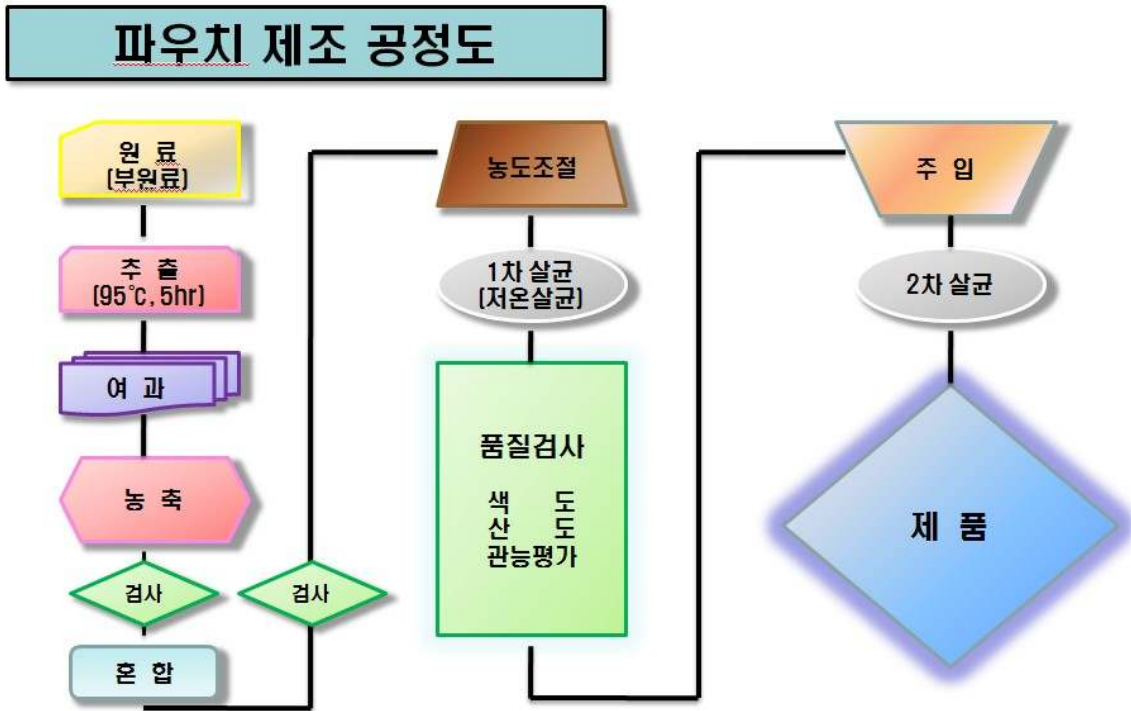


Photo. 2-5. The plan for manufacture of Wa-song experimental products.

3. 와송 천연물소재 및 최적조성물 제조공정

향후 건강기능식품 소재 및 일반식품소재로서 유통을 위한 와송 천연물소재의 제조 공정은 Fig. 2-5 및 Photo 2-6과 같다.



Fig. 2-5. The scheme for manufacture of Wa-song naturally.



Photo. 2-6. The plan for manufacture of Wa-song naturally.

제 3 절 와송의 항산화 활성 구명

1. 서 론

건강을 유지하기 위한 다양한 방안 중 하나로서 심혈관의 기능장애, 동맥경화, 염증 유발, 암, 약물독성, 재관류 손상, 신경변성의 손상 등을 포함하는 다양한 병리학적 증상 유발에 관여하는 산화적 스트레스를 줄이는 일은 중요한 의미를 가지게 된다. 활성 산소종이나 산화적 스트레스로부터 건강을 유지하기 위하여 생체는 다양한 효소적 및 비효소적 항산화 시스템을 가지고 있지만 지속적인 산화 스트레스에 충분히 대처하기 위해서는 식품을 통한 항산화 물질의 공급이 불가피하다. 식물류에 함유된 수천 종의 phytochemical은 서로 다른 생체 내 반응을 활성화 또는 억제시켜 인체 내에서 다양한 기능을 가지는 것으로 알려져 있다.

와송은 기와지붕 위에서 자라는 모양이 소나무 잎이나 꽃을 닮아서 우리나라에서는 와송 또는 바위솔이라고 불린다. 와송의 약리작용으로는 혈관수축작용, 이뇨작용, 장관의 긴장도 증강작용, 혈압강하, 이뇨작용 및 해열 작용이 있다고 보고되어 있다(HSU HY. et al 1986). 주요성분으로는 friedelin, epi-friedlanol, glutinone, glutinol 등의 triterpenoid류와 β -sitosterol, campesterol 등의 sterol계열 물질, fatty acid ester류 및 kaempferol, quercetin과 같은 flavonoid, 4-hydroxybenzoic acid, 3,4-dihydroxybenzoic acid, gallic acid 등의 aromatic acid 등이 보고되어 있다(Park JC. et al 2005, Park HJ. et al 1994).

최근 연구에 의하면 와송의 물 및 에탄올추출물이 linoleic acid 또는 금속류를 함유한 기질에서 항산화능이 확인되어 있으며, 건조방법에 따른 활성은 열풍건조한 와송이 가장 효과적이라고 보고되어져 있다(Lee SJ. et al 2008). 대두유 및 돈지에 와송 추출물을 첨가하였을 때 60°C에서 저장(Shin JH. et al 2008) 및 180°C에서 가열저장(Lee SJ. et al 2009) 하였을 때 유지의 저장 중 산화 억제에 효과가 있음이 보고된 바 있다.

따라서 본 연구는 와송의 처리조건을 달리하여 항산화 활성을 실험하였으며, 식용유지의 저장 중 와송을 첨가하여 유지의 산화억제에 미치는 영향을 측정하였다.

2. 재료 및 방법

가. 항산화 활성 측정

와송은 채취시기별(6월~12월), 추출 용매별(헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올 및 물), 건조방법별(천일건조, 열풍건조 및 동결건조)로부터 각각의 와송 추출물을 제조하여 100~1000 µg/mL의 농도로 조절하여 항산화 활성을 시험하였다. 와송 및 생약재복합물의 항산화 활성은 생약재복합물에 와송 추출물의 첨가량을 달리하여 제조하였는데, 생약재복합물에 대해 동량의 와송 추출물 첨가군(MW-1)과 3배의 와송 추출물 첨가군(MW-3)으로 구성하였다. 생약재복합물은 (주)금황 바이오로부터 제공받았으며, 상황버섯 17.7%, 유기생, 유근피, 울금, 차가버섯 및 블루베리는 각 11.0%, 민들레, 진피 및 감초는 각 7.0%, 영지 3.7%, 백봉령 및 호초가 2.0%의 구성비로 하였다. 와송은 물추출물은 텍스트린을 가하여 20% 와송 추출물로 조제하였다.

(1) 총 페놀 및 플라보노이드 정량

총 페놀 함량은 각 추출물 1 mL에 Foline-Ciocalteu 시약 및 10% Na₂CO₃용액을 각 1 mL씩 차례로 가한 다음 실온에서 1시간 정치한 후 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. Caffeic acid(Sigma Co., USA)를 사용하여 얻은 표준검량선으로부터 총 페놀 함량을 산출하였다. 총 플라보노이드는 추출물 1 mL에 10% aluminum nitrate 0.1 mL, 1 M potassium acetate 0.1 mL 및 ethanol 4.3 mL를 차례로 가하여 혼합하고 실온에서 40분간 정치한 다음 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. Quercetin(Sigma Co., USA)을 표준물질로 하여 얻은 표준검량선으로부터 추출물의 총 플라보노이드 함량을 계산하였다.

(2) DPPH라디칼 소거능 측정

1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)법에 따라 시료 추출물의 전자공여능을 DPPH 라디칼 소거능으로 나타내었다. 즉 일정한 농도의 시료에 DPPH 용액을 가하여 20분간 반응시킨 후 525 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH 라디칼 소거능은 시료첨가구와 무첨가구의 흡광도 차이를 백분율(%)로 나타내었다.

(3) 환원력 측정

시료에 인산 완충액(200 mM, pH 6.6) 및 1%의 potassium ferricyanide 각 1 mL를 차례로 가한 다음 50°C의 수욕상에서 20분간 반응시켰다. 여기에 10% TCA용액 1 mL

가하여 13,500×g에서 15분간 원심분리한 후 얻은 상층액 1 mL에 증류수 1 mL와 ferric chloride 1 mL를 혼합한 후 700 nm에서 흡광도를 측정하여 흡광도의 값으로 나타내었다.

(4) ABTs 라디칼 소거능 측정

7 mM의 ABTs(2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate)) 수용액에 2.4 mM의 potassium persulfate를 용해시킨 다음 암실에서 12~16시간 동안 반응시켰다. 이를 414 nm에서 흡광도가 1.5가 되도록 증류수로 조정한 후 3 mL를 취하여 시료액 1 mL를 가하여 실온에서 10분간 반응시켜 414 nm에서 흡광도를 측정하여 시료첨가구와 무첨가구의 흡광도 비로 나타내었다.

(5) Hydroxyl radical(\cdot OH)의 소거능 측정

시험관에 1 mM FeSO₄/EDTA 용액 0.2 mL, 10 mM 2-deoxyribose 0.2 mL, 시료 추출액을 첨가한 후 0.1 M phosphate buffer(pH 7.4) 1.2 mL, 10 mM H₂O₂ 0.2 mL를 가한 다음 37°C에서 1시간 반응시킨 후 2.8% TCA(trichloroacetic acid)용액 1 mL를 가하고 95°C에서 10분간 증탕하여 냉각시킨 다음 532 nm에서 분광광도계(Optizen 2120UV, Mecasys Co. Ltd, Korea)로 흡광도를 측정하였다. 대조구에 대한 시료첨가구의 흡광도차이를 백분율(%)로 나타내었다.

(6) Superoxide dismutase(SOD) 유사활성 측정

시료에 pH 8.5로 조정한 tris-HCl buffer 3 mL와 7.2 mM pyrogallol 0.2 mL를 가하여 25°C에서 10분간 방치한 후 1 N HCl 1 mL로 반응을 정지시킨 후 420 nm에서 흡광도를 측정하여 시료첨가구와 무첨가구의 흡광도 차이를 백분율(%)로 나타내었다.

(7) Thiobarbituric acid reactive substances(TBARS) 측정

TBARS는 fish oil emulsion을 제조한 후 산소종을 달리하여 첨가한 후 일정량의 시료 추출액을 넣은 다음 반응 혼합물을 37°C 수욕상에서 1시간동안 반응시킨 후 7.2% BHT 50 μ L를 가하여 반응을 정지시켰다. 여기에 TCA/TBA시약 2 mL를 가하여 끓는 물에서 15분간 가열한 후 급냉시켜 2000×g에서 10분간 원심분리시킨 상등액을 531 nm에서 흡광도를 측정하였다. TBARS값은 반응혼합물 L에 대한 mg malondialdehyde (MDA)로 나타내었다.

(8) Thiocyanate법에 의한 과산화지질 생성 저해능 측정

Linoleic acid의 과산화에 대한 저해 효과는 thiocyanate법으로 측정하였다. 시료 추출물 1 mL에 linoleic acid emulsion(1%) 1 mL, 0.2 M phosphate 완충용액(pH 7.0) 2 mL를 차례로 혼합하여 37°C에서 보관하면서 일정 기간별로 채취하여 75% ethanol 4.7 mL, 30% ammonium thiocyanate 0.1 mL 및 0.02 M ferrous chloride 0.1 mL를 혼합하여 500 nm에서 흡광도를 측정하였다. 과산화지질 생성 저해능은 시료 무첨가구의 흡광도와 시료 첨가구의 흡광도로부터 백분율(%)로 산출하였다.

(9) 아질산염 소거능의 측정

시료 추출물에 1 mM 아질산나트륨 용액 1 mL를 가한 후, 0.1 N HCl 완충액 및 0.2 M 구연산 완충용액으로 각각 반응용액을 pH 2.5로 조정하여 다음 반응용액의 총 부피를 10 mL로 하여 37°C에서 1시간 반응시켰다. 이 반응액을 취하여 2% 초산용액, 30% 초산용액으로 조제한 Griess 시약을 혼합하여 분광광도계로 520 nm에서 흡광도를 측정하여 대조구에 대한 시료첨가구의 아질산소거능을 백분율로 나타내었다.

(10) Nitric oxide(NO) 소거능

Nitric oxide 소거능은 시료 0.5 mL에 10mM sodium nitroprusside 용액 0.5 mL를 가하여 상온에서 150분간 반응시켰다. 여기에 1 mL의 Griess reagent를 가한 후 542 nm에서 흡광도를 측정하였다. Griess reagent는 2% sulfanilamide를 함유하는 4% 인산용액과 0.2% naphthylethylenediamide용액을 사용직전에 1:1(v/v)로 혼합하여 사용하였다. Nitric oxide 소거능은 $[1 - (\text{시료 첨가구의 흡광도} / \text{무첨가구의 흡광도})] \times 100$ 으로 나타내었다.

(11) Tyrosinase 활성 저해능 측정

Tyrosinase 활성 저해능 측정은 tyrosinase의 작용결과 생성되는 DOPA chrome을 비색법에 의해 측정하였다. 즉, 0.2 M potassium phosphate buffer(pH 6.5) 2.3 mL에 2 mM L-tyrosine 용액 0.4 mL, 시료액 0.2 mL 및 tyrosinase(220 unit/mL, Sigma chemical Co., St. Louis, MO, USA) 0.1 mL를 차례로 가한 후 37°C에서 30분간 반응시킨 후 470 nm에서 흡광도(S_{OD})를 측정하였다. 효소액 대신에 증류수를 넣고 측정한 흡광도(B_{OD}) 및 시료액 대신에 증류수를 첨가하여 측정한 흡광도(C_{OD})를 이용하여 다음의 식에 따라 tyrosinase 저해능을 측정하였다.

$$\text{Inhibition effect (\%)} = \left[1 - \frac{(\text{SOD} - \text{BOD})}{\text{C}_{\text{OD}}} \right] \times 100$$

(12) α -glucosidase 활성 저해능 측정

α -glucosidase 활성 저해능은 *in vitro*에서 기질과의 반응역학분석 방법으로 저해능을 측정하였다. 즉, synthetic substrate인 2.5 mM ρ -nitrophenyl α -D-glucopyranoside를 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 6.8)에 첨가한 후 α -glucosidase와 시료 추출물을 넣고 그 혼합액에 enzyme solution을 첨가한 후 37°C에서 20분간 반응시키고 0.1 M NaOH 100 μ L를 가하여 반응을 정지시키고 substrate인 ρ -nitrophenyl α -D-glucopyranoside로부터 유리되어 나오는 반응 생성물인 ρ -nitrophenol을 405 nM에서 측정하여 α -glucosidase 활성의 억제정도를 측정하였다.

나. 식용유지기질에서 항산화 활성 측정

대두유 및 돈지 각 100 g에 열풍건조 물추출물, 열풍건조 에탄올추출물 및 동결건조 물추출물을 각각 0.1, 0.5, 1.0 mg/100 g의 농도로 첨가하였다. 저온저장 시료는 60±2°C의 항온기에 4주간 보관하면서 1주일 간격으로, 고온저장 시료는 180±2°C의 oil bath 상에 보관하면서 12, 24, 36 및 48시간에 시료를 취하여 각 분석에 사용하였다. 이때 와송 추출물을 첨가하지 않은 유지를 대조군(control)으로 하였으며, 시료 대신에 0.02% 농도의 BHT를 유지에 첨가한 것을 positive control로 하여 동일한 방법으로 분석하였다.

(1) 색도 측정

색도는 시료 유지 2 g 을 CCl₄ 2 mL에 용해시킨 후 분광광도계를 이용하여 430 nm에서 흡광도를 측정하고 이 값을 색도로 표시하였다.

(2) Anisidine value(AV) 측정

각 시료와 iso-octane을 1: 49의 비율로 섞은 용액 5 mL에 무수 초산에 희석한 0.25% ρ -anisidine 시약 1 mL을 혼합한 후 25°C 암소에서 10분간 보관하였다가 350 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(3) 산가(Acid value) 측정

유지 5 g에 100 mL ether-ethanol solution (2:1)과 5% phenolphthalein 2~3방울을 가한 후 0.1 N KOH 용액으로 적정하였다.

(4) 과산화물가(Peroxide value) 측정

시료 1 g에 35 mL의 chloroform-acetic acid (2:3)와 1 mL 포화 KI 용액을 넣은 후 5분간 암실에 방치한 다음 75 mL의 증류수를 첨가하고 1% 전분용액을 지시약으로 하여 0.01 N sodium thiosulfate로 적정하였다.

(5) TBA가 측정

유지에 benzene 10 mL을 혼합하여 용해시킨 후 TBA (2-thiobarbituric acid) 혼합액 10 mL를 가하고 가끔 흔들며 주면서 4분간 방치한 다음 아래층을 회수하여 95°C water bath상에서 30분간 가열 한 후 빙수 중에서 급냉시켜 530 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 외송 채취시기별 항산화 활성

(1) 채취시기별 추출물의 총 페놀과 플라보노이드 함량

채취시기를 달리한 외송의 총 페놀 화합물의 함량은 Table 3-1과 같이 물추출물보다 메탄올 추출물에서 높게 정량되었으며 특히 8~10월에 채취한 외송의 메탄올추출물은 $2,428.0 \pm 3.52 \sim 2,703.1 \pm 5.21$ mg/100 g, 물추출물은 $1865.5 \pm 1.89 \sim 2004.2 \pm 2.17$ mg/100 g이었다. 8월에 채취한 외송의 총페놀 화합물의 함량이 유의적으로 높았다. 플라보노이드 함량은 10월에 채취한 외송에서 유의적으로 가장 높았는데, 메탄올추출물은 1324.6 ± 1.87 mg/100 g, 물추출물은 941.2 ± 2.84 mg/100 g이었다.

(2) 채취시기별 추출물의 DPPH라디칼 소거능

채취시기에 따른 메탄올과 물추출물의 전자 공여능은 Table 3-2에서 보는 바와 같이 추출물의 첨가량이 많아짐에 따라 유의적으로 증가하였다. 물추출물에 비해 메탄올추출물에서 DPPH라디칼 소거능이 우수하였다.

시료의 첨가량이 100~1000 $\mu\text{g/mL}$ 에서 메탄올추출물은 $18.2 \pm 0.32 \sim 88.3 \pm 0.46\%$, 물추출물은 $14.3 \pm 0.08 \sim 64.6 \pm 0.38\%$ 의 소거능을 보였다. 1000 $\mu\text{g/mL}$ 첨가시 메탄올추출물은 9월에 채취된 시료에서 $88.3 \pm 0.46\%$, 물추출물은 8월에 채취된 시료에서 $64.6 \pm 0.38\%$ 로 다른 시기에 비해 유의적으로 활성이 높았다. 반면에 6, 7월 및 12월에

채취된 시료에서는 1000 µg/mL 첨가시에도 50% 미만의 소거능을 보였는데, 이는 시료 중의 총페놀 및 플라보노이드 함량과 밀접한 관계가 있는 것으로 판단된다.

Table 3-1. Total phenol and flavonoid contents of methanol and water extracts from Wa-song harvested at June~December

(mg/100 g)

| | | Phenol contents | Flavonoid contents |
|----------|-----------|---------------------------|---------------------------|
| Methanol | June | 647.2±1.26 ^a | 238.3±1.43 ^a |
| | July | 782.3±3.22 ^b | 322.7±1.21 ^b |
| | August | 2,703.1±5.21 ^g | 634.2±2.33 ^c |
| | September | 2,632.1±2.38 ^f | 1,012.1±3.24 ^e |
| | October | 2,428.0±3.52 ^e | 1,324.6±1.87 ^g |
| | November | 1,462.8±1.70 ^d | 1,211.4±1.36 ^f |
| | December | 1,232.4±1.23 ^c | 985.3±1.32 ^d |
| Water | June | 525.3±0.55 ^a | 217.6±2.55 ^a |
| | July | 800.2±1.37 ^b | 253.3±1.98 ^b |
| | August | 1,985.4±2.34 ^g | 511.1±2.14 ^c |
| | September | 1865.5±1.89 ^e | 824.9±3.87 ^f |
| | October | 2,004.2±2.17 ^f | 941.2±2.84 ^g |
| | November | 1,312.1±1.99 ^d | 442.8±3.62 ^e |
| | December | 998.6±1.86 ^c | 401.6±2.40 ^d |

^{a-g}Means with different superscripts within a concentration in the same sample significantly difference at $p < 0.05$.

Table 3-2. DPPH radical scavenging ability of methanol and water extracts from Wa-song harvested at June~December

| | | Scavenging ability (%) | | | |
|----------|-----------|---|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | | Concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | | | |
| | | 100 | 250 | 500 | 1000 |
| Methanol | June | 18.2 \pm 0.32 ^{a)} | 22.6 \pm 0.21 ^a | 29.7 \pm 0.15 ^a | 32.5 \pm 0.21 ^a |
| | July | 22.3 \pm 0.22 ^b | 30.7 \pm 0.17 ^b | 36.8 \pm 0.23 ^b | 39.3 \pm 0.20 ^b |
| | August | 52.1 \pm 0.42 ^e | 62.5 \pm 0.34 ^g | 77.5 \pm 0.38 ^g | 82.4 \pm 0.42 ^f |
| | September | 48.8 \pm 0.32 ^d | 55.7 \pm 0.31 ^f | 68.3 \pm 0.32 ^f | 88.3 \pm 0.46 ^g |
| | October | 45.7 \pm 0.22 ^d | 49.8 \pm 0.15 ^e | 53.7 \pm 0.27 ^e | 79.6 \pm 0.30 ^e |
| | November | 33.7 \pm 0.12 ^c | 42.4 \pm 0.20 ^d | 48.8 \pm 0.25 ^d | 54.3 \pm 0.21 ^d |
| | December | 31.9 \pm 0.10 ^c | 38.7 \pm 0.19 ^c | 42.2 \pm 0.19 ^c | 46.9 \pm 0.26 ^c |
| Water | June | 14.3 \pm 0.08 ^a | 21.2 \pm 0.22 ^a | 25.2 \pm 0.18 ^a | 28.7 \pm 0.11 ^a |
| | July | 17.5 \pm 0.05 ^b | 22.3 \pm 0.18 ^a | 28.1 \pm 0.20 ^b | 32.5 \pm 0.20 ^b |
| | August | 38.8 \pm 0.17 ^d | 52.2 \pm 0.36 ^e | 58.5 \pm 0.31 ^f | 64.6 \pm 0.38 ^g |
| | September | 42.2 \pm 0.22 ^e | 48.1 \pm 0.33 ^d | 51.5 \pm 0.36 ^e | 60.6 \pm 0.43 ^f |
| | October | 36.5 \pm 0.26 ^d | 38.2 \pm 0.20 ^c | 42.2 \pm 0.29 ^d | 52.4 \pm 0.24 ^e |
| | November | 29.8 \pm 0.21 ^c | 32.1 \pm 0.25 ^b | 41.5 \pm 0.31 ^d | 44.8 \pm 0.31 ^d |
| | December | 28.4 \pm 0.16 ^c | 31.7 \pm 0.31 ^b | 36.3 \pm 0.15 ^c | 38.2 \pm 0.21 ^c |

^{a-g}Means with different superscripts within a concentration in the same sample significantly difference at $p < 0.05$.

(3) 채취시기별 추출물의 환원력

반응계에 시료의 첨가량을 증가시키기에 따라 환원력은 유의적으로 증가하였다. Table 3-3에서와 같이 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 8~10월에 채취한 와송의 메탄올추출물은 1.45 \pm 0.028~1.88 \pm 0.031로 높은 환원력을 보였으며, 9월에 채취된 와송에서 환원력이 가장 높았다. 물추출물은 메탄올추출물보다는 전체적으로 환원력이 낮았으나, 8~10월에 채취한 와송에서는 유의적으로 활성이 높았으며, 8월에 채취된 와송에서 환원력이 가장 높았다. 이는 DPPH 라디칼 소거능과 유사한 경향이였다.

Table 3-3. Reducing power of methanol and water extracts from Wa-song harvested at June~December

| | | 700 nm (O.D.) | | | |
|----------|-----------|---|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | | Concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | | | |
| | | 100 | 250 | 500 | 1000 |
| Methanol | June | 0.07±0.001 ^a | 0.13±0.002 ^a | 0.22±0.003 ^a | 0.28±0.005 ^a |
| | July | 0.12±0.001 ^b | 0.24±0.003 ^b | 0.29±0.011 ^b | 0.41±0.016 ^b |
| | August | 0.33±0.002 ^d | 0.52±0.007 ^e | 1.02±0.038 ^e | 1.88±0.031 ^e |
| | September | 0.37±0.002 ^d | 0.48±0.012 ^d | 0.92±0.015 ^d | 1.52±0.035 ^c |
| | October | 0.42±0.004 ^e | 0.51±0.020 ^e | 0.89±0.020 ^d | 1.45±0.028 ^b |
| | November | 0.28±0.001 ^c | 0.33±0.011 ^c | 0.49±0.007 ^c | 1.02±0.025 ^d |
| | December | 0.13±0.001 ^b | 0.23±0.009 ^b | 0.37±0.002 ^c | 0.49±0.012 ^c |
| Water | June | 0.07±0.001 ^a | 0.10±0.000 ^a | 0.15±0.003 ^a | 0.20±0.004 ^a |
| | July | 0.10±0.001 ^b | 0.20±0.002 ^b | 0.22±0.004 ^b | 0.28±0.003 ^b |
| | August | 0.26±0.002 ^c | 0.31±0.003 ^d | 0.47±0.002 ^e | 0.56±0.011 ^d |
| | September | 0.31±0.005 ^d | 0.39±0.005 ^e | 0.49±0.001 ^e | 0.62±0.020 ^e |
| | October | 0.33±0.011 ^d | 0.38±0.010 ^e | 0.42±0.005 ^d | 0.59±0.016 ^d |
| | November | 0.12±0.004 ^b | 0.25±0.006 ^c | 0.31±0.011 ^c | 0.39±0.015 ^c |
| | December | 0.11±0.006 ^b | 0.19±0.004 ^b | 0.24±0.015 ^b | 0.22±0.009 ^a |

^{a-e}Means with different superscripts within a concentration in the same sample significantly difference at $p < 0.05$.

(4) Hydroxyl radical 소거능

Hydroxyl radical 소거능은 Table 3-4에서 보는 바와 같이 100~1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도 범위에서 메탄올추출물은 12.0±0.09~67.5±0.43%, 물추출물은 13.3±0.10~52.5±1.33%의 활성을 보였다.

메탄올추출물은 8월, 9월 및 10월에 채취된 와송에서 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 첨가시 50%이상의 활성을 보였으며, 9월 및 10월에 채취된 와송간에는 유의차가 없었으나, 다른 시기에 채취된 와송보다 유의적으로 활성이 높았다. 물추출물은 8월에 채취된 와송에서 유의적으로 가장 활성이 높았으며, 다음으로 7월, 9월 및 10월에 채취된 와송으로 이들의 활성은 유의차가 적었다.

Table 3-4. The scavenging of hydroxyl radical of methanol and water extracts from Wa-song harvested at June~December

| | | Scavenging ability (%) | | | |
|----------|-----------|------------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | | Concentration ($\mu\text{g/mL}$) | | | |
| | | 100 | 250 | 500 | 1000 |
| Methanol | June | 16.2 \pm 0.21 ^b | 21.3 \pm 0.17 ^b | 24.7 \pm 0.28 ^a | 30.8 \pm 0.15 ^b |
| | July | 28.2 \pm 0.18 ^c | 32.4 \pm 1.24 ^c | 37.7 \pm 0.19 ^b | 42.3 \pm 1.35 ^c |
| | August | 40.8 \pm 1.23 ^d | 51.3 \pm 2.11 ^e | 56.6 \pm 1.21 ^d | 58.7 \pm 1.42 ^d |
| | September | 41.4 \pm 1.89 ^d | 48.3 \pm 1.18 ^e | 55.5 \pm 0.29 ^d | 65.6 \pm 0.18 ^e |
| | October | 38.3 \pm 0.10 ^d | 44.2 \pm 0.92 ^d | 53.6 \pm 0.75 ^d | 67.5 \pm 0.43 ^e |
| | November | 29.2 \pm 0.15 ^c | 36.3 \pm 0.13 ^c | 41.3 \pm 0.14 ^c | 46.8 \pm 1.05 ^c |
| | December | 12.0 \pm 0.09 ^a | 16.8 \pm 0.09 ^a | 22.5 \pm 0.22 ^a | 24.5 \pm 0.98 ^a |
| Water | June | 14.2 \pm 0.18 ^a | 18.4 \pm 0.12 ^a | 21.5 \pm 0.21 ^a | 26.8 \pm 0.12 ^a |
| | July | 32.5 \pm 0.24 ^c | 38.3 \pm 0.10 ^c | 41.6 \pm 0.35 ^c | 48.6 \pm 1.24 ^c |
| | August | 38.2 \pm 0.33 ^d | 41.4 \pm 0.36 ^d | 48.7 \pm 0.17 ^e | 52.5 \pm 1.33 ^d |
| | September | 40.0 \pm 1.21 ^e | 42.5 \pm 0.25 ^d | 44.3 \pm 0.29 ^d | 48.2 \pm 1.17 ^c |
| | October | 32.4 \pm 0.32 ^c | 38.7 \pm 0.19 ^c | 42.4 \pm 0.12 ^c | 48.2 \pm 0.31 ^c |
| | November | 18.3 \pm 0.16 ^b | 21.1 \pm 0.21 ^b | 26.5 \pm 0.41 ^b | 33.6 \pm 1.20 ^b |
| | December | 13.3 \pm 0.10 ^a | 16.2 \pm 0.17 ^a | 21.4 \pm 0.16 ^a | 26.5 \pm 0.11 ^a |

^{a-c}Means with different superscripts within a concentration in the same sample significantly difference at $p < 0.05$.

시료의 hydroxyl radical 소거능은 Fenton 반응에서 Fe^{+2} chelation이 아니라 직접적인 radical 제거에 의한 것으로 보고되어 있다(Kang MY. et al 2004). 즉 hydroxyl radical이 생체 내에서 발생하는 활성산소종 중에서 산화적 손상을 일으키는 유해 라디칼인 것으로 볼 때, 와송 열풍건조 시료는 인체 내에서 산화성 free radical과 반응하는 항산화제로 이용될 수 있는 가능성이 클 것으로 기대된다.

(5) 채취시기별 추출물의 TBARS 함량

금속 및 산소종을 달리하여 와송 추출물의 TBARS 함량을 측정한 결과 Table 3-5 ~ 3-7과 같다. Table 3-5에서 FeCl_2 가 지질 산화에 미치는 정도는 채취시기와 와송 추출

물에 의한 유의적인 차이는 없었으며, 단지 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 첨가시 8~11월에 채취한 와송의 메탄올추출물은 $1.4\pm 0.01\sim 1.8\pm 0.04$ mg/MDA/L의 범위로 유의차가 없었다. 물추출물에서는 8~9월에 채취된 와송에서 $1.7\pm 0.02\sim 1.8\pm 0.05$ mg MDA/L의 범위로 유의적으로 낮은 함량의 TBARS 값을 나타내어, 이 시기에 채취된 와송에서 지질과산화 억제능이 뛰어난 것으로 짐작할 수 있었다.

Table 3-6은 CuSO_4 존재시 TBARS 함량을 나타낸 것으로, FeCl_2 와 동일한 양상을 나타내었는데, 메탄올추출물은 8~10월에 채취된 와송에서 $2.0\pm 0.02\sim 2.4\pm 0.01$ mg MDA/L의 범위로 가장 낮은 TABRS 값을 보여 이들 시료의 지질과산화 억제능이 뛰어난 것으로 판단되었다. 물추출물은 8~9월에 채취된 와송에서 가장 활성이 우수하였다.

H_2O_2 존재시 TBARS 함량은 Table 3-7에 나타낸 바와 같이 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 메탄올과 물추출물은 $4.2\pm 0.03\sim 8.2\pm 0.12$ mg MDA/L로 지질과산화가 다른 산소종보다 촉진됨을 알 수 있었다. 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 첨가시에는 $2.2\pm 0.01\sim 6.6\pm 0.04$ mg MDA/L로 시료의 첨가량이 증가됨에 따라 TABRS 함량이 감소되는 경향이였다. 또한 메탄올추출물이 물추출물보다 TBARS 값이 낮은 것으로 보아 산화촉진 인자들을 결합하는 능력이 물추출물보다 높음을 추정할 수 있었다.

본 실험의 결과 와송 추출물의 첨가시 지질과산화 억제능이 우수한 것은 와송 추출물이 금속이온에 대한 결합력이 높기 때문인 것으로 판단된다. 따라서 시료의 지질산화 억제효과는 시료의 제조 조건 및 추출방법에 따라 달라질 수 있다는 것을 알 수 있었다.

Table 3-5. Effect of methanol and water extracts from Wa-song harvested at June~ December on lipid oxidation of oil emulsion containing FeCl₂

TBARS (mg MDA/L)

| | | Concentration (µg/mL) | | | |
|----------|-----------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | | 100 | 250 | 500 | 1000 |
| Methanol | June | 3.8±0.21 ^b | 3.4±0.03 ^c | 3.2±0.01 ^c | 2.8±0.02 ^c |
| | July | 3.2±0.11 ^b | 3.8±0.05 ^c | 3.4±0.04 ^c | 2.8±0.05 ^c |
| | August | 2.8±0.17 ^a | 2.6±0.11 ^b | 2.3±0.03 ^b | 1.6±0.01 ^a |
| | September | 2.6±0.08 ^a | 2.2±0.08 ^c | 1.8±0.01 ^a | 1.4±0.01 ^a |
| | October | 3.4±0.15 ^b | 2.6±0.06 ^b | 2.2±0.04 ^b | 1.6±0.02 ^a |
| | November | 4.2±0.19 ^c | 3.6±0.07 ^d | 2.4±0.06 ^b | 1.8±0.04 ^a |
| | December | 4.0±0.06 ^c | 3.8±0.04 ^c | 3.2±0.09 ^c | 2.6±0.07 ^b |
| Water | June | 4.0±0.10 ^c | 3.6±0.02 ^b | 3.4±0.02 ^c | 3.2±0.03 ^c |
| | July | 3.8±0.14 ^c | 3.4±0.04 ^b | 3.0±0.04 ^b | 3.0±0.05 ^c |
| | August | 3.2±0.09 ^b | 2.8±0.05 ^a | 2.6±0.01 ^a | 1.7±0.02 ^a |
| | September | 2.8±0.13 ^a | 2.6±0.07 ^a | 2.4±0.03 ^a | 1.8±0.05 ^a |
| | October | 4.1±0.11 ^c | 3.8±0.04 ^c | 3.2±0.02 ^b | 2.8±0.01 ^b |
| | November | 4.2±0.02 ^c | 4.0±0.01 ^d | 3.5±0.01 ^c | 2.8±0.07 ^b |
| | December | 3.8±0.01 ^c | 3.6±0.08 ^b | 3.4±0.07 ^c | 3.9±0.02 ^d |

^{a-d}Means with different superscripts within a concentration in the same sample significantly difference at $p < 0.05$.

Table 3-6. Effect of methanol and water extracts from Wa-song harvested at June~ December on lipid oxidation of oil emulsion containing CuSO₄

TBARS (mg MDA/L)

| | | Concentration (µg/mL) | | | |
|----------|-----------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | | 100 | 250 | 500 | 1000 |
| Methanol | June | 4.2±0.08 ^b | 3.8±0.04 ^b | 3.4±0.02 ^c | 3.2±0.06 ^d |
| | July | 3.8±0.12 ^a | 3.4±0.03 ^b | 3.2±0.01 ^b | 2.9±0.02 ^c |
| | August | 3.6±0.05 ^a | 3.4±0.01 ^b | 3.0±0.03 ^b | 2.4±0.01 ^b |
| | September | 3.4±0.04 ^a | 3.0±0.02 ^a | 2.8±0.01 ^a | 2.2±0.04 ^b |
| | October | 3.6±0.03 ^a | 3.2±0.04 ^a | 2.6±0.02 ^a | 2.0±0.02 ^b |
| | November | 4.8±0.01 ^c | 4.2±0.07 ^c | 3.6±0.03 ^c | 3.1±0.04 ^d |
| | December | 4.4±0.02 ^b | 4.0±0.05 ^c | 3.8±0.05 ^d | 2.4±0.02 ^b |
| Water | June | 5.2±0.05 ^d | 4.6±0.05 ^b | 4.2±0.12 ^d | 4.5±0.03 ^d |
| | July | 4.4±0.08 ^b | 4.4±0.11 ^b | 3.8±0.01 ^c | 3.6±0.02 ^b |
| | August | 4.2±0.10 ^a | 3.8±0.02 ^a | 3.6±0.02 ^b | 3.0±0.04 ^a |
| | September | 4.3±0.06 ^b | 3.7±0.03 ^a | 3.2±0.02 ^a | 2.8±0.01 ^a |
| | October | 4.0±0.04 ^a | 3.8±0.04 ^a | 3.5±0.04 ^b | 3.4±0.03 ^b |
| | November | 4.8±0.08 ^c | 4.6±0.08 ^b | 4.4±0.11 ^d | 4.0±0.04 ^c |
| | December | 5.2±0.12 ^d | 4.7±0.09 ^b | 4.3±0.02 ^d | 4.2±0.05 ^c |

^{a-d}Means with different superscripts within a concentration in the same sample significantly difference at $p < 0.05$.

Table 3-7. Effect of methanol and water extracts from W-song harvested at June~ December on lipid oxidation of oil emulsion containing H₂O₂

| | | TBARS (mg MDA/L) | | | |
|----------|-----------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | | Concentration (μg/mL) | | | |
| | | 100 | 250 | 500 | 1000 |
| Methanol | June | 6.8±0.11 ^c | 5.4±0.04 ^c | 4.2±0.07 ^c | 3.9±0.04 ^c |
| | July | 5.6±0.08 ^b | 4.8±0.02 ^b | 3.6±0.08 ^b | 2.8±0.03 ^b |
| | August | 4.8±0.05 ^a | 3.9±0.05 ^a | 3.2±0.03 ^b | 2.5±0.06 ^a |
| | September | 4.2±0.03 ^a | 3.6±0.06 ^a | 3.0±0.05 ^a | 2.8±0.03 ^b |
| | October | 4.4±0.02 ^a | 3.6±0.05 ^a | 2.8±0.02 ^a | 2.2±0.01 ^a |
| | November | 5.6±0.04 ^b | 4.6±0.04 ^b | 4.2±0.15 ^c | 3.8±0.06 ^c |
| | December | 6.2±0.07 ^c | 5.4±0.03 ^c | 4.8±0.02 ^d | 3.7±0.04 ^c |
| Water | June | 8.2±0.12 ^d | 7.6±0.05 ^d | 7.2±0.12 ^d | 6.6±0.04 ^c |
| | July | 7.4±0.03 ^c | 5.7±0.02 ^b | 5.2±0.03 ^c | 4.6±0.03 ^b |
| | August | 6.2±0.05 ^b | 5.4±0.04 ^b | 4.7±0.02 ^b | 3.4±0.06 ^a |
| | September | 6.4±0.04 ^b | 5.6±0.03 ^b | 4.8±0.02 ^b | 3.7±0.05 ^a |
| | October | 5.9±0.08 ^a | 4.7±0.04 ^a | 4.1±0.04 ^a | 3.9±0.02 ^a |
| | November | 7.2±0.04 ^c | 6.7±0.07 ^c | 5.4±0.06 ^c | 4.8±0.05 ^b |
| | December | 7.8±0.13 ^d | 6.5±0.05 ^c | 5.7±0.05 ^c | 4.7±0.02 ^b |

^{a-d}Means with different superscripts within a concentration in the same sample significantly difference at $p < 0.05$.

(6) 채취시기별 추출물의 지질과산화 저해능

Thiocyanate법에 의한 와송의 항산화 활성을 37℃에서 1일 및 7일동안 저장 한 후 측정된 결과는 Table 3-8, 3-9와 같다. 반응 1일째는 추출물의 첨가 농도가 증가함에 따라 항산화 활성이 유의적으로 증가하는 경향을 보였다(Table 3-8). 8~9월에 채취된 시료에서 100 μg/mL 첨가시 10.3±0.01~14.1±0.05%였는데, 1000 μg/mL 첨가시에는 32.9±0.03~36.3±0.04%였다. 다른 시기에 채취된 시료에 비해 8~9월에 채취된 시료에서 유의적으로 활성이 우수하였다.

Table 3-8. Antioxidant activity of linoleic acid emulsion* in methanol and water extracts from Wa-song harvested at June~December

| | | Scavenging ability (%) | | | |
|----------|-----------|---|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | | Concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | | | |
| | | 100 | 250 | 500 | 1000 |
| Methanol | June | 8.2 \pm 0.03 ^b | 12.5 \pm 0.03 ^a | 18.4 \pm 0.03 ^b | 22.2 \pm 0.02 ^b |
| | July | 12.7 \pm 0.02 ^c | 18.8 \pm 0.05 ^c | 23.2 \pm 0.09 ^c | 28.8 \pm 0.04 ^c |
| | August | 14.1 \pm 0.05 ^d | 22.2 \pm 0.02 ^d | 26.8 \pm 0.10 ^d | 32.9 \pm 0.03 ^d |
| | September | 10.3 \pm 0.01 ^c | 18.0 \pm 0.06 ^c | 24.3 \pm 0.06 ^c | 36.3 \pm 0.04 ^d |
| | October | 14.2 \pm 0.08 ^d | 21.3 \pm 0.06 ^d | 22.0 \pm 0.03 ^b | 24.3 \pm 0.01 ^b |
| | November | 8.9 \pm 0.04 ^b | 12.9 \pm 0.03 ^a | 16.5 \pm 0.01 ^a | 19.6 \pm 0.09 ^a |
| | December | 6.3 \pm 0.04 ^a | 14.2 \pm 0.09 ^b | 21.2 \pm 0.13 ^b | 24.3 \pm 0.02 ^b |
| Water | June | 8.8 \pm 0.03 ^b | 13.3 \pm 0.02 ^b | 16.0 \pm 0.05 ^b | 21.8 \pm 0.03 ^c |
| | July | 10.2 \pm 0.08 ^c | 16.9 \pm 0.05 ^c | 22.8 \pm 0.05 ^d | 24.2 \pm 0.02 ^d |
| | August | 8.3 \pm 0.03 ^b | 12.2 \pm 0.06 ^b | 16.1 \pm 0.02 ^b | 18.4 \pm 0.04 ^b |
| | September | 12.1 \pm 0.07 ^c | 16.3 \pm 0.03 ^c | 18.7 \pm 0.06 ^c | 22.1 \pm 0.03 ^c |
| | October | 12.0 \pm 0.09 ^c | 14.0 \pm 0.02 ^c | 18.8 \pm 0.03 ^c | 21.6 \pm 0.06 ^c |
| | November | 6.6 \pm 0.04 ^a | 8.7 \pm 0.04 ^a | 12.2 \pm 0.06 ^a | 14.7 \pm 0.04 ^a |
| | December | 8.3 \pm 0.02 ^b | 10.5 \pm 0.09 ^b | 12.0 \pm 0.03 ^a | 18.4 \pm 0.02 ^b |

^{a-d}Means with different superscripts within a concentration in the same sample significantly difference at $p < 0.05$.

*Linoleic acid emulsion; mixtures of sample extracts(0.5 mL), linoleic acid emulsion(2 mL) and 0.2M phosphate buffer(pH 7.0, 2 mL) were stored for 1day at 37°C.

반응 7일째에는 6~12월에 채취된 모든 시료에서 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 첨가시 18.4 \pm 0.08~42.3 \pm 0.11%였는데, 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 첨가시에는 42.0 \pm 0.25~ 84.0 \pm 0.35%의 범위로 반응 1일째보다 지질과산화 억제능이 증가된 것으로 나타났다(Table 3-9). 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 첨가시 메탄올추출물은 7~10월에 채취된 와송에서 50%이상의 활성을 보였다. 반면에 물추출물에서는 모든 시료에서 50% 미만의 활성을 보였으나, 7~8월에 채취된 와송이 다른 시기에 채취된 것보다 지질과산화 억제능이 유의적으로 높았다.

Table 3-9. Antioxidant activity of linoleic acid emulsion* in methanol and water extracts from Wa-song harvested at June~December

| | | Scavenging ability (%) | | | |
|----------|-----------|---|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | | Concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | | | |
| | | 100 | 250 | 500 | 1000 |
| Methanol | June | 22.2 \pm 0.06 ^b | 28.5 \pm 0.22 ^b | 32.3 \pm 0.24 ^a | 35.4 \pm 0.17 ^a |
| | July | 34.9 \pm 0.02 ^d | 38.0 \pm 0.19 ^c | 42.0 \pm 0.13 ^b | 53.7 \pm 0.22 ^c |
| | August | 42.3 \pm 0.11 ^e | 52.4 \pm 0.16 ^e | 62.3 \pm 0.38 ^d | 84.0 \pm 0.35 ^e |
| | September | 36.5 \pm 0.24 ^d | 43.3 \pm 0.32 ^d | 52.7 \pm 0.18 ^c | 62.2 \pm 0.21 ^d |
| | October | 28.8 \pm 0.19 ^c | 37.8 \pm 0.08 ^c | 45.4 \pm 0.25 ^b | 59.6 \pm 0.29 ^c |
| | November | 18.4 \pm 0.08 ^a | 24.3 \pm 0.22 ^a | 36.3 \pm 0.34 ^a | 42.0 \pm 0.25 ^b |
| | December | 18.9 \pm 0.23 ^a | 22.0 \pm 0.18 ^a | 36.7 \pm 0.43 ^a | 48.4 \pm 0.19 ^b |
| Water | June | 16.5 \pm 0.09 ^b | 18.4 \pm 0.18 ^b | 22.2 \pm 0.19 ^b | 24.3 \pm 0.12 ^a |
| | July | 22.9 \pm 0.21 ^c | 28.2 \pm 0.24 ^c | 32.3 \pm 0.05 ^c | 42.1 \pm 0.17 ^c |
| | August | 30.2 \pm 0.25 ^d | 34.0 \pm 0.32 ^d | 38.9 \pm 0.24 ^d | 42.3 \pm 0.20 ^c |
| | September | 28.9 \pm 0.13 ^d | 33.2 \pm 0.17 ^d | 36.3 \pm 0.11 ^d | 38.0 \pm 0.13 ^b |
| | October | 24.3 \pm 0.09 ^c | 28.5 \pm 0.29 ^c | 32.0 \pm 0.07 ^c | 38.2 \pm 0.32 ^b |
| | November | 18.0 \pm 0.12 ^b | 22.4 \pm 0.33 ^b | 32.6 \pm 0.04 ^c | 38.3 \pm 0.14 ^b |
| | December | 8.2 \pm 0.19 ^a | 12.5 \pm 0.14 ^a | 18.4 \pm 0.08 ^a | 22.5 \pm 0.26 ^a |

^{a-c}Means with different superscripts within a concentration in the same sample significantly difference at $p < 0.05$.

*Linoleic acid emulsion; mixtures of sample extracts(0.5 mL), linoleic acid emulsion(2 mL) and 0.2M phosphate buffer(pH 7.0, 2 mL) were stored for 7days at 37°C.

(7) 채취시기별 추출물의 아질산염 소거능

와송을 월별(6~12월)로 채취하여 pH 조건을 각각 pH 2.5, 4.2 및 6.0으로 조정하여 아질산염 소거능을 측정한 결과는 Table 3-10 ~ 3-12에 나타내었다.

pH 2.5의 경우 8월~10월에 채취한 메탄올추출물이 100~500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 첨가시 53.9 \pm 0.18~73.5 \pm 0.42%로 아질산염 소거능이 유의적으로 높았다. 반면 물추출물은 100~500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 첨가시 50% 미만의 아질산염 소거능을 보였고, 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서

53.8±0.24~68.2±0.29%로 메탄올추출물과 유사한 소거능을 나타내었다. pH 4.2와 pH 6.0의 경우는 모든 시험구에서 각각 52.2±0.45%과 25.3±0.05% 미만의 낮은 아질산염 소거능을 보였다. 상기의 결과로부터 메탄올과 물추출물의 아질산염 소거능은 pH 2.5에서 가장 우수하였으며, 물추출물 보다는 메탄올추출물에서 아질산염 소거능이 더욱 우수한 것으로 나타났다.

Table 3-10. Nitrite scavenging ability of methanol and water extracts from Wa-song harvested at June~December in reaction system of pH 2.5

| | | Scavenging ability (%) | | | |
|----------|-----------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| | | Concentration (µg/mL) | | | |
| | | 100 | 250 | 500 | 1000 |
| Methanol | June | 8.6±0.12 ^a | 12.3±0.11 ^a | 33.4±0.17 ^b | 45.3±0.11 ^b |
| | July | 11.0±0.25 ^a | 15.6±0.14 ^a | 22.8±0.16 ^a | 38.7±0.17 ^a |
| | August | 53.9±0.18 ^d | 61.4±0.33 ^d | 73.5±0.42 ^c | 75.4±0.13 ^d |
| | September | 60.2±0.22 ^e | 64.2±0.22 ^d | 68.3±0.22 ^c | 72.8±0.05 ^d |
| | October | 63.9±0.20 ^f | 68.4±0.15 ^e | 70.2±1.18 ^c | 75.3±0.14 ^d |
| | November | 23.5±0.45 ^c | 34.7±0.16 ^c | 41.0±0.20 ^b | 52.4±0.16 ^c |
| | December | 18.7±0.22 ^b | 23.6±0.25 ^b | 36.4±0.17 ^b | 43.2±0.18 ^b |
| Water | June | 8.9±0.11 ^b | 13.3±0.14 ^a | 24.5±0.20 ^a | 32.1±0.19 ^a |
| | July | 7.8±0.18 ^a | 12.7±0.25 ^a | 22.7±0.14 ^a | 32.3±0.20 ^a |
| | August | 40.2±0.25 ^g | 45.2±0.17 ^e | 49.6±0.16 ^d | 53.8±0.24 ^c |
| | September | 27.6±0.13 ^e | 33.4±0.43 ^d | 41.6±0.27 ^c | 56.5±0.30 ^c |
| | October | 32.3±0.24 ^f | 44.4±0.16 ^e | 53.6±0.17 ^e | 68.2±0.29 ^d |
| | November | 13.4±0.19 ^c | 16.4±0.18 ^b | 24.5±0.08 ^a | 32.7±0.04 ^a |
| | December | 16.7±0.23 ^d | 21.0±0.42 ^c | 29.7±0.07 ^b | 37.4±0.23 ^b |

^{a-g}Means with different superscripts within a concentration in the same sample significantly difference at $p < 0.05$.

Table 3-11. Nitrite scavenging ability of methanol and water extracts from Wa-song harvested at June~December in reaction system of pH 4.2

| | | Scavenging ability (%) | | | |
|----------|-----------|------------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | | Concentration ($\mu\text{g/mL}$) | | | |
| | | 100 | 250 | 500 | 1000 |
| Methanol | June | 0.7 \pm 0.08 ^a | 3.4 \pm 0.06 ^a | 8.1 \pm 0.03 ^a | 18.3 \pm 0.16 ^a |
| | July | 10.2 \pm 0.10 ^b | 18.7 \pm 0.14 ^c | 20.2 \pm 0.04 ^b | 22.5 \pm 0.24 ^b |
| | August | 22.7 \pm 0.16 ^c | 31.1 \pm 0.09 ^f | 43.7 \pm 0.33 ^e | 46.2 \pm 0.33 ^d |
| | September | 22.5 \pm 0.18 ^c | 28.7 \pm 0.17 ^f | 33.6 \pm 0.29 ^d | 52.2 \pm 0.45 ^e |
| | October | 18.4 \pm 0.19 ^c | 22.5 \pm 0.16 ^e | 33.4 \pm 0.21 ^d | 44.3 \pm 0.39 ^d |
| | November | 7.8 \pm 0.09 ^b | 18.6 \pm 0.28 ^d | 25.4 \pm 0.19 ^c | 30.2 \pm 0.27 ^c |
| | December | 9.5 \pm 0.21 ^b | 14.7 \pm 0.07 ^b | 18.3 \pm 0.17 ^b | 21.5 \pm 0.16 ^b |
| Water | June | 0.9 \pm 0.04 ^a | 4.2 \pm 0.09 ^a | 9.9 \pm 0.06 ^a | 15.7 \pm 0.13 ^a |
| | July | 8.8 \pm 0.06 ^d | 11.7 \pm 0.13 ^c | 22.2 \pm 0.17 ^c | 26.6 \pm 0.17 ^c |
| | August | 16.9 \pm 0.12 ^f | 21.8 \pm 0.11 ^e | 26.4 \pm 0.18 ^c | 30.2 \pm 0.29 ^d |
| | September | 18.4 \pm 0.07 ^f | 25.4 \pm 0.16 ^e | 33.2 \pm 0.31 ^d | 42.5 \pm 0.38 ^e |
| | October | 11.3 \pm 0.05 ^e | 17.5 \pm 0.07 ^d | 28.3 \pm 0.19 ^c | 32.2 \pm 0.16 ^d |
| | November | 6.9 \pm 0.13 ^c | 9.7 \pm 0.06 ^c | 12.3 \pm 0.10 ^b | 15.4 \pm 0.09 ^a |
| | December | 4.2 \pm 0.12 ^b | 7.5 \pm 0.07 ^b | 11.8 \pm 0.18 ^b | 20.2 \pm 0.16 ^b |

^{a-f}Means with different superscripts within a concentration in the same sample significantly difference at $p < 0.05$.

Table 3-12. Nitrite scavenging ability of methanol and water extracts from Wa-song harvested at June~December in reaction system of pH 6.0

| | | Scavenging ability (%) | | | |
|----------|-----------|---|------------------|-------------------|-------------------|
| | | Concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | | | |
| | | 100 | 250 | 500 | 1000 |
| Methanol | June | 1.3 ± 0.13^a | 3.7 ± 0.09^a | 5.6 ± 0.01^a | 8.7 ± 0.03^a |
| | July | 0.7 ± 0.06^a | 4.5 ± 0.01^b | 8.3 ± 0.06^b | 14.7 ± 0.09^c |
| | August | 7.7 ± 0.09^f | 8.9 ± 0.12^f | 11.5 ± 0.04^c | 16.2 ± 0.04^d |
| | September | 6.9 ± 0.16^e | 8.6 ± 0.03^f | 11.3 ± 0.02^c | 20.2 ± 0.08^f |
| | October | 5.3 ± 0.18^d | 7.4 ± 0.05^e | 14.2 ± 0.08^d | 25.3 ± 0.05^g |
| | November | 2.0 ± 0.06^b | 5.4 ± 0.11^c | 10.4 ± 0.16^c | 18.4 ± 0.10^e |
| | December | 3.2 ± 0.09^c | 6.6 ± 0.05^d | 8.0 ± 0.05^b | 10.5 ± 0.06^b |
| Water | June | 1.3 ± 0.06^b | 4.3 ± 0.06^b | 5.5 ± 0.03^a | 6.4 ± 0.08^a |
| | July | 0.9 ± 0.02^a | 3.1 ± 0.08^a | 5.3 ± 0.04^a | 6.9 ± 0.04^a |
| | August | 3.6 ± 0.08^e | 4.2 ± 0.10^b | 6.2 ± 0.09^b | 7.3 ± 0.08^b |
| | September | 2.8 ± 0.06^d | 5.3 ± 0.06^d | 7.9 ± 0.11^d | 10.2 ± 0.06^c |
| | October | 4.6 ± 0.10^f | 8.3 ± 0.04^e | 12.5 ± 0.06^e | 15.3 ± 0.07^d |
| | November | 2.7 ± 0.09^d | 3.3 ± 0.05^a | 7.3 ± 0.08^c | 8.9 ± 0.06^c |
| | December | 2.2 ± 0.07^b | 5.4 ± 0.13^c | 7.3 ± 0.09^c | 8.6 ± 0.04^c |

^{a-g}Means with different superscripts within a concentration in the same sample significantly difference at $p < 0.05$.

나. 용매별 추출물의 항산화 활성

(1) 용매별 추출물의 총 페놀 화합물과 플라보노이드 함량

와송을 이용하여 용매를 달리하여(헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올 및 물) 순차 분획하여 각 분획물의 총 페놀 및 플라보노이드 함량을 측정한 결과 Table 3-13 과 같다. 총 페놀 화합물은 클로로포름획분에서 $2,003.3 \pm 0.6 \text{ mg}/100 \text{ g}$ 으로 가장 높았고 다음으로 에틸아세테이트분획($1,315.2 \pm 0.9 \text{ mg}/100 \text{ g}$)이었다. 플라보노이드의 함량은 클로로포름획분에서 $624.2 \pm 0.7 \text{ mg}/100 \text{ g}$ 으로 가장 높았고, 다음으로 헥산획분(99.8 ± 0.8

mg/100 g)이었다. 모든 획분에서 총 페놀의 함량이 플라보노이드 함량보다 월등히 높게 정량되었다.

Table 3-13. Total phenol and flavonoid contents of different solvent extracts from Wa-song

| | Phenol contents | Flavonoid contents |
|---------------|--------------------------|------------------------|
| Hexane | 721.7±0.7 ^c | 99.8±0.8 ^d |
| Chloroform | 2,003.3±0.6 ^e | 624.2±0.7 ^e |
| Ethyl acetate | 1,315.2±0.9 ^d | 88.9±0.6 ^c |
| Butanol | 523.1±0.9 ^b | 10.1±0.1 ^b |
| Water | 28.6±0.3 ^a | 3.4±0.1 ^a |

^{a-c}Means with different superscripts within a concentration in the same sample significantly difference at $p < 0.05$.

(2) 용매별 추출물의 DPPH 라디칼 소거능

모든 용매 분획물에서 시료의 농도가 많아짐에 따라 DPPH 라디칼 소거능이 유의적으로 증가하였다(Table 3-14). 100 µg/mL 첨가시 클로로포름획분에서 54.4±1.23%로 가장 높았는데, 이는 BHT, 토코페롤 및 아스코르브산의 활성보다 뛰어난 활성이었다. 1000 µg/mL 첨가시에는 클로로포름획분에서 82.4±1.12%로 유의적으로 우수하였는데, 이는 아스코르브산의 활성과 유의차가 적었으며, BHT 및 토코페롤보다는 활성이 유의적으로 높았다.

(3) 용매별 추출물의 환원력

hexanefraction을 제외한 모든 시료에서 농도가 증가함에 따라 환원력이 큰 폭으로 증가하는 경향을 보였다(Table 3-15). 특히 1000 µg/mL 첨가시에서는 클로로포름획분의 환원력이 2.21±0.021로 가장 높았으며, 다음으로 에틸아세테이트(1.86±0.022), 물획분(1.23±0.020), 부탄올획분(1.12±0.028)의 순서였다. 클로로포름획분은 토코페롤(2.23±0.021)과 유사한 활성이었으나, BHT 및 아스코르브산보다는 활성이 다소 낮았다.

그 외의 획분에서는 positive control보다 환원력이 낮았다.

Table 3-14. DPPH radical scavenging ability of different solvent extracts from W-song

| | Scavenging ability (%) | | | |
|---------------|---|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | Concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | | | |
| | 100 | 250 | 500 | 1000 |
| Hexane | 8.2 \pm 0.14 ^a | 10.5 \pm 0.16 ^a | 13.1 \pm 0.12 ^a | 15.8 \pm 0.14 ^a |
| Chloroform | 54.4 \pm 1.23 ^e | 64.1 \pm 1.53 ^d | 73.4 \pm 0.08 ^e | 82.4 \pm 1.12 ^e |
| Ethyl acetate | 47.6 \pm 0.17 ^d | 49.5 \pm 1.20 ^c | 52.6 \pm 0.10 ^c | 55.5 \pm 0.38 ^b |
| Butanol | 36.4 \pm 0.11 ^c | 56.3 \pm 0.15 ^c | 64.0 \pm 0.22 ^d | 68.7 \pm 0.12 ^c |
| Water | 18.9 \pm 0.06 ^b | 24.1 \pm 0.19 ^b | 33.6 \pm 0.17 ^b | 54.2 \pm 1.10 ^b |
| Ascorbic acid | 52.6 \pm 1.12 ^e | 68.6 \pm 0.22 ^d | 71.5 \pm 0.13 ^e | 85.9 \pm 1.56 ^e |
| BHT | 45.0 \pm 0.13 ^d | 52.6 \pm 0.10 ^c | 61.5 \pm 1.25 ^d | 75.9 \pm 0.54 ^c |
| Tocopherol | 43.2 \pm 0.10 ^d | 53.6 \pm 0.14 ^c | 63.5 \pm 1.12 ^d | 78.7 \pm 0.16 ^c |

^{a-g}Means with different superscripts within a concentration in the same sample significantly difference at $p < 0.05$.

Table 3-15. Reducing power of different solvent extracts from Wa-song

| | 700 nm (O.D.) | | | |
|---------------|---|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | Concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | | | |
| | 100 | 250 | 500 | 1000 |
| Hexane | 0.12 \pm 0.010 ^a | 0.18 \pm 0.018 ^a | 0.28 \pm 0.010 ^a | 0.62 \pm 0.018 ^a |
| Chloroform | 0.78 \pm 0.021 ^f | 1.44 \pm 0.021 ^g | 1.52 \pm 0.034 ^g | 2.21 \pm 0.021 ^e |
| Ethyl acetate | 0.52 \pm 0.015 ^e | 0.86 \pm 0.011 ^e | 1.18 \pm 0.015 ^d | 1.86 \pm 0.022 ^d |
| Butanol | 0.43 \pm 0.012 ^d | 0.68 \pm 0.025 ^d | 0.88 \pm 0.021 ^c | 1.12 \pm 0.028 ^b |
| Water | 0.34 \pm 0.018 ^b | 0.52 \pm 0.018 ^b | 0.98 \pm 0.018 ^b | 1.23 \pm 0.020 ^c |
| Ascorbic acid | 0.98 \pm 0.025 ^g | 1.93 \pm 0.034 ^h | 2.40 \pm 0.012 ^h | 2.56 \pm 0.032 ^f |
| BHT | 0.32 \pm 0.021 ^c | 0.41 \pm 0.015 ^c | 1.46 \pm 0.028 ^f | 2.91 \pm 0.035 ^g |
| Tocopherol | 0.52 \pm 0.027 ^e | 0.96 \pm 0.018 ^f | 1.30 \pm 0.016 ^e | 2.23 \pm 0.021 ^e |

^{a-h}Means with different superscripts within a concentration in the same sample significantly difference at $p < 0.05$.

(4) 용매별 추출물의 hydroxyl radical 소거능

와송의 용매별 추출물의 hydroxyl radical 소거능은 Table 3-16과 같다. 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 클로로포름과 에틸아세테이트획분은 $46.5 \pm 0.26 \sim 52.3 \pm 0.28\%$ 로 tocopherol ($42.5 \pm 0.24\%$)보다 높은 hydroxyl radical 소거능을 보였으나, 아스코르브산 및 BHT보다는 낮았다. 1000 $\mu\text{g/mL}$ 에서도 마찬가지로 클로로포름획분의 hydroxyl radical 소거능이 $71.7 \pm 0.44\%$ 로 여타 용매분획물보다 유의적으로 높았다. 다음으로 에틸아세테이트 및 물획분은 각각 $58.9 \pm 0.32\%$, $55.7 \pm 0.18\%$ 로 유의차가 적었다.

Table 3-16. The scavenging of hydroxyl radical in different solvent extracts from Wa-song

| | Scavenging ability (%) | | | |
|---------------|------------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | Concentration ($\mu\text{g/mL}$) | | | |
| | 100 | 250 | 500 | 1000 |
| Hexane | 15.4 ± 0.25^a | 19.6 ± 0.08^a | 25.3 ± 0.19^a | 29.9 ± 0.15^a |
| Chloroform | 52.3 ± 0.28^f | 60.2 ± 0.38^d | 65.3 ± 0.28^d | 71.1 ± 0.44^d |
| Ethyl acetate | 46.5 ± 0.26^e | 52.3 ± 0.34^c | 56.2 ± 0.17^c | 58.9 ± 0.32^c |
| Butanol | 38.5 ± 0.18^c | 42.3 ± 0.13^b | 47.4 ± 0.11^b | 49.9 ± 0.23^b |
| Water | 32.7 ± 0.22^b | 46.5 ± 0.16^b | 52.3 ± 0.09^c | 55.7 ± 0.18^c |
| Ascorbic acid | 59.3 ± 0.32^g | 61.1 ± 0.29^d | 69.4 ± 0.21^e | 72.8 ± 0.15^d |
| BHT | 62.3 ± 0.35^h | 69.9 ± 0.43^e | 71.2 ± 0.38^e | 82.1 ± 0.36^e |
| Tocopherol | 42.5 ± 0.24^d | 57.7 ± 0.21^d | 61.2 ± 0.13^d | 68.3 ± 0.29^d |

^{a-g}Means with different superscripts within a concentration in the same sample significantly difference at $p < 0.05$.

(5) 용매별 추출물의 SOD 유사활성

Superoxide의 산화 억제작용을 알아보기 위하여 superoxide와 반응하여 갈변물질을 생성하는 pyrogallol 자동산화율 측정한 결과는 Table 3-17과 같다. 클로로포름획분

(500 $\mu\text{g}/\text{mL}$)은 $38.1\pm 0.11\%$ 로 tocopherol보다 높았고, 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 첨가시에는 positive control이 50% 이상의 SOD 유사활성을 보였는데, 와송의 용매별 추출물은 $24.1\pm 0.11\sim 39.2\pm 0.27\%$ 의 범위였다. 그러나 클로로포름획분은 여타 획분에 비해 유의적으로 높은 활성을 보였다.

Table 3-17. SOD-like activity of different solvent extracts from Wa-song
Scavenging ability (%)

| | Concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | | | |
|---------------|---|------------------|------------------|------------------|
| | 100 | 250 | 500 | 1000 |
| Hexane | 9.8 ± 0.06^a | 11.1 ± 0.05^a | 15.9 ± 0.22^a | 24.1 ± 0.11^a |
| Chloroform | 22.3 ± 0.20^b | 34.6 ± 0.22^c | 38.1 ± 0.11^d | 39.2 ± 0.27^c |
| Ethyl acetate | 27.8 ± 0.19^c | 29.9 ± 0.18^b | 32.2 ± 0.14^c | 34.2 ± 0.20^b |
| Butanol | 24.3 ± 0.17^b | 26.4 ± 0.05^b | 27.1 ± 0.09^b | 28.4 ± 0.19^a |
| Water | 35.0 ± 0.25^d | 34.2 ± 0.19^c | 34.6 ± 0.24^c | 35.8 ± 0.15^b |
| Ascorbic acid | 31.5 ± 0.14^d | 38.9 ± 0.13^d | 49.9 ± 0.19^e | 51.1 ± 0.10^d |
| BHT | 34.7 ± 0.12^d | 46.3 ± 0.21^e | 52.6 ± 0.17^f | 60.5 ± 0.35^f |
| Tocopherol | 28.8 ± 0.09^c | 31.1 ± 0.12^c | 34.8 ± 0.10^c | 56.7 ± 0.16^e |

^{a-f}Means with different superscripts within a concentration in the same sample significantly difference at $p < 0.05$.

(6) 용매별 추출물의 TBARS 함량

Oil emulsion을 기질로 하여 활성 산소종(FeCl_2 , CuSO_4 및 H_2O_2)과 와송 용매별 추출물을 첨가한 후 생성된 MDA의 함량을 대조구(ascorbic acid, BHT, tocopherol)와 비교 실험한 결과는 Table 3-18 ~ 3-20과 같다.

FeCl_2 가 지질산화에 미치는 정도는 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 모든 획분에서 ascorbic acid와 BHT보다는 낮았으나, 클로로포름 및 에틸아세테이트획분에서는 각각 2.64 ± 0.22 mg MDA/L 및 2.96 ± 0.13 mg MDA/L로 높은 활성을 보였고, 그 외의 획분에서는 비교적 활성이 낮은편이었다.

CuSO_4 가 첨가된 반응계에서 TBARS 함량을 MDA로 나타낸 결과는 Table 3-19와 같

다. 와송 용매별 추출물과 Cu^{2+} 와의 결합능은 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도일 때 클로로포름획분에서 3.02 ± 0.37 mg MDA/L로 시료 획분 중 가장 낮은 값을 보여 positive control보다 활성이 우수한 것으로 보였다. 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 첨가시에는 클로로포름 및 에틸아세테이트 획분이 각각 2.66 ± 0.10 mg MDA/L, 2.69 ± 0.08 mg MDA/L 유의적으로 높은 활성을 보였으며, 다음으로 부탄올획분에서 2.88 ± 0.14 mg MDA/L였다.

H_2O_2 가 첨가된 반응계에서 TBARS 함량을 MDA 값으로 나타낸 결과는 Table 3-20과 같다. H_2O_2 첨가시에도 시료의 첨가량이 많아짐에 따라 MDA의 생성량이 감소되는 것으로 나타났으나, FeCl_2 , CuSO_4 가 첨가된 반응계의 MDA 값보다는 높은 경향이 있었다. 즉 100~250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 첨가시에는 모든 획분에서 positive control보다 MDA의 생성량이 높았는데, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 첨가시에는 클로로포름획분이 BHT와 유사한 값을 보였고, 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 첨가시에는 클로로포름획분이 2.98 ± 0.06 mg MDA/L로 가장 낮은 값을 보여 활성이 높음을 알 수 있었다.

Table 3-18. Effect of different solvent extracts from Wa-song on lipid oxidation of oil emulsion containing FeCl_2

| | TBARS (mg MDA/L) | | | |
|---------------|---|------------------|------------------|------------------|
| | Concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | | | |
| | 100 | 250 | 500 | 1000 |
| Hexane | 5.29 ± 0.08^d | 4.78 ± 0.32^d | 4.63 ± 0.24^d | 4.48 ± 0.11^d |
| Chloroform | 2.64 ± 0.22^b | 2.55 ± 0.21^b | 2.34 ± 0.43^b | 1.99 ± 0.06^b |
| Ethyl acetate | 2.96 ± 0.13^b | 2.75 ± 0.18^b | 2.73 ± 0.15^b | 2.41 ± 0.16^c |
| Butanol | 3.72 ± 0.17^c | 3.65 ± 0.19^c | 3.59 ± 0.30^c | 2.49 ± 0.43^c |
| Water | 3.63 ± 0.09^c | 3.51 ± 0.08^c | 3.39 ± 0.67^c | 3.19 ± 0.09^d |
| Ascorbic acid | 1.33 ± 0.24^a | 1.26 ± 0.32^a | 0.93 ± 0.17^a | 0.85 ± 0.75^a |
| BHT | 1.79 ± 0.30^a | 1.13 ± 0.75^a | 1.10 ± 0.22^a | 0.82 ± 0.64^a |
| Tocopherol | 2.88 ± 0.17^b | 2.58 ± 0.22^b | 2.14 ± 0.16^b | 1.95 ± 0.25^b |

^{a-d}Means with different superscripts within a concentration in the same sample significantly difference at $p < 0.05$.

Table 3-19. Effect of different solvent extracts from Wa-song on lipid oxidation of oil emulsion containing CuSO₄

| | TBARS (mg MDA/L) | | | |
|---------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| | Concentration (µg/mL) | | | |
| | 100 | 250 | 500 | 1000 |
| Hexane | 6.55±0.21 ^d | 5.28±0.16 ^c | 4.72±0.07 ^d | 4.54±0.02 ^d |
| Chloroform | 3.02±0.37 ^a | 2.93±0.13 ^a | 2.85±0.10 ^b | 2.66±0.10 ^b |
| Ethyl acetate | 3.32±0.23 ^b | 3.11±0.05 ^b | 2.92±0.08 ^b | 2.69±0.08 ^b |
| Butanol | 3.28±0.10 ^b | 3.25±0.20 ^b | 3.12±0.13 ^b | 2.88±0.14 ^c |
| Water | 3.87±0.08 ^b | 3.68±0.18 ^b | 3.42±0.05 ^c | 3.07±0.10 ^c |
| Ascorbic acid | 2.98±0.06 ^a | 2.64±0.06 ^a | 2.54±0.08 ^a | 2.12±0.08 ^a |
| BHT | 3.48±0.22 ^b | 3.20±0.12 ^b | 3.06±0.05 ^b | 2.52±0.06 ^b |
| Tocopherol | 4.76±0.14 ^c | 3.42±0.15 ^b | 3.21±0.03 | 3.01±0.02 ^c |

^{a-d}Means with different superscripts within a concentration in the same sample significantly difference at $p < 0.05$.

Table 3-20. Effect of different solvent extracts from Wa-song on lipid oxidation of oil emulsion containing H₂O₂

| | TBARS (mg MDA/L) | | | |
|---------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| | Concentration (µg/mL) | | | |
| | 100 | 250 | 500 | 1000 |
| Hexane | 8.19±0.27 ^f | 7.99±0.24 ^e | 7.26±0.25 ^f | 6.57±0.32 ^d |
| Chloroform | 4.61±0.24 ^c | 4.21±0.10 ^c | 3.33±0.11 ^c | 2.98±0.06 ^b |
| Ethyl acetate | 6.24±0.15 ^e | 5.94±0.08 ^d | 4.93±0.22 ^d | 4.22±0.15 ^c |
| Butanol | 5.83±0.11 ^d | 5.46±0.13 ^d | 5.44±0.04 ^e | 4.41±0.11 ^c |
| Water | 6.09±0.08 ^d | 5.73±0.05 ^d | 5.12±0.12 ^e | 4.45±0.21 ^c |
| Ascorbic acid | 3.62±0.22 ^b | 3.26±0.17 ^b | 2.96±0.08 ^b | 2.63±0.09 ^a |
| BHT | 3.74±0.03 ^b | 3.63±0.24 ^b | 3.29±0.03 ^c | 3.06±0.10 ^c |
| Tocopherol | 2.98±0.18 ^a | 2.61±0.10 ^a | 2.43±0.02 ^a | 2.38±0.21 ^a |

^{a-h}Means with different superscripts within a concentration in the same sample significantly difference at $p < 0.05$.

(7) 용매별 추출물의 지질과산화 저해능

Linoleic acid emulsion에 용매별 추출물을 첨가하여 37°C에서 저장기간에 따른 항산화능을 측정한 결과는 Table 3-21, 3-22에 나타내었다. 반응 1일째 100 µg/mL의 농도에서 positive control(19.8±0.21~127.6±0.07%)와 비교해 볼 때 시료 획분의 지질과산화 저해능은 3.8±0.08~12.5±0.05%의 범위로 낮은 활성이었으나, 1000 µg/mL의 농도로 증가시킴에 따라 클로로포름, 에틸아세테이트 및 물획분에서 지질과산화 저해능이 두드러지게 상승하였다.

반응 7일째에서도 positive control보다는 모든 획분에서 낮은 활성을 보였으나, 100 µg/mL의 클로로포름 및 부탄올획분 첨가시 각각 27.3±0.25%, 26.6±0.24%로 여타 획분과 비교해 볼때 유의적으로 높은 활성을 보였다. 1000 µg/mL 첨가시에는 모든 획분에서 19.3±0.11~57.6±1.24%였는데, 클로로포름획분에서 유의적으로 가장 높았다. 다음으로 에틸아세테이트, 부탄올 및 물획분이었는데, 이들 3종의 획분간에는 유의차가 없었

다.

Table 3-21. Antioxidant activity of linoleic acid emulsion in different solvent extracts from Wa-song during storage for 1 day at 37°C

| | Concentration ($\mu\text{g/mL}$) | | | |
|---------------|------------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | 100 | 250 | 500 | 1000 |
| Hexane | 3.8 \pm 0.08 ^a | 6.8 \pm 0.05 ^a | 9.1 \pm 0.08 ^a | 11.3 \pm 0.18 ^a |
| Chloroform | 8.2 \pm 0.12 ^c | 15.4 \pm 0.10 ^c | 19.5 \pm 0.05 ^c | 25.2 \pm 0.22 ^b |
| Ethyl acetate | 12.5 \pm 0.05 ^d | 15.0 \pm 0.08 ^c | 17.4 \pm 0.10 ^c | 20.9 \pm 0.15 ^b |
| Butanol | 6.9 \pm 0.01 ^b | 9.7 \pm 0.08 ^b | 13.7 \pm 0.09 ^b | 14.3 \pm 0.17 ^a |
| Water | 11.6 \pm 0.09 ^d | 14.5 \pm 0.04 ^c | 18.9 \pm 0.08 ^c | 20.8 \pm 0.11 ^b |
| Ascorbic acid | 19.8 \pm 0.21 ^e | 21.5 \pm 0.11 ^d | 33.0 \pm 0.67 ^e | 41.3 \pm 0.22 ^d |
| BHT | 27.6 \pm 0.07 ^g | 32.3 \pm 0.22 ^e | 34.6 \pm 1.07 ^f | 48.2 \pm 1.21 ^d |
| Tocopherol | 18.9 \pm 0.11 ^f | 25.7 \pm 0.14 ^d | 28.9 \pm 0.89 ^d | 38.6 \pm 0.76 ^c |

^{a-g}Means with different superscripts within a concentration in the same sample significantly difference at $p < 0.05$.

Table 3-22. Antioxidant activity of linoleic acid emulsion* in different solvent extracts from Wa-song during storage for 7 days at 37°C

| | Scavenging ability (%) | | | |
|---------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| | Concentration (µg/mL) | | | |
| | 100 | 250 | 500 | 1000 |
| Hexane | 8.5±0.04 ^a | 10.7±0.12 ^a | 13.4±0.14 ^a | 19.3±0.11 ^a |
| Chloroform | 27.3±0.25 ^c | 39.7±1.18 ^d | 41.1±0.11 ^d | 57.6±1.24 ^c |
| Ethyl acetate | 12.5±0.11 ^b | 17.0±0.17 ^b | 24.0±0.09 ^b | 37.3±0.13 ^b |
| Butanol | 26.6±0.24 ^c | 29.0±0.15 ^c | 34.1±1.21 ^c | 39.7±0.18 ^b |
| Water | 12.3±0.16 ^b | 17.8±0.05 ^b | 33.9±0.27 ^c | 36.6±0.20 ^b |
| Ascorbic acid | 38.7±0.34 ^d | 46.9±0.19 ^e | 56.9±1.01 ^e | 65.3±1.09 ^d |
| BHT | 42.1±0.27 ^d | 57.3±0.14 ^f | 60.5±1.34 ^f | 75.2±1.32 ^e |
| Tocopherol | 39.5±0.31 ^d | 49.6±0.22 ^e | 56.8±0.98 ^e | 58.3±1.28 ^c |

^{a-f}Means with different superscripts within a concentration in the same sample significantly difference at $p < 0.05$.

(8) 용매별 추출물의 아질산염 소거능

와송의 용매별 추출물을 다양한 반응계(pH 2.5, 4.2 및 6.0)로부터 아질산염 소거능을 측정한 결과는 Table 3-23 ~ 3-25와 같다. pH 2.5의 반응계의 경우 시료이 첨가량이 증가할수록 아질산염 소거능은 상승되었으며, 100 µg/mL 첨가시 아질산염 소거능은 모든 획분에서 21.9±0.53~74.8±1.33%의 범위였으며, 클로로포름획분에서 유의적으로 소거능이 가장 높았다. 250 µg/mL의 농도에서는 클로로포름과 에틸아세테이트획분이 85.9±1.04%와 69.7±0.52%의 높은 아질산염 소거능을 보였으며, 1000 µg/mL 농도에서는 클로로포름획분이 93.3±1.46%의 유의적인 차이로 높은 아질산염 소거능이 있었으며, 다음으로 에틸아세테이트, 부탄올, 물 및 헥산분획물의 순이었다.

pH 4.2의 반응계에서도 농도가 증가함에 따라 아질산염 소거능이 상승하였으나, pH 2.5의 반응계보다는 대체로 낮았다. 클로로포름획분은 100 µg/mL 첨가시 52.8±0.30%

의 소거능이었는데, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 첨가시에는 $80.3\pm 0.24\%$ 의 소거능으로 여타 시료에 비해 유의적으로 우수하였다. 다음으로 에틸아세테이트> 부탄올> 헥산> 물획분의 순서였다. 아질산염의 소거는 아질산염이 환원성 물질에 의하여 nitric oxide로 전환되기 때문인데 시료의 아질산염 소거능이 상이한 것은 환원성 물질의 환원력 차이에 기인하는 것이라는 보고가 있다(Shin JH. et al 2002). 본 실험의 결과도 상기의 보고와 일치하는 것으로 추정된다.

반면, pH 6.0에서는 모든 시료 획분에서 아질산염 소거능이 40% 미만으로 나타나 반응계의 pH가 알칼리화되어질수록 아질산염 소거능은 감소되는 것을 알 수 있었다. 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 첨가시 클로로포름획분은 $13.1\pm 0.13\%$ 의 소거능을 보였는데, 그 외의 획분에서는 10% 미만이었다. 또한 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 첨가시에는 클로로포름 획분이 $39.6\pm 0.12\%$ 로 유의적으로 소거능이 가장 높았다. 이러한 결과는 pH 2.5 및 4.2의 반응계의 결과와 유사하였다. 아질산염은 제 2급 및 3급 아민 등의 아민류와 반응하여 강력한 발암물질인 N-nitrosamine을 생성하며, 이러한 반응은 산성 pH 조건에서는 쉽게 일어나지만, 알칼리성 pH의 조건에서는 반응이 약하며, 아질산염의 소거능도 산성 pH 조건에서 효과적인 것으로 보고되어 있다(Peter FS. 1975).

Table 3-23. Nitrite scavenging ability of different solvent extracts from Wa-song in reaction system of pH 2.5

| | Scavenging ability (%) | | | |
|---------------|---|------------------|------------------|------------------|
| | Concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | | | |
| | 100 | 250 | 500 | 1000 |
| Hexane | 22.5 ± 0.61^a | 32.4 ± 0.51^a | 39.2 ± 0.73^a | 27.7 ± 0.18^a |
| Chloroform | 74.8 ± 1.33^d | 85.9 ± 1.04^d | 91.6 ± 1.02^d | 93.3 ± 1.46^e |
| Ethyl acetate | 59.4 ± 1.02^c | 69.7 ± 0.52^c | 79.8 ± 1.30^c | 75.2 ± 1.08^d |
| Butanol | 33.7 ± 0.64^b | 43.0 ± 0.61^b | 52.5 ± 0.72^b | 53.3 ± 0.25^c |
| Water | 21.9 ± 0.53^a | 31.2 ± 1.14^a | 37.4 ± 0.62^a | 49.5 ± 0.16^b |

^{a-c}Means with different superscripts within a concentration in the same sample significantly difference at $p < 0.05$.

Table 3-24. Nitrite scavenging ability of different solvent extracts from Wa-song in reaction system of pH 4.2

| | Scavenging ability (%) | | | |
|---------------|---|-------------------|-------------------|-------------------|
| | Concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | | | |
| | 100 | 250 | 500 | 1000 |
| Hexane | 7.6 ± 0.24^a | 12.3 ± 0.52^a | 16.0 ± 0.61^a | 18.1 ± 0.13^a |
| Chloroform | 52.8 ± 0.30^e | 62.6 ± 1.22^d | 78.9 ± 0.82^d | 80.3 ± 0.24^d |
| Ethyl acetate | 34.3 ± 0.21^d | 42.4 ± 0.84^c | 51.6 ± 0.62^c | 54.0 ± 0.43^c |
| Butanol | 11.8 ± 0.61^c | 29.1 ± 0.33^b | 33.5 ± 0.70^b | 35.6 ± 0.29^b |
| Water | 8.3 ± 0.31^b | 12.0 ± 0.52^a | 15.9 ± 0.41^a | 19.2 ± 0.24^a |

^{a-e}Means with different superscripts within a concentration in the same sample significantly difference at $p < 0.05$.

Table 3-25. Nitrite scavenging ability of different solvent extracts from Wa-song in reaction system of pH 6.0

| | Scavenging ability (%) | | | |
|---------------|---|-------------------|-------------------|-------------------|
| | Concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | | | |
| | 100 | 250 | 500 | 1000 |
| Hexane | 3.4 ± 0.42^a | 4.7 ± 0.10^a | 6.4 ± 0.42^a | 7.0 ± 0.09^a |
| Chloroform | 13.1 ± 0.13^e | 22.1 ± 0.52^e | 35.4 ± 0.52^e | 39.6 ± 0.12^d |
| Ethyl acetate | 4.8 ± 0.10^c | 9.3 ± 0.22^d | 12.7 ± 0.10^d | 27.2 ± 0.08^e |
| Butanol | 6.5 ± 0.11^d | 8.5 ± 0.13^c | 9.8 ± 0.11^c | 35.6 ± 0.15^c |
| Water | 4.2 ± 0.14^b | 5.7 ± 0.10^b | 7.5 ± 0.12^b | 19.2 ± 0.10^b |

^{a-e}Means with different superscripts within a concentration in the same sample significantly difference at $p < 0.05$.

다. 처리조건별 와송 추출물의 항산화 활성

(1) 총 페놀 화합물과 플라보노이드 함량

와송의 건조방법을 달리하여 물 및 에탄올 추출한 후 총 페놀 화합물과 플라보노이드 함량을 측정한 결과는 Table 3-26에 나타난 바와 같이 열풍건조한 와송의 에탄올추출물에서 각각 1,210.3±1.70 mg/100 g과 989.1±1.27 mg/100 g으로 월등히 높은 함량을 나타내었으며, 다음으로 동결건조한 에탄올추출물, 열풍건조한 물추출물 순이었다.

Table 3-26. Total phenol and flavonoid contents of Wa-song extractss with the treatment conditions

| Sample ¹⁾ | Phenol contents | Flavonoid contents |
|----------------------|---------------------------|-------------------------|
| SW | 627.3±1.27 ^c | 302.4±3.87 ^a |
| HW | 780.1±1.18 ^d | 517.3±3.52 ^d |
| FW | 417.4±1.24 ^a | 319.2±1.93 ^b |
| SE | 521.7±2.31 ^b | 485.8±2.14 ^c |
| HE | 1,210.3±1.70 ^f | 989.1±1.27 ^f |
| FE | 834.8±2.52 ^e | 724.6±2.18 ^e |

- ¹⁾ SW : water extract of sun-dried Wa-song
 HW : water extract of hot air-dried Wa-song
 FW : water extract of freeze dried Wa-song
 SE : ethanol extract of sun-dried Wa-song
 HE : ethanol extract of hot air-dried Wa-song
 FE : ethanol extract of frized dried Wa-song

^{a-f}Means with different superscripts within a concentration in the same sample significantly difference at p <0.05.

(2) 처리조건별 추출물의 DPPH 라디칼 소거능

와송의 처리조건을 달리하여 DPPH 라디칼 소거능을 측정한 결과는 Table 3-27과 같다. 추출물의 첨가량이 증가함에 따라 DPPH 라디칼 소거능은 상승되었으며, 물추출물보다 에탄올추출물의 소거능이 더 우수하였다. 특히 열풍건조 에탄올추출물은 BHT 보다 높은 항산화 활성을 보였으며, 1000 µg/mL 첨가시 열풍건조 에탄올추출물> 동결

건조 에탄올추출물> 천일건조 에탄올추출물> 열풍건조 물추출물> 천일건조 물추출물> 동결건조 물추출물의 순서로 DPPH 라디칼 소거능이 우수하였다.

Table 3-27. DPPH radical scavenging ability of Wa-song extracts with the treatment conditions

| Sample ¹⁾ | Scavenging ability (%) | | | |
|----------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| | Concentration (µg/mL) | | | |
| | 100 | 250 | 500 | 1000 |
| SW | 6.1±0.08 ^b | 12.4±0.10 ^b | 16.9±0.11 ^a | 23.5±0.17 ^a |
| HW | 12.0±0.12 ^e | 26.4±0.09 ^d | 33.7±0.12 ^c | 59.2±0.24 ^c |
| FW | 3.1±0.06 ^a | 8.5±0.03 ^a | 17.6±0.06 ^b | 34.6±0.20 ^b |
| SE | 11.7±0.04 ^d | 29.8±0.10 ^e | 36.6±0.13 ^d | 60.7±0.31 ^c |
| HE | 13.6±0.06 ^f | 39.2±0.08 ^g | 53.5±0.38 ^g | 80.5±0.36 ^f |
| FE | 10.7±0.10 ^c | 23.4±0.12 ^c | 48.9±0.25 ^f | 74.1±0.27 ^e |
| Ascorbic acid | 62.8±0.18 ^h | 79.8±0.27 ^h | 81.4±0.33 ^h | 95.5±0.42 ^g |
| BHT | 27.0±0.12 ^g | 35.7±0.17 ^f | 41.9±0.24 ^e | 63.9±0.28 ^d |

¹⁾Abbreviation : same as in Table 3-26

^{a-h}Means with different superscripts within a concentration in the same sample significantly difference at p <0.05.

(3) 처리조건별 추출물의 환원력

와송의 처리조건을 달리하여 환원력을 측정하여 700 nm에서 흡광도 값으로 나타낸 결과는 Table 3-28과 같다. 시료의 흡광도 값은 높을수록 환원력이 상승되는 것을 의미하는데, 시료의 첨가량이 증가될수록 환원력이 상승되는 경향이였다. DPPH 라디칼 소거능과 유사한 경향으로 여타 추출물에 비해 열풍건조 에탄올추출물에서 0.28±0.001~1.76±0.023의 범위로 높은 환원력을 나타냈으며, 특히 100~250 µg/mL의 농도에서는 열풍건조 에탄올추출물이 BHT보다 높은 환원력을 보였다.

Table 3-28. Reducing power of Wa-song extracts with the treatment conditions

700 nm (O.D.)

| Sample ¹⁾ | Concentration (µg/mL) | | | |
|----------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | 100 | 250 | 500 | 1000 |
| SW | 0.10±0.001 ^b | 0.33±0.011 ^d | 0.42±0.005 ^b | 0.54±0.015 ^a |
| HW | 0.18±0.003 ^d | 0.27±0.009 ^b | 0.54±0.017 ^d | 0.99±0.010 ^d |
| FW | 0.08±0.001 ^a | 0.24±0.003 ^a | 0.38±0.010 ^a | 0.62±0.022 ^b |
| SE | 0.20±0.002 ^e | 0.31±0.005 ^c | 0.46±0.008 ^c | 0.78±0.014 ^c |
| HE | 0.28±0.001 ^g | 0.53±0.013 ^g | 1.22±0.024 ^f | 1.76±0.023 ^f |
| FE | 0.14±0.004 ^c | 0.35±0.015 ^e | 0.57±0.016 ^e | 1.04±0.019 ^e |
| Ascorbic acid | 0.72±0.013 ^h | 1.84±0.028 ^h | 2.28±0.035 ^h | 2.45±0.015 ^g |
| BHT | 0.24±0.002 ^f | 0.37±0.012 ^f | 1.24±0.014 ^g | 2.64±0.027 ^h |

¹⁾Abbreviation : same as in Table 3-26

^{a-h}Means with different superscripts within a concentration in the same sample significantly difference at p <0.05.

(4) 처리조건별 추출물의 hydroxyl radical 소거능

와송의 처리조건별 hydroxyl radical 소거능은 Table 3-29와 같다. 시료 추출물의 농도가 증가함에 따라 hydroxyl radical 소거능이 증가하는 경향이었으며, 100 µg/mL 농도에서 모든 추출물의 소거능이 21% 미만이었는데, 1000 µg/mL에서는 15.4±0.14~66.5±0.55%였으며, 열풍건조 에탄올추출물이 여타 추출물에 비해 유의적으로 높았으며, 다음으로 열풍건조 물추출물(47.3±0.13%)이었다. 따라서 열풍건조법이 천일 건조 및 동결건조 방법에 비해 항산화 활성에 유효한 것으로 판단되었다.

Table 3-29. The scavenging of hydroxyl radical of Wa-song extracts with the treatment conditions

| Sample ¹⁾ | Scavenging ability (%) | | | |
|----------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| | Concentration (µg/mL) | | | |
| | 100 | 250 | 500 | 1000 |
| SW | 4.8±0.07 ^b | 6.8±0.06 ^b | 12.3±0.08 ^b | 15.4±0.14 ^b |
| HW | 8.4±0.05 ^d | 10.5±0.05 ^c | 18.3±0.10 ^c | 47.3±0.13 ^e |
| FW | 4.5±0.04 ^a | 6.6±0.07 ^a | 8.6±0.09 ^a | 12.5±0.08 ^a |
| SE | 7.8±0.06 ^c | 12.6±0.10 ^d | 23.4±0.12 ^d | 33.2±1.15 ^c |
| HE | 20.3±0.12 ^f | 33.1±0.12 ^f | 41.7±1.04 ^f | 66.5±0.55 ^f |
| FE | 18.4±0.18 ^e | 20.7±0.11 ^e | 33.1±1.20 ^e | 44.6±1.00 ^d |
| Ascorbic acid | 48.4±1.36 ^g | 59.9±1.42 ^h | 64.3±0.58 ^h | 69.3±1.31 ^g |
| BHT | 50.6±2.19 ^h | 52.4±1.23 ^g | 61.3±1.25 ^g | 75.7±1.17 ^h |

¹⁾Abbreviation : same as in Table 3-26

^{a-h}Means with different superscripts within a concentration in the same sample significantly difference at p <0.05.

(5) 처리조건별 추출물의 SOD 유사활성

처리조건별 추출물의 SOD 유사활성은 Table 3-30과 같다. SOD 유사활성은 시료 추출물이 peroxy radical에 빠르게 전자를 제공함으로써 지질과산화 과정의 연쇄반응을 파괴하는 1차적 chain-breaking 항산화제로 보고되어 있다(Lim SN. et al 2002). 와송의 처리조건별 추출물 중 열풍건조 에탄올추출물은 1000 µg/mL 첨가시 56.9±0.35%를 보여 가장 높은 활성을 보였는데, 그 외의 시료에서는 모두 40% 미만의 활성을 보였고, 이러한 결과는 positive control로 사용된 아스코르브산 및 BHT보다 낮은 활성이었다. 따라서 와송의 SOD 유사활성도 에탄올추출물이 물추출물보다 뛰어난 것으로 나타났다.

Table 3-30. SOD-like activity of Wa-song extracts with the treatment conditions

Scavenging ability (%)

| Sample ¹⁾ | Concentration (µg/mL) | | | |
|----------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| | 100 | 250 | 500 | 1000 |
| SW | 8.8±0.04 ^b | 11.4±0.04 ^b | 13.1±0.05 ^a | 14.2±0.13 ^a |
| HW | 13.2±0.06 ^e | 16.4±0.12 ^e | 18.7±0.13 ^c | 24.2±0.18 ^c |
| FW | 6.4±0.03 ^a | 10.2±0.08 ^a | 15.5±0.07 ^b | 18.3±0.12 ^b |
| SE | 9.6±0.05 ^c | 12.7±0.05 ^c | 20.1±0.14 ^d | 27.7±0.21 ^d |
| HE | 16.2±0.10 ^f | 25.4±0.21 ^f | 39.8±0.17 ^e | 56.9±0.35 ^f |
| FE | 10.3±0.02 ^d | 15.3±0.13 ^d | 20.1±0.19 ^d | 38.3±0.29 ^e |
| Ascorbic acid | 28.9±0.15 ^g | 31.3±0.28 ^g | 45.3±0.46 ^f | 58.9±0.26 ^g |
| BHT | 31.6±0.17 ^h | 42.2±0.23 ^h | 50.2±0.61 ^g | 59.9±0.17 ^h |

¹⁾Abbreviation : same as in Table 3-26

^{a-h}Means with different superscripts within a concentration in the same sample significantly difference at p <0.05.

(6) 처리조건별 추출물의 TBARS 함량

지질산화를 촉진하는 금속 이온인 Fe⁺², Cu⁺²에 대한 와송 추출물의 지질과산화 억제능을 BHT의 활성과 비교한 결과는 Table 3-31과 같다. FeCl₂ 첨가에 대한 와송 추출물의 영향은 모든 시료 농도에서 시료 무첨가구(4.91±0.05 mg MDA/L)에 비해 낮은 TBARS 값을 나타내어 와송 추출물이 지질과산화 억제에 효과가 있는 것으로 판단되었다. 와송 추출물을 500 및 100 µg/mL의 농도로 첨가하였을 때 물추출물은 3.67±0.11~1.93±0.27 mg MDA/L의 범위였으며, 열풍건조 시료의 TBARS 값이 가장 낮았다. 에탄올추출물은 2.55±0.14~1.45±0.11 mg MDA/L범위로 시료의 첨가 농도가 많을수록 TBARS 값이 감소되었으며, 물추출물과 마찬가지로 열풍건조 시료에서 가장 낮았다.

CuSO₄가 첨가된 반응조건에서 시료 무첨가구의 TBARS 함량은 6.02±0.09 mg MDA/L이었으며, 와송 물추출물에서는 4.62±0.20~3.03±0.06 mg MDA/L, 에탄올추출물은 3.82±0.13~2.44±0.09 mg MDA/L의 범위로 와송 추출물의 첨가시 시료 무첨가구

에 비해 낮은 TBARS 값을 나타내었으며, 에탄올추출물이 물추출물에 비하여 지질과산화 억제능이 더 높았다.

Table 3-31. Effect of Wa-song extracts on lipid oxidation of oil emulsion containing FeCl₂ and CuSO₄, respectively

| Sample ¹⁾ | TBARS (mg MDA/L) | | | |
|----------------------|--|------------------------|--|------------------------|
| | In Added FeCl ₂ ²⁾ | | In Added CuSO ₄ ³⁾ | |
| | 500 µg/mL | 1000 µg/mL | 500 µg/mL | 1000 µg/mL |
| SW | 3.67±0.11 ^f | 3.03±0.21 ^f | 4.54±0.29 ^d | 3.91±0.08 ^f |
| HW | 2.51±0.19 ^d | 1.93±0.27 ^d | 3.91±0.12 ^c | 3.03±0.06 ^d |
| FW | 2.92±0.23 ^e | 2.27±0.15 ^e | 4.62±0.20 ^d | 3.94±0.12 ^f |
| SE | 2.55±0.14 ^d | 1.86±0.18 ^d | 3.82±0.13 ^c | 3.27±0.17 ^e |
| HE | 1.75±0.21 ^b | 1.45±0.11 ^b | 2.56±0.18 ^a | 2.44±0.09 ^b |
| FE | 1.89±0.17 ^c | 1.66±0.09 ^c | 3.00±0.06 ^b | 2.51±0.08 ^c |
| BHT | 1.03±0.17 ^a | 0.76±0.19 ^a | 2.62±0.13 ^a | 2.36±0.06 ^a |

¹⁾Abbreviation : same as in Table 3-26

²⁾control(not added Wa-song extracts) : 4.91±0.05 mg MDA/L

³⁾control(not added Wa-song extracts) : 6.02±0.09 mg MDA/L

^{a-f}Means with different superscripts in the same column are significantly different at p<0.05.

열풍건조한 와송의 에탄올추출물은 500 µg/mL의 농도에서는 BHT와 유사한 수준까지 지질과산화 억제능이 나타났으며, 1000 µg/mL농도에서는 시료 무첨가구의 TBARS 함량에 대해 Fe⁺²이온 존재시 약 70%, Cu⁺²이온 존재시 약 60%정도로 TBARS 생성 억제를 보여 와송의 Fe⁺²이온 포집력이 더 높은 것으로 나타났다. Fe⁺²이온은 그 자체가 지질 산화를 강하게 촉진시키는 인자인데(Lee YJ. et al 2000), 본 실험의 결과 와송 추출물의 첨가시 지질과산화 억제능이 우수한 것은 와송 추출물이 금속이온에 대한 결합력이 높기 때문인 것으로 추정된다. 따라서 시료의 지질산화 억제능 정도는 시료의 제조 조건 및 추출방법에 따라 달라질 수 있다는 것을 알 수 있었다(Kim SM. et al 2001).

(7) 처리조건별 추출물의 지질과산화 저해능

와송 추출물을 linoleic acid 기질에 500 µg/mL 및 1000 µg/mL 농도로 첨가한 후 37°C의 항온기에서 각각 1일 및 7일간 저장한 후 지질과산화 저해능을 측정한 결과는 Table 3-32와 같으며, 이때 positive control로 BHT를 사용하였다.

Table 3-32. Total antioxidant activity of Wa-song extracts on the oxidation of linoleic acid system after 1 day and 7 days incubation at 37°C

| Sample ¹⁾ | Scavenging activity (%) | | | |
|----------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| | after 1 day | | after 7 days | |
| | 500 µg/mL | 1000 µg/mL | 500 µg/mL | 1000 µg/mL |
| SW | 8.8±0.15 ^a | 11.7±0.10 ^a | 16.9±0.18 ^a | 23.8±0.24 ^a |
| HW | 12.4±0.03 ^c | 18.6±0.09 ^b | 22.4±0.20 ^b | 31.6±0.15 ^b |
| FW | 9.8±0.09 ^b | 11.2±0.15 ^a | 17.2±0.15 ^a | 24.1±0.29 ^a |
| SE | 17.9±0.17 ^d | 21.1±0.14 ^c | 37.9±0.23 ^c | 43.3±0.18 ^c |
| HE | 25.6±0.07 ^f | 31.7±0.16 ^e | 56.6±0.27 ^e | 65.8±0.30 ^e |
| FE | 18.1±0.11 ^e | 25.2±0.13 ^d | 42.4±0.14 ^d | 50.7±0.26 ^d |
| BHT | 35.9±0.14 ^g | 47.9±0.15 ^f | 63.7±0.36 ^f | 76.3±0.27 ^f |

¹⁾Abbreviation : same as in Table 3-26

^{a-f}Means with different superscripts in the same column are significantly different at p<0.05.

천일건조, 열풍건조 및 동결건조한 와송의 물과 에탄올 추출물의 지질과산화 저해능은 500 µg/mL 농도에서 보다 1000 µg/mL에서 더 높아 시료의 첨가농도가 높을수록 상승하는 경향을 보였다. 저장 1일째에 와송 물추출물의 지질과산화 저해능은 20% 미만이었으며, 에탄올추출물은 17.9~31.7%의 범위로 물추출물에 비해 유의적으로 높은 저해능을 보였으나, 대조구로 사용한 BHT보다는 낮았다.

저장 7일째에 물추출물의 지질과산화 저해능은 16.9~31.6%의 범위였으며, 열풍건조

시료가 천일건조 및 동결건조 시료에 비해 유의적으로 더 높은 활성을 보였다. 에탄올 추출물은 37.9~65.8%의 범위로 열풍건조>동결건조>천일건조 시료의 순으로 유의차를 보였으며, 물추출물보다 높았다.

이와 같이 와송 추출물의 지질과산화 저해능은 저장기간이 길어짐에 따라 상승하는 경향이었는데, 저장 1일에 비해 7일째 시료에서 물추출물은 1.7~2.2배, 에탄올추출물은 2.0~2.3배 정도 증가하는 것으로 보아 에탄올추출물에서 증가폭이 다소 높은 경향이였다. 와송 추출물간에 지질과산화 억제능의 차이는 linoleic acid 기질에서 반응성이 시료의 기질에 대한 용해도의 차이에 따라 달라진다고 한 보고(Dong S. et al 2004)와 비슷하였다.

(8) 처리조건별 추출물의 아질산염 소거능

와송의 처리조건별 추출물의 농도(100~1000 µg/mL) 및 pH(pH 2.5, 4.2 및 6.0)를 달리한 반응계에서 아질산염 소거능은 Table 3-33 ~ 3-35와 같다.

pH 2.5의 강산성 반응계에서 아질산염 소거능(Table 3-33)은 100 µg/mL 첨가시 10.4±0.11~40.2±0.19% 였는데, 1000 µg/mL 첨가시에는 24.5±0.20~64.3±0.27%의 범위로 시료의 첨가량이 많아질수록 상승하였다. 특히 에탄올추출물이 18.7±0.16~64.3±0.27%의 범위로 나타나 물추출물(10.4±0.11~41.7±0.23%)보다 다소 높았다. 1000 µg/mL의 농도에서 아질산염 소거능은 열풍건조 에탄올추출물이 가장 높았으며, 다음으로 동결건조 에탄올추출물, 열풍건조 물추출물 순으로 시료간에 유의적인 차이를 보였다.

pH 4.2의 반응계에서 아질산염 소거능은 Table 3-34와 같이 물추출물의 소거능은 5.6±0.08~26.7±0.13%의 범위였으며, 에탄올추출물은 11.2±0.10~43.6±0.21%로 pH 2.5 반응계 실험과 유사한 결과였다.

pH 6.0에서 아질산염 소거능은 Table 3-35에 나타난 바와 같이 시료의 첨가량이 많아짐에 따라 증가하기는 하였으나, pH 2.5 및 4.2의 반응계보다는 낮은 소거능을 보였다. 특히 열풍건조 에탄올추출물의 경우 1000 µg/mL 첨가시 22.1±0.10%로 가장 높았으며 그 외 시료에서는 20% 미만이었다.

Table 3-33. Nitrite scavenging ability of Wa-song extracts with the treatment conditions in reaction system of pH 2.5

| Samples ¹⁾ | Scavenging ability (%) | | | |
|-----------------------|---|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | Concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | | | |
| | 100 | 250 | 500 | 1000 |
| SW | 12.2 \pm 0.10 ^b | 17.6 \pm 0.15 ^b | 20.1 \pm 0.11 ^a | 24.5 \pm 0.20 ^a |
| HW | 12.4 \pm 0.08 ^b | 28.8 \pm 0.13 ^d | 34.5 \pm 0.16 ^d | 41.7 \pm 0.23 ^d |
| FW | 10.4 \pm 0.11 ^a | 12.7 \pm 0.12 ^a | 19.4 \pm 0.20 ^a | 26.2 \pm 0.09 ^b |
| SE | 18.7 \pm 0.16 ^c | 22.4 \pm 0.19 ^c | 26.3 \pm 0.25 ^b | 28.1 \pm 0.10 ^c |
| HE | 40.2 \pm 0.19 ^f | 46.6 \pm 0.16 ^f | 53.7 \pm 0.23 ^e | 64.3 \pm 0.27 ^f |
| FE | 22.5 \pm 0.20 ^d | 28.6 \pm 0.21 ^d | 33.3 \pm 0.09 ^c | 42.7 \pm 0.18 ^e |

¹⁾Abbreviation : same as in Table 3-26

^{a-f}Means with different superscripts within a concentration in the same sample significantly difference at $p < 0.05$.

Table 3-34. Nitrite scavenging ability of Wa-song extracts with the treatment conditions in reaction system of pH 4.2

| Samples ¹⁾ | Scavenging ability (%) | | | |
|-----------------------|---|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | Concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | | | |
| | 100 | 250 | 500 | 1000 |
| SW | 5.6 \pm 0.08 ^a | 7.4 \pm 0.09 ^a | 9.1 \pm 0.07 ^a | 12.7 \pm 0.04 ^a |
| HW | 11.4 \pm 0.07 ^c | 18.6 \pm 0.10 ^d | 24.5 \pm 0.14 ^e | 26.7 \pm 0.13 ^e |
| FW | 8.1 \pm 0.06 ^b | 12.3 \pm 0.11 ^b | 16.6 \pm 0.10 ^b | 18.7 \pm 0.09 ^b |
| SE | 11.2 \pm 0.10 ^c | 16.4 \pm 0.08 ^c | 21.0 \pm 0.07 ^d | 22.2 \pm 0.15 ^c |
| HE | 22.1 \pm 0.14 ^e | 28.7 \pm 0.13 ^e | 34.8 \pm 0.21 ^f | 43.6 \pm 0.21 ^f |
| FE | 13.3 \pm 0.17 ^d | 16.5 \pm 0.12 ^c | 18.6 \pm 0.03 ^c | 25.3 \pm 0.18 ^d |

¹⁾Abbreviation : same as in Table 3-26

^{a-f}Means with different superscripts within a concentration in the same sample significantly difference at $p < 0.05$.

Table 3-35. Nitrite scavenging ability of Wa-song extracts with the treatment conditions in reaction system of pH 6.0

| Samples ¹⁾ | Concentration (µg/mL) | | | |
|-----------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|
| | 100 | 250 | 500 | 1000 |
| SW | 0.7±0.05 ^a | 2.2±0.04 ^a | 3.4±0.09 ^a | 5.2±0.13 ^a |
| HW | 2.7±0.06 ^d | 6.9±0.10 ^f | 9.4±0.10 ^e | 11.7±0.16 ^d |
| FW | 1.4±0.05 ^c | 2.8±0.05 ^b | 4.3±0.06 ^b | 7.5±0.08 ^b |
| SE | 0.9±0.08 ^b | 3.2±0.07 ^c | 5.8±0.05 ^c | 8.3±0.05 ^c |
| HE | 4.5±0.11 ^f | 6.7±0.03 ^e | 12.6±0.12 ^f | 22.1±0.10 ^f |
| FE | 3.4±0.07 ^e | 5.6±0.12 ^d | 8.2±0.04 ^d | 16.1±0.11 ^e |

¹⁾Abbreviation : same as in Table 3-26

^{a-f}Means with different superscripts within a concentration in the same sample significantly difference at $p < 0.05$.

라. 식용유지 기질에서 와송추출물의 항산화 활성

(1) 색도(chromaticity)의 변화

대두유에 와송 열풍건조 물추출물(HW), 열풍건조 에탄올추출물(HE) 및 동결건조 물추출물(FW)을 농도별로 가하여 60°C (Table 3-36)와 180°C (Table 3-37)에서 각각 저장하면서 유지의 변색 정도를 흡광도의 수치로 나타낸 결과, 저장기간이 경과할수록 흡광도 수치가 높아져 유지의 색도가 증가됨을 확인할 수 있었다.

60°C에서 저장할 경우 HE에서 저장 28일 후에 색도가 가장 높았는데, 에탄올에 의한 추출로 여러 가지 색소성분의 용출이 물보다 높았기 때문이며, FW 첨가구의 색도가 타 시료에 비해 다소 낮은 것은 동결건조에 의한 전처리에서 시료 자체의 변색이 적었기 때문인 것으로 추정된다. 180°C 저장의 경우 흡광도 값의 범위가 60°C에서 저장한 시료에 비해 현저히 높았으며, 36시간 저장 이후에 유의적으로 높은 흡광도 수치를 보여 고온에서 기름의 가열이 유지의 변색에 큰 영향을 미치는 것으로 관찰되었다. 시료간·농도간 변색 정도는 60°C 저장의 경우와 유사한 경향이였다.

Table 3-36. Changes of chromaticity in soybean oil containing Wa-song extracts during storage at 60°C

| Samples ¹⁾ | Added Sample vol. (g/100 mL soybean oil) | Storage period (days) | | | |
|-----------------------|--|-------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | | 7 | 14 | 21 | 28 |
| HW | 0.1 | 0.02±0.00 ^{aB} | 0.06±0.01 ^{bB} | 0.06±0.01 ^b | 0.11±0.00 ^{cB} |
| | 0.5 | 0.02±0.00 ^{aB} | 0.07±0.01 ^{bB} | 0.07±0.01 ^b | 0.13±0.00 ^{cC} |
| | 1.0 | 0.01±0.00 ^{aA} | 0.05±0.01 ^{bA} | 0.07±0.01 ^c | 0.09±0.00 ^{dA} |
| HE | 0.1 | 0.04±0.01 ^a | 0.08±0.01 ^{bA} | 0.09±0.01 ^{bA} | 0.13±0.01 ^{cA} |
| | 0.5 | 0.04±0.00 ^a | 0.11±0.01 ^{bB} | 0.13±0.01 ^{cB} | 0.20±0.01 ^{dB} |
| | 1.0 | 0.04±0.01 ^a | 0.18±0.01 ^{bC} | 0.22±0.00 ^{cC} | 0.29±0.01 ^{dC} |
| FW | 0.1 | 0.03±0.01 ^a | 0.06±0.00 ^{cAB} | 0.04±0.00 ^{bA} | 0.07±0.00 ^{dA} |
| | 0.5 | 0.03±0.00 ^a | 0.06±0.01 ^{bA} | 0.06±0.00 ^{bB} | 0.09±0.01 ^{cA} |
| | 1.0 | 0.02±0.00 ^a | 0.07±0.00 ^{bB} | 0.09±0.01 ^{cC} | 0.11±0.01 ^{dB} |
| Control | | 0.01±0.00 ^a | 0.02±0.00 ^a | 0.03±0.01 ^b | 0.03±0.00 ^b |
| BHT (0.02%) | | 0.01±0.00 ^a | 0.02±0.00 ^b | 0.04±0.00 ^c | 0.07±0.00 ^d |

¹⁾Refer to the Table 3-26

^{a-d}Means with different superscripts in the same row significantly difference(p <0.05).

^{A-D}Means with different superscripts in the same column and same sample significantly difference(p <0.05).

Table 3-37. Changes of chromaticity in soybean oil containing Wa-song extracts during heating at 180°C

| Samples ¹⁾ | Added Sample vol. (g/100 mL soybean oil) | Heating time (hours) | | | |
|-----------------------|--|--------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | | 12 | 24 | 36 | 48 |
| HW | 0.1 | 0.20±0.01 ^{aA} | 0.20±0.00 ^{aA} | 0.64±0.00 ^{bA} | 0.66±0.02 ^{bA} |
| | 0.5 | 0.22±0.01 ^{aAB} | 0.21±0.00 ^{aA} | 0.66±0.01 ^{bB} | 0.74±0.03 ^{cB} |
| | 1.0 | 0.23±0.01 ^{aB} | 0.23±0.01 ^{aB} | 0.77±0.01 ^{bC} | 0.77±0.03 ^{bB} |
| HE | 0.1 | 0.18±0.00 ^{aA} | 0.23±0.02 ^{bA} | 0.56±0.01 ^{cA} | 0.60±0.01 ^{dA} |
| | 0.5 | 0.26±0.00 ^{aB} | 0.27±0.01 ^{aB} | 0.83±0.04 ^{bB} | 0.87±0.00 ^{cB} |
| | 1.0 | 0.28±0.00 ^{aC} | 0.28±0.01 ^{aB} | 0.90±0.04 ^{bC} | 1.01±0.01 ^{cC} |
| FW | 0.1 | 0.16±0.02 ^{aA} | 0.20±0.00 ^{bA} | 0.46±0.00 ^{cA} | 0.50±0.01 ^{dA} |
| | 0.5 | 0.19±0.02 ^{aA} | 0.28±0.01 ^{bB} | 0.51±0.00 ^{cB} | 0.52±0.02 ^{cB} |
| | 1.0 | 0.28±0.02 ^{aB} | 0.31±0.00 ^{bC} | 0.54±0.00 ^{cC} | 0.59±0.01 ^{dC} |
| Control | | 0.11±0.00 ^a | 0.18±0.01 ^b | 0.19±0.01 ^b | 0.38±0.02 ^c |
| BHT (0.02%) | | 0.10±0.01 ^a | 0.15±0.00 ^b | 0.17±0.00 ^c | 0.22±0.00 ^d |

¹⁾Refer to the Table 3-26

^{a-d}Means with different superscripts in the same row significantly difference(p <0.05).

^{A-D}Means with different superscripts in the same column and same sample significantly difference(p <0.05).

돈지(lard)를 유지기질로 하여 시료를 첨가한 후 60°C(Table 3-38)와 180°C(Table 3-39)에서 각각 저장하면서 색도를 측정된 결과 60°C에서 저장초기에는 대두유의 색도와 비슷하였으나 저장 28일 이후에는 HE>FW>HW의 순서로 대두유의 색도보다 다소 높았다. HW 시료는 대조구 및 BHT 첨가구와 유사한 값을 보여 저장기간에 따른 유지의 색깔 변화에 가장 영향이 적은 것으로 생각된다. 180°C 저장시에는 대두유의 가열저장시보다 색도가 높았다.

Table 3-38. Changes of chromaticity in lard containing Wa-song extracts during storage at 60°C

| Samples ¹⁾ | Added Sample vol. (g/100 mL lard) | Storage period (days) | | | |
|-----------------------|-----------------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|
| | | 7 | 14 | 21 | 28 |
| HW | 0.1 | 0.03±0.00 ^a | 0.05±0.00 ^{bA} | 0.06±0.01 ^{bcA} | 0.07±0.01 ^c |
| | 0.5 | 0.03±0.01 ^a | 0.05±0.00 ^{bA} | 0.06±0.01 ^{bA} | 0.08±0.00 ^c |
| | 1.0 | 0.04±0.01 ^a | 0.07±0.00 ^{bB} | 0.07±0.01 ^{bB} | 0.09±0.01 ^b |
| HE | 0.1 | 0.02±0.01 ^a | 0.06±0.00 ^{bA} | 0.10±0.01 ^{cA} | 0.11±0.01 ^{cA} |
| | 0.5 | 0.03±0.00 ^a | 0.10±0.00 ^{bB} | 0.12±0.01 ^{cB} | 0.22±0.00 ^{dB} |
| | 1.0 | 0.04±0.01 ^a | 0.15±0.00 ^{bC} | 0.17±0.01 ^{cC} | 0.23±0.01 ^{dB} |
| FW | 0.1 | 0.01±0.00 ^{aA} | 0.05±0.01 ^{bA} | 0.07±0.00 ^{cA} | 0.09±0.00 ^{dA} |
| | 0.5 | 0.02±0.00 ^{aA} | 0.06±0.01 ^{bA} | 0.08±0.01 ^{cB} | 0.10±0.01 ^{dA} |
| | 1.0 | 0.03±0.01 ^{aB} | 0.08±0.01 ^{bB} | 0.09±0.00 ^{cC} | 0.12±0.01 ^{dB} |
| Control | | 0.01±0.00 ^a | 0.03±0.00 ^b | 0.05±0.01 ^c | 0.08±0.01 ^d |
| BHT (0.02%) | | 0.01±0.00 ^a | 0.03±0.00 ^b | 0.06±0.01 ^c | 0.08±0.00 ^d |

¹⁾Refer to the Table 3-26

^{a-d}Means with different superscripts in the same row significantly difference(p <0.05).

^{A-D}Means with different superscripts in the same column and same sample significantly difference(p <0.05).

가열 12시간 후 HE와 FW의 색도는 시료의 첨가 농도의 증가에 따른 차이가 적었으나, HWE의 색도는 시료의 농도가 증가할수록 유의적으로 색도가 높았으며, 이러한 현상은 가열 24시간 후에도 마찬가지였다. 저장 48시간에 열풍건조 시료는 동결건조 시료에 비해 색도가 높은 경향이었으며, 특히 HE 1.0 mg 첨가구에서 1.17±0.01로 가장 높은 색도를 보였다. 와송 추출물이 첨가된 모든 실험구는 대조구 및 BHT 첨가구 보다 색도가 높은 경향이였다.

Table 3-39. Changes of chromaticity in lard containing Wa-song extracts during heating at 180°C

| Samples ¹⁾ | Added Sample vol. (g/100 mL lard) | Heating time (hours) | | | |
|-----------------------|-----------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|
| | | 12 | 24 | 36 | 48 |
| HW | 0.1 | 0.25±0.01 ^{aA} | 0.28±0.00 ^{bA} | 0.43±0.00 ^{cA} | 0.90±0.01 ^{dA} |
| | 0.5 | 0.41±0.01 ^{aB} | 0.46±0.00 ^{bB} | 0.50±0.00 ^{cB} | 0.95±0.01 ^{dB} |
| | 1.0 | 0.56±0.00 ^{aC} | 0.58±0.00 ^{bC} | 0.67±0.00 ^{cC} | 1.10±0.00 ^{dC} |
| HE | 0.1 | 0.22±0.01 ^{aA} | 0.54±0.01 ^{bA} | 0.55±0.01 ^b | 1.00±0.03 ^{cA} |
| | 0.5 | 0.26±0.00 ^{aB} | 0.58±0.01 ^{bB} | 0.60±0.18 ^b | 1.07±0.03 ^{cB} |
| | 1.0 | 0.26±0.02 ^{aB} | 0.60±0.01 ^{bB} | 0.66±0.00 ^c | 1.17±0.01 ^{dC} |
| FW | 0.1 | 0.22±0.01 ^{aA} | 0.49±0.00 ^{bA} | 0.50±0.00 ^{cA} | 0.52±0.00 ^{dA} |
| | 0.5 | 0.22±0.00 ^{aA} | 0.52±0.00 ^{bB} | 0.54±0.02 ^{bB} | 0.70±0.01 ^{cBC} |
| | 1.0 | 0.24±0.01 ^{aB} | 0.56±0.01 ^{bC} | 0.59±0.00 ^{cC} | 0.73±0.01 ^{cC} |
| Control | | 0.15±0.00 ^a | 0.23±0.01 ^b | 0.34±0.00 ^c | 0.54±0.02 ^d |
| BHT (0.02%) | | 0.10±0.00 ^a | 0.18±0.01 ^b | 0.25±0.00 ^c | 0.42±0.00 ^d |

¹⁾Refer to the Table 3-26

^{a-d}Means with different superscripts in the same row significantly difference(p <0.05).

^{A-D}Means with different superscripts in the same column and same sample significantly difference(p <0.05).

(2) Anisidine value 변화

Anisidine value(AV)는 유지 중의 2,4-dienal과 이와 유사한 conjugated diene이 *p*-anisidin과의 반응으로 황색의 정색반응이 나타나는 성질을 이용한 것으로 AV가 낮을수록 항산화능이 높은 것으로 여겨진다. AV는 POV(peroxide value)보다 산패도의 측정에 유리하며, 고온 가열 등 유지의 급격한 산화에 있어서도 그 진행정도를 추정하는데 더 유용하게 이용된다.

와송 추출물을 농도별로 대두유에 첨가하고 저장온도 및 기간에 따른 AV값의 변화를 측정한 결과는 Table 3-40, 3-41과 같다. AV값은 저장온도가 높고 저장기간이 경과할수록 증가하는 경향이였다. 60°C 저장의 경우(Table 3-40) 저장 14일까지는 유의차

가 없었으나, 저장 21일 이후 점차 유의적인 증가를 보였다. 저장 28일에는 열풍건조한 와송시료(HW, HE)의 경우 대조구 및 BHT 첨가구보다 AV값이 낮게 나타나 대두유의 저장시 와송 추출물의 첨가가 유지의 항산화에 매우 효과적인 것으로 여겨진다.

180°C에서 가열한 경우(Table 3-41), 저장 12시간 후에 HW 첨가구에서 AV가 다소 높았으나, 시료의 첨가 농도에 따른 유의차는 없었다. 저장 48시간 후에는 HW 1.0 g 첨가구에서 86.54±0으로 가장 높은 수치를 보였고, 시료의 첨가농도가 높을수록 AV는 상승하는 것으로 나타났다. 와송 추출물 첨가구는 BHT 첨가구보다 모두 높은 AV를 나타내었으나, 대조구보다는 낮았다

Table 3-40. Changes of anisidine value in soybean oil containing Wa-song extracts during storage at 60°C

| Samples ¹⁾ | Added Sample vol. (g/100 mL soybean oil) | Storage period (days) | | | |
|-----------------------|--|-------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|
| | | 7 | 14 | 21 | 28 |
| HW | 0.1 | 4.00±0.43 ^a | 5.64±0.23 ^{bB} | 6.87±0.14 ^{cB} | 13.82±0.68 ^d |
| | 0.5 | 4.46±0.23 ^a | 4.51±0.11 ^{aA} | 5.82±0.22 ^{bA} | 13.08±0.85 ^c |
| | 1.0 | 4.50±0.15 ^a | 4.51±0.10 ^{aA} | 6.50±0.45 ^{bB} | 12.60±0.92 ^c |
| HE | 0.1 | 4.23±0.20 ^a | 4.28±0.43 ^a | 6.05±0.50 ^b | 13.63±0.93 ^c |
| | 0.5 | 3.78±0.60 ^a | 4.17±0.02 ^a | 6.43±0.50 ^b | 13.11±0.71 ^c |
| | 1.0 | 3.22±0.26 ^a | 3.90±0.36 ^a | 6.41±0.58 ^b | 14.26±0.86 ^c |
| FW | 0.1 | 6.27±0.17 ^{aB} | 6.30±0.36 ^{aA} | 8.08±1.10 ^b | 16.60±0.41 ^{cA} |
| | 0.5 | 5.64±0.27 ^{aA} | 6.36±0.35 ^{aA} | 9.71±0.84 ^b | 15.02±1.40 ^{cA} |
| | 1.0 | 6.73±0.44 ^{aB} | 7.43±0.58 ^{aB} | 10.40±1.15 ^b | 18.64±0.62 ^{cB} |
| Control | | 5.18±0.11 ^a | 6.42±0.98 ^a | 8.72±0.93 ^b | 18.99±0.62 ^c |
| BHT (0.02%) | | 5.15±0.03 ^a | 6.11±0.02 ^b | 7.85±0.16 ^c | 16.11±0.75 ^d |

¹⁾Refer to the Table 3-26

^{a-d}Means with different superscripts in the same row significantly difference(p <0.05).

^{A-D}Means with different superscripts in the same column and same sample significantly difference(p <0.05).

Table 3-41. Changes of anisidine value in soybean oil containing Wa-song extracts during heating at 180°C

| Samples ¹⁾ | Added Sample vol. (g/100 mL soybean oil) | Heating time (hours) | | | |
|-----------------------|--|-------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | | 12 | 24 | 36 | 48 |
| HW | 0.1 | 28.71±0.70 ^a | 47.20±0.95 ^{bA} | 57.78±5.18 ^c | 74.22±0.99 ^{dA} |
| | 0.5 | 28.15±0.29 ^a | 51.55±2.05 ^{bB} | 56.65±2.50 ^c | 83.76±2.31 ^{dB} |
| | 1.0 | 28.87±2.20 ^a | 61.54±2.68 ^{bC} | 60.89±3.42 ^b | 86.54±0.00 ^{CB} |
| HE | 0.1 | 23.97±1.60 ^a | 42.31±2.63 ^{bA} | 49.62±3.65 ^{cA} | 76.54±0.00 ^{dA} |
| | 0.5 | 24.00±0.32 ^a | 56.14±3.29 ^{bB} | 65.42±1.57 ^{cB} | 79.30±0.40 ^{dAB} |
| | 1.0 | 26.85±2.04 ^a | 57.75±2.84 ^{bB} | 68.71±1.81 ^{cB} | 82.37±3.70 ^{dB} |
| FW | 0.1 | 22.57±0.92 ^a | 54.38±4.60 ^b | 61.07±3.06 ^{cA} | 80.91±4.56 ^d |
| | 0.5 | 22.99±1.23 ^a | 62.28±4.02 ^b | 68.39±3.50 ^{cAB} | 80.73±0.27 ^d |
| | 1.0 | 23.25±0.57 ^a | 58.75±2.93 ^b | 72.86±4.33 ^{cB} | 85.36±1.10 ^d |
| Control | | 41.15±0.08 ^a | 62.72±0.61 ^b | 72.86±3.88 ^c | 81.21±1.53 ^d |
| BHT (0.02%) | | 22.23±0.94 ^a | 34.32±1.12 ^b | 49.62±2.02 ^c | 65.04±5.64 ^d |

¹⁾Refer to the Table 3-26

^{a-d}Means with different superscripts in the same row significantly difference(p <0.05).

^{A-D}Means with different superscripts in the same column and same sample significantly difference(p <0.05).

Table 3-42. Changes of anisidine value in lard containing Wa-song extracts during storage at 60°C

| Samples ¹⁾ | Added Sample vol. (g/100 mL lard) | Storage period (days) | | | |
|-----------------------|-----------------------------------|-------------------------|-------------------------|---------------------------|--------------------------|
| | | 7 | 14 | 21 | 28 |
| HW | 0.1 | 10.88±0.86 ^a | 10.39±0.26 ^a | 18.58±0.32 ^{bC} | 19.28±2.61 ^b |
| | 0.5 | 10.19±0.61 ^a | 10.02±0.37 ^a | 17.30±0.33 ^{bB} | 18.96±0.68 ^c |
| | 1.0 | 9.81±0.45 ^a | 9.54±0.55 ^a | 14.92±0.05 ^{bA} | 17.82±0.79 ^c |
| HE | 0.1 | 8.30±0.06 ^a | 8.63±0.62 ^a | 12.71±0.15 ^{bB} | 16.18±1.07 ^c |
| | 0.5 | 8.01±0.18 ^a | 8.32±0.50 ^a | 12.49±0.05 ^{bAB} | 16.07±2.01 ^c |
| | 1.0 | 7.82±0.32 ^a | 8.27±0.49 ^a | 12.35±0.11 ^{bA} | 15.32±2.73 ^c |
| FW | 0.1 | 9.49±0.41 ^a | 9.66±0.30 ^a | 18.34±0.24 ^{bB} | 21.24±1.08 ^{cC} |
| | 0.5 | 9.34±0.27 ^a | 9.44±0.52 ^a | 13.49±0.95 ^{bA} | 16.96±0.47 ^{cB} |
| | 1.0 | 8.77±0.54 ^a | 9.20±0.11 ^a | 12.98±0.35 ^{bA} | 14.47±0.41 ^{cA} |
| Control | | 8.27±0.08 ^a | 9.73±0.11 ^b | 14.41±0.22 ^c | 16.53±0.70 ^d |
| BHT (0.02%) | | 8.38±0.16 ^a | 9.75±0.07 ^b | 15.63±0.17 ^c | 17.75±0.14 ^d |

¹⁾Refer to the Table 3-26

^{a-d}Means with different superscripts in the same row significantly difference(p <0.05).

^{A-D}Means with different superscripts in the same column and same sample significantly difference(p <0.05).

돈지에 와송 추출물을 첨가하여 60°C 및 180°C에 저장한 결과(Table 3-42, 3-43), 대두유와 유사한 경향이였다. 각 추출물의 농도에 따른 유의적인 차이는 거의 나타나지 않았으나, 돈지에서 180°C로 가열시 FW 첨가구에서 시료의 농도변화에 따라 유의차를 보였으나, 시료 첨가 농도가 증가될수록 AV가 상승되어 유지의산패가 촉진되는 경향이였다.

Table 3-43. Changes of anisidine value in lard containing Wa-song extracts during heating at 180°C

| Samples ¹⁾ | Added Sample vol. (g/100 mL lard) | Heating time (hours) | | | |
|-----------------------|-----------------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|
| | | 12 | 24 | 36 | 48 |
| HW | 0.1 | 26.49±0.10 ^{aA} | 32.36±0.38 ^b | 34.51±1.20 ^{cA} | 36.70±0.47 ^{dA} |
| | 0.5 | 26.92±0.12 ^{aB} | 32.57±1.82 ^b | 34.76±0.11 ^{cA} | 38.86±0.30 ^{dB} |
| | 1.0 | 29.86±0.12 ^{aC} | 33.59±0.17 ^b | 36.36±0.15 ^{cB} | 39.04±0.80 ^{dB} |
| HE | 0.1 | 25.92±0.10 ^{aB} | 28.01±5.82 ^a | 29.77±0.18 ^{abA} | 34.76±0.50 ^{bA} |
| | 0.5 | 24.69±0.12 ^{aA} | 31.17±0.29 ^b | 32.49±0.24 ^{cB} | 37.94±0.50 ^{dB} |
| | 1.0 | 26.12±0.08 ^{aB} | 32.14±0.58 ^b | 35.77±1.50 ^{cC} | 43.12±1.18 ^{dC} |
| FW | 0.1 | 25.92±0.77 ^{aA} | 27.53±0.08 ^{bA} | 34.83±0.54 ^{cA} | 35.58±0.74 ^{cA} |
| | 0.5 | 28.76±1.18 ^{aB} | 29.84±0.14 ^{aB} | 38.44±0.09 ^{cB} | 36.82±0.67 ^{bB} |
| | 1.0 | 29.74±0.12 ^{aB} | 33.50±0.17 ^{bC} | 38.39±0.39 ^{cB} | 40.24±0.17 ^{dC} |
| Control | | 36.45±0.29 ^a | 42.44±0.87 ^b | 47.74±0.20 ^c | 50.27±0.82 ^d |
| BHT (0.02%) | | 17.14±0.23 ^a | 20.30±1.05 ^b | 33.01±0.77 ^c | 45.41±2.40 ^d |

¹⁾Refer to the Table 3-26

^{a-d}Means with different superscripts in the same row significantly difference(p <0.05).

^{A-D}Means with different superscripts in the same column and same sample significantly difference(p <0.05).

(3) 산가(Acid value)의 변화

와송 추출물을 농도별로 대두유에 첨가하여 60°C에 저장한 결과(Table 3-44) 저장기간이 증가될수록 산가는 증가하는 경향이었으며, 0.1 및 0.5 g/100 mL의 HW를 첨가한 실험구를 제외한 모든 와송 추출물 첨가구에서 저장 14일 이후 유의적으로 증가하였다. 특히 FW 첨가구에서 저장 14일부터 시료의 첨가농도가 증가될수록 유의적으로 산가가 감소되었으며, 저장 28일 후 HE 및 FW는 0.1 및 0.5 g 첨가구에 비해 1.0 g 첨가구에서 유의적으로 산가가 낮았다. 반면에 그 외 시료에서는 유의차가 없었다. 와

송 추출물 첨가구는 대조구 및 BHT 첨가구보다 낮은 산가를 보였다.

180°C 저장의 경우(Table 3-45)에서도 이와 유사한 경향으로 가열 저장 초기부터 시간이 길어질수록 산가는 상승되어 60°C 저장에 비해 약 2배 이상으로 높았으며, HE를 첨가하여 36시간 가열한 후 0.5 g이상에서 유의차를 보였을 뿐 그 외의 농도에서는 유의차가 없었다.

Table 3-44. Changes of acid value in soybean oil containing Wa-song extracts during storage at 60°C

| Samples ¹⁾ | Added Sample vol. (g/100 mL soybean oil) | Storage period (days) | | | |
|-----------------------|--|------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | | 7 | 14 | 21 | 28 |
| HW | 0.1 | 0.18±0.08 ^a | 0.27±0.00 ^a | 0.50±0.10 ^b | 0.83±0.03 ^c |
| | 0.5 | 0.18±0.08 ^a | 0.27±0.01 ^a | 0.42±0.02 ^b | 0.81±0.08 ^c |
| | 1.0 | 0.14±0.00 ^a | 0.25±0.02 ^b | 0.36±0.05 ^c | 0.73±0.03 ^d |
| HE | 0.1 | 0.18±0.08 ^a | 0.32±0.08 ^b | 0.40±0.02 ^b | 0.82±0.08 ^{cB} |
| | 0.5 | 0.16±0.02 ^a | 0.31±0.05 ^b | 0.35±0.07 ^b | 0.76±0.05 ^{cB} |
| | 1.0 | 0.14±0.01 ^a | 0.27±0.00 ^b | 0.35±0.06 ^b | 0.63±0.07 ^{c7A} |
| FW | 0.1 | 0.26±0.02 ^a | 0.57±0.03 ^{bB} | 0.64±0.04 ^{bB} | 1.10±0.11 ^{cB} |
| | 0.5 | 0.25±0.03 ^a | 0.45±0.03 ^{bA} | 0.55±0.00 ^{cAB} | 1.04±0.06 ^{dB} |
| | 1.0 | 0.24±0.03 ^a | 0.44±0.08 ^{bA} | 0.47±0.07 ^{bA} | 0.89±0.02 ^{cA} |
| Control | | 0.30±0.06 ^a | 0.59±0.04 ^b | 0.77±0.07 ^b | 1.29±0.17 ^c |
| BHT (0.02%) | | 0.27±0.01 ^a | 0.64±0.03 ^b | 0.78±0.00 ^c | 1.33±0.02 ^d |

¹⁾Refer to the Table 3-26

^{a-d}Means with different superscripts in the same row significantly difference(p <0.05).

^{A-D}Means with different superscripts in the same column and same sample significantly difference(p <0.05).

Table 3-45. Changes of acid value in soybean oil containing Wa-song extracts during heating at 180°C

| Samples ¹⁾ | Added Sample vol. (g/100 mL soybean oil) | Heating time (hours) | | | |
|-----------------------|--|-------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|
| | | 12 | 24 | 36 | 48 |
| HW | 0.1 | 0.40±0.00 ^{aA} | 0.62±0.08 ^b | 1.64±0.08 ^c | 2.36±0.08 ^d |
| | 0.5 | 0.62±0.04 ^{aC} | 0.76±0.08 ^b | 1.56±0.08 ^c | 2.36±0.08 ^d |
| | 1.0 | 0.53±0.00 ^{aB} | 0.76±0.08 ^b | 1.51±0.08 ^c | 2.21±0.10 ^d |
| HE | 0.1 | 0.36±0.08 ^a | 0.49±0.08 ^a | 1.24±0.08 ^{bB} | 1.78±0.08 ^c |
| | 0.5 | 0.18±0.08 ^a | 0.49±0.08 ^b | 0.98±0.08 ^{cA} | 1.78±0.08 ^d |
| | 1.0 | 0.22±0.08 ^a | 0.49±0.08 ^b | 0.84±0.08 ^{cA} | 1.74±0.02 ^d |
| FW | 0.1 | 0.36±0.08 ^a | 0.76±0.08 ^b | 2.09±0.08 ^c | 2.62±0.08 ^d |
| | 0.5 | 0.51±0.03 ^a | 0.76±0.08 ^b | 1.96±0.08 ^c | 2.49±0.08 ^d |
| | 1.0 | 0.44±0.08 ^a | 0.71±0.08 ^b | 1.91±0.08 ^c | 2.49±0.08 ^d |
| Control | | 0.18±0.08 ^a | 0.44±0.08 ^b | 0.84±0.08 ^c | 1.69±0.08 ^d |
| BHT (0.02%) | | 0.16±0.01 ^a | 0.44±0.03 ^b | 0.80±0.02 ^c | 1.58±0.03 ^d |

¹⁾Refer to the Table 3-26

^{a-d}Means with different superscripts in the same row significantly difference (p < 0.05).

^{A-D}Means with different superscripts in the same column and same sample significantly difference (p < 0.05).

Table 3-46. Changes of acid value in lard containing Wa-song extracts during storage at 60°C

| Samples ¹⁾ | Added Sample vol. (g/100mL lard) | Storage periods (days) | | | |
|-----------------------|----------------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| | | 7 | 14 | 21 | 28 |
| | | (mg/g) | | | |
| HW | 0.1 | 0.27±0.00 ^{aB} | 0.76±0.08 ^b | 0.86±0.08 ^b | 0.89±0.08 ^b |
| | 0.5 | 0.24±0.05 ^{aB} | 0.72±0.09 ^b | 0.81±0.02 ^b | 0.84±0.08 ^b |
| | 1.0 | 0.14±0.02 ^{aA} | 0.63±0.08 ^b | 0.76±0.08 ^c | 0.79±0.02 ^c |
| HE | 0.1 | 0.16±0.03 ^a | 0.65±0.12 ^b | 0.84±0.08 ^c | 0.85±0.10 ^c |
| | 0.5 | 0.14±0.02 ^a | 0.61±0.07 ^b | 0.80±0.13 ^c | 0.82±0.09 ^c |
| | 1.0 | 0.12±0.02 ^a | 0.59±0.02 ^b | 0.72±0.10 ^c | 0.78±0.05 ^c |
| FW | 0.1 | 0.15±0.01 ^a | 0.58±0.08 ^b | 0.84±0.08 ^c | 1.20±0.14 ^d |
| | 0.5 | 0.14±0.02 ^a | 0.57±0.06 ^b | 0.79±0.02 ^c | 1.12±0.05 ^d |
| | 1.0 | 0.12±0.01 ^a | 0.51±0.03 ^b | 0.76±0.08 ^c | 1.08±0.10 ^d |
| Control | | 0.12±0.02 ^a | 0.49±0.08 ^b | 0.84±0.08 ^c | 1.11±0.12 ^d |
| BHT (0.02%) | | 0.14±0.02 ^a | 0.47±0.04 ^b | 0.82±0.03 ^c | 1.09±0.09 ^d |

¹⁾Refer to the Table 3-26

^{a-d}Means with different superscripts in the same row significantly difference(p <0.05).

^{A-D}Means with different superscripts in the same column and same sample significantly difference(p <0.05).

돈지에 와송 추출물을 첨가하여 60°C에 저장한 경우(Table 3-46), 저장기간이 길어질수록 산가가 높아졌으나, 저장 28일 동안 HW 첨가구의 변화가 가장 적었으며, FW 첨가구는 저장 초기 산가가 낮았으나, 저장 28일 후 1.08~1.20 mg/g의 범위로 가장 높은 함량을 나타내었다. 또한 저장 28일에 HW, HE는 대조구 및 BHT 첨가구보다 산가가 낮아, 대두유의 저장시 와송 열풍건조 시료가 유지의 유리지방산 생성을 감소시킬 수 있을 것으로 예상된다.

180°C에서 가열 저장한 경우에는(Table 3-47), 대두유의 가열 저장에 비해 가열 12시

간 후 산가의 차이가 두드러지게 높았으며, 가열시간이 길어질수록 유의성있게 증가되었다. 대조구 및 BHT 첨가구보다 산가가 높았으나 24시간 가열 후 1.0 g 첨가시 HE 및 FW 첨가구, 48시간 후에는 HW 및 FW 첨가구에서 유의성 있는 감소를 보였다. 12시간 및 36시간 가열 후에는 시료의 농도 증가에 따른 유의적인 차이를 보이지 않았다.

Table 3-47. Changes of acid value in lard containing Wa-song extracts during heating at 180°C

| Samples ¹⁾ | Added Sample vol. (g/100 mL lard) | Heating time (hours) | | | |
|-----------------------|-----------------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|--------------------------|
| | | 12 | 24 | 36 | 48 |
| | | (mg/g) | | | |
| HW | 0.1 | 0.89±0.08 ^a | 1.24±0.08 ^b | 1.69±0.08 ^c | 2.27±0.06 ^{dC} |
| | 0.5 | 0.98±0.08 ^a | 1.22±0.04 ^b | 1.64±0.08 ^c | 2.17±0.03 ^{dB} |
| | 1.0 | 0.84±0.08 ^a | 1.21±0.02 ^b | 1.51±0.08 ^c | 2.07±0.05 ^{dA} |
| HE | 0.1 | 0.78±0.02 ^a | 1.24±0.08 ^{bC} | 1.64±0.08 ^c | 2.26±0.05 ^d |
| | 0.5 | 0.76±0.08 ^a | 1.16±0.08 ^{bB} | 1.60±0.00 ^c | 2.22±0.08 ^d |
| | 1.0 | 0.71±0.08 ^a | 1.02±0.08 ^{bA} | 1.51±0.08 ^c | 2.18±0.08 ^d |
| FW | 0.1 | 0.84±0.08 ^a | 1.24±0.08 ^{bB} | 1.56±0.08 ^c | 2.18±0.08 ^{dB} |
| | 0.5 | 0.76±0.08 ^a | 1.20±0.00 ^{bB} | 1.47±0.00 ^c | 2.09±0.08 ^{dAB} |
| | 1.0 | 0.80±0.00 ^a | 0.98±0.08 ^{bA} | 1.42±0.08 ^c | 1.96±0.06 ^{dA} |
| Control | | 0.71±0.08 ^a | 1.11±0.08 ^b | 1.29±0.08 ^c | 1.78±0.08 ^d |
| BHT (0.02%) | | 0.56±0.01 ^a | 0.76±0.02 ^b | 1.13±0.01 ^c | 1.58±0.03 ^d |

¹⁾Refer to the Table 3-26

^{a-d}Means with different superscripts in the same row significantly difference(p <0.05).

^{A-D}Means with different superscripts in the same column and same sample significantly difference(p <0.05).

(4) 과산화물가(Peroxide value)의 변화

와송 추출물을 첨가한 대두유 및 돈지의 POV를 측정한 결과는 Table 3-48 ~ 3-51과 같다. 60°C에서 저장할 경우(Table 3-48)에 180°C로 가열 저장한 것(Table 3-49)보다 10배 이상으로 POV가 높게 생성되어 POV의 생성은 저장 온도보다 저장 기간에 더 큰 영향을 받는 것이라고 생각된다. 대두유에 와송 추출물을 첨가하여 60°C에서 저장한 경우 대두유 100 mL에 FW를 1.0 g 첨가한 경우 저장 14일 이후 POV가 유의적으로 감소되었다. HW 및 HE는 저장 28일 후에 1.0 g 첨가시 유의적인 감소가 나타남을 알 수 있었다. 이는 180°C에서 가열한 경우에도 마찬가지였으며, 36시간 가열 후 모든 시료 추출물 첨가구는 대조구보다 POV가 낮았으나, 48시간 가열 후에는 HW 및 HE 첨가구에서 대조구보다 낮은 POV를 나타내었다.

돈지에 와송 추출물을 첨가하여 60°C에 저장할 경우(Table 3-50) 저장 14일까지는 시료의 농도 증가에 따른 유의적인 차이가 없었으며, 저장 기간의 경과에 따른 차이도 크지 않았다. 저장 21일 후에는 시료의 첨가량이 많아질수록 모든 시료 첨가구에서 POV가 유의적으로 감소되는 경향이었으며, 저장 28일 후에는 HE 및 FW에서만 농도 증가에 따른 POV의 유의적인 감소가 나타났다.

180°C에서 가열할 경우에는 가열 12시간 후에는 첨가구 모두에서 대조구 및 BHT 처리구보다 POV가 높았다(Table 3-51). 그러나 가열 24시간 후에는 HW 첨가구에서 2.72~2.96의 범위로 대조구보다 낮은 POV를 나타내었고, 특히, 1.0 g의 시료 첨가시 농도에 따른 유의차를 보였다. 36시간 후에는 다시 와송 추출물 첨가구의 POV가 대조구에 비해 점차 높아지는 경향이었으나, 시료의 첨가 농도 증가에 따른 POV의 감소는 유의성 있게 나타났다. 48시간 후 HW 첨가구에서 POV가 가장 낮았으나, 대조구 및 BHT 첨가구보다는 높은 값이었다.

Table 3-48. Changes of peroxide value in soybean oil containing Wa-song extracts during storage at 60°C

| Samples ¹⁾ | Added Sample vol. (g/100 mL soybean oil) | Storage period (days) | | | | (meq/kg) |
|-----------------------|--|-------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|----------|
| | | 7 | 14 | 21 | 28 | |
| | | | | | | |
| HW | 0.1 | 7.89±0.61 ^a | 21.08±0.77 ^{bB} | 24.23±0.98 ^c | 25.23±0.68 ^{cB} | |
| | 0.5 | 8.71±0.29 ^a | 19.08±0.68 ^{bA} | 22.87±0.81 ^c | 25.49±0.23 ^{dB} | |
| | 1.0 | 8.83±0.25 ^a | 19.86±0.77 ^{bAB} | 21.97±1.12 ^c | 23.75±0.98 ^{dA} | |
| HE | 0.1 | 9.42±0.77 ^a | 20.30±0.68 ^b | 21.52±0.68 ^c | 23.31±0.23 ^{dA} | |
| | 0.5 | 9.39±0.73 ^a | 19.31±0.93 ^b | 21.96±0.00 ^c | 24.81±0.70 ^{dB} | |
| | 1.0 | 10.13±0.73 ^a | 18.72±0.70 ^b | 20.88±1.11 ^c | 23.04±0.75 ^{dA} | |
| FW | 0.1 | 12.71±0.63 ^a | 19.02±0.62 ^{bB} | 24.01±0.72 ^{cB} | 24.90±0.64 ^{cB} | |
| | 0.5 | 11.77±0.68 ^a | 20.27±0.65 ^{bB} | 23.62±0.68 ^{cB} | 24.89±0.64 ^{dB} | |
| | 1.0 | 12.65±0.67 ^a | 17.53±0.78 ^{bA} | 21.49±0.82 ^{cA} | 22.46±0.64 ^{cA} | |
| Control | | 17.08±1.22 ^a | 28.97±0.53 ^b | 30.92±0.69 ^c | 36.21±0.72 ^d | |
| BHT (0.02%) | | 16.20±0.64 ^a | 29.56±0.80 ^b | 33.69±1.17 ^c | 41.72±0.64 ^d | |

¹⁾Refer to the Table 3-26

^{a-d}Means with different superscripts in the same row significantly difference(p <0.05).

^{A-D}Means with different superscripts in the same column and same sample significantly difference(p <0.05).

Table 3-49. Changes of peroxide value in soybean oil containing Wa-song extracts during heating at 180°C

| Samples ¹⁾ | Added Sample vol. (g/100 mL soybean oil) | Heating time (hours) | | | | (meq/kg) |
|-----------------------|--|-------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|----------|
| | | 12 | 24 | 36 | 48 | |
| | | | | | | |
| HW | 0.1 | 2.33±0.13 ^a | 2.89±0.72 ^a | 4.55±0.72 ^b | 7.70±0.14 ^{cB} | |
| | 0.5 | 2.50±0.05 ^a | 2.07±0.72 ^a | 3.71±0.02 ^b | 7.34±0.21 ^{cA} | |
| | 1.0 | 2.54±0.12 ^a | 2.48±0.00 ^a | 3.66±0.03 ^b | 7.14±0.07 ^{cA} | |
| HE | 0.1 | 2.16±0.10 ^{aA} | 2.78±0.47 ^b | 4.92±0.06 ^c | 6.77±0.21 ^{dC} | |
| | 0.5 | 2.28±0.12 ^{aA} | 2.43±0.04 ^a | 4.30±0.03 ^b | 6.27±0.17 ^{cB} | |
| | 1.0 | 2.52±0.05 ^{aB} | 2.89±0.72 ^a | 4.13±0.72 ^b | 5.88±0.11 ^{cA} | |
| FW | 0.1 | 2.30±0.15 ^a | 2.89±0.72 ^a | 4.67±0.18 ^{bB} | 8.66±0.10 ^{cC} | |
| | 0.5 | 2.53±0.09 ^a | 2.48±0.00 ^a | 4.30±0.16 ^{bA} | 8.18±0.12 ^{cB} | |
| | 1.0 | 2.69±0.27 ^a | 2.89±0.72 ^a | 4.20±0.20 ^{bA} | 7.88±0.18 ^{cA} | |
| Control | | 2.19±0.39 ^a | 2.48±0.00 ^a | 5.42±0.20 ^b | 7.84±0.12 ^c | |
| BHT (0.02%) | | 1.15±0.05 ^a | 1.84±0.08 ^b | 3.74±0.45 ^c | 5.98±0.13 ^d | |

¹⁾Refer to the Table 3-26

^{a-d}Means with different superscripts in the same row significantly difference(p <0.05).

^{A-D}Means with different superscripts in the same column and same sample significantly difference(p <0.05).

Table 3-50. Changes of peroxide value in lard containing Wa-song extracts during storage at 60°C

| Samples ¹⁾ | Added Sample vol. (g/100 mL lard) | Storage period (days) | | | |
|-----------------------|-----------------------------------|-------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|
| | | 7 | 14 | 21 | 28 |
| | | (meq/kg) | | | |
| HW | 0.1 | 19.93±0.70 ^a | 21.15±0.70 ^a | 25.21±0.70 ^{bB} | 28.87±0.70 ^c |
| | 0.5 | 21.15±0.70 ^a | 21.96±0.00 ^a | 24.40±0.00 ^{bAB} | 28.47±0.70 ^c |
| | 1.0 | 20.33±0.70 ^a | 21.55±0.70 ^a | 23.59±0.70 ^{bA} | 27.28±1.22 ^c |
| HE | 0.1 | 16.01±1.01 ^a | 17.69±0.09 ^b | 23.99±0.70 ^{cB} | 29.70±0.73 ^{dB} |
| | 0.5 | 15.93±0.13 ^a | 17.16±1.62 ^a | 20.74±1.22 ^{bA} | 28.57±0.64 ^{cB} |
| | 1.0 | 15.01±0.73 ^a | 16.82±0.45 ^b | 19.92±0.69 ^{cA} | 26.37±0.82 ^{dA} |
| FW | 0.1 | 22.77±0.70 ^a | 24.00±0.71 ^b | 26.03±0.71 ^{cB} | 29.28±0.00 ^{dB} |
| | 0.5 | 22.41±0.67 ^a | 23.59±0.72 ^{ab} | 24.82±0.69 ^{bAB} | 28.50±0.68 ^{cB} |
| | 1.0 | 21.55±0.70 ^a | 22.37±0.70 ^a | 23.18±1.22 ^{aA} | 26.84±1.22 ^{bA} |
| Control | | 24.40±0.00 ^a | 28.87±0.70 ^b | 33.35±0.70 ^c | 36.53±1.80 ^d |
| BHT (0.02%) | | 22.00±1.16 ^a | 26.15±0.85 ^b | 32.55±2.28 ^c | 38.60±1.18 ^d |

¹⁾Refer to the Table 3-26

^{a-d}Means with different superscripts in the same row significantly difference(p <0.05).

^{A-D}Means with different superscripts in the same column and same sample significantly difference(p <0.05).

Table 3-51. Changes of peroxide value in lard containing Wa-song extracts during heating at 180°C

| Samples ¹⁾ | Added Sample vol. (g/100 mL lard) | Heating time (hours) | | | | (meq/kg) |
|-----------------------|-----------------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|----------|
| | | 12 | 24 | 36 | 48 | |
| | | | | | | |
| HW | 0.1 | 2.56±0.05 ^a | 2.96±0.06 ^{bB} | 5.03±0.06 ^{cB} | 8.37±0.22 ^d | |
| | 0.5 | 2.44±0.10 ^a | 2.86±0.07 ^{bB} | 4.75±0.18 ^{cB} | 8.26±0.07 ^d | |
| | 1.0 | 2.33±0.11 ^a | 2.72±0.04 ^{aA} | 4.05±0.52 ^{bA} | 8.08±0.05 ^c | |
| HE | 0.1 | 2.36±0.02 ^a | 3.96±0.08 ^{bC} | 6.73±0.12 ^{cC} | 10.29±0.16 ^{dC} | |
| | 0.5 | 2.57±0.03 ^a | 3.52±0.26 ^{bB} | 5.60±0.11 ^{cB} | 9.31±0.21 ^{dB} | |
| | 1.0 | 2.50±0.33 ^a | 3.12±0.10 ^{bA} | 5.19±0.06 ^{cA} | 8.82±0.15 ^{dA} | |
| FW | 0.1 | 2.64±0.05 ^a | 3.53±0.12 ^{bB} | 6.97±0.18 ^{cC} | 11.43±0.19 ^{dB} | |
| | 0.5 | 2.58±0.06 ^a | 3.18±0.05 ^{bA} | 6.56±0.14 ^{cB} | 10.01±0.03 ^{dA} | |
| | 1.0 | 2.53±0.16 ^a | 3.21±0.09 ^{bA} | 6.17±0.05 ^{cA} | 9.62±0.38 ^{dA} | |
| Control | | 2.11±0.02 ^a | 3.68±0.10 ^b | 4.56±0.22 ^c | 7.33±0.02 ^d | |
| BHT (0.02%) | | 1.32±0.10 ^a | 2.25±0.13 ^b | 4.08±0.13 ^c | 6.23±0.11 ^d | |

¹⁾Refer to the Table 3-26

^{a-d}Means with different superscripts in the same row significantly difference(p <0.05).

^{A-D}Means with different superscripts in the same column and same sample significantly difference(p <0.05).

(5) TBA가의 변화

불포화 지질은 산소와 반응하므로써 과산화 반응이 일어나는데, 이러한 과정이 계속 진행되면 활성산소의 연쇄반응이 일어나 이차 분해산물로 malondialdehyde (MDA)를 생성하게 되는데, 이 물질은 thiobarbituric acid (TBA)와 반응하여 적자색의 복합체를 형성하게 되는데 이는 곧 유지의 산패 척도가 된다. 와송 추출물을 농도별로 첨가하고 대두유 기질에 대한 TBA 생성 억제효과를 측정한 결과 Table 3-52 및 3-53과 같다.

TBA가는 저장기간이 경과할수록 시료의 첨가 농도가 낮을수록 높아지는 경향이었는데, 60°C저장의 경우(Table 3-52), 저장 기간 동안 모든 시료 첨가구에서 대조구 및

BHT 첨가구보다 TBA가가 낮았다. 저장 14일까지는 HW 첨가구에서 다소간 낮은 TBA가를 보였으나, 저장 21일 이후부터는 HE 첨가구에서 TBA가가 낮았다. 그러나 각 시료의 첨가농도 증가에 따른 유의적 차이는 없었다. 180°C에서 가열할 경우(Table 3-53) BHT 첨가구에서 TBA가가 가장 낮았으며, 가열 24시간 후에는 모든 시료 첨가구에서 대조구보다 TBA가가 낮았다. 그러나 가열 36시간 후에는 HW 및 HE 첨가구에서만 대조구보다 낮은 경향이였다.

Table 3-52. Changes of TBA value in soybean oil containing Wa-song extracts during storage at 60°C

| Samples ¹⁾ | Added Sample vol. (g/100 mL soybean oil) | Storage period (days) | | | |
|-----------------------|--|--------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | | 7 | 14 | 21 | 28 |
| HW | 0.1 | 62.90±13.97 ^a | 126.40±32.28 ^{ab} | 189.77±8.91 ^{bc} | 245.00±73.80 ^c |
| | 0.5 | 51.60±8.25 ^a | 110.90±23.55 ^b | 180.73±5.66 ^c | 242.40±28.67 ^d |
| | 1.0 | 51.60±6.75 ^a | 86.70±10.32 ^b | 176.33±3.12 ^c | 195.13±6.21 ^d |
| HE | 0.1 | 71.70±8.25 ^a | 153.33±10.62 ^b | 197.53±20.08 ^c | 198.10±15.82 ^c |
| | 0.5 | 51.50±20.87 ^a | 133.13±13.39 ^b | 156.70±6.95 ^b | 187.80±7.52 ^c |
| | 1.0 | 48.90±14.06 ^a | 120.93±17.77 ^b | 128.30±1.68 ^b | 182.80±9.50 ^c |
| FW | 0.1 | 98.40±6.75 ^a | 176.27±9.56 ^b | 234.20±52.16 ^c | 286.80±23.94 ^c |
| | 0.5 | 87.70±11.61 ^a | 145.97±20.80 ^b | 197.10±2.75 ^c | 267.40±37.29 ^d |
| | 1.0 | 78.80±9.96 ^a | 135.60±8.95 ^b | 183.33±14.34 ^c | 243.97±6.12 ^d |
| Control | | 149.00±5.39 ^a | 236.27±16.35 ^b | 273.43±23.66 ^c | 310.53±14.66 ^d |
| BHT (0.02%) | | 139.43±0.86 ^a | 219.51±5.97 ^b | 254.77±2.29 ^c | 315.28±2.78 ^d |

¹⁾Refer to the Table 3-26

^{a-d}Means with different superscripts in the same row significantly difference(p <0.05).

^{A-D}Means with different superscripts in the same column and same sample significantly difference(p <0.05).

Table 3-53. Changes of TBA value in soybean oil containing Wa-song extracts during heating at 180°C

| Samples ¹⁾ | Added Sample vol. (g/100 mL soybean oil) | Heating time (hours) | | | |
|-----------------------|--|---------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| | | 12 | 24 | 36 | 48 |
| HW | 0.1 | 124.40±5.34 ^{aA} | 186.47±18.06 ^{ab} | 204.60±12.47 ^b | 230.20±9.72 ^c |
| | 0.5 | 147.97±5.61 ^{aB} | 175.60±9.64 ^b | 202.10±18.21 ^c | 221.60±6.14 ^c |
| | 1.0 | 153.90±4.95 ^{aB} | 182.33±7.45 ^b | 199.81±16.88 ^{bc} | 211.91±15.59 ^c |
| HE | 0.1 | 122.47±8.68 ^{aA} | 143.00±5.80 ^{ab} | 169.90±12.76 ^{bc} | 199.00±27.07 ^c |
| | 0.5 | 140.50±4.65 ^{aB} | 142.20±16.09 ^a | 160.60±7.53 ^b | 172.00±1.05 ^b |
| | 1.0 | 136.13±4.92 ^B | 148.75±12.46 | 157.90±31.10 | 161.50±24.32 |
| FW | 0.1 | 125.80±23.87 ^a | 163.37±21.95 ^a | 233.37±14.86 ^{bB} | 266.93±24.40 ^{bB} |
| | 0.5 | 134.60±9.52 ^a | 183.60±4.91 ^b | 214.00±17.36 ^{cA} | 233.83±10.72 ^{cA} |
| | 1.0 | 144.43±23.62 ^a | 178.37±10.55 ^b | 192.40±10.18 ^{bA} | 196.87±20.84 ^{bA} |
| Control | | 136.33±7.77 ^a | 199.87±31.26 ^b | 218.10±5.01 ^{bc} | 235.37±6.06 ^c |
| BHT (0.02%) | | 79.70±2.72 ^a | 94.10±3.04 ^b | 102.20±1.76 ^c | 117.27±4.09 ^d |

¹⁾Refer to the Table 3-26

^{a-d}Means with different superscripts in the same row significantly difference(p <0.05).

^{A-D}Means with different superscripts in the same column and same sample significantly difference(p <0.05).

Table 3-54와 같이 돈지에 와송 추출물을 첨가하여 60°C에서 저장한 경우 저장 7일 후에는 대조구보다 모든 시료 첨가구에서 TBA가 높았으나, 저장 24일 후에는 오히려 낮은 경향이였다. 이러한 현상은 저장 28일 이후까지 지속되었다. FW는 시료의 농도 증가에 따른 TBA의 감소가 유의적으로 나타났으나, 그 외 시료에서는 농도에 따른 유의성은 없었다. 180°C에서 돈지의 가열시 TBA는 대두유보다는 낮은 함량이었으며(Table 3-55), 가열 12시간 후에는 대조구와 시료 첨가구 간의 TBA가 유사한 경

향이였다. 그러나 가열 24시간 이후 와송 추출물 첨가구는 대조구보다 점차 감소되었으며, 48시간 이후까지 지속되는 것으로 나타났다. HW 및 HE는 가열 36시간 이후 농도 증가에 따른 TBA가는 유의적으로 감소하였으며, FW는 24시간 이후 유의차가 있었다. 자동산화 억제력을 가진 시료들이라도 고온 가열 처리시 항산화력은 약화되는 결과를 보였는데 이는 자동산화와 고온 가열산화의 기작이 상이하기 때문이라고 보고되어 있다(Jung MY. et al 1997).

Table 3-54. Changes of TBA value in lard containing Wa-song extracts during storage at 60°C

| Samples ¹⁾ | Added Sample vol. (g/100 mL lard) | Storage period (days) | | | |
|-----------------------|-----------------------------------|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| | | 7 | 14 | 21 | 28 |
| HW | 0.1 | 185.30±11.57 ^a | 195.60±13.49 ^{ab} | 225.00±32.90 ^{bc} | 238.40±1.81 ^c |
| | 0.5 | 182.10±20.52 ^a | 188.50±4.89 ^a | 196.40±12.30 ^a | 231.30±2.67 ^b |
| | 1.0 | 160.90±4.42 ^a | 170.90±36.47 ^a | 173.50±32.49 ^a | 224.10±12.28 ^b |
| HE | 0.1 | 232.10±3.55 ^{bcB} | 247.30±13.94 ^c | 221.50±18.67 ^b | 170.80±4.66 ^a |
| | 0.5 | 185.30±20.04 ^{abA} | 239.80±15.02 ^c | 211.00±19.82 ^{bc} | 170.40±9.95 ^a |
| | 1.0 | 177.00±19.64 ^{aA} | 214.70±11.80 ^b | 174.90±20.43 ^a | 154.30±16.04 ^a |
| FW | 0.1 | 161.17±7.39 ^{ab} | 240.93±15.60 ^{bc} | 267.77±16.88 ^{cC} | 273.80±6.15 ^{cB} |
| | 0.5 | 127.10±5.10 ^{aA} | 201.60±13.43 ^{bb} | 241.53±4.01 ^{cB} | 245.40±16.88 ^{cA} |
| | 1.0 | 118.47±6.13 ^{aA} | 163.60±6.24 ^{ba} | 219.40±3.18 ^{cA} | 223.90±11.70 ^{cA} |
| Control | | 112.40±2.44 ^a | 393.50±18.72 ^b | 430.70±14.70 ^c | 468.10±7.45 ^d |
| BHT (0.02%) | | 99.85±0.96 ^a | 214.97±9.05 ^b | 269.81±15.98 ^c | 285.03±11.82 ^c |

¹⁾Refer to the Table 3-26

^{a-d}Means with different superscripts in the same row significantly difference(p <0.05).

^{A-D}Means with different superscripts in the same column and same sample significantly difference(p <0.05).

Table 3-55. Changes of TBA value in lard containing Wa-song extracts during heating at 180°C

| Samples ¹⁾ | Added Sample vol. (g/100 mL lard) | Heating time (hours) | | | |
|-----------------------|-----------------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | | 12 | 24 | 36 | 48 |
| HW | 0.1 | 119.17±2.02 ^{aA} | 123.93±1.51 ^{bA} | 143.50±1.73 ^{cB} | 152.60±0.95 ^{dC} |
| | 0.5 | 128.90±2.96 ^{aB} | 131.70±2.26 ^{aB} | 136.77±2.70 ^{bA} | 148.50±2.46 ^{cB} |
| | 1.0 | 129.67±1.56 ^{aB} | 130.40±3.37 ^{aB} | 133.07±1.94 ^{aA} | 141.20±2.16 ^{bA} |
| HE | 0.1 | 121.70±1.14 ^a | 131.60±0.96 ^b | 148.30±5.74 ^{cB} | 155.70±1.82 ^{dC} |
| | 0.5 | 119.00±2.13 ^a | 129.50±2.25 ^b | 136.77±3.97 ^{cA} | 144.30±1.59 ^{dB} |
| | 1.0 | 119.27±1.85 ^a | 127.53±1.55 ^b | 134.10±1.35 ^{cA} | 137.83±1.75 ^{dA} |
| FW | 0.1 | 131.60±0.96 ^{aC} | 140.60±0.92 ^{bB} | 151.00±2.04 ^{cC} | 159.43±1.25 ^{dC} |
| | 0.5 | 121.50±2.56 ^{aA} | 137.10±1.20 ^{bB} | 142.70±2.27 ^{cB} | 151.13±2.36 ^{dB} |
| | 1.0 | 127.70±1.35 ^{aB} | 131.90±3.18 ^{abA} | 133.70±1.95 ^{bA} | 144.97±3.14 ^{cA} |
| Control | | 127.20±1.31 ^a | 155.60±0.75 ^b | 161.10±1.20 ^c | 164.20±1.42 ^d |
| BHT (0.02%) | | 83.98±0.67 ^a | 95.44±1.10 ^b | 124.43±3.71 ^c | 148.25±2.42 ^d |

¹⁾Refer to the Table 3-26

^{a-d}Means with different superscripts in the same row significantly difference(p <0.05).

^{A-D}Means with different superscripts in the same column and same sample significantly difference(p <0.05).

본 실험의 결과, 와송 추출물은 합성 항산화제인 BHT보다는 효과가 낮으나, 대조구에 비해 저온 및 고온 저장시 항산화 효과를 나타내어 유지의 저장시 와송 추출물의 첨가는 유지 저장 기간의 연장을 기대할 수 있을 것으로 여겨진다.

마. 생약재복합물 및 와송 추출물의 항산화 활성

와송 추출물의 항산화 활성을 측정함으로써 최적의 와송 추출물을 선정하였다. 와송

추출물의 항산화 효과에 시너지 효과를 부여하기 위하여 생약재복합물을 제조하여 첨가한 후 이의 항산화 활성을 측정하였다.

생약재복합물에 와송 추출물의 첨가량을 달리하여 제조하였으며, 생약재복합물에 대해 동량의 와송 추출물 첨가군(1:1/v:v, MW-1)과 3배의 와송 추출물 첨가군(1:3/v/v, MW-3)으로 구성하여 생약재복합물 및 와송 추출물의 항산화 활성과 비교하였다.

(1) 생약재복합물 및 와송 추출물의 총 페놀 화합물 및 플라보노이드 함량

생약재복합물 및 와송 추출물의 총 페놀 화합물 및 플라보노이드 함량을 측정한 결과 Table 3-56과 같다. 총 페놀 화합물 함량은 생약재복합물에서 115.84 ± 1.56 mg/g이었으며, 생약재복합물 및 와송 추출물을 1:1로 혼합한 MW-1에서 124.49 ± 0.58 mg/g, 1:3으로 혼합한 MW-3에서 99.62 ± 0.79 mg/g으로 시료간에 유의적인 차이를 보였다.

Table 3-56. Total phenolic compounds and flavonoids contents of the medicinal plants composites and Wa-song extracts

| Samples | Phenolic compounds | Flavonoids |
|-----------------------------|------------------------|---------------------|
| | (mg/g extracted solid) | |
| Medicinal plants composites | 115.84 ± 1.56^C | 104.59 ± 0.28^B |
| Wa-song extracts | 73.90 ± 0.22^A | 87.25 ± 1.00^A |
| MW-1 | 124.49 ± 0.58^D | 150.22 ± 6.26^D |
| MW-3 | 99.62 ± 0.79^B | 137.37 ± 2.82^C |

^{A-D}Means with different superscripts in the same column significantly difference.

플라보노이드 함량은 MW-1에서 150.22 ± 6.26 mg/g, MW-3에서 137.37 ± 2.82 mg/g이었으며, 생약재복합물에서는 104.59 ± 0.28 mg/g이었다. 총 페놀 및 플라보노이드 함량은 와송 추출물보다 생약재복합물에서 그 함량이 높았으며, 이들을 혼합한 경우에는 MW-3보다 MW-1의 조성에서 그 함량이 높았다.

(2) 생약재복합물 및 와송 추출물의 DPPH 라디칼 소거능

생약재복합물 및 와송 추출물의 DPPH 라디칼 소거능은 Table 3-57과 같다. DPPH 시약에 의한 라디칼 소거능은 페놀 및 플라보노이드가 함유된 식물 시료에 대한 항산화능의 지표로 알려져 있다. 시료의 첨가량이 증가됨에 따라 라디칼 소거능은 유의적으로 증가되었다. 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 생약재복합물은 $84.71\pm 0.36\%$, 와송 추출물은 $75.34\pm 2.68\%$ 로 생약재복합물의 소거능이 더 우수하였으며, 이들의 혼합물에서는 와송추출물의 첨가량이 많은 MW-3이 MW-1보다 DPPH 라디칼 소거능이 높았다. 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서는 와송 추출물 첨가구에서 $9.88\pm 1.44\%$ 였으나, 여기에 생약재복합물이 혼합되었을 때는 $19.92\pm 0.95\%$ (MW-1) 및 $18.50\pm 7.80\%$ (MW-3)로 상승되었다. 즉, 와송 추출물이 생약재복합물에 혼합되었을 때 DPPH 라디칼에 의한 항산화능의 시너지 효과가 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 낮은 농도에서 두드러진 경향인 것으로 생각되었다.

Table 3-57. DPPH scavenging activity of the medicinal plants composites and Wa-song extracts

| Samples | Concentration($\mu\text{g}/\text{mL}$) | | | |
|-----------------------------|--|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | 100 | 250 | 500 | 1000 |
| Medicinal plants composites | $15.30\pm 0.38^{\text{aA}}$ | $35.88\pm 0.25^{\text{bC}}$ | $57.67\pm 0.69^{\text{cC}}$ | $84.71\pm 0.36^{\text{dC}}$ |
| Wa-song extracts | $9.88\pm 1.44^{\text{aA}}$ | $16.79\pm 0.94^{\text{bA}}$ | $30.21\pm 0.94^{\text{cA}}$ | $75.34\pm 2.68^{\text{dB}}$ |
| MW-1 | $19.92\pm 0.95^{\text{aB}}$ | $37.21\pm 0.07^{\text{bD}}$ | $64.46\pm 1.51^{\text{cD}}$ | $69.13\pm 1.41^{\text{dA}}$ |
| MW-3 | $18.50\pm 7.80^{\text{aB}}$ | $27.04\pm 0.48^{\text{bB}}$ | $47.79\pm 0.44^{\text{cB}}$ | $73.59\pm 1.19^{\text{dB}}$ |

^{a-d}Means with different superscripts in the same row significantly difference.

^{A-D}Means with different superscripts in the same column significantly difference.

(3) 생약재복합물 및 와송 추출물의 환원력

생약재복합물 및 와송 추출물의 환원력은 Table 3-58과 같다. 시료의 환원력은 700 nm에서의 흡광도 값으로 나타내었으며, 흡광도 값이 높을수록 시료의 환원력이 증가하는 것을 의미한다. 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 첨가시 생약재복합물 및 와송 추출물의 환원력은 0.70 ± 0.02 및 0.73 ± 0.10 으로 유의차가 없었다. 반면에 생약재복합물과 와송 추출물이 혼

합된 경우, MW-1은 1.85 ± 0.04 , MW-3은 1.34 ± 0.03 나타나 생약재의 첨가비율이 많은 조성물에서 환원력이 더욱 높았다. 이로써 식물류의 DPPH 라디칼 소거능 및 환원력이 시료 중에 함유된 페놀 및 플라보노이드 함량에 의존적이라는 것을 확인할 수 있었다.

Table 3-58. Reducing power of the medicinal plants composites and Wa-song extracts

(O.D. value)

| Samples | Concentration($\mu\text{g}/\text{mL}$) | | | |
|-----------------------------|--|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| | 100 | 250 | 500 | 1000 |
| Medicinal plants composites | $0.15\pm 0.00^{\text{aB}}$ | $0.27\pm 0.01^{\text{bC}}$ | $0.41\pm 0.00^{\text{cC}}$ | $0.73\pm 0.10^{\text{dA}}$ |
| Wa-song extracts | $0.10\pm 0.01^{\text{aA}}$ | $0.14\pm 0.01^{\text{bA}}$ | $0.22\pm 0.00^{\text{cA}}$ | $0.70\pm 0.02^{\text{dA}}$ |
| MW-1 | $0.19\pm 0.00^{\text{aC}}$ | $0.28\pm 0.01^{\text{bD}}$ | $0.48\pm 0.01^{\text{cD}}$ | $1.85\pm 0.04^{\text{dC}}$ |
| MW-3 | $0.15\pm 0.00^{\text{aB}}$ | $0.21\pm 0.00^{\text{bB}}$ | $0.34\pm 0.01^{\text{cB}}$ | $1.34\pm 0.03^{\text{dB}}$ |

^{a-d}Means with different superscripts in the same row significantly difference.

^{A-D}Means with different superscripts in the same column significantly difference.

(4) 생약재복합물 및 와송 추출물의 ABTs 라디칼 소거능

생약재복합물 및 와송 추출물의 ABTs 라디칼 소거능은 Table 3-59와 같다. 이 방법은 ABTs 라디칼이 시료 중의 항산화성 물질에 의해 제거되어 라디칼 특유의 청록색이 탈색되는 정도를 항산화능으로 나타내는 방법으로 시료의 첨가량이 증가됨에 따라 탈색이 크게 일어남으로써 시료 무첨가구에 대한 라디칼 소거능이 증가되는 것으로 알 수 있다.

1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 시료 첨가시 ABTs 라디칼 소거능은 생약재복합물에서 $85.23\pm 1.67\%$, 와송 추출물에서 $70.64\pm 0.29\%$ 였으며, 와송 추출물의 첨가량이 많은 MW-3은 $94.92\pm 0.11\%$, MW-1은 $92.17\pm 0.05\%$ 로 와송 추출물의 첨가량이 많아질수록 라디칼 소거능이 유의적으로 상승되었다. 이러한 현상은 와송 추출물의 첨가량이 100~250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 일때 MW-3이 MW-1에 비해 약 1.5~1.8배, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 첨가시에는 MW-1이 MW-3에 비해 약 1.3배 증가현상을 보여, 실험에 사용된 농도 범위 중 저농도에서 와송 추출물

의 첨가량에 따른 라디칼 소거능이 두드러지는 경향이였다.

Table 3-59. ABTs radical scavenging of the medicinal plants composites and Wa-song extracts

| Samples | Concentration($\mu\text{g}/\text{mL}$) | | | |
|-----------------------------|--|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| | 100 | 250 | 500 | 1000 |
| Medicinal plants composites | 7.44 \pm 0.81 ^{aB} | 21.12 \pm 0.26 ^{bC} | 38.46 \pm 0.55 ^{cB} | 85.23 \pm 1.67 ^{dB} |
| Wa-song extracts | 0.68 \pm 0.17 ^{aA} | 7.15 \pm 0.08 ^{bA} | 18.79 \pm 1.08 ^{cA} | 70.64 \pm 0.29 ^{dA} |
| MW-1 | 6.81 \pm 0.69 ^{aB} | 17.75 \pm 0.25 ^{bB} | 51.52 \pm 1.89 ^{cC} | 92.17 \pm 0.05 ^{dC} |
| MW-3 | 12.04 \pm 0.612 ^{aC} | 26.71 \pm 0.96 ^{bD} | 38.37 \pm 1.11 ^{cB} | 94.92 \pm 0.11 ^{dD} |

(%)

^{a-d}Means with different superscripts in the same row significantly difference.

^{A-D}Means with different superscripts in the same column significantly difference.

(5) 생약재복합물 및 와송 추출물의 TBARS 함량

TBARS법은 thiobarbituric acid가 polyunsaturated fatty acid에 의해서 생성되는 malonaldehyde(MDA)와 결합하여 생성되는 적색의 축합물을 분광광도계로 측정함으로써 산화정도를 비교할 수 있는 방법이다. 생약재복합물 및 와송 추출물의 TBARS 함량은 시료 무첨가구의 흡광도 값에 대한 시료 첨가구의 흡광도 값을 백분율로 계산하여 반응생성물인 MDA의 생성억제능으로 Table 3-60 및 3-61에 나타내었다. Fe²⁺이온에 대한 지방의 산화 정도는 시료의 Fe²⁺이온에 대한 결합능이 클수록 높은 항산화능을 나타내며, Fe²⁺이온은 그 자체가 강한 지방 산화 촉진 작용을 나타내는 것으로 알려져 있다.

Table 3-60은 FeCl₂이 반응계에 존재할 때 생약재복합물 및 와송 추출물의 MDA 생성억제능을 나타낸 결과로 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 첨가시 생약재복합물(15.10 \pm 0.41%)과 MW-3(13.38 \pm 0.97%)은 유의차가 없었다. 시료의 첨가량이 많아질수록 MDA 생성억제능은 유의적으로 상승되었다. 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 첨가되었을 때 생약재복합물 및 와송 추출물 첨가구간에는 유의차가 없었으나, MW-1은 49.66 \pm 0.56%, MW-3은 50.88 \pm 0.33%로 와송의 첨가량이 많아질수록 유의적으로 증가되었다.

Table 3-60. Effect of the medicinal plants composites and Wa-song extracts on lipid oxidation of oil emulsion containing FeCl₂

(%)

| Samples | Concentration(μg/mL) | | | |
|-----------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | 100 | 250 | 500 | 1000 |
| Medicinal plants composites | 15.10±0.41 ^{aB} | 23.56±0.95 ^{bC} | 32.26±0.12 ^{cA} | 44.18±0.59 ^{dA} |
| Wa-song extracts | 10.93±0.71 ^{aA} | 17.08±0.58 ^{aA} | 31.07±0.72 ^{bA} | 44.43±0.26 ^{cA} |
| MW-1 | 9.64±1.36 ^{aA} | 19.71±0.93 ^{bB} | 31.87±0.31 ^{cA} | 49.66±0.56 ^{dB} |
| MW-3 | 13.38±0.97 ^{aB} | 23.31±0.43 ^{bC} | 35.40±0.38 ^{cB} | 50.88±0.33 ^{dC} |

^{a-d}Means with different superscripts in the same row significantly difference.

^{A-D}Means with different superscripts in the same column significantly difference.

Table 3-61. Effect of the medicinal plants composites and Wa-song extracts on lipid oxidation of oil emulsion containing CuSO₄

(%)

| Samples | Concentration(μg/mL) | | | |
|-----------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | 100 | 250 | 500 | 1000 |
| Medicinal plants composites | 28.86±2.50 ^{aA} | 35.11±1.06 ^{bA} | 50.98±1.70 ^{cA} | 62.38±0.72 ^{dA} |
| Wa-song extracts | 42.09±4.93 ^{aB} | 44.41±1.71 ^{aC} | 53.85±0.64 ^{bB} | 64.11±1.11 ^{cB} |
| MW-1 | 25.76±1.64 ^{aA} | 38.94±0.62 ^{bB} | 53.67±0.64 ^{cB} | 69.40±0.96 ^{dC} |
| MW-3 | 68.63±1.01 ^{aC} | 75.69±0.57 ^{bD} | 81.12±0.41 ^{cD} | 85.50±0.50 ^{dD} |

^{a-d}Means with different superscripts in the same row significantly difference.

^{A-D}Means with different superscripts in the same column significantly difference.

반응계에 CuSO₄가 존재할 때 생약재복합물 및 와송 추출물의 MDA 생성억제능은 Table 3-61에 나타내었다. 시료의 첨가량이 많아짐에 따라 유의적으로 증가하는 경향

이였으며, FeCl₂가 존재하는 반응계보다 MDA 생성억제능이 보다 우수한 경향을 띄었다. 100 µg/mL 첨가시 MW-3은 68.63±1.01%로 가장 높은 활성을 보였으며, 1000 µg/mL 첨가시에도 MW-3은 85.50±0.50%로 여타 시료군에 비해 가장 활성이 높았다. 다음으로 MW-1(69.40±0.96%)이었는데, 생약재복합물 및 와송 추출물 단독으로 첨가된 실험군보다 생약재와 와송이 혼합된 실험군에서 그 활성이 더욱 높은 것으로 나타나 생약재복합물은 와송 추출물의 지질과산화 억제에 유효적인 것으로 판단되었다.

(6) 생약재복합물 및 와송 추출물의 아질산염 소거능

아질산염은 식품 중에 존재함으로써 발암성의 니트로사민(nitrosamine)을 생성시키는 전구물질로 작용하는데, 아질산을 제거할 수 있는 물질로 아스코르브산, 토코페롤, 페놀화합물 등이 있다. 실험상에서 아질산은 이온의 상태로 작용하기 때문에 시료가 이온상태인 아질산과 반응성이 크다면 아질산을 제거에 효과적이므로 이러한 작용에 의해서 아질산 소거능력이 높은 시료는 항산화능력도 높다고 평가되고 있다.

Table 3-62. Nitrite scavenging ability of the medicinal plants composites and Wa-song extracts

| Samples | Concentration(µg/mL) | | | |
|-----------------------------|-------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|
| | 100 | 250 | 500 | 1000 |
| Medicinal plants composites | 2.86±0.64 ^{aA} | 7.18±0.65 ^{bB} | 15.40±0.29 ^{cB} | 35.02±0.43 ^{dB} |
| Wa-song extracts | 2.68±1.02 ^{aA} | 4.18±0.33 ^{bA} | 11.32±0.69 ^{cA} | 28.17±0.71 ^{dA} |
| MW-1 | 3.52±0.42 ^{aA} | 10.57±0.86 ^{bC} | 13.15±3.40 ^{bAB} | 57.89±0.61 ^{cD} |
| MW-3 | 5.07±0.49 ^{aB} | 6.48±1.85 ^{aB} | 9.81±1.42 ^{bA} | 47.04±0.73 ^{cC} |

^{a-d}Means with different superscripts in the same row significantly difference.

^{A-D}Means with different superscripts in the same column significantly difference.

pH 2.5의 반응계에서 생약재복합물 및 와송 추출물의 아질산염 소거능을 측정한 결과 Table 3-62와 같다. 100 µg/mL의 농도에서는 2.68±1.02~5.07±0.49%의 소거능을 보였으며, MW-3에서 유의적으로 소거능이 높았다. 시료의 첨가량이 증가됨에 아질산염 소거능이 유의적으로 증가되기는 하였으나, MW-3은 100~250 µg/mL의 범위에서는 유의차가 없었다. MW-1은 250 µg/mL이상 첨가시 MW-3보다 유의적으로 아질산염 소

거능이 증가되었으며, 1000 µg/mL의 농도에서는 MW-1이 57.89±0.61%로 소거능이 가장 우수하였다.

(7) 생약재복합물 및 와송 추출물의 NO(nitric oxide) 소거능

Nitric oxide는 생체 내에서 NO synthase라는 효소의 촉매작용을 통해 L-arginine으로부터 생성되는 반응성이 강한 자유라디칼이다. NO는 생리적인 현상인 혈압조절과 신경전달 매개체로 작용하며, 면역반응에 중추적인 역할을 하고, chondrocyte와 synoviocyte 같은 뼈를 형성하는 세포에서도 발현된다(Ding AH. et al 1988). 그러나 최근 과량의 NO라디칼 생성이 염증반응을 일으키고 조직의 파괴, 면역 체계이상을 일으키는 원인임이 보고되어 있다(Liang YC. et al 1999).

생약재복합물 및 와송 추출물의 NO라디칼 소거능은 Table 3-63에 나타낸 바와 같이 100 µg/mL 첨가시에는 10% 미만이었으나, 시료 첨가량이 증가됨에 따라 유의적으로 상승하는 경향이였다. 500 µg/mL 첨가시에는 18.67±1.19~ 33.51±2.38%였으며, 1000 µg/mL 첨가시에는 와송 추출물 및 MW-3에서 50% 이상의 NO라디칼 소거능이 있었다. 특히 MW-3의 소거능이 유의적으로 가장 우수하여 생약재복합물이 와송 추출물에 대해 시너지효과가 있는 것으로 생각되었다.

Table 3-63. NO radical scavenging activity of the medicinal plants composites and Wa-song extracts

| Samples | Concentration(µg/mL) | | | |
|-----------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | 100 | 250 | 500 | 1000 |
| Medicinal plants composites | 8.62±1.27 ^{aD} | 19.82±2.00 ^{bC} | 33.51±2.38 ^{cC} | 45.55±2.04 ^{dA} |
| Wa-song extracts | 4.84±1.10 ^{aB} | 9.56±3.02 ^{bAB} | 18.67±1.19 ^{cA} | 51.58±0.73 ^{dB} |
| MW-1 | 2.31±0.14 ^{aA} | 6.38±1.17 ^{bA} | 29.40±2.80 ^{cB} | 48.89±1.79 ^{dB} |
| MW-3 | 5.98±0.73 ^{aB} | 11.96±0.67 ^{bB} | 21.71±0.32 ^{cA} | 57.15±0.69 ^{dC} |

^{a-d}Means with different superscripts in the same row significantly difference.

^{A-D}Means with different superscripts in the same column significantly difference.

(8) 생약재복합물 및 와송 추출물의 tyrosinase 활성 저해능

Tyrosinase는 melanine 생합성 과정의 중요 효소로서 피부노화 및 색소 침착을 일으키며 식품의 갈변화를 일으키는 원인으로 알려져 있다. 식품 가공의 측면에서 볼 때 식품의 갈변화를 억제하기 위한 방안으로 tyrosinase의 활성 억제는 중요한 의미를 지니게 된다. 한편, 피부노화 및 색소의 침착과 관련하여서는 피부의 멜라닌이 세포내 tyrosinase의 생합성 과정에서 만들어지며(Invergar R. et al 1992), 과도한 멜라닌의 생성은 인체에 기미, 주근깨, 검버섯 등과 같은 색소 침착을 일으키고, 피부의 손상을 촉진시키므로 피부 미백효과와 관련하여 중요한 부분이 된다(Kwon MC, et al 2008).

생약재복합물 및 와송 추출물의 tyrosinase 활성 저해능을 측정한 결과는 Table 3-64에 나타난 바와 같다. 100 µg/mL 첨가시 17.37±0.69~19.21±0.96%였는데, 와송 추출물 및 MW-3은 시료의 첨가량이 증가됨에 따라 유의적으로 상승되었다. 250 µg/mL 첨가시에는 20% 이상의 저해능을 보였으며, 1000 µg/mL 첨가시 와송 추출물 및 MW-3에서 각각 37.21±1.16%, 39.49±1.55%의 tyrosinase 활성 저해능을 보여 여타 시료에 비해 유의적으로 활성이 높았다.

Table 3-64. Tyrosinase activity of the medicinal plants composites and Wa-song extracts

| Samples | Concentration(µg/mL) | | | |
|-----------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|
| | 100 | 250 | 500 | 1000 |
| Medicinal plants composites | 18.53±0.96 ^{aAB} | 21.48±1.75 ^{bA} | 23.64±1.49 ^{bA} | 30.46±1.40 ^{cA} |
| Wa-song extracts | 17.37±0.69 ^{aA} | 20.28±0.59 ^{bA} | 26.12±1.69 ^{cB} | 37.21±1.16 ^{dBC} |
| MW-1 | 18.97±0.49 ^{aB} | 21.19±2.64 ^{aA} | 27.17±0.47 ^{bB} | 35.30±1.16 ^{cB} |
| MW-3 | 19.21±0.96 ^{aB} | 26.13±1.00 ^{bB} | 30.82±0.94 ^{cC} | 39.49±1.55 ^{dC} |

^{a-d}Means with different superscripts in the same row significantly difference.

^{A-D}Means with different superscripts in the same column significantly difference.

(9) 생약재복합물 및 와송 추출물의 α -glucosidase 활성 저해능

당뇨와 산화적 스트레스의 관계에 있어 당뇨환자가 건강한 사람에 비해 높은 산화적 스트레스를 받고 있는 것으로 알려져 있다. 글루코시다제는 소장의 상피세포에 존재하는 효소로 이당류 및 다당류를 소화되기 쉬운 형태인 단당류로 가수분해하는 역할을 한다. 글루코시다제에 대한 저해능은 탄수화물 식사 후 혈당 상승을 억제할 수 있어 항당뇨 활성법으로도 활용된다.

생약재복합물 및 와송 추출물의 α -glucosidase 활성 저해능은 Table 3-65와 같다. 시료의 첨가량이 증가됨에 따라 와송 추출물 및 MW-3에서 유의적으로 상승되었다. MW-3은 100~250 $\mu\text{g/mL}$ 의 범위에서 $24.60\pm 0.62\sim 27.37\pm 0.88\%$ 의 저해능이었으나, 500~1000 $\mu\text{g/mL}$ 첨가시에는 $51.96\pm 0.63\sim 62.25\pm 1.02\%$ 로 50%이상의 저해능으로 나타났다. 와송 추출물은 1000 $\mu\text{g/mL}$ 첨가시에만 50% 이상의 저해능이 있었다. 그 외의 시료에서는 50% 미만이었다. 따라서 생약재복합물 및 와송 추출물은 탄수화물의 소화과정에서 α -glucosidase에 의한 단당류 생성을 저해함으로써 식사 후 혈당이 급격히 상승하는 등의 증상에 효과적으로 이용될 수 있는 가능성이 있을 것으로 확인되었다.

Table 3-65. α -glucosidase activity of the medicinal plants composites and Wa-song extracts

| Samples | Concentration($\mu\text{g/mL}$) | | | |
|-----------------------------|-----------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| | 100 | 250 | 500 | 1000 |
| Medicinal plants composites | 17.15 ± 0.43^{aA} | 18.31 ± 1.01^{aA} | 26.40 ± 0.79^{bA} | 34.87 ± 0.74^{cA} |
| Wa-song extracts | 25.35 ± 0.96^{aC} | 29.76 ± 1.32^{bD} | 43.88 ± 2.26^{cC} | 53.05 ± 1.60^{dC} |
| MW-1 | 20.82 ± 1.47^{aB} | 22.75 ± 0.55^{aB} | 34.24 ± 0.98^{bB} | 42.59 ± 1.46^{cB} |
| MW-3 | 24.60 ± 0.62^{aC} | 27.37 ± 0.88^{bC} | 51.96 ± 0.63^{cD} | 62.25 ± 1.02^{dD} |

^{a-d}Means with different superscripts in the same row significantly difference.

^{A-D}Means with different superscripts in the same column significantly difference.

제 4 절 와송의 항당뇨 활성 구명

1. 서 론

최근 우리나라의 급속한 의학 발전과 먹거리의 풍성함으로 인해 국민들이 평균수명이 계속해서 증가되고, 이로 인해 노인인구가 급격히 증가하게 되었고, 따라서 당뇨 등의 만성질환 발생도 증가되고 있다.

당뇨병은 당대사 이상, 단백질과 지질 대사 및 전해질 대사 이상을 초래하여 여러 기관에 영향을 주기 때문에 신장병, 고지혈증 및 심장질환 등의 합병증의 유발 가능성도 매우 높다(Kannel WB. et al 1979). 당뇨 합병증은 인슐린 부족, 당내성의 저하로 나타나는 지질 대사 이상, 지질과산화의 증가 및 항산화 방어계의 변화로 인하여 조직의 손상으로 발병한다. 따라서 당뇨시 엄격한 혈당 조절의 실시로 혈중 콜레스테롤 및 중성지방 함량을 낮추며 반응성의 유리산소 등 산화적 스트레스를 감소시키고 조직의 항산화 방어체계를 강화하여 당뇨병성 미세혈관 등의 합병증의 위험을 감소시키는 것이 중요하다.

당뇨병은 만성적인 관리를 요구하는 질환으로 치료시 발생하는 내성의 문제로 식이요법이 가장 중요한 인자로 대두되고 있으며, 운동요법 및 약물요법으로 혈당을 조절하고 당뇨병성 합병증을 예방하고 있으나, 근본적으로 치료할 수 있는 방법이 없으므로 우리나라에서는 대부분의 당뇨병 환자들이 여러 종류의 민간요법에 의존하고 있다. 현재 사용되고 있는 대표적인 경구용 혈당 강하제는 설폰닐요소제, 메트포르민, 알파글리코시다제 저해제 등 다양한 약물들이 판매되고 있으나, 약제에 따라 저혈당, 간독성, 체중 증가, 복부팽만감 젖산혈증 등의 부작용이 있어 그 사용이 제한될 수 있기 때문에 혈당강하 신소재의 개발은 무엇보다 관심이 높다.

와송의 항산화능에 관한 연구가 이미 수행된 바, 최근 항산화의 주된 관점이 현대인의 노화억제와 질병예방 등과 관련된 기능성 물질의 요구에 있는 것에 착안하여 와송 추출물 및 생약재복합물과 와송 추출물의 혼합급이가 당뇨 유발 흰쥐에 미치는 영향을 구명함으로써 항당뇨 활성을 위한 기능성 식품소재로서 와송의 활용가치를 증대시키고자 하였다.

2. 재료 및 방법

와송 추출물, 생약재복합물과 와송 추출물을 당뇨 유발 흰쥐에 급이하여 사육하므로써 혈당 강하 및 체내 지질대사에 미치는 영향을 조사하였다.

가. 실험동물, 사육조건 및 식이조성

실험동물은 생후 5주된 150 ± 10 g의 Sprague-Dawley계 수컷 성장기 흰쥐를 (주)샘타코(서울)로부터 분양받아, 온도 $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 $50 \pm 5\%$, 명암주기 12시간(07:00~19:00)이 자동설정된 동물사육실에서 1주간 시판 고형사료(Rat, chow, 삼양사)로 적응시켰다. 난괴법에 따라 각 군당 7마리를 사용하였으며, 실험군의 식이조성은 Table 4-1과 같다. 당뇨를 유발하지 않은 정상군(group 1) 및 streptozotocin으로 당뇨를 유발한 당뇨 대조군(group 2), 당뇨 유발 흰쥐에 와송 추출물의 농도를 달리하여 첨가한 당뇨 실험군(group 3~8)으로 구분하여 4주간 실험사육하였다. 와송 추출물은 조제사료에 혼합하여 급이하였으며, 물은 매일 신선한 것을 공급하였다.

나. 당뇨유발

당뇨를 유발하기 위하여 췌장의 β -세포에만 특이적으로 작용하여 다른 장기에는 영향을 미치지 않는 것으로 알려진 streptozotocin을 0.01M citrate buffer (pH 4.5)에 용해하여 1회(50 mg/kgBW) 복강주사하여 당뇨를 유발하였다. 정상군은 동량의 citrate buffer 용액을 복강주사하였다. 당뇨 유발 확인은 streptozotocin을 주사한 48시간 후 공복상태에서 꼬리정맥으로부터 채혈하여 혈당계(Active Blood Glucose Meter, ACCU-CHEK[®], USA)로 혈당을 측정하여 혈당농도가 300 mg/dL이상인 것만을 당뇨 유발인 것으로 간주하고 실험에 사용하였다.

다. 식이섭취량, 식이효율 및 체중측정

실험기간 동안 식이는 매일 오후 5시에 급여하였고 다음날 오전 10시경에 식이섭취량을 조사하였다. 식이섭취량의 오차를 최소화하고자 손실량을 보정하였다. 물은 신선한 상수도수를 공급하였으며 매일 신선하게 공급하였다. 체중은 1주일에 한번씩 일정한 시간에 측정하였으며, 실험기간 동안의 체중증가량을 같은 기간 동안의 총 식이섭취량으로 나누어 식이효율을 구하였다.

Table 4-1. Composition of experimental diets

| Ingredient | Groups | | | | | | | |
|---------------------------|--------|------|------|------|------|------|------|------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| Corn starch | 25.0 | 25.0 | 25.0 | 25.0 | 25.0 | 25.0 | 25.0 | 25.0 |
| Sucrose | 30.0 | 30.0 | 29.9 | 29.5 | 29.9 | 29.5 | 29.9 | 29.5 |
| Casein | 20.0 | 20.0 | 20.0 | 20.0 | 20.0 | 20.0 | 20.0 | 20.0 |
| Corn oil | 15.0 | 15.0 | 15.0 | 15.0 | 15.0 | 15.0 | 15.0 | 15.0 |
| Cellulose | 5.0 | 5.0 | 5.0 | 5.0 | 5.0 | 5.0 | 5.0 | 5.0 |
| Mineral mix ¹⁾ | 3.5 | 3.5 | 3.5 | 3.5 | 3.5 | 3.5 | 3.5 | 3.5 |
| Vitamin mix ²⁾ | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
| DL-Methionine | 0.3 | 0.3 | 0.3 | 0.3 | 0.3 | 0.3 | 0.3 | 0.3 |
| Choline bitartrate | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 |
| HW | - | - | 0.1 | 0.5 | - | - | - | - |
| HE | - | - | - | - | 0.1 | 0.5 | - | - |
| FW | - | - | - | - | - | - | 0.1 | 0.5 |

Group 1: Normal control group. Received only basal diet

Group 2: Diabetic control group. Received only basal diet

Group 3: Diabetic experimental group. HW was added at a dose of 0.1%

Group 4: Diabetic experimental group. HW was added at a dose of 0.5%

Group 5: Diabetic experimental group. HE was added at a dose of 0.1%

Group 6: Diabetic experimental group. HE was added at a dose of 0.5%

Group 7: Diabetic experimental group. FW was added at a dose of 0.1%

Group 8: Diabetic experimental group. FW was added at a dose of 0.5%

¹⁾AIN-76TM mineral mixture ²⁾AIN-76TM vitamin mixture.

라. 경구 당부하 검사

4주간의 실험사육이 끝난 후 실험동물을 14시간 절식시키고 당내성 반응을 확인하기 위해 공복시 꼬리정맥에서 혈액을 채취하여 혈당을 측정하였으며, 각 군별로 glucose (2g/kg)를 경구투여하고 30, 60, 120, 180 및 240 분경에 혈당의 변화를 측정하였다.

마. 실험동물의 처리

실험 최종일에 실험동물을 16시간 절식시킨 후 에테르로 가볍게 마취시켜 심장에서 채혈하였다. 채혈된 혈액은 빙수 중에서 30분간 응고시킨 후 원심분리기(Mega 17R, 한일사)로 3,000 rpm에서 15분간 원심분리시켜 혈청을 얻어 -70°C에 보관해두고 분석용 시료로 사용하였다. 장기(간장, 심장, 신장, 비장)는 채혈 후 즉시 분리시켰으며, 생리식염수로 혈액을 씻은 다음 흡수지로 물기를 제거하고 무게를 측정 후 -70°C에 보관하였다.

바. 혈액 분석

(1) 혈당 측정

실험 사육 최종일에 심장채혈하여 얻은 혈청으로부터 혈당 측정은 glucose 측정용 kit시약(AM 201-k, Asan, Korea)으로 측정하였다. 20 µL의 혈청에 3 mL의 효소시약을 첨가한 후 37°C에서 5분간 incubation한 후 혈청 무첨가구를 대조로 하여 파장 500 nm에서 흡광도를 측정하였다. 혈당 함량은 표준검량선에 의해 mg/dL로 표시하였다.

(2) 당화 헤모글로빈 측정

당화 헤모글로빈 함량은 Hemoglobin A1c (Glycosylated hemoglobin, Asan, Korea)으로 측정하였다. EDTA가 처리된 전혈에서 Helena laboratories kit시약을 사용하여 microcolumn chromatography로 측정하였다. 총 헤모글로빈에 대한 당화 헤모글로빈의 흡광도비에 의해 당화헤모글로빈 함량을 산출하였다.

(3) 지질 함량 분석

혈청의 총 지질 함량은 혈청 20 µL에 phospho-vanillin 시약을 첨가하여 37°C에서 15분간 배양한 후 시료 무첨가구를 대조로 하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 콜레스테롤(total cholesterol) 함량은 총 콜레스테롤 측정용 kit시약(AM 202-k, Asan, Korea), 중성지방(triglyceride)함량은 중성지방 측정용 kit시약(AM 157S-k, Asan, Korea), High density lipoprotein cholesterol (HDL-C) 함량의 측정은 HDL-C 측정용 kit시약(AM 203-k, Asan, Korea)을 사용하여 각각의 효소법에 따라 측정하였다. Low density lipoprotein cholesterol (LDL-C) 함량 및 very low density lipoprotein cholesterol (VLDL-C) 함량의 측정은 다음의 계산식에 의해 산출하였다.

$$\text{LDL-C (mg/dL)} = \text{Total cholesterol} - (\text{HDL-C} + \text{Triglyceride}/5)$$

$$\text{VLDL-C (mg/dL)} = \text{Total cholesterol} - (\text{HDL-C} + \text{LDL-C})$$

(4) GOT 및 GPT 활성 분석

혈청의 GOT (glutamic oxaloacetic transaminase) 및 GPT (glutamic pyruvic transaminase) 활성도는 GOT 측정용 kit (PⅢ 3150, Fugii, Japan) 및 GPT 측정용 kit (PⅢ 3250, Fugii, Japan)로 혈액분석기(DRI-Chem 3500I, Fugii, Japan)에서 분석하였으며, 혈청 1 mL당 karmen unit로 표시하였다.

(5) ALP 및 Amylase 활성 측정

ALP (Alkaline phosphatase) 활성도는 ALP 측정용 kit (AM 105S, Asan, Korea) 시약으로 측정하였다. Amylase 활성도는 amylase 측정용 kit (AMY-S, Asan, Korea) 시약으로 측정하였다.

(6) TBARS 함량 측정

혈청 중 지질과산화물 함량은 혈청 100 μL 에 1/12N 황산용액과 10% phosphotungstic acid를 차례로 가한 후 4,000 rpm에서 10분간 원심분리시켰다. 원심분리 후 침전물에 증류수 및 TBA 시약을 1 mL 가하여 95°C water bath에서 60분간 반응시킨 후 생성된 지질과산화물을 butanol에 이행시켜 532 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(7) 항산화 활성 측정

혈청의 항산화 활성은 혈청 100 μL 에 tris-HCl 완충액(100 mM, pH 7.4)을 1 mL 가하여 혼합한 후 0.5 mM 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 용액 1 mL를 가한 다음 37°C의 암실에서 15분간 반응시켰다. 여기에 chloroform 2 mL를 가하여 3,000 rpm에서 10분간 원심분리시켜 하층부의 chloroform을 취하여 파장 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 항산화 활성은 시료첨가구와 무첨가구의 흡광도 비로 나타내었다.

사. 조직성분 분석

(1) 간장 및 신장조직의 지질 분석

간장 및 신장 조직의 지질 함량은 각 조직 0.5 g에 chloroform : methanol 혼합액

(C:M=2:1, v/v)을 가하여 Poter-Elvehjem tissue grinder (DAIHAN WOS01010, Korea)로 마쇄하여 30 mL로 정용한 다음 냉암소에 하룻밤 정치시켜 지질을 추출하였다. 이를 여과(Watman No. 7)하여 일정량을 취하여 건조시킨 것을 사용하였으며, 간장 및 신장 조직의 지질은 총지질, 총 콜레스테롤 및 중성지방을 상기의 분석방법에 따라 측정하였다.

(2) 간장 조직의 glycogen 함량 측정

간장 조직의 glycogen 함량은 조직 일정량에 30% KOH용액을 가하여 100°C의 water bath상에서 20분간 가열한 후 급냉하였다. 여기에 95% 에탄올을 혼합하여 다시 5분간 가열한 후 3000 rpm에서 4분간 원심분리한 다음 상층액을 제거하였다. 침전물에 증류수를 가하고 0.2% anthrone 용액을 첨가하여 혼합한 다음 가열·냉각한 후 620 nm에서 흡광도를 측정하였다. glucose를 이용하여 동일한 방법으로 얻은 표준검량선으로부터 glycogen 함량을 산출하였다.

(3) 단백질 함량 측정

간장 조직의 단백질 함량은 Lowry 등의 방법에 준하였다. 간장 조직에 10배량의 1.5% KCl 용액을 가하여 균질화하였다. 균질액 0.1 mL에 증류수 및 5.0 mL carbonate-copper 시약을 가하여 실온에서 10분간 정치시켰다. 여기에 1 N Folin-Ciocalteu phenol 시약을 0.5 mL 가한 후 실온에서 30분간 반응시킨 후 750 nm (5-25 µg)에서 흡광도를 측정하였다. Albumin (Sigma, USA)을 이용하여 얻은 표준검량선으로부터 단백질 함량을 계산하였다.

(4) 간장 조직의 conjugated diene(CD) 함량 측정

간장 조직 일정량에 2.0 mL의 Tris-HCl buffer (pH 7.4)를 가하여 균질화한 후 1000×g에서 5분간 원심분리한 상층액을 2 mL 취하여 chloroform과 methanol 혼합액을 6 mL 가하여 3000×g에서 20 분간 재원심분리하였다. Chloroform층을 회수하여 50°C에서 용매를 휘발시키고 3 mL의 cyclohexane에 녹여 250 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(5) 간장 및 신장 조직의 지질과산화물 함량 측정

각 조직 1 g에 1.5% KCl 용액을 넣어 마쇄하여 10% 균질액을 만든 다음, 이를 0.5 mL를 취하여 3 mL의 1% phosphoric acid와 1 mL의 0.6% TBA를 넣어 잘 혼합하였

다. 이것을 95°C water bath에서 45분간 가열한 뒤 4 mL의 butanol를 가하여 발색물질 추출한 다음 3,000 rpm에서 10분간 원심분리한 butanol층의 흡광도(OD₅₃₅₋₅₂₀)를 측정하였다. 조직의 TBARS 함량은 표준용액으로 1,1,3,3-tetraethoxypropane을 사용한 표준 검량선으로부터 산출하였다.

(6) 항산화 활성 측정

간장 및 신장 조직의 항산화 활성은 각 조직 1 g에 1.5% KCl 용액으로 10% 균질액을 제조한 다음 이를 100 µL 취하여 상기와 동일한 방법에 따라 측정하였다.

아. 통계처리

실험으로부터 얻은 결과는 SPSS package를 이용하여 실험군당 평균±표준편차로 표시하였고, 통계적 유의성 검정은 일원배치 분산분석(one-way analysis of variance)을 한 후 $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test를 시행하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 외송 추출물의 항당뇨 활성

(1) 실험동물의 당뇨 유발 확인

Streptozotocin (STZ)의 복강 투여로 실험 동물의 췌장 β-세포의 파괴를 초래하여 당뇨를 유발시킨 결과 Table 4-2와 같이 공복시 혈당 수준이 정상군과 비교하여 유의적으로 높은 수준이었으며, 혈당수준이 300 mg/dL이상인 흰쥐를 선별하여 본 실험을 수행하였다.

(2) 체중의 변화

Table 4-3은 당뇨 유발 흰쥐에 외송 추출물을 급이하여 4주간 실험 사육하는 동안 체중의 변화를 나타낸 결과이다. 정상군은 실험 사육 4주 동안 체중이 증가되었다. 당뇨 대조군은 반대의 경향으로 실험 사육 최종일에 175.0±28.5 g으로 가장 낮은 수치를 나타내었으나, 외송 추출물 투여군과 비교해 볼 때 유의적인 차이는 없었다. 특히 외송의 동결건조 물추출물(FW)을 0.5%로 급이한 8군에서 체중의 증가량이 다소 높았다.

Table 4-2. Fasting blood glucose levels of rats after treatment of STZ

| Group ¹⁾ | Fasting blood glucose(mg/dL) |
|---------------------|------------------------------|
| 1 | 93.8± 22.1 ^a |
| 2 | 439.3± 42.2 ^b |
| 3 | 511.8± 72.9 ^b |
| 4 | 469.4± 80.7 ^b |
| 5 | 461.8± 80.9 ^b |
| 6 | 449.2±119.6 ^b |
| 7 | 476.4±134.9 ^b |
| 8 | 470.6± 68.2 ^b |

¹⁾Refer to the Table 4-1

Values were the mean ± SD for 6-7 rats per group

Values with the same superscript letter within the column were not significantly different.

Table 4-3. Effect of various extracts on body weights of the rats

| Group ¹⁾ | Body weight (g) | | | | |
|---------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | Initial | 1week | 2week | 3week | Final |
| 1 | 190.0±0.0 ^b | 240.0±24.5 ^b | 278.5±30.8 ^b | 302.9±32.5 ^b | 328.4±25 ^b |
| 2 | 201.7±7.5 ^a | 198.0±13.0 ^a | 194.4±26.5 ^a | 184.6±25.5 ^a | 175.0±28.5 ^a |
| 3 | 200.0±0.0 ^a | 197.5±15.5 ^a | 193.4±26.7 ^a | 193.9±33.2 ^a | 195.5±45.3 ^a |
| 4 | 198.0±4.5 ^a | 198.0±11.0 ^a | 198.4±21.5 ^a | 201.0±27.3 ^a | 201.4±29.8 ^a |
| 5 | 202.0±4.5 ^a | 201.0±17.5 ^a | 202.0±34.4 ^a | 200.6±40.2 ^a | 200.4±35.2 ^a |
| 6 | 202.0±4.5 ^a | 202.0±29.7 ^a | 200.7±53.1 ^a | 203.2±63.1 ^a | 208.5±64.5 ^a |
| 7 | 202.0±4.5 ^a | 201.0±8.9 ^a | 196.7±11.8 ^a | 197.6±13.3 ^a | 200.7±16.2 ^a |
| 8 | 200.0±0.0 ^a | 209.0±13.4 ^a | 209.5±17.7 ^a | 214.4±19.6 ^a | 215.4±20.0 ^a |

¹⁾Refer to the Table 4-1

Values were the mean ± SD for 6-7 rats per group

Values with the same superscript letter within the column were not significantly different.

(3) 식이섭취량, 물섭취량 및 식이효율

당뇨 유발 흰쥐에 와송 추출물을 급이하여 4주간 실험사육하는 동안 식이섭취량, 물 섭취량 및 식이효율은 Table 4-4와 같다. 식이섭취량은 정상군에 비해 당뇨 대조군에서 유의적으로 높았으며, 와송 추출물 급이군간의 유의적인 차이는 없었으나, 당뇨 대조군에 비해서는 유의적으로 낮았다. 물 섭취량은 당뇨 유발로 인하여 정상군에 비해 월등히 상승하였으며, 와송 추출물 급이군(3~8군)에서는 당뇨 대조군에 비해서는 유의적으로 낮은 섭취량을 보였다. 식이효율은 당뇨 유발시 감소되었으며, 당뇨 유발군에서 와송 추출물의 급이유무에 따른 유의차가 없었다.

Table 4-4. Effect of various extracts on food intake, water intake and food efficient ratio (FER) in the rats

| Group ¹⁾ | Food intake (g/100g bw/day) | Water intake (mL/rat/day) | FER ²⁾ |
|---------------------|--------------------------------|------------------------------|-------------------------|
| 1 | 6.0±0.3 ^a | 30.2±3.1 ^a | 7.04±1.04 ^b |
| 2 | 16.2±1.1 ^d | 196.8±12.9 ^d | -1.04±0.92 ^a |
| 3 | 12.2±1.1 ^c | 170.8±18.7 ^c | -0.48±1.99 ^a |
| 4 | 11.6±1.0 ^{bc} | 159.6±9.5 ^{bc} | 0.04±1.17 ^a |
| 5 | 11.5±1.0 ^{bc} | 152.4±21.4 ^{bc} | -0.22±1.4 ^a |
| 6 | 11.2±1.8 ^{bc} | 149.5±21.1 ^{bc} | 0.08±2.39 ^a |
| 7 | 11.8±1.2 ^{bc} | 156.7±24.0 ^{bc} | -0.12±0.45 ^a |
| 8 | 10.3±0.9 ^b | 139.2±15.5 ^b | 0.59±0.92 ^a |

¹⁾Refer to the Table 4-1

²⁾FER : Food Efficiency Ratio

Values were the mean ± SD for 6-7 rats per group

Values with the same superscript letter within the column were not significantly different.

(4) 경구 당부하 검사 (OGTT)

경구 당 부하검사를 통한 와송 추출물의 섭취가 당뇨쥐의 내당능에 미치는 영향을 조사한 결과 Fig. 4-1에 나타낸 바와 같다. 정상군의 경우 공복시 혈당인 87.3±2.3 mg/dL이었으며, 포도당의 투여 30분 후에 혈당이 급격하게 상승하여 최고치를 나타내었으나, 120분 후에는 공복시 혈당 수준으로 감소되었다. 당뇨 대조군은

포도당의 투여 후 시간의 경과에 따라 혈당이 지속적으로 증가되어 240분 후에 393.0±1.4 mg/dL에 이르렀다. 와송 추출물의 급이군에서는 포도당 투여 240분 후에 와송 열풍건조 물추출물(HWE) 급이군(group 3)을 제외한 모든 실험군에서 당뇨 대조군에 비해 유의적인 차이로 감소되었다. 따라서 당뇨 유발시 와송 추출물의 급이는 혈당의 저하에 유효한 것으로 판단된다.

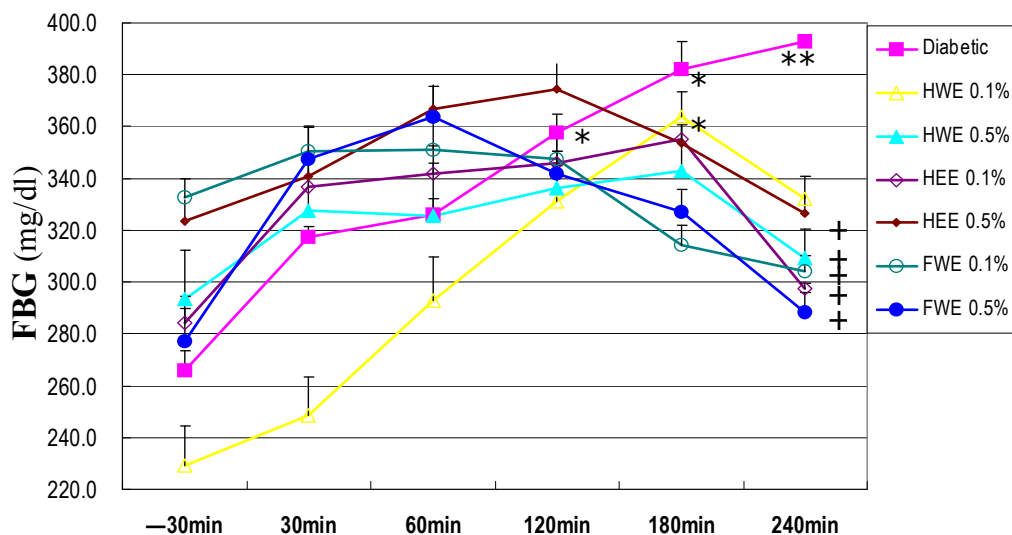


Fig. 4-1. Effect of various extracts on OGTT in the rats
 Compared with -30min within same group * p<0.05; ** p<0.01
 Compared with diabetic control group at every same time + p<0.05.

(5) 장기 무게의 변화

간장, 신장, 심장 및 비장의 무게는 Table 4-5와 같다. 신장, 심장 및 비장의 무게는 정상군과 당뇨 대조군간에 유의적인 차이를 보였으나, 당뇨 유발군에서 와송 추출물의 급이에 따른 유의적인 차이는 보이지 않았다. 특히 신장의 경우 당뇨 대조군에서 정상군에 비해 높게 나타났으나, 간장의 경우 반대되는 경향이었다.

Streptozotocin으로 유발된 당뇨쥐의 경우 당뇨로 인한 면역기능의 저하를 보이며 인슐린 분비가 저감되어 당대사가 정상적으로 이루어지지 않아 간장 및 신장의 무게가 증가된다는 연구보고가 있는데, 본 실험의 결과 신장의 무게는 이와 잘 일치하였으나 간장의 무게는 상반된 경향을 나타내었다. 또한 H/B 비율의 상승은 콜레스테롤, 중성지방, 인지질의 축적으로 인한 심장계통 질환의 유발 가능성을

예견할 수 있는 데이터로 활용될 수 있다.

Table 4-5. Effect of various extracts on liver, kidney, heart and spleen weight of the rats

| Group ¹⁾ | Liver (g/rat) | Kidney (g/rat) | Heart (g/rat) | Spleen (g/rat) | H/B ratio ²⁾ (mg/g) |
|---------------------|------------------|-------------------|------------------|-------------------|-----------------------------------|
| 1 | 11.6±2.0 | 2.17±0.25* | 0.96±0.10* | 0.68±0.07* | 2.95±0.32* |
| 2 | 9.1±2.2 | 3.35±0.62 | 0.64±0.17 | 0.36±0.12 | 3.58±0.50 |
| 3 | 10.3±1.7 | 3.30±0.74 | 0.64±0.15 | 0.38±0.14 | 3.27±0.13 |
| 4 | 10.5±1.3 | 3.15±0.19 | 0.64±0.09 | 0.40±0.15 | 3.19±0.12 |
| 5 | 10.3±2.3 | 3.21±0.42 | 0.64±0.16 | 0.45±0.15 | 3.18±0.21 |
| 6 | 10.8±1.6 | 2.80±0.69 | 0.65±0.21 | 0.45±0.23 | 3.14±0.33 |
| 7 | 10.6±1.5 | 2.83±0.46 | 0.66±0.07 | 0.49±0.08 | 3.29±0.08 |
| 8 | 11.0±1.5 | 2.78±0.53 | 0.67±0.08 | 0.51±0.12 | 3.13±0.30 |

¹⁾Refer to the Table 4-1

²⁾H/B ratio : Heart weight : Bodyweight ratio

Values are the mean ± SD for 6-7 rats per group

* Significantly different from the diabetic control group.

(6) 혈당의 변화

당뇨 유발 흰쥐에 와송 추출물을 농도별로 4주간 급여한 후 혈당의 함량을 측정한 결과는 Table 4-6과 같다. 정상군에서 137.5±24.3mg/dL로 가장 낮았으며, 당뇨 대조군에서 449.8±58.8 mg/dL로 유의적으로 높은 수준이었다. 와송 추출물의 급여군에서는 당뇨 대조군에 비해서 유의적으로 낮았으나 와송 추출물의 종류 및 농도에 따른 유의적인 차이는 없었다.

Table 4-6. Effect of various extracts on serum glucose levels

| Group ¹⁾ | Glucose (mg/dL) |
|---------------------|--------------------------|
| 1 | 137.5±24.3 ^a |
| 2 | 449.8±58.8 ^d |
| 3 | 347.8±82.1 ^c |
| 4 | 317.8±70.9 ^{bc} |
| 5 | 291.4±48.0 ^{bc} |
| 6 | 290.0±13.0 ^{bc} |
| 7 | 289.7±19.5 ^{bc} |
| 8 | 260.2±31.3 ^b |

¹⁾Refer to the Table 4-1

Values were the mean ± SD for 6-7 rats per group

Values with the same superscript letter within the column were not significantly different.

(7) 혈액 중 지질 함량

Streptozotocin으로 유발된 당뇨쥐에 와송 추출물을 농도별로 4주간 급이한 후 혈중 지질함량을 측정한 결과는 Table 4-7, 4-8과 같다. 정상군의 총콜레스테롤 함량은 96.0±11.4 mg/dL이었으며, 당뇨 대조군은 115.4±23.5 mg/dL였다. 와송 추출물의 급이시 총콜레스테롤의 함량은 동결건조 물추출물 급이군에서 당뇨 대조군에 비해 유의적으로 감소되었다. 중성지방은 정상군, 당뇨 대조군 및 와송 추출물 급이군간에 유의적인 차이가 없었으나, 당뇨 대조군에 비해서 와송 동결건조 물추출물 급이군(FWE)은 유의적인 감소를 나타내었다. HDL-C은 모든 실험군간에 유의차가 없었다. AI(동맥경화지수)는 당뇨 대조군에서 정상군에 비해 유의적인 수준으로 높았으나 와송 추출물의 급이시 정상군과 유사한 수준으로 회복되어 와송 추출물은 당뇨로 인한 동맥경화 유발 가능성을 감소시킬 수 있을 것으로 생각되었다.

LDL-C은 Table 8과 같이 정상군에 비해 당뇨 대조군에서 유의적으로 높은 값을 나타내었으며, 와송 열풍건조 물추출물(HW) 및 에탄올추출물(HE)의 0.5% 급이군과 동결건조 물추출물의 0.1 및 0.5% 급이군에서는 당뇨 대조군에 비해 유의적인 감소를 보였고 정상군과 유사한 수준으로 나타났다. VLDL-C는 모든 실험군간에 유의적인 차이가 없었다.

Table 4-7. Effect of various extracts on serum total cholesterol, triglyceride, HDL-C and AI levels

| Group ¹⁾ | TC | TG | HDL-C | AI |
|---------------------|--------------------------|--------------------------|------------------------|------------------------|
| | (mg/dL) | | | |
| 1 | 96.0±11.4 ^{ab} | 92.8±10.7 ^{ab} | 63.5±5.3 ^a | 0.52±0.16 ^a |
| 2 | 115.4±23.5 ^b | 121.4±49.3 ^b | 43.2±18.7 ^a | 2.05±1.26 ^b |
| 3 | 105.3±3.9 ^{ab} | 115.0±16.4 ^{ab} | 54.5±14.9 ^a | 1.05±0.57 ^a |
| 4 | 103.4±11.8 ^{ab} | 114.4±24.1 ^{ab} | 54.8±16.7 ^a | 0.93±0.52 ^a |
| 5 | 102.2±11.5 ^{ab} | 90.2±9.4 ^{ab} | 57.8±6.9 ^a | 1.07±0.52 ^a |
| 6 | 101.3±8.9 ^{ab} | 88.8±24.1 ^{ab} | 60.3±13.4 ^a | 0.75±0.44 ^a |
| 7 | 94.7±4.7 ^a | 88.0±23.8 ^{ab} | 57.7±14.3 ^a | 0.71±0.40 ^a |
| 8 | 93.4±9.6 ^a | 76.8±23.9 ^a | 62.4±14.2 ^a | 0.55±0.33 ^a |

¹⁾Refer to the Table 4-1

Values were the mean ± SD for 6-7 rats per group

Values with the same superscript letter within the column were not significantly different.

Table 4-8. Effect of various extracts on serum LDL-C and VLDL-C

| Group ¹⁾ | LDL-C | VLDL-C |
|---------------------|-------------------------|------------------------|
| | (mg/dL) | |
| 1 | 14.0±8.4 ^a | 18.6±2.1 ^{ab} |
| 2 | 48.0±22.1 ^b | 24.3±9.9 ^b |
| 3 | 27.8±13.9 ^{ab} | 23.0±3.3 ^{ab} |
| 4 | 23.9±11.4 ^a | 22.9±4.8 ^{ab} |
| 5 | 32.6±9.9 ^{ab} | 18.0±1.9 ^{ab} |
| 6 | 23.3±16.0 ^a | 17.8±4.8 ^{ab} |
| 7 | 19.4±5.7 ^a | 17.6±4.8 ^{ab} |
| 8 | 15.6±12.6 ^a | 15.4±4.8 ^a |

¹⁾Refer to the Table 4-1

Values were the mean ± SD for 6-7 rats per group;

Values with the same superscript letter within the column were not significantly different.

(8) 혈액 중 GOT 및 GPT 활성

당뇨 유발 흰쥐에 와송 추출물의 급이시 혈중 GOT (glutamic oxaloacetic transaminase) 및 GPT (glutamic pyruvic transaminase) 활성은 Table 4-9와 같다. 정상군의 GOT 및 GPT 활성은 당뇨 대조군에 비해 유의적으로 낮았다. GOT의 활성은 당뇨 대조군과 와송 추출물 급이군간에 유의적인 차이는 없었으나, 와송 추출물 급이시 GOT의 활성이 다소 저하되었다. GPT의 활성도 GOT와 같은 경향이었으나, FW 급이군(group 8)에서 70.6±20.2 unit/L로 당뇨대조군에 비해 유의적으로 활성이 낮았다. GPT는 급만성 간염, 약물 또는 알코올 중독, 간염, 간경변, 폐쇄성 황달, 간암 등의 간질환에서 특이적으로 상승하는데, 와송 추출물의 급이로 이러한 질환의 발병 위험을 감소시킬 수 있을 것으로 기대된다.

Table 4-9. Effect of various extracts on serum GOT and GPT activities of the rats
(unit/L)

| Group ¹⁾ | GOT | GPT |
|---------------------|--------------------------|--------------------------|
| 1 | 152.3±13.5 ^a | 23.5± 9.0 ^a |
| 2 | 301.2±78.5 ^b | 114.2±44.4 ^c |
| 3 | 259.0±49.9 ^b | 102.0±22.5 ^{bc} |
| 4 | 255.6±86.5 ^{1b} | 91.6±31.2 ^{bc} |
| 5 | 243.4±36.6 ^b | 87.0±13.8 ^{bc} |
| 6 | 240.3±76.2 ^b | 84.8±10.2 ^{bc} |
| 7 | 246.0±32.1 ^b | 87.7±11.4 ^{bc} |
| 8 | 223.6±44.9 ^{ab} | 70.6±20.2 ^b |

¹⁾Refer to the Table 4-1

Values were the mean ± SD for 6-7 rats per group

Values with the same superscript letter within the column were not significantly different.

(9) 간장, 신장 및 심장 조직 중 지질 함량

간장, 신장 및 심장 조직으로부터 총콜레스테롤 및 중성지방의 함량을 측정된 결과는 Table 4-10, 4-11과 같다. Table 4-10에서 간장의 총콜레스테롤 함량은 정상군에 비해 당뇨 대조군에서 유의적으로 상승하였다. 이는 HW를 급이한 실험군(group 3, 4)과는 유의차가 없었으나, HE 및 FW를 급이한 실험군과는 유의차를 보였다. 중성지방도 당뇨 대조군에서는 정상군에 비해 2배 이상 높은 함량으로 유의차를 보였으며, HW의 0.1% 급이군(group 3)을 제외한 모든 실험군에서 와송 추추물 급이로 인한 유의적인 차이를 보였다.

Table 4-11은 신장 및 심장의 총콜레스테롤 및 중성지방 함량을 나타낸 결과로서, 신장의 총콜레스테롤 함량은 정상군에 비해 당뇨 대조군에서 유의적으로 높았으며, HE의 0.5% 급이군(group 6)에서 당뇨 대조군에 비해 유의적으로 감소되었다. 중성지방은 HE 0.5% 급이군(group 6)에서 가장 낮은 함량으로 정상군과 비슷한 수준으로 나타났다. 심장에서는 총콜레스테롤 함량의 경우 모든 실험군간에 유의차가

없었으며, 중성지방은 HW의 0.1% 급이군(group 3)을 제외한 와송 추출물 급이군(group 4~8)에서 정상군과 비슷한 수준으로 회복되었다.

Table 4-10. Effect of various extracts on TC and TG levels in liver

(mg/100 g wet tissue)

| Group ¹⁾ | Liver | |
|---------------------|-------------------------|--------------------------|
| | TC | TG |
| 1 | 2.73±0.37 ^a | 6.45±1.83 ^a |
| 2 | 3.27±0.16 ^b | 15.49±3.24 ^d |
| 3 | 2.96±0.16 ^{ab} | 13.52±1.58 ^{cd} |
| 4 | 2.87±0.59 ^{ab} | 11.87±2.02 ^{bc} |
| 5 | 2.62±0.32 ^a | 11.44±1.67 ^{bc} |
| 6 | 2.52±0.39 ^a | 9.10±1.53 ^{ab} |
| 7 | 2.63±0.20 ^a | 11.99±3.70 ^{bc} |
| 8 | 2.57±0.22 ^a | 10.6±2.39 ^{bc} |

¹⁾Refer to the Table 4-1

Values were the mean ± SD for 6-7 rats per group

Values with the same superscript letter within the column were not significantly different.

Table 4-11. Effect of various extracts on TC and TG levels in kidney and heart
(mg/100 g wet tissue)

| Group ¹⁾ | Kidney | | Heart | |
|---------------------|-------------------------|---------------------------|------------------------|-------------------------|
| | TC | TG | TC | TG |
| 1 | 3.06±0.59 ^a | 8.58±1.32 ^{ab} | 0.90±0.18 ^a | 3.06±0.66 ^a |
| 2 | 3.72±0.39 ^b | 12.93±0.78 ^d | 1.01±0.19 ^a | 4.70±1.98 ^b |
| 3 | 3.42±0.45 ^{ab} | 11.56±1.90 ^{cd} | 0.95±0.06 ^a | 3.59±0.88 ^{ab} |
| 4 | 3.27±0.19 ^{ab} | 9.44±0.81 ^{abc} | 0.94±0.06 ^a | 3.38±0.29 ^a |
| 5 | 3.31±0.17 ^{ab} | 9.50±2.82 ^{abc} | 0.85±0.16 ^a | 3.11±0.61 ^a |
| 6 | 3.09±0.40 ^a | 8.15±1.40 ^a | 0.84±0.08 ^a | 2.79±0.87 ^a |
| 7 | 3.47±0.51 ^{ab} | 10.03±2.34 ^{abc} | 0.93±0.12 ^a | 3.11±0.43 ^a |
| 8 | 3.34±0.34 ^{ab} | 11.25±2.71 ^{bcd} | 0.88±0.15 ^a | 2.98±0.74 ^a |

¹⁾Refer to the Table 4-1

Values were the mean ± SD for 6-7 rats per group

Values with the same superscript letter within the column were not significantly different.

(10) 간장 조직의 글리코겐 및 단백질 함량

간장 조직의 글리코겐 및 단백질 함량은 Table 4-12에 나타난 바와 같다. 간장의 글리코겐 함량은 정상군에서 12.249±1.418 mg/g (wet tissue)이었는데, 당뇨 대조군에서는 5.661±1.45 mg/g (wet tissue)로 감소되었다. 당뇨 유발군에 와송 추출물을 급이시킨 결과 간장 글리코겐의 함량은 증가하는 경향을 보였으며, 특히 FW의 0.5% 급이군에서 유의적인 증가를 나타내었다.

간장 조직의 단백질 함량은 정상군에서 9.214±0.788 mg/100 g wet tissue이었으나, 당뇨 대조군에서는 5.487±0.299 mg/100 g (wet tissue)로 유의적인 감소를 보였다. FW의 0.5% 급이군(group 8)에서는 8.048±1.554 mg/100 g (wet tissue)로 당뇨 대조군에 비해서 유의적으로 증가되었다.

당뇨쥐의 간장 글리코겐 함량은 정상군에 비해 낮은 수치로 나타났는데, 이는 췌장의 β-세포의 파괴에 의한 인슐린의 부족으로 글리코겐의 분해가 촉진되거나, 간장 및 근육의 glycogen synthases가 활성화 되어 글리코겐 합성을 촉진하게 되는데

streptozotocin에 의해 당뇨 유발된 흰쥐의 경우 간장 조직의 glycogen synthases phosphatase의 활성이 감소되어지기 때문이다.

Table 4-12. Effect of various extracts on hepatic glycogen and protein content

| Group ¹⁾ | Glycogen content | Total protein content |
|---------------------|-------------------|----------------------------|
| | (mg/g wet tissue) | (mg/100g wet tissue) |
| 1 | 12.249±1.418* | 9.214±0.788 ^c |
| 2 | 5.661±1.450 | 5.487±0.299 ^a |
| 3 | 7.965±3.378 | 6.172±1.151 ^{ab} |
| 4 | 10.905±4.559 | 6.601±2.101 ^{ab} |
| 5 | 10.383±3.994 | 7.053±1.449 ^{ab} |
| 6 | 11.686±6.443 | 7.476±0.982 ^{abc} |
| 7 | 11.158±4.155 | 6.983±1.399 ^{ab} |
| 8 | 13.424±6.898* | 8.048±1.554 ^{bc} |

¹⁾Refer to the Table 4-1

Values are the mean ± SD for 6-7 rats per group

*Significant from diabetic control group p<0.05 (ANOVA followed LSD test).

(11) 간장 조직의 conjugated diene (CD) 함량

당뇨 유발로 인하여 간장 내 지질과산화의 정도를 측정하기 위하여 간장 조직의 conjugated diene 함량을 조직의 중량에 대한 흡광도의 값으로 나타내었다.

Table 4-13에서 보는 바와 같이 정상군에 비해 당뇨 대조군에서 5.301±1.516 O.D/g으로 유의적인 증가현상을 보였다. HW의 0.1% 급이군(group 3)을 제외한 여타의 실험군에서는 당뇨 대조군에 비해 유의적인 감소를 보였고, 정상군과 비교해 보아 유의적인 차이가 없었다. 따라서 와송 추출물을 급이시킬 경우 당뇨 유발에 의해 생성된 체내 지질과산화를 감소시킬 수 있을 것으로 판단되었다.

Table 4-13. Effect of various extracts on CD levels in liver

(O.D/g, wet tissue)

| Group ¹⁾ | Conjugated diene level |
|---------------------|---------------------------|
| 1 | 2.718±0.629 ^a |
| 2 | 5.301±1.516 ^c |
| 3 | 4.248±0.320 ^{bc} |
| 4 | 3.909±0.525 ^{ab} |
| 5 | 3.517±0.723 ^{ab} |
| 6 | 3.48±0.966 ^{ab} |
| 7 | 3.567±0.387 ^{ab} |
| 8 | 3.254±0.660 ^{ab} |

¹⁾Refer to the Table 4-1

Values were the mean ± SD for 6-7 rats per group

Values with the same superscript letter within the column were not significantly different.

(12) 간장 조직의 지질과산화 측정

간장 지질의 과산화 정도를 측정하기 위하여 간장 조직의 TBARS 함량을 측정한 결과 Table 4-14와 같다.

정상군에서는 4.457±0.292 nmol MDA/100 mg(wet tissue)이었는데, 당뇨 대조군에서는 12.552±4.595 nmol MDA/100 mg(wet tissue)로 2배 이상 증가되었다. 와송 추출물의 급이시에는 5.630±2.172~7.772±1.782 nmol MDA/100 mg(wet tissue)의 범위로 0.1% 급이군보다 0.5%의 와송 추출물 급이군에서 다소 감소되기는 하였으나 와송 추출물 급이군간에 유의차가 없었으며, 정상군과 유사한 수준이었다. 당뇨병에서 발생하는 과산화지질은 glucose의 자기산화, 산화적 스트레스, 효소 활성의 변화, 세포막 수송체계의 능력 변화 및 기타 합병증과 관련이 있는 것으로 알려져 있다. 따라서 와송 추출물의 급이로 지질과산화의 감소가 관찰됨에 따라 와송 추출물이 산화적 스트레스의 완화작용이 있는 것으로 기대된다.

Table 4-14. Effect of various extracts on liver TBARS levels

(nmol MDA/100 mg, wet tissue)

| Group ¹⁾ | TBARS levels |
|---------------------|---------------------------|
| 1 | 4.457±0.292 ^a |
| 2 | 12.552±4.595 ^b |
| 3 | 7.772±1.782 ^a |
| 4 | 7.537±3.940 ^a |
| 5 | 6.685±3.225 ^a |
| 6 | 6.411±2.76 ^a |
| 7 | 6.337±2.926 ^a |
| 8 | 5.630±2.172 ^a |

¹⁾Refer to the Table 4-1

Values were the mean ± SD for 6-7 rats per group

Values with the same superscript letter within the column were not significantly different.

(13) 간장 조직의 항산화 활성

당뇨 유발 흰쥐에 와송 추출물을 급이하여 4주간 실험사육한 후 간장조직으로부터 DPPH에 의한 라디칼 소거활성을 측정한 결과는 Table 4-15와 같다.

모든 실험군에서 60%이상의 항산화 활성을 보였다. 정상군은 81.618±6.245%이었으며, 당뇨 대조군은 69.327±1.893%로 정상군에 비해 유의적인 감소를 나타내었다. 와송 추출물 급이시에는 항산화 활성이 상승되는 경향이었는데, 0.5%의 HE 급이군(group 6) 및 FW 급이군(group 8)에서는 각각 77.130±0.727%, 77.778±1.628%로 당뇨 대조군에 비해 유의적인 증가를 보여 항당뇨 및 체내 항산화 활성을 증가시키기 위해서는 와송 추출물의 급이수준을 0.1%보다 0.5%가 적절할 것으로 판단되었다.

Table 4-15. Effect of various extracts on hepatic DPPH radical scavenging ability of the rats

| Group | DPPH scavenging rate (%) |
|-------|------------------------------|
| 1 | 81.618±6.245 ^d |
| 2 | 69.327±1.893 ^a |
| 3 | 69.945±8.432 ^{ab} |
| 4 | 71.898±4.932 ^{abc} |
| 5 | 73.120±1.19 ^{abc} |
| 6 | 77.130±0.727 ^{bcd} |
| 7 | 75.395±0.167 ^{abcd} |
| 8 | 77.778±1.628 ^{cd} |

¹⁾Refer to the Table 4-1

Values were the mean ± SD for 6-7 rats per group

Values with the same superscript letter within the column were not significantly different (p<0.05).

나. 생약재복합물과 와송 추출물의 급이에 따른 항당뇨 활성

생약재복합물에 동량의 와송 추출물(1:1/v:v, MW-1), 생약재복합물에 3배의 와송 추출물(1:3/v:v, MW-3) 첨가군으로 구성하였다. 식이조성은 Table 4-16과 같다.

항당뇨 활성은 당뇨를 유발하지 않은 정상군(Normal) 및 streptozotocin으로 당뇨를 유발한 당뇨군(Diabetic), 당뇨 유발 흰쥐에 생약재복합물을 첨가한 실험군(DMW-0), 당뇨 유발 흰쥐에 동량의 생약재복합물과 와송 추출물을 첨가한 실험군(DMW-1) 및 당뇨 유발 흰쥐에 생약재복합물과 와송 추출물을 1:3의 비율로 첨가한 실험군(DMW-3)으로 구분하여 4주간 실험사육하였다. 생약재복합물과 와송 추출물은 조제사료에 혼합하여 급이하였다.

Table 4-16. Composition of experimental diets

(g/ 100g)

| Ingredients | Groups | | | | |
|----------------------------|--------|----------|-------|-------|-------|
| | Normal | Diabetic | DMW-0 | DMW-1 | DMW-3 |
| Corn starch | 39.74 | 39.74 | 38.74 | 38.74 | 38.74 |
| Sucrose | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Dextrin | 13.2 | 13.2 | 13.2 | 13.2 | 13.2 |
| Casein | 20.0 | 20.0 | 20.0 | 20.0 | 20.0 |
| Corn oil | 7.0 | 7.0 | 7.0 | 7.0 | 7.0 |
| Cellulose | 5.0 | 5.0 | 5.0 | 5.0 | 5.0 |
| Mineral mix. ¹ | 3.5 | 3.5 | 3.5 | 3.5 | 3.5 |
| Vitamin mix. ² | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
| L-Cysteine | 0.3 | 0.3 | 0.3 | 0.3 | 0.3 |
| Choline bitartrate | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 |
| Wa-song extracts | - | - | - | 0.5 | 0.75 |
| Medicinal plant composites | - | - | 1 | 0.5 | 0.25 |

Normal : Normal control group. Received only basal diet

Diabetic : Diabetic control group. Received only basal diet

DMW-0 : Diabetic experimental group. Only medicinal plant composites was added at a dose of 1%

DMW-1 : Diabetic experimental group. Wa-song extracts :medicinal plant composites was 1:1 (w/w)

DMW-3 : Diabetic experimental group. Wa-song extracts :medicinal plant composites was 1:3 (w/w)

¹)AIN-76TM mineral mixture ²)AIN-76TM vitamin mixture.

(1) 체중 변화 및 식이효율

당뇨 유발 흰쥐에 생약재복합물과 와송 추출물을 4주간 급여하는 동안 체중변화, 식이섭취량 및 식이효율을 나타낸 결과는 Table 4-17과 같다.

정상군(Normal), 대조군(Diabetic) 및 실험군(DMW-0, DMW-1, DMW-3)을 비교한 결과 실험사육 최종일의 체중은 정상군이 341.25±33.57 g으로 유의적으로 높았으며, 당뇨 유발군에서는 유의차가 없었다. 식이섭취량은 정상군과 대조군간에 유의차가 적었으며, 생약재복합물과 와송 추출물을 동량으로 급여한 DMW-1에서 유의적으로 높았다.

실험사육 4주간의 체중증가량은 대조군에서 38.33 ± 13.29 g/4 weeks으로 가장 낮았으나, 실험군에서 생약재복합물과 와송 추출물을 급이함으로써 대조군에 비해 유의적으로 증가되었다. 식이효율(FER)은 대조군에 비해 DMW-0에서 가장 높았으나, DMW-1과 DMW-3간에는 유의적인 차이는 적었으나, 와송 추출물의 첨가량이 많은 DMW-3에서 식이효율이 다소 높았다.

Table 4-17. Changes in body weight, food intake and food efficiency ratio in normal and diabetic rats

| Group ¹⁾ | Final body weight (g) | Food intake (g/day) | Total body weight gain (g/4 weeks) | FER ³⁾ |
|---------------------|--------------------------|------------------------|------------------------------------|-----------------------|
| Normal | $341.25 \pm 33.57^{b2)}$ | 18.85 ± 0.76^{ab} | 121.67 ± 13.29^c | 19.67 ± 1.36^d |
| Diabetic | 292.50 ± 24.35^a | 18.72 ± 0.43^a | 38.33 ± 13.29^a | 9.70 ± 1.74^a |
| DMW-0 | 295.00 ± 62.11^a | 19.04 ± 0.54^{abc} | 62.00 ± 8.37^b | 14.42 ± 2.08^c |
| DMW-1 | 295.00 ± 28.78^a | 19.44 ± 0.19^c | 70.00 ± 14.14^b | 10.26 ± 2.68^{ab} |
| DMW-3 | 291.25 ± 39.80^a | 19.27 ± 0.22^{bc} | 67.50 ± 11.65^b | 12.42 ± 2.37^{bc} |

¹⁾Refer to the Table 4-16

²⁾Values are mean \pm SD (n=7)

³⁾FER : Food Efficiency Ratio

NS : not significant

(2) 장기의 중량

당뇨 유발 흰쥐에 생약재복합물과 와송 추출물을 4주간 급이하여 실험사육한 후 간장, 심장, 신장, 고환 및 지라의 무게를 측정된 결과는 Table 4-18과 같다.

간장의 무게는 정상군에서 3.79 ± 0.40 g/100 g이었는데, 당뇨 유발군에서는 $4.76 \pm 0.79 \sim 5.19 \pm 0.60$ g/100 g의 범위로 유의적으로 감소하였다. 신장은 정상군에 비해 대조군, DMW-0, DMW-3에서 유의적으로 감소되었으며, DMW-3은 정상군과 유의차가 적었다. 고환의 무게는 정상군에 비해 대조군에서 유의적으로 감소되었으나, DMW-0 및 DMW-3은 정상군과 유의차가 적었다. 심장 및 지라의 무게는 모든 실험군간에 유의차가 없었다.

Table 4-18. Effect of the medicinal plants composites and Wa-song extracts on organ weight in normal and diabetic rats

(tissue g/100 g body weight)

| Group ¹⁾ | Liver | Heart | Kidney | Testis | Spleen |
|---------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Normal | 3.79±0.40 ^{a2)} | 0.34±0.17 ND | 0.72±0.05 ^a | 0.94±0.08 ^a | 0.18±0.01 ND |
| Diabetic | 5.19±0.60 ^b | 0.35±0.15 | 0.88±0.06 ^b | 1.08±0.04 ^b | 0.20±0.02 |
| DMW-0 | 5.13±0.62 ^b | 0.36±0.02 | 0.88±0.12 ^b | 1.07±0.13 ^{ab} | 0.19±0.01 |
| DMW-1 | 4.91±0.34 ^b | 0.36±0.01 | 0.88±0.09 ^b | 1.10±0.08 ^b | 0.20±0.03 |
| DMW-3 | 4.76±0.79 ^b | 0.35±0.02 | 0.80±0.11 ^{ab} | 1.06±0.14 ^{ab} | 0.20±0.02 |

¹⁾Refer to the Table 4-16

²⁾Values are mean±SD (n=7)

NS : not significant

(3) 생약재복합물 및 와송 추출물의 급이에 따른 경구당부하 검사

경구당부하 검사를 통한 생약재복합물 및 와송 추출물의 섭취가 당뇨쥐의 내당능에 미치는 영향을 조사한 결과 Fig. 4-2와 같다. 정상군은 공복시 혈당이 87.40 mg/dL이었으며, 포도당 급이 60분경에 158mg/dL로 최고치를 보였으며, 120분 경과 후 점차 감소되어 180분 이후에는 96.00 mg/dL로 공복시 혈당과 유의차가 없었다. 대조군(Diabetic)은 공복시 혈당이 208.80 mg/dL이었는데, 포도당 급이 후 180분경까지 유의적인 감소가 없었다.

생약재복합물 및 와송 추출물의 급이군(DMW-0, DMW-1, DMW-2)은 공복시 혈당이 197.60~199.00 mg/dL였으며, 생약재복합물 급이군(DMW-0)은 포도당 급이 30분경에 298.00 mg/dL로 최고치를 보였고, 생약재복합물과 와송 추출물이 1:1로 혼합 급이군(DMW-1)은 포도당 급이 60분경에 287.80 mg/dL로 가장 높은 혈당함량을 보였다. 그 이후에 점차 감소되는 경향이었으나, 180분 이후에도 공복시 혈당 함량보다는 유의적으로 높았다. DMW-3은 포도당 급이 30분경에 278.20 mg/dL로 가장 높았으나, 점차 감소되어 180분 경과후에는 202.00 mg/dL로 공복시 혈당함량과 유사한 수준으로 회복되었다.

(4) 4주간의 혈당변화

당뇨 유발 흰쥐에 생약재복합물 및 와송 추출물을 급여하여 4주 동안 사육하는 동안 혈당의 변화를 혈당계로 측정한 결과는 Fig. 4-3과 같다. 정상군은 실험사육 4주동안 92.83~95.00 mg/dL의 범위로 유의차가 없었다. 대조군(Diabetic)은 당뇨 유발 직후 초기 혈당이 312.17 mg/dL이었는데, 점차 증가하였으며, 실험사육 4주동안 351.00~365.33 mg/dL의 범위로 시간의 경과함에 따른 유의차가 없었다.

와송 추출물의 첨가량을 달리한 DMW-0, DMW-1 및 DMW-3에서는 첨가량이 증가됨에 따라 혈당이 유의적으로 감소되었다.

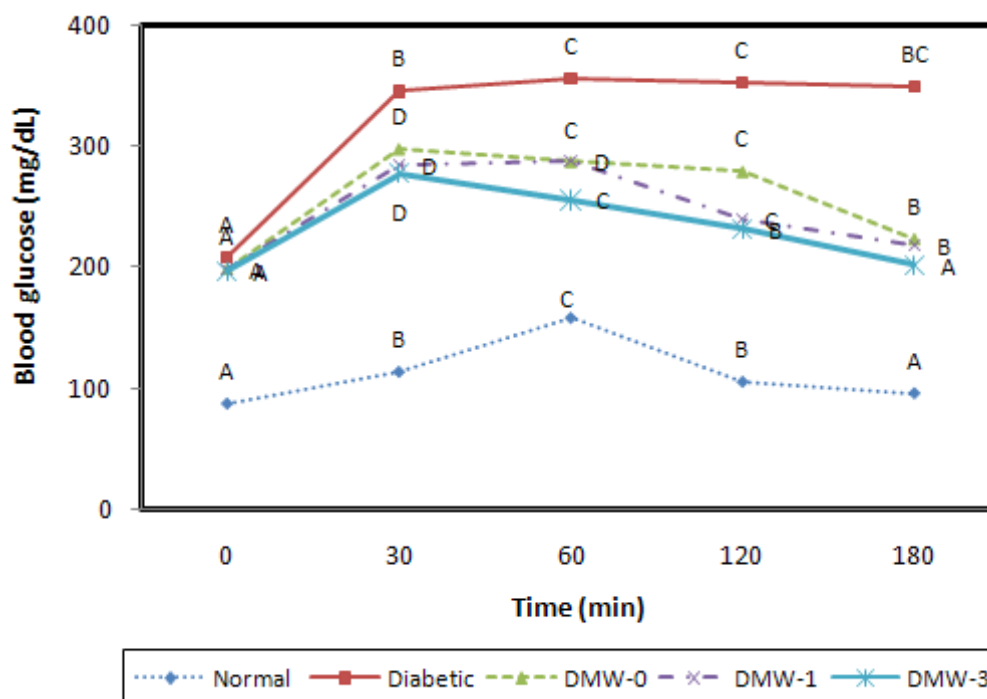


Fig. 4-2. Effect of the medicinal plants composites and Wa-song extracts on OGTT in normal and diabetic rats.
^{A-D}Values in a column sharing the same superscript letter are not significantly different.

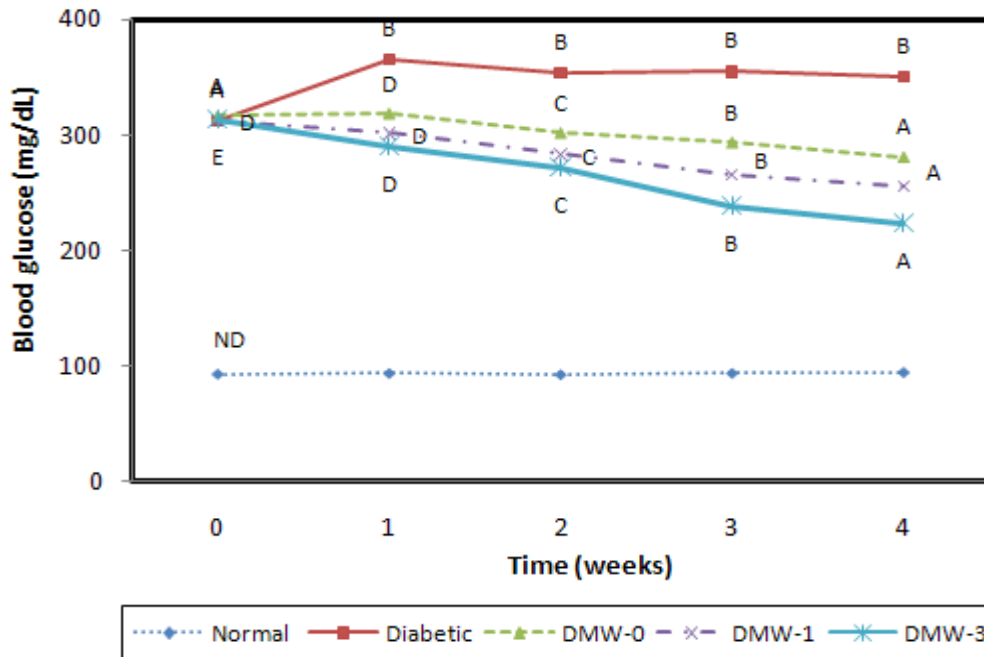


Fig. 4-3. Effect of the medicinal plants composites and Wa-song extracts on glucose content in normal and diabetic rats.
^{A-E}Values in a column sharing the same superscript letter are not significantly different.

(5) 혈당 함량

당뇨 유발 흰쥐에 생약재복합물 및 와송 추출물을 급이하여 4주간 실험사육한 후 최종일에 심장으로부터 얻은 혈액의 혈당을 측정된 결과는 Fig. 4-4와 같다.

정상군은 122.29 mg/dL, 대조군은 324.43 mg/dL이었는데, 생약재복합물 및 와송 추출물을 급이한 DMW-1 및 DMW-3은 각각 272.50 mg/dL, 258.24 mg/dL로 당뇨군에 비해 유의적으로 감소되었다. 상기의 결과와 비교해 볼 때 당뇨쥐에 와송 열풍건조 추출물을 급이한 경우보다 생약재복합물과 혼합급이했을 때 당뇨쥐의 혈당 저하에 더욱 효과적인 것으로 판단되었다.

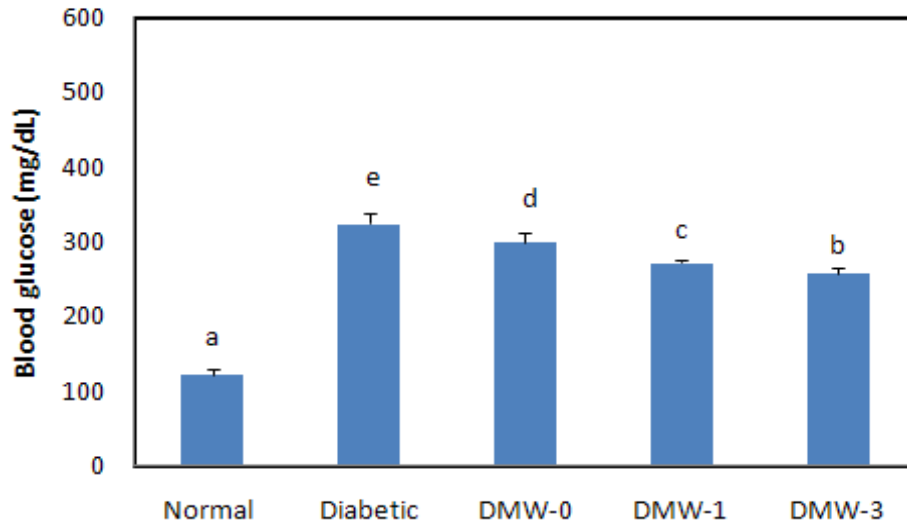


Fig. 4-4. Effect of the medicinal plants composites and Wa-song extracts on glucose in serum of normal and diabetic rats.

^{a-c}Values in a column sharing the same superscript letter are not significantly different.

(6) 당화 헤모글로빈 함량

당뇨유발 흰쥐에 생약재복합물 및 와송 추출물을 급이시켰을 때 혈중 당화 헤모글로빈 함량을 측정한 결과는 Fig. 4-5와 같다. 당뇨병의 경우 신장 기능의 저하로 헤모글로빈 함량이 저하되며, 높은 수준의 혈당은 헤모글로빈과 결합하므로써 당화 헤모글로빈을 형성하게 된다. 즉 당뇨에서 당화 헤모글로빈의 저하는 당뇨 조절에 효과가 있음을 의미한다. 대조군은 정상군에 비해 당화 헤모글로빈의 함량이 유의적으로 증가되었으나, 생약재복합물 급이군(DMW-0) 및 생약재복합물과 와송 추출물의 혼합 급이군(DMW-1, DMW-3)의 경우 당뇨군에 비해 유의적으로 당화 헤모글로빈의 함량이 감소되었다. 따라서 생약재복합물과 와송 추출물의 혼합 급이는 혈중 당화 헤모글로빈의 함량 개선에 효과가 있음을 예상할 수 있었다.

(7) 혈중 단백질 함량

혈중 단백질 함량을 측정한 결과는 Fig. 4-6에 나타낸 바와 같다. 정상군은 4.47 ± 0.28 mg/dL이었으며, 대조군은 4.34 ± 0.25 mg/dL로 유의차가 적었다. 생약재복합물과 와송 추출물을 급이한 실험군에서는 $4.77 \pm 0.31 \sim 4.97 \pm 0.41$ mg/dL의 범위로 유의차는 적었으나, 생약재복합물 급이군(DMW-0)에서 다소 높았다.

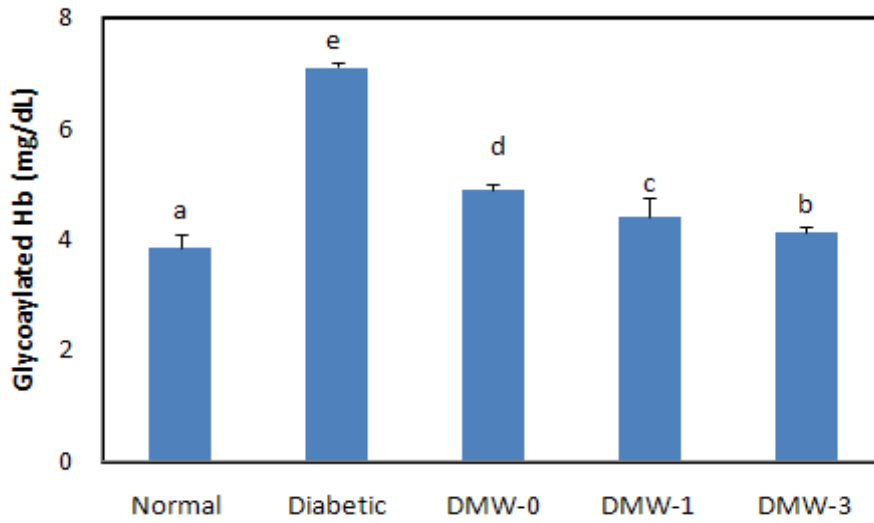


Fig. 4-5. Effect of the medicinal plants composites and Wa-song extracts on glycosylated hemoglobin in serum of streptozotocin induced rats. ^{a-e}Values in a column sharing the same superscript letter are not significantly different.

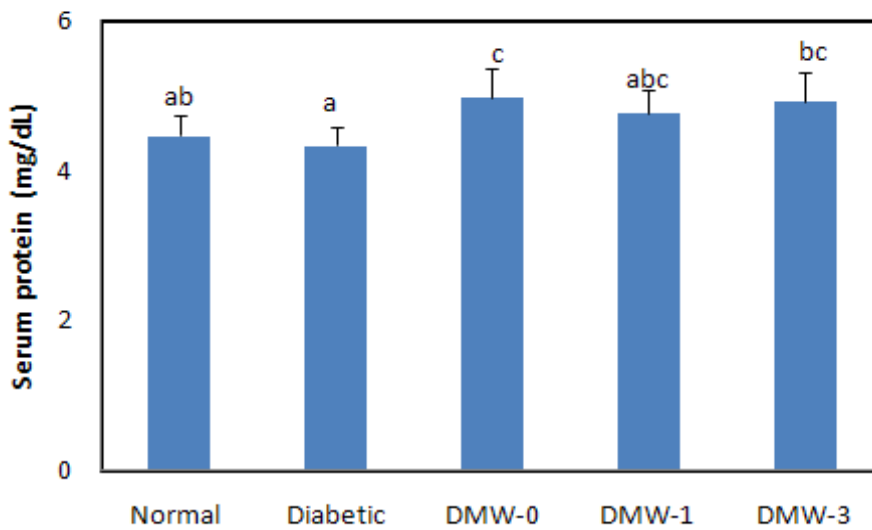


Fig. 4-6. Effect of the medicinal plants composites and Wa-song extracts on serum glucose and total protein content in normal and diabetic rats. ^{a-c}Values in a column sharing the same superscript letter are not significantly different.

(8) 혈청 총 지질, 총 콜레스테롤 및 중성지방 함량

당뇨 유발 흰쥐에 생약재복합물과 와송 추출물을 급이하였을 때 혈청 총 지질, 총 콜레스테롤 및 중성지방 함량을 측정한 결과는 Table 4-19와 같다. 총 지질은 정상군에서 193.26 ± 5.95 mg/dL이었는데, 대조군에서는 287.33 ± 7.78 mg/dL로 당뇨 유발에 의해 유의적으로 증가되었다. 생약재복합물과 와송 추출물을 급이한 실험군에서는 와송의 첨가량이 증가됨에 따라 유의적으로 감소되었으며, DMW-3은 183.86 ± 11.40 mg/dL로 정상군과 유사한 수준으로 회복되었다. 총 콜레스테롤은 정상군에서 47.56 ± 4.32 mg/dL, 대조군에서는 62.05 ± 6.19 mg/dL로 유의적으로 증가되었으며, DMW-0 및 DMW-1에서 정상군과 유의적인 차이가 적었다. 중성지방은 정상군에서 36.97 ± 2.60 mg/dL이었는데, 생약재복합물과 와송 추출물을 급이함으로써 $34.65 \pm 1.25 \sim 38.74 \pm 2.48$ mg/dL의 범위로 정상군과 유사한 함량이었다.

Table 4-19. Effect of the medicinal plants composites and Wa-song extracts on total lipid, total cholesterol and triglyceride in normal and diabetic rats (mg/dL)

| Group ¹⁾ | Total lipid | Total cholesterol | Triglyceride |
|---------------------|-------------------------|------------------------|-----------------------|
| Normal | $193.26 \pm 5.95^{a2)}$ | 47.56 ± 4.32^a | 36.97 ± 2.60^{ab} |
| Diabetic | 287.33 ± 7.78^d | 62.05 ± 6.19^c | 46.12 ± 2.55^c |
| DMW-0 | 262.22 ± 5.81^c | 54.91 ± 3.93^{abc} | 38.74 ± 2.48^b |
| DMW-1 | 246.62 ± 9.37^b | 53.12 ± 8.02^{ab} | 35.06 ± 2.06^a |
| DMW-3 | 183.86 ± 11.40^a | 56.50 ± 2.79^{bc} | 34.65 ± 1.25^a |

¹⁾Refer to the Table 4-16

²⁾Values are mean \pm SD (n=7)

^{a-d}Values in a column sharing the same superscript letter are not significantly different.

(9) 혈청 HDL-C 및 LDL-C 함량

당뇨 유발 흰쥐에 생약재복합물과 와송 추출물을 급이하였을 때 혈청 HDL-C 및 LDL-C 함량을 측정한 결과는 Table 4-20과 같다.

HDL-C는 말초조직 및 혈관벽에 축적된 콜레스테롤을 제거하여 콜레스테롤 에스테르로 만들어 간장으로 운반하여 담즙산으로 배설시킴으로써 혈중 콜레스테롤 농도를

저하시키는데 관여하며(Castelli WP. et al 1986), 혈청 LDL은 세포 표면의 수용체에 결합되어 간장과 기타 조직에서 제거되는데(Goldstein JL과 Brown MS. 1983), LDL 수용체 부위에 결합이 생기거나 활성이 감소되면 LDL이 결합되지 못하고 혈액 중으로 유리됨으로써 혈청 중 LDL 농도가 상승하게 되며, LDL-콜레스테롤은 콜레스테롤의 주된 운반형으로 동맥벽이나 말초조직에 콜레스테롤을 운반, 축적시키므로써 동맥경화를 촉진시키는 인자로 알려져 있다(Smith EB. 1974). 당뇨 유발 흰쥐의 혈청 중 HDL-C의 함량은 정상군에서 36.33 ± 2.15 mg/dL이었으며, 대조군에서 30.00 ± 2.70 mg/dL로 유의적으로 낮았다. 생약재복합물과 와송 추출물을 급이한 실험군 중 DMW-0 및 DMW-1은 대조군과 유의차가 적었으나, DMW-3은 대조군에 비해 유의적으로 상승되어 와송의 첨가량이 증가됨에 따라 당뇨 유발 흰쥐의 혈중 HDL-C의 함량이 증가되는 것으로 나타났다.

LDL-C 함량은 정상군에서 6.56 ± 0.31 mg/dL이었는데, 대조군에서는 21.70 ± 1.73 mg/dL로 약 3배정도 증가되었는데, 생약재복합물과 와송 추출물의 급이로 유의적으로 감소되는 경향이었으며, 특히 DMW-3에서 효과가 가장 높았다.

Table 4-20. Effect of the medicinal plants composites and Wa-song extracts on HDL- and LDL-cholesterol in normal and diabetic rats

| (mg/dL) | | |
|---------------------|------------------------|-----------------------|
| Group ¹⁾ | HDL-C | LDL-C |
| Normal | $36.33 \pm 2.15^{c2)}$ | 6.56 ± 0.31^a |
| Diabetic | 30.00 ± 2.70^a | 21.70 ± 1.73^d |
| DMW-0 | 32.03 ± 2.22^{ab} | 15.80 ± 1.40^{bc} |
| DMW-1 | 33.03 ± 1.88^{abc} | 17.56 ± 2.87^c |
| DMW-3 | 34.35 ± 3.54^{bc} | 13.21 ± 0.74^b |

¹⁾Refer to the Table 4-16

²⁾Values are mean \pm SD (n=7)

^{a-c}Values in a column sharing the same superscript letter are not significantly different at p<0.05

(10) GOT, GTP, ALP 및 amylase 활성

당뇨 유발 흰쥐에 생약재복합물과 와송 추출물을 급이하었을 때 혈청 GOT, GTP,

ALP 및 amylase 활성을 측정한 결과는 Table 4-21과 같다.

GPT는 급·만성 간염, 약물 또는 알콜 중독, 간염, 간경변, 폐쇄성 황달, 간암 등의 간질환에서 특이적으로 상승하는데, GOT는 간질환이외에도 심장, 신장, 골격 및 근육 등의 여러 장기의 침해시에서도 상승하게 된다. 본 연구에서 정상군의 GOT 활성도는 64.80 ± 8.56 u/mL이었는데, 대조군은 81.00 ± 3.87 u/mL로 유의적으로 증가되었다. 생약 재복합물과 와송 추출물을 급이한 실험군에서는 $62.40 \pm 2.88 \sim 68.00 \pm 3.39$ u/mL의 범위였으며, 정상군과 유의차가 적었다. GPT 활성도는 정상군에서 8.60 ± 0.55 u/mL, 대조군에서 13.40 ± 1.52 u/mL로 GOT 활성도와 마찬가지로 유의적으로 증가되었다. 이 또한 생약재복합물과 와송 추출물을 급이함으로써 유의적으로 감소되는 경향이였다.

Table 4-21. GOT, GPT, ALP and Amylase activities of serum in normal and diabetic rats treated with medicinal plants composites and Wa-song extracts

| Group ¹⁾ | GOT | GPT | ALP | Amylase |
|---------------------|------------------------|----------------------|--------------------|---------------------|
| | (unit/mL) | | | |
| Normal | $64.80 \pm 8.56^{a2)}$ | 8.60 ± 0.55^{ab} | 24.90 ± 1.81^a | 632.81 ± 4.55^a |
| Diabetic | 81.00 ± 3.87^b | 13.40 ± 1.52^c | 44.55 ± 3.53^c | 753.13 ± 7.68^e |
| DMW-0 | 68.00 ± 3.39^a | 10.20 ± 1.30^b | 34.51 ± 1.81^b | 726.16 ± 3.03^d |
| DMW-1 | 65.20 ± 5.89^a | 9.75 ± 0.96^b | 34.56 ± 2.74^b | 714.15 ± 1.48^c |
| DMW-3 | 62.40 ± 2.88^a | 7.60 ± 1.14^a | 26.79 ± 1.80^a | 703.70 ± 3.42^b |

¹⁾Refer to the Table 4-16

²⁾Values are mean \pm SD (n=7)

^{a-c}Values in a column sharing the same superscript letter are not significantly different at $p < 0.05$

ALP 활성은 담도 폐쇄시 증가되는데, 고지혈증, 간조직이나 담관의 폐쇄에 의해 간장에서 담즙산 배설에 장애가 발생함으로써 혈청 콜레스테롤 농도가 상승하는 것으로 알려져 있다(Kim KH. 1980). 상기 결과에서 ALP 활성은 정상군에서 24.90 ± 1.81 u/mL 이었는데, DMW-0와 DMW-1에서는 유의차가 없었으며, 와송 추출물의 첨가량이 증가될수록 유의적인 감소를 보였다.

혈중 amylase의 증가는 췌장의 손상을 나타는 지표로 이용되는데, 본 실험에서는 정

상군(632.81±4.55 u/mL)에 비해 당뇨 유발군에서 유의적으로 증가되어 당뇨로 인한 췌장이 손상이 초래된 것으로 인정되었다. 반면에 와송 추출물의 첨가량이 많아짐에 따라 혈중 amylase의 함량은 유의적으로 감소되는 경향이였다.

(11) 혈중 TBARS 함량 및 항산화 활성

당뇨 유발 흰쥐에 생약재복합물과 와송 추출물을 급이하였을 때 혈청 TBARS 함량과 DPPH에 의한 항산화 활성을 측정한 결과는 Table 4-22와 같다.

정상군에서 혈중 TBARS 함량은 27.26±1.86 mmol/mL이었는데, 대조군은 49.73±1.78 mmol/mL로 유의적으로 증가되었는데, 와송 추출물의 급이량이 증가될수록 유의적으로 감소되었으며, DMW-3에서는 30.39±2.21 mmol/mL로 정상군과 유의차가 적었다. 항산화 활성은 생약재복합물과 와송 추출물을 급이한 실험군에서 61.38±4.31~78.24±3.08%의 활성을 보여, 정상군보다 유의적으로 높은 활성을 나타내었다.

Table 4-22. TBARS contents and DPPH scavenging activity in serum of rats treated with medicinal plants composites and Wa-song extracts

| Group ¹⁾ | TBARS (mmol/mL) | DPPH scavenging activity (%) |
|---------------------|---------------------------|------------------------------|
| Normal | 27.26±1.86 ^{a2)} | 50.32±5.11 ^b |
| Diabetic | 49.73±1.78 ^d | 39.78±2.95 ^a |
| DMW-0 | 39.64±3.68 ^c | 61.38±4.31 ^c |
| DMW-1 | 32.01±3.37 ^b | 71.24±3.28 ^d |
| DMW-3 | 30.39±2.21 ^{ab} | 78.24±3.08 ^e |

¹⁾Refer to the Table 4-16

²⁾Values are mean±SD (n=7)

^{a-c}Values in a column sharing the same superscript letter are not significantly different.

(12) 간장 조직 중 총 지질, 총 콜레스테롤 및 중성지방 함량

간장 조직의 총 지질, 총 콜레스테롤 및 중성지방 함량을 측정한 결과는 Table 4-23과 같다. 간장 조직의 총 지질은 정상군에서 14.34±0.66 mg/g이었는데, 대조군에서 당

노 유발시 유의적으로 증가되었다. 반면에 생약재복합물 및 와송 추출물을 급이함으로써 감소되었는데, DMW-3은 15.43 ± 0.41 mg/g으로 정상군과 유사한 수준이었다. 총 콜레스테롤은 대조군에서 2.36 ± 0.26 mg/g이었는데, 생약재복합물 급이시(DMW-0)에는 1.81 ± 0.23 mg/g, 와송 추출물의 첨가량을 증가시킴에 따라 감소되었으나, 유의차는 적었다. 중성지방은 대조군에서 10.83 ± 1.36 mg/g이었는데, 생약재복합물 및 와송 추출물을 급이함으로써 $6.18 \pm 0.28 \sim 6.45 \pm 0.95$ mg/g의 범위로 정상군과 유사한 함량이었다.

Table 4-23. Content of total lipid, total cholesterol and triglyceride in liver of rats treated with medicinal plants composites and Wa-song extracts (mg/g wet liver)

| Group ¹⁾ | Total lipid | Total-cholesterol | Triglyceride |
|---------------------|------------------------|-----------------------|--------------------|
| Normal | $14.34 \pm 0.66^{a2)}$ | 2.05 ± 0.39^b | 5.68 ± 0.35^a |
| Diabetic | 18.44 ± 0.50^c | 2.36 ± 0.26^c | 10.83 ± 1.36^b |
| DMW-0 | 17.11 ± 1.33^b | 1.81 ± 0.23^{abc} | 6.45 ± 0.95^a |
| DMW-1 | 16.94 ± 0.59^b | 1.76 ± 0.15^{ab} | 6.40 ± 1.11^a |
| DMW-3 | 15.43 ± 0.41^a | 1.50 ± 0.46^a | 6.18 ± 0.28^a |

¹⁾Refer to the Table 4-16

²⁾Values are mean \pm SD (n=7)

^{a-c}Values in a column sharing the same superscript letter are not significantly different.

(13) 신장 조직 중 총 지질, 총 콜레스테롤 및 중성지방 함량

신장 조직에서 총 지질, 총 콜레스테롤 및 중성지방 함량을 측정한 결과는 Table 4-24와 같다. 신장 조직 내 총 지질 함량은 정상군(19.97 ± 1.79 mg/g)과 대조군(24.03 ± 2.16 mg/g)에서 유의차가 없었다. 반면에 생약재복합물 및 와송 추출물을 급이함으로써 $10.64 \pm 1.31 \sim 15.45 \pm 2.89$ mg/g의 범위로 유의적으로 감소하였으며, 특히 DMW-3에서는 가장 낮은 함량을 보였다. 총 콜레스테롤은 생약재복합물 급이군(DMW-0)에서 대조군과 유의차가 없었으나, 와송 추출물을 첨가함으로써 감소하는 경향을 보였다. 그러나 와송 추출물의 첨가량에 따른 유의차는 없었다. 중성지방 함량은 대조군이 10.40 ± 1.40 mg/g이었는데, DMW-0 및 DMW-1은 정상군(7.81 ± 0.69 mg/g)과

유의차가 없었으나, DMW-3은 6.14 ± 0.73 mg/g으로 가장 낮은 함량이었다.

간장 및 신장 조직의 지질 함량을 비교해 볼 때 정상군의 경우 신장조직에서 지질 축적량이 많았으며, 대조군에서도 신장조직의 지질 함량이 더 높았다. 반면에 생약재 복합물 및 와송 추출물을 급이한 실험군에서는 총 지질이 간장 조직에서, 총 콜레스테롤은 신장조직에서, 중성지방은 간장조직에서 각각 더 크게 감소되었다.

Table 4-24. Content of total lipid, total cholesterol and triglyceride in kidney of rats treated with medicinal plants composites and Wa-song extracts (mg/g wet liver)

| Group ¹⁾ | Total lipid | Total-cholesterol | Triglyceride |
|---------------------|------------------------|-------------------|--------------------|
| Normal | $19.97 \pm 1.79^{c2)}$ | 2.34 ± 0.47^a | 7.81 ± 0.69^b |
| Diabetic | 24.03 ± 2.16^c | 3.20 ± 0.26^b | 10.40 ± 1.40^c |
| DMW-0 | 15.45 ± 2.89^b | 2.95 ± 0.27^b | 8.79 ± 0.79^b |
| DMW-1 | 15.33 ± 5.64^b | 2.45 ± 0.57^a | 8.27 ± 0.44^b |
| DMW-3 | 10.64 ± 1.31^a | 2.41 ± 0.29^a | 6.14 ± 0.73^a |

¹⁾Refer to the Table 4-16

²⁾Values are mean \pm SD (n=7)

^{a-c}Values in a column sharing the same superscript letter are not significantly different.

(14) 간장 조직의 글리코겐 함량

당뇨유발 흰쥐에 생약재복합물 및 와송 추출물을 급이하였을 때 간장 조직의 글리코겐 함량을 측정한 결과는 Fig. 4-7에 나타내었다. 당뇨의 경우 글리코겐을 합성하는 글리코겐 합성효소의 활성이 낮아짐으로써 간장 조직의 글리코겐 함량의 감소가 초래된다. 글리코겐의 합성은 포도당의 농도 및 인슐린에 의존적이므로 포도당의 이용이 어렵고 인슐린 분비가 적은 당뇨 발병시 간장 조직 글리코겐 함량의 감소는 불가피하다.

정상군에서 글리코겐 함량은 493.44 mg/g이었는데, 당뇨군(Diabetic)은 276.70 mg/g으로 유의적으로 감소되었다. 생약재복합물과 와송 추출물을 혼합급이한 DMW-1과 생약재복합물을 급이한 DMW-0는 유의차가 없었으나, 당뇨군보다는 유의적으로 감소되

었다. 한편 생약재복합물에 대해 와송 추출물을 1:3의 비율로 혼합 급이한 DMW-3은 와송 추출물의 첨가량 증가에 따라 간장 조직의 글리코겐 함량도 유의적으로 증가되었다.

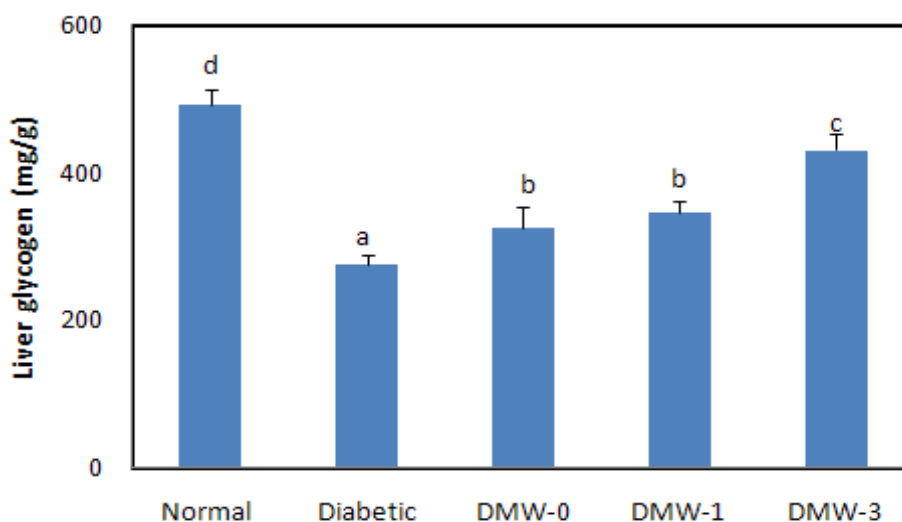


Fig. 4-7. Effect of the medicinal plants composites and Wa-song extracts on glycogen contents in liver of normal and diabetic rats.
^{a-d}Values in a column sharing the same superscript letter are not significantly different.

(15) 간장 조직 중 TBARS 함량 및 항산화 활성

간장 조직에서 지질과산화에 미치는 영향을 조사하기 위하여 과산화 과정의 2차 단계에서 생성되는 MDA 수준을 분석한 결과는 Table 4-25와 같다.

간장 조직의 MDA 수준은 정상군에서 211.40 ± 25.58 mmol/g이었는데, 대조군에서는 364.39 ± 17.36 mmol/g이었다. 생약재복합물 및 와송 추출물을 급이한 실험군에서는 유의적으로 감소되었는데, DMW-3에서 164.27 ± 7.63 mmol/g으로 가장 낮은 함량을 보였다. 간장 조직의 항산화 활성은 정상군($74.50 \pm 4.22\%$)에 비해 대조군에서 $49.86 \pm 2.72\%$ 로 나타나 약 33% 정도 감소되었다. 생약재복합물 및 와송 추출물을 급이한 실험군에서는 $61.64 \pm 2.85 \sim 68.45 \pm 2.32\%$ 의 범위로 유의적으로 증가되었다.

Table 4-25. TBARS contents and DPPH scavenging activity in liver of rats treated with medicinal plants composites and Wa-song extracts

| Group ¹⁾ | TBARS (mmol/g wet liver) | DPPH scavenging activity (%) |
|---------------------|-----------------------------|---------------------------------|
| Normal | 211.40±25.58 ^{b2)} | 74.50±4.22 ^d |
| Diabetic | 364.39±17.36 ^e | 49.86±2.72 ^a |
| DMW-0 | 286.59±11.16 ^d | 61.64±2.85 ^b |
| DMW-1 | 256.53±12.59 ^c | 63.56±1.97 ^b |
| DMW-3 | 164.27±7.63 ^a | 68.45±2.32 ^c |

¹⁾Refer to the Table 4-16

²⁾Values are mean±SD (n=7)

^{a-c}Values in a column sharing the same superscript letter are not significantly different.

(16) 신장 조직 중 TBARS 함량 및 항산화 활성

신장 조직 중 지질과산화에 미치는 영향을 반응생성물인 MDA 수준으로 분석한 결과는 Table 4-26과 같다.

신장 조직의 MDA 수준은 정상군에서 228.11±14.79 mmol/g이었는데, 대조군에서는 377.55±30.99 mmol/g이었다. 생약재복합물 및 와송 추출물을 급이한 실험군에서는 유의적으로 감소되었으며, 와송 추출물의 첨가량에 따른 유의차는 없었다.

신장 조직의 항산화 활성은 대조군에서 53.33±4.67%였는데, 생약재복합물 급이군 (DMW-0)에서는 57.72±4.47%로 대조군과 유의차가 없었다. DMW-1 및 DMW-3은 각각 66.50±3.71%, 69.24±2.42%로 와송 추출물의 첨가량에 따른 유의차는 없었다.

지질과산화물 함량은 반응성이 높은 유리기에 의해 세포막지질의 불포화지방산이 산화적 분해를 일으켜 산화적 스트레스의 지표가 되는 MDA 수준은 기관별로 민감도가 다른 것으로 보고되어 있다(Behrens WA과 Madere R. 1991). 반면에 본 연구에서는 당뇨 유발시 간장과 신장의 TBARS 함량이 각각 364.39±17.36 mmol/g, 377.55±30.99 mmol/g인 것으로 보아 기관에 따른 차이가 적은 것으로 판단된다.

Table 4-26. TBARS contents and DPPH scavenging activity in kidney of rats treated with medicinal plants composites and Wa-song extracts

| Group ¹⁾ | TBARS (mmol/g wet liver) | DPPH scavenging activity (%) |
|---------------------|-----------------------------|---------------------------------|
| Normal | 228.11±14.79 ^a | 70.01±2.07 ^b |
| Diabetic | 377.55±30.99 ^d | 53.33±4.67 ^a |
| DMW-0 | 336.36±21.73 ^c | 57.72±4.47 ^a |
| DMW-1 | 289.22±2.87 ^b | 66.50±3.71 ^b |
| DMW-3 | 275.02±8.58 ^b | 69.24±2.42 ^b |

¹⁾Refer to the Table 4-16

²⁾Values are mean±SD (n=7)

^{a-d}Values in a column sharing the same superscript letter are not significantly different.

제 5 절 와송의 항암·면역 활성 구명

1. 서 론

생활수준의 향상과 식생활의 서구화로 인한 과영양, 운동부족, 환경오염, 과도한 스트레스를 개인의 건강을 위협하는 주요 인자로 지적되고 있다. 의학의 발달과 더불어 많은 질병들에 대한 치료법 및 예방법에 관한 연구들이 진행되고 있으나 고령화 현상에 따른 생활습관성 질환들과 관련한 치료와 예방법에 대해서는 아직도 많은 연구들이 진행되어야 한다.

이 중 암은 대표적인 사망원인이 되고 있으며 종류별로는 위암이 전체의 20.2%를 차지하여 발생 빈도가 가장 높고 다음으로 폐암, 간암, 대장암, 유방암, 갑상선암 등의 순이다. 특히 65세 이상의 고령일 경우 위암의 발생빈도는 더 증가하고 있으며 최근 구미 선진국에서는 그 발생빈도가 감소되고 있는 추세이나 우리나라와 일본 등에서는 아직도 가장 많은 비율을 차지하고 있다. 또한 대장암이나 직장암은 동물성 지방과 육식을 좋아하는 미국이나 유럽 등지에서 많이 발생하는 암으로서 우리나라 등 아시아 국가에서는 서구에 비해서는 발병율이 낮으나 식생활의 서구화로 인해 발생빈도가 꾸준히 증가하고 있는 추세이다.

항암제와 관련한 연구는 종양세포처럼 세포 분열이 왕성한 조직에 대한 세포 독성을 근거로 하므로 세포분열이 빠른 피부, 점막 및 골수와 같은 정상조직 세포에서도 독성을 나타내게 되어 치료에 따른 많은 부작용을 야기하고 있다. 따라서 정상세포에 대한 독성은 적으면서 종양세포에만 특이적으로 작용하는 항암물질의 개발이 요구되고 있다. 이러한 측면에서 볼 때 과거로부터 꾸준히 섭취하여 온 천연식품 소재를 원료로 한 항암치료제의 개발과 관련한 연구들이 활발히 진행되고 있다.

우리나라에서는 오래전부터 약리적으로 이용하여 온 와송은 혈관수축작용과 호흡흥분작용, 장관의 긴장도 증강작용 등이 알려져 있으며, 한방에서는 지혈, 해열, 이뇨 등에 활용하였고, 민간에서도 간염 및 암치료제 등으로 사용하여 왔다(Kim JK. 1984, Park HJ. 1992). 최근 와송에 존재하는 phytochemicals로 sterol, triterpenoid류, 플라보노이드류 및 페놀 화합물 등이 분리되었고, 소화기 계통의 암에 효과가 좋은 것으로 알려지면서 이에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다(Park HJ. et al 1994, Park JG. et al 2000). Kwon과 Han(2004)은 와송이 생쥐 비장 및 흉선세포의 생존율을 증가시켰으며, 백혈병세포의 apoptosis를 촉진시키는 항암능력을 보유하고 있다고 보고한 바 있다. 또한 와송 메탄올추출물은 마우스 시상하부 신경세포에서 H₂O₂에 의한 apoptosis

에 방어효과를 내는데, 주된 생리활성 물질은 비극성 화합물이며(Yoon Y. et al 2000), 와송 지상부의 물추출물은 HIV-1 단백분해효소에 대한 저해활성이 있는 것으로 보고 되어 있다(Park JG. et al 2000).

식품이 지니는 항암활성을 평가하기 위한 방법으로는 암세포의 성장을 억제하거나 암세포의 세포사멸(apoptosis)을 유도하는 방법, 암세포의 다른 기관으로의 전이를 억제하는 방법, 암세포의 성장에 따른 신생혈관의 생성 등을 억제하는 방법 등과 관련한 연구들이 주로 진행되고 있다. 세포사멸은 세포가 정상적인 상태 또는 병리학적인 요인에 노출된 후에 죽음에 이르게 되는 생리적인 과정으로 정상세포의 기능 유지에 필수적인 과정인데 세포사멸에 장애가 생기면 세포의 과증식이 이루어지고 이어 암을 발생시키며 암을 더욱 진전시켜 치료를 어렵게 만드는 원인이 된다. 따라서 적절한 세포사멸 속도를 유지하도록 하는 것은 암의 발생과 진전을 억제하고 암을 치료할 수 있는 좋은 방법이 되므로 현재 사용되고 있는 많은 항암제는 암세포의 세포사멸을 유도함으로써 항암효과를 나타내는 것이다.

따라서 본 연구에서는 과거로부터 민간에서 항암식품으로 널리 활용하여온 와송의 항암활성을 구명하고 나아가 상황버섯 및 생약재복합물과의 시너지 효과를 확인하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

가. 세포 주 배양법

생쥐 대식세포 계열의 세포주인 RAW264.7은 한국 세포 주 은행(서울대학교 의과대학 암 연구소)에서 구입하였다. 세포배양을 위한 DMEM 배지에 sodium bicarbonate (NaHCO_3), 항생제(100 units/mL, penicillin, 100 mg/mL streptomycin), 10% FBS (fetal bovine serum)를 첨가한 것을 이용하였으며, 37°C, 5% CO_2 배양기에서 배양하였다. 배양된 각각의 세포는 일주일에 2~3번 refeeding하고 7~8일 만에 PBS (phosphate buffered saline)와 0.25% trypsin-EDTA 용액으로 부착한 세포를 분리하여 원심분리한 후 집적된 암세포에 배지를 넣고 피펫으로 암세포가 골고루 분산되도록 잘 혼합하여 75 mm³ cell culture flask에 10 mL씩 일정 수 분할하여 주입하고 계속 6~7일마다 계대 배양하면서 실험에 사용하였다.

인체 암 세포주인 HeLa, HepG2, HT-29, 그리고 MCF-7 은 한국 세포 주 은행(서울대학교 의과대학 암 연구소)에서 구입하였다. 세포배양을 위한 DMEM 배지에 sodium bicarbonate (NaHCO_3), 항생제(100 units/mL, penicillin, 100 mg/mL streptomycin),

10% FBS (fetal bovine serum)를 첨가한 것을 이용하였으며, 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 배양된 각각의 세포는 일주일에 2~3번 refeeding하고 7~8일 만에 PBS (phosphate buffered saline)와 0.25% trypsin-EDTA 용액으로 부착한 세포를 분리하여 원심분리한 후 집적된 암세포에 배지를 넣고 피펫으로 암세포가 골고루 분산되도록 잘 혼합하여 75 mm³ cell culture flask에 10 mL씩 일정 수 분할하여 주입하고 계속 2~3일마다 계대 배양하면서 실험에 사용하였다.

나. 일산화 질소 측정법

안정된 NO산화물인 NO₂⁻는 Griess반응을 이용하여 측정하였다. 세포배양 상층액을 flat bottom 96well plate에 100 µL씩 넣고 여기에 Griess 시약(0.1% N-1-naphthyl-ethylendiamine in H₂O : 1% sulfanilamide in 5% H₃PO₄ = 1:1)을 동량 첨가하여 10분간 반응시킨 후, microplate reader (ASYS Hitech GmbH, AUSTRIA)로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. Nitrite의 농도는 sodium nitrite를 32 µm에서 0.25 µm까지 2배씩 희석하여 얻은 표준 곡선과 비교하여 계산하였다.

다. Cytotoxicity 측정법

발효차에서 분리한 물질 또는 lipopolysaccharide (LPS)를 RAW264.7 세포에 첨가하여 24시간 배양한 후 상층 액을 회수하여 상층 액에 포함된 IL-6, TNF-α, GM-CSF의 양을 측정하였다. 즉 일차 항체를 coating buffer (0.1 M NaHCO₃)에 희석하여 plate에 첨가하여 4°C에서 하룻밤 방치한 다음 washing 용액(0.05% Tween 20/PBS)으로 세척한 다음, 소 혈청이 포함된 인산완충액(10% FBS/PBS)으로 blocking한 후 배양 상층액을 적절하게 희석하여 첨가한 다음, biotin과 결합한 이차 항체를 첨가하였다. 일정한 시간 후에 avidin-peroxidase를 첨가하고, 기질(2,2'-azino-bis, 0.1 M citric acid, H₂O₂)을 넣어 발색시키는 효소 항체 법(enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA)을 이용해 microplate reader로 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

라. Sulforhodamine B (SRB) assay

세포단백질 염색을 이용하여 세포증식이나 독성을 측정하는 SRB assay을 사용하였다. 암세포를 96well plate에 well당 3×10⁴/mL가 되도록 seeding하고 24시간 배양한 후 세포가 plate에 부착되면 시료 추출물 100µL를 첨가 한 후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양 48시간 후에 배지를 제거한 후 0.9% NaCl로 한번 씻고, 10% TCA를 첨가하여 4°C에서 냉장 방치하였다. 1시간 후 TCA를 제거하고 증류수로 5번

씻은 후 실온에서 건조시키고, 여기에 0.4% SRB 100 μ L를 첨가하여 30분 동안 염색시켰다. 그리고 1% acetic acid로 5번 씻은 후 다시 실온에서 건조시킨 후 0.01M tris base를 150 μ L를 첨가한 후 520 nm에서 흡광도를 측정하였다.

마. Cell morphology and nuclear staining

간암 세포를 multiwell에 1×10^4 cells/35mm-diameter로 DAPI staining과 morphology 분석을 위하여 배양한 후 37°C에서 24시간 유지한 후 와송 추출물이 간암 세포에 미치는 영향을 측정하였다.

바. Flow cytometric analysis of cell cycle

HepG2 세포들은 10 cm 배양접시에 3×10^5 개의 농도로 부유하여 배양한 후 총 24시간 후 부유(floating) 세포 및 trypsin 처리한 부착(adherent) 세포들은 거두어 분석을 하였다. 수집된 세포들은 PBS에 녹인 70% 에탄올에 부유하여 얼음 속에서 30분간 두어 고정하였다. 고정된 세포들은 원심 분리하여 에탄올을 제거하고 ice-cold PBS로 수세 후 45 μ g/mL의 propidium iodide (PI) 및 500 μ g/mL의 ribonuclease A가 함유된 PBS에 부유하여 ice에서 차광하여 30분간 배양한 후 Becton Dickinson FACSC alibur flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose CA, USA)을 이용하여 분석하였다.

사. MTT assay

배양된 각각의 암세포는 PBS로 세척한 후 0.05% trypsin-EDTA로 부착된 세포를 분리한 후 원심분리하여 집적된 암세포를 배지에 다시 분산 시킨 다음 20 μ L를 취해 tryphanblue 20 μ L와 잘 혼합하여 세포수를 확인하였다. 각각의 암세포는 4×10^4 , cells/mL로 농도를 조절하여 각각 100 μ L씩을 96 well plate에 접종하였다. 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양한 후 배지를 제거한 다음 50, 100, 200, 500 및 1,000 μ g/mL로 농도를 조정된 free RPMI 배지를 각 100 μ L씩 가하여 동일한 조건에서 다시 24시간 배양하였다. 이때 대조군으로는 시료를 함유하지 않은 free RPMI 배지를 첨가하였다. 배양 후 PBS에 5 mg/mL의 농도로 제조한 MTT 용액을 각 well에 10 μ L씩 가한 후 3시간 동안 incubator에서 배양하였다. 이 때 생존하는 세포와 MTT와의 반응으로 생성된 formazan 결정의 배지를 제거한 후 DMSO 100 μ L에 녹여 plate shake에서 30분간 반응시킨 후 ELISA reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하여 암세포의 성장 억제율을 산출하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 와송 추출물에 의한 NO 생산

대식세포는 박테리아와 같은 항원이 침입하였을 때, 일차적으로 면역반응을 담당하는 세포로서, 우선 침입한 박테리아를 잡아먹는 식세포 작용을 한다. 잡아먹힌 박테리아는 금방 죽는 것이 아니라 대식세포내 살균 작용에 의해 죽고 분해된다. 박테리아를 죽이기 위해 대식세포가 분비하는 물질은 여러 가지가 알려져 있지만, 그 중에서 최근에 밝혀진 것으로 일산화질소가 있다. 따라서 와송 추출물이 대식세포의 일산화질소 생산에 어떠한 영향을 미치는지를 검색하였다. 대식세포주(RAW264.7)에 건조방법을 달리한 와송 물추출물 및 에탄올추출물을 첨가하여 24시간 배양한 후 배양액 중 대식세포가 생산한 NO가 산화된 형태인 NO₂ 농도를 측정하였다.

천일건조, 열풍건조 및 동결건조 와송 물추출물(Table 5-1 ~ 5-3) 및 에탄올추출물(Table 5-4 ~ 5-6)을 첨가할 경우 무처리 대조구에 비하여 농도 의존적으로 대식세포의 일산화질소 생산을 유도하였다. 즉 와송 추출물은 은 대식세포를 활성화시켜서 일산화질소 생산을 유도하는 것을 알 수 있었다.

Table 5-1. Effect of hot water extracts of sun dried Wa-song on the production of nitric oxide in a macrophage cell line

| Concentration (mg/mL) | 1 | 0.5 | 0.2 |
|--------------------------|-------------|------------|------------|
| Control | 11.4±1.13 | - | - |
| LPS (10 µg/mL) | 14.26±0.04* | - | - |
| Water extract of Wa-song | 12.07±0.07* | 11.98±0.33 | 11.7±0.357 |
| Kaemperol | 8.64±0.23* | 9.4±0.13* | 10.35±0.49 |
| Quercetin | 8.48±0.395 | 9.03±0.20* | 11.47±3.38 |

RAW264.7 cells (5×10^5 cells/well) were stimulated with LPS or *Orostachys japonicus* extracts for the production of nitric oxide. After 24 hours of culture, the amounts of NO production were measured by the Griess method as described under materials and methods.

*p<0.05: Significant difference between untreated control and other experimental groups.

Table 5-2. Effect of hot water extracts of hot-air dried Wa-song on the production of nitric oxide in a macrophage cell line

| Concentration (mg/mL) | 1 | 0.5 | 0.2 |
|--------------------------|-------------|------------|-------------|
| Control | 11.40±1.13 | | |
| LPS (10 µg/mL) | 14.26±0.04* | | |
| Water extract of Wa-song | 11.63±0.23* | 12.07±0.85 | 11.43±0.13* |
| Kaemperol | 8.64±0.23* | 9.40±0.13* | 10.35±0.49 |
| Quercetin | 8.48±0.39 | 9.03±0.20* | 11.40±3.38 |

RAW264.7 cells (5×10^5 cells/well) were stimulated with LPS or *Orostachys japonicus* extracts for the production of nitric oxide. After 24 hours of culture, the amounts of NO production were measured by the Griess method as described under materials and methods.

*p < 0.05: Significant difference between untreated control and other experimental groups.

Table 5-3. Effect of hot water extracts of freeze dried Wa-song on the production of nitric oxide in a macrophage cell line

| Concentration (mg/mL) | 1 | 0.5 | 0.2 |
|--------------------------|--------------|--------------|--------------|
| Control | 11.40±±1.13 | | |
| LPS (10 µg/mL) | 14.26±±0.04* | | |
| Water extract of Wa-song | 11.66±±0.26 | 12.14±±0.03* | 11.36±±0.62 |
| Kaemperol | 8.64±±0.23* | 9.40±±0.13* | 10.35±±0.49 |
| Quercetin | 8.48±±0.39 | 9.00±±0.203* | 11.47±±3.38* |

RAW264.7 cells (5×10^5 cells/well) were stimulated with LPS or *Orostachys japonicus* extracts for the production of nitric oxide. After 24 hours of culture, the amounts of NO production were measured by the Griess method as described under materials and methods.

*p < 0.05: Significant difference between untreated control and other experimental groups.

Table 5-4. Effect of ethanol extracts of sun dried Wa-song on the production of nitric oxide in a macrophage cell line

| Concentration (mg/mL) | 1 | 0.5 | 0.2 |
|----------------------------|-------------|------------|------------|
| Control | 11.4±1.13 | | |
| LPS (10 µg/mL) | 14.26±0.04* | | |
| Ethanol extract of Wa-song | 11.34±0.39 | 12.21±0* | 12.94±0* |
| Kaemperol | 8.64±0.23* | 9.40±0.13* | 10.35±0.49 |
| Quercetin | 8.48±0.39 | 9.03±0.2* | 11.4±3.387 |

RAW264.7 cells (5×10^5 cells/well) were stimulated with LPS or *Orostachys japonicus* extracts for the production of nitric oxide. After 24 hours of culture, the amounts of NO production were measured by the Griess method as described under materials and methods.

*p<0.05: Significant difference between untreated control and other experimental groups.

Table 5-5. Effect of ethanol extracts of hot air dried Wa-song on the production of nitric oxide in a macrophage cell line

| Concentration (mg/mL) | 1 | 0.5 | 0.2 |
|----------------------------|-------------|------------|------------|
| Control | 11.4±1.13 | | |
| LPS (10 µg/mL) | 14.26±0.04* | | |
| Ethanol extract of Wa-song | 10.81±0.16* | 12.05±0.49 | 12.09±1.9 |
| Kaemperol | 8.64±0.23* | 9.40±0.13* | 10.35±0.49 |
| Quercetin | 8.48±0.39 | 9.03±0.2* | 11.47±3.38 |

RAW264.7 cells (5×10^5 cells/well) were stimulated with LPS or *Orostachys japonicus* extracts for the production of nitric oxide. After 24 hours of culture, the amounts of NO production were measured by the Griess method as described under materials and methods.

*p<0.05: Significant difference between untreated control and other experimental groups.

Table 5-6. Effect of ethanol extracts of freeze dried Wa-song on the production of nitric oxide in a macrophage cell line

| Concentration (mg/mL) | 1 | 0.5 | 0.2 |
|----------------------------|-------------|------------|------------|
| Control | 11.4±1.13 | | |
| LPS (10 µg/mL) | 14.26±0.04* | | |
| Ethanol extract of Wa-song | 10.62±0.1* | 11.06±0.33 | 10.57±0.1* |
| Kaemperol | 8.64±0.23* | 9.40±0.13* | 10.35±0.49 |
| Quercetin | 8.48±0.39 | 9.03±0.2* | 11.40±3.87 |

RAW264.7 cells (5×10^5 cells/well) were stimulated with LPS or *Orostachys japonicus* extracts for the production of nitric oxide. After 24 hours of culture, the amounts of NO production were measured by the Griess method as described under materials and methods.

*p<0.05: Significant difference between untreated control and other experimental groups.

Table 5-7. Effect of Wa-song extracts on the production of nitric oxide in a macrophage cell line

| Concentration (mg/mL) | | 1 | 0.5 | 0.2 |
|-----------------------|----------------|-------------|-------------|-------------|
| Control | | 11.4±1.13 | | |
| LPS (10 µg/mL) | | 14.26±0.04* | | |
| Water extract | Sun drying | 12.07±0.06* | 12.0±0.32 | 11.77±0.35 |
| | Hot air drying | 11.63±0.23 | 12.07±0.85 | 11.43±0.13* |
| | Freeze drying | 11.66±0.26 | 12.14±0.03* | 11.36±0.62 |
| Ethanol extract | Sun drying | 11.34±0.39 | 12.21±0 | 12.94±0 |
| | Hot air drying | 10.81±0.16* | 12.05±0.45 | 12.09±1.9 |
| | Freeze drying | 10.62±0.10* | 11.06±0.33 | 10.57±0.1* |

RAW264.7 cells (5×10^5 cells/well) were stimulated with LPS or *Orostachys japonicus* extracts for the production of nitric oxide. After 24 hours of culture, the amounts of NO production were measured by the Griess method as described under materials and methods.

*p<0.05: Significant difference between untreated control and other experimental groups.

나. 와송 추출물에 의한 대식세포의 cytotoxicity 생산

대식세포는 항원의 자극을 받아 활성화되면 IL-6, TNF- α , GM-CSF 등을 분비하여 면역 반응을 조절한다. 특히 TNF- α 는 종양괴사인자(tumor necrosis factor)로 알려진 물질로 종양 세포를 파괴하는 사이토카인이고, IL-6는 간세포가 피브리노겐과 같은 몇 가지 혈장단백질을 합성하도록 유도하며 B세포 분화를 유도하는 B세포 성장 인자로 작용한다.

그리고 GM-CSF (granulocyte-macrophage colony stimulating factor)는 골수전구세포의 분화와 증식을 유도하여 과립구와 대식세포를 만드는 작용을 한다. 따라서 와송 추출물들이 대식세포가 생산하는 이들 사이토카인의 분비에 어떠한 영향을 미치는지를 검색하였다. 분비되는 사이토카인의 종류를 알아보기 위하여 대식세포주에 분리한 물질들을 첨가하여 24시간 배양한 후 상층액을 회수하여 상층액에 포함된 사이토카인의 분비량을 측정하였다(Table 5-8).

Table 5-8. Effect of Wa-song extracts on the secretion of various cytokines in a macrophage cell line

| Conditions | | Cytokines (pg/mL) | | |
|---------------------|----------------|---------------------|--------------------|----------------------|
| | | TNF- α | GM-CSF | IL-6 |
| Control | | | 147.2 \pm 9.6 | 501.70 \pm 2.8 |
| LPS (10 μ g/mL) | | 1216.67 \pm 35.7* | 254.8 \pm 4.9* | 2546.50 \pm 11.7* |
| Water extract | Sun drying | 805.23 \pm 15.3* | 104.56 \pm 5.8* | 1603.35 \pm 10.3* |
| | Hot air drying | 659.37 \pm 16.5* | 87.66 \pm 13.7* | 1276.92 \pm 32.1* |
| | Freeze drying | 708.45 \pm 10.9* | 78.95 \pm 23.1* | 1478.65 \pm 9.3* |
| Ethanol extract | Sun drying | 689.87 \pm 21.6* | 93.65 \pm 18.3* | 1132.0 \pm 9.3* |
| | Hot air drying | 632.98 \pm 18.4* | 89.12 \pm 13.2* | 1342.57 \pm 13.76* |
| | Freeze drying | 650.69 \pm 16.35* | 100.37 \pm 21.6* | 1464.59 \pm 11.95* |

RAW264.7 cells (5×10^5 cells/well) were stimulated with LPS or *Orostachys japonicus* extracts for 24 hours and the supernatants were assayed for various cytokines. Cytokine levels in culture supernatants were determined as described under materials and methods. The results are expressed as mean \pm SD of triplicate assays. *p<0.05: Significant difference between untreated control and other experimental groups.

대식세포를 활성화시키는 LPS에 의하여 많은 양의 IL-6, TNF- α , GM-CSF 생산이 유도되는 것으로 나타났다. 그리고 와송 추출물을 첨가하였을 때, 무처리 대조구에 비하여 TNF- α , GM-CSF 및 IL-6의 분비가 증가하는 것을 알 수 있었다. 이러한 대식세포 사이토카인 생산량은 대식세포를 활성화 시키는 LPS보다 높게 나타났다. 따라서 와송 추출물들은 대식세포를 활성화시켜 다양한 사이토카인을 분비하여 항종양 및 면역 활성을 유도하는 것을 확인하였다.

다. 와송 추출물의 암세포 성장 억제 효과

Sulforhodamine B(SRB)는 두 개의 sulfonic group을 가진 밝은 핑크의 aminoxanthene염색액으로 단백질 염색에 널리 사용되어지는 bromophenol blue와 naphthol yellows와 유사하다. 약산성일 때 SRB는 trichloroacetic acid(TCA)로 고정된 세포내의 단백질 염기 아미노산 잔기와 결합하므로 세포의 밀도와 직선 관계이다. 와송 추출물의 암세포 성장 억제 효과를 알아보기 위하여 암세포(HeLa, HepG-2, HT-29 및 MCF-7)를 이용하여 SRB assay를 이용한 추출물의 저해효과를 조사하였다.

Table 5-9는 와송 추출물에 의한 인체 유방암 세포주인 MCF-7 세포에 대하여 억제 효과를 검토한 결과이다. 와송의 에탄올추출물이 열수추출물보다 전반적으로 높은 항암활성을 보였으며 모든 추출물의 농도를 증가시킴에 따라 활성이 높아지는 경향이 있었다. 열수추출물 중에서는 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 51.57%로 활성이 가장 높았으며, 에탄올추출물 중에서는 HE군이 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 46.52%, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 48.89%, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서는 51.73%로 농도 의존적으로 높은 활성을 보였다.

Table 5-10에서 인체 대장암 세포인 HT-29에 대한 와송 추출물의 저해 효과를 관찰한 결과 와송 추출물의 항암 효과는 열수추출물보다는 에탄올추출물에서 그 활성이 높았으며, 열수추출물 중에서는 FW군이 모든 시료 농도에서 50% 이상의 활성을 보였고, 에탄올추출물 중에서는 FE군이 농도증가에 따라 유의적으로 높은 활성을 나타내었다.

Table 5-11에서 HepG-2 세포에 대한 와송 추출물의 저해 효과, 즉 인체 간암 세포주에 대한 와송 추출물의 항암 효과는 열수추출물과 에탄올추출물간 유의적인 차이는 보이지 않았으나, FE군에서는 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상의 농도에서 30% 이상의 활성을 보였다. 이러한 결과는 인체 유방암 세포주인 MCF-7 세포와 인체 대장암 세포인 HT-29에 비해 비교적 낮은 활성을 보였다.

Table 5-9. Inhibitory effects of the extracts from Wa-song on MCF-7 cell growth
(Cell death, %)

| | Concentrations($\mu\text{g}/\text{mL}$) | | |
|------------------|---|--------------------------------|--------------------------------|
| | 200 | 100 | 50 |
| SW ¹⁾ | 51.57 \pm 4.68 ^h | 35.33 \pm 1.78 ^{de} | 28.86 \pm 1.56 ^b |
| HW | 35.01 \pm 0.44 ^{ce} | 27.44 \pm 1.78 ^{ab} | 3.71 \pm 0.22 ^a |
| FW | 38.17 \pm 4.46 ^e | 31.86 \pm 0.44 ^{bd} | 27.44 \pm 1.33 ^{ab} |
| SE | 43.53 \pm 0.89 ^f | 35.17 \pm 1.56 ^{de} | 30.59 \pm 0.44 ^{bc} |
| HE | 51.73 \pm 0.89 ^h | 48.89 \pm 0.44 ^{gh} | 46.52 \pm 1.56 ^{fg} |
| FE | 42.74 \pm 0.22 ^f | 37.53 \pm 3.12 ^e | 31.70 \pm 0.66 ^{bd} |

¹⁾Refer to the Table 3-26

^{a-h}Means with different superscripts in the same row significantly difference(p <0.05).

Table 5-10. Inhibitory effects of extracts from Wa-song on HT-29 cell growth
(Cell death, %)

| | Concentrations($\mu\text{g}/\text{mL}$) | | |
|------------------|---|--------------------------------|--------------------------------|
| | 200 | 100 | 50 |
| SW ¹⁾ | 49.4 \pm 3.71 ^{bd} | 40.20 \pm 8.26 ^{bc} | 25.25 \pm 3.64 ^a |
| HW | 48.3 \pm 0.21 ^{bd} | 38.22 \pm 2.94 ^b | 25.20 \pm 0.49 ^a |
| FW | 58.37 \pm 1.75 ^d | 54.46 \pm 2.52 ^d | 50.84 \pm 2.45 ^{cd} |
| SE | 57.72 \pm 1.26 ^d | 51.09 \pm 9.10 ^{cd} | 46.47 \pm 1.19 ^{bd} |
| HE | 58.47 \pm 1.19 ^d | 55.94 \pm 0.98 ^d | 48.17 \pm 0.63 ^{bd} |
| FE | 59.11 \pm 6.30 ^d | 58.17 \pm 5.53 ^d | 55.64 \pm 4.06 ^d |

¹⁾Refer to the Table 3-26

^{a-d}Means with different superscripts in the same row significantly difference(p <0.05).

Table 5-12에서 HeLa 세포에 대한 와송 추출물의 저해 효과를 관찰한 결과로 미루어 볼 때 인체 자궁암 세포주에 대한 와송 추출물의 항암 효과는 에탄올추출물 중 SE 200 µg/mL 농도에서 49.23%로 가장 높은 활성을 보였으며, 대체로 보아 에탄올추출물에 비해 열수추출물에서 높은 활성을 보였는데, 특히 HW 100 µg/mL 이상의 농도에서는 약 38%의 억제효과를 보여 다른 시료에 비해 우수한 항암억제 활성을 보였다.

Table 5-11. Inhibitory effects of extracts from Wa-song on HepG-2 cell growth
(Cell death, %)

| | Concentrations(ug/mL) | | |
|------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | 200 | 100 | 50 |
| SW ¹⁾ | 29.83±3.32 ^{df} | 23.93±0.15 ^{ce} | 6.37±3.99 ^a |
| HW | 32.60±2.07 ^{ef} | 22.20±0.22 ^{cd} | 12.17±1.55 ^{ab} |
| FW | 31.03±5.17 ^{df} | 22.47±3.55 ^{cd} | 11.70±0.44 ^{ab} |
| SE | 32.71±4.29 ^{ef} | 23.35±5.98 ^{ce} | 16.14±1.99 ^{bc} |
| HE | 30.51±7.24 ^{df} | 20.53±2.44 ^{bc} | 6.27±3.69 ^a |
| FE | 34.64±2.44 ^f | 30.88±0.96 ^{df} | 16.77±8.05 ^{bc} |

¹⁾Refer to the Table 3-26

^{a-h}Means with different superscripts in the same row significantly difference(p < 0.05).

Table 5-12. Inhibitory effects of extracts from Wa-song on HeLa cell growth
(Cell death, %)

| | Concentrations(ug/mL) | | |
|------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | 200 | 100 | 50 |
| SW ¹⁾ | 18.93±4.45 ^{ab} | 14.52±0.82 ^{ab} | 12.83±1.71 ^a |
| HW | 38.09±4.59 ^c | 38.38±1.30 ^c | 22.51±12.94 ^b |
| FW | 22.31±0.89 ^b | 19.12±0.62 ^{ab} | 15.10±2.60 ^{ab} |
| SE | 49.23±0.48 ^d | 17.18±0.62 ^{ab} | 15.63±0.48 ^{ab} |
| HE | 17.81±0.68 ^{ab} | 16.21±4.18 ^{ab} | 16.07±2.05 ^{ab} |
| FE | 16.26±1.37 ^{ab} | 17.62±1.78 ^{ab} | 15.10±4.52 ^{ab} |

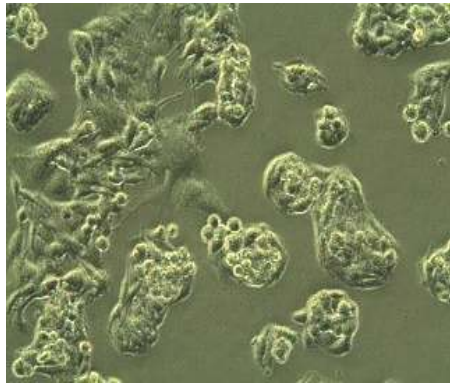
¹⁾Refer to the Table 3-26

^{a-d}Means with different superscripts in the same row significantly difference(p <0.05).

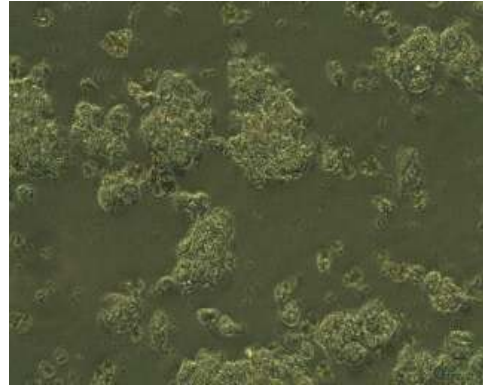
4종류의 암세포에 대한 와송 추출물의 항암 효과를 시험한 결과 대장암 세포주와 간암 세포주에서 유의적으로 높은 억제효과를 보였으며, 유방암 세포주와 자궁암 세포주에 대하여서는 부분적인 효과만이 인정되었다. 와송 추출물을 차로 이용하여 상용할 경우 대장암과 간암 예방 효과를 기대할 수 있을 것으로 예측되며 이러한 효과를 갖는 물질들을 순수 분리하여 고농도의 제품을 만들 경우 암예방 활성이 급격히 높아질 것으로 예상된다.

라. 와송 추출물의 DNA fragmentation

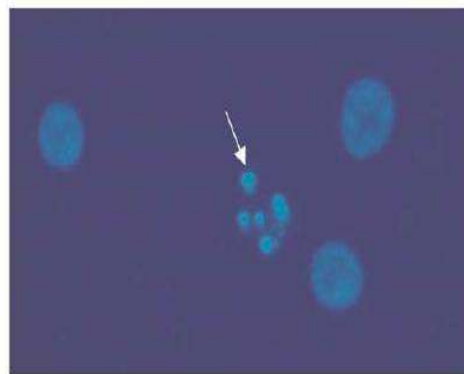
와송을 열풍 건조하여 에탄올로 추출한 분말을 200 µg/mL 에 대한 liver cancer cell line에 대한 morphology와 DAPI staining에 의한 DNA fragmentation을 측정한 결과는 Fig. 5-1과 같다. 정상적인 cell에 비해 Fig. 5-1에서는 cell의 morphology가 수축되고 성장이 둔화된 모습을 관찰할 수 있었고, 또 DNA fragmentation이 유도된 것이 측정되었다.



A : Control



B : Wa-song 0.2 mg/mL

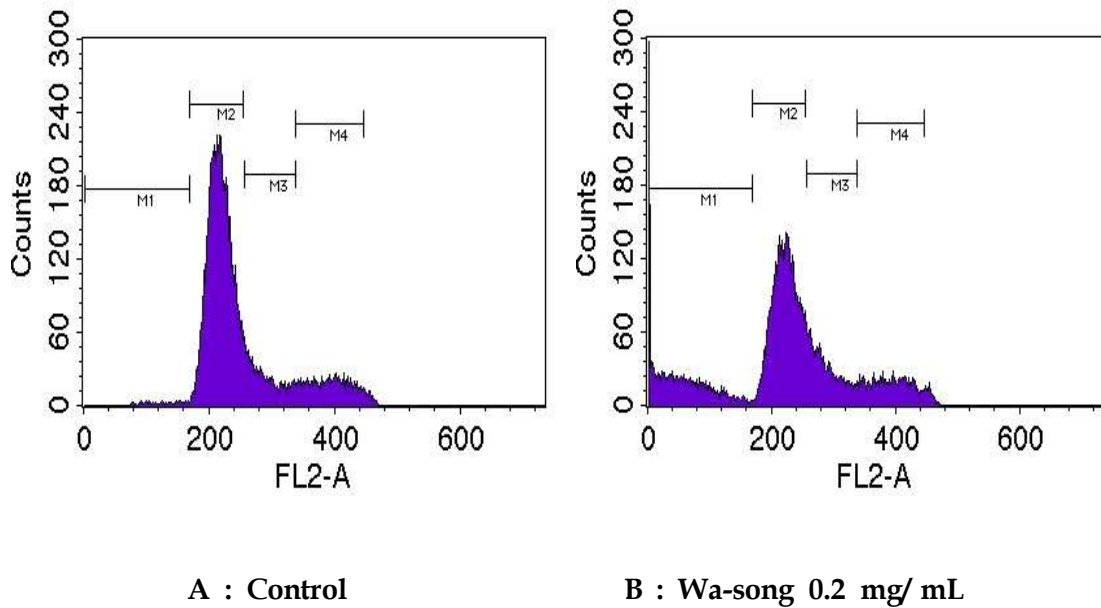


C : Wa-song 0.2 mg/mL

Fig. 5-1. The Wa-song induced morphologic alterations and nuclear fragmentation. (A) Control (untreated) HepG-2 cells. (B) HepG-2 cells treated with 200 μ g/mL extract for 48h. (C) DAPI staining of nuclei of 200 μ g/mL extract treated HepG-2 cells for 48h.

마. 와송 추출물의 FACS에 의한 세포주기 변화

와송 추출물의 간암 세포에 대한 flow cytometry에 의한 cell cycle 변화를 측정된 결과는 Fig. 5-2와 같다. Fig. 5-2에서 S phase block이 23.17%에서 13.92%로 cell population이 감소하였으며 G2/M phase의 cell population도 3.37%에서 14.00%로 대조군과 비교하여 변화하였다. 식물에서 추출한 여러 종류의 항암 물질들은 cancer cell의 성장을 저지하는데, 이것은 G2/M cycle의 증가로 알 수 있다. G2/M phase cell cycle에 의하여 HepG-2 liver cancer cell은 성장저해가 발생한다는 것을 알 수 있으며 일반적으로 예방의학적인 측면에서 와송 추출물이 항암활성에 매우 유용함을 알 수 있었다.



| | Control | Wa-song 0.2 mg/mL |
|-------|-----------|-------------------|
| M1 | 0.85 | 11.06 |
| G0/G1 | 71.850.35 | 60.500.28 |
| S | 23.170.12 | 13.920.17 |
| G2/M | 3.370.09 | 14.000.25 |

Fig. 5-2. The Wa-song induced cell-cycle distribution in human liver carcinoma cells. HepG-2 cells were exposed to various concentrations of its extract for 24 hr, and the cell-cycle distribution was analyzed as described in the text. Results were expressed as the percentage of total cell number. The values given are the mean±SD of at least three independent experiments, each performed in triplicate.

바. 와송 추출물 및 생약재 혼합 조성물의 암세포 성장 억제능

와송, 백봉령, 창출 및 사인 등 4종의 생약재 추출물을 동량으로 혼합한 조성물과 와송 추출물의 암세포에 대한 생육저해 활성을 MTT assay를 통하여 살펴본 결과는 Table 5-13 ~ 5-15과 같다.

MTT(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)는 살아있는 세포의 미토콘드리아 내막에 존재하는 *oxide-reductase*의 효소작용에 의해 환원되어 보라색의 불용성 formazan을 형성하고 이들 용해액의 발색정도를 흡광도로 측정함으로써 살아있는 세포수를 계측하는 방법이다(Dnizot FD와 Rite L. 1986).

위암세포인 AGS 세포에 대한 생육저해 활성은 와송 추출물의 경우 26.90±2.81~46.49±1.17%로 농도 의존적으로 점차 증가하였다(Table 5-13).

Table 5-13. Inhibitory effect of the hot water extracts from Wa-song, medicinal plants and their mixture in AGS cell growth

| Samples | Concentration(μg/mL) | | | |
|------------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | 100 | 250 | 500 | 1000 |
| Medicinal plants composites* | 26.17±1.32 ^{ab} | 28.09±1.00 ^{abA} | 30.06±4.82 ^{bA} | 53.64±0.87 ^{cB} |
| Wa-song extracts | 26.90±2.81 ^{ab} | 35.83±1.83 ^{bb} | 42.27±2.56 ^{cb} | 46.49±1.17 ^{cA} |
| MW-1** | 19.78±1.06 ^{aA} | 24.05±4.41 ^{bA} | 32.43±2.53 ^{cA} | 45.02±1.30 ^{dA} |
| MW-3*** | 20.83±1.11 ^{aA} | 25.96±3.43 ^{bA} | 38.51±3.03 ^{cb} | 44.85±1.52 ^{dA} |

*Medicinal plants composites : *Poria cocos wolf*, *Atractylodis rhizoma* and *Amomum villosum* were mixed with same ratio(v/v).

**MW-1 : medicinal plants and Wa-song composition extracts were mixed with same ratio, 1:1(v/v).

***MW-3 : medicinal plants and Wa-song composition extracts were mixed with 1:3(v/v). ^{a-d}Means with different superscripts in the same row are significantly different at p<0.05.

^{A-D}Means with different superscripts in the same column are significantly different at p<0.05.

생약재복합물의 경우 500 μg/mL 농도에서 활성이 30.06±4.82%로 동일 농도의 와송 추출물에 비하여 활성이 더 낮았으나 1000 μg/mL 농도에서는 53.64±0.87%로 시료 중 가장 활성이 높았다. 생약재복합물과 와송 추출물을 혼합한 경우 저농도에서는 와송 단독 추출물에 비하여 그 활성이 더 낮았으나, 1000 μg/mL 농도에서는 유의적인 차이가 없었다.

MCF-7 세포에 대한 생육억제 효과는 생약재 추출물에서 가장 활성이 높았고 와송 단독 처리구가 가장 활성이 낮아 500 μg/mL 농도까지 활성은 20% 미만이었다(Table 5-14). 생약재와 와송을 동량으로 혼합한 경우에 비해 혼합 비율이 1:3으로 와송 추출물의 더 높은 경우 MCF-7 세포의 생육저해활성이 더 높았다.

Table 5-14. Inhibitory effect of the hot water extracts from Wa-song, medicinal plants and their mixture in MCF-7 cell growth

(%)

| Samples* | Concentration($\mu\text{g}/\text{mL}$) | | | |
|-----------------------------|--|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| | 100 | 250 | 500 | 1000 |
| Medicinal plants composites | 19.66 \pm 2.34 ^{aC} | 20.25 \pm 1.20 ^{aA} | 34.54 \pm 0.97 ^{bD} | 44.81 \pm 2.30 ^{cC} |
| Wa-song extracts | 12.11 \pm 0.92 ^{aA} | 17.13 \pm 0.78 ^{bA} | 19.30 \pm 1.11 ^{bA} | 27.80 \pm 1.90 ^{cA} |
| MW-1 | 12.97 \pm 0.17 ^{aAB} | 21.10 \pm 2.60 ^{bA} | 25.91 \pm 0.77 ^{cB} | 28.65 \pm 2.25 ^{cA} |
| MW-3 | 15.96 \pm 2.89 ^{aB} | 20.56 \pm 3.21 ^{bA} | 31.52 \pm 2.23 ^{cC} | 34.79 \pm 1.38 ^{cB} |

*Refer to the comment in Table 5-13.

^{a-d}Means with different superscripts in the same row are significantly different at $p < 0.05$.

^{A-D}Means with different superscripts in the same column are significantly different at $p < 0.05$.

인체 대장암 유래 세포인 HT-29에 대한 와송 및 생약재복합물의 생육억제 효과를 분석한 결과는 Table 5-15과 같다. HT-29 세포에 대한 생육억제 효과는 생약재복합물에서 16.40 \pm 1.18~34.17 \pm 2.27%의 범위로 활성이 가장 낮았고, 와송 추출물과 생약재복합물을 혼합할 경우 활성은 유의적으로 증가하였다. 생약재복합물 단독으로는 활성이 낮았으나 와송과 혼합되면서 활성이 증가하였으며, 그 첨가비율이 높을 경우 활성이 더 높아 1:3 혼합액의 경우 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 활성은 46.61 \pm 2.21%까지 증가하였다. 와송 단독의 활성 보다는 생약재복합물이 첨가되면서 서로 상승효과를 유발함으로써 활성이 더 증가하는 것으로 판단된다.

Table 5-15. Inhibitory effect of the hot water extracts from Wa-song, medicinal plants and their mixture in HT-29 cell growth

(%)

| Samples* | Concentration($\mu\text{g}/\text{mL}$) | | | |
|-----------------------------|--|--------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| | 100 | 250 | 500 | 1000 |
| Medicinal plants composites | 16.40 \pm 1.18 ^{aA} | 21.75 \pm 1.64 ^{bA} | 25.51 \pm 1.80 ^{cA} | 34.17 \pm 2.27 ^{dA} |
| Wa-song extracts | 12.11 \pm 0.92 ^{aA} | 17.13 \pm 0.78 ^{bA} | 19.30 \pm 1.11 ^{bA} | 27.80 \pm 1.90 ^{cA} |
| MW-1 | 25.04 \pm 0.75 ^{aC} | 39.21 \pm 2.74 ^{bB} | 42.24 \pm 1.27 ^{bcC} | 44.63 \pm 1.92 ^{cdBC} |
| MW-3 | 31.53 \pm 1.25 ^{aD} | 43.50 \pm 2.22 ^{bB} | 43.51 \pm 2.50 ^{bcC} | 46.61 \pm 2.21 ^{bcC} |

*Refer to the comment in Table 5-13.

^{a-d}Means with different superscripts in the same row are significantly different at $p < 0.05$.

^{A-D}Means with different superscripts in the same column are significantly different at $p < 0.05$.

사. 와송과 상황버섯 추출물 및 혼합 조성물의 암세포 성장 억제능

와송과 상황버섯 열수추출물 및 이들의 비율별 혼합물을 농도별로 제조하여 암세포 성장억제에 미치는 영향을 분석하였다. 인체 간암 유래 세포인 HepG-2에 대한 와송 추출물 및 생약재복합물의 생육억제 효과를 분석한 결과는 Table 5-16과 같다.

HepG-2 세포에 대한 생육억제 효과는 와송 단독 처리의 경우 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 49.12 \pm 4.52%로 활성이 가장 낮았으며 상황버섯 추출물의 경우 53.58 \pm 2.57%로 와송 추출물에 비하여 활성이 더 높았다. 와송 및 상황버섯 추출물 혼합조성물의 경우 1:1 혼합물의 HepG-2 세포 생육 억제능은 51.77 \pm 3.67%로 상황 추출물 단독 처리구에 비하여 활성이 더 낮았으나 상황버섯이나 와송 추출물 1:2나 2:1 혼합 조성물의 활성은 각각 56.55 \pm 2.18%와 73.59 \pm 5.33%로 유의적으로 증가하였다.

Table 5-16. Inhibitory effect of the hot water extracts from Wa-song, Sang-hwang and their mixture in HepG-2 cell growth

(%)

| Samples | Concentration($\mu\text{g}/\text{mL}$) | | | |
|-----------------------------|--|---------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| | 50 | 100 | 200 | 500 |
| Water extract of Wa-song | 34.98 \pm 2.54 ^{aA} | 38.05 \pm 4.62 ^{aA} | 47.12 \pm 0.58 ^{bB} | 49.12 \pm 4.52 ^{bA} |
| Water extract of Sang-hwang | 37.82 \pm 3.52 ^{aAB} | 42.81 \pm 6.31 ^{abA} | 44.93 \pm 3.14 ^{bB} | 53.58 \pm 2.57 ^{cAB} |
| WS - 1* | 36.61 \pm 2.51 ^{aA} | 37.50 \pm 1.36 ^{abA} | 40.91 \pm 0.98 ^{bA} | 51.77 \pm 3.67 ^{cAB} |
| WS - 2** | 42.34 \pm 1.59 ^{aBC} | 49.32 \pm 2.65 ^{bB} | 52.93 \pm 1.07 ^{cC} | 56.55 \pm 2.18 ^{dB} |
| WS - 3*** | 45.80 \pm 4.18 ^{aC} | 52.30 \pm 1.59 ^{bB} | 53.10 \pm 3.06 ^{bC} | 73.59 \pm 5.33 ^{cC} |

*Wa-song and Sang-hwang water extract mixed with same ratio, 1 : 1(v/v)

**Wa-song and Sang-hwang water extract mixed with 2 : 1(v/v)

***Wa-song and Sang-hwang water extract mixed with 1 : 2(v/v)

^{a-d}Means with different superscripts in the same row are significantly different at $p < 0.05$.

^{A-D}Means with different superscripts in the same column are significantly different at $p < 0.05$.

Table 5-17은 인체 대장암 유래세포인 HT-29에 대한 와송, 상황버섯 추출물 및 이들의 비율별 혼합물에 대한 생육 억제능을 분석한 결과이다. 세포 생육 억제능은 HepG-2 세포에 대한 실험결과와 동일한 경향이었으나 상대적인 생육 억제능은 더 낮았다. 와송과 상황버섯 1:1 추출물의 경우 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서는 25.58 \pm 0.24%로 시료 중 가장 활성이 낮았고 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서도 40% 미만의 낮은 활성을 나타내었다. 그러나 이들의 혼합 비율을 달리할 경우는 와송이나 상황버섯 단독 추출물 처리구에 비하여 활성이 더 증가하여 와송과 상황버섯 혼합물은 혼합 비율이 동일한 경우보다 상대량이 차이가 날 경우 더 높은 활성을 나타냄을 확인할 수 있었다.

인체 위암 세포에 대한 생육억제 활성을 실험한 결과는 Table 5-18과 같다. 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상의 농도에서는 와송 추출물과 와송과 상황 추출물 1:1 혼합 조성물을 제외한 시료에서 50% 이상의 높은 활성을 나타내었으며, 상황버섯 추출물의 경우 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 활성은 72.24 \pm 1.16%로 가장 높았다.

Table 5-17. Inhibitory effect of the hot water extracts from Wa-song, Sang-hwang and their mixture in HT-29 cell growth

(%)

| Samples* | Concentration($\mu\text{g}/\text{mL}$) | | | |
|-----------------------------|--|--------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|
| | 50 | 100 | 200 | 500 |
| Water extract of Wa-song | 32.25 \pm 3.90 ^{ab} | 38.06 \pm .354 ^{bB} | 42.54 \pm 2.35 ^{bcBC} | 44.12 \pm 1.64 ^{cB} |
| Water extract of Sang-hwang | 31.30 \pm 4.36 ^{ab} | 35.51 \pm 4.57 ^{ab} | 41.36 \pm 1.47 ^{bB} | 51.74 \pm 3.42 ^{cC} |
| WS - 1 | 25.58 \pm 0.24 ^{aA} | 29.90 \pm 1.27 ^{bA} | 31.47 \pm 0.98 ^{bA} | 36.44 \pm 1.83 ^{cA} |
| WS - 2 | 36.66 \pm 2.00 ^{aC} | 37.82 \pm 0.60 ^{ab} | 45.58 \pm 0.76 ^{bD} | 53.14 \pm 3.20 ^{cC} |
| WS - 3 | 35.09 \pm 0.88 ^{abC} | 42.86 \pm 1.36 ^{bC} | 44.85 \pm 1.90 ^{bCD} | 57.46 \pm 1.40 ^{cD} |

*Refer to the comment in Table 5-16.

^{a-d}Means with different superscripts in the same row are significantly different at $p < 0.05$.

^{A-D}Means with different superscripts in the same column are significantly different at $p < 0.05$.

와송 및 상황버섯 추출물과 그 혼합 조성물의 농도별 MCF-7 세포에 대한 생육 억제능을 실험한 결과는 Table 5-19와 같다. MCF-7에 대한 생육 억제능은 100~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서는 와송 추출물이 상황버섯 추출물에 비하여 더 활성이 높아 46.54 \pm 1.09~50.67 \pm 1.52%였는데 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서는 활성이 오히려 더 감소하여 46.90 \pm 2.01%로 시료 중 가장 활성이 낮았다. 상황버섯 추출물의 경우 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서는 62.37 \pm 1.27%로 가장 활성이 높았으며 와송과 상황버섯 추출물을 2:1로 혼합한 경우는 활성이 49.18 \pm 2.39%로 1:1 또는 1:2로 상황버섯 추출물의 혼합비율이 더 높은 경우에 비하여 활성이 오히려 더 낮았다.

Table 5-18. Inhibitory effect of the hot water extracts from Wa-song, Sang-hwang and their mixture in AGS cell growth

(%)

| Samples* | Concentration($\mu\text{g}/\text{mL}$) | | | |
|-----------------------------|--|---------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| | 50 | 100 | 200 | 500 |
| Water extract of Wa-song | 18.56 \pm 1.63 ^{aA} | 35.78 \pm 2.84 ^{bB} | 37.78 \pm 1.91 ^{bB} | 44.22 \pm 1.49 ^{cA} |
| Water extract of Sang-hwang | 28.48 \pm 1.30 ^{aB} | 31.65 \pm 0.83 ^{bAB} | 64.18 \pm 0.96 ^{cD} | 72.24 \pm 1.16 ^{dE} |
| WS - 1 | 20.41 \pm 2.79 ^{aA} | 27.61 \pm 1.49 ^{bA} | 30.43 \pm 3.89 ^{bA} | 53.70 \pm 1.10 ^{cB} |
| WS - 2 | 35.89 \pm 2.87 ^{aC} | 43.95 \pm 0.55 ^{bC} | 52.39 \pm 1.87 ^{cC} | 57.16 \pm 1.97 ^{dC} |
| WS - 3 | 39.80 \pm 0.80 ^{aD} | 49.31 \pm 7.24 ^{bC} | 54.79 \pm 1.45 ^{bC} | 62.37 \pm 0.76 ^{cD} |

*Refer to the comment in Table 5-16.

^{a-d}Means with different superscripts in the same row are significantly different at $p < 0.05$.

^{A-D}Means with different superscripts in the same column are significantly different at $p < 0.05$.

Table 5-19. MTT assay of the hot water extracts from Wa-song, Sang-hwang and their mixture in MCF-7 carcinoma cell

(cell culture inhibition ratio, %)

| Samples* | Concentration($\mu\text{g}/\text{mL}$) | | | |
|-----------------------------|--|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| | 50 | 100 | 200 | 500 |
| Water extract of Wa-song | 32.95 \pm 1.03 ^{ab} | 46.54 \pm 1.09 ^{bD} | 50.67 \pm 1.52 ^{bc} | 46.90 \pm 2.01 ^{cA} |
| Water extract of Sang-hwang | 35.37 \pm 1.42 ^{bc} | 32.55 \pm 0.16 ^{aA} | 48.35 \pm 3.00 ^{cC} | 62.37 \pm 1.27 ^{dD} |
| WS - 1 | 35.09 \pm 1.16 ^{aC} | 33.39 \pm 2.22 ^{aA} | 35.09 \pm 2.62 ^{aA} | 52.21 \pm 0.60 ^{bB} |
| WS - 2 | 26.64 \pm 1.87 ^{aA} | 41.87 \pm 0.82 ^{bc} | 44.44 \pm 3.78 ^{bB} | 49.18 \pm 2.39 ^{cA} |
| WS - 3 | 35.59 \pm 0.73 ^{aC} | 37.68 \pm 0.83 ^{bB} | 42.24 \pm 0.58 ^{cb} | 57.48 \pm 2.20 ^{dC} |

*Refer to the comment in Table 5-16.

^{a-d}Means with different superscripts in the same row are significantly different at $p < 0.05$.

^{A-D}Means with different superscripts in the same column are significantly different at $p < 0.05$.

제 6 절 시제품 개발 및 상품화

1. 제품별 포장디자인 개발

가. 외송 액상제품 포장디자인

외송의 항당뇨 활성 연구결과에 기초하여 개발한 액상제품은 100 mL씩 10포 × 3box 포장단위의 레토르트파우치 제품으로 포장디자인을 완료하였다(Photo. 6-1).



Photo. 6-1. Liquid types of the contained Wa-song

나. 환제품 및 정제형 제품의 포장디자인

외송의 항산화활성 연구결과에 기초한 환(丸) 제품과 항암·면역 활성에 기초한 정제형 제품의 포장디자인은 다음과 같다(Photo. 6-2 ~ 6-4).



Photo. 6-2. Powder and granule types of the contained Wa-song product



Photo. 6-3. Capsule type of the contained Wa-song product



Photo. 6-4. Pills type of the contained Wa-song product

다. 액상 시제품의 품질평가

최종 개발제품의 품질평가는 시제품의 색도변화와 관능평가(색상, 향미, 신맛, 단맛) 항목을 중심으로 연구원 10명이 직접 참여하였으며, 기호성을 중심으로 종합평가를 실시하였다.

CIELAB 균등 색 공간은 Hunter Lab 색 공간을 표준화 한 것으로 밝기를 나타내는 L^* 를 수직 축으로 하고 색도를 나타내는 a^* , b^* 를 수평 평면으로 하는 공간으로 구성되어 있다. 여기서 a^* 가 양의 방향으로 큰 값일수록 빨간 기미를 많이 띠고 음의 방향으로 큰 값일수록 녹색 기미를 많이 띤다. 또한 b^* 가 양의 방향으로 큰 값일수록 노란 기미를 많이 띠고 음의 방향으로 큰 값일수록 파란 기미를 많이 띤다. 중앙은 무채색을 나타낸다.

이러한 Hunter 색차계를 이용하여 개발제품의 색도를 측정한 결과는 Table 6-1과 같이 L^* (명도)은 32.51로 약간의 짙은 색으로 인해 선명도가 낮았으며, 녹색과 빨간색

의 정도를 나타내는 a값은 평균 15.26의 범위를 보여 붉은 갈색의 색상을 나타내었고, b값은 평균 26.21의 범위로서 불투명한 노란색이 관찰되었다(Photo. 6-5).

Table 6-1. Color of products by Hunter Lab.

| | Color | | |
|--------|-------|-------|-------|
| | L | a | b |
| Sample | 32.51 | 15.26 | 26.21 |

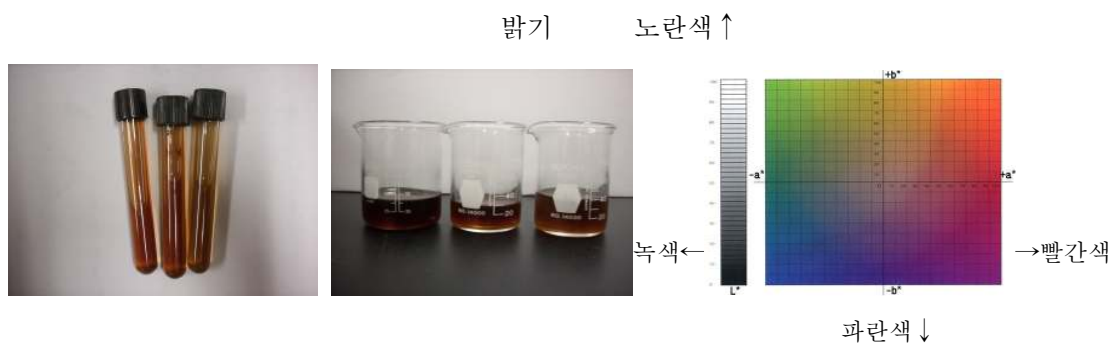


Photo. 6-5. Color comparison by Hunter Lab

라. 개발시제품의 관능평가

개발 시제품의 관능평가를 위해 5명(남 3, 여 2)의 연구원을 대상으로 최종제품에 대한 관능평가를 실시한 결과는 Table 6-2와 같다.

와송 추출물(A)는 성상과 색상 측면에서 보통, 향미와 맛의 측면에서 미흡 수준으로 평가되었으며, 시제품 시료 A-01은 색상과 향미에서, 시료 C-03에서는 향미에서 가장 좋은 평가를 받았다. 또한 시료 B-02에서는 성상, 색상, 향미 및 맛의 측면에서 모두 좋은 평가를 받았으며, 종합평가에서도 시제품 B-02 시료에서 가장 높은 관능평가 결과를 얻었다.

또한 색상과 향미는 짙은 갈색으로 인해 전반적으로 보통(3점) 수준이었으며, 신맛은 적음, 단맛은 좋음, 전체적인 기호도는 보통 수준으로 나타났는데, 이러한 결과로 보아 향후 와송 함유 제품의 기호적 특성을 고려하여 색상 및 맛의 개선이 이루어 진다면 개발 제품으로서 기호도가 높아질 것으로 예상된다.

Table 6-2. The organoleptic characteristics of products

| Items | Volunteers | | | | |
|-----------------------|------------|----|----|----|----|
| | P1 | P2 | P3 | P4 | P5 |
| Color | 4 | 4 | 3 | 3 | 3 |
| Flavor | 3 | 2 | 2 | 3 | 3 |
| Acidity | 3 | 2 | 3 | 3 | 2 |
| Sweet | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| Overall acceptability | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |

* 아주좋음(5), 좋음(4), 보통(3), 나쁨(2), 아주나쁨(1).

관능평가를 위한 평가지는 Table 6-3과 같다. 색상과 향미는 짙은 갈색으로 인해 전반적으로 보통(+) 수준이었으며, 신맛은 적음, 단맛은 좋음, 전체적인 기호도는 보통 수준으로 나타났는데, 이러한 결과로 보아 향후 외송 함유 제품의 기호적 특성을 고려하여 색상 및 맛의 개선이 필요할 것으로 사료된다.

Table 6-3. Table for the organoleptic characteristics test

| 구 분 | 평 가 방 법 및 점수 | | | |
|---------------|--|--|--|--|
| | 시료명 (A:와송 추출물) | 시료명 (A-01) | 시료명 (B-02) | 시료명 (C-03) |
| 1. 성상의 기호도 | 아주좋다(5), 좋다(4) 보통(3), 미흡(2), 아주미흡(1) | 아주좋다(5), 좋다(4) 보통(3), 미흡(2), 아주미흡(1) | 아주좋다(5), 좋다(4) 보통(3), 미흡(2), 아주미흡(1) | 아주좋다(5), 좋다(4) 보통(3), 미흡(2), 아주미흡(1) |
| 2. 색상의 기호도 | 아주좋다(5), 좋다(4) 보통(3), 미흡(2), 아주미흡(1) | 아주좋다(5), 좋다(4) 보통(3), 미흡(2), 아주미흡(1) | 아주좋다(5), 좋다(4) 보통(3), 미흡(2), 아주미흡(1) | 아주좋다(5), 좋다(4) 보통(3), 미흡(2), 아주미흡(1) |
| 3. 향미의 기호도 | 아주좋다(5), 좋다(4) 보통(3), 미흡(2), 아주미흡(1) | 아주좋다(5), 좋다(4) 보통(3), 미흡(2), 아주미흡(1) | 아주좋다(5), 좋다(4) 보통(3), 미흡(2), 아주미흡(1) | 아주좋다(5), 좋다(4) 보통(3), 미흡(2), 아주미흡(1) |
| 4. 맛의 기호도 | 아주좋다(5), 좋다(4) 보통(3), 미흡(2), 아주미흡(1) | 아주좋다(5), 좋다(4) 보통(3), 미흡(2), 아주미흡(1) | 아주좋다(5), 좋다(4) 보통(3), 미흡(2), 아주미흡(1) | 아주좋다(5), 좋다(4) 보통(3), 미흡(2), 아주미흡(1) |
| 5. 종합평가 | 아주좋다(5), 좋다(4) 보통(3), 미흡(2), 아주미흡(1) | 아주좋다(5), 좋다(4) 보통(3), 미흡(2), 아주미흡(1) | 아주좋다(5), 좋다(4) 보통(3), 미흡(2), 아주미흡(1) | 아주좋다(5), 좋다(4) 보통(3), 미흡(2), 아주미흡(1) |

Table 6-4. Organoleptic characteristics of the contained Wa-song products

| 구 분 | 와송 시제품 관능평가 결과 | | | | | | | | | | | |
|------------|----------------|----|----|----|----------|----------|-----------|----|----|----|----------|----------|
| | 시료 (A:와송) | | | | | | 시료 (A-01) | | | | | |
| | 아주 좋다 | 좋다 | 보통 | 미흡 | 아주 미흡 | 계 (명) | 아주 좋다 | 좋다 | 보통 | 미흡 | 아주 미흡 | 계 (명) |
| 1. 성상의 기호도 | | | 3 | 1 | 1 | 5 | | 2 | 2 | 1 | | 5 |
| 2. 색상의 기호도 | | 2 | 3 | | | 5 | 1 | 3 | 1 | | | 5 |
| 3. 향미의 기호도 | | | 2 | 3 | | 5 | | 3 | 2 | | | 5 |
| 4. 맛의 기호도 | | | 2 | 2 | 1 | 5 | | | 4 | 1 | | 5 |
| 5. 종합평가(명) | 0 | 2 | 10 | 6 | 2 | 20 | 1 | 8 | 9 | 2 | 0 | 20 |

| 구 분 | 와송 시제품 관능평가 결과 | | | | | | | | | | | |
|------------|----------------|----|----|----|----------|----------|-----------|----|----|----|----------|----------|
| | 시료 (B-02) | | | | | | 시료 (C-03) | | | | | |
| | 아주 좋다 | 좋다 | 보통 | 미흡 | 아주 미흡 | 계 (명) | 아주 좋다 | 좋다 | 보통 | 미흡 | 아주 미흡 | 계 (명) |
| 1. 성상의 기호도 | | 3 | 1 | 1 | | 5 | | 1 | 2 | 2 | | 5 |
| 2. 색상의 기호도 | 1 | 3 | 1 | | | 5 | | 1 | 4 | | | 5 |
| 3. 향미의 기호도 | 3 | 1 | 1 | | | 5 | 1 | 2 | 2 | | | 5 |
| 4. 맛의 기호도 | 2 | 3 | | | | 5 | | 1 | 4 | | | 5 |
| 5. 종합평가(명) | 6 | 10 | 3 | 1 | 0 | 20 | 1 | 5 | 12 | 2 | 0 | 20 |

2. 건강기능식품 제조방법 및 규격

와송을 함유하는 건강기능식품은 기준 규격형(고시형) 건강기능식품 37종 중 와송의 향산화, 항당뇨 및 항암면역증진활성 연구결과에 기초하여 와송 유용물질 추출물의 배합비율을 달리하여 수회 반복실험을 통해 활성이 가장 높게 관찰된 와송을 함유한 키토올리고당 함유제품으로 선정하였다. 와송을 함유한 키토올리고당 함유제품 제조를

위한 배합비율, 단가는 Table 6-5와 같다.

Table 6-5. Formula of healthy functional foods containing wa-song

| 원재료명 | 배합비(%) | 일일섭취량 (mg) | 실사용량(g) | 원료단가 (원/kg) | 금액(30set) |
|----------------------|--------|---------------|---------|----------------|-----------|
| 와송 20% 함유 추출물 분말 | 20.0 | 500.0 | 500.0 | 30,000 | 22,500 |
| 키토올리고당 분말(60% 이상) | 30.0 | 900.0 | 900.0 | 80,000 | 72,000 |
| 결정셀룰로오스 | 23.0 | 690.0 | 690 | 3,500 | 2,415 |
| 옥수수전분 | 18.5 | 555.0 | 555.0 | 2,500 | 1,388 |
| 붉은토끼풀 추출물 분말 | 1.0 | 30.0 | 30.0 | 80,000 | 2,400 |
| 토마토추출분말 | 1.0 | 30.0 | 30.0 | 75,000 | 2,250 |
| 포도씨추출분말 | 0.5 | 15.0 | 15.0 | | 3,150 |
| 이산화규소 | 1.0 | 30.0 | 30.0 | 5,500 | 165 |
| 0호 캡셀 | - | - | - | 4.0 | - |
| 합 계 | 100.0 | 3000.0 | | | 127,868 |

선정된 제품은 일일섭취량과 배합비를 조정하여 식품의약품안전청에서 규정하고 있는 기준에 의해 최종 제품의 컨셉을 정제형태로 결정하였으며, 포장단위는 1~3 g 단위의 정제형을 200~300개입/병 포장으로 하였으며, 시제품 샘플은 건강기능식품 전문 제조업체에 의뢰하여 생산완료하였다. 개발된 건강기능식품 시제품은 1회 2정씩, 1일 3회 섭취되는 것을 기준으로 하였으며, 이 또한 식품의약품안전청의 규정에 준하도록 하였다.

향후 본 과제 참여기업에서 생산을 희망할 경우에는 건강기능식품 전문생산업체와 공동 연구를 통해 와송 추출물을 함유하는 조성물을 개별인증형 건강기능식품으로 인증받을 수 있는 추가 연구가 필요할 것으로 사료된다.

3. 특허출원

【요약서】

【요약】

본 발명은 추출수율을 증대시킨 와송의 추출방법과, 와송의 항당뇨 효과를 극대화한 항당뇨 복합조성물에 관한 것이다.

본 발명에 따른 와송의 추출방법은 와송을 열풍건조한 후 열수추출하는 것을 특징으로 한다.

본 발명에 따른 항당뇨 복합조성물은, 열풍건조한 후 열수추출한 와송 추출물; 백봉령, 창출, 사인을 포함한 생약재 추출물;을 함유하는 것을 특징으로 한다. 여기서, 상기 와송 추출물은 열풍건조한 와송을 열수추출한 후 15~20brix로 농축한 다음 부형제를 첨가하여 와송 농축물의 함유량을 15~25중량%로 조절하고 건조시킨 와송 추출 건조물 형태로 이용하고, 상기 생약재 추출물은 백봉령, 창출, 사인을 열수추출하고 건조시킨 생약재 추출 건조물 형태로 이용할 수 있다.

【대표도】

도 4

【색인어】

와송, 백봉령, 창출, 사인, 당뇨, 혈당

【명세서】

【발명의 명칭】

와송의 추출방법 및 그 방법으로 추출된 와송 추출물을 함유하는 항당뇨 복합 조성물{Extracting Method of Wa-song and Antidiabetic Composition Comprising the Wa-song Extract}

【발명의 상세한 설명】

【기술분야】

본 발명은 추출수율을 증대시킨 와송의 추출방법과, 와송의 항당뇨 효과를 극대화한 항당뇨 복합조성물에 관한 것이다.

【배경기술】

와송(Wa-song, *Orostachys japonicus* A. Berger)은 오래된 기와지붕 위나 깊은 산의 바위 위에 자라고 있는 돌나무과(Crassulaceae)의 여러해살이 식물로, 잎은 살이 찌고 버들잎 모양으로 줄기를 둘러싸고 무더기로 자란다. 와송은 기와지붕 위에서 자라는 모양이 소나무 잎이나 꽃을 닮아서 우리나라에서는 와송 또는 바위솔이라고 불린다.

와송은 우리나라에서 오래전부터 민간요법으로 간염, 종기에 대한 면역작용, 지혈제 및 암치료제 등으로 사용되어져 왔으며, 최근 와송에 존재하는 phytochemicals 로 sterol, triterpenoid류, 플라보노이드류 및 페놀 화합물 등이 분리되었고, 소화기 계통의 암에 효과가 좋은 것으로 알려지면서 이에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

본 발명자들은 와송을 기능성 식품소재로서 활용가치를 증대시키고자 본 발명을 개발하기에 이르렀다.

【발명의 내용】

【해결하고자 하는 과제】

본 발명은 와송의 적극적인 이용을 위해 개발된 것으로서, 다음과 같은 기술적 과제를 갖는다.

첫째, 본 발명은 와송의 추출수율을 증대시킬 수 있는 와송의 추출방법을 제공하고자 한다.

둘째, 본 발명은 와송의 항당뇨 효과를 극대화시키기 위해 다른 생약재와 혼합한 항당뇨 복합조성물을 제공하고자 한다.

【과제 해결 수단】

상기한 기술적 과제를 해결하기 위해 본 발명은, 와송을 열풍건조한 후 열수추출하는 것을 특징으로 하는 와송의 추출방법을 제공한다.

또한, 본 발명은 상기한 추출방법으로 추출된 와송 추출물; 백봉령, 창출, 사인을 포함한 생약재 추출물;을 함유하는 것을 특징으로 하는 항당뇨 복합조성물을 제공한다.

나아가, 본 발명은 열풍건조한 와송을 열수추출한 후 15~20brix로 농축한 다음 부형제를 첨가하여 와송 농축물의 함유량을 15~25중량%로 조절하고 건조시킨 와송 추출 건조물; 백봉령, 창출, 사인을 열수추출하고 건조시킨 생약재 추출 건조물;을 함유하는 것을 특징으로 하는 항당뇨 복합조성물을 제공한다.

【효과】

본 발명에 따르면 다음과 같은 효과가 기대된다.

첫째, 와송의 추출수율을 극대화시킬 수 있기 때문에 와송의 유효성분을 유용하게 활용할 수 있다.

둘째, 와송 추출물을 백봉령, 창출, 사인과 같은 생약재 추출물과 함께 급이한 결과 항당뇨 효과가 더욱 우수해졌음을 확인할 수 있었는 바, 본 발명에 따른 복합조성물은 항당뇨 용도로 유리하게 이용할 수 있다.

【발명의 실시를 위한 구체적인 내용】

본 발명에 따른 와송의 추출방법은 열풍건조한 후 열수추출하는 과정으로 이루어진다. 하기 [실시예1]를 통해 열풍건조와 물의 의한 열수추출방법이 추출수율에서 가장 유리함을 확인할 수 있었다.

본 발명에 따른 항당뇨 복합조성물은 와송 추출물; 백봉령·창출·사인의 생약재 추출물;을 포함하여 구성된다. 와송 추출물은 추출수율을 극대화한 것을 이용함이 바람직하겠다. 하기 [실시예2]에서는 항당뇨 복합조성물의 구체적인 예로서, 열풍건조한 와송을 열수수출한 후 15~20brix로 농축한 다음 부형재를 첨가하여 와송 농축물의 함유량을 15~25중량%로 조절하고 건조시킨 와송 추출 건조물;과, 백봉령, 창출, 사인을 열수추출하고 건조시킨 생약재 추출 건조물;의 혼합 조성물을 제안한다. 여기서 생약재 추출 건조물은 백봉령, 창출, 사인을 동일한 양으로 준비하여 열수추출한 후 건조한 것이고, 상기 와송 추출 건조물과 생약재 추출 건조물은 1~3:1의 중량비로 조성될 수 있다.

이하에서는 실시예에 의거하여 본 발명을 살펴본다. 다만, 하기의 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐이며, 본 발명의 범위가 이로써 한정되는 것은 아니다.

[실시예 1] 와송 추출

(1) 건조방법에 따른 와송의 건조수율

건조방법에 따른 와송의 건조수율을 조사하기 위하여 하기 [표 1]과 같이 건조조건(양건, 열풍건조, 동결건조)에 따라 시료 각 2kg을 건조한 후 건조수율을 측정하였

다.

【표 1】

와송의 건조조건

| 건조방법(Dry method) | Sample(g) | Temperature | Time(min) |
|------------------|-----------|-------------|-----------|
| 태양건조(Sun dry) | 2,000 | 실온 | 500~530 |
| 열풍건조(Heat dry) | 2,000 | 70~80℃ | 450~550 |
| 동결건조(Freeze dry) | 2,000 | -45~-50℃ | 48~50 |

건조방법에 따른 와송의 건조수율을 측정한 결과는 도 1과 같이 나타났다. 도 1에서 보는 바와 같이 열풍건조, 동결건조, 태양건조 순으로 각각 10.0%, 8.20%, 6.25%로 나타났는 바, 열풍건조가 건조수율에서 가장 우수한 건조방법임을 확인할 수 있다.

(2) 건조방법에 따른 와송의 추출수율

건조방법에 따른 와송의 열수추출 수율을 조사하기 위하여 양건, 열풍건조, 동결건조된 시료를 각각 하기 [표 2]의 추출조건에 따라 열수추출한 후 추출물의 농도(Brix)를 측정하고, 추출·농축액을 동결건조한 후 건조수율을 측정하였다.

【표 2】

와송의 열수추출조건

| 건조방법(Dry method) | Temperature | Time(hr) | Solution rate | Concentration of extract(Brix) |
|------------------|-------------|----------|---------------|--------------------------------|
| 태양건조(Sun dry) | 95~100℃ | 4~5 | 7:1 | 1.6 |
| 열풍건조(Heat dry) | 95~100℃ | 4~5 | 7:1 | 5.0 |
| 동결건조(Freeze dry) | 95~100℃ | 4~5 | 7:1 | 2.4 |

건조방법에 따른 와송의 열수추출 수율을 측정한 결과는 도 2와 같이 나타났다. 도 2에서 보는 바와 같이 건조방법에 따라 추출한 후 동결건조한 와송의 열수추출 수율은 열풍건조 시료가 2.762%로 가장 높게 나타났으며, 동결건조 시료 1.804%, 태양건조 시료 0.677% 순으로 나타났다.

(3) 추출용매에 따른 와송의 추출수율

추출용매에 따른 와송의 추출수율을 조사하기 위하여 열풍건조된 시료를 하기 [표 3]과 같은 조건에서 물, 에탄올, 메탄올로 각각 추출·농축하였으며, 농축액은 다시 동결건조하여 건조 수율로 계산하였다. 이때 에탄올 및 메탄올 추출·농축액은 증류수를 이용하여 5회 이상 반복 증류한 후 농축하였으며, 이 농축액을 동결건조한 후 건조 수율을 측정하였다.

【표 3】

와송의 추출조건

| 추출용매(Solvent) | Temperature | Time | Solution rate |
|---------------|-------------|---------|---------------|
| 물(Water) | 95~100℃ | 4~5 hr | 7:1 |
| 에탄올(Ethanol) | 70~80℃ | 4~5 hr | 7:1 |
| 메탄올(Methanol) | soaking | 30 days | 7:1 |

추출용매에 따른 와송의 추출수율을 측정한 결과는 도 3과 같이 나타났다. 도 3에서 보는 바와 같이 물추출물에서 가장 높은 수율(2.762%)을 얻을 수 있었으며, 에탄올추출물 0.723%, 메탄올추출물 0.542%로 동결건조 수율을 나타내었다

이상과 같이 [실시예 1]을 통해 와송의 건조조건별, 추출용매별 가공특성을 조사한 결과 열풍건조 조건과 열수추출 조건에서 가장 높은 수율을 나타내는 것을 알 수 있는 바, 와송의 가장 적합한 가공특성 조건으로는 열풍건조 시료를 열수추출하는 것이라 하겠다.

[실시예 2] 와송 추출물을 함유한 복합조성물

(1)와송 추출 건조물 제조

열풍건조한 와송을 도 4에서 같이 열수추출, 1차농축, 부형제 첨가, 2차농축, 연과, 건조하여 분말 상태의 와송 추출 건조물을 확보하였다.

(2)생약재 추출 건조물 제조

백봉령, 창출, 사인을 동량으로 준비하고 이들 생약재를 도 4에서 같이 통상의 방법으로 열수추출한 후 건조하여 분말 상태의 생약재 추출 건조물을 확보하였다.

[실시예3] 와송 추출물을 함유한 복합조성물의 항당뇨 효과

(1) 실험동물과 식이

평균체중이 150 ± 10 g인 Sprague-Dawley계 5주령 수컷 흰쥐를 (주)샘타코(서울, Korea)로부터 분양받아, 동물사육실에서 고품사료로 1주일간 적응시킨 후 7% 대두유를 함유한 기본식이(normal diet)로 다시 1주일간 예비사육하여 체중에 따라 각 군의 체중이 비슷하도록 8마리씩 5군으로 나누어 사육상자에 한 마리씩 넣어 4주간 실험사육하였다. 사육실의 조건으로 온도는 $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도는 $50 \pm 4\%$, 명암주기는 12시간 (07:00~19:00)으로 조절하였으며, 사육 기간동안 물과 사료는 자유 급이하였다.

실험동물은 당뇨를 유발하지 않은 정상군(Normal), streptozotocin으로 당뇨를 유발한 당뇨군(Diabetic), 당뇨 유발 흰쥐에 식이조건을 달리한 실험군(DMW-0, DMW-1, DMW-3)으로 구분하였다. 당뇨 유발은 췌장의 β -세포에만 특이적으로 작용하며 다른 장기에는 영향을 미치지 않는 것으로 알려진 streptozotocin(Sigma Co., USA)을 0.01M citrate buffer(pH 4.5)에 용해하여 1회(45mg/kgBW) 복강주사하는 방식으로 이루어졌으며, 한편 정상군은 동량의 citrate buffer 용액을 복강주사하였다. 당뇨 유발 확인은 streptozotocin을 주사한 48시간 후 공복상태에서 꼬리정맥으로부터 채혈하여 혈당계(Active Blood Glucose Meter, ACCU-CHEK[®] USA)로 혈당을 측정하여 혈당농도가 250 mg/dL 이상인 것만을 당뇨 유발인 것으로 간주하고 실험에 사용하였다.

실험동물의 식이조성은 하기 [표 4]와 같다. [표 4]에서 보는 바와 같이 정상군과 당뇨군에 조제사료를 급이하고 실험군에는 조제사료와 상기 [실시예2]에서 제조한 와송 추출 건조물 내지 생약재 추출 건조물을 적절히 혼합하여 급이하였다.

【표 4】 식이 조성

| | 정상군 (Normal) | 당뇨군 (Diabetic) | 실험군1 (DMW-0) | 실험군2 (DMW-1) | 실험군3 (DMW-3) |
|--|-----------------|-------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Corn starch | 39.74 | 39.74 | 38.74 | 38.74 | 38.74 |
| Sucrose | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Dextrin | 13.2 | 13.2 | 13.2 | 13.2 | 13.2 |
| Casein | 20.0 | 20.0 | 20.0 | 20.0 | 20.0 |
| Corn oil | 7.0 | 7.0 | 7.0 | 7.0 | 7.0 |
| Cellulose | 5.0 | 5.0 | 5.0 | 5.0 | 5.0 |
| Mineral mix. ¹ | 3.5 | 3.5 | 3.5 | 3.5 | 3.5 |
| Vitamin mix. ² | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
| L-Cysteine | 0.3 | 0.3 | 0.3 | 0.3 | 0.3 |
| Choline bitartrate | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 |
| 와송 추출 건조물 | - | - | - | 0.5 | 0.75 |
| 생약재 추출 건조물 | - | - | 1 | 0.5 | 0.25 |
| 정상군- 조제사료 당뇨군- 조제사료 실험군1- 조제사료 + 생약재 추출 건조물 실험군2- 조제사료 + (와송 추출 건조물:생약재 추출 건조물=1:1) 실험군3- 조제사료 + (와송 추출 건조물:생약재 추출 건조물=3:1) ¹ AIN-76 TM mineral mixture ² AIN-76 TM vitamin mixture. | | | | | |

(2) 경구당부하 검사

4주간의 실험사육이 끝난 후 실험동물을 14시간 절식시킨 후 당내성 반응을 위해 공복시 꼬리정맥에서 혈액을 채취하여 혈당을 측정하여 공복 전의 혈당치로 하였다. 각 군별로 glucose(2g/kg)를 경구투여하고 시간의 경과에 따라 혈당을 측정하였으며, SPSS package를 이용하여 통계적 유의성은 일원배치 분산분석(one-way analysis of variance)을 한 후 $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test로 비교분석을 하였다.

경구당부하 검사 결과는 도 5와 같다. 도 5에서 보는 바와 같이 정상군(Normal)은 공복시 혈당이 87.40 mg/dL이었으며, 포도당 급이 60분경에 158mg/dL로 최고치를 보였으며, 120분 경과 후 점차 감소되어 180분 이후에는 96.00 mg/dL로 공복시 혈당과 유의차가 없었다. 당뇨군(Diabetic)은 공복시 혈당이 208.80 mg/dL이었는데, 포도당 급이 후 180분경까지 유의적인 감소가 없었다. 실험군1,2,3(DMW-0, DMW-1, DMW-3)은 공복시 혈당이 197.60~199.00mg/dL였으며, 실험군1(DMW-0)은 포도당 급이 30분경에 298.00mg/dL로 최고치를 보였고, 실험군2(DMW-1)은 포도당 급이 60분경에 287.80 mg/dL로 가장 높은 혈당 함량을 보였다가 그 이후에 점차 감소

하였지만 180분 이후에도 공복시 혈당 함량보다는 유의적으로 높았다. 실험군 3(DMW-3)은 포도당 급이 30분경에 278.20 mg/dL로 가장 높았으나, 점차 감소되어 180분 경과후에는 202.00 mg/dL로 공복시 혈당 함량과 유사한 수준으로 회복되었다.

(3)혈당 분석

4주간 실험사육한 후 최종일에 심장으로부터 얻은 혈액의 혈당을 측정하였다. 혈당은 glucose 측정용 kit시약(AM 201-k, Asan, Korea)으로 측정하였으며, 20 μ l의 혈청에 3ml의 효소시약을 첨가한 후 37°C에서 5분간 incubation한 후 혈청 무침가구를 대조로 하여 파장 500nm에서 흡광도를 측정하였다. 혈당 함량은 표준검량선에 의해 mg/dL로 표시하였으며, SPSS package를 이용하여 통계적 유의성은 일원배치 분산분석(one-way analysis of variance)을 한 후 $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test로 비교분석을 하였다.

혈당 분석 결과는 도 5와 같다. 정상군(Normal)은 122.29 mg/dL, 당뇨병(Diabetic)의 혈당은 324.43 mg/dL이었으나, 본 발명에 따른 복합조성물을 급이한 실험군 2(DMW-1)와 실험군 3(DMW-3)은 각각 272.50 mg/dL, 258.24 mg/dL로 당뇨병에 비해 유의적으로 감소한 것을 확인할 수 있었다. 또한 실험군 1에서보다 실험군 2,3에서 혈당이 더 감소한 것을 확인할 수 있는 바, 생약재 추출 건조물 단독보다는 와송 추출 건조물과의 혼합이 혈당 저하에 더욱 효과적이라고 하겠다.

(4)당화 헤모글로빈 측정

당화 헤모글로빈 함량은 Hemoglobin A1c(Glycosylated hemoglobin, Asan, Korea)으로 측정하였다. EDTA가 처리된 전혈에서 Helena laboratories kit를 사용하여 microcolumn chromatography로 측정하였다. 총 헤모글로빈에 대한 당화 헤모글로빈의 흡광도비에 의해 당화헤모글로빈 함량을 산출하였으며, PSS package를 이용하여 통계적 유의성은 일원배치 분산분석(one-way analysis of variance)을 한 후 $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test로 비교분석을 하였다.

혈중 당화 헤모글로빈 함량을 측정한 결과는 도 6과 같다. 당뇨병의 경우 신장 기능의 저하로 헤모글로빈 함량이 저하되며, 높은 수준의 혈당은 헤모글로빈과 결합함으로써 당화 헤모글로빈을 형성하게 되므로, 당뇨병에서 당화 헤모글로빈의 저하는 당뇨 조절에 효과가 있음을 의미한다. 도 6에서 보는 바와 같이 당뇨병(Diabetic)은 정상군(Normal)에 비해 당화 헤모글로빈의 함량이 유의적으로 증가하였으나, 실험군 1,2,3(DMW-0, DMW-1, DMW-3)은 당뇨병에 비해 유의적으로 당화 헤모글로빈의 함량

이 감소하였다. 특히, 실험군1에서보다 실험군2,3에서 당화 헤모글리빈 함량이 더 감소한 것을 확인할 수 있는 바, 생약재 추출 건조물과 와송 추출 건조물의 혼합 급이는 혈중 당화 헤모글로빈의 함량 개선에 유리한 효과가 있음을 예상할 수 있다.

(5)간장 조직의 글리코겐 함량 측정

간장 조직 일정량에 30% KOH용액을 가하여 100℃의 water bath상에서 20분간 가열한 후 급냉하였다. 여기에 95% 에탄올을 혼합하여 다시 5분간 가열한 후 3000 rpm에서 4분간 원심분리한 다음 상층액을 제거하였다. 침전물에 증류수를 가하고 0.2% anthrone 용액을 첨가하여 혼합한 다음 가열·냉각한 후 620nm에서 흡광도를 측정하였다. glucose를 이용하여 동일한 방법으로 얻은 표준 검량선으로부터 glycogen 함량을 산출하였으며, PSS package를 이용하여 통계적 유의성은 일원배치 분산분석(one-way analysis of variance)을 한 후 $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test로 비교분석을 하였다.

간장 조직의 글리코겐 함량을 측정한 결과는 도 7과 같다. 당뇨의 경우 글리코겐을 합성하는 글리코겐 합성효소의 활성이 낮아짐으로써 간장 조직의 글리코겐 함량 감소가 초래되며, 글리코겐의 합성은 포도당의 농도 및 인슐린에 의존적이므로, 포도당의 이용이 어렵고 인슐린 분비가 적은 당뇨 발병시 간장 조직 글리코겐 함량의 감소는 불가피하다. 도 7에서 보는 바와 같이 정상군(Normal)에서 글리코겐 함량은 493.44 mg/g이었는데 당뇨군(Diabetic)은 276.70 mg/g으로 유의적으로 감소하였으며, 실험군1,2,3에서는 당뇨군보다는 유의적으로 증가하였다. 특히, 실험군1,2,3의 결과를 보면 와송 건조 추출물의 첨가량 증가에 따라 간장 조직의 글리코겐 함량도 유의적으로 증가하는 것을 알 수 있다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

와송을 열풍건조한 후 열수추출하는 것을 특징으로 하는 와송의 추출방법.

【청구항 2】

제1항에 따라 추출된 와송 추출물;

백봉령, 창출, 사인을 포함한 생약재 추출물;을 함유하는 것을 특징으로 하는
항당뇨 복합조성물.

【청구항 3】

열풍건조한 와송을 열수수출한 후 15~20brix로 농축한 다음 부형재를 첨가하
여 와송 농축물의 함유량을 15~25중량%로 조절하고 건조시킨 와송 추출 건조물;

백봉령, 창출, 사인을 열수추출하고 건조시킨 생약재 추출 건조물;

을 함유하는 것을 특징으로 하는 항당뇨 복합조성물.

【청구항 4】

제3항에서,

상기 생약재 추출 건조물은 백봉령, 창출, 사인을 동일한 양으로 준비하여 열
수추출한 후 건조한 것이며,

상기 와송 추출 건조물과 생약재 추출 건조물은 1~3:1의 중량비로 조성되는
것을 특징으로 하는 항당뇨 복합조성물.

【도면의 간단한 설명】

도 1은 건조방법에 따른 와송의 건조수율을 나타낸다.

도 2는 건조방법에 따른 와송의 열수추출 수율을 나타낸다.

도 3은 추출용매에 따른 와송의 추출수율을 나타낸다.

도 4는 본 발명에 따른 항당뇨 복합조성물의 제조공정을 도시한다.

도 5는 본 발명에 따른 항당뇨 복합조성물의 급이에 따른 간장조직의 글리코
겐 함량 결과를 나타낸다.

도 6은 본 발명에 따른 항당뇨 복합조성물의 급이에 따른 혈당 함량 측정 결
과를 나타낸다.

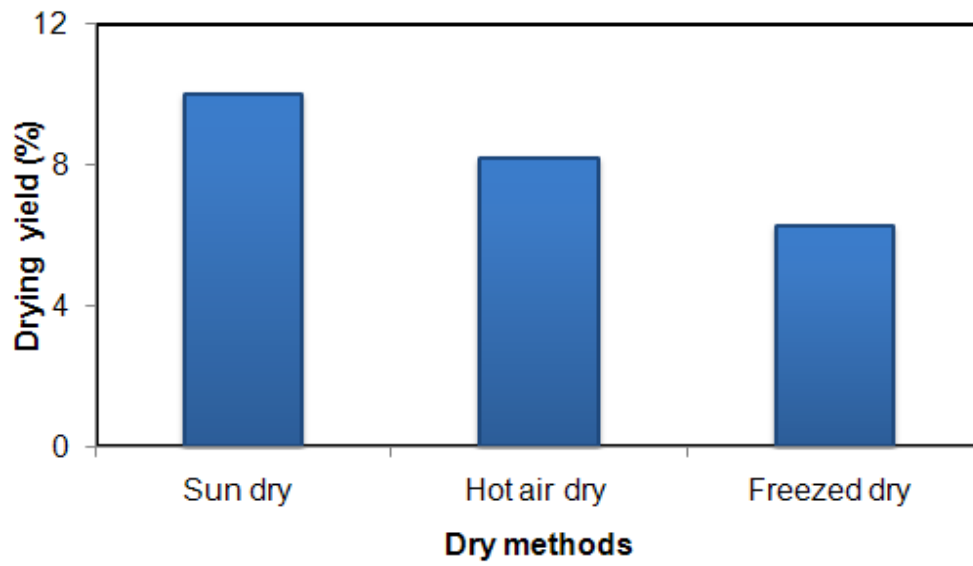
도 7은 본 발명에 따른 항당뇨 복합조성물의 급이에 따른 경구당부하 검사 결

과를 나타낸다.

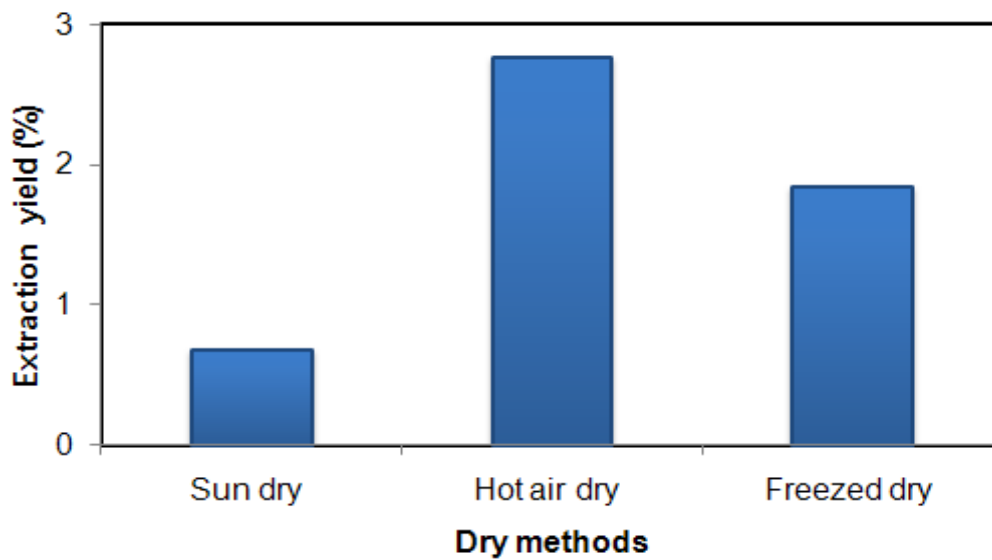
도 8은 본 발명에 따른 항당뇨 복합조성물의 급이에 따른 당화 헤모글로빈 함량 측정 결과를 나타낸다.

【도면】

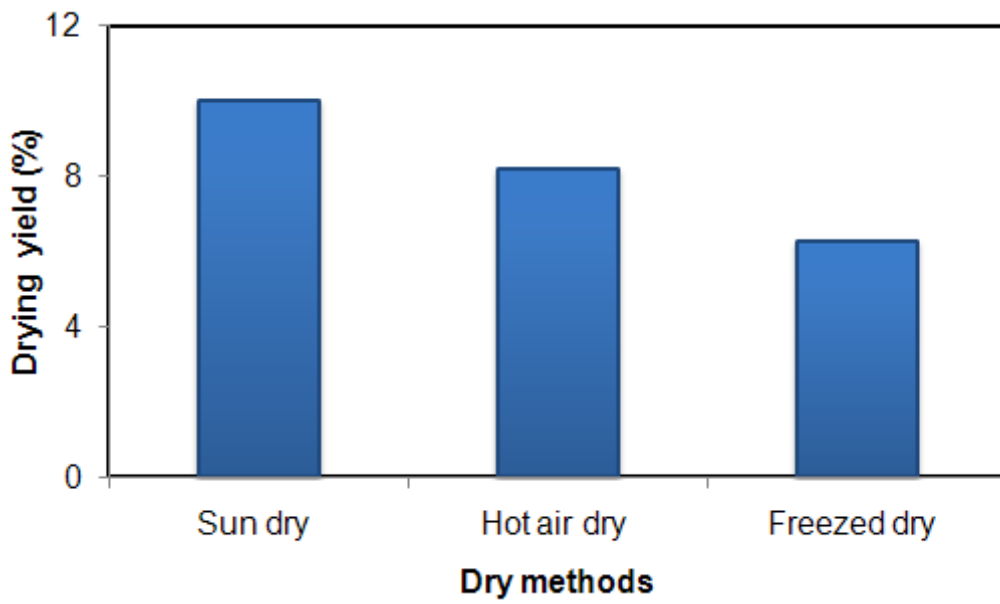
【도 1】



【도 2】



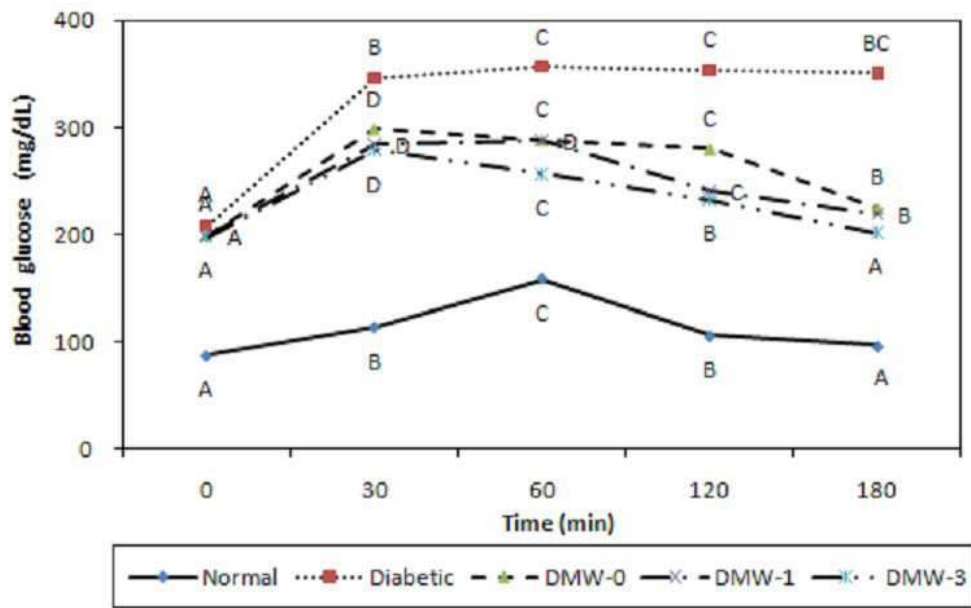
【도 3】



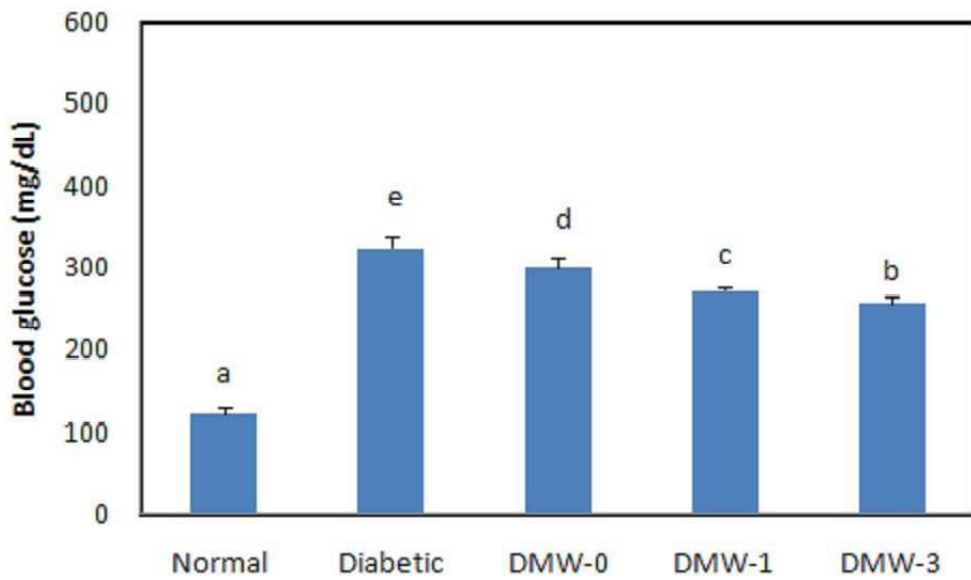
【도 4】



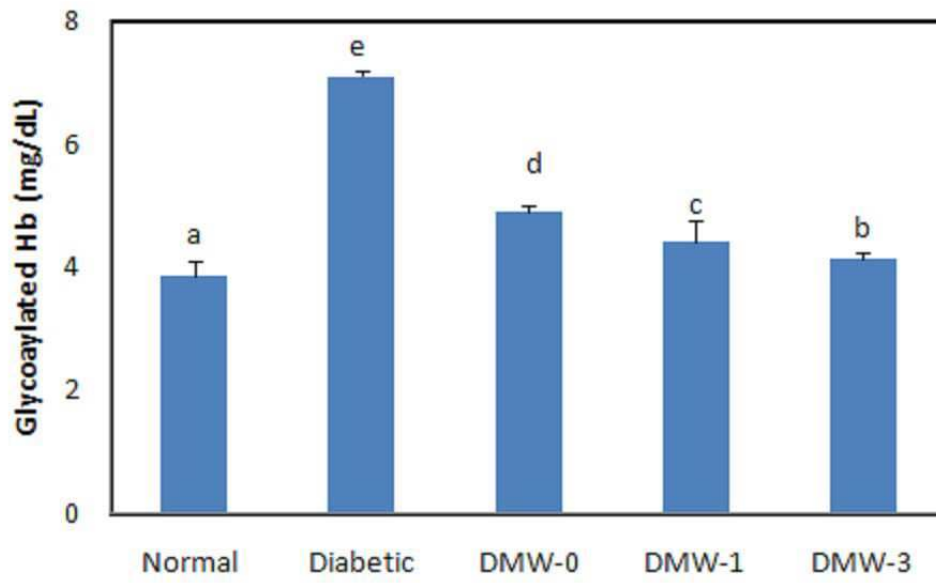
【도 5】



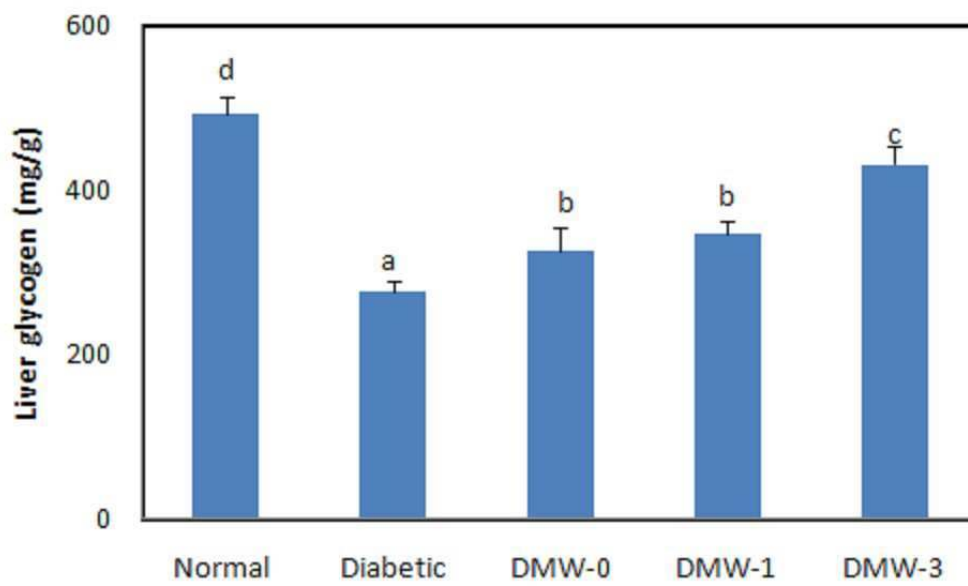
【도 6】



【도 7】



【도 8】



4. 제품 홍보

가. 행사명: “2009년 진주시민 건강 축제”

나. 행사기간: 2009년 4월15일 ~ 18일

다. 행사내용: 와송의 기능성에 관한 시민 홍보, 건강기능 식품 홍보,
노화 억제 및 항당뇨 활성을 갖는 상황버섯 복합물의 시음회 개최

라. 행사관련 사진

| | |
|---|--|
|  |  |
| <p>1일차 행사관련 사진</p> | <p>2일차 행사관련 사진</p> |
|  |  |
| <p>3일차 행사관련 사진</p> | <p>4일차 행사관련 사진</p> |

제 4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

- 1차년도

| 연구목표 | 평가착안점 | 연구개발 수행내용 |
|--------------------------|---------------------|--|
| 와송의 유용생리 활성 물질의 분리 및 분석 | - 물질의 분리 여부 | ○와송의 유용물질 분리 및 분석 (목표 달성도 : 100%) - 와송의 기능성 물질 분리 및 분석 완료 - 와송의 추출용매별 물질 분리 완료 |
| 와송 유용물질의 항산화 활성 구명 | - 항산화 활성의 위위성 검증 여부 | ○와송 유용물질의 항산화 활성 연구 (목표 달성도 : 100%) - 총 페놀 함량, 플라보노이드 함량, DPPH라디칼 소거능, 환원력, OH 소거능, SOD유사활성, TBARS 함량, 과산화 지질 저해능 측정, 아질산염 소거능 측정 완료 |
| 와송 유용물질의 면역활성 연구 | - 면역 활성의 위위성 검증여부 | ○유용물질의 면역활성 연구 (목표 달성도 : 100%) - Cytokine 생성 활성을 통한 면역활성 연구 완료 - Nitric oxide 생성 연구 완료 |
| 와송의 전처리 방법을 통한 원료가공특성 연구 | - 원료의 가공특성 확립 여부 | ○와송의 수확, 건조 및 저장 조건 확립 (목표 달성도 : 100%) - 수확시기별 특성 연구 완료 - 추출용매별 특성 연구 완료 - 처리조건별 특성 연구 완료 |

- 2차년도

| 연구목표 | 평가착안점 | 연구개발 수행내용 |
|--|---|---|
| 조성물 개발 및 분석 | <ul style="list-style-type: none"> - 조성물 개발 여부 - 조성물 특성 분석 여부 | <p>○1차년도 결과에 기초한 유용물질의 최적조성물 개발 (목표 달성도 : 100%)</p> <ul style="list-style-type: none"> - 분획물질의 최적조성물 개발 및 선정 완료 - 최적조성물의 가공특성 시험 완료 |
| <p>와송 항당뇨 활성 구명</p> <p>식용유지를 기질로 한 항산화 활성 구명</p> | <ul style="list-style-type: none"> - 항당뇨 활성검증 여부 - 항산화 활성 검증 여부 | <p>○와송의 항당뇨 활성 연구 (목표 달성도 : 100%)</p> <ul style="list-style-type: none"> - 경구당부하검사, 혈당 함량 측정완료 - 혈중 지질성분, 간장 및 신장 지질 성분 분석 - 간장의 글리코젠, conjugated dien 및 단백질 함량, TBARS 함량 및 항산화 활성 측정 완료 <p>○와송의 식용유지 기질에서 항산화활성 연구 (목표 달성도 : 100%)</p> <ul style="list-style-type: none"> - 색도, 아니시딘가, 산가, POV, TBA가 측정 완료 |
| 와송 유용물질의 항암활성 연구 | <ul style="list-style-type: none"> - 항암 활성의 우위성 검증여부 | <p>○유용물질의 항암활성 연구 (목표 달성도 : 100%)</p> <ul style="list-style-type: none"> - Tumor cell lines을 이용한 항암활성 측정 완료 - SRB assay 측정 완료 - FACS에 의한 세포주기 변화 측정 완료 |
| 상품화 (바이오식품의 형태) | <ul style="list-style-type: none"> - 제형화 결과물 여부 | <p>○와송의 유용 생리 활성물질을 이용한 제형화 연구 완료 (목표 달성도 : 100%)</p> <ul style="list-style-type: none"> - 바이오헬스 소재 : 분말형 1종, 과립형 1종 - 상품화 제품 : 액상과우치 1종, 정제형 1종 환(丸)형 1종 |

- 3차년도

| 연구목표 | 평가착안점 | 연구개발 수행내용 |
|-------------------------|--|---|
| 시제품 개발 및 제품특성 분석 | <ul style="list-style-type: none"> - 시제품개발 여부 - 제품특성분석 여부 | <p>○와송 및 생약재 조성물을 이용한 시제품 개발 (목표 달성도 : 100%)</p> <ul style="list-style-type: none"> - 시제품 개발완료(포장디자인 개발) - 시제품의 관능검사 및 특성 분석 완료 |
| 와송 시제품의 항산화 및 항당뇨 활성 구명 | <ul style="list-style-type: none"> - 항산화 활성의 우수성 검증 여부 - 항당뇨 활성의 우수성 검증 여부 | <p>○와송 시제품의 항산화 활성 연구 (목표 달성도 : 100%)</p> <ul style="list-style-type: none"> - DPPH라디칼 소거능, 환원력, OH 소거능, SOD유사활성, TBARS 함량, 과산화 지질 저해능 측정, 아질산염 소거능 측정 α-glucosidase 저해활성 측정 완료 <p>○와송 시제품의 항당뇨 활성 연구 (목표 달성도 : 100%)</p> <ul style="list-style-type: none"> - 경구당부하검사, 혈당 측정 당화 헤모글로빈 측정 간장 및 신장조직의 지질성분 분석 간장 및 신장의 지질과산화물 및 항산화 활성 측정 완료 |
| 와송 시제품의 항암·면역활성 연구 | <ul style="list-style-type: none"> - 항암·면역 활성의 우수성 검증여부 | <p>○시제품의 항암·면역활성 연구 (목표 달성도 : 100%)</p> <ul style="list-style-type: none"> - Tumor cell lines(AGS, HT-29, HepG-2, MCF-7)을 이용한 항암활성 측정 완료 |
| 상품화 (생산자동화 공정 개발) | <ul style="list-style-type: none"> - 생산자동화 공정 구축 여부 | <p>○와송 시제품의 생산자동화 공정 확립 (목표 달성도 : 100%)</p> <ul style="list-style-type: none"> - 원료의 제조공정 확립 - 생산자동화공정 개발 확립 |

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절 연구개발결과의 활용방안

1. 특허출원

- 와송의 유용 생리활성물질 조성물 특허, 개발제품 특허 및 제조공정 특허

2. 개발기술의 기술이전

- 개발대상 기술을 참여기업에 기술 이전하여 산업화함으로서 재배농가의 안정적 수입원 보장 및 지역경제 활성화

3. 명품 브랜드화

- 지역 특화작물을 이용한 고부가가치 명품브랜드 추진

4. 천연물소재 지역특화 산업 집중육성

- 지리산 권역을 중심으로 한 한방 천연물소재를 집중 육성함으로서 수입개방화로 인한 특화작물 재배농가의 대외 경쟁력 향상

제 2 절 기대성과

1. 기술적 측면

- (가) 천연물소재를 이용한 고부가가치 바이오식품의 개발기술 및 산업화기술의 기본 모델 확립
- (나) 무독성, 저비용의 약용식품 및 영양의학식품 개발을 위한 천연물소재 기술 보유
- (다) 건강보조 식품이나 상용식품에 적용할 수 있는 방안을 제시함으로서 기능성 천연물 소재의 다양성을 부여하고, 그 활용도를 극대화시킴.
- (라) 민간요법으로 사용되던 와송의 항암면역 증강활성 및 항산화, 항당뇨 활성 메

카니즘을 현대 과학적으로 검증함으로써 개발대상 기술과 제품의 우수성, 신뢰성 확보

(마) 개발기술 및 개발제품의 확대 적용함으로써 와송의 제품화에 적용된 기술은 향후 지리산 토종 약초를 활용한 한방의 과학화에 확대 적용 가능.

2. 경제적·산업적 측면

(가) 와송의 유용 생리활성물질을 이용한 천연물 식품소재를 개발하여 이를 상용식품과 건강 보조 식품으로 개발·상품화하여 명품브랜드로 육성될 경우 특화작물의 활용가치 증대, 농가소득 증대 및 지역 경제 활성화에 크게 기여할 것으로 사료됨.

(나) 부가가치 향상 및 생산비용 절감 : 대량재배를 통한 원료의 안정적 공급으로 특화작물의 부가가치 향상, 생산비용 절감 및 재배 농가에 지속적인 소득원 제공.

(다) 수입대체효과 및 수출기반조성 : 와송의 항암·면역 활성, 항산화 및 항당뇨 활성을 입증하여 기능성 식품으로 제품화할 경우 향후 수입 의존도가 높은 약용식품, 영양의학 식품에 대한 수입대체 효과가 기대되며 또한 개발기술을 상품화하여 지속적인 마케팅 전략을 병행한다면 국내 천연물 식품소재의 수출기반을 조성하는데 크게 기여할 것으로 사료됨.

3. 연구성과

(가) 특허출원

출원번호통지서

출원일자 2009.04.20
 특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)
 출원번호 10-2009-0034205 (접수번호 1-1-2009-0237420-78)
 출원인명칭 경상대학교산학협력단(2-2004-010719-4)
 대리인성명 고영희(9-1998-000147-6)
 발명자성명 성낙주 서종권 이수정 신정혜 노종수
 발명의명칭 와송의 추출방법 및 그 방법으로 추출된 와송 추출물을 포함하는 향당노
 복합조성물

(나) 논문게재 성과

| 게재 연도 | 논문명 | 저자 | | | 학술지 명 | Vol. (No.) | 국내 외 구분 | SCI 구분 |
|----------|---------------------------------|-----|----------|--------------------|--------------|---------------|---------------|-----------|
| | | 주저자 | 교신 저자 | 공동 저자 | | | | |
| 2008 | 건조방법에 따른 와송의 향산화 효과 | 이수정 | 성낙주 | 서종권, 신정혜, 이현지 | 한국식품영양과학회지 | 37 (5) | 국내 | |
| 2008 | 와송의 이화학적 특성 및 NDMA 생성에 관한 연구 | 최선영 | 성낙주 | 김정균 | 한국식품영양학회지 | 21 (2) | 국내 | |
| 2008 | 채취 시기에 따른 와송 추출물의 항산화 활성 연구 | 최선영 | 성낙주 | 정미자 | 한국식품영양학회지 | 21 (2) | 국내 | |
| 2008 | 유지 기질에 대한 와송 추출물의 항산화 효과 | 이수정 | 성낙주 | 차지영, 신정혜, 정미자 | 한국생명과학회지 | 18 (8) | 국내 | |
| 2008 | 식용유지에 대한 와송 열수 추출물의 항산화효과 | 신정혜 | 성낙주 | 이수정, 차지영, 서종권, 전은우 | 한국식품조리과학회지 | 24 (6) | 국내 | |
| 2009 | 식용유지의 가열시 와송 추출물이 산화안정성에 미치는 영향 | 이수정 | 성낙주 | 신정혜, 서종권 | 한국식품위생안전성학회지 | 24 (1) | 국내 | |

(다) 학술발표성과

| 발표 연도 | 논문명 | 저자 | | | 학술 대회명 | 국내 외 구분 |
|----------|---|----------|-------------------|---------------------|--|---------------|
| | | 주저자 | 교신 저자 | 공동 저자 | | |
| 2008 | Assessment of Antidiabetic Potential of <i>Orostachys japonicus</i> Extract in streptozotocin Induced Diabetic Rats | Zhang GF | Sung NJ Lee SJ | Kim SH, Jeong BY | 2008년도 한국생명과학회 제49회 학술심포지움 및 국제 학술대회 | 국내 |

(라) 학위논문성과

| 발표 연도 | 논문명 | 저자 | 학위명 |
|----------|---|----------|-----|
| 2008 | Anti-diabetic Potential of <i>Orostachys japonicus</i> in Streptozotocin Induced Diabetes Mellitus Rats | Zhang GF | 석사 |

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

- 해당사항 없음

제 7 장 참고문헌

- Anderson D. 1999. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. *Mutation Research* 350:103-108.
- Aruoma OI. 1998. Free radicals, oxidative stress and antioxidants in human health and disease. *J AOCS* 75:199-212.
- Behrens WA, Madere R. 1991. Vitamin C and vitamin E status in the spontaneously diabetes BB rat before the onset of diabetes. *Metabolism* 40:72-76.
- Castelli WP, Garrison RJ, Wilson PWF, Abbott RD, Kalousdian A, Kannel WB. 1986. Incidence of coronary heart disease and lipoprotein cholesterol levels. *JAMA* 256:2835-2844.
- Choi SY. 2006. Effect of *Orostachys japonicus* extracts on antioxidative activity and N-nitrosodimethylamine formation. Ph. D thesis of Gyeongsang National Univ.
- Choi SU, Nam SH, Yang GJ, Cho MJ, Yang MS. 1994. Plant regeneration from the stem tissue of *Orostachys japonicus* A. Berger. *Kor J Plant Biotechnol* 21:65-68.
- Ding AH, Nathan CF, Stuhr DJ. 1988. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. *J Immunol* 141:2407-2412.
- Dnizot FD, Rite L. 1986. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods* 22:271-277.
- Dong S, Jung SH, Moon JS, Rhee SK, Son JY. 2004. Antioxidant activities of clove by extraction solvent. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33:609-613.
- Goldstein JL, Brown MS. 1983. The LDL receptor defect in familial hypercholesterolemia; Implications for pathogenesis and therapy. *Med Clin North Am* 66:335-362.
- HSU HY, Chen YP, Shen SJ, Hsu CS, Chen CC. 1986. Oriental material medica: A concise guide. California pp.473-474.
- Huang MT, Ho CT, Lee CY. 1992. Phenolic compounds in food. In Phenolic compounds in food and their effects on health II. Maple Press, New York, USA. vol. 99, pp.2-7.

- Hur JM and Park JC. 2006. Effects of aerial parts of *Orostachys japonicus* and its bioactive component on hepatic alcohol-metabolizing enzyme system. *J Med Food* 9:336-341.
- Invergar R, McEvily AJ. 1992. Studies on biological activity from extract of *Crataegi fructus*. *Kor J Herb* 17:29-38.
- Kang MY, Kim SY, Koh HJ, Chin JH, Nam SH. 2004. Antioxidative activity of germinated specialty rices. *Korean J Food Sci Technol* 36:624-630.
- Kang JH, Yoon SY, Hong DO, Shin SC. 2005. Growth and flowering of *Orostachys japonicus* A. Berger by controlling daylengths. *Kor J Medicinal Crop Sci* 13:114-117.
- Kannel WB, McGee DL. 1979. Diabetes and cardiovascular disease. *JAMA* 241: 2035-2038.
- Kim JK. 1984. Illustrated natural drugs encyclopedia. Namsandang, Seoul. pp.447.
- Kim KH, Kim EY, Kim YO, Baek GO, Kim HB, Lee DS. 2004. Studies on biological activities of the polysaccharides and oligosaccharides of *Orostachys japonicus*. *Korean J Microbiol* 40:334-341.
- Kim KH. 1980. A translation : The clinical application of the results of the test. Ko Moon Sa, Seoul pp.164-176.
- Kim SY, Ryu KS, Lee WC, Ku HO, Lee HS, Lee KR. 1999a. Hypoglycemic effect of mulberry leaves with anaerobic treatment in alloxan-induced diabetic mice. *Korean J Pharmacogn* 30:123-129.
- Kim SM, Cho YS, Sung SK. 2001. The antioxidant ability and nitrite scavenging ability of plant extracts. *Korean J Food Sci Technol* 33:626-632.
- Kwon J, Han KS. 2004. Effects of *Orostachys japonicus* A. Berger on the immune system. *Korean J Medicinal Crop Sci* 12:315-320.
- Kwon MC, Qadir SA, Kim HS, Ahn JH, Cho NH, Lee HY. 2008. UV protection and whitening effects of collagen isolated from outer layer of the squid *Todarodes pacificus*. *J Kor Fish Soc* 41:7-12.
- Lee SJ, Cha JY, Shin JH, Chung MJ, Sung NJ. 2008. Antioxidant effect of wa-song(*Orostachys japonicus* A. Berger) extracts on edible oil and fat. *J Life Sci* 18:1106-1114.
- Lee SJ, Shin JH, Seo JK, Sung NJ. 2009. Effect of wa-song(*Orostachys japonicus* A. Berger) extract on oxidative stability of edible oil during its heating. *J Fd Hyg*

- Safety* 24:14-20.
- Lee YJ, Han JP. 2000. Antioxidative activities and nitrite scavenging abilities of extracts from *Ulmus davidiana*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 29:893-899.
- Liang YC, Huang YT, Tsai SH, Lin-shiau SY, Chen CF, Lin JK. 1999. Suppression of inducible cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase by apigenin and related flavonoids in mouse macrophage. *Carcinogenesis* 20:1945-1952.
- Lim SN, Cheung PCK, Ooi VEC, Ang PO. 2002. Evaluation of antioxidative activity of extracts from a brown seaweed, *Sargassum siliquastrum*. *J Agric Food Chem* 50:3562-3866.
- Park HJ, Lim SC, Lee MS, Young HS. 1994. Triterpene and steroids from *Orostachys japonicus*. *Korean J Pharmacogn* 25:20-23.
- Park HJ, Moon SH, Park KY, Choi JS, Chung HY, Young HS, Suh SS. 1991b. Antimutagenic effect of *Orostachys japonicus*. *Journal of the Pharmaceutical Society of Korea* 35:253-257.
- Park HJ, Young HS, Kim JO, Rhee SH, Choi JS. 1991a. A study on the chemical constituents of *Orostachys japonicus* A. Berger. *Korean J Pharmacogn* 22:78-84.
- Park HJ, Young HS, Park KY, Rhee SH, Chung HY, Choi JS. 1991c. Flavonoids from the whole plants of *Orostachys japonicus*. *Archives of Pharmacal Research* 14:167-171.
- Park JG, Park JC, Hur JM, Park SJ, Choi DR, Shin DY, Park KY, Cho HW, Kim MS. 2000. Phenolic compounds from *Orostachys japonicus* having anti-HIV-1 protease activity. *Natural Product Sciences* 6:117-121.
- Park JC, Han WD, Park JR, Choi SH, Choi JW. 2005. Changes in hepatic drug metabolizing enzymes and lipid peroxidation by methanol extract and major compound of *Orostachys japonicus*. *J Ethnopharmacology* 102:313-318.
- Peter FS. 1975. The toxicology of nitrate, nitrite and N-nitroso compounds. *J Sci Food Agric* 26:1761-1766.
- Shin DY, Lee YM, Kim HJ. 1994. Anatomy and artificial seed propagation in anti-cancer plant *Orostachys japonicus* A. Berger. *Kor J Crop Sci* 39:146-157.
- Shin JH, Lee SJ, Cha JY, Seo JW, Chen EW, Sung NJ. 2008. The antioxidants activities of water extract from wa-song(*Orostachys japonicus* A. Berger) on edible oil and fat. *Korean J Soc Food Cookery Sci* 24:748-756.

- Shin JH. 2002. The formation and inhibition of N-nitrosamine in common Korean foods. Ph. D thesis of Gyeongsang National University.
- Smith EB. 1974. The relationship between plasma and tissue lipid in human atherosclerosis. *Adv Lipid Res* 1-7.
- Yang MS, Choi SU. 1992. Some biochemical component changes the culture of *Orostachys japonicus* A. Berger. *Kor J Plant Tissue Culture* 19:209-121.
- Yoon Y, Kim KS, Hong SG, Kang BJ, Lee MY, Cho DW. 2000. Protective effects of *Orostachys japonicus* A. Berger(Crassulaceae) on H₂O₂-induced apoptosis in GT1-1 mouse hypothalamic neuronal cell line. *Journal of Ethnopharmacology* 69:73-78.

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.