

암예방효능 및 노인성치매 개선효능을  
함유한 신기능성전통한과의 개발에  
관한 연구

Developement of functional materials,  
as supplemental resources for functional  
Korean Kookies preparation, with beneficial  
effect on the malignant tumor promotion and  
on retardatory effect of cognitive impairments  
caused by senile dementia

한국화학연구원

농림부

# 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “암예방효능 및 노인성치매 개선효능을 함유한 신기능성전통한과의 개발에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2005 년 11 월 10 일

주관연구기관명 : 한국화학연구원

총괄연구책임자 : 유시용

세부연구책임자 : 유시용

연 구 원 : 김영섭

연 구 원 : 서지희

연 구 원 : 김정숙

연 구 원 : 최연희

협동연구기관명 : 합천전통한과

협동연구책임자 : 김상근

협동연구기관명 : 충남대학교

협동연구책임자 : 강종성

# 요 약 문

## I. 제 목

암예방 효능 및 노인성치매 개선효능을 함유한 신기능성전통한과의 개발에 관한 연구

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

오랜 세월을 통하여 우리민족 고유의 전통과 입맛을 계승 발전시켜온 전통한과는 최근들어 우리생활 도처에 뿌리깊게 확산되고 있는 빵, 과자, 패스트푸드 등 각종 외래음식들에 의하여 급속도로 그 시장이 잠식되어가고 있는 실정이다. 이와 같이 어려운 한과산업계의 현 실정을 극복할 수 있는 하나의 방편으로 전통한과의 맛과 멋은 그대로 유지하면서 인구노령화에 따라 점점 그 발생빈도가 커져가는 노인성치매, 뇌졸중, 당뇨 등 각종 퇴행성 성인질환에 대한 예방 및 개선효과, 폐암, 유방암 등 각종 악성종양질환에 대한 예방효과, 노화에 따라 발생하는 각종 순환기장애에 대한 개선 효과 등 다양한 생리활성기능이 가미된 새로운 형태의 기능성 한과제품을 개발함으로써 전통한과의 부가가치를 극대화시킬 수 있으리라 기대된다.

## III. 연구개발 내용 및 범위

A549 (비소세포 폐암주)등 5종의 인체유래 암세포주에 대한 항암효과 및 mouse을 이용한 동물실험을 통하여 암세포의 전이 및 암발생을 탁월하게 억제하는 약리학적 효능이 입증된 생약재 아위 (Ferulae)의 추출물 및 기타 항암효과가 탁월한 생약재를 효과적으로 가미한 복합생약제 추출물을 기능성 식품소재로하여 이 기능성 식품소재를 다식, 강정 및 산자류 등 각종 전통한과에 효과적으로 접목하여 항암효과를 겸비한 고부가가치의 기능성 한과를 창출

한다.

아울러 *in vitro* 실험 (acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase 및 M1 type muscarine성 acetylcholine 수용체등에 대한 저해효과) 및 동물실험 (수동회피 실험을 통한 기억력 감소 및 인지기능감퇴에 대한 회복효과)을 통하여 노인성 치매로 유발되는 기억력 및 각종 인지기능손상 등의 증세를 효과적으로 회복시키는 약리학적 효능을 보여주고 있는 길경, 당귀, 원지, 산조인 등 수종의 생약재 추출물 및 이들 생약자원으로부터 분리정제된 유효성분들을 다량으로 함유한 유효분획들을 효과적으로 배합한 복합제제를 상기와 같은 방법으로 기존 전통한과류에 적용하여 노인성치매개선 효과를 갖는 기능성한과제품을 개발한다.

#### IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

A-549 (non small cell lungcarcinoma) 등 5종의 인체유래 암세포주를 대상으로 하여 시험관 내 (*in vitro*) 세포증식저해효과를 지표로 하여 30 여종의 생약재 추출물들의 항암효능을 검색하였으며 지난 선행연구결과 data를 총망라하여 300여종의 생약재추출물의 항암효능에 대한 database를 구축하였다. 이와 같은 항암활성 (*in vitro*) 검색 결과를 토대로하여 우수한 생리활성 (기능성)를 보여주는 생약재들을 대상으로하여 아위 등 5종의 식물추출물을 혼합한 복합제제 (기능성소재)를 도출하였다.

한편 노인성치매 및 기억력 감퇴 등 각종 인지기능 퇴행을 특징으로 하는 여러 가지 퇴행성 뇌질환에 광범위하게 적용가능하리라 예측되는 우수한 인지기능 개선효능(기능성)를 보여주는 아위등 10여종의 식물들을 일정 비율로 혼합하여 열수 추출한 복합제제 (기능성 소재) 2종 (실버-1, 실버-2)를 도출하였으며 본 연구 결과를 특허출원 완료하였다. 이들 복합제제 (기능성 소재) 2종 (실버-1, 실버-2) 중 보다 우수한 인지기능 효능이 인정되는 실버-2 제제에 대한 랫드를 이용한 1차 안전성시험을 완료하였다.

또, 본 기능성 소재를 활용한 한과제품의 개발을 위하여 현재 최종적으로 한

과 제조시 적용단계 및 적용방법을 검토 중에 있으며 시제품의 개발 및 본격적인 시장출시를 앞두고 있다.

한편, 본 연구를 통하여 도출된 복합제제들을 별도의 연구과제를 통하여 건강기능식품 혹은 천연물의약으로의 개발을 추진할 예정이다.

아울러 본 연구과제와 같이 연구개발을 통하여 새로운 기능성소재를 발굴하고 발굴된 기능성소재를 한과, 빵, 레포르트 등 기존의 식품형태에 접목하는 연구과제들은 타 연구과제에 비하여 비교적 단시일 내에 소정의 연구목표에 도달할 수 있으며 점점 퇴보하고 있는 우리나라 한과산업이 재도약하는 계기를 마련하였고 연구를 통하여 도출된 제품 역시 비록 낙관적인 예측이지만 높은 시장점유율이 예측되는 만큼 향후 지속적인 연구투자가 계속되기를 기대한다.

## SUMMARY

The research project is mainly focused on the development of some functional materials which could be widely employed as unique supplemental resources for the preparation of new class of functional Korean Cookies (generally accepted as Hankwa in Korea), with beneficial effect on the malignant tumor promotion and on the retardatory effect of cognition (memory) impairment caused by the progress of neurodegenerative disease such as senile dementia or Alzheimer's diseases (AD).

For these purposes, more than 300 kinds of the plant extracts were evaluated (1) for the inhibition on the proliferation of cultured human tumor cells such as A549 (non small cell lung), SK-OV-3 (ovary), SK-MEL-2 (melanoma), XF498 (central nerve system) and HCT-15 (colon) *in vitro*, (2) for the agonistic activity upon the recombinant human muscarinic acetylcholine receptor subtype 1 (*mAChR-M<sub>1</sub>*) produced from the CHO(Chinese Hamster Ovary) cell line, (3) for the antagonistic affinity on the glycine binding site of NMDA (N-methyl-D-aspartate) receptor prepared by the synaptic membranes from the forebrains of male Sprague-Dawley rats, (4) for the inhibitory effect on the acetylcholinesterase (AChE, E.C. 3.1.1.7) from electric eel using acetylthiocholine as a substrate, and for the for the ability of enhancing the memory or cognitive function impaired by the acute administartion of alcohol into mice (passive avoidance performance test).

By the conducted experiments *in vitro* or *in vivo* above mentioned, a promising herbal prescription with excellent beneficial effect on the malignant tumor promotion was invented, which comprised five kind of plant materials. This herbal prescription was currently investigated intensively for the development as unique supplemental resources for the preparation of promising functional Korean Hankwa, with beneficial effect on the malignant tumor

promotion.

On the other hand, two kinds of herbal prescription (HP Silver-1 and Silver-2) with excellent beneficial effect on the retardatory effect of cognition (memory) impairment caused by the progress of neurodegenerative disease such as senile dementia or Alzheimer's diseases (AD) was invented, which comprised 8 and 12 kind of plant materials.

Among them, the herbal prescription HP Silver-1 was exhibited a pronounced effect of the improvement of the memory or cognitive function impaired by the acute intoxication of alcohol into mice. It was found that a single or repeated administration of HP Silver-1 resulted in the increase of the latency time and duration in the light compartment in the passive avoidance performance test. And the herbal prescription AL-019 was finally chosen for the candidate for the following R & D project for the development of a new nutraceutical for the improvement of cognitive impairment caused by the progress of senile dementia or Alzheimer's disease. These results were filed up into patentship and were contracted of cooperation for the development with the company "Hapcheon Traditional Food" .

This three herbal prescriptions especially the HP Silver-2 was currently investigated intensively for the development as unique supplemental resources for the preparation of new functional Korean Hankwa.

# CONTENTS

Chapter 1. Perspective of view .....	9
I Objectives and importance of the R & D project .....	9
II Contents and scope of the R & D project .....	12
Chapter 2. State of Art of the R & D project .....	14
Chapter 3. Contents and results of the R & D .....	16
I Development of biofunctional materials with antitumor activity .....	16
1. Evaluation of antitumor activity of the plant materials .....	16
2. Purification antitumor components of the plant materials .....	19
3. Composition of biofunctional materials with antitumor activity .....	38
II Development of biofunctional materials with memory enhancing activity .....	39
1. Binding affinity of some herbal extracts on the muscarinic acetylcholine receptor subtype 1 ( <i>mAChR-M<sub>1</sub></i> ) .....	39
2. Binding affinity of some herbal extracts on the glycine binding site of NMDA (N-Methyl-D-Aspartate) receptor .....	42
3. Inhibitory effects of some herbal extracts on the acetylcholinesterase (AChE) <i>in vitro</i> .....	46
4. Cognition enhancing effect of the herbal prescription assessed by the passive avoidance performances model .....	49
5. Composition of biofunctional materials with memory enhancing activity .....	56
6. Variation of the content of neurotransmitters in the brain after treatment of the Prescription Silver-2 .....	63
III. Application of biofunctional Prescription Silver-2 to Korean Cooky Product ·	71
1. Perspective .....	71
2. Preparation of the basement of Hankwa (Korean Cooky) .....	72
3. Application of biofunctional Prescription to Korean Cooky basement .....	76
3. Application of biofunctional Prescription to Korean Cooky Product .....	84
5. Results and Discussion .....	91
Chapter 4. Contribution of research product and the result .....	99
Chapter 5. Application of the research product and the result .....	103
Chapter 6. References .....	106
Appendix : Safety and Toxicology Evaluation of Silver-2 .....	114

## 목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	9
제 1 절	연구개발의 목적 필요성	9
제 2 절	연구개발의 범위	12
제 2 장	국내외 기술개발 현황	14
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	16
제 1 절	항암활성 및 암발생저해역제 효능을 이용한 기능성소재의 발굴	16
1.	생약시료의 항암활성 (in vitro)의 검색 암세포증식저해효능	16
2.	종양세포 증식저해효능을 나타내는 항암활성물질의 분리정제 연구	19
3.	암예방효능을 가진 복합제제의 구성	38
제 2 절	노인성치매 개선효능을 이용한 기능성소재의 발굴	39
1.	Muscarinic acetylcholine 수용체(mAChR-M1)에 대한 친화력 검색	39
2.	NMDA 수용체 glycine binding site에 대한 친화력 검색	42
3.	Acetylcholinesterase (AChE) 저해활성검색	46
4.	수동회피실험 모델을 활용한 인지기능 회복실험	49
5.	노인성치매 개선효능을 가진 기능성소재의 구성	56
6.	복합제제 실버-2 투여 후 뇌중 신경전달물질들의 동태변화	63
제 3 절	기능성소재를 활용한 기능성 한과시제품의 조제	71
1.	개요	71
2.	기능성한과 제조를 위한 한과바탕 (유과 base) 의 조제	72
3.	한과 바탕 조제시 공정단계별 기능성소재 적용사례에 관한 연구	76
4.	한과 바탕에 집청 착의 공정시 기능성소재의 첨가 연구	84
5.	연구고찰 및 결과	91
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	99
제 5 장	연구개발결과의 활용계획	103
제 6 장	참고문헌	106
부록 :	기능성 소재 실버-2의 안전성 실험 자료	114

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1 절 연구개발의 목적, 필요성

### 1. 기술적 측면

오랜 세월을 통하여 우리민족 고유의 전통과 입맛을 계승 발전시켜온 전통한과는 최근들어 우리생활 도처에 뿌리깊게 확산되고 있는 빵, 과자, 패스트푸드 등 각종 외래음식들에 의하여 급속도로 그 시장이 잠식되어가고 있는 실정이다. 급기야 이제 한과는 추석이나 구정 등 민속명절에 제수용으로 혹은 명절선물용 음식으로만 그 사용용도가 좁혀져 겨우 그 명맥을 이어가고 있으며 오랫동안 이들 전통한과를 생산하여 온 한과산업은 점점 사양화되어가고 있는 안타까운 실정이다.

이와 같이 어려운 한과산업계의 현 실정을 극복할 수 있는 하나의 방편으로 전통한과의 맛과 멋은 그대로 유지하면서 인구노령화에 따라 점점 그 발생빈도가 커져가는 치매, 뇌졸중, 당뇨 등 각종 성인성질환에 대한 예방 및 개선효과, 폐암, 유방암 등 각종 악성종양질환에 대한 예방효과, 노화에 따라 발생하는 각종 순환기장애에 대한 개선 효과 등 다양한 생리활성기능이 가미된 새로운 형태의 기능성 한과제품을 개발함으로써 전통한과의 부가가치를 극대화시킬 수 있으리라 기대된다.

또, 이와 같은 기능성 한과제품의 개발은 패스트푸드 등 각종 외래음식산업에 그 자리를 빼앗기고 있는 전통한과산업의 중흥을 이루어 낼 수 있는 계기가 될 수 있으며 아울러 고령화사회에 접어든 우리 국민들의 건강관리에 도 일조를 할 수 있으며 우리에게 점점 잊혀져가고 있는 전통한과의 맛과 멋을 되찾아줄 수 기회로 삼을 수 있으리라 기대된다.

▶ 이러한 취지하에 합천전통한과회사에서는 그간 고령화 대응 기능성 한방한과를 개발하고자 부단한 노력의 결과 국내외특허출원 2건, 국내·외 상표출원 4건 등의 연구기술력을 축적하여왔다. 본 연구에서는 지난 수년간 한국화학연구원과의 공동연구결과 도출된 암질환 예방효과 및 노인성치매를 개

선하는 약리학적 효능을 지닌 한방복합제제들을 기존의 전통한과에 접목함으로써 새로운 형태의 기능성한방한과를 창출하여 전통한과의 고부가가치화를 실현함과 동시에 21세기 식품시장을 주도할 기능성식품 또는 약용식품에 대한 독창적인 기술확보를 이룩하고자 한다.

▶ 생약재 아위 (Ferulae Resina) 추출물 및 이로부터 분리된 새로운 항암활성물질인 FA-0501의 암전이 억제 활성 및 암 예방 효능은 각종 인체유래 암세포주와 실험동물을 이용하여 재삼 확인된 바 있으며 길경, 당귀, 원지 등 한약재에서 유래되는 노인성치매 개선효과는 동물실험을 통하여 그 효과를 인정받고 있다. 향후 이들 한약재들의 약리학적 효능을 *in vitro* 및 *in vivo* 실험을 통하여 다각적으로 작용기전을 규명하여 보다 우수한 기능성한과제품을 개발할 예정이다. 이들 연구결과들은 제품의 효능에 대한 과학적 객관적인 연구결과를 절대적으로 요구하는 기능성 전통한과제품의 개발사업에 매우 중요한 자료로 활용될 수 있으리라 사료된다.

## 2. 경제·산업적 측면

▶ 21세기 식품산업은 식품의 제 3차적 기능 즉 생리활성조절기능이 강조된 기능성 식품(functional food) 또는 약용식품(Pharmafood, nutraceutical food)이 식품시장을 주도할 것으로 예견되며, 2005년에는 약 20조원 이상의 시장이 형성되리라 전문가들은 예측하고 있다. 특히 중풍, 치매, 당뇨 등 퇴행성난치성 성인병의 치료 및 관리의 경우에 있어 이들 기능성식품에 대한 의존도가 오히려 기존의 의약품에 대한 의존도보다 훨씬 더 커지리라 예측하고 있다.

▶ 수출가능성이 높은 우리의 전통한과류를 조속한 시간에 세계화하기 위해서는 위생적 제조공정에 의한 대량생산체계 확립과 더불어 현대과학적 검증을 거친 생리활성조절기능 및 약리학적 효능 등 새로운 기능성을 제품에 부가함으로써 한과의 고부가가치화를 이룩하는 것이 선결요건으로 주목받고

있다.

### 3. 사회·문화적 측면

▶ 생리활성조절기능이 있는 신기능성물질의 개발은 인류의 건강 증진, 건강한 삶의 질 향상에 폭넓게 기여할 수 있어 신기능성물질 개발은 고부가가치 약용식품, 영양의학식품 또는 의약품개발을 통하여 막대한 수익창출을 가져올 수 있을 뿐만 아니라 국가 경제 및 사회, 문화적 측면에서 삶의 질 향상의 전환점을 마련할 수 있다.

▶ 합천전통한과는 농림부 장관 지정 전통식품 제 1호 업체로서 1998년에 중소기업청 주관 중소기업 기술혁신개발사업에 참여하여 한과류의 가공방법을 개선하기 위하여 “압출성형공법을 이용한 대량생산기술개발 및 비유탕 처리에 의한 산패방지와 저장성 향상 기술을 개발하여 한과류의 위생적 대량생산체계를 확립한 바 있다. 그리고 생명공학기술을 활용한 약용한과류 개발을 한국화학연구원 및 진주전문대 식품테크노센터와 공동으로 수행하여 ”치매관련 질환용 식품소재 및 이를 이용한 식품 (특허출원번호 10-2000-0048670)“ 을 개발하여 상표등록 (국내 40-2000-0043377, 40-2000-0043378, 일본 2000-116065, 2000-116066) 4 건을 출원하였으며 기능성식품 관련 한과류를 2000년 10월부터 생산하여 국내외 시장에 납품 중에 있다. 또, 한국화학연구원과 공동으로 항암물질 검색 및 분리연구를 수행하여 아위 (*Ferulae resina*)로 부터 새로운 항암물질인 sesquiterpene 물질의 분리 및 구조동정에 성공하여 국내외 특허출원(국내 2000-60039호, PCT/KR01/01697)을 완료하였고, 이들 연구결과를 상품화하기 위하여 한국화학연구원과 전용실시권 설정 계약을 체결하였다.

▶ 전통한과류에 상기와 같이 신기능성 또는 약용식품소재를 접목시킴으로써 전통한과류의 고부가가치화와 수출촉진을 도모하여 전통한과류의 세계화를 실현할 수 있는 계기를 마련할 수 있으리라 사료된다.

## 제 2 절 연구개발의 범위

그간의 선행연구결과 A549 (비소세포 폐암주)등 5종의 인체유래 암세포주에 대한 항암효과 및 mouse을 이용한 동물실험을 통하여 암세포의 전이 및 암발생을 탁월하게 억제하는 약리학적 효능이 입증된 생약재 아위 (Ferulae)의 추출물 및 추출물로부터 분리정제된 새로운 항암활성물질 FA-0501를 다량 함유하고 있는 추출물분획을 기본원료로 하고 (대한민국 특허 2000-0060039 및 국제특허 PCT/KR01/01697) 여기에 기타 항암효과가 탁월한 생약재를 효과적으로 가미한 복합생약제제 추출물을 기능성 식품소재로하여 이 기능성 식품소재를 다식, 강정 및 산자류 등 각종 전통한과에 효과적으로 첨가함으로써 항암효과를 겸비한 고부가가치의 기능성 한과를 창출한다.

아울러 in vitro 실험 (actylcholinesterase, butyrylcholinesterase 및 M1 type muscarine성 acetylcholine 수용체등에 대한 저해효과) 및 동물실험 (수동회피실험을 통한 기억력 감소 및 인지기능감퇴에 대한 회복효과)을 통하여 노인성치매로 유발되는 기억력 및 각종 인지기능손상 등의 증세를 효과적으로 회복시키는 약리학적 효능을 보여주고 있는 길경, 당귀, 원지, 산조인 등 수종의 생약재 추출물 및 이들 생약자원으로부터 분리정제된 유효성분들을 다량으로 함유한 유효분획들을 효과적으로 배합한 복합제제를 상기와 같은 방법으로 기존 전통한과류에 적용하여 노인성치매개선 효과를 갖는 기능성한과제품을 개발한다. [Kor. J. Pharmacogn. 33(3), 211-218 (2002) ; Kor. J. Pharmacogn. 32(3), 212-218 (2001) ; Kor. J. Pharmacogn. 32(3), 219-225 (2001)]

이들 연구결과 도출된 기능성한과 및 기능성부가를 목적으로 첨가한 기능성 식품소재에 대한 약리학적 효능을 다각적으로 연구검토함으로써 최종제품에 부가된 항암효능 및 노인성치매 개선효능 등 생리활성 조절효능에 대한 과학적이고 객관적인 연구결과를 제시하므로써 기능성 전통한과제품의 고부가가치 창출을 유도하고 나아가 기능성한과 및 전통한과류의 세계시장으로의 진출을 위한 발판을 구축한다.

아울러, 본 연구를 통하여 도출된 새로운 기능성소재에 대하여서는 별도의 추가연구를 통하여 새로운 건강기능식품 또는 천연물의약의 개발을 위한 귀중한 자료로 활용할 예정이다.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 1 절. 국내·외 관련기술의 현황과 문제점

국내외적으로 2000년대 이후 한약재, 건강보조물질 등 각종 천연물을 기본소재로하여 다양한 생리활성조절기능 및 약리학적 효능을 나타내는 여러 가지 종류의 건강기능식품들이 속속 개발되어 시장에 진출되고 있다. 이들 제품들은 대부분 별도의 새로운 제형, 즉 분말, 액제(파우치 및 드링크제), 과립제, 캡슐제 등의 형태로 개발되고 있으며 본 연구진이 추구하고 있는 바와 같이 연구개발된 건강기능식품 소재를 한과 등 기존의 식품 형태에 접목시키려는 시도는 매우 드물게 시도되어지고 있다. (예, 마늘빵, DHA 증강우유 등)

그리고 현재 우후죽순적으로 개발되고 있는 대부분의 건강기능식품들이 주장하고 있는 주된 기능성은 주로 정력보강효과 등 지나치게 선정적이고 시장성 논리에 의존한 약리효능에 집중되고 있어 소비자들로부터 별반 좋은 호응을 얻지 못하고 그 효과에 대한 소비자들의 신뢰도 역시 그다지 높지 못한 실정이다. 한편 본 연구진은 현재 전 인류를 위협하는 최대의 질병인 악성종양 및 노인성 치매 등 각종 퇴행성성인질환에 대한 개선효과를 제품이 지닌 기능성의 최종목표로 삼고 있음으로서 제품에 대한 소비자들의 이미지측면에서도 긍정적인 호응을 기대할 수 있으리라 사료된다.

### 제 2 절 앞으로의 전망

전술한 바와 같이 본 연구진은 오늘날 시대적으로 가장 요구되는 악성종양 및 노인성 치매 등 퇴행성성인질환에 대한 개선효과를 가지고 있는 생약복합제제를 전통한과에 접목한 새로운 제품의 개발을 궁극적인 연구목표로 삼고 있으므로 향후 생산되는 제품에 대한 소비자들의 기대감 및 제품의 선호도측면에서 좋은 호응을 얻을 수 있으리라 기대할 수 있으며 아울러 새로운 형태의 제형 개발형식을 취하지 않음으로서 고유한 한과의 멋과 풍미를 그대로 유지할 수 있는 장점이 있어 향후 새로운 신기능성 한과제품은 높은 시장성이 예측

가능하다.

일반적으로 한약재의 추출물 혹은 추출물로부터 정제된 생리활성물질을 기본 소재로하여 의약품이나 식품으로 가공하는 제형학적기술은 관련업계에서 오랜 시간에 걸쳐 시행착오의 역사를 되풀이해오면서 꾸준히 발전해온 비교적 잘 정립된 기술이라고 할 수 있으며 특별히 본 연구과제의 성공적 수행을 위하여 선진국으로부터 새로운 기술을 도입할 필요성은 현재로서는 없다고 할 수 있겠다. 또, 주로 우리 나라에서 오랜 세월을 거치면서 축적된 기술을 토대로 발전하여 온 한과제품의 특성상 오히려 제품개발에 관한 기술과 노하우 및 완제품을 선진국으로 수출함으로써 국가경제에 이바지할 계기로 삼아야 될 것이다.

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1 절 항암활성 (in vitro) 및 암발생저해억제 효능을 이용한 기능성소재의 발굴

#### 1. 생약시료의 항암활성 (in vitro)의 검색 : 암세포증식저해효능

건조된 생약시료 100 g을 methanol 2 L에 넣고 일주일간 상온에서 침출시킨 후 마포로 추출액을 여과하고 즉시 rotary evaporator에서 감압농축한다. 농축액은 냉동보관하고 실험 직전에 5% DMSO용액으로 농도별로 녹여 시료검액으로 사용한다.

암세포증식저해효과는 미국 NCI (국립암연구센터) 및 기타 여러검정기관에서 약물의 일차적 항암효과의 측정방법으로 가장 널리 사용하는 SRB (sulfrhodamine B) 방법 (Skehan, P. et al., (1990) J. Natl. Cancer. Inst. 82, 1107)에 준하여 측정한다. 실험에 사용한 암세포들은 A-549(non small cell lungcarcinoma), SK-OV-3 (adenocarcinoma, ovary malignant ascites), SK-MEL-2 (malignant melanoma, metastasis to skin of thigh), XF-498(central nerve system tumor), HCT-15(colon adenocarcinoma)이며 이 암세포들은 모두 human origin tumor cell line들로서, 미국의 국립암연구소 (NCI)로부터 분양받아 한국화학연구원에서 계대배양 중인 것을 사용하였다<sup>1)</sup>.

#### 가. 암세포증식저해효능

본 연구에서 활용하고 있는 생리활성측정법은 시험관 내에서 항암작용을 간편하게 측정할 수 있는 SRB (sulfrhodamine B) 방법으로서 미국 NCI 및 여러 검정기관에서 가장 폭넓게 사용하는 방법이며 자세한 실험 prototol은 다음과 같다.

1) 계대중의 암세포들을 trypsin-CDTA 용액으로 처리하여 용기 부착면으로부터 분리시키고, 96-well flat bottom microplate (Falcon)에 각 well 당 세포수가 각각  $5 \times 10^3$  (A549, HCT15),  $1 \times 10^4$  (SK-MEL-2, XF498),  $2 \times 10^4$

(SK-OV-3)이 되도록 희석하여 분주한다. 이들을 CO<sub>2</sub> incubator속에서 24시간 배양하여 cell이 well의 바닥면에 부착(anchor)되도록 한 후 aspirator로 media를 제거하고 media에 녹여둔 검체를 농도별로 각각의 well 속에 넣어주고 48시간동안 계속 배양한다. 검체용액을 조제할 때는 검체를 media만을 사용하여 녹이는 (dissolve) 것을 원칙으로 하지만 경우에 따라서는 특히 검체가 난용성일 경우에는 소량의 EtOH 혹은 DMSO (dimethylsulfoxide)를 가하여 줄수도 있으나 EtOH 혹은 DMSO의 최종농도가 1%를 초과하지 않아야 한다. 또 검체용액을 암세포에 가할때는 미리 filter로 여과하여 무균상태를 유지시켜준다.

2) 48시간동안의 배양을 마친후 각 well속의 media를 aspiration으로 제거하고 10% trichloroacetic acid (TCA)용액을 각 well당 10 $\mu$ l 씩 가하고 1 시간동안 상온에서 방치하여 세포들을 고정시킨 다음 물로 5-6회 세척하여 과잉의 TCA 용액을 완전제거하고 건조시킨다.

3) 각 well당 100 $\mu$ l 씩의 SRB 염색용액 (0.4% sulforhodamine in 1% acetic acid) 을 가하여 30분간 염색하고 과잉의 염색액은 1% acetic acid로 5-6회 반복 세척하여 제거한 후 상온에서 건조시킨다.

4) 각 well당 100 $\mu$ l 씩의 10mM Trisma base (unbuffered) 용액을 가한후 titer plate shaker로 10분간 진탕하여 cell에 염색된 염색액을 용출시키고 microplate reader를 이용하여 520nm의 흡광도치 (absorbance)를 측정한다.

(그림 참조)

5) 검체용액을 넣어준 검체군의 암세포증식율 (% cell growth, 항암활성의 역)는 다음 수식에 따라 산출한다. 즉 검체용액 대신 동양의 media를 넣어준 대조군의 세포수(C)와 zero time의 세포수(Tz) 및 검체군의 세포수(T)를 각각 각군의 흡광도치로 부터 환산한다. 검체군의 암세포 증식율(% cell growth)는 Tz>T인 경우에는  $[(T-Tz)/(C-Tz)] \times 100$  으로, Tz<T인 경우에는  $[(T-Tz)/Tz] \times 100$  의 수식으로 계산한다.

6) 각각의 농도에서 측정한 검체군의 암세포증식율을 바탕으로하여 LOTUS program의 data regression을 사용하여 검체가 해당암세포의 성장을 50% 저해하는 농도 (ED<sub>50</sub>)를 계산하고 이 ED<sub>50</sub> 치를 기준으로하여 각 검체의 항암효과 의 potency를 상호 비교하는 지표로 삼는다.

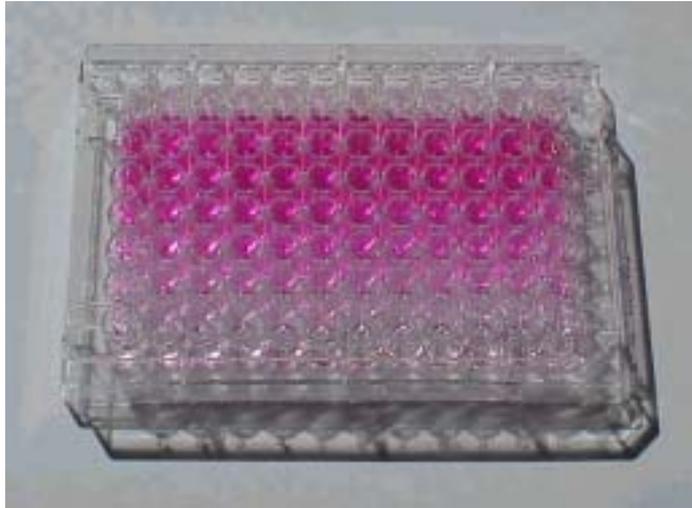


Fig 1 : SRB (sulfrhodamine B) 방법에 따라 96-well microplate 상에서 실시한 암세포증식저해효능의 측정방법

나. 암발생 저지효과(암예방효과)

실험동물로 mouse를 사용하여 실험전 DMBA (7,12-dimethylbenzan-thracene)로 유도한 실험 동물의 발암 억제효과 실험에서는 아위추출물 (FA-ether)을 투여하지 않은 대조군에서는 DMBA 처리후 12주 경과시에 암발생율이 87.5 %로 나타난 반면, 아위추출물(FA-ether) 투여군에서는 암 발생율이 5.5 % 정도로 매우 낮았다. 또한 16주 경과시에는 대조군 모두가 100% 암이 발생하였으나 아위추출물(FA-ether) 투여군에서는 20 % 정도 낮은 수준에서 암이 발생한 것으로 관찰되었다. 암의 진행 상태를 예측할 수 있는 종양수를 비교해 보면 아위추출물 투여군에서는 대조군에 비해 2.5% 에서 8.5% 정도로 아주 미약하게 나타남을 알 수 있었다.

다. Ras farnesyltransferase (FPTase) inhibition *in vitro* (Farnesyltransferase [<sup>3</sup>H]SPA enzyme assay)<sup>2,3)</sup>

1) Farnesyl protein transferase(FPTase) 분리 및 정제

가) Ammonium sulfate fractionation

Reiss et al. (1990)의 방법에 따라 male S.D.rat 50마리에서 brain을 분리하고 homogenization한 다음 ultracentrifuge (60000g)로 원심분리하여 상층액을 얻는다. 상층액에 solid ammonium sulfate을 가하여 30% 포화용액에서는 침전하지 않고 50%포화용액에서 침전하는 단백질을 pH 7.5의 buffer에서 16시간 동안 투석한다.

나) Ion-exchange chromatography

위에서 투석한 것을 Q separeose로 충전된 XK26/20 column을 이용하여 분리 정제한다. Reiss et al. (1990)의 방법에 따라 0.05 M NaCl에서 1M NaCl 까지의 농도차를 이용한 linear gradient chromatography를 시행하여 0.3M NaCl과 0.4M NaCl농도 사이에서 FPTase 활성을 가지는 분획을 얻는다.

2) Farnesyl protein transferase assay *in vitro* (Farnesyl transferase [<sup>3</sup>H]SPA enzyme assay)

FPTase inhibitor sample을 DMSO에 녹인다. 적당한 농도의 [<sup>3</sup>H]farnesyl pyrophosphate와 biotin lamin-B에 enzyme으로는Reiss et al. (1990)의 방법으로 분리한 FPTase를 가지고 준비된 enzyme inhibitor sample을 넣고 37°C에서 1시간동안 반응시킨다. stop/bead reagent를 가하고 30분후에 liquid scintillation counter로 count한다.

2. 종양세포 증식저해효능을 나타내는 항암활성물질의 분리정제 연구

A-549(non small cell lungcarcinoma), SK-OV-3 (adenocarcinoma, ovary malignant ascites), SK-MEL-2 (malignant melanoma, metastasis to skin of thigh), XF-498(central nerve system tumor), HCT-15(colon adenocarcinoma) 등 5종의 인체유래 암세포주를 대상으로 하여 시험관 내 (*in vitro*) 세포증식

저해효과<sup>1)</sup>를 지표로 하여 300 여종의 생약재 추출물들의 암세포증식저해효능을 검색하였으며 이 결과를 토대로하여 각각의 생약재들의 1차적 항암효능을 평가하는 자료로 활용하였다. 또 이들 중 항암효능이 탁월한 생약재들의 경우에는 항암효능을 갖는 복합제제의 구성등에 함유약재로 활용하거나 별도의 연구를 통하여 각각의 생약재에 함유된 항암활성 성분들을 분리정제하는 연구에 귀중한 기초자료로 활용하고 있다. 금번 연구과제를 통하여 본 연구진은 생약재 아위(阿魏, *Ferulae Resina*, Asafoetida)로부터 새로운 다수의 항암활성물질을 새롭게 분리정제하였으며 특히 생약재 아위와 두충(*Eucommiae Cortex*), 육두구(*Myristicae Semen*) 등 생약재를 구성약재로 활용한 복합제제를 개발하여 새로운 형태의 암예방용 기능성 소재로의 개발을 도모하고 있다. 이들 연구내용은 현재 대한민국 특허 2000-0060039 및 국제특허 PCT/KR 01/01697, 미국(10/399218), 일본( 533878/2002) 등에 출원이 완료되어 있다.

#### 1) 두충(杜冲) 추출물의 암세포증식저해효과

두충(杜冲) *Eucommia ulmoides* Oliver은 두충나무과(*Eucommiaceae*)에 속하는 1과 1속 1종의 낙엽교목으로서 높이 15 m, 지름 40 cm까지 자란다. 원산지는 중국의 호북, 사천성 등지로 알려져 있으며 우리 나라에는 1926년에 처음 중국으로부터 도입되었다. 우리나라 중부이남 지역 어디에서나 잘 서식하며 특히 계곡이나 산록지대 또는 토질이 좋고 수분이 적절한 데서 잘 자라며 약용가치가 높아 전국적으로 많이 재배되고 있다.

대한약전에는 이 나무의 여러해 묵은 수피를 두충(杜冲, *Eucommiae Cortex*)이라고 기재되어 있으며 강장, 진정, 진통작용 등이 알려져 있고 혈압강하효과가 있어 요배신경통, 유산 및 고혈압 등의 질병을 예방하는 데 사용된다고 명시되어 있다. 또, 우리 나라에서는 이 식물의 잎을 차로 많이 음용하고 있는데 두충의 잎에는 비타민 C가 차 잎보다도 많은 63 mg % 정도 들어 있고 더운 물에 우려나오는 가용성분도 차잎의 비하여 많이 들어있어 오래 복용하면 간과 담낭의 기능을 활발하게 해주고 다리와 팔의 무력감을 없애주고 몸이 가벼워지며 정력도 좋아진다고 알려져 있으나 유효성분에 관한 연구사례는 미진한

상황이다.

두층 및 두층차의 약리활성에 관한 연구로는 활성산소종의 소거작용<sup>4)</sup> 및 항산화효과<sup>5)</sup>가 보고되고 있으며 collagen synthesis를 촉진시키는 효과<sup>6)</sup>, alpha-glucosidase를 억제하는 기전에 의거한 항당뇨효과<sup>7)</sup>, 암발생저해효과 (항돌연변이효과)<sup>8,9)</sup>, 항보체효과 (anticomplementary activity)<sup>10)</sup> 등이 보고되고 있다.

#### 가) 추출 및 분리

건조된 두층 1 kg을 MeOH에 5일간 냉침시킨 후 감압 농축하여 methanol (MeOH) extract 105 g을 얻었다. 이 MeOH extract를 ethylacetate (EtOAc)와 증류수로 partition한 후 EtOAc층을 감압농축한 결과 EtOAc soluble part 27 g을 얻었다. 잔류 물층은 butanol (BuOH)로 추출하여 BuOH soluble part 10 g을 얻었다. EtOAc soluble part 27 g을 hexane/EtOAc 혼합용매를 용출용매로 사용하여 stepwise gradient elution 방식으로 silica gel (70-230 mesh, 750g) column ( $\varnothing=5.0 \times 100$  cm) chromatography 를 실시하여 EC-1 (660 mg), EC-2 (1.62 g), EC-3 (1.36 g), EC-4 (3.24 g), EC-5 (5.4 g), EC-6 (4.66 g), EC-7(5.2 g) 등 총 7개의 fraction으로 나누었다. 이 중 EC-5를 EtOAc에 녹인 후 alumina column ( $\varnothing=1.0 \times 20$  cm)을 통과시키고 용출액을 농축하여 다시 silica gel column ( $\varnothing=2.0 \times 40$  cm) chromatography (MC:MeOH= 200:1  $\rightarrow$  20:1)를 실시하여 EC-51(600 mg), EC-52(760 mg), EC-53 (2300 mg), EC-54(490 mg)을 얻었다. EC-54 (490 mg)는 70% MeOH를 용출액으로 사용하여 RP-18 column chromatography를 실시한 결과 **compound 1** (120 mg)을 분리하였다.

EC-53 (2.3 g)을 RP-18 column chromatography 및 silica gel column chromatography를 수차례 반복하고 최종적으로 preparative silica gel TLC (MC : MeOH=20:1)를 실시하여 **compound 2** (59 mg)을 분리하였다.

BuOH층 10g을 MC/MeOH 혼합용매를 용출용매로 사용하여 stepwise gradient elution 방식으로 silica gel (70-230 mesh, 750g) column ( $\varnothing=5.0 \times 100$  cm) chromatography를 실시하여 BC-1(2.21 g), BC-2(750 mg), BC-3(2.55

g), BC-4 (1.5 g), BC-5(2.74 g)을 얻었다. BC-3(2.55 g)을 MeOH/H<sub>2</sub>O (step gradient)로 RP-18 C.C.를 실시하여 4개의 분획을 얻었으며 그 중 2번째 분획인 BC-32를 silica C.C. (MC:MeOH=20:1, 10:1, 1:1)를 거듭실시하여 **compound 3** (232 mg)을 얻었으며 BC-4(1.5 g)를 RP-18 C.C.(30%, 100% MeOH)하여 **compound 4** (250 mg)를 분리하였다.

**compound 1** 무색침상결정 (MeOH), mp. 120°C, C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>O<sub>5</sub>, <sup>1</sup>H-NMR (300MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ7.41 (1H, s, H-3), 5.79 (1H, brs, H-7), 4.72 (1H, d, *J*=8.7 Hz, H-1), 4.23 (2H, m, H-10), 3.66 (3H, s, -OMe), 3.12 (1H, m, H-5), 2.81 (1H, m, H-6), 2.46 (1H, dd, *J* = 8.1, 8.7Hz, H-9), 2.02 (1H, m, H-6), <sup>13</sup>C-NMR (125MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ36.6 (C-5), 38.9 (C-6), 47.8 (C-9), 51.3 (-OMe), 61.1 (C-10), 96.3 (C-1), 110.5 (C-4), 130.6 (C-7), 142.1 (C-3), 152.6 (C-8), 168.0 (C-11)

**compound 2** 무색액상, C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>O<sub>5</sub>, [α]<sub>D</sub> = 0 (CHCl<sub>3</sub> 0.1 %), <sup>1</sup>H-NMR (300MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ3.13 (1H, m, H-9), 3.88 (1H, m, H-9), 3.90 (3H, s -OMe), 4.26 (1H, m, H-8), 4.76 (1H, d, *J* =4.0Hz, H-7), 6.83(1H, d, *J*=8.0 Hz, H-3) 6.90 (1H, d, *J*=8.0 Hz, H-2), 6.91 (1H, d, *J*=2.0 Hz, H-6), <sup>13</sup>C-NMR (125MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ: 53.9 (-OMe), 55.8 (C-9), 71.5 (C-7), 85.7 (C-8), 108.6 (C-6), 114.2 (C-3), 118.8 (C-2), 132.6 (C-1), 145.1 (C-4), 146.6 (C-5)

**compound 3** 흰색분말, mp. 160°C, C<sub>17</sub>H<sub>24</sub>O<sub>10</sub>, <sup>1</sup>H-NMR (300MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) : δ2.65 (2H, m), 3.0 - 3.2 (6H, m), 3.64 (4H,s), 4.03 (1H, m), 4.11 (1H, m), 4.51 (2H, m), 4.73 (1H, m), 4.97 (2H, m), 5.08 (1H, m), 5.79 (1H, s, H-7), 7.52 (1H, s, H-3). <sup>13</sup>C-NMR (125MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) : δ:34.5 (C-5), 38.0 (C-6), 45.9 (C-9), 51.1 (-OMe), 59.4 (C-10), 61.0 (C-6'), 70.0 (C-4'), 73.3 (C-2'), 76.6 (C-5'), 77.3 (C-3'), 95.7 (C-1), 98.6 (C-1'), 110.9 (C-4), 125.5 (C-7), 144.1 (C-3), 151.6 (C-8), 166.9 (C-11)

**compound 4** 흰색분말, C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>O<sub>10</sub>, <sup>1</sup>H-NMR (300MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) : δ2.60 (2H, m), 3.00-3.17 (6H, m), 4.12 (2H, m), 4.53 (2H, m), 4.72 (1H, t), 4.96-5.12 (4H, m), 5.68 (1H, s, H-7), 7.41 (1H,s, H-3). <sup>13</sup>C-NMR (125MHz,

DMSO-*d*<sub>6</sub>) : 34.7 (C-5), 38.1 (C-6), 45.9 (C-9), 59.5 (C-10), 61.0 (C-6'), 70.0 (C-4'), 73.4 (C-2'), 76.7 (C-5'), 77.3 (C-3'), 95.7 (C-1), 98.6 (C-1'), 111.6 (C-4), 125.6 (C-7), 144.2 (C-3), 151.1 (C-8), 168.1(C-11)

나) 두층로부터 분리된 활성성분들의 암세포 증식 저해효과

두층의 MeOH추출물을 EtOAc, BuOH, 물의 순서로 단계 분획하고 각 분획물의 세포증식저해효과를 같은 방법으로 측정하여 본 결과 EtOAc soluble part가 우수한 활성 (A549의 세포증식을 50% 저해하는 농도 [IC<sub>50</sub>]는 약 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )을 보여준 반면 BuOH 가용분 및 최종 수용성분획은 항암활성이 미미하였다 (A549의 세포증식을 50% 저해하는 농도 [IC<sub>50</sub>]는 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  이상). 따라서 가장 우수한 암세포증식저해효과를 보여준 EtOAc soluble part를 진술한 방법에 따라 silica gel column chromatography와 RP-18 column chromatography 등을 반복하여 항암활성을 나타내는 compound 1과 compound 2 그리고 지방산 혼합물을 분리하였다. 이중 compound 1과 compound 2는 각종 물리화학적 성상 및 분광학적 자료를 분석한 결과 compound 1은 monoterpene iridoid 계 화합물인 genipin으로 compound 2는 phenylpropanoid 계열의 ( $\pm$ )-guaiacylglycerol로 동정하였으며<sup>11,12)</sup> 이들은 모두 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$  이상의 농도영역에서 양호한 암세포증식 저해효과를 보여주었다.

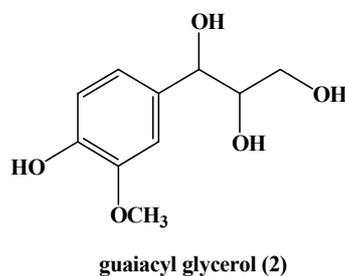
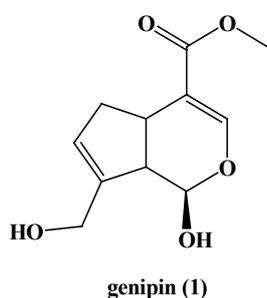
즉 활성유도분획법에 따라 두층의 MeOH 추출물로부터 세포증식저해물질들을 추적하여 본 결과 활성성분들은 주로 ethylacetate soluble part에 많이 분포하고 있으며 이 ethylacetate soluble part를 각종 column chromatography 방법으로 정제한 결과 genipin(1), ( $\pm$ )-guaiacylglycerol 및 다량의 지방산혼합물을 암세포증식저해효과를 나타내는 활성성분으로 규명하였다.

Table I. Inhibition of tumor cell proliferation by components isolated from *E. ulmoides*

COMPOUND	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) <sup>a</sup>				
	A549	SK-OV-3	SK-MEL-2	XF498	HCT15
genipin	18.8±0.06	9.8±0.08	9.5±0.10	14.3±0.09	15.1±0.08
guaiacylglycerol	31.2±0.22	24.8±0.25	32.2±0.12	29.6±0.21	35.3±0.17
geniposide	>100	>100	>100	>100	>100
geniposidic acid	>100	>100	>100	>100	>100
fatty acid					
undecylenic(11:1)	12.7±0.06	22.3±0.09	18.8±0.08	22.8±0.10	14.1±0.09
lauric (12:0)	13.3±0.06	19.4±0.08	17.8±0.06	21.7±0.12	15.9±0.08
palmitic (16:0)	13.0±0.07	7.8±0.06	13.8±0.06	9.2±0.06	16.3±0.06
stearic (18:0)	17.3±0.08	10.1±0.06	18.9±0.08	16.2±0.06	20.2±0.06
oleic (18:1)	38.6±0.12	30.4±0.09	35.8±0.10	29.4±0.09	39.5±0.09
linoleic (18:2)	>100	>100	>100	>100	>100
doxorubicin	0.1±0.02	0.2±0.02	0.1±0.01	0.2±0.02	1.8±0.05

<sup>a</sup>IC<sub>50</sub> value of compound against each cancer cell line, which was defined as a concentration( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) that caused 50 % inhibition of cell proliferation *in vitro*.

<sup>b</sup>Data are mean±S.E.M. of three distinct experiments.



## 2) 육두구 (肉荳蔻, Myristica Semen) 추출물의 암세포증식저해효과

육두구 (肉荳蔻, *Myristica fragrans*)는 동남아 열대지방에서 재배되는 육두구과 (Myristicaceae)의 상록교목으로 높이는 8~16m 정도이며 원산지는 인도네

시아 몰루카 제도로 알려져 있다. 4~6월, 11~12월경에 둥글고 굳은 감색의 열매를 따서 씨를 꺼내어 말린 후 검은색의 단단한 씨껍질을 벗기고 석회즙에 하루밤 담갔다가 상온에 말린 것을 육두구(肉荳蔻, Myristicae Semen)라 한다. 육두구에는 많은 양의 굳기름(28~34%)과 정유(3~9%)가 존재하며 굳기름은 주로 myristic acid와 trimyristin (myristic acid triglyceride)으로 구성되어 있다. 정유성분으로는 *d*-camphene, *d*-pinene, 등 monoterpene 류가 80% 정도, myristicin이 4%, 기타 *d*-borneol, eugenol, dipentene, *l*-terpineol 등이 6% 정도 함유되어 있다고 알려져 있다. 한방에서는 주로 위경, 대장경에 작용한다고 알려져 있으며 미량에서는 입맛을 돋우고 건위작용을 나타내며 비위가 허하여 설사할 때, 소화가 안되며 헛배가 부르고 아플 때, 토할 때 등에 쓰인다. 한편, 본 연구진은 A549 (인체유래 비소세포암주) 등 5종의 인체유래 암세포주를 대상으로 하여 시험관 내 (*in vitro*) 세포증식저해효과를 지표로 하여 300 여종의 생약재 추출물들의 항암효능을 검색하여 본 결과 육두구(Myristicae Semen)의 MeOH추출물이 농도 의존적으로 비교적 양호한 항암효과를 보여주고 있음을 알 수 있었으며 육두구의 methanol 추출물을 상법에 따라 용매분획을 실시하고 얻은 각 분획물에 대한 세포독성을 측정된 후, 유의성 있는 활성을 나타낸 ethylacetate분획을 각종 chromatography를 통하여 정제한 결과 최종적으로 6종의 활성성분을 분리하였다.

#### 가) 추출 및 분리

건조된 육두구 1.8kg을 7일간 methanol에 상온 냉침 시켰다. 추출액을 감압 농축하여 MeOH extract 300g을 얻었으며, 이를 H<sub>2</sub>O에 현탁시킨 후 ethylacetate (EA)와 *n*-butanol (BuOH)로 단계적으로 용매분획하여 EA 분획 255 g과 BuOH 분획 6 g을 얻었다. 세포독성에서 활성을 나타낸 EA 분획 128g 을 silica gel column chromatography (*n*-hexane : EA = 20:1, 10:1, 5:1, 1:1)를 실시하여 9개의 분획 (M1~M9)으로 나누었으며, 이중 M2 (4g)분획을 silica gel column chromatography (*n*-hexane : EA)를 반복하여 미황색 유상 물질 1.23g (화합물 1)을 얻었다. 한편 M4 (36g)분획은 silica gel column

chromatography (*n*-hexane : EA = 20:1, 10:1, 5:1, 1:1)를 통하여 재차 4개의 소분획 (M41~M44)으로 나누었다. 그 중 소분획 M42 (10g)을 RP-18 column chromatography (70, 80, 100% MeOH)로 정제한 결과 미황색 유상물질 (화합물 2) 500mg 과 백색 무정형침전 (myristic acid) 5g을 얻었다. 또 소분획 M44 (17g)를 RP-18 column chromatography (60~100% MeOH)로 정제하여 미황색 유상물질 (화합물 3) 20mg을 얻었다. M7 분획 5g은 silica gel column chromatography를 실시하여 5개의 소분획 (M71~M75)으로 나누고, 이 중 소분획 M72 (1.3g)을 dichloromethane에 녹인후 alumina gel chromatography로 정제하여 무색결정 (화합물 4) 1.1 g을 얻었다. 한편 M9 분획 35g을 dichloromethane에 녹인 후 alumina gel을 통과시켜 myristic acid 등 지방산을 제거하고 silica gel column chromatography (hexane : EA = 5:1)를 실시하여 2개의 소분획 (M91~M92)로 나누고, 그 중 소분획 M92 (16g)를 재차 silica gel column chromatography (*n*-hexane : EA = 5:1)를 실시하여 300mg의 compound. 4와 무색 결정 (화합물 5) 1.2 g 및 무정형분말 (화합물 6) 570 mg을 얻었다.

**화합물 1** - slightly yellow oil ; MS  $m/z$  : 162 [M]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 3.22 (2H, d,  $J$  = 6.6 Hz, H-7), 5.00 (1H, m, H-9a), 5.02 (1H, m, H-9b), 5.85 (1H, m, H-8), 5.83 (2H, s, -OCH<sub>2</sub>O-), 6.58 (1H,  $J$  = 8.1 Hz, H-6), 6.63 (1H, m, H-2), 6.67 (1H, d,  $J$  = 8.1 Hz, H-5); <sup>13</sup>C-NMR (125MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 137.8 (C-1), 108.0 (C-2), 147.3 (C-3), 145.5 (C-4), 108.7 (C-5), 121.1 (C-6), 39.1 (C-7), 39.5 (C-8), 39.0 (C-9), 100.7 (-OCH<sub>2</sub>O-)

**화합물 2** - Yellow oil ; MS  $m/z$  : 326 [M]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (300MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 0.75 (6H, d,  $J$ =6.7Hz, H-9, 9'), 1.67 (2H, m, H-8, 8'), 2.29 (2H, dd,  $J$ =13.4, 9.3Hz, H-7a, 7'a), 2.65 (2H, dd,  $J$ =13.4, 4.8Hz, H-7b, 7'b), 5.82 (4H, s, -OCH<sub>2</sub>O- ×2), 6.52 (2H, dd,  $J$ =7.8, 1.6Hz, H-6, 6'); <sup>13</sup>C-NMR (125MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 135.6 (C-1,1'), 107.9 (C-2,2'), 145.4 (C-3,3'), 147.4 (C-4,4'), 109.3 (C-5,5'), 121.7 (C-6,6'), 39.4 (C-7,7'), 39.0 (C-8,8'), 16.1 (C-9,9'), 100.6 (-OCH<sub>2</sub>O-)

**화합물 3** - Yellow oil,  $[\alpha]_D$  : -45.4 (CHCl<sub>3</sub>); MS  $m/z$ : 324 [M]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  1.31 (3H, d,  $J$  = 6.8 Hz, H-9), 1.79 (3H, d,  $J$  = 6.7 Hz, H-9'), 3.3 (m, H-8), 3.82 (3H, s, -OCH<sub>3</sub>), 5.02 (1H, d,  $J$  = 9.0 Hz, H-7), 5.88 (2H, s, -OCH<sub>2</sub>O-), 6.03 (1H, dq,  $J$ =15.7, 6.7 Hz, H-8'), 6.28 (1H, d,  $J$ = 15.7 Hz, H-7'), 6.70 - 6.86 (5H, m, H-2, 4, 5, 2', 6'); <sup>13</sup>C-NMR (125MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  134.3 (C-1), 106.7 (C-2), 147.5 (C-3), 147.8 (C-4), 108.0 (C-5), 121.1 (C-6), 93.3 (C-7), 45.7 (C-8), 17.8 (C-9), 131.1 (C-1', 7'), 109.4 (C-2'), 133.0 (C-3'), 144.1 (C-4'), 146.5 (C-5'), 113.3 (C-6'), 123.3 (C-8'), 18.3 (C-9'), 56.0 (-OCH<sub>3</sub>), 101.0 (-OCH<sub>2</sub>O-)

**화합물 4** - colourless prisms, mp 70-72°,  $[\alpha]_D^{20}$  = +5.28°(c = 1.8, CHCl<sub>3</sub>); MS  $m/z$  (rel. int.): 328 [M]<sup>+</sup> (11), 137 [C<sub>8</sub>H<sub>9</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup> (100) and 135 [C<sub>8</sub>H<sub>7</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup> (68); <sup>1</sup>H-NMR (300MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  6.87 (1H, d,  $J$  = 7.8 Hz, H-5), 6.76 (1H, d,  $J$ =7.8 Hz, H-5'), 6.66 (1H, d,  $J$  = 1.8 Hz, H-2), 6.63 (1H, d,  $J$  = 1.8 Hz, H-2'), 6.64 (1H, dd,  $J$  = 1.8, 7.8 Hz, H-6), 6.70 (1H, dd,  $J$  = 1.8, 7.8 Hz, H-6'), 5.95 (2H, s, O-CH<sub>2</sub>-O), 5.32 (1H, s, 4-OH), 3.87 (3H, s, -OCH<sub>3</sub>), 2.76 and 2.30 (each 2H, m, H-7, 7'), 1.78 (2H, m, H-8, 8'), 0.88 (6H, m, H-9,9'); <sup>13</sup>C-NMR (125MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  135.6 (C-1), 107.8 (C-2), 147.4 (C-3), 145.5 (C-4), 109.3 (C-5), 121.7 (C-6), 39.0 (C-7), 39.3 (C-8), 16.1 (C-9), 133.6 (C-1'), 111.4 (C-2'), 146.2 (C-3'), 143.5 (C-4'), 114.0 (C-5'), 121.6 (C-6'), 38.7 (C-7'), 39.2 (C-8'), 16.0 (C-9'), 55.7 (-OCH<sub>3</sub>), 100.6 (-OCH<sub>2</sub>O-)

**화합물 5** - colorless crystals ; m.p. 87-88°C;  $[\alpha]_D$  0° (c=0.7, CHCl<sub>3</sub>): IR(KBr, cm<sup>-1</sup>) 3559, 3371, 3047, 1648, 1592; EI/MS  $m/z$ (70eV): 330[M<sup>+</sup>], 192, 183; <sup>1</sup>H-NMR (300MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 0.63 (6H, d,  $J$ =6.63, H-9, 9'), 1.54 (2H, m, H-8, 8'), 2.07 (2H, m, H-7a, 7'a), 2.51 (2H, m, H-7b, 7'b), 3.63 (6H, s, -OCH<sub>3</sub>×2), 5.20 (2H, s, -OH×2), 6.42 (2H, s, H-2, 2'), 6.46 (2H, d,  $J$ =8.0, H-6, 6'), 6.62 (2H, d,  $J$ =8.0, H-5, 5'); <sup>13</sup>C-NMR (125MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  133.8 (C-1, 1'), 111.5 (C-2, 2'), 146.3 (C-3, 3'), 143.5 (C-4, 4'), 114.0 (C-5, 5'), 121.7 (C-6, 6'), 39.2 (C-7, 7'), 38.9 (C-8, 8'), 16.2 (C-9, 9'), 56.0

(-OCH<sub>3</sub>×2)

**화합물 6** - <sup>1</sup>H-NMR(300MHz, Acetone) : δ 0.62(3H, d, *J*=7.0, H-9), 0.85(3H, d, *J*=7.0, H-9'), 1.80(1H, m, H-8), 2.38(1H, m, H-8'), 2.13(1H, dd, *J*=12.9, 2.0, H-7a'), 2.95(1H, dd, *J*=12.9, 3.4, H-7b'), 4.45(1H, dd, *J*=9.2, 1.0, H-7), 6.68(1H, dd, *J*=7.9, 1.3, H-6'), 6.80(1H, dd, *J*=8.1, 2.0, H-6), 6.73(1H, d, *J*=9.0, H-5'), 6.76(1H, d, *J*=8.1, H-5), 6.70(1H, br. s, H-2'), 7.01(1H, d, *J*=1.3, H-2), 3.84(3H, s)(-OCH<sub>3</sub>), 5.94(2H, s)(O-CH<sub>2</sub>-O) ; <sup>13</sup>C-NMR(125MHz, Acetone) : δ 138.6(C-1), 111.5(C-2), 148.6 (C-3), 148.5 (C-4), 115.6 (C-5), 121.0 (C-6), 77.4 (C-7), 46.4 (C-8), 12.3 (C-9), 137.8 (C-1'), 109.0 (C-2'), 148.9 (C-3'), 146.8 (C-4'), 110.6 (C-5'), 123.2 (C-6'), 38.2 (C-7'), 36.6 (C-8'), 18.4 (C-9'), 56.7 (-OCH<sub>3</sub>), 102.0 (O-CH<sub>2</sub>-O)

나) 육두구 (Myristicae Semen)로부터 분리된 활성성분들의 암세포증식저해효과

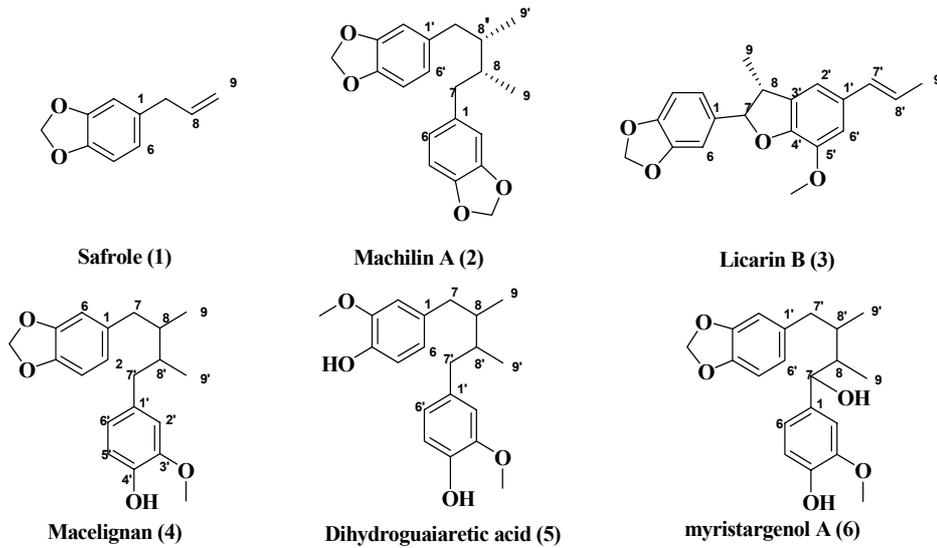
생약재 육두구(肉荳蔻, Myristicae Semen)의 MeOH추출물은 A549 (인체유래 비소세포암주) 등 5종의 인체유래 암세포주에 대하여 농도 의존적으로 양호한 세포증식 저해효과를 나타내었다. 육두구(肉荳蔻, Myristicae Semen)의 MeOH추출물을 활성유도 분획법(Bioactivity-directed fractionation)에 따라 chromatography로 정제한 결과 safrole (**1**) 및 5종의 lignan 화합물을 활성성분으로 분리 정제하였다. 분리 정제된 각 화합물(**1-6**)를 각각 SRB 방법으로 A549 (비소세포폐암주), SK-OV-3 (난소암주), SK-MEL-2 (피부종양주), XF-498 (중추신경계종양주) 및 HCT-15 (직장종양주) 등 5종의 human tumor cells에 대한 시험관내 세포증식저해 효과를 검색하여 본 결과 모든 화합물들이 각각의 암세포주에 대하여 농도의존적으로 우수한 세포증식저해 효과를 보여주었으며 특히 화합물 2-6의 경우에는 각각의 암세포주에 대한 ED<sub>50</sub> (50% 세포증식저해 효과를 나타내는 농도) 치가 모두 5.0 μg/ml 이하의 수치를 나타내고 있어 차후 우수한 항암제로의 개발 가능성을 시사하고 있다 (Table 1). 한편 이들 6종의 lignan 계 화합물 (**1-6**) 이외에도 본 식물추출물로부터 다

량 분리된 지방산 myrstic acid (C14: 0)의 경우 역시 실험에 사용된 각각의 암세포주에 대한 ED<sub>50</sub>치가 각각 13  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (A549), 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (SK-OV-3), 14  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (SK-MEL-2), 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (XF498) 및 15 (HCT15)  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 으로 나타나 유의성 있는 암세포증식저해 효과를 보여주었다.<sup>13-22)</sup>

Table 2. Inhibition of tumor cell proliferation by components isolated from Myristicae Semen.

COMPOUND	ED <sub>50</sub> ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) <sup>a</sup>				
	A549	SK-OV-3	SK-MEL-2	XF498	HCT15
total ex.	20.0	20.0	25.0	28.0	20.0
EtOAc fr.	10.0	23.0	10.5	33.8	23.8
BuOH fr.	50.0	28.0	30.0	40.0	28.0
<b>I</b>	>100	93.2	90.4	>100	99.8
<b>II</b>	10.6	9.7	12.0	14.1	11.2
<b>III</b>	5.4	9.0	8.8	7.5	5.7
<b>IV</b>	4.2	8.6	5.3	8.4	5.1
<b>V</b>	3.2	3.9	3.4	3.5	3.1
<b>VI</b>	3.7	4.8	4.2	5.5	3.7
doxorubicin	0.1	0.2	0.1	0.2	1.8

<sup>a</sup> EC<sub>50</sub> value of compound against each cancer cell line, which was defined as a concentration( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) that caused 50 % inhibition of cell proliferation *in vitro*.



3) 아위(阿魏, *Ferulae Resina*, Asafoetida) 추출물의 암세포증식저해효과

아위(阿魏, *Ferulae Resina*, Asafoetida) (大韓藥典의 生藥規格集, 1987)는 중국, 중앙아시아 등지에 자생하는 미나리과(Umbelliferae)에 속하는 다년생초본 아위(*Ferula assafoetida* L.) 및 동속식물의 뿌리 및 근경으로부터 얻은 삼출액, 즉 수지상 유액(Resin)을 건조한 것을 칭하며 한방에서는 주로 적체, 어혈, 충적 등의 치료목적으로 사용했으며, 또한 기관지염, 백일해, 천식에 자극성거담제로도 사용되어 왔다(中藥大辭典 第 1卷, 小學館, 上海科學術出版社, p. 2 (1985)). 아위로부터 분리된 갈바닉산과 그 나트륨염은 적혈구 응집반응과 혈소판 응집반응을 억제한다고 알려져 있다(Mansurov M. M., Martirosov M. S., 1990, *Farmakol Toksikol*, **53**, 51; Mansurov M. M., Martirosov M. S., 1988, *Farmakol Toksikol* **51**, 47). 또한 갈바닉산은 사염화메탄 주사로 야기된 간독성 과정을 개선하는 효과가 보고되어 있다(Syrov V. N., Khushbaktova Z. A., Nabiev A. N., 1990, *Farmakol Toksikol*. **53**, 41).

그러나, 갈바닉산을 비롯한 본 발명의 세스키테르펜 화합물들이 인간 암세포

주들에 대하여 강력한 세포증식 저해효과를 나타내어 항암제로서 유용하다는 사실은 아직 보고된 바 없다.

#### 가) 추출 및 분리

아위 1.2 Kg을 메탄올 20 L에 넣고 3시간씩 3회 반복 환류교반하여 식힌 후 여과하고 여액을 감압농축하여 메탄올 추출물 460 g을 얻었다.

이를 적당량의 증류수에 분산시킨 후 n-헥산, 디클로로메탄 및 n-부탄올로 단계적으로 용매분획하여 56 g의 헥산 가용분, 290 g의 디클로로메탄 가용분 및 50 g의 n-부탄올 가용분을 얻었다. 디클로로메탄 가용분 5 g을 취하여 디클로로메탄 100 ml에 녹여 실리카겔 [Merck, Kieselgel 60, 70-230 mesh, 300 g] 컬럼(Φ = 3.0 x 80 cm)을 이용하여 일정비율의 디클로로메탄과 메탄올의 혼합용액으로 단계적으로 용출시켜 총 4개의 분획(Fr. 1 - Fr. 4)으로 나누었다. 즉, 최초 디클로로메탄 2 L로 용출된 Fr. 1 (480 mg), 다음 디클로로메탄과 메탄올의 100 : 1 혼합용액 2 L로 용출된 Fr. 2 (2,050 mg), 디클로로메탄과 메탄올의 50 : 1 혼합용액 2 L로 용출된 Fr. 3 (570 mg) 및 디클로로메탄과 메탄올의 10 : 1 혼합용액 2 L로 용출된 Fr. 4 (980 mg)으로 나누었다. 이들 각 분획들의 인체 기원 암세포주에 대한 세포 증식 저해효과를 참고예의 방법으로 조사한 결과, Fr.2와 Fr.3이 A549 세포주에 대한 ED<sub>50</sub> 값이 각각 약 8 μg/ml과 9 μg/ml로서 우수한 세포 증식 저해효과를 보여주었다.

Fr.2와 Fr.3을 사용하여 각각 전술한 바와 같은 요령으로, 즉 세포 증식 저해효과가 우수한 분획을 다시 컬럼 크로마토그래피를 통하여 몇 개의 소분획으로 나누고 이중 우수한 효과를 보여주는 소분획을 다시 몇 개의 소소분획으로 나누어 나가는 조작을 유효성분의 분리가 이루어질 때까지 단계적으로 반복하였다. 즉 Fr.2와 Fr.3을 n-헥산과 에틸아세테이트 혼합용액 (혼합비; 4:1 ~ 1:1을 단계적으로 사용)을 용출액으로하여 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 반복적으로 수행하여 최종적으로 Fr.2로부터 움벨리프레닌(umbelliprenin) [화학식 3, 무색 침상결정, mp 61°C, C<sub>24</sub>H<sub>30</sub>O<sub>3</sub>, MW 366] 70 mg 및 파네시페롤 B(farnesiferol B) [화학식 4, 무색 침상결정, mp 112°C, [α]<sub>D</sub> +10 (c, 1.0 in CHCl<sub>3</sub>) C<sub>24</sub>H<sub>30</sub>O<sub>4</sub>, MW 382] 120 mg을 얻었으며, Fr.3 로부터 갈바닉산

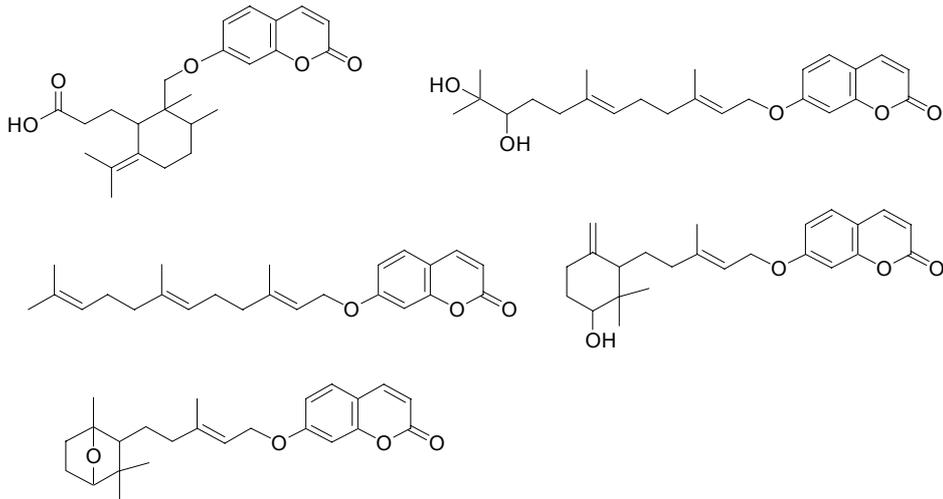
(galbanic acid) [화학식 1, 무색침상결정, mp 87-89°C, 미황색 오일 (이부분은 삭제),  $[\alpha]_D -20$  (c, 1.0 in  $\text{CHCl}_3$ ),  $\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{O}_5$ , MW 398] 500 mg, 카라타비시놀 (karatavicinol) [화학식 2, 무색 결정, mp 50°C,  $[\alpha]_D -4$  (c, 1.0 in  $\text{CHCl}_3$ ),  $\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{O}_5$ , MW 400] 50 mg 및 파네시페롤 C (farnesiferol C) [화학식 5, 무색 침상결정, mp 82°C,  $[\alpha]_D -36$  (c, 1.0 in  $\text{CHCl}_3$ ),  $\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{O}_4$ , MW 382] 400 mg을 얻었다. 이들 각 화합물들의 각종 분광학( $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ , MS) 및 이화학적 특성 조사결과 (mp,  $[\alpha]_D$ ) 등을 종합하여 이미 문헌 (화학식 1; Appendino, G *et al.*, 1994, *Phytochemistry*, 35, 183, 화학식 2; Veselovskaya, NV *et al.*, 1982, *Khim. Prir. soedin.* 18, 397-8, 화학식 3; Chartterjee, A *et al.*, 1961, *J. Chem. Soc.*, 2246, 화학식 4, 화학식 5; Caglioti, L *et al.*, 1958, *Helv. Chim. Acta*, 2278)에 보고된 바 있는 이들 화합물들의 그것들과 비교분석하여 화학식 1 내지 화학식 5의 구조를 규명하였다.

나) 아위(Asafoetida)로부터 분리된 활성성분들의 암세포증식저해효과

Table 3. Inhibition of tumor cell proliferation by components isolated from Asafoetida.

	ED <sub>50</sub> ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )				
	A549	SK-OV-3	SK-MEL-2	XF498	HCT15
아위 메탄올 추출물	11.5	18.6	13.0	11.2	12.0
화합물 1	8.9	14.5	12.3	13.0	9.7
화합물 2	5.6	11.6	5.7	7.5	7.0
화합물 3	8.9	9.4	6.7	5.3	4.1
화합물 4	7.2	10.0	7.1	7.1	4.3
화합물 5	4.2	7.2	3.9	5.4	4.3
시스플라틴	1.8	1.5	1.2	1.4	3.2

<sup>a</sup> EC<sub>50</sub> value of compound against each cancer cell line, which was defined as a concentration( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) that caused 50 % inhibition of cell proliferation *in vitro*.

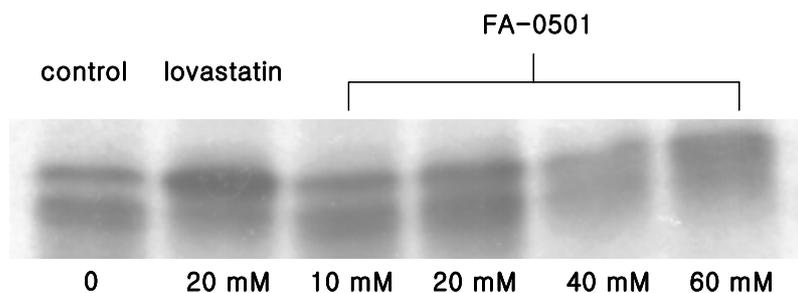


다) 아위(Asafoetida)로부터 분리된 화합물들의 Ras farnesyltransferase 저해효과

아위(Asafoetida)로부터 A549 (비소세포폐암주), SK-OV-3 (난소암주), SK-MEL-2 (피부종양주), XF-498 (중추신경계종양주) 및 HCT-15 (직장종양주) 등 5종의 human tumor cells에 대한 시험관내 세포증식저해 효과를 나타내는 활성성분들을 추적분리한 결과 위와 같은 5종의 sesquiterpene 계 화합물들이 최종적으로 분리 정제되었으며 이들 화합물들의 암세포증식저해 효능에 대한 구체적인 mechanism을 연구하고자 Ras farnesyltransferase (FTase) 및 geranyl-geranyltransferase (GGTase)에 대한 저해효능을 검색하여 보았다.

그 결과 화합물 1 (galbanic acid, FA0501)은 Ras farnesyltransferase (FTase)를 강력히 저해하고 있으며 기타 화합물 2-5 들 역시 우수한 FTase 저해효능을 보여주었다. 특히 화합물 1 (galbanic acid, FA0501)은 강력한 FTase 저해효능을 보여주었으며  $IC_{50}$  치가  $3.5 \pm 0.01 \mu M$ 로 측정되었으며 기타 화합물 2-5 들의 FTase 저해효능을 아래 표와 같다. 반면 이들 화합물들은 geranyl-geranyltransferase (GGTase)에 대하여서는  $1,000 \mu M$  이상의 농도에서도 20% 미만의 미미한 저해활성을 보여주어 FTase 에 대한 선택적 저해효능을 나타내고 있음을 확인할 수 있었다.

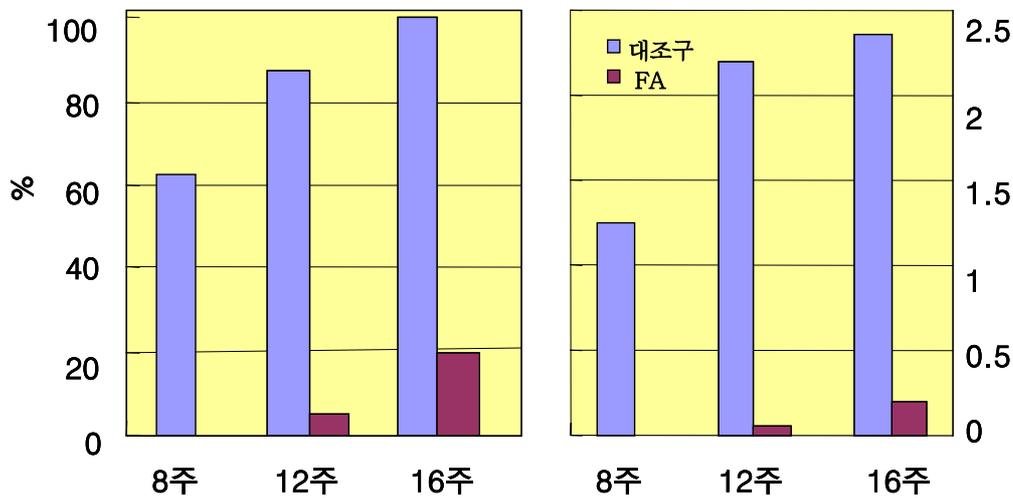
Compound	IC <sub>50</sub> (μg / ml) <sup>a</sup>
FA-0501	3.5
FA-0502	35.0
FA-0503	32.5
FA-0504	32.5
FA-0507	32.5



**Fig 2.** Hras-F cells, NIH3T3 cells transformed by human Ha-*ras*(61L, CVLS), were used to evaluate the effect of galbanic acid on the posttranslational processing of Ras in whole cells. Farnesylation alter the migration of Ha-Ras during SDS-PAGE, because it changes the hydrophobicity of target protein. the unprenylated forms of Ras (upper bands) migrated more slowly, indicating a lack of posttranslational processing. A similar pattern of migration was obtained for cells incubated in the presence of 60mM galbanic acid, demonstrating that this compound similarly blocked processing of Ras in cell

라) 아위(Asafoetida) 추출물의 암발생 저지효과(암예방효과)

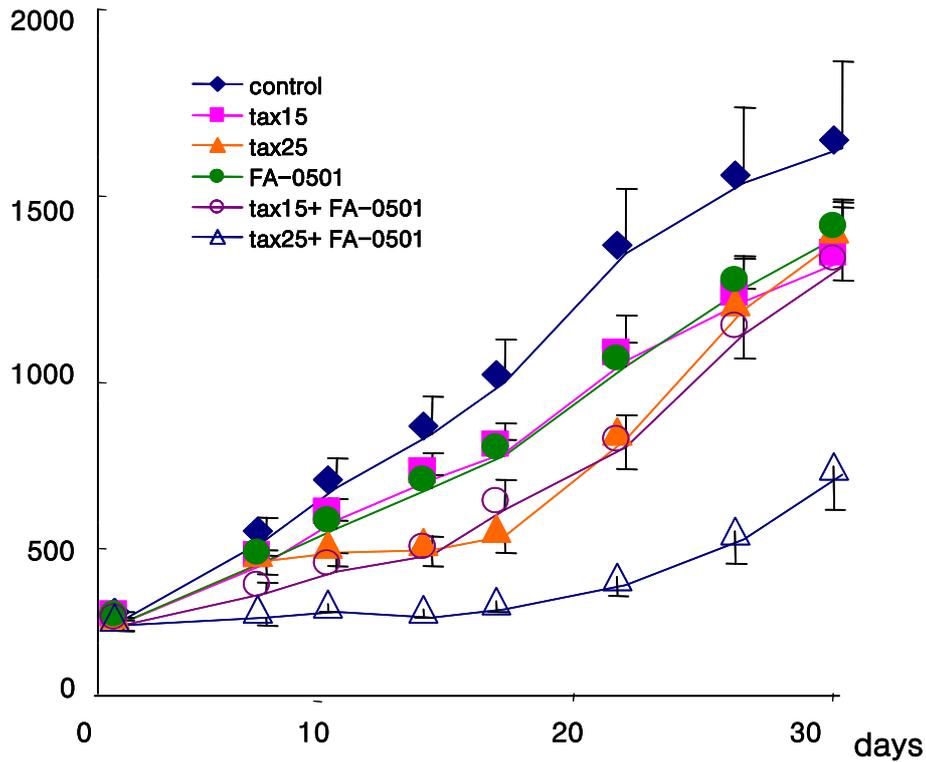
실험동물로 mouse를 사용하여 실험전 DMBA(7,12-dimethylbenz-anthracene) 로 유도한 실험 동물의 발암 억제효과 실험에서는 아위추출물을 투여하지 않은 대조군에서는 DMBA 처리후 12주 경과시에 암발생율이 87.5 %로 나타난 반면, 아위추출물(FA-ether) 투여군에서는 암 발생율이 5.5 % 정도로 매우 낮았다. 또한 16주 경과시에는 대조군 모두가 100% 암이 발생하였으나 아위추출물 투여군에서는 20 % 정도 낮은 수준에서 암이 발생한 것으로 관찰되었다. 암의 진행 상태를 예측할 수 있는 종양수를 비교해 보면 아위추출물 투여군에서는 대조군에 비해 2.5% 에서 8.5% 정도로 아주 미약하게 나타남을 알 수 있었다.



**Fig.3** Dosal hair of the mice(10 in each group) were removed and after 48 hr mice were treated topically with 200 nmol of DMBA(7,12-dimethylbenzanthracene) in 0.2 ml acetone. After 1 week croton oil (0.1 ml) was applied topically as a promotor, twice weekly for 4 weeks. The experimental animals also were applied with 200 l of FA extract prior to croton oil application. Values are average of two independent experiments consisting of 10 animals per group.

마) 아위(Asafoetida) 추출물로부터 분리된 활성성분의 암세포 증식저해효과 (nude mouse를 활용한 Xenograft 동물시험)

아위(Asafoetida) 추출물로부터 분리된 화합물 1 (FA-0501) 단독투여 혹은 현재 임상에서 제일 자주 사용하고 있는 항암제 taxol (paclitaxel)과 병용투여시의 효능을 비교분석하였다.



**Fig 4.** A549 (human non small cell lung cancer) were injected S.C. into the right flanks of 7 week-old female nude mice. When tumor sizes reached an average of 100-200mm<sup>3</sup>, animals were treated i.p. days 1,4,7 and 10 with saline(control), 15mg/kg paclitaxel(tax15) and 25mg/kg paclitaxel(tax 25), 120mg/kg FA-0501 was treated i.p.for 1, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 16 and 17days once a day. Data are presented as the average volume of eight tumors in each group.



**Fig 5.** 아위(Asafoetida)추출물로부터 분리된 화합물 1의 암세포 증식저해효과  
(nude mouse를 활용한 Xenograft 동물시험)

### 3. 암예방효능을 가진 복합제제의 구성

본 연구과제 1, 2 차년도 연구기간을 통하여 A-549 (non small cell lungcarcinoma), SK-OV-3 (adenocarcinoma, ovary malignant ascites), SK-MEL-2 (malignant melanoma, metastasis to skin of thigh), XF-498(central nerve system tumor) 및 HCT-15(colon adenocarcinoma) 등 5종의 인체유래 암세포주를 대상으로 하여 시험관 내 (*in vitro*) 세포증식저해효과를 지표로 하여 30 여종의 생약재 추출물들의 항암효능을 검색하였으며 지난 선행연구결과 data를 총망라하여 300여종의 생약재추출물의 항암효능에 대한 database를 구축하였다. 이들 중 식품의약품안전청 고시 식품가용 식물 70여종 (식품첨가제 포함) 들의 항암효능을 검토하여 본 결과 이들 중 두충, 갈근, 대두, 다엽, 계피, 겨우살이, 아위 등 10 여종의 경우 우수한 항암효능을 가지고 있음을 알 수 있었다. 이와 같은 항암활성 (*in vitro*) 검색 결과를 토대로하여 우수한 생리활성 (기능성)를 보여주는 생약재들을 대상으로하여 아위 등 5종의 식물추출물을 혼합한 복합제제를 도출하였다. (현재 특허출원을 준비 중인 관계로 자세한 식물종류, 배합비율 및 추출조건 등에 대한 상세한 기술 생략). 아울러 이 복합제제 추출물의 안전성, 안정성을 검토하고 있으며 최종 한과제조시 적용단계 및 적용방법을 검토 중에 있다.

## 제 2 절 노인성치매 개선효능을 이용한 기능성소재의 발굴

기능성소재 후보생약재들의 기억력 증진효과를 연구하기 위하여 1차적으로 시험관내 실험으로 muscarin성 acetylcholine receptor ( $M_1$  type), glutamate (NMDA; glycine binding site) receptor 및 acetylcholinesterase 등 치매와 직접적인 관련이 있는 각종 약물작용점(효소, 수용체)에 대한 저해효과를 검색하고 2차적으로 수동회피실험 모델을 활용한 동물실험을 통하여 개개의 식물추출물에 대한 기억력 증진효과를 검색한다. 이와같은 연구결과를 토대로 기억력 증진효과가 인정되는 후보 식물추출물에 대하여 뇌중 신경전달물질의 변동 등 신경화학적 변화를 추적한다.

### 1. Muscarin성( $M_1$ type) acetylcholine 수용체(mAChR- $M_1$ )에 대한 친화력 검색

#### 가. 생약의 추출 및 시료조제

실험에 사용된 생약시료들은 경동시장에서 구입하여 전문가의 정확한 감정을 거친후 실험에 사용하였으며 voucher specimen은 한국화학연구원에 보관하였다.

건조된 생약시료 100 g을 증류수 1L에 넣고 3시간동안 환류추출하고 마포를 사용하여 열시 여과하였다. 여액은 rotary evaporator에서 적당량 (100ml)으로 농축 후 즉시 동결건조하였다.

#### 나. 시약 및 기기

Liquid scintillation counter로는 MicroBeta 1450 Plus (Wallac, Finland)를 사용하였으며 Inotech harvester (96-well) 및 shaking incubator (Rosi 1000, Thermolyne) 를 사용하였다.

수용체 친화력시험에 사용된 ligand 시약 [ $^3$ H] N-methyl-scopolamine는 NEN, NET-636, atropine sulfate (RBI, A-105)을 사용하였으며 대조시약으로 4-DAMP methiodide (4-diphenylacetoxy-N-methylpiperidine methiodide)는 RBI사 제품을 사용하였다. 수용체는 CHO(Chinese Hamster Ovary) 세포에서 발현된 인간 재조합 무스카린성 acetylcholine 수용체 (mAChR- $M_1$ ,

BSR-MM1H)를 BSR사로부터 구입하여 냉동 보관한 뒤 용시 단백질 함량 130  $\mu\text{g}/\text{ml}$  로 희석하여 사용하였다.

#### 다. 수용체 친화력시험

미리  $-70^{\circ}\text{C}$ 에 냉동 보관된 수용체 세포 분획을 250  $\mu\text{l}$  당 10 ml의 phosphate buffered saline(PBS), pH 7.4로 현탁시켜 단백질 함량을 130  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도로 조정하였다. Assay buffer로는 phosphate buffered saline(PBS), pH 7.4를 사용하였다. 반응액의 최종 부피는 0.25 ml로 하였으며 50  $\mu\text{l}$ 의 hot-ligand 0.5 nM [ $^3\text{H}$ ] N-methyl-scopolamine (24,605 DPM) 와 10  $\mu\text{l}$ 의 시험약물이 포함되게 하였다. 또, nonspecific binding을 보정하기 위하여 5  $\mu\text{M}$ 의 atropine sulfate 50  $\mu\text{l}$ 를 첨가하였다. 반응의 시작은 100  $\mu\text{l}$ 의 receptor suspension을 첨가한 후 25 $^{\circ}\text{C}$ 에서 60분간 shaking incubator에서 반응시켰다. 1시간 동안의 incubation후 0.5 ml의 차가운 50 mM Tris-HCl in 0.9% saline, (pH 7.4)을 가하여 반응을 종료시키고 즉시 Wallac glass fiber filtermat GF/C (Wallac, P.O. Boc 10, FIN-20101 Tutku, Finland)를 이용한 Inotech cell harvester system으로 여과하고 차가운 완충액으로 수차 세척하였다. filtermat를 microwave oven에서 말린 후 radioactivity를 liquid scintillation counter로 측정하여 수용체에 대한 ligand의 결합율을 산출하였다. 각 생약시료는 소량의 dimethylsulfoxide (DMSO)에 녹인 후 buffer로 희석하였으며 반응액 중의 DMSO농도가 0.1% 미만인 되도록 하였고 모든 시료는 duplicate로 측정하여 평균값을 산출하였다. 표준대조약물로는 4-DAMP methiodide을 사용하였으며 4-DAMP methiodide는 수용체에 대한 ligand의 결합율을 0.024  $\mu\text{M}$  농도에서 50% 저해하는 것으로 관찰되었다.

#### 다. 연구결과

82종의 생약제의 열수추출물을 조제하여 이들을 시료로 하여 무스카린성 acetylcholine 수용체 (mAChR- $M_1$ )와 리간드 ([ $^3\text{H}$ ] N-methyl-scopolamine)와의 결합을 저해하는 효과를 지표로 하여 muscarin성 acetylcholine 수용체  $M_1$

subtype (mAChR-M<sub>1</sub>)에 대한 친화력을 검색하여 보았다. 즉, 각각 5 µg/ml, 50 µg/ml 및 500 µg/ml의 농도로 희석한 생약시료들의 수용체에 대한 친화력을 test한 결과 황련 (*Coptidis Rhizoma*), 황백 (*Phellodendri Cortex*), 백화사설초 (*Hedyotis Herba*), 가자 (*Terminariae Fructus*) 등 3종의 생약재를 제외한 대부분의 생약시료들은 50 µg/ml 이하의 농도에서는 muscarin 수용체 (mAChR-M<sub>1</sub>)와 리간드와의 결합에 별다른 영향력을 미치지 못하는 것으로 나타났다 (mAChR-M<sub>1</sub>와 리간드의 결합저지율이 10% 미만). 결과적으로 실험에 사용된 대부분의 생약 추출물들은 50 µg/ml 이하의 농도에서는 muscarin 수용체 (mAChR-M<sub>1</sub>)와의 친화력이 미미한 것으로 사료된다.

반면, 500 µg/ml 측정농도에서는 삼백초 (*Saururus chinensis Herba*), 어성초 (*Houttuynia cordata*), 오가피 (*Acanthopanax Cortex*), 계지 (*Cinnamomi Ramulus*), 상황버섯 (*Phellinus linteus*), 곡기생 (*Visci Ramulus*), 인진 (*Artemisiae capillaris Herba*), 음양곽 (*Epimedii Herba*), 저령 (*Polyporus*), 반지련 (*Scutellaria barbata*), 포공영 (*Taraxaci Herba*) 등의 생약추출물이 mAChR-M<sub>1</sub>와 리간드의 결합을 40% 이상 저지하고 있어 어느 정도 수용체 (mAChR-M<sub>1</sub>)와의 친화력을 보여주고 있음을 알 수 있었으며 현재 이들 생약재를 대상으로 하여 mAChR-M<sub>1</sub>와 리간드의 결합을 저지하는 활성성분들을 활성유도분획법 (activity-guided fractionation)에 따라 추적 연구 중이다.

한편, 본 실험 결과 수용체 (mAChR-M<sub>1</sub>)에 대하여 강력한 친화력을 보여준 생약재 황련 (*Coptidis Rhizoma*) 및 황백 (*Phellodendri Cortex*)에 대하여서는 별도로 활성유도분획법에 따라 그 활성성분을 추적단리하여 본 결과 (unpublished results) 이들 약재에 다량으로 함유된 alkaloid 성분 중의 하나인 berberine이 mAChR-M<sub>1</sub>와 리간드의 결합을 1.0 µM의 농도에서 50% 저지하는 것으로 나타나 이 성분이 수용체 (mAChR-M<sub>1</sub>)에 대하여 강력한 친화력을 나타내고 있음을 알 수 있었다.

아울러 기발표된 각종 문헌을 조사 분석검토하여 본 결과 berberine 및 관련 protoberberine 계 화합물 (palmatine, coptisine 등)들이 수용체 (mAChR-M<sub>1</sub>)에 대하여 유의성있는 친화력을 나타내었으며, 별도로 시행한 여러 가지 약리학적 연구결과 이들 alkaloid들이 각종 cholinergic receptor에 대하여 효능약으로 작

용하고 있음을 파악할 수 있었다.

또 한편, berberine 및 관련 protoberberine 화합물들이 과연 경구투여나 복강주사에 의한 약물투여 방식으로 치매 및 퇴행성 뇌질환에서 중요한 약물작용점으로 간주하고 있는 대뇌중추의 cholinergic receptor에 직접적으로 영향을 미칠 수 있는지는 현재까지의 연구 결과 미지수이거나 다소 부정적이지만 이들 성분들을 다량 함유하고 있는 황련 (Coptidis Rhizoma) 및 황백 (Phellodendri Cortex) 등의 약재가 과거로부터 치매 등 각종 퇴행성질환의 치료목적으로 단독 혹은 복합제의 형태로 많이 사용되어왔으며, 수동회피실험 (Passive avoidance performance) 등 현대과학적인 방법에 의하여 이들 생약재 (12) 및 이들 생약재에 함유된 berberine 등 protoberberine계 alkaloid의 치매치료제로서의 효능이 점차 입증되고 있는 실정이다.

이와 같은 연구결과를 종합하여볼 때 무스카린성 acetylcholine 수용체 (mAChR-M<sub>1</sub>)와 리간드 ([<sup>3</sup>H] N-methyl-scopolamine)와의 결합을 저해하는 효과를 지표로 하여 muscarin성 acetylcholine 수용체 M<sub>1</sub> subtype (mAChR-M<sub>1</sub>)에 대한 친화력을 검색하는 연구는 향후 치매치료제의 연구개발과정에 있어 유용하게 활용할 수 있는 중요한 tool이 될 수 있으리라 사료되며, 특히 이 방법에 준한 생약자원의 약효검색작업은 차후 보다 많은 자원을 대상으로 하여 계속적으로 수행할 필요가 있다고 사료된다.<sup>23-30)</sup>

## 2. NMDA(N-Methyl-D-Aspartate)수용체 glycine binding site에 대한 친화력검색

### 가. 생약의 추출 및 시료 조제

실험에 사용된 생약시료들은 경동시장에서 구입하여 전문가의 정확한 감정을 거친후 실험에 사용하였으며 voucher specimen은 한국화학연구원에 보관하였다.

건조된 생약시료 100 g을 증류수 1L에 넣고 3시간동안 환류추출하고 마포를 사용하여 열시 여과하였다. 여액은 rotary evaporator에서 적당량 (100 ml)으로 농축 후 즉시 동결건조하였다.

#### 나. 시약 및 기기

Liquid scintillation counter로 MicroBeta 1450 Plus (Wallac, Finland)를 사용하였으며 Inotech harvester (96-well) 및 shaking incubator (Rosi 1000, Thermolyne) 를 사용하였다.

수용체 친화력 시험에 사용된 ligand 시약 [<sup>3</sup>H]MDL 105,519 는 Amersham Pharmacia Biotech으로부터 구입하였으며, 대조약물로 사용한 NMDA antagonist 약물로는 5,7-DCKA (5,7-Dichlorokynurenic acid, IC<sub>50</sub> value for Glycine binding site is estimated as 1.00 μM)을 RBI사로부터 구입하여 사용하였다.

#### 다. 수용체의 분리

실험에 사용한 NMDA 수용체는 상법에 따라 웅성흰쥐 (Spague-Dawley)의 전뇌의 synaptic membrane을 분리하여 사용하였다. 즉, 흰쥐 (Spague-Dawley)의 전뇌를 적출하여 잘게 잘라 10배 용량의 차가운 수크로오스 용액 (0.32 mM)을 가한 후 테프론-글래스 호모게나이저를 이용하여 균질화시키고 즉시 1,000 g(10분, 4°C, 베크만 J2-21 M/E 원심분리기)으로 원심분리하여 상등액을 얻었다. 상등액은 20,000 g (20분, 4°C)로 재차 원심분리하여 침전물을 얻었다. 얻어진 침전에 20배 용량의 차가운 증류수를 가하여 브링크만 폴리트론 호모게나이저 (Brinkman Polytron Homogenizer)로 30초동안 균질화시킨 후 4°C에서 30분간 교반한 다음 8,000 g(20분, 4°C)으로 원심분리하여 상등액을 취하였다. 상등액을 다시 39,800 g (25분, 4°C, 베크만 L8-M 초원심분리기)으로 원심분리하여 얻은 침전물을 -70°C에서 냉동보관하였다. 냉동보관된 침전물을 상온에서 10분간 녹인 다음 20배 용량의 0.04% 트리톤 X-100을 함유한 50 mM 트리스-아세테이트 완충액(pH 7.1)에 균질화시키고 이를 37°C에서 20분간 교반시킨 후 39,800 g(20분, 4°C)으로 재차 원심분리하여 침전을 얻었다. 얻어진 침전은 20배 용량의 50 mM 트리스-아세테이트 완충액(pH 7.1)로 3번 더 세척(균질화시킨 후 원심분리)한 후 트리스-아세테이트 완충액에 현탁

하여 브래트퍼드(bradford)의 방법에 따라 단백질 농도를 측정된 다음 단백질 농도를 1 mg/ml로 분주하여 -70℃에서 보관하였으며 이를 용시에 녹여 수용체로 사용하였다.

#### 라. 수용체 친화력 시험

미리 -70℃로 냉동보관된 수용체 분획을 50 mM 트리스-아세테이트완충액 (pH 7.1) 으로 현탁하여 단백질 함량을 5  $\mu\text{g}/\text{well}$  농도로 조정하였다. Assay buffer로는 50 mM 트리스-아세테이트(pH 7.1) 를 사용하였다. 반응액의 최종 부피는 0.25 ml로 하였으며 50  $\mu\text{l}$ 의 hot-ligand 4 nM [ $^3\text{H}$ ]MDL 105,519 (140,000 DPM) 와 10  $\mu\text{l}$ 의 시험약물이 포함되게 하였다. 또, nonspecific binding을 보정하기 위하여 5 mM 글리신 50  $\mu\text{l}$ 를 첨가하였다. 반응의 시작은 100  $\mu\text{l}$ 의 receptor suspension을 첨가한 후 25℃에서 30분간 shaking incubator에서 반응시켰다.

Incubation후 0.2 ml의 차가운 50 mM Tris-HCl in 0.9% saline, (pH 7.4)을 가하여 반응을 종료시키고 즉시 Wallac glass fiber filtermat GF/C (Wallac, P.O. Boc 10, FIN-20101 Tutku, Finland)를 이용한 Inotech cell harvester system으로 여과하고 차가운 완충액으로 9회 반복 세척하였다. filtermat를 microwave oven에서 건조시킨 후 radioactivity를 liquid scintillation counter로 측정하여 수용체에 대한 ligand의 결합율을 산출하였다. 각 생약시료는 소량의 dimethylsulfoxide (DMSO)에 녹인 후 buffer로 희석하였으며 반응액 중의 DMSO농도가 0.1% 미만이 되도록 하였고 모든 시료는 duplicate로 측정하여 평균값을 산출하였다. 표준대조약물로는 5,7-DCKA (5,7-Dichlorokynurenic acid) 을 RBI사로부터 구입하여 사용하였으며 5,7-DCKA 는 수용체에 대한 ligand의 결합을 1.0  $\mu\text{M}$  농도에서 50% 저해하는 것으로 관찰되었다.

#### 다. 연구결과

감초 (Glycyrrhizae Radix) 등 82종의 생약 열수추출물을 대상시료로 하여 이

들 시료가 흰쥐의 대뇌로부터 분리정제한 NMDA 수용체와 이 수용체의 glycine binding site에 선택적인 리간드로 알려져 있는 [<sup>3</sup>H]-MDL 105,519와의 결합을 저해하는 효과를 지표로 하여 NMDA 수용체에 대한 친화력을 검색하여 보았다. 각 생약시료를 각각 5 µg/ml, 50 µg/ml 및 500 µg/ml의 측정농도로 수용체에 대한 친화력을 test한 결과 대부분의 생약시료들은 NMDA 수용체에 대하여 모두 농도의존적으로 [<sup>3</sup>H]-MDL 105,519의 결합을 저해하였으며 특히 산약 (Dioscoreae Rhizoma) 등 12종의 생약시료들은 5 µg/ml의 농도에서도 30% 이상의 높은 저해효과를 보여주었다. 또, 500 µg/ml의 측정농도에서는 대부분의 검색시료들이 80% 이상의 높은 수용체, ligand 결합저해효과를 나타내고 있어 이러한 검색결과가 실제로 검색시료들이 수용체에 대하여 친화력을 가지고 있기 때문에 나타난 결과인가에 대한 의문을 남겼으며 아마도 이는 고농도 시료로 말미암아 non specific binding에 의한 false positive 실험결과일 가능성을 배제하지 않을 수 없었으며 결론적으로 본 수용체를 활용한 receptor binding assay system 에서 고농도(500 µg/ml)의 생약시료를 사용하는 것은 실험결과의 판단에 착오를 불러일으킬 소지가 있어 바람직하지 못하다는 결론을 얻을 수 있었다.

glutamate, NMDA (N-Methyl-D-Aspartate) 등 각종 흥분성 신경전달물질에 의한 뇌세포의 손상을 방지하므로서 즉, 흥분성 신경전달물질의 수용체에 대한 선택적인 길항제를 개발하여 이들을 치매 및 뇌허혈 등 기타 퇴행성 뇌질환을 제어하는 약물로 활용하고자 하는 연구는 현재 주로 glutamate 등 흥분성 아미노산의 화학구조를 근간으로 분자모델링방법에 의거하여 design된 합성의약품들을 중심으로 집중적으로 연구되어져 왔으며, 금번 연구에서와 같이 천연물을 대상으로 한 검색작업은 일찍이 행하여진 바가 없으며 따라서 식물추출물등 천연물에 기원을 둔 약제들도 전무한 실정이다.

현재 본 연구진은 5 µg/ml의 측정농도에서 30% 이상의 높은 수용체, ligand 결합저해율을 보여준 산약 (Dioscoreae Rhizoma), 지구자 (Hoveniae Semen cum Fructus), 황기 (Astragali Radix), 행인 (Armeniacae Semen), 어성초 (*Huttuynia cordata*), 오가피 (Acanthopanax Cortex), 진피 (Aurantii nobilis Pericarpium), 상황버섯 (Phellinus linteus), 공사인 (Amomi Fructus), 인진

(*Artemisiae capillaris Herba*), 저령 (*Polyporus*), 괄향 (*Agastachis Herba*) 및 계내금 (*Galli Stomachichum Corium*) 등의 생약재를 대상으로하여 수용체와 리간드의 결합을 저지하는 활성성분들을 활성유도분획법 (activity-guided fractionation)에 따라 추적 연구 중에 있다.<sup>31-38)</sup>

### 3. Acetylcholinesterase (AChE) 저해활성검색

#### 가. 생약의 추출 및 시료검액조제

건조된 생약시료 100 g을 methanol 2 L에 넣고 일주일간 상온에서 침출시킨 후 마포로 추출액을 여과하고 즉시 rotary evaporator에서 감압농축하였다. 농축액은 냉동보관하고 실험 직전에 0.1 M phosphate buffer (0.1 N NaCl 함유)로 1mg/ml의 농도로 녹여 시료검액으로 사용하였다.

#### 나. 시약 및 기기

효소저해실험에 사용한 acetylcholinesterase 효소원으로는 전기뱀장어로부터 추출정제된 acetylcholinesterase (AChE, E.C. 3.1.1.7. Sigma C2627)를 사용하였으며 효소반응의 기질로 사용한 acetylthiocholine(ATCh), 효소저해활성의 대조약물로 사용한 THA (tetrahydroaminoacridine; tacrine) 및 coupling agent로 사용한 DTNB (5,5'-dithio bis-2-nitrobenzoic acid)는 Aldrich Chemical Co.에서 구입하여 사용하였다. 완충용액 0.1 M phosphate buffer (0.1 N NaCl 함유)는 용시 조제하여 사용하였으며 흡광도측정은 HP8452 diode array UV-visible spectrophotometer (Hewlett-Packard)를 이용하였다.

#### 다. 효소활성 및 효소활성저해효과의 측정법

효소활성은 Ellman's coupled enzyme assay방법을 사용하여 측정하였다(24). 효소반응은 25.0 ± 0.1 °C 항온조내에서 실행하였으며 1 ml cuvette을 반응조

로 사용하였다. 즉, 기질, coupling agent 및 검액을 함유한 반응조를 항온조 내에서 4분간 incubation한 후 즉시 효소액 (AChE 10unit/10 $\mu$ l)을 첨가하고 60초 동안 incubation 한 후 412 nm에서 흡광도를 측정하였다. 반응액 (1ml) 중 기질 acetylthiocholine (ATCh)의 농도는 0.1 mM, coupling agent DTNB의 농도는 0.2 mM로 하고 시료검액은 0.1 mg (0.1 ml)으로 하였다. 모든 실험군은 triplicate로 실행하여 흡광도의 평균치를 산출하였다. 시료검액의 효소활성저해효과는 시료검액 대신 동량의 완충액을 넣은 대조군의 흡광도치(control test, C.T.)와 시료검액을 넣어준 검액군의 흡광도치(sample test, S.T.)를 이용하여 아래 수식에 따라 산출하였다.

$$\text{inhibition (\%)} = 100 - \left( \frac{S.T.}{C.T.} \times 100 \right)$$

#### 다. 연구결과

가자 (*Terminaria chebula*) 등 생약재 340종의 메탄올 추출물을 대상시료로 하여 전기뱀장어로부터 추출정제된 acetylcholinesterase 에 대한 *in vitro* 저해효과를 acetylthiocholine을 기질로 사용하여 검색하여 보았다. 우선 각각 100 $\mu$ g/ml의 농도로 희석한 각 생약의 메탄올추출물을 검체로 하여 340종의 생약재 각각의 효소저해효과를 검색하고 그 결과를 표 1에 정리하였다. 대부분의 생약재들은 대조약제로 사용한 THA (tacrine : tetrahydroaminoacridine)에 비하여 (THA의 50%효소저해농도 (IC<sub>50</sub>)는 약 0.3  $\mu$ M로 나타났다) 미약한 효소저해활성 (저해율 50% 미만)을 보여준 반면 황련 (*Coptidis Rhizoma*), 황백 (*Phellodendri Cortex*), 오수유(*Evodiae Fructus*), 몰약(Myrrha), 빈랑자(*Arecae Semen*), 후추(*Piperis nigri Fructus*) 등 6종의 생약추출물이 60% 이상의 강한 효소저해활성을 보여주었으며 이들 시료들은 모두 1.0  $\mu$ g/ml - 100  $\mu$ g/ml의 농도영역에서 모두 농도의존적으로 효소활성을 저해하고 있음을 관찰할 수 있었다 (data 기재생략). 특히, 황련 (*Coptidis Rhizoma*), 황백 (*Phellodendri Cortex*)의 경우에는 3 $\mu$ g/ml 이하의 농도에서도 효소활성을 50%이상 저해하는 강력한 활성을 보여주었다. 현재 이들 6종의 생약재에 대하여서는

acetylcholinesterase 에 대한 *in vitro* 저해효과를 나타내는 활성성분들을 활성 유도분획법 (activity-guided fractionation)에 따라 추적분리하는 연구를 수행 중이다.

한편, 본 실험 결과 검체로 사용한 340종의 생약재 중 acetylcholinesterase 에 대하여 가장 강력한 *in vitro* 저해효과를 나타낸 바 있는 생약재, 황련 (Coptidis Rhizoma)에 대하여서는 별도로 활성유도분획법에 따라 그 활성성분을 추적단리하여 본 결과 본 생약재에 다량으로 함유된 alkaloid 성분인 berberine 및 coptisine, epi-berberine, groenlandicine, jateorrhizine 등의 protoberberine 계 성분들이 acetylcholinesterase 에 대하여 강력한 저해효과를 보여주고 있음을 알 수 있었다. 흥미로운 사실은 이들 protoberberine 계 alkaloid들이 muscarin성 acetylcholine 수용체 M<sub>1</sub> subtype (mAChR-M<sub>1</sub>)에 대하여 강력한 친화력을 나타내고 있다는 사실과 본 실험에서 관찰된 바와 같이 acetylcholinesterase에 대하여도 강한 저해효과를 보여주고 있는 사실은 acetylcholine 수용체 M<sub>1</sub> subtype (mAChR-M<sub>1</sub>)와 acetylcholine 분해효소인 acetylcholinesterase의 긴밀한 구조적 관련성을 시사하고 있다. 아울러 이미 발표된 각종 문헌을 조사 분석 검토하여 본 결과 berberine 및 관련 protoberberine 계 화합물(palmatine, coptisine 등) 들이 acetylcholine 수용체 M<sub>1</sub> subtype (mAChR-M<sub>1</sub>)에 대하여 유의성있는 친화력을 나타내었으며, 별도로 시행한 여러 가지 약리학적 연구결과에서도 이들 alkaloid들이 acetylcholinesterase에 대한 저해효과 및 각종 cholinergic receptor에 대하여 효능약으로 작용하고 있음을 알 수 있었다.

또 한편, berberine 및 관련 protoberberine 화합물들이 과연 경구투여나 복강 주사에 의한 약물투여 방식으로 치매 및 퇴행성 뇌질환에서 중요한 약물작용 점으로 간주하고 있는 대뇌중추에 분포한 cholinergic neuron 특히 cholinergic receptor에 직접적으로 영향을 미칠 수 있는지는 현재까지의 연구 결과 미지수이지만 이들 성분들을 다량 함유하고 있는 황련 (Coptidis Rhizoma) 및 황백 (Phellodendri Cortex)등의 약재가 과거로부터 치매등 각종 퇴행성질환의 치료 목적으로 단독 혹은 복합제의 형태로 많이 사용되어 왔으며, 수동회피실험 (Passive avoidance performance) 등 현대과학적인 실험기법에 의하여 이들

생약재 및 이들 생약재에 함유된 berberine등 protoberberine계 alkaloid의 치매 치료제로서의 효능이 점차 입증되고 있는 실정이다.

이와 같은 연구결과를 종합하여볼 때 acetylcholinesterase (AChE) 에 대한 *in vitro* 저해효과를 지표로 하여 새로운 acetylcholine성 약물 (cholinergic drug)을 탐색하고 이들 효소저해제들을 치매치료제로 응용, 개발하고자하는 연구는 언급한 바와 같이 현재 전세계적으로 가장 많이 시도되고 있는 방법인 만큼 차후 보다 많은 천연물자원들을 대상으로 하여 광범위하게 지속적으로 수행할 가치가 있다고 사료된다.<sup>39-46)</sup>

#### 4. 수동회피실험 모델을 활용한 인지기능 회복실험

##### 가. 실험동물 및 추출물투여

##### 1) 실험동물 및 실험약제의 투여

실험동물은 ICR계의 체중  $19 \pm 1$  g인 수컷의 생쥐를 대한바이오링크 (충북 음성)로부터 구입하였다. 실험동물은 타 동물과 격리하여 수용하였으며 12시간 명암 주기(6:00부터 18:00사이는 밝게 18:00부터 익일 6:00까지는 어둡게 함)와 항온( $24 \pm 1$  °C), 항습( $55 \pm 5$  %) 조건 하에서 사료와 물을 자유롭게 공급하면서 3 - 4일간 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 실험동물을 공시험(blank)군, 대조시험(control)군, 표준약물(standard)군, 실험약제군(2 - 3군)으로 나누었으며 각 군은 10마리씩으로 하였다. 공시험 (blank)군, 대조시험 (control)군은 약물 대신에 증류수를 체중 g당 0.01 ml의 용량으로 투여하였다. 실험약제군은 실험약제를 매회 20 mg/kg, 100 mg/kg 씩 투여하였으며 표준약물(standard)군은 tacrine을 매회 10 mg/kg씩 투여하였다. 투여약제는 모두 증류수에 녹여 체중 g당 0.01 ml의 용량으로 1일 1회 4일간 경구 투여하였다.

2) **1차 실험** : 생쥐를 대조군, 표준약물(standard)군, 실험약제군 투여군(250 mg/kg), 성분 투여군(10-25 mg/kg) (2-3군)으로 나누고 각 군에 6-8 마리를 배치하고 기억력 시험을 행한다.

3) **2차 실험** : 1차 실험에서 효과가 월등한 시료 2개 정도에 대해 용량에 따

른 기억력 시험을 시행한다. 생쥐를 대조군, positive control 군, 고용량군, 중용량군, 저용량군으로 나누고 각 군에 6-8 마리를 배치하고 기억력 시험을 행한다.

나. 기억력 증진 효과 시험 : **수동회피실험 (step-through test)**

인지기능 손상에 대한 개선 효능은 팩스-30 셔틀박스 시스템 (PACS-30, Columbus Co., OH, USA)을 사용한 수동회피실험을 통하여 평가하였다.

실험장치로 사용한 팩스-30 셔틀박스 시스템 (PACS-30, Columbus Co., OH, USA)은 동일한 크기의 두 개의 방(15 x 15 x 22 cm)으로 구성되어 있으며, 방과 방 사이는 guillotine door (4 x 3.5 cm)가 설치된 칸막이로 차단되어 있다. 두 개의 방 중 한쪽의 방에는 강도 10 W의 조명을 비추어 밝게 하였으며 나머지 한쪽 방은 차광하여 어둡게 하였다. 어두운 쪽 방의 바닥에는 전기 쇼크를 줄 수 있는 grid를 설치하였다. 실험은 동일한 방법으로 learning trial(학습훈련)과 memory acquisition test (기억력 시험)를 24시간 간격으로 진행하였으며 이들 실험은 모두 오후 6시 이후 시간대에 수행하였다. 즉 생쥐를 1시간 동안 암실에서 순응시킨 후 실험장치의 밝은 쪽 방에 넣고 30 초가 경과한 뒤 guillotine door가 자동으로 열리도록 하였다. 생쥐가 반대쪽 어두운 방으로 옮겨가면 guillotine door가 자동으로 닫히면서 생쥐는 바닥으로부터 5 초간 0.6 mA의 전기쇼크를 받게 하였다 (학습훈련). 학습훈련 24 시간 후 생쥐를 동일한 실험장치의 밝은 쪽 방에 넣고 반대편 방으로 옮겨가는데 걸리는 시간 (latency)을 측정하였다 (기억력 시험). 이때 5분이 경과한 경우에도 어두운 쪽 방으로 옮겨가지 않는 경우는 latency를 5분으로 하였으며 학습훈련 시 밝은 쪽 방에서 2분 이내에 반대편 방으로 옮겨가지 않는 생쥐는 실험에서 제외시켰다.

최종약물투여는 학습훈련 1시간 전에 종료하고 공시험 (blank)군을 제외한 모든 시험군의 생쥐에게는 학습훈련 30 분전에 3.0 g/kg 씩의 에탄올을 경구 투여하였으며 공시험 (blank)군은 에탄올 대신 동량의 증류수를 경구 투여하였다.

1) **실험장치:** 수동회피실험 (passive avoidance performance) 을 이용하여 측정한다. 이 장치는 두개의 구획으로 나뉘어져 있으며, 중간에 guillotine door가 있는 칸막이로 구성되어 있다. 두 구획 중 한쪽은 강도 10의 조명을 비추어 밝게 하고 나머지 한쪽은 차광하여 어둡게 한다. 바닥은 전기 속크를 줄 수 있는 grid로 구성되어 있다. (그림 참조)

2) **학습시험:** 마지막 약물투여 30분 후에 에탄올을 투여하고, 에탄올 투여 1시간 후 생쥐를 조명을 비추는 밝은 쪽에 놓고, 30초의 탐색시간 후 guillotine door가 열려 어두운 구획으로 들어 갈 수 있게 한다. 쥐는 어두운 곳을 선호하기 때문에 즉시 어두운 쪽으로 들어간다. 이때 guillotine door가 열린 후 120초 이내에 어두운 쪽으로 들어가지 않는 쥐는 제외시킨다. guillotine door가 열리고 쥐가 어두운 쪽으로 들어갈 때까지의 시간을 측정한다. 쥐가 일단 어두운 쪽으로 들어가면 guillotine door가 닫히고 0.6mA의 전류가 5초 동안 grid floor를 통해 흐르게 된다 (learning trial).

3) **기억력시험:** 학습이 끝난 쥐를 대상으로 하여 24시간이 지난 후 학습에서와 같은 방법으로 시행한다. 이 때 30초의 탐색시간 후 300초의 시간을 주고 어두운 쪽으로 들어가는 latency를 측정하는데 이것이 길수록 수동회피의 학습과 기억이 좋음을 나타낸다 (testing trial).

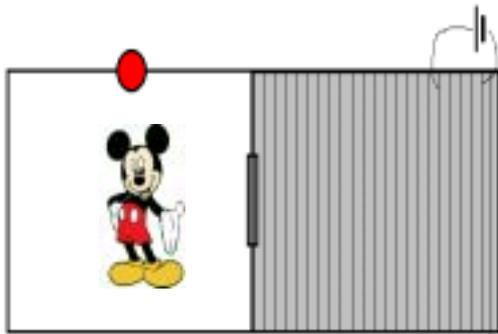


Fig 6 : 팩스-30 셔틀박스 시스템 (PACS-30, Columbus Co., OH, USA)을 사용한 수동회피실험장치 (그림 상) 및 모식도

다. 연구결과

노인성치매(senile dementia)는 심한 뇌위축과 뇌세포의 손상으로 말미암아 기억력 및 각종 인지기능이 감퇴되고 추상적인 사고판단능력이 현격하게 저하되므로서 궁극적으로는 심각한 성격장애, 불면, 망상, 행동장애등의 증상을 나타내게 되는 대표적인 퇴행성 만성 뇌질환이다.

최근 각종 질병으로 인한 인간의 사망률을 조사한 역학연구보고에 따르면 노인성치매를 비롯한 퇴행성 뇌질환은 관상동맥질환, 악성종양에 이어 3위의 순서를 차지하고 있으며 현재 전 세계적으로 2,500 만명 정도의 노령인구가 이

들 질환에 시달리고 있다. 노인성치매의 발병율은 환자의 연령에 비례하여 급격히 증가하며 65세 이상 전체인구의 7.5 %, 85세 이상 전체인구의 30 %가 이 질병으로 고통을 받고 있다. 따라서 노인인구가 급속하게 증가하고 있는 오늘날의 상황을 감안하여 볼 때 노인성치매는 그 해결책이 하루속히 강구되어야 할 매우 시급한 과제라고 할 수 있다.

그러나 노인성치매는 아직껏 질병의 정확한 원인이 제대로 규명되지 못하고 있는 까닭으로 항정신성약물(antipsychotics), 항우울제(antidepressant), 항불안제, 항경련제(anticonvulsant), 뇌기능개선제 (nootropics), 신경전달물질의 대사에 관여하는 효소차단제(enzyme blocker), 칼슘차단제(Ca-blocker)등의 약제들을 환자의 상태에 따라 적절하게 처치하는 대증요법만이 최선의 방법으로 알려져 있다. 전술한 약제들 중 많은 약물들에 대하여는 치매 치료제로서의 활용가능성이 여러차례 연구 검토되어져 왔으나 대부분의 경우 성격장애, 불면, 망상, 행동장애 등 치매의 진행에 따라 발생하는 각종 병증에 대한 일시적인 완화효과만 일부분 인정이 되고 인지기능개선효과 등 치매에 대한 근본적인 치유효과를 보여주는 약물은 거의 전무한 실정이다. 최근 노인성치매로부터 유발되는 기억력상실, 학습력 저하 등 각종 인지기능장애는 주로 대뇌 기저부의 acetylcholine성 신경세포의 손상으로부터 기인된다는 연구가설에 의거하여 무스카린성 acetylcholine 수용체에 대한 효능제, acetylcholine 생성촉진제, acetylcholinesterase (AChE) 저해제 등 여러가지 작용기전에 따라 acetylcholine성 신경세포의 기능을 강화시켜줄 수 있는 많은 약물들이 연구개발되어 지고 있다. 대표적인 사례로 노인성치매로 야기된 muscarine성 acetylcholine 수용체 M<sub>1</sub> subtype (mAChR-M<sub>1</sub>)의 기능 저하을 향진시켜줄 수 있는 효과적인 mAChR-M<sub>1</sub> 효능약 (agonist)이 치매의 치료 혹은 병의 진행을 지연시켜줄 수 있으리라는 연구 가설 하에 arecoline, oxotremoline 등 여러가지 muscarine 효능약이 연구 개발되었으며, 현재 mirameline, sabcomeline, xanomeline 등이 시판을 앞두고 있는 실정이다.

mAChR-M<sub>1</sub> 효능약과 함께 노인성치매 개선제로 활발하게 연구 개발되어지고 있는 분야는 AChE 저해제에 관한 연구로서 현재 시판되고 있는 tacrine (Cognex), rivastigmine (Exelon), donepezil (Aricept), galantamine (Reminil)

등의 약제들은 모두 acetylcholinesterase 저해효과를 약효의 근간으로 삼고 있다.

한편 본 연구진은 수년 전부터 생약재 등 각종 천연식물자원으로부터 노인성치매로 유발된 각종 인지기능의 손상을 효과적으로 개선할 수 있는 천연의 약품을 개발하고자 인지기능 손상과 관련된 mAChR-M<sub>1</sub>, AChE, BChE (butyrylcholinesterase) 등 각종 약리학적 작용점을 조절하는 천연물에 대한 탐색연구를 수행하여왔다. 그 결과 생약의 추출물들을 대상으로 하여 mAChR-M<sub>1</sub>에 대한 친화력 및 AChE에 대한 저해효과를 검색하여 보고한 바 있다.

이와 같이 약리작용점을 대상으로 한 *in vitro* 실험과 병행하여 최근 본 연구진은 생쥐(mouse)를 실험동물로 사용한 수동회피실험(passive avoidance performance)을 통하여 노인성치매로부터 유발되는 기억력 감소, 학습력 저하 등의 인지기능 장애를 개선시키는 약리효능을 평가하는 동물실험방법을 확립하였으며 이 방법에 준하여 수종 생약추출물의 효능을 검색하여 본 결과 산조인(酸棗仁, Zizyphi spinosi Semen), 원지(遠志, Polygalae Radix), 육두구(肉荳蔻, Myrsticae Semen), 몰약(Myrrha), 맥문동(Liliopsis Tuber), 상기생(Loranthi Ramulus), 석창포(Acori graminei Rhizoma), 천궁(Cnidii Rhizoma), 길경(桔梗, Platycodi Radix) 등의 생약재들이 우수한 인지기능장애 개선효능을 보여주고 있음을 알 수 있었다. 각 생약재의 추출물을 1주일간 반복하여 투여한 후 인지기능 개선효능을 생쥐(mouse)를 실험동물로 사용한 수동회피실험(passive avoidance performance)을 통하여 평가한 결과는 아래와 같다.<sup>47-54)</sup>

Table 4. Memory test of various plant extract after repeated administration

plant 추출물	latency	successful rate
vehicle	12 ± 5	2/11
Zizyphi spinosi Semen	227 ± 142	3/4
Polygalae Radix	138 ± 122	3/6
Myrsticae Semen	198 ± 52	3/6
Myrrha	136 ± 53	2/5
Liliopis Tuber	116 ± 58	1/3
Loranthi Ramulus	100 ± 52	1/4
Acori graminei Rhizoma	114 ± 63	1/4
Cnidii Rhizoma	21 ± 5	0/4
Platycodi Radix	95 ± 35	1/4
Xanthoxyli Fructus	34 ± 15	1/4
Carthami Flos	20 ± 10	0/4
Angelicae Radix	54 ± 21	1/4

Table 5. Memory test of various plant extract after singled administration

plant 추출물	latency	successful rate
vehicle	12 ± 5	2/11
Polygalae Radix	227 ± 122	3/4
Myrsticae Semen	238 ± 114	3/4
Cnidii Rhizoma	294 ± 105	3/4
Acori graminei Rhizoma	238 ± 63	2/3
Zizyphi spinosi Semen	230 ± 141	3/4
Loranthi Ramulus	209 ± 68	1/4
Liliopis Tuber	226 ± 78	1/3
Platycodi Radix	85 ± 34	1/4
Xanthoxyli Fructus	161 ± 15	1/4
Carthami Flos	54 ± 10	0/4
Angelicae Radix	182 ± 121	1/3
Myrrha	169 ± 123	1/4
Rehmanniae Raix	109 ± 65	1/3

## 5. 노인성치매 개선효능을 가진 기능성소재의 구성

전술한 바와 같이 기능성소재 후보생약재들의 기억력 증진효과를 연구하기 위하여 1차적으로 시험관내 실험으로 muscarin성 acetylcholine receptor ( $M_1$  type), glutamate (NMDA; glycine binding site) receptor 및 acetylcholinesterase (AChE) 등 노인성 치매와 직접적인 관련이 있는 각종 약물작용점(효소, 수용체)에 대한 저해효과 및 친화력효능을 검색하고 2차적으로 수동회피실험 모델을 활용한 동물실험을 통하여 개개의 식물추출물에 대한 기억력 증진효과를 검색하였다.

일차적으로 시험관내 실험모델로 실행한 Muscarin성 acetylcholine receptor ( $M_1$  type), glutamate (NMDA; glycine binding site) receptor 및 acetylcholinesterase 등 노인성 치매와 직간접적인 관련이 있는 각종 약물작용점(효소, 수용체)에 대한 저해효과를 검색하여 본 결과 황련 (Coptidis Rhizoma), 황백 (Phellodendri Cortex), 백화사설초(Hedyotis Herba), 가자 (Terminariae Fructus) 등의 생약재가 muscarin성 acetylcholine 수용체 ( $M_1$  type)에 친화력을 나타내고 있으며 산약 (Dioscoreae Rhizoma), 지구자 (Hoveniae Semen cum Fructus), 황기 (Astragali Radix), 행인 (Armeniacae Semen), 어성초 (*Huttuynia cordata*), 오가피 (Acanthopanax Cortex), 진피 (Aurantii nobilis Pericarpium), 상황머섯 (Phellinus linteus), 공사인 (Amomi Fructus), 인진 (Artemisiae capillaris Herba), 저령 (Polyporus), 곽향 (Agastachis Herba) 및 계내금 (Galli Stomachichum Corium) 등의 생약재이 glutamate (NMDA; glycine binding site) 수용체와 리간드의 결합을 저지하는 활성을 나타내고 있음을 알 수 있었다. 또, 황련 (Coptidis Rhizoma), 황백 (Phellodendri Cortex), 오수유(Evodiae Fructus), 몰약 (Myrrha), 빈랑자 (Arecae Semen), 후추(Piperis nigri Fructus) 등이 acetylcholinesterase (AChE)에 대하여 저해효능을 나타내고 있음이 확인되었다. 한편 mouse를 실험동물로 활용하여 시행한 수동회피실험 (Passive avoidance performance) 결과를 토대로 기억력개선 효능 혹은 인지기능 개선효능을 검색하여 본 결과 산조인(酸棗仁, Zizyphi spinosi Semen), 원지(遠志, Polygalae Radix), 육두구 (肉

荳蔻, Myrsticae Semen), 몰약 (Myrrha), 맥문동 (Liliopsis Tuber), 상기생 (Loranthi Ramulus), 석창포 (Acori graminei Rhizoma), 천궁 (Cnidii Rhizoma), 길경(桔梗, Platycodi Radix) 등의 생약재들이 우수한 인지기능장애 개선효능을 보여주고 있음을 알 수 있었다.

전술한 바와 같이 시험관내 실험으로 muscarinic acetylcholine receptor (M<sub>1</sub> type), glutamate (NMDA; glycine binding site) receptor 및 AChE (acetylcholinesterase) 등 노인성 치매와 직접적인 관련이 있는 각종 약물작용점(효소, 수용체)에 대한 저해효과 및 친화력효능을 검색한 결과 유효한 효능을 나타내고 있는 생약재들은 황련 (Coptidis Rhizoma), 황백 (Phellodendri Cortex), 오수유(Evodiae Fructus) 의 경우를 제외하고는 대부분 현재 식품의 약안전청에서 식품원료로의 사용이 허가된 품목들로서 복합제제구성에 요긴하게 활용할 수 있었다.

또, 이와 같은 시험관 내 효능평가방법이 아닌 동물실험 (수동회피실험)을 통한 인지기능 개선효능의 검색 결과에서는 복합제제구성에 적용할 수 있는 산조인(酸棗仁, Zizyphi spinosi Semen), 원지(遠志, Polygalae Radix), 육두구 (肉荳蔻, Myrsticae Semen), 몰약 (Myrrha), 맥문동 (Liliopsis Tuber) 등 우수한 약재들이 후보약재로 선정되었다.

최종적으로 동물실험 (수동회피실험)을 통한 인지기능 개선효능의 검색 결과를 토대로하여 노인성치매 및 기억력 감퇴 등 각종 인지기능 퇴행을 특징으로 하는 퇴행성 뇌질환에 광범위하게 적용가능하리라 예측되는 우수한 인지기능 개선효능(기능성)을 보여주는 아위등 10여종의 식물들을 일정 비율로 혼합하여 열수 추출한 복합제제 (기능성 소재) 2종 (실버-1, 실버-2)를 도출하였으며 본 연구 결과를 특허출원 완료하였다. (아위 추출물을 함유하는 인지기능 개선용 식품: 출원번호; 대한민국 KR 2004-0026005 출원일자 ; 2004/4/06). 이들 복합제제 (기능성 소재) 2종 (실버-1, 실버-2) 중 보다 우수한 인지기능 효능이 인정되는 실버-2 제제에 대한 랫드를 이용한 1차 안전성시험을 완료하였으며 최종적으로 한과제조시 적용단계 및 적용방법을 검토 중에 있다.

별첨 (부록) : 실버-1 의 안전성시험 성적서 및 일반성분 분석자료

가. 인지기능 개선효능을 가진 복합제제의 구성

<단계 1> 아위추출물의 제조

아위 200 g에 증류수 2 ℓ를 가하고, 90 내지 95℃에서 5시간 동안 2회 반복 추출하였다. 이 추출물을 여과지로 여과하고 감압농축하여 본 발명의 아위 열수 추출물 80 g을 얻었다. 한편, 아위 200 g에 에탄올 2 ℓ를 가하고, 상온에서 3일간 2회 추출하였고, 이 추출물을 여과 및 감압농축하여 아위 에탄올 추출물 60 g을 얻었다.

<단계 2> 아위 혼합 추출물의 제조

하기 표 1과 같은 조성비율에 따라 각각의 생약재들을 혼합한 후, <단계 1>의 아위 열수 추출물과 동일한 방법으로 추출한 뒤, 추출액을 동결건조하여 실버-1 250 g 및 실버-2 800 g을 각각 제조하였다.

【Table 6】 복합제제의 구성

실버-1		실버-2	
천 마	600 g	당 귀	600 g
석창포	300 g	맥문동	400 g
산조인	300 g	하수오	400 g
당 귀	300 g	숙지황	300 g
백복신	300 g	천 마	500 g
오미자	300 g	산조인	300 g
침 향	20 g	석창포	300 g
원 지	300 g	원 지	300 g
아 위	40 g	육두구	300 g
		작 약	300 g
		인 삼	300 g
		산수유	300 g
		침 향	20 g
		육 계	300 g
		아 위	40 g

나. 인지기능 개선효능을 가진 복합제제의 인지기능개선효능

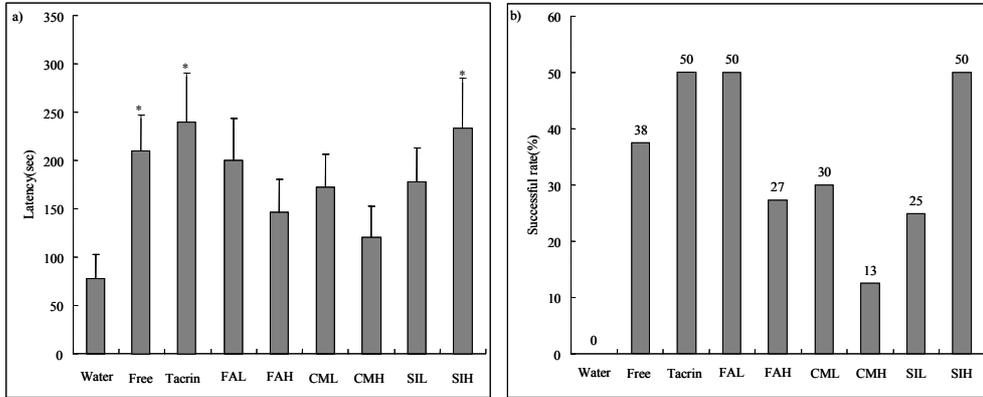
상기와 같이 제조한 아위 추출물, 실버-1 및 실버-2의 인지기능 개선효과를 확인하기 위하여 수동회피실험을 실시하였다. 수동회피실험에 들어가기 전, 18 내지 20 g의 수컷생쥐를 22±1℃에서 12시간을 주기로 명암을 조절하고, 7일간 사육하였다. 사육시에는 물과 사료를 자유롭게 섭취하도록 했으며, 물과 사료는 3일 이상 순화시킨 후 실험에 사용하였다. 수동회피 실험시, 각각의 실험군은 6마리씩 구성하였으며, 각 실험군 별 시료 및 에탄올의 투여조건을 하기 표 2에 나타내었다. 구체적으로, 실험군 1 및 2에는 실시예 1에서 제조한 아위 추출물을 농축시켜 만든 농축액을 10 mg/kg 또는 100 mg/kg의 용량으로 매일 1회 일주일간 경구 투여하였고, 실험군 3 내지 6에는 실버-1 및 실버-2 추출물을 감압건조시켜 만든 농축분말을 5% 트윈 80(Tween 80, 폴리옥시에틸렌솔비탄 모노올리에이트, 시그마사)에 녹인 후 실험군 1 및 2와 같은 용량 및 방법으로 투여하였다. 양성대조군에는 아세틸콜린 에스터라제의 강력한 저해제이자 알츠하이머병 치료제로 승인된 타크린(Tacrine, 9-아미노-1,2,3,4-테트라하이드로아크리딘, 시그마사)을 10 mg/kg용량의 상기와 같은 방법으로 투여하였고, 음성대조군 및 정상군은 5% 트윈 80을 10 ml/체중kg 씩 상기와 같은 방법으로 투여하였다.

[ Table 7]

실험군	시료내용	시료용량	에탄올 투여
1	아위 추출물 농축액	10 mg/kg	투여
2	아위 추출물 농축액	100 mg/kg	투여
3	실버-1 농축분말+트윈	10 mg/kg	투여
4	실버-1 농축분말+트윈	100 mg/kg	투여
5	실버-2 농축분말+트윈	10 mg/kg	투여
6	실버-2 농축분말+트윈	100 mg/kg	투여
음성대조군	트윈	10 mg/kg	투여
양성대조군	타크린(Tacrine)	10 mg/kg	투여
정상군	트윈	10 mg/kg	비투여

수동회피실험은 팩스-30 서틀 박스 시스템(PACS-30, 콜럼버스 인스트루먼트사)을 사용하였으며, 학습(learning)과 실험(testing)으로 나누어 시행하였다.

Fig 7. 아위 추출물 및 복합제제 실버-1 및 실버-2의 학습인지기능 개선효과



실험명	시료내용	시료용량
CML	실버-1 농축분말 +에탄올투여	10mg/kg
CMH	실버-1 농축분말 +에탄올투여	100mg/kg
SIL	실버-2 농축분말 +에탄올투여	10mg/kg
SIH	실버-2 농축분말 +에탄올투여	100mg/kg
FAL	아위 추출물 농축액 +에탄올투여	10mg/kg
FAH	아위 추출물 농축액 +에탄올투여	100mg/kg
Water	트윈투여 +에탄올투여	
Free	트윈만 투여	
Tac	대조약제(Tacrine) +에탄올투여	10mg/kg

학습훈련 (learning trial)과 기억력시험(memory acquisition test)을 통하여 생쥐가 밝은 쪽 방에서 어두운 쪽 방으로 옮겨가는데 걸리는 시간(latency)을 각 시험군 별로 측정하였으며 학습 훈련 시에 비하여 기억력시험 시의 latency가 증가하는 정도를 지표로 하여 인지기능의 개선효과를 평가하였다. 학습훈련 전 에탄올을 투여하지 않은 공시험(free)군의 경우 실험동물들은 학

습 훈련 시에는 모두 1분 이내의 latency를 보여주었으나 24시간이 경과한 후 실시한 기억력시험 시에는 모두 4 - 5 분대의 latency를 기록하고 있어 학습 훈련을 통하여 습득한 전기쇼크의 경험을 24시간이 경과한 후에도 잘 기억하고 있음을 알 수 있었다. 반면 학습훈련 전 에탄올을 투여한 대조시험 (water) 군의 경우에는 학습훈련 시에는 공시험군의 경우와 같이 모두 1분 이내의 latency를 보여 주고 있으나 기억력 시험 시에도 모두 1분 이내의 latency를 보이고 있어 학습훈련을 통한 전기쇼크의 기억을 24시간 이후에서는 모두 잊어버리고 있음을 알 수 있다. 이와 같은 연구결과는 실험동물로 사용한 생쥐들의 경우 에탄올의 경구투여로 인지기능(기억력) 손상이 잘 유도되고 있음을 시사하고 있다.

한편 복합제제 실버-1 및 실버-2 투여군의 경우에는 투여량 (10 mg/kg, 100 mg/kg)에 상관없이 학습훈련 시에 비하여 기억력시험 시에 밝은쪽 방으로부터 어두운 쪽 방으로 옮겨가는데 걸리는 시간 (latency)이 150초 정도로 대조 시험 (water)군의 경우에 비하여 약 3배 정도 증가하고 있어 에탄올 투여로 야기된 인지기능 손상이 상당부분 회복되고 있음을 알 수 있었다. 실버-2 투여군의 경우에는 학습훈련 시에 비하여 기억력시험 시의 latency가 약물투여량(10 mg/kg, 100 mg/kg)에 따라 투여용량 의존적으로 증가하였다. 특히 고용량(100 mg/kg)의 사포닌분획을 투여한 군의 경우에는 기억력 시험시 측정된 latency가 에탄올을 투여하지 않은 공시험군의 경우와 비슷한 수준 (74%)으로 증가하였으며 대조약물로 사용한 tacrine (Cognex)에 버금가는 우수한 인지기능 개선효능을 보여주었다.

이와 같은 연구결과는 실험동물로 사용한 생쥐의 경우 복합제제 실버-1 및 실버-2을 반복 경구투여하므로서 에탄올 투여로 유발된 인지기능 (기억력) 손상이 효과적으로 개선되고 있음을 시사하고 있다. (Fig 7).

## 6. 복합제제 실버-2 투여 후 뇌중 신경전달물질들의 동태변화

### 가. 실험방법

뇌의 대뇌피질 (cortex), 해마 (hippocampus) 및 선조체 (striatum: basal ganglia)등에서 acetylcholine 및 각종 카테콜아민 등 여러 신경전달물질의 변동은 퇴행성뇌질환의 발생 및 진행에 밀접한 관련성이 있음은 이미 여러 보고를 통하여 잘 알려진 바 있다. 아직껏 뇌중 어느부위에서 어떤 신경전달물질들이 특정 질병의 발생과 진행에 관련되고 있는지에 대하여는 수많은 연구들이 진행되고 있으며 그 결과 dopamine의 감소에 따른 parkinson 질환의 진행, 해마 영역에서의 acetylcholine 등이 감소함에 따라 노인성치매등의 질환이 급속도로 진행된다고 하는 학설들은 많은 연구결과를 토대로 잘 정립이 되어 가고 있으나 아직도 이들 학설을 반박하고 있는 연구결과들도 많이 보고되고 있는 실정이다. 그러나 이와 같이 부분적으로는 서로 상반된 연구결과들을 보고하고 있는 연구진들도 모두 이구동성으로 주장하고 있는 부분은 노인성 치매 등 퇴행성뇌질환의 진행을 차단하기 위하여서는 뇌중 어느부위에서나 신경전달물질들은 항상 건강한 사람의 경우와 비슷한 수준으로 유지되어야 한다는 이른바 신경전달물질의 항상성유지를 가장 중요한 요인으로 꼽고 있다. 이러한 연구배경하에 수동회피실험결과 가장 효과가 뛰어난 복합제제 실버-2 투여 후 뇌를 절개한 후 대뇌피질, 해마 및 선조체등을 각각 취하여 이들 각 부위에서의 신경전달물질의 동태변화를 알아보았다.

#### 1) 시약 및 기기

Dopamine HCl (DA), 3,4-dihydroxyphenyl acetic acid (DOPAC), homovanilic acid (HVA), 5-hydroxyindole acetic acid (5-HIAA), serotonin creatinine sulfate (5-HT), isoproterenol HCl (ISP), GA, GABA,  $\beta$ -aminobutyric acid(BABA), 2-mercaptoethanol(2-ME), sodium octyl sulfate (SOS), choline chloride (CH), acetylcholine chloride (ACh) 등은 Sigma

Chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A), noradrenaline HCl (NA)는 Tokyo Kasei Co. (Tokyo, Japan), o-phthalaldehyde (OPA)는 Fluka Chemie AG (Buchs, Switzerland)로부터 각각 구입하여 사용하였다. Citric acid, tetrasodium ethylenediamine tetraacetate (Na<sub>4</sub>EDTA), sodium acetate, polyethylene glycol 400 (PEG400), 메탄올(MeOH) 등은 국내외의 특급시약을, 물은 3차 증류수를 사용하였다. HPLC system은 Shimadzu사 LC-10AD 펌프와 SIL10A 자동주입기로 구성하였고, 검출기는 HP사 HP1049A Programmable ECD를 사용하였다.

## 2) 실험동물 및 추출물투여

한국실험동물원에서 공급받은 몸무게 18-20 g의 ICR 수컷 생쥐를 사용하였다. 사육실은 24±1 °C의 통풍장치를 가동시켰고 12시간을 주기로 명암을 조절하였다. 사육시 물과 사료는 자유롭게 섭취하도록 하였다. 생약추출물을 10% Tween 80에 용해시킨 후 생리식염수로 희석한 것을 실험액으로, Tween 80을 생리식염수로 희석한 것을 대조액으로 하고, 실험군에는 실험액을, 대조군에는 대조액을 매일 1회씩 7일간 경구투여 하고, 7일째 투여 30분후에 에탄올을 3 g/kg 용량으로 경구투여 하였다.

## 3) 시료조제 및 분석

### (1) 조직의 분리

에탄올 투여 1시간 후에 생쥐의 뇌를 Microwave irradiator (TMW-6402C, Muromachi, Japan)에 4.5 kW의 에너지로 1.4 초간 노출시켜 뇌 중 효소의 기능을 정지시킨 후 전피질, 해마, 선조체를 부위별로 채취하여 무게를 측정하고 dry ice상에서 순간적으로 동결시켜 -70°C에 보관하였다. 분석직전에 조직을 얼음상에서 녹이고 조직이 담긴 tube에 이동상과 내부표준액을 넣은 후 Ultrasonic Homogenizer 4710 (Cole Parmer Co., Chicago, U.S.A.)로 2-3초씩 조직이 완전히 분해될 때까지 수회 반복처리하고 4 °C에서 16,000 rpm으로 10 분간 원심분리한 상등액을 시료액으로 하였다.

(2) catecholamine류 및 indole류의 분석

시료액 10 $\mu$ l를 직접 HPLC에 주입하여 분석하였다. 내부표준물질로 ISP, 고정상으로 Elipse XDB-C18 (2.1 $\times$ 150mm) 컬럼, 이동상으로 10 mM citric acid, 0.13 mM Na<sub>4</sub>EDTA, 0.58 mM SOS를 함유하는 35 mM 초산완충액 (pH 3.4) : MeOH = 84:16 (v/v)을 사용하였고 이동상의 유속은 0.4 ml/min, 컬럼 온도는 30 °C, 자동주입기의 온도는 4 °C로 하였다. 전기화학검출기의 전극으로 glassy carbon electrode를 사용하였고, 은/염화은전극을 기준으로 0.85 V가 되도록 조정하였다.

(3) GABA 및 GA의 분석

시료액에 OPA반응액을 가하여 완전히 섞은 후 시료액과 OPA반응액을 합한 양과 동량의 PEG400을 다시 가하여 섞은 액 10  $\mu$ l를 HPLC에 주입하여 분석하였다. 내부표준물질로 BABA, 고정상으로 NovaPak C18 (3.9 $\times$ 150mm) 컬럼, 이동상으로 0.1 mM Na<sub>4</sub>EDTA를 포함하는 0.1M 인산완충액 : MeOH = 55:45(v/v) (pH 3.8)를 이용하였고 이동상의 유속은 0.8 ml/min, 컬럼의 온도는 30 °C, 자동주입기의 온도는 4 °C로 하였다. 전기화학검출기의 전극으로 glassy carbon electrode를 사용하였고, 은/염화은전극을 기준으로 0.7 V가 되도록 조정하였다.

(4) Acetylcholine 및 Choline 의 분석

시료액 10  $\mu$ l 씩을 직접 HPLC에 주입하여 분석하였다. 내부표준물질로 ethylhomocholine, 고정상으로 ACH-3 (3 $\times$ 150 mm) 컬럼에 SPR (enzyme reactor)를 연결한 것을, 이동상으로 tetramethylammonium chloride 0.5 mM, 1-octanesulfonic acid sodium salt 2.0 mM, 0.005% MB reagent를 함유하는 pH 8 인산완충액을 사용하였고 이동상의 유속은 0.35 ml/min, 컬럼온도는 35 °C, 자동주입기의 온도는 4 °C로 하였다. 전기화학검출기의 전극으로 백금전극을 사용하였고, 은/염화은전극을 기준으로 0.3 V가 되도록 조정하였다.

#### 4) 측정값의 처리

모든 자료는 평균±표준오차로 표시하였으며, 실험군과 대조군에 대한 유의성 검정은 Student의 t-test로 수행하였다. P값이 0.05이하인 경우 통계적으로 유의하다고 판정하였고, P값이 0.01이하인 경우는 따로 표시하였다.

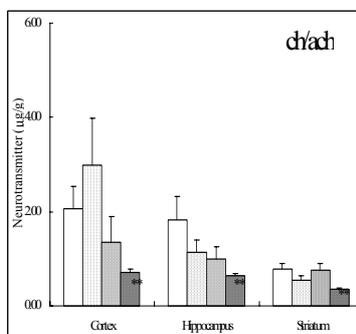
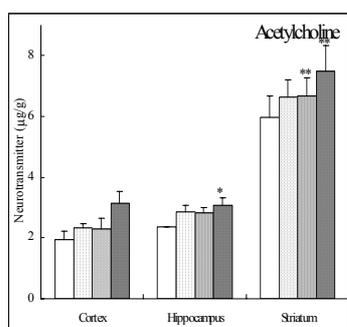
#### 나. 연구결과

복합제제 실버-2 투여 후 뇌의 신경전달물질에서의 어떤변화가 나타내는지 실험하였다. 특히 퇴행성뇌질환과 관련있는 아세틸콜린, 도파민, 세로토닌, 글루타메이트 및 이들의 전구물질의 변동량을 대뇌피질, 해마, 선조체등 각각의 부위에서 비교 검토하였다.

아래 표 12와 그림에서 보는 바와 같이 아세틸콜린의 함량은 에탄올만 투여한구에서는 대뇌피질, 해마, 선조체등 모든 부위에서 전반적으로 대조구보다 낮았다. 반면 복합제제 실버-2 의 처리구에서는 아세틸콜린이 에탄올 투여군에 비하여 높은 농도를 유지하고 있다. 특히 50mg/ml를 처리한 구에서 유의성있는 아세틸콜린의 증가를 관찰할 수 있었다. 아세틸콜린의 전구물질내지는 분해물질인 콜린은 에탄올처리구에서 해마와 선조체에서 다른 실험구보다 높게 나타나고 있다. 그러나 복합제제 실버-2의 처리구에서는 해마의 경우에는 대조구와 같거나 조금 낮게(50mg/ml) 나타나고 선조체에서는 50mg/ml 처리구에서 낮게 나타나고 있음을 알 수 있었다. 따라서 복합제제 실버-2 는 뇌내의 아세틸콜린의 함량을 높혀주고 반면에 콜린의 함량은 낮은 농도로 유지시켜 주는 것으로 사료된다.

Table 8. The neurotransmitter (acetylcholine and choline) level in mouse brain after administration of Silver-2.

		acetylcholine	choline	ch/ach
Cortex	EtOH	1.93 ± 0.29	3.80 ± 0.63	2.07 ± 0.47
	Saline	2.32 ± 0.14	3.83 ± 0.64	3.00 ± 0.98
	Silver-2 25(+al-m)	1.31 ± 0.32	4.13 ± 0.64	7.99 ± 3.55
	Silver-2 50(+al-m)	3.15 ± 0.37	2.20 ± 0.64	0.72 ± 0.06
Hippocampus	EtOH	2.35 ± 0.02	4.29 ± 1.17	1.83 ± 0.49
	Saline	2.87 ± 0.21	2.76 ± 0.30	1.13 ± 0.26
	Silver-2 25(+al-m)	2.83 ± 0.16	2.70 ± 0.65	1.00 ± 0.26
	Silver-2 50(+al-m)	3.08 ± 0.23	1.95 ± 0.18	0.63 ± 0.05
Striatum	EtOH	5.96 ± 0.71	4.78 ± 1.23	0.78 ± 0.13
	Saline	6.64 ± 0.57	3.28 ± 0.21	0.55 ± 0.08
	Silver-2 25(+al-m)	6.66 ± 0.62	4.78 ± 0.81	0.76 ± 0.14
	Silver-2 50(+al-m)	7.47 ± 0.86	2.51 ± 0.11	0.35 ± 0.03



Mice were administered silver-2 (25, 50 mg/kg, p.o.) for seven consecutive days and ethanol was injected 30 min after last treatment of drugs in individual animal groups. The control animals were given 5% Tween without drug for seven consecutive days and treated with EtOH. mice were sacrificed on microwave applicator after 1 h after administration of EtOH. Saline group was administered with saline without any further treatments. Values represent the mean±S.E.M. of 3-12 mice in ug/g tissue. \*\*\* p<0.01, \*\* p<0.05 and \* p<0.1 when compared with control (EtOH).

한편, 도파민류들의 변화량은 다음표와 그림과 같다. 도파민류들은 다른 신경 전달물질들과는 달리 주로 선조체에 많이 존재하는 것으로 보여진다. 따라서 선조체의 도파민 함량이 줄어들거나 흑질로부터 도파민의 전사가 되지 않는다면 파킨슨씨병이 나타나게 된다. 그림에서 보는 바와 같이 도파민의 함량은 알콜투여 후에 대조구보다 현저히 줄어들고 있음을 알 수 있다. 반면 복합제제 실버-2 처리구의 경우는 에탄올 처리구 보다 도파민 함량이 증가함을 알 수 있었다. 또한 도파민의 분해물질인 DOPAC(dp)의 함량은 에탄올 처리구의 경우 다른 처리구보다 상당히 낮음을 알 수 있었다. 이는 아마도 도파민의 대사가 에탄올 처리구에서는 서서히 진행될 것으로 판단된다. 결론적으로 실버-2는 도파민의 turnover를 빠르게 함으로서 도파민과 도파민 이외의 타신경전달물질과의 평형성을 유지시켜주는 것으로 사료된다.

Table 9. The neurotransmitter (dopamine and DOPAC) level in mouse brain after administration of Silver-2.

		da(dopamine)	dp(dopac)	dp/da
Cortex	EtOH	0.71 ± 0.19	0.08 ± 0.01	0.12 ± 0.01
	Saline	0.78 ± 0.08	0.19 ± 0.03	0.26 ± 0.04
	Silver-2 25(+al-m)	0.78 ± 0.09	0.22 ± 0.02	0.29 ± 0.03
	Silver-2 50(+al-m)	0.88 ± 0.22	0.23 ± 0.02	0.40 ± 0.08
Hippocampus	EtOH	0.41 ± 0.08	0.18 ± 0.03	0.43 ± 0.11
	Saline	0.15 ± 0.04	0.14 ± 0.03	1.27 ± 0.38
	Silver-2 25(+al-m)	0.25 ± 0.15	0.15 ± 0.04	1.59 ± 0.76
	Silver-2 50(+al-m)	0.10 ± 0.02	0.21 ± 0.02	2.52 ± 0.63
Striatum	EtOH	7.38 ± 0.13	0.42 ± 0.01	0.06 ± 0.00
	Saline	8.55 ± 0.48	0.86 ± 0.07	0.10 ± 0.01
	Silver-2 25(+al-m)	8.10 ± 0.52	0.73 ± 0.06	0.09 ± 0.00
	Silver-2 50(+al-m)	8.06 ± 0.42	0.70 ± 0.04	0.09 ± 0.00

세로토닌의 경우에는 에탄올만 처리한 경우 cortex에서 상당히 증가함을 알 수 있다. 복합제제 실버-2 처리구에서는 세로토닌의 농도를 상당히 줄여주는 것으로 나타나고 있다. 해마에서는 에탄올처리구에서 세로토닌의 양이 적고 선조체에서는 약간 증가함을 알 수 있었다. 반면 복합제제 실버-2 처리구

에서는 대조구와 같은 정도의 양만 존재하는 것으로 나타나고 있다. 또한 그 대사산물인 hiaa의 경우는 각 부분에서 거의 비슷한 양이 존재하는 것으로 나타나고 있는데 이는 아마도 세로토닌의 turnover는 외부 자극에 의 진행되는 것이 아니고 내적인 요인에 의해 일정량만이 turnover되는 것으로 보여진다. 따라서 세로토닌의 양은 주어진 조건하에서 증감이 결정되기 때문에 세로토닌으로 인한 질병들은 이들의 뇌내 농도를 조절함으로써 치료 가능할 것으로 예견된다. 복합제제 실버-2는 전두엽(cortex)과 선조체에서 에탄올에 의해 높아지는 세로토닌의 양을 낮춰주고 있으며, 해마에서는 낮아진 농도를 높혀주고 있어 우울증, 마약중독 및 알콜중독 등과 같이 세로토닌으로 인하여 나타나는 각종 질병에도 유효할 것으로 사료된다.

Table 10. The neurotransmitter (serotonin and HIAA) level in mouse brain after administration of Silver-2.

		hiao	ht(serotonin)	hiao/ht
Cortex	EtOH	0.23 ± 0.05	1.86 ± 0.04	0.55 ± 0.17
	Saline	0.19 ± 0.01	0.44 ± 0.07	0.10 ± 0.00
	Silver-2 25(+al-m)	0.28 ± 0.01	0.70 ± 0.04	0.41 ± 0.04
	Silver-2 50(+al-m)	0.28 ± 0.03	0.76 ± 0.04	0.38 ± 0.04
Hippocampus	EtOH	0.48 ± 0.04	0.60 ± 0.02	0.80 ± 0.05
	Saline	0.82 ± 0.05	1.01 ± 0.06	0.82 ± 0.06
	Silver-2 25(+al-m)	0.66 ± 0.03	1.00 ± 0.06	0.67 ± 0.06
	Silver-2 50(+al-m)	0.81 ± 0.10	0.93 ± 0.04	0.87 ± 0.07
Striatum	EtOH	0.37 ± 0.03	0.84 ± 0.07	0.44 ± 0.00
	Saline	0.36 ± 0.02	0.56 ± 0.02	0.65 ± 0.02
	Silver-2 25(+al-m)	0.32 ± 0.02	0.61 ± 0.02	0.53 ± 0.02
	Silver-2 50(+al-m)	0.36 ± 0.03	0.64 ± 0.03	0.57 ± 0.03

흥분성 신경전달물질인 글루타메이트는 에탄올처리구에서 뇌내 각 부분의 농도가 대조구보다 현저히 줄어들음을 알 수 있다. 반면 복합제제 AL-019의 처리구에서는 두농도 모두에서 같은 정도로 대조구와 같은 농도를 유지하고 있음을 보여주었다. 반면 글루타메이트의 대사물질인 GABA의 농도는 대부분 비슷하게 유지되고 있음을 볼 수 있다. 그러나 에탄올처리구에서는 적은양의

글루타메이트를 비교적 빠르게 turnover시키는 반면 대조구와 복합제제 실버-2 처리구에서는 지극히 정상적으로 turnover를 시키고 있다.

따라서 복합제제 실버-2는 글루타메이트대사계를 조절함으로써 억제성 신경전달물질인 GABA로 인해 나타나는 안정, 진정, 혼수, 마취 및 NMDA-glutamate가 억제되어 기억능력과 학습능력이 저하되고 필름이 끊긴다고 하는 black-out이 생기는 현상 그리고 글루타메이트가 너무 많이 방출되어 신경계가 과다 흥분되는 것 등을 적절히 조절할 수 있을 것으로 사료된다.

Table 11. The neurotransmitter (Glutamate and GABA) level in mouse brain after administration of Silver-2.

		Glu (glutamate)	GA(GABA)	GA/Glu
Cortex	EtOH	1.46 ± 0.09	0.20 ± 0.06	0.14 ± 0.03
	Saline	2.23 ± 0.09	0.15 ± 0.01	0.07 ± 0.00
	Silver-2 25(+al-m)	2.14 ± 0.05	0.16 ± 0.01	0.08 ± 0.01
	Silver-2 50(+al-m)	1.97 ± 0.13	0.15 ± 0.01	0.08 ± 0.00
Hippocampus	EtOH	1.31 ± 0.13	0.18 ± 0.02	0.14 ± 0.01
	Saline	2.04 ± 0.02	0.16 ± 0.01	0.08 ± 0.00
	Silver-2 25(+al-m)	1.99 ± 0.06	0.15 ± 0.01	0.07 ± 0.00
	Silver-2 50(+al-m)	2.07 ± 0.08	0.17 ± 0.01	0.08 ± 0.00
Striatum	EtOH	1.28 ± 0.01	0.23 ± 0.02	0.18 ± 0.01
	Saline	1.73 ± 0.11	0.21 ± 0.01	0.11 ± 0.00
	Silver-2 25(+al-m)	1.89 ± 0.06	0.19 ± 0.01	0.10 ± 0.01
	Silver-2 50(+al-m)	1.87 ± 0.05	0.23 ± 0.00	0.12 ± 0.00

### 제 3 절 기능성소재를 활용한 기능성 한과시제품의 조제

#### 1. 개 요

복합제제 실버-1 및 실버-2를 첨가한 인지기능 개선용 기능성 한과 시제품을 제조하기 위하여 찹쌀의 침지에서부터 최종 한과제품을 얻기까지의 전과정에 걸쳐 각 공정별로 기능성 소재 실버-2의 첨가적용가능성을 연구 검토하여 최적의 제조공정 및 조건을 확립하였다. 한과를 제조하는 일반공정은 현재 합천전통한과에서 시행하고 있는 제조단계 및 공정에 준하였으며 (ISO-9000 품질시스템 인증) 기능성 소재를 첨가하는 과정을 각 단계공정별로 적용하여 시행하여 보았다.

이를 위하여 우선 찹쌀의 침지에서부터 최종한과제품을 얻기까지의 전과정에 대하여 각 공정별로 기능성 소재 실버-2의 적용가능성을 연구, 검토하였다. 즉 한과의 바탕을 조제하는 일련의 공정 즉 찹쌀의 침지 및 분쇄 → 반죽 및 증자 → 파리치기(치대기) → 반데기의 제조 → 팽화등의 각각의 단계에 대하여 실버-2를 농도별로 첨가하여 보았다. 그 결과 침지과정에서의 소재를 첨가한 경우에 있어서는 찹쌀의 숙성 등 충분한 부풀림 현상이 관찰되지 않는 등 침지로 인한 찹쌀자체의 이화학적 변환이 불완전하여 실제적으로 다음 공정인 분쇄 및 반죽과정으로의 진행이 불가능하였으며, 반죽단계 및 파리치기 단계에서 소재첨가의 경우에 있어서는 유탕처리 시 불완전 팽화제품이 다수 나타나는 등 제품의 품질면에서도 uniformity가 극히 불량하였다. 또, 이 경우에는 최종 제품에서의 기능성 효능에 대한 소실이 예견되었다. 결론적으로 한과의 바탕을 조제하는 전과정 즉 찹쌀의 침지 및 분쇄 → 반죽 및 증자 → 파리치기(치대기) → 반데기의 제조 → 팽화의 단계 중 어느 단계가 소재첨가를 하기에 가장 적합한 단계인가에 대한 연구 결과 어떠한 단계에서 소재첨가를 실시하여도 만족할 만한 제품생산이 이루어지지 못하였으며 따라서 한과의 바탕을 조제하는 모든 단계가 소재첨가의 시기로는 부적합하다는 결론을 얻을 수 있었다. 따라서 최종적으로 기존의 한과바탕 제조공정에 따라 제조된 한과바탕에 시럽을 도포하는 단계가 소재첨가의 가장 적합한 단계라는 결론을 얻을 수 있었다.

최종적으로 도출된 최상의 시제품의 제조공정을 요약하면 다음과 같으며 생산된 시제품에 대하여서는 별도의 관능적 특징을 조사하여 최적의 기능성 소재 첨가 농도를 선별하였다.

잡쌀을 약 두 배량(중량비)의 물에 담근 채로 약 2주간 상온(常溫), 상습(常濕) 조건에서 침지하고 물기를 제거한 다음 roller mill로 2회 습식분쇄 하였다. 그런 다음 수분함량이 50% 정도가 되도록 반죽하여 100℃ 수증기로 30분간 증자하였다. 증자한 반죽을 250 rpm으로 5분간 파리치기를 실시한 후, 두께가  $3 \pm 0.5$  mm가 되도록 성형한 다음 60~65℃에서 2시간동안 1차 건조하였다. 건조가 끝난 성형물은 20 mm × 40 mm × 5 mm (길이× 폭 × 두께)로 절단한 다음 수분함량이 15~20 %가 되도록 62~65℃ 열풍건조기에서 2시간동안 2차 건조하였다. 건조가 끝난 성형물(반데기)은 PE film bag에 넣어 일주일 동안 숙성시켰다. 그런 다음 100 ± 5 ℃에서 10~15 초간 1차 튀김을 실시하고 165 ± 5 ℃에서 10~15초간 2차 튀김한 후 탈유하여 유과바탕을 제조하였다. 이 유과바탕을 실시예 1에서 제조된 아워 추출물 또는 아워 혼합 추출물인 실버-2가 1 - 10%로 첨가된 물엿 (1.1 - 11.2 중량 %)에 약 30초 내지 1분간 침지시키고, 코팅된 한과에 백미 튀밥으로 옷을 입힌 (착의) 후 자연 건조시켜 시제품을 완성하였다.

## 2. 기능성한과 제조를 위한 한과바탕 (유과 base) 의 조제

우리나라의 대표적인 전통식품 가운데 한과는 큰 잔치나 제사, 계절에 따라 즐기는 계절식 등 특별한 행사에 사용되었으며, 그 중에서 대표적인 것이 유과이다. 유과를 비롯한 한과류를 언제부터 만들기 시작하였는지 확실하게 언급할 수 없으나 삼국시대부터 이미 만들어지기 시작하였을 것으로 추측되고 있다.

‘유과’라는 명칭은 조선시대 요리서인 도문대작에 유밀과류로 기록되었으며, 그 후 음식디미방, 규합총서(閨閣叢書), 규곤시의방(閨.是議方)등 고문헌에 강정이란 이름으로 소개되어 있다. 오늘날에는 강정, 산자 또는 유과로 혼용되고 있

는 실정이다.

유과의 제조방법에 관해서는 도문대작, 규곤시의방, 규합총서, 열양세시기, 아언각비, 동국세시기와 같은 고문헌에 기록되어 있다. 즉, '규곤시의방'에 의하면 먼저 찹쌀가루를 술과 콩물에 반죽하여 파리가 일도록 치대어 밀은 후 말려서 기름에지져 부풀게 한다. 그런 다음, 꿀물을 바르고 흰깨, 물들인 쌀튀김, 승검초가루 등의 고물을 묻힌다고 기록되어 있다. 또한 '아언각비'에서는 진한 술을 찹쌀가루에 타서 반죽하여 떡을 만들고 가늘게 썰어 말린 후 기름에 튀우면 둥글고 크게 일어난다고 하였다.

현재 생산되고 있는 유과 또한 기본적으로 전통적인 유과의 제조방법을 따르고 있으며, 대량생산보다는 가내수공업적인 형태로 생산되고 있는 실정이다. 유과제조를 위해 공통적으로 요구되는 공정은 주원료인 찹쌀의 침지 및 분쇄 → 반죽 및 증자 → 파리치기(치대기) → 반데기의 제조 → 팽화 → 엿물 및 고물 묻히기 (착의) 등이며 생산자 또는 지역에 따라 약간의 차이가 있다.

이 과정을 단계별로 요약하면 우선 침지한 찹쌀을 분쇄하여 증자한 반죽물을 파리치기 공정을 통해 기포가 형성된 펠릿형태의 반데기를 제조한다. 이렇게 제조한 반데기는 수분함량이 15~20 % 전후가 되도록 건조하며 표면건조가 일어나지 않도록 비닐봉투에 넣어 7~8시간 정도 방치한다. 적정 수분함량으로 유지된 반데기는 여러 가지 팽화매체를 이용하여 팽화시키는데 유탕팽화의 경우, 2회에 걸쳐 튀기며 일반적으로 1차 튀김온도는 110~120℃, 2차 튀김온도는 170~180℃가 적정인 것으로 알려져있다. 또, 유과의 각 제조공정은 최종적으로 생산된 유과의 품질에 많은 영향을 미치는 것으로 알려져 있는데, 특히 찹쌀의 침지시간 및 조건에 의한 영향이 큰 것으로 보고 되고 있으며 우리나라에서는 여러 연구진에 의하여 침지시간에 따른 유과제품의 팽화도 및 제품의 기호도의 변화 등을 체계적으로 연구하고 있는 실정이다.

본 연구를 통하여 조제된 기능성한과의 시제품에 사용된 유과 바탕의 제조는 일반 업체에서 사용되는 방법을 준용하여 합천전통한과의 제조시설을 이용하여 제조하였다 (Fig. 1). 현재 합천전통한과에서 출시되고 있는 한과제품의 일반적 제조공정 (ISO-9000 품질시스템 인증)을 요약하면 다음과 같다. 시제품조제에 사용된 찹쌀은 경남 합천지역에서 2004년에 시험생산된 찹쌀로 10분

도로 도정한 것을 4℃ 저온저장고에 보관하면서 사용하였다. 유과바탕의 제조를 위해 사용한 튀김용 기름은 시판 채종유 (제일제당)를 사용하였다.

잡쌀을 약 두 배량(중량비)의 물에 담근 채로 약 1 주간 상온(常溫), 상습(常濕) 조건에서 침지하고 물기를 제거한 다음 roller mill(경창기계, 한국)로 2회 습식분쇄 하였다. 그런 다음 수분함량이 50% 정도가 되도록 반죽하여 100℃ 수증기로 30분간 증자하였다. 증자한 반죽을 250 rpm으로 5분간 파리치기를 실시한 후, 두께가  $5 \pm 0.5$  mm가 되도록 성형한 다음 60 ~ 65℃에서 2시간 동안 1차 건조하였다. 건조가 끝난 성형물은 20 mm × 40 mm × 5 mm (길이 × 폭 × 두께)로 절단한 다음 수분함량이 15 ~ 20 %가 되도록 62 ~ 65℃ 열풍건조기에서 2시간동안 2차 건조하였다. 건조가 끝난 성형물(반테기)은 PE film bag에 넣어 일주일 동안 숙성시켰다. 그런 다음 100 ± 5 ℃에서 10~15초간 1차 튀김을 실시하고 165 ± 5℃에서 10~15초간 2차 튀김한 후 탈유하여 유과바탕을 제조하였으며 이를 간략히 도식화하면 Fig. 1 과 같다.

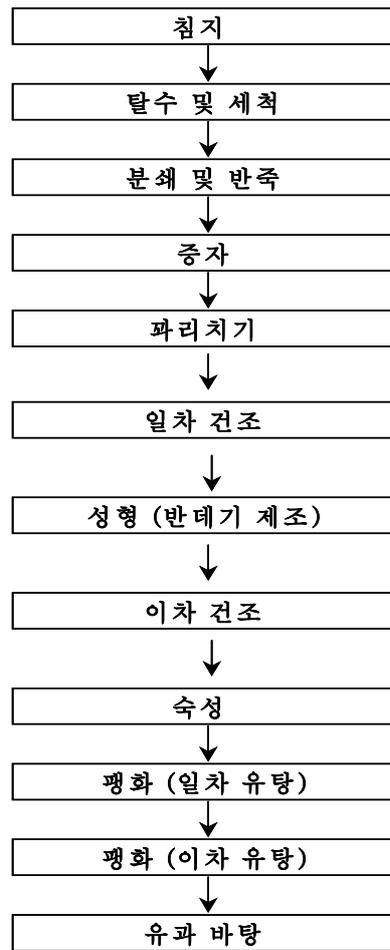


Fig. 1. 전통한과 바탕의 제조공정 모식도

### 3. 한과 바탕 조제시 공정단계별 기능성소재 적용사례에 관한 연구

제 2절에서 서술한 바와 같이 동물실험 (수동회피실험)을 통한 인지기능 개선 효능의 검색 결과를 토대로하여 노인성치매 및 기억력 감퇴 등 각종 인지기능 퇴행 등을 특징으로 하는 퇴행성 뇌질환에 광범위하게 적용가능하리라 예측되는 우수한 인지기능 개선효능(기능성)을 보여주는 아위 등 10여종의 식물들을 일정 비율로 혼합하고 열수 추출한 복합제제 (기능성 소재, 실버-2)를 한과에 첨가적용하는 최적의 공정단계를 검토하였다. 즉 기능성 소재의 첨가가 가장 용이하고 적절한 제조공정을 알아보고자 한과 제조과정을 기존에 연구된 문헌들을 참조하여 공정별로 나누어 보았다. 한과 제조과정은 크게 찹쌀을 원료로 하여 침지, 분쇄, 성형, 팽화 등 일련의 가공조작을 거쳐 한과의 바탕을 제조하는 과정과 한과 바탕에 엿물 및 고물등을 입혀 최종 제품을 완성하는 착의 (着衣)과정으로 대별할 수 있다.

본 연구에서는 우선 기능성소재의 첨가시기를 한과의 바탕을 조제하는 각 단계 즉 찹쌀의 침지 및 분쇄 → 반죽 및 증자 → 파리치기(치대기) → 반데기(성형)의 제조 → 팽화 → 착의 (엿물 및 고물 묻히기) 단계에 걸쳐 단계별로 적용하여 제품의 완성도를 관찰하였으며 아울러 제조된 한과바탕에 엿물 및 고물등을 입혀 최종 제품을 완성하는 착의 (着衣)과정에서의 첨가방법 등을 검토하여 보았다.

#### 가. 찹쌀의 침지(steeeping) 공정시 적용 실시예

우선 침지시에 실버-2 추출물을 적당 농도비로 함유되도록 침지수에 첨가하고 이후 통상적인 유과제조 공정을 통하여 유과를 제조 하였을 때 유과제품에 미치는 영향을 관찰하고자 하였다.

침지(steeeping) 과정은 amylopectin 함량이 많은 찹쌀을 정미하여 수세한 후 물에 담그는 공정이다. 유과제품의 우수한 조직 및 미세한 구조를 얻기 위하여는 장시간의 수침이 요구되어진다고 하였다. 수침공정은 유과제조에 있어 많은 의미가 있는 공정이다. 수침은 호화를 위한 흡수 유도 조작을 위한 공정이며, 수침중의 pH 및 산도변화를 유도한다. 찹쌀을 2시간 수침시킨 액의 pH는 6.61인 반면 수침기간이 길어질수록 낮아져 수침 30일 후의 pH는 3.71까지 감소한다고 한다. 1일에서 3일 사이에 pH감소가 현저하게 나타난다고 한다. 수침 중엔 성분의 변화도 유도된다. 유기산을 생성시키고, 금속이온( $Ca^{++}$ ,  $Mg^{++}$  와 같은 양이온의 용출)을 유출시킨다. 이와 같이 수침중에 유기산의 증가에도 불구하고 최고 점도를 나타낸 것은 산도 증가에 의한 직접적인 점도저하 효과보다  $Ca^{++}$ ,  $Mg^{++}$  과 같은 양이온의 용출이 점도증가에 보다 큰 영향을 준다. 수침과정은 찹쌀의 주성분인 amylopectin의 물리화학적 성질에도 영향을 미친다. 수침중  $\alpha$ -amylase 효소의 활성이 증가되어 amylopectin의 함량에 영향을 주어 전분을 환원당으로 변화시키고, 다음 단계에서 미생물의 작용에 의해 발효와 유사한 과정을 거치게 한다. 전통적인 유과의 제조과정중 찹쌀의 침지는 계절에 따라 차이가 있는데 여름철에는 일주일정도, 겨울철에는 10일에서 14일정도 침지를 하였다고 한다. 수침기간이 경과함에 따라 팽화도는 증가하는 것으로 나타나, 찹쌀을 2시간 수침 시킨 유과의 팽화도는 4.97ml/ml 이었으며 15일 수침시킨 후 제조된 유과의 팽화도는 12.46ml/ml로 증가되었다고 하였다. 또한 35℃로 3일 수침한 유과의 팽화도는 20℃에서 10일 수침한 유과와 유사한 결과를 보여서 수침온도는 수침기간을 단축시킬 수 있는 요인으로 작용한다고 하였다.

통상적으로 합천전통한과에서는 한과 제조시 첫단계로 침지(steeeping) 과정, 즉 찹쌀 100 g을 250 ml의 물에 담근 채로 1 주간 상온(常溫), 상습(常濕) 조건에서 침지하는 과정을 거치고 있다. 실버-2 추출물을 각각 1 %, 5 %, 10 %의 농도비로 함유되도록 침지수에 첨가하고 1 주간을 경과한 후 상태를 비교

검토하였다.

그 결과 실버-2 추출물을 함유하지 아니한 경우에 비추어 실버-2 추출물을 각각 1 %, 5 %, 10 %의 농도비로 함유되도록 침지수에 첨가하여 준 모든 경우에 있어서는 실버-2 추출물을 함유하지 아니한 경우에 관찰되는 찹쌀의 상태가 문들어 지거나 혹은 선내가 날 정도로 숙성 상태가 전혀 관찰되지 못하였다. 이는 찹쌀의 침지과정이 단순한 불순물의 제거나 수분을 흡수하는 목적 이외에 생물학적, 이화학적 작용에 의한 찹쌀의 변화를 유도하는 과정임을 시사한다. 또, 이는 침지과정 중에 일반적으로 발생하는 유기산의 증가,  $\alpha$ -amylase 효소의 활성증가,  $Ca^{++}$ ,  $Mg^{++}$  과 같은 양이온의 용출 등의 이화학적변화에 직접적으로 영향을 주는 효모 등 각종 미생물들의 발육 및 증식이 첨가된 실버-2 추출물에 의하여 원천적으로 차단된 결과라고 사료되며 결과적으로 실버-2 추출물을 찹쌀의 침지 (steeping) 공정시에 첨가하는 방안은 바람직하지 못하다는 결론을 얻을 수 있었다.

#### 나. 반죽 (mixing) 공정시 적용 실시예

분쇄공정은 일정기간 수침된 찹쌀을 분쇄해서 입자사이에 공기를 포함시키고 호화가 빠르고 균일하게 잘 일어나도록 하기 위한 조작공정이다. 재래식 공정에서 roller 분쇄기를 이용하여 찹쌀가루를 분쇄한 후 60 mesh, 80 mesh, 100 mesh의 체를 이용하여 입자에 공기를 분포함과 동시에 입자를 고르게 한다고 하였다. 최근 국내의 연구에 따르면 초미세로 분쇄한 찹쌀 분말을 공기분급 휠 속도(ACWS, air classifying wheel speed) 20,000 rpm과 15,000 rpm으로 공기분급 하였을 경우 ACWS의 증가에 따라 입자의 크기는 감소하였으며, 성분조성 중 단백질, 지방, 회분은 증가한 반면 전분질은 감소하였다고 한다. 15,000~20,000 rpm분획과 15,000 rpm 이하의 분획으로 제조한 유과는 전통적인 방법으로 제조한 유과와 팽화율, 경도, 기포수 등의 품질요인에서 유의 차가 없었으며

관능검사 결과도 동일하게 나타났다고 하였으며 본 연구과정에서는 통상적인 방법에 따라 물기를 제거한 다음 roller mill (경창기계, 한국)을 사용하여 15,000 rpm으로 2회 습식분쇄 하였다. 반죽공정은 수침한 찹쌀을 분쇄하여 보관한 찹쌀가루에 부원료를 첨가하여 균일하게 섞어 호화에 적당한 수분을 지니게 하는 공정이다. 전통유과 제조에서 유과제조에 알맞은 반죽물의 수분함량을 50 % 전후로 하면 증자 하였을 때 파리치기 되는 것과 성형상태 또한 건조한 후의 반데기의 상태가 양호하다고 하였다. 전통적인 유과제조방법 조사에서 반죽물의 첨가물로 사용되는 것은 물, 술, 대두즙, baking powder, 설탕, 효모 등을 사용하였으며 술에는 alcohol함량이 적은 대신 yeast가 첨가된 약주, 탁주, 청주를 사용하거나 alcohol의 함량이 많은 소주를 사용한다고 한다. 콩물 첨가가 팽화도 상승에 큰 요인으로 작용하였고 삶은 콩을 첨가했을 때 팽화도는 7.47ml/ml로 낮게 나타나 유의적인 차이를 보여( $P < 0.001$ ), 대두에 들어있는  $\alpha$ -amylase 가 반죽의 성분 변화와 제품의 품질에 영향을 미치므로 생대두즙이 좋다는 연구결과를 얻었다. 문헌에 의하면 평균적으로 부원료의 배합 비율은 찹쌀을 100%로 하였을 때 술류는 5~20%, 대두는 5~10%, 설탕은 5~8%, baking powder는 3%, 물은 3~5%, yeast는 5%, 소금은 0.5% 정도로 한다고 한다.

한편 본 연구에서는 통상적인 한과 제조 시 적용한 공정과 동일하게 즉 1 주간 상온(常溫), 상습(常濕) 조건에서 침지하는 과정을 마친 찹쌀의 물기를 제거한 다음 roller mill (경창기계, 한국)로 2회 습식분쇄 하였다. 다음 수분함량이 50 % 정도의 상태에서 대두는 5 %, 설탕은 5 %, baking powder는 3 %, yeast 5 %, 소금은 0.5 %를 섞어 반죽하였으며 이 반죽물에 실버-2 추출물을 각각 1 %, 5 %, 10 %의 농도비로 함유되도록 첨가한 후 증자 및 반데기조제 등 다음 공정을 순차적으로 진행하였다. 증자(찌기)공정은 적당한 수분수준으로 반죽을 완료한 후 증기로 가열하여 전분을 균일하게 호화 시키는 공정으로 가열초기에는 어느 온도까지 각종 미생물과 효소의 작용이 일어날 것이며, 후기에는 살균 및 효소의 불활성화가 일어나는 공정이다. 쌀 전분의 호화개시 온도는 64.5 ~ 67°C로써 찹쌀과 멍쌀에서 큰 차이를 보이지는 않지만 점도의 경우 찹쌀이 멍쌀보다 모두 높은 경향을 보이며 이는 amylopectin함량이 높기 때문이라고 한다. 찹쌀가루는 그 특성이 멍쌀과 달라 증자할 때 대량을 한번에 증자하면 표면만 호화가 일어

나고 내부는 표면의 호화된 찹쌀가루에 증기가 투과하기 어려워 호화가 일어나지 않는다. 본 연구에서는 가압형 증자기를 이용하여 15~30분 동안 찌기를 실시하였다.

#### 다. 파리치기 (punching and sheeting) 공정시 적용 실시예

파리치기(교반)공정은 호화된 미립의 조직을 파괴하여 공기를 지닐 수 있는 막을 형성시키면서 포집된 공기를 세분하는 물리적 공정으로 공기가 호화된 찹쌀 전분 내에서 colloid구조 형성의 초기적 단계로 팽화에 중요한 공정이다. 이 공정은 유과의 제조공정 중 가장 중요한 공정중의 하나이며, 전통적인 방법은 증자된 반죽물을 절구질하거나 또는 짓는 방법으로 파리치기를 하였다. 이와 같은 방법은 균일하게 공기혼입을 하는데 많은 시간과 노동력이 필요하고, 성형을 수작업 하는데 있어서 반데기 자체가 유동성이 있어서 무척 어렵다. 파리치기는 유과 제조시 texture (질감)에 큰 영향을 주는 공정이므로 기호도에 따라 파리치기를 많이 하여 조직이 치밀하고 더욱더 균일하여 부드럽길 바라면 많이 치면 질수록 좋고, 조금은 덜 부드러워도 아삭하고 씹히는 맛을 즐기는 기호도는 적게 치면 되는 공정이다. 하지만, 제품 품질의 우수성 면에서는 많이 치면 질수록 좋다고 본다.

본 연구에서는 통상적인 한과 제조시 적용한 공정과 동일하게 250 rpm으로 5분간 교반처리하여 파리치기를 실시하였으며 이때 실버-2 추출물을 반죽물의 중량대비 1%, 5%, 10%의 농도비로 첨가한 후 반데기를 제조하였으며 제조된 반데기는 순차적으로 팽화공정을 진행하였다.

## 라. 반데기 제조 및 건조

반데기는 제품의 모양과 크기를 정하고 건조 및 튀김시 편리하도록 일정하게 펠릿 형태로 절단하는 공정을 통하여 만든 것이다. 전통적인 성형 방법은 전분을 깐 널빤지에 놓고 밀대를 이용하여 적당한 두께로 편 다음 필요에 따라 길이와 폭을 정하여 잘랐다. 일반적인 유과의 크기는 30mm(가로)×50mm(세로)×5mm(두께)이다. 증자한 찹쌀가루는 멥쌀이나 다른 곡류에 비하여 amylopectin의 함량이 높기 때문에 점도가 매우 높고 유연성(flexibility)이 좋기 때문에 성형시 칼날에 달라 붙거나 밀대에 달라붙는 경향이 높고, 증자후의 수분함량도 50%정도이기 때문에 유동성이 있어 변형이 잘 일어난다. 두께와 크기는 건조공정 튀김공정에 영향을 주는데 특히 두께가 영향을 크게 주므로 너무 두껍거나 얇지 않도록 해야 한다.

건조공정은 일정한 두께로 만든 후 적절한 건조조작을 가하여 반데기가 일정한 수분 수준으로 되게 하는 공정이다. 건조 속도는 반데기의 두께, 건조시간, 건조온도, 공기중의 습도 등에 의해서 영향을 받는다고 한다. 전통적인 방법으로는 “뜨거운 방에서 바삭 말린 후 술에 축인 다음 보자기에 덮어 채우고 반쯤 말리기”, “95℃에서 바람이 닿지 않게 건조하여 겉은 바삭 마르고 속은 약간 무른 정도로 건조한다”, “따뜻한 곳에서”, “rack에서 30℃로 속까지 완전히”, “뜨거운 방에 종이를 깔고 늘어놓아 자주 뒤집어서 속까지 말린다.”라고 하였다. 한 국내의 연구진에 의한 연구결과에 따르면 oven의 온도를 45℃에서 5분간, 온도를 23℃로 내리고 15분간 건조시키고 시료를 뒤집은 후 다시 45℃에서 5분부터 시작하여 이 과정을 반복하면서 5시간 건조시킨 유과가 관능검사 및 재질검사에 의하여 측정된 결과가 우수하다고 하였다. 반데기의 건조에서 열풍건조기를 이용하였는데 갑작스런 표면 건조로 인하여 반데기가 뒤틀릴 수 있으며, 오랜 시간 동안 침지하여 얻어진 유과 고유의 맛과 향기가 감소될 우려가 있다고 하였다. 그래서, 냉풍건조기를 이용하였는데, 냉풍건조기의 원리는 낮은 온도(15~20℃)

에서 증발되는 습기를 fan(ventilator)을 이용하여 빨아내어 반데기를 건조시킨다고 하였다. 그렇기 때문에 냉풍건조기를 이용해서 낮은 온도로 건조하는게 유과제품에 가장 우수한 방법이라고 하였다. 또한 건조 시킨 후에 표면건조가 일어나지 않도록 plastic bag에 넣어 7~8시간 정도 방치 후에 튀긴다고 하였다. 건조한 반데기의 수분함량은 20%를 전후 할 때가 가장 좋다고 하고, 몇몇 자료에서는 15%가 가장 적당하다고 하였다. 건조과정은 무엇보다도 적당한 수분을 반데기 전체가 고르게 분포할 수 있도록 건조하는게 무엇보다도 중요하다고 할 수 있다.

#### 마. 팽화 (튀김, frying) 공정

팽화공정은 적당한 수분 수준 상태의 반데기를 기름을 가열 매체로 해서 호화, 포집된 공기의 팽창, 건조, amylopectin의 고화(solidification)를 일으켜 다공성을 갖게 하며 기름의 침투, 호정화, 향미 생성 등이 진행되어 여러가지 물리화학적 변화가 단시간내에 일어나는 공정이다. 한 국내의 연구진에 의한 연구결과에 따르면 14℃의 기름에 1분간 담그고 건져서 120℃의 기름에 2분간 담그어 팽화 시키고, 190℃의 기름에서 2분간 튀긴 유과가 수용력이 가장 높고 우수한 제품이 된다고 하였다. 전통적인 공정에서는 1차 튀김에서의 낮은 온도는 110~120℃정도가 좋으며 이때 튀김 전 반데기의 1.5 ~ 2배 정도 팽창하게 되며, 170~180℃ 정도의 온도에서 2차 튀김을 하여 최대한으로 팽창된 유과를 얻을 수 있다고 하였다. 유과제품은 2번의 튀김과정을 거치는데 1차 튀김에서 2차 튀김으로 반데기를 옮길 때 옮기는 시간이 길어지면 예비 튀김에서 팽창되었던 반데기가 다시 움츠러지며 2차 튀김에서 튀겼을 경우 팽창되는 정도가 감소 될뿐만 아니라 제품의 모양이 일그러지게 된다고 하였다. 그래서 튀김공정을 자동화하는 여러 장치들이 고안되었으며 그 원리는 전기 heater로 가열될 수 있는 기름탱

크를 만들어 1차 튀김과 2차 튀김에서의 온도를 달리하기 위해 탱크의 중간부분을 막고 양쪽 튀김조에 각각 자동온도 제어장치를 부착하였다고 한다. 1차 튀김조와 2차 튀김조에서 반데기를 기름 속으로 운반할 수 있는 철망은 벨트로 하는 chain식 conveyer system으로 연결되어 있고, 1차 튀김 과정에서는 반데기가 부유하게 되므로 이를 막기 위하여 stainless steel로 된 반데기를 끌고 기름 속으로 들어가면서 완전히 튀김이 이루어지는 원리라고 한다. 튀김공정에서 가장 중요한 것은 무엇보다도 기름의 산패로 인한 저장기간 단축을 극복할 수 있는 개선점과, 유지 특유의 향과 맛을 유지할 수 있는 방법이 무엇보다도 시급한 문제이다.

#### 4. 한과 바탕에 집청 착의 공정시 기능성소재의 첨가 연구

##### 가. 집청 및 착의 공정

한과의 바탕에 시럽 등 엷물을 입히는 이유는 유과가 다공성이고, 더구나 튀김시 기름이 침투되어 유지함량이 증가(약30%전후)되기 때문에 공기의 접촉에 의한 유지 산화가 심하게 일어나게 되므로 표면에 엷을 고르게 바르면 엷막이 감미를 줄뿐만 아니라 산화에 관여하는 산소를 차단하는 먹을 수 있는 포장역할을 하게 하는 것이다. 한 국내의 연구진에 의한 최근 연구결과에 따르면 유과의 경우 장기간 보존해야 할 식품이므로 수분함량이 높은 시럽은 유과의 brittleness (바삭바삭함)에 좋지 못한 영향을 주므로 시럽은 시판용 물엷에 당도를 높이기 위하여 설탕을 일정량 넣은 것이 점도가 254.4 centi-strokes로서 당도가 70인 일반시럽의 점도 18.8centi-strokes에 비하여 매우 높은 값으로 점성이 상당히 컸으며 당도는 83.2, 비중은 상온에서 1.4 이었다고 한다. 고물은 외관을 다양하게 하는 방법도 되지만 취급시 또는 그릇에 담을때 제거된 엷층이 서로 들러과 붙거나 엉키는 것을 방지해주는 역할을 한다. 고물은 깨, 콩, 튀밥을 주로 사용한다고 한다.

##### 나. 집청 공정시 기능성 소재 첨가연구

전 장에서는 기능성소재의 첨가시기를 한과의 바탕을 조제하는 각 단계 즉 찹쌀의 침지 및 분쇄 → 반죽 및 증자 → 파리치기(치대기) → 반테기(성형)의 제조 → 팽화 → 착의 (엷물 및 고물 묻히기) 단계에 걸쳐 각 단계별로 적용하여 제품의 완성도를 관찰하여본 연구내용을 다루었다. 본 chapter에서는 합천전통

한과의 제조시설을 이용하여 확립된 제조공정 (ISO-9000 품질시스템 인증)에 따라 제조된 한과 바탕에 엇물 및 고물등을 입혀 최종 제품을 완성하는 집청 및 착의 (着衣)과정에서의 기능성 소재 첨가 방법을 검토하여 보았다. 본 연구에 사용된 시럽은 합천전통한과에서 독자적으로 개발 고안한 원료를 배합한 시럽으로 점도가 225 centi-strokes, 당도는 80.2, 비중은 상온에서 1.25 이었다. 이 시럽에 기능성 소재 실버-2 추출물을 각각 1 %, 5 %, 10 %의 농도비 (1.1 - 11.2 중량 %)로 함유되도록 첨가하고 한과바탕을 약 30초 내지 1분간 침지시킨 후, 코팅된 한과에 백미 튀밥으로 옷을 입힌 (착의) 후 자연 건조시켜 시제품을 완성하였다. 시제품은 포장지(PE)에 밀봉하여 - 20℃에서 보관하였으며 각각의 시제품에 대하여 별도의 관능검사 및 기능성 소재의 함량을 감안하여 최적의 시제품을 도출하였다.

#### 다. 관능검사

관능검사에 참여한 패널은 관능검사 유경험자로 구성된 합천전통한과 직원 10명으로 구성하였다. 예비훈련을 통하여 시료의 검사특성을 개발하고 각 특성의 정의를 확립한 후 측정방법을 결정하였다. 패널요원을 특성의 개념과 강도에 대한 안정된 판단기준이 확립되어 측정능력의 재현성이 인정될 때까지 계속하여 훈련한 뒤 본 검사에 임하도록 하였다. 관능검사에 필요한 시료보관은 -20℃ 냉동고에서 보관하였으며 검사 개시 1시간 전에 상온에 노출시켰다. 시료의 label은 세자리의 숫자를 무작위로 조합하여 제시하였다. 관능검사에 사용된 용어와 관능검사용 sheet의 내용은 Table 12 및 Fig. 8과 같다. 즉, 관능검사 요원들은 100 점 선척도를 이용한 유과의 관능검사표에 각각 특성별로 느끼는 정도를 표시하도록 하였다.

소비자 기호도 검사는 합천전통한과 직원 30명을 대상으로 실시하였다. 기호

도의 평가시, 0점의 경우 매우 싫어함이며, 100 점의 경우 매우 좋아함의 100 점 척도를 사용하였다.

#### 라. 통계처리

모든 실험결과의 통계처리는 SAS 프로그램을 이용하였다. 데이터는 평균  $\pm$  표준편차로 나타내었으며, 분산분석(ANOVA test)에 의해 유의성이 인정되면 Duncan's multiple range test를 실시하여 분석하였다.

Table 12. 한과제품의 관능검사 항목

Sensory attribute	Definition
맛, 냄새 및 신선도	
한과맛 Original fresh Yukwa aroma	Degree of original fresh sour aroma of Yukwa
기름향 Oily aroma	Degree of fresh oily aroma
외관	
색 (Color uniformity)	Degree of color uniformity on the surface
표면처리 Surface roughness	Degree of unevenness on the surface
팽화도 Expansion	Degree of expansion of Yukwa
향 (풍미)	
Original Yukwa flavor	Degree of original Yukwa flavor
Oily flavor	Degree of oily flavor
재질감 (씹히는 맛)	
경도 (Hardness)	Force required to the first bite through
아삭아삭함 (Crispness)	Degree of something firm but easily broken with pleasing ear and fresh sense
접착감 (adhesiveness)	Force required to remove sample from molars
뒷맛 (Feelings in mouth after swallow)	Degree of residual feelings in the mouth after swallow

## 관능 검사 표

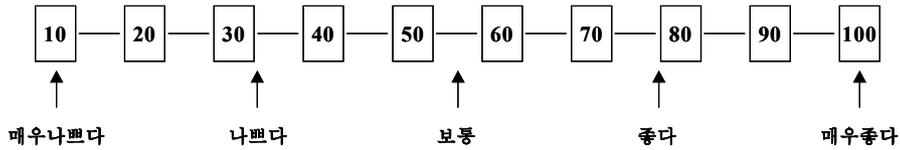
Sample No.:

Date:

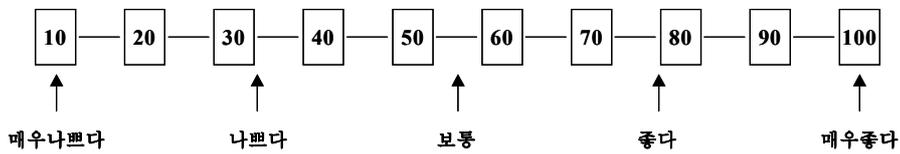
Name:

### I. Order (맛, 냄새 및 신전도)

1) 한과 고유맛 유지 정도 Original fresh Yukwa aroma (sour aroma)

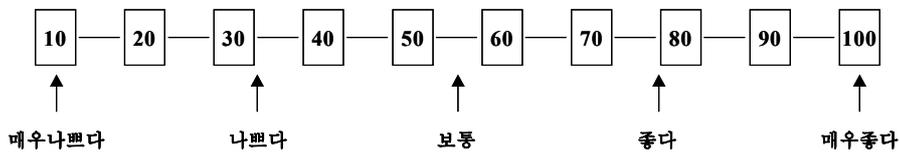


2) 기름향 Oily aroma

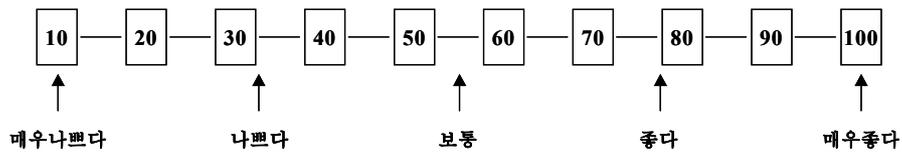


### II. Appearance (외관)

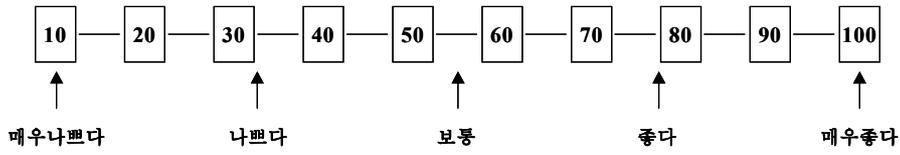
1) Color uniformity (색깔의 균일성)



2) Surface roughness (표면의 거친 정도)

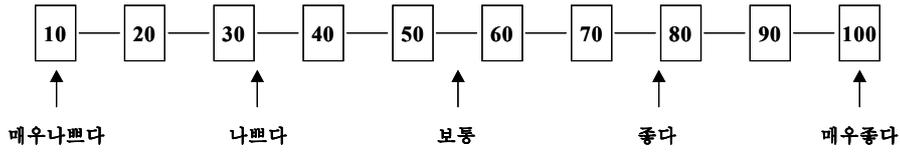


3) Expansion (팽화도)

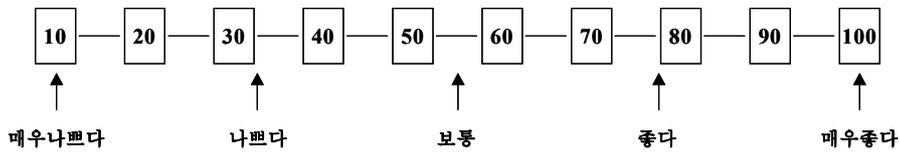


III. Flavor (향기 및 풍미)

1) Original Yukwa flavor (한과향)

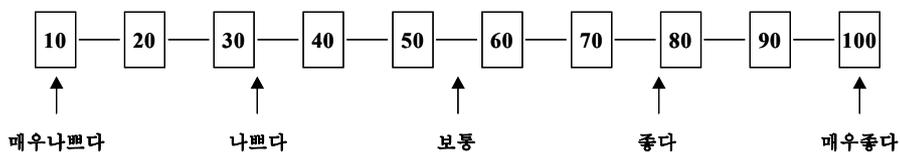


2) Oily flavor

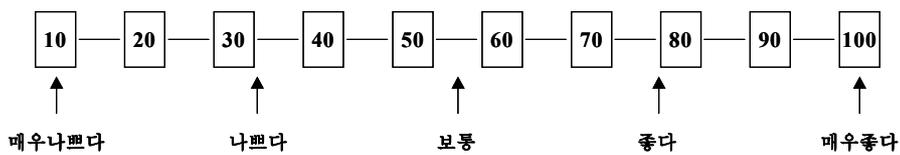


IV. Texture (재질감)

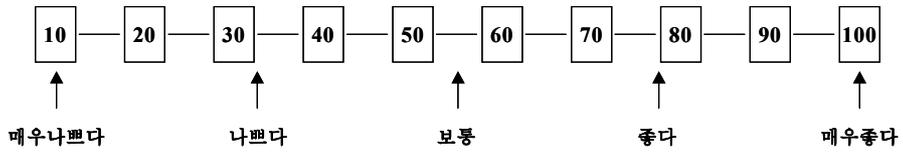
1) Hardness (딱딱한 정도)



2) Crispness (씹히는 맛, 아삭아삭한 정도)



3) Adhesiveness (점착도)



4) 뒷맛 (후취)

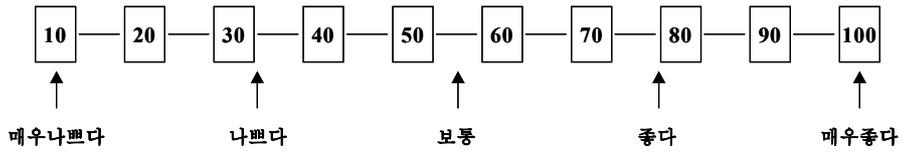


Fig 8. 관능검사 (기호도 조사)표

## 5. 연구결과 및 고찰

### 가. 한과 바탕 조제시 공정단계별 기능성소재 적용사례에 관한 연구

한과의 바탕을 조제하는 일련의 공정 즉 찹쌀의 침지 및 분쇄 → 반죽 및 증자 → 파리치기(치대기) → 반데기의 제조 → 팽화의 공정에 대하여 각각의 공정단계에서 기능성 소재 실버-2를 농도별로 첨가하여 보았다. 그 결과 침지과정에서의 소재를 첨가한 경우에 있어서는 찹쌀의 숙성 등 충분한 부풀림 현상이 관찰되지 않는 등 침지로 인한 찹쌀자체의 이화학적 병환이 불완전하여 실제로 다음 공정인 분쇄 및 반죽과정으로의 진행이 불가능하였으며, 반죽 단계 및 파리치기 단계에서 소재첨가의 경우에 있어서는 유탕처리 시 불완전 팽화제품이 다수 나타나는 등 제품의 재질면에서도 uniformity가 지극히 불량하였다. 또, 이 경우에는서는 최종 제품의 기능성 효능에 대한 소실이 예견되었다. 결론적으로 한과의 바탕을 조제하는 전과정 즉 찹쌀의 침지 및 분쇄 → 반죽 및 증자 → 파리치기(치대기) → 반데기의 제조 → 팽화의 단계 중 어느 단계가 소재첨가를 하기에 가장 적합한 단계인가에 대한 연구 결과 어떠한 단계에서 소재첨가를 실시하여도 만족할 만한 제품생산이 이루어지지 못하였으며 따라서 한과의 바탕을 조제하는 모든 단계가 소재첨가의 시기로는 부적합하다는 결론을 얻을 수 있었다.

#### 1) 찹쌀의 침지(steepling) 공정시 적용

한과 제조시 첫 단계에 해당하는 침지(steepling) 과정, 즉 찹쌀 100 g을 250

ml의 물에 담긴 채로 1 주간 상온(常溫), 상습(常濕) 조건에서 침지하는 과정을 거치고 있다. 실버-2 추출물을 각각 1 %, 5 %, 10 %의 농도비로 함유되도록 침지수에 첨가하고 1 주간을 경과한 후 상태를 비교 검토하였다.

그 결과 실버-2 추출물을 함유하지 아니한 경우에 비추어 실버-2 추출물을 각각 1 %, 5 %, 10 %의 농도비로 함유되도록 침지수에 첨가하여 준 모든 경우에 있어서는 실버-2 추출물을 함유하지 아니한 경우에 관찰되는 찹쌀의 상태가 문들어 지거나 혹은 선내가 날 정도로의 숙성 상태가 전혀 관찰되지 못하였다. 이는 찹쌀의 침지과정이 단순한 불순물의 제거나 수분을 흡수하는 목적 이외에 생물학적, 이화학적 작용에 의한 찹쌀의 변화를 유도하는 과정임을 시사한다. 또, 이는 침지과정 중에 일반적으로 발생하는 유기산의 증가,  $\alpha$ -amylase 효소의 활성증가,  $Ca^{++}$ ,  $Mg^{++}$  과 같은 양이온의 용출 등의 이화학적변화에 직접적으로 영향을 주는 효모 등 각종 미생물들의 발육 및 증식이 첨가된 실버-2 추출물에 의하여 원천적으로 차단된 결과라고 사료되며 결과적으로 실버-2 추출물을 찹쌀의 침지 (steeping) 공정시에 첨가하는 방안은 바람직하지 못하다는 결론을 얻을 수 있었다.

## 2) 반죽 (mixing) 공정 시 적용

기능성 소재의 첨가시기를 반죽 공정 시로 하였을 경우 제품의 품질상태를 알아보고자 통상적인 한과 제조 시 적용한 공정과 동일하게 즉 1 주간 상온(常溫), 상습(常濕) 조건에서 침지하는 과정을 마친 찹쌀의 물기를 제거한 다음 roller mill (경창기계, 한국)로 2회 습식분쇄 하였다. 다음 수분함량이 50 % 정도의 상태에서 대두 5 %, 설탕 5 %, baking powder 3 %, yeast 5 %, 소금은 0.5 %를 섞어 반죽하였으며 이 반죽물에 실버-2 추출물을 각각 1 %, 5 %, 10 %의 농도비로 함유되도록 첨가한 후 다음 제조공정에 해당하는 증자, 반데기조제, 팽

화 및 착의 등의 공정을 순차적으로 진행하여 최종한과 제품을 제조한 후 제품의 품질 상태를 관찰 조사하였다.

그 결과 반죽물에 기능성 소재 실버-2를 섞는 단계 및 증자 과정 등 후속 공정을 차례로 거치는 동안에는 첨가한 기능성 소재의 농도와 관계없이 모두 별다른 문제점이 발생하지 아니하였으나 파리치기 공정을 거친 후 반데기 제조과정 및 반데기를 팽화시키는 팽화과정에서는 최종제품의 품질에 큰 영향을 줄 수 있을 정도로 심각한 문제점등이 발생되었다. 즉 파리치기 공정 시에는 부풀음 현상(파리생성)이 현저한 저하되었으며, 팽화 공정시에는 전반적인 팽화율 불량 및 제품의 균질성 (uniformity)이 현저히 불량하였다. 특히 소재를 첨가하지 아니한 반죽물을 사용한 경우에서는 평균 팽화율이 10 -15 배로 나타난 반면 기능성 소재를 함유한 경우 특히 고농도 (5 %, 10 %)의 소재를 함유한 경우에는 팽화율이 2배 정도에도 못 미쳤으며 제품형태의 균일성도 40% 미만으로 관찰되었다.

### 3) 파리치기 (punching and sheeting) 공정 시 적용

기능성 소재의 첨가시기를 파리치기 공정시로 하였을 경우의 제품의 품질상태를 알아보려고 통상적인 한과 제조시 적용한 공정과 동일하게 250 rpm으로 5분간 교반처리하여 파리치기 공정을 실시하였다. 이때 실버-2 추출물을 반죽물의 중량대비 1 %, 5 %, 10 %의 농도비로 첨가한 후 반데기를 제조하였으며 제조된 반데기는 순차적으로 팽화공정을 진행하였다. 그 결과 우선적으로 파리치기 공정 시 최종제품의 품질에 큰 영향을 줄 수 있을 정도로 심각한 문제점 즉 부풀음 현상 (호화)이 감소되었으며 다음 팽화공정을 거치는 동안에는 앞서 소개한 반죽물에 소재첨가를 한 사례에서 관찰된 바와 유사한 팽화율 불량 및 제품의 균질성 (uniformity)이 현저히 불량한 결과를 초래하였다. 특히 소재를 첨가하지 아니한 경우에서는 평균 팽화율이 10 -15 배 (1,000 - 1,500 %)로 나타난 반면

기능성 소재를 함유한 경우 특히 고농도 (5 %, 10 %)의 소재를 함유한 경우에는 팽화율이 2배 정도에도 못 미쳤으며 제품형태의 균일성도 50% 미만으로 관찰되었다. 이러한 팽화과정 시 불량 현상들이 발생하는 원인에 대하여서는 현재까지의 연구결과로는 쉽게 단정지을 수는 없으나 반죽물과 기능성 소재의 혼합으로 말미암아 팽화 공정에 직접적인 영향을 주게 되는 찹쌀 고유의 amylopectin 성분이 변성되어 호화과정 및 팽화과정에 심각한 영향을 준 것으로 사료된다.

#### 나. 집청 및 착의 공정시 기능성소재의 첨가 연구

앞 장에서 서술한 바와 같이 한과의 바탕을 조제하는 일련의 공정 즉 찹쌀의 침지 및 분쇄 → 반죽 및 증자 → 파리치기(치대기) → 반데기의 제조 → 팽화의 단계에 걸쳐 각각의 공정단계에 대하여 기능성 소재 실버-2를 농도별로 첨가하여 본 결과 한과의 바탕을 조제하는 전 과정 즉 찹쌀의 침지 및 분쇄 → 반죽 및 증자 → 파리치기(치대기) → 반데기의 제조 → 팽화의 단계 중 어떠한 공정단계에서 소재첨가를 실시하여도 만족할 만한 제품생산이 이루어지지 못하였으며 따라서 한과의 바탕을 조제하는 모든 공정단계가 기능성 소재를 첨가하는 시기로는 부적합하다는 결론을 얻을 수 있었다. 따라서 다음으로 시도하여 본 방법으로 합천전통한과의 제조시설을 이용하여 확립된 제조공정에 따라 제조된 한과 바탕은 그대로 사용하고 한과 바탕에 엿물 및 고물 등을 입혀 최종 제품을 완성하는 집청 및 착의 (着衣)과정에서 기능성 소재 첨가 방법을 검토하여 보았다.

우선 전술한 바와 같이 조제한 시럽에 기능성 소재실버-2 추출물을 시럽 용량 대비 0 %, 5 %, 10 %, 20 %의 농도비로 함유되도록 각각 첨가하였다. 이와 같이 조제한 시럽 용액에 미리 준비한 한과바탕을 약 30초 내지 1분간 침지시킨 후, 시럽으로 코팅된 한과에 백미 튀밥으로 옷을 입힌 (착의) 후 자연 건조시켜 시제품을 완성하였다. 시럽에 침지하는 과정 및 착의과정 중에는 최종제품의 품질에 영향을 줄 수 있는 아무런 외관 상의 문제점도 발생하지 아니하였다.

이와 같은 제조과정에 따라 각각 0 %, 5 %, 10 %, 20 %의 농도비에 해당하는 기능성 소재를 함유하는 시럽으로 집성한 시제품 군에 대하여 각각 전술한 방법에 따라 별도의 관능검사를 실시하였으며 기능성 소재의 함량을 감안하여 최적의 시제품을 도출하였다.

#### 다. 관능검사

관능검사 및 소비자 기호도 검사에 사용된 용어와 관능검사용 sheet의 내용은 앞장에 서술한 Table 12 및 Fig. 8와 같다. 즉, 관능검사 요원들은 100 점 선척도를 이용한 유과의 관능검사표에 각각 특성별로 느끼는 정도를 표시하도록 하였다. 기능성 소재를 각각 0 %, 5 %, 10 %, 20 %의 농도비로 함유하는 시럽으로 집성한 시제품 군에 대하여 합천전통한과 직원 30명을 대상으로 실시하였다. 기호도의 평가시, 0점의 경우 매우 싫어함이며, 100 점의 경우 매우 좋아함을 의미하고 각 항목은 100 점 척도를 사용하였다. 각 제품에 대한 기호도는 기능성 소재를 함유하고 있는 애플 제품의 기호도를 각 항목별로  $100 \pm 5$  로 한 경우에 대하여 상대적인 점수로 평가하였다.

Table. 13. 기능성 소재함유 시제품에 대한 관능검사

관능검사 항목	기능성 소재 함량비			
	0 %	5 %	10 %	20 %
한과의 고유맛 유지 정도	98 ± 5.6 <sup>a</sup>	87 ± 8.5	75 ± 7.6	48 ± 9.8
잔류 기름향	98 ± 5.8	78 ± 9.8	75 ± 8.6	62 ± 5.6
제품의 색감	98 ± 5.6	86 ± 8.5	78 ± 7.6	65 ± 9.8
제품의 표면도	98 ± 7.6	96 ± 5.6	95 ± 8.6	95 ± 8.6
팽화도	98 ± 5.8	97 ± 5.7	98 ± 5.8	97 ± 7.6
한과의 향	98 ± 5.8	87 ± 8.5	82 ± 7.6	78 ± 9.8
기름향	98 ± 7.6	78 ± 9.8	75 ± 8.6	62 ± 5.6
제품의 경도 (hardness)	97 ± 5.6	87 ± 8.5	82 ± 7.6	78 ± 9.8
아삭아삭함 (crispness)	98 ± 7.8	94 ± 5.6	94 ± 5.6	87 ± 5.6
접착감 (adhesiveness)	98 ± 7.6	78 ± 9.8	75 ± 8.6	72 ± 5.6
뒷맛 (feeling after swallow)	98 ± 5.6	84 ± 9.8	80 ± 8.6	46 ± 5.6

<sup>a</sup> score ± 표준편차

라. 관능검사 결과에 따른 시제품의 제조

합천전통한과에서 제조한 한과바탕을 사용하여 기능성 소재를 각각 0 %, 5 %, 10 %, 20 %의 농도비로 함유하는 시럽으로 코팅한 각각의 시제품 군에 대하여 실시한 관능시험 결과 각각의 제품들은 Table 13에 요약한 바와 같은 성적을 얻을 수 있었다. 우선 한과의 고유맛 유지 정도를 지표로 한 제품의 선호도를 살펴보면 기능성소재를 전혀 함유하고 있지 아니한 제품에 비하여 기능성 소재를 각각 0 %, 5 %, 10 %, 20 %의 농도비로 함유하는 시럽으로 집성한 시제품들에 대한 선호도는 기능성 소재의 함유량이 많아질수록 떨어지는 경향을 나타내었으

며 20%의 기능성소재 함유 제품의 경우에는 선호도 감소가 50% 이상으로 나타났다. 또, 이와 같이 기능성 소재의 함유비율이 증가할 수록 제품에 대한 선호도가 감소하는 현상은 한과의 고유맛 유지 부분 이외에도 잔류 기름향, 제품의 색깔, 한과의 향, 기름 향, 제품의 경도, 접착감 (adhesiveness) 및 뒷맛 (feeling after swallow) 등 총 8가지 검사항목에 걸쳐 관찰되었다. 반면, 제품의 표면도, 팽화도, 아삭아삭함 (crispness) 등의 검사항목의 경우에는 기능성 소재의 함유량이 많아짐에 따라 비례적으로 기호도가 떨어지는 경향은 관찰되지 아니하였다. 가장 많은 양의 기능성소재를 함유한 20 % 기능성소재 함유 제품의 경우에는 한과의 고유한 맛 유지 항목 및 뒷맛 항목에서 각각 기호도가 50% 이하로 현저히 불량하였으며 그 원인으로는 아마도 기능성소재의 독특한 한약추출물의 냄새에 기인하리라 사료된다.

한편, 기능성 소재를 5 % 및 10 % 농도비로 함유하는 시럽으로 집성한 시제품의 경우를 살펴보면 20 %의 기능성소재 함유 제품의 경우와 마찬가지로 한과의 고유한 맛 항목 및 뒷맛 항목에서 기능성소재를 함유하지 아니한 제품에 비하여 각각 기호도가 상대적으로 열등하게 나타났으나 11개 검사항목 전체에 걸친 기호도를 종합하여 본 결과 5 % 및 10 % 농도비로 함유하는 시럽으로 집성한 시제품의 경우는 기능성소재를 전혀 함유하고 있지 아니한 제품의 기호도를 98 score로 간주할 경우 각각 88 score, 83 score을 얻고 있어 비교적 양호한 결과를 보여주었다.

이와 같은 관능검사 결과를 근거로 하여 최종 기능성 한과 제품의 제조과정에서의 기능성 소재첨가 방법으로는 합천전통한과에서 채택하고 있는 종래의 방법에 따라 제조한 한과바탕을 사용하고 여기에 기능성 소재를 각각 5 % 및 10 %의 농도비로 함유하는 시럽으로 집성한 방식을 최종적으로 채택하였다.

#### 마. 기능성 한과 시제품의 기능성 검토

본 연구결과를 토대로 하여 기억력 증진 및 인지기능 개선효능 등을 주 기능성으로 하는 기능성 한과를 새롭게 고안하고 시제품을 제조하였다. 기능성 한과 제품의 제조방법은 합천전통한과에서 채택하고 있는 종래의 방법에 따라 일률적으로 제조한 한과바탕에 기능성 소재를 10%의 농도비로 함유하는 시럽으로 집착하는 방법을 최종적으로 채택하였다. 현재 고려 중인 성인 기준 일일 권장 섭취량으로 30 - 50 g을 제시하고 있으며 이는 표준한과 9 - 15 pellets에 해당하는 양이며 집착율 (syrup absorption ratio)을 20%로 계산할 경우 실제 기능성 소재 실버-2의 함유량은 600 - 1,000 mg으로 환산할 수 있다. 한편 Table 7에 나타난 연구결과에 따르면 기능성 소재 실버-2의 경우 마우스를 사용한 수동회피실험 (passive avoidance performance) 결과 인지기능 개선 효능을 보여주고 있는 경구 투여용량의 영역은 1.0 - 200.0 mg / kg bw이며 최적 투여용량은 10 - 100.0 mg/kg bw 으로 나타난 바 있다. 이를 실험동물에 대한 투여용량을 기준으로 인체 적용 투여용량을 정하는 통상의 방법에 따라 환산하면 인지기능 개선 효능을 보여주고 있는 기능성 소재 실버-2의 경구 투여용량의 영역은 20,0 - 4,000 mg/ 60 kg bw, 그리고 최적 용량은 200 - 2,000 mg/ 60kg bw 으로 환산할 수 있다. 따라서 현재 고려 중인 기능성 한과 일일 권장 섭취량 30 - 50 g (9 - 15 pellets) 중에는 실제 기능성 소재 실버-2가 600 - 1,000 mg 이 함유되고 있으므로 가장 이상적인 용량의 기능성 소재를 함유하고 있음을 알 수 있다.

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

본 연구과제를 통하여 A-549(non small cell lungcarcinoma) 등 5종의 인체 유래 암세포주를 대상으로 하여 시험관 내 (*in vitro*) 세포증식저해효과를 지표로 하여 30 여종의 생약재 추출물들의 항암효능을 검색하였으며 지난 선행 연구결과 data를 총망라하여 300여종의 생약재추출물의 항암효능에 대한 database를 구축하였다. 이들 중 식품의약품안전청 고시 식품가용 식물 70여종 (식품첨가제 포함) 들의 항암효능을 검토하여 본 결과 이들 중 두충, 갈근, 대두, 다엽, 계피, 겨우살이, 아위 등 10 여종의 경우 우수한 항암효능을 가지고 있음을 알 수 있었다. 이와 같은 항암활성 (*in vitro*) 검색 결과를 토대로하여 우수한 생리활성 (기능성)를 보여주는 생약재들을 대상으로하여 아위 등 5종의 식물추출물을 혼합한 복합제제를 도출하였다. (현재 특허출원을 준비 중인 관계로 자세한 식물종류, 배합비율 및 추출조건 등에 대한 상세한 기술 생략). 아울러 이 복합제제 추출물의 안전성, 안정성을 검토하고 있으며 최종 한과제 조시 적용단계 및 적용방법을 검토 중에 있다. 한편 항암활성 (*in vitro*)검색 결과 우수한 암세포성장 저해효능 (기능성)를 보여주는 생약재 두충, 육두구 및 겨우살이 등의 생약재에 대하여서 활성유도분획법 (activity-guided fractionation)에 따라 유효성분을 추적한 결과 8종의 항암활성 유효성분의 분리에 성공하였으며 이들 연구결과는 대한약학회 등 국내학술대회를 통하여 발표하였다. 또 식품첨가제로 식품원료로 사용이 가능한 아위의 추출물에 대한 항암활성 (*in vitro*) 즉 암세포성장 저해효능 (기능성)를 활용한 식품제조를 위하여 2건의 국제특허를 출원하였다. (출원번호 미국 10/399218, 일본 533878/2002).

한편 기억력 증진 및 노인성 치매로 인한 인지기능의 손상을 개선하는 효능을 지닌 기능성 수재를 개발하기 위하여 1차적으로 시험관내 실험으로 muscarinic acetylcholine receptor ( $M_1$  type), glutamate (NMDA; glycine binding site) receptor 및 acetylcholinesterase (AChE) 등 노인성 치매와 직접

적인 관련이 있는 각종 약물작용점(효소, 수용체)에 대한 기능성소재 후보생약재들의 저해효과 및 친화력효능을 검색하고 2차적으로 수동회피실험 모델을 활용한 동물실험을 통하여 개개의 식물추출물에 대한 기억력 증진효과를 검색하였다. 또, 동물실험(수동회피실험)을 통한 인지기능 개선효능의 검색 결과를 토대로하여 노인성치매 및 기억력 감퇴 등 각종 인지기능 퇴행을 특징으로 하는 여러 가지 퇴행성 뇌질환에 광범위하게 적용가능하리라 예측되는 우수한 인지기능 개선효능(기능성)을 보여주는 아위등 10여종의 식물들을 일정 비율로 혼합하여 열수 추출한 복합제제(기능성 소재) 2종(실버-1, 실버-2)를 도출하였으며 본 연구 결과를 특허출원 완료하였다. (아위 추출물을 함유하는 인지기능 개선용 식품: 출원번호; 대한민국 KR 2004-0026005 출원일자 ; 2004/4/06). 이들 복합제제(기능성 소재) 2종(실버-1, 실버-2) 중 보다 우수한 인지기능 효능이 인정되는 실버-2 제제에 대한 랫드를 이용한 1차 안전성 시험을 완료하였다. 또, 본 기능성 소재를 활용한 한과제품의 개발을 위하여 현재 최종적으로 한과 제조시 적용단계 및 적용방법을 검토 중에 있으며 시제품의 개발 및 본격적인 시장 출시를 앞두고 있는 실정이다.

현재 구상 중인 시제품에 대한 연구내용은 다음과 같다. 즉 합천전통한과에서 제조한 한과바탕을 사용하여 기능성 소재를 각각 0%, 5%, 10%, 20%의 농도비로 함유하는 시럽으로 코팅한 각각의 시제품 군에 대하여 실시한 관능시험 결과 각각의 제품들은 Table 13에 요약한 바와 같은 성적을 얻을 수 있었다. 우선 한과의 고유맛 유지 정도를 지표로 한 제품의 선호도를 살펴보면 기능성소재를 전혀 함유하고 있지 아니한 제품에 비하여 기능성 소재를 각각 0%, 5%, 10%, 20%의 농도비로 함유하는 시럽으로 집성한 시제품들에 대한 선호도는 기능성 소재의 함유량이 많아질수록 떨어지는 경향을 나타내었으며 20%의 기능성소재 함유 제품의 경우에는 선호도 감소가 50% 이상으로 나타났다. 또, 이와 같이 기능성 소재의 함유비율이 증가할 수록 제품에 대한 선호도가 감소하는 현상은 한과의 고유맛 유지 부분 이외에도 잔류 기름향, 제품의 색감, 한과의 향, 기름 향, 제품의 경도, 접착감(adhesiveness) 및 뒷맛(feeling after swallow) 등 총 8가지 검사항목에 걸쳐 관찰되었다. 반면, 제품의 표면도, 팽화도, 아삭아삭함

(crispness) 등의 검사항목의 경우에는 기능성 소재의 함유량이 많아짐에 따라 비례적으로 기호도가 떨어지는 경향은 관찰되지 아니하였다. 가장 많은 양의 기능성소재를 함유한 20 % 기능성소재 함유 제품의 경우에는 한과의 고유한 맛 유지 항목 및 뒷맛 항목에서 각각 기호도가 50% 이하로 현저히 불량하였으며 그 원인으로서는 아마도 기능성소재의 독특한 한약추출물의 냄새에 기인하리라 사료된다.

한편, 기능성 소재를 5 % 및 10 % 농도비로 함유하는 시럽으로 집성한 시제품의 경우를 살펴보면 20 %의 기능성소재 함유 제품의 경우와 마찬가지로 한과의 고유한 맛 항목 및 뒷맛 항목에서 기능성소재를 함유하지 아니한 제품에 비하여 각각 기호도가 상대적으로 열등하게 나타났으나 11개 검사항목 전체에 걸친 기호도를 종합하여 본 결과 5 % 및 10 % 농도비로 함유하는 시럽으로 집성한 시제품의 경우는 기능성소재를 전혀 함유하고 있지 아니한 제품의 기호도를 98 score로 간주할 경우 각각 88 score, 83 score을 얻고 있어 비교적 양호한 결과를 보여주었다.

이와 같은 관능검사 결과를 근거로 하여 최종 기능성 한과 제품의 제조과정에서의 기능성 소재첨가 방법으로는 합천전통한과에서 채택하고 있는 종래의 방법에 따라 제조한 한과바탕을 사용하고 여기에 기능성 소재를 각각 5 % 및 10 %의 농도비로 함유하는 시럽으로 집성한 방식을 최종적으로 채택하여 시제품을 제조하였다.

이와 같이 본 연구과제를 통하여 그간 본 연구실에서 축적된 많은 선행연구 결과를 유용하게 활용한 결과 본 연구과제의 최종목표인 암예방효능 및 노인 성치매 개선효능을 함유한 신기능성전통한과의 개발을 위한 기초 연구와 산업 재산권의 확보 등 계획된 소정의 연구과제의 목표에 부합되는 소정의 성과를 거두었다고 사료된다.

또, 본 연구를 통하여 도출된 복합제제들을 별도의 연구과제를 통하여 건강 기능식품 혹은 천연물의약으로의 개발을 추진할 예정이다.

아울러 본 연구과제와 같이 연구개발을 통하여 새로운 기능성소재를 발굴하

고 발굴된 기능성소재를 한과, 빵, 레포르트 등 기존의 식품형태에 접목하는 연구과제들은 타 연구과제에 비하여 비교적 단시일 내에 소정의 연구목표에 도달할 수 있으며 연구를 통하여 도출된 제품 역시 비록 낙관적인 예측이지만 높은 시장점유율이 예측되는 만큼 지속적인 연구투자가 계속되기를 기대한다.

## 제 5 장 연구개발 결과의 활용 계획

본 연구과제를 통하여 우수한 암예방효능(기능성)을 보여주는 생약재들을 대상으로하여 아귀 등 5종의 식물추출물을 구성약재로하여 조합한 암예방 기능성 복합제제 (현재 특허출원을 준비 중인 관계로 자세한 복합제제의 명칭, 구성 식물종류, 배합비율 및 추출조건 등에 대한 상세한 기술 생략) 및 시험관내 실험으로 muscarin성 acetylcholine receptor ( $M_1$  type), glutamate (NMDA; glycine binding site) receptor 및 acetylcholinesterase (AChE) 등 노인성 치매와 직접적인 관련이 있는 각종 약물작용점(효소, 수용체)에 저해효과 및 친화력효능을 보여주며 아울러 수동회피실험 모델을 활용한 동물실험을 통하여 노인성치매 및 기억력 감퇴 등 각종 인지기능 퇴행을 특징으로 하는 여러 가지 퇴행성 뇌질환에 광범위하게 적용가능하리라 예측되는 우수한 인지기능 개선효능(기능성)을 보여주는 아귀등 10여종의 식물들을 일정 비율로 혼합하여 열수 추출한 복합제제 (기능성 소재) 2종 (실버-1, 실버-2)를 도출하였으며 본 연구 결과를 특허출원 완료하였다. (아귀 추출물을 함유하는 인지기능 개선용 식품: 출원번호; 대한민국 KR 2004-0026005 출원일자 ; 2004/4/06). 이들 복합제제 (기능성 소재) 2종 (실버-1, 실버-2) 중 보다 우수한 인지기능 효능이 인정되는 실버-2 제제에 대한 랫드를 이용한 1차 안전성시험을 완료하였다.

합천전통한과에서 제조한 한과바탕을 사용하여 기능성 소재를 각각 0 %, 5 %, 10 %, 20 %의 농도비로 함유하는 시럽으로 코팅한 각각의 시제품 군에 대하여 실시한 관능시험 결과 각각의 제품들은 Table 13에 요약한 바와 같은 성적을 얻을 수 있었다. 우선 한과의 고유맛 유지 정도를 지표로 한 제품의 선호도를 살펴보면 기능성소재를 전혀 함유하고 있지 아니한 제품에 비하여 기능성 소재를 각각 0 %, 5 %, 10 %, 20 %의 농도비로 함유하는 시럽으로 집성한 시제품들에 대한 선호도는 기능성 소재의 함유량이 많아질수록 떨어지는 경향을 나타내었으며 20%의 기능성소재 함유 제품의 경우에는 선호도 감소가 50% 이상으로 나타났다. 또, 이와 같이 기능성 소재의 함유비율이 증가할 수록 제품에 대한 선호도가

감소하는 현상은 한과의 고유맛 유지 부분 이외에도 잔류 기름향, 제품의 색감, 한과의 향, 기름 향, 제품의 경도, 접착감 (adhesiveness) 및 뒷맛 (feeling after swallow) 등 총 8가지 검사항목에 걸쳐 관찰되었다. 반면, 제품의 표면도, 팽화도, 아삭아삭함 (crispness) 등의 검사항목의 경우에는 기능성 소재의 함유량이 많아짐에 따라 비례적으로 기호도가 떨어지는 경향은 관찰되지 아니하였다. 가장 많은 양의 기능성소재를 함유한 20 % 기능성소재 함유 제품의 경우에는 한과의 고유한 맛 유지 항목 및 뒷맛 항목에서 각각 기호도가 50% 이하로 현저히 불량하였으며 그 원인으로서는 아마도 기능성소재의 독특한 한약추출물의 냄새에 기인하리라 사료된다.

한편, 기능성 소재를 5 % 및 10 % 농도비로 함유하는 시럽으로 집성한 시제품의 경우를 살펴보면 20 %의 기능성소재 함유 제품의 경우와 마찬가지로 한과의 고유한 맛 항목 및 뒷맛 항목에서 기능성소재를 함유하지 아니한 제품에 비하여 각각 기호도가 상대적으로 열등하게 나타났으나 11개 검사항목 전체에 걸친 기호도를 종합하여 본 결과 5 % 및 10 % 농도비로 함유하는 시럽으로 집성한 시제품의 경우는 기능성소재를 전혀 함유하고 있지 아니한 제품의 기호도를 98 score로 간주할 경우 각각 88 score, 83 score을 얻고 있어 비교적 양호한 결과를 보여주었다.

이와 같은 관능검사 결과를 근거로 하여 최종 기능성 한과 제품의 제조과정에서의 기능성 소재첨가 방법으로는 합천전통한과에서 채택하고 있는 종래의 방법에 따라 제조한 한과바탕을 사용하고 여기에 기능성 소재를 각각 5 % 및 10 %의 농도비로 함유하는 시럽으로 집성한 방식을 최종적으로 채택하여 시제품을 제조하였다.

또, 본 기능성 소재를 활용한 한과제품의 개발을 위하여 현재 최종적으로 한과 제조시 적용단계 및 적용방법을 검토 중에 있으며 조만간에 시제품의 개발 및 본격적인 시장 출시를 앞두고 있는 실정이다. 시장출시가 확정되면 한국화학연구원과 합천전통한과는 전용실시권을 내용으로 하는 기술이전 계약을 별

도로 체결할 예정이다.

또, 본 연구를 통하여 도출된 복합제제들을 별도의 연구과제를 통하여 건강 기능식품 혹은 천연물의약으로의 개발을 계속하여 추진할 예정이다.

## 제 6 장 참고문헌

1. Skehan P, Streng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer. Inst.* 1990; 82: 1107-111
2. Reiss Y, Goldstein JL, Seabra MC, Casey PJ, Brown MS. Inhibition of purified p21ras farnesyl:protein transferase by Cys-AAX tetrapeptides. *Cell* 1990; 62: 81-88.
3. Reiss Y, Seabra MC, Armstrong SA, Slaughter CA, Goldstein JL, Brown MS. Nonidentical subunits of p21H-ras farnesyltransferase. *J. Biol. Chem.* 1991; 266:10672-10677.
4. Hsieh C. L., Yen G. C. (2000) Antioxidant actions of du-zhong (*Eucommia ulmoides* Oliv.) toward oxidative damage in biomolecules. *Life Sci.* **66**:1387-1400.
5. Yen G. C. and Hsieh C. L. (2000) Reactive oxygen species scavenging activity of Du-zhong (*Eucommia ulmoides* Oliv.) and its active compounds. *J. Agric. Food Chem.* **48**: 3431-3436.
6. Li Y, Sato T, Metori K, Koike K, Che Q. M., Takahashi S. (1998) The promoting effects of geniposidic acid and aucubin in *Eucommia ulmoides* Oliver leaves on collagen synthesis. *Biol Pharm Bull.* **21**: 1306-1310.
7. Watanabe J, Kawabata J, Kurihara H, Niki R. (1997) Isolation and identification of alpha-glucosidase inhibitors from tochu-cha (*Eucommia ulmoides*). *Biosci Biotechnol Biochem.* **61**: 177-178.
8. Nakamura T, Nakazawa Y, Onizuka S, Satoh S, Chiba A, Sekihashi K, Miura A, Yasugahira N, Sasaki YF. (1997) Antimutagenicity of Tochu tea (an aqueous extract of *Eucommia ulmoides* leaves): 1. The clastogen-suppressing effects of Tochu tea in CHO cells and mice. *Mutat Res.* **388**: 7-20.

9. Sasaki YF, Chiba A, Murakami M, Sekihashi K, Tanaka M, Takahoko M, Moribayashi S, Kudou C, Hara Y, Nakazawa Y, Nakamura T, Onizuka S. (1996) Antimutagenicity of Tochu tea (an aqueous extract of *Eucommia ulmoides* leaves): 2. Suppressing effect of Tochu tea on the urine mutagenicity after ingestion of raw fish and cooked beef. *Mutat Res.* **371**: 203-214.
10. Oshima Y, Takata S, Hikino H, Deyama T, Kinoshita G. (1988) Anticomplementary activity of the constituents of *Eucommia ulmoides* bark. *J. Ethnopharmacol.* **23**: 159-164.
11. Deyama T, Ikawa T, Kitagawa S and Nishibe S. (1987) The constituents of *Eucommia ulmoides* Oliv. *Chem. Pharm. Bull.* **35**: 1785-1789
12. Y.H. Choi, J.H.Seo, J.S.Kim, J.Heor, S.K.Kim, S.U. Choi, Y.S. Kim, Y.K. Kim and S.Y.Ryu. Inhibitory effects of the stem bark extract of *Eucommia ulmoides* on the proliferation of human tumor cell lines. *Kor. J. Pharmacogn.* 34(4), 308-313 (2003).
13. Kap-Joon Kim, Yong Nam Han : Lignans from *Myristica Fragrans* : Yakhak Hoeji **46**(2), 98-101 (2002)
14. Hiroko Shimomura, Yutaka Sashida, Motomu Oohara :Lignans from *Machilus Thunbergii* : *Phytochemistry*, **26**(5), 1513~1515 (1987).
15. Raul G. Enriquez, Marco A. Chavez : Phytochemical investigations of plants of the genus *Aristolochia*, 1. isolation and nmr spectral characterization of eupomatenoïd derivatives : *Journal of Natural Products*, **47**(5), 896~899 (1984)
16. Yang Bae Kim, Il Yeong Park, Kuk Hyun Shin : The crystal structure of licarin B (C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>O<sub>4</sub>) a component of the seed of *Myristica Fragrans* : *Arch. Pharm. Res.*, **14**(1), 1-6 (1991)
17. Kuk Hyun Shin, Ok Nam Kim, Won Sick Woo : Isolation of hepatic drug metabolism inhibitors from the seeds of *Myristica Fragrans* : *Arch. Pharm. Res.*, **11**(3), 240~243 (1988)

18. Won Sick Woo, Kuk Hyun Shin, Hildebert Wagner, Hermann Lotter : The structure of macelignan from *Myristica Fragrans* : *Phytochemistry*, **26**(5), 1542 - 1543 (1987)
19. Kuk Hyun Shin, Won Sick Woo : Biological evaluation of drug metabolism modifying activity : *Kor. J. Pharmacogn.* **17**(3), 189 - 194 (1986)
20. Jung Yun Lee, Yong Bong Han, Won Sick Woo, Kuk Hyun Shin : Antioxidant activity of diarylbutanes : *Kor. J. Pharmacogn.* **21**(4), 270~273 (1990)
21. Yukinobu Ikeya, Heihachiro Taguchi, Itiro Yosioka, Hiroshi Kobayashi : The constituents of *Schizandra chinensis* baill. IV. The structures of two new lignans, pre-gomisin and gomisin J : *Chem. Pharm. Bull.* **27**(7), 1583-1588 (1979)
22. Nobuji Nakatani, Kayo Ikeda, Hiroe Kikuzaki, Masaru Kido, Yuzo Yamaguchi : Diaryldimethylbutane lignans from *Myristica Argentea* and their antimicrobial action against *Streptococcus Mutans* : *Phytochemistry*, **27**(10), 3127~3129 (1988)
23. Schroder, H., Giacobini, E., Struble, RG., Luiten, PG., Zilles, K., Strosberg, AD. (1991) Muscarinic cholinergic neurons in the frontal cortex in Alzheimer's disease. *Brain Res Bull.* **27**(5): 631-636.
24. Polinsky, RJ. (1998) Clinical pharmacology of rivastigmine: a new generation acetylcholinesterase inhibitor for the treatment of Alzheimer's disease. *Clin Ther.* **20**(4): 634-47.
25. Levey, AI. (1996) Muscarinic acetylcholine receptor expression in memory circuits: implications for treatment of Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**(24): 13541-6.
26. Messer, WS Jr., Rajeswaran, WG., Cao, Y., Zhang, HJ., el-Assadi, AA., Dockery, C., Liske, J., O'Brien, J., Williams, FE., Huang, XP., Wroblewski, ME., Nagy, PI., Pesceckis, SM. (2000) Design and development of selective muscarinic agonists for the treatment of Alzheimer's disease:

- characterization of tetrahydropyrimidine derivatives and development of new approaches for improved affinity and selectivity for M1 receptors. *Pharm Acta Helv.* 74(2): 135-140.
27. Doody, RS. (1999) Clinical profile of donepezil in the treatment of Alzheimer's disease. *Gerontology.* 45 Suppl 1:23-32.
  28. Asthana, S., Greig, NH., Holloway, HW., Raffaele, KC., Berardi, A., Schapiro, MB., Rapoport, SI., Soncrant, TT. (1996) Clinical pharmacokinetics of arecoline in subjects with Alzheimer's disease. *Clin. Pharmacol. Ther.* 60(3): 276-282.
  29. Harries, MH., Samson, NA., Cilia, J., Hunter, AJ. (1998) The profile of sabcomeline (SB-202026), a functionally selective M1 receptor partial agonist, in the marmoset. *Br J Pharmacol.* 124(2): 409-415.
  30. Shannon, HE., Rasmussen, K., Bymaster, FP., Hart, JC., Peters, SC., Swedberg, MD., Jeppesen, L., Sheardown, MJ., Sauerberg, P., Fink-Jensen, A. (2000) Xanomeline, an M(1)/M(4) preferring muscarinic cholinergic receptor agonist, produces antipsychotic-like activity in rats and mice. *Schizophr Res.* 42(3): 249-59.
  31. Ferber, D. (2001) Neurodegenerative disease. Using the fruit fly to model tau malfunction. *Science* 292 (5524): 1983
  32. Bugiani O. (1999) Pathogenesis of Alzheimer's disease and dementia. *Rev. Neurol.* 155 Suppl 4: S28-32
  33. Polinsky, RJ. (1998) Clinical pharmacology of rivastigmine: a new generation acetylcholinesterase inhibitor for the treatment of Alzheimer's disease. *Clin Ther.* 20(4): 634-47.
  34. Levey, AI. (1996) Muscarinic acetylcholine receptor expression in memory circuits: implications for treatment of Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93(24): 13541-6.
  35. Messer, WS Jr., Rajeswaran, WG., Cao, Y., Zhang, HJ., el-Assadi, AA., Dockery, C., Liske, J., O'Brien, J., Williams, FE., Huang, XP.,

- Wroblewski, ME., Nagy, PI., Peseckis, SM. (2000) Design and development of selective muscarinic agonists for the treatment of Alzheimer's disease: characterization of tetrahydropyrimidine derivatives and development of new approaches for improved affinity and selectivity for M1 receptors. *Pharm Acta Helv.* 74(2): 135-140.
36. Muir, KW. and Lees, KR. (1995) Clinical experience with excitatory amino acid antagonist drugs. *Stroke* 26(3), 503 - 513.
37. Leeson, PD. and Iversen, LL. (1994) The glycine site on the NMDA receptor : Structure-activity relationships and therapeutic potential. *J. Med. Chem.* 37(24), 4053-4067
38. Cho, J., Joo, NE., Kong, JY., Jeong, DY., Lee, KD., Kang, BS. (2000) Inhibition of excitotoxic neuronal death by methanol extract of *Acori graminei* Rhizoma in cultured rat cortical neurons. *J. ethnopharmacology* 73, 31-37
39. Harries, MH., Samson, NA., Cilia, J., Hunter, AJ. (1998) The profile of sabcomeline (SB-202026), a functionally selective M1 receptor partial agonist, in the marmoset. *Br J Pharmacol.* 124(2): 409-415.
40. Shannon, HE., Rasmussen, K., Bymaster, FP., Hart, JC., Peters, SC., Swedberg, MD., Jeppesen, L., Sheardown, MJ., Sauerberg, P., Fink-Jensen, A.(2000) Xanomeline, an M(1)/M(4) preferring muscarinic cholinergic receptor agonist, produces antipsychotic-like activity in rats and mice. *Schizophr Res.* 42(3): 249-59.
41. Kim, YS., Kim, JS., Kim, SK., Heor, JH., Lee, BE., Ryu, SY. (2001) Binding affinity of some herbal extracts on the muscarinic acetylcholine receptor subtype 1 (mAChR-M<sub>1</sub>). *Kor. J. Pharmacogn.* 32(3), 219-225.
42. Ellman, GL., Coutney, KD., Andres, V., Featherstone, RM. (1961) A new and rapid colorimetric determination acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88 -95
43. Kim, JS., Choi, BW., Lee, BH., Kim, SK., Heor, JH., Kim, YS., Zee, OP.,

- Ryu, SY. (2001) Inhibitory effect of protoberberine alkaloids from *Coptidis Rhizoma* upon Acetylcholinesterase (AChE). the proceeding of the 50th convention of Korean Pharmaceutical Society 2001, 04. 20, Kwangju Korea.
44. Schmeller, T., Latz-Bruning, B., Mink, M. (1997) Biochemical activities of berberine, palmatine and sanguinarine mediating chemical defence against microorganisms and herbivores. *Phytochemistry* 44: 257-266.
  44. Wang, W., Chen, K., Guan, Y. (1999) Effect of berberine hydrochloride on muscarinic receptors, *Acta Pharmaceutica Sinica* 34: 260-263.
  45. Hsieh, MT., Peng, WH., Wu, CR., Wang, WH. (2000) The ameliorating effect of the cognitive-enhancing Chinese herbs on scopolamine-induced amnesia in rats. *Phytother. res.* 14: 375-377.
  46. Peng WH, Hsieh MT, Wu CR. (1997) Effect of long term administration of berberine on scopolamine-induced Amnesia in rats, *Jpn. J. Pharmacol.* 74: 261-266.
  47. Messer, W.S. Jr., Rajeswaran, W.G., Cao, Y., Zhang, H.J., el-Assadi, A.A., Dockery, C., Liske, J., O'Brien, J., Williams, F.E., Huang, X.P., Wroblewski, M.E., Nagy, P.I., Peseckis, S.M. (2000) Design and development of selective muscarinic agonists for the treatment of Alzheimer's disease: characterization of tetrahydropyrimidine derivatives and development of new approaches for improved affinity and selectivity for M1 receptors. *Pharm. Acta Helv.* 74(2), 135-140.
  48. Doody, R.S. (1999) Clinical profile of donepezil in the treatment of Alzheimer's disease. *Gerontol.* 45 Suppl 1, 23-32.
  49. Asthana, S., Greig, N.H., Holloway, H.W., Raffaele, K.C., Berardi, A., Schapiro, M.B., Rapoport, S.I., Soncrant, T.T. (1996) Clinical pharmacokinetics of arecoline in subjects with Alzheimer's disease. *Clin. Pharmacol. Ther.* 60(3), 276-282.
  50. Harries, M.H., Samson, N.A., Cilia, J., Hunter, A.J. (1998) The profile of

- sabcomeline (SB-202026), a functionally selective M<sub>1</sub> receptor partial agonist, in the marmoset. *Br. J. Pharmacol.* 124(2), 409-415.
51. Shannon, H.E., Rasmussen, K., Bymaster, F.P., Hart, J.C., Peters, S.C., Swedberg, M.D., Jeppesen, L., Sheardown, M.J., Sauerberg, P., Fink-Jensen, A. (2000) Xanomeline, an M(1)/M(4) preferring muscarinic cholinergic receptor agonist, produces antipsychotic-like activity in rats and mice. *Schizophr Res.* 42(3), 249-59.
  52. Kim, Y.S., Kim, J.S., Kim, S.K., Heor, J.H., Lee, B.E., Ryu, S.Y. (2001) Binding affinity of some herbal extracts on the muscarinic acetylcholine receptor subtype 1 (mAChR-M<sub>1</sub>). *Kor. J. Pharmacogn.* 32(3), 219-225.
  53. Lee, S. C., Kim E. J., You, K. H., Kang, J. S., Moon, Y. S. (1999) Effects of various nootropic candidates on the impaired acquisition of ethanol-treated rats in step-through test. *J. Ginseng Res.* 23, 115-121.
  54. 손경희 : 유과의 조리법 표준화 및 찹쌀의 수침기전에 관한 연구.  
대산농촌문화, 겨울호, PP.6- 9. 1995.
  55. 김태홍 : 강정과 산자류 제조에 관한 실험조리적 연구(I).  
대한 가정학회지, 제19권3호, PP.63- 68. 1981.
  56. 김태홍 : 강정과 산자류 제조에 관한 실험조리적 연구(II) 건조와 튀기는  
과정에 따른 산자의 질간에 대하여. 대한가정학회지 20(2):119 (1982)
  57. 박동준, 구경형, 목철균 : 찹쌀의 초미세분/공기분급특성과 유과제조공정  
개선. 한국식품과학회지, 제27권6호, PP.1008- 1012. 1995.
  58. 신동화, 김명곤, 정태규, 이현유 : 유과 품질향상을 위한 첨가물의 효과와  
공정 단순화 시도. 한국식품과학회지, 제22권3호, PP.272- 276. 1990.
  59. 신동화, 김명곤, 정태규, 이현유 : 쌀 품종별 유과제조 특성. 한국식품과학  
회지, 제21권6호, PP.820- 825. 1989.
  60. 신동화, 김명곤, 정태규, 이현유 : 유과의 저장성과 팽화방법 개선시험.  
한국식품과학회지, 제 22권3호, PP.266- 271. 1990.

61. 신동화, 최웅, 이현유 : 멥쌀 혼합비율에 따른 유과의 품질 특성.  
한국식품과학회지, 제23권5호, PP.619- 621. 1991.
62. 한재숙 : 한국 병과류의 조리학적 연구- 유과를 중심으로.  
한국영양식량학회지, Vol.11, No.4, PP.37- 41. 1982.
63. Kang, S.H. and Ryu, G.H.: Analysis of traditional process for Yukwa making, a Korean puffed rice snack ( I ):Steeping and punching processes. Korean J. Food Sci. Technol. 34(4):597-603 (2002)
64. Kang, S.H. and Ryu, G.H.: Analysis of traditional process for Yukwa making, a Korean puffed rice snack ( II ):Pelleting, Drying, conditioning and additive. Korean J. Food Sci. Technol. 34(5):818-823 (2002)
65. 임영희 : 유과의 최적조건 확립을 위한 연구. 단국대학교 박사학위논문 (1994)
66. Kim, K., Kang, K.J., Lee, Y.H. and Kim, S.K.: Changes in properties of waxy rice during steeping in water. Korean J. Food Sci. Technol. 25(1):86-87 (1993)
67. Park, D.J., Ku, K.H. and Mok, C.Y.: Characteristics of glutinous rice fractions and improvement of Yoogwa processing by microparticulation /air-classification. Korean J. Food Sci. Technol. 27(6):1008-1012 (1995)

부록 : 기능성 소재 실버-2의 안전성 실험 자료

※ 보고서 겉표지 뒷면 하단에 다음 문구 삽입

## 주 의

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