

적하수오의 혈관계 개선 효과 규명 및 기능성 제품 개발

Development of functional foods which it uses and elucidation of
blood vessel system improvement from *Polygonum multiflorum*

국내 적하수오의 우수성규명 및 콜레스테롤개선효과 분석 (제1세부)

Studies on cholesterol lowering and functional properties of *Polygonum multiflorum*

적하수오의 혈전개선 소재화 및 활성성분의 안정성 연구 (제2세부)

Studies on the stability of bioactive component and improving blood
clots effect of *Polygonum multiflorum*

적하수오의 혈압강하효과 및 기능성 제품화 가공기술 개발 (제3세부)

Development of functional food for blood pressure lowering and
processing techmology of *Polygonum multiflorum*

적하수오의 혈관계개선 우수활성성분의 분리, 구조분석 및 응용연구 (협동)

Purification, structural analysis of bioactive material for blood vessel system
improvement from *Polygonum multiflorum*

연 구 기 관
한 국 식 품 연 구 원

농 립 수 산 식 품 부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “적하수오의 혈관계 개선 효과 규명 및 기능성 제품 개발” 과제의
보고서로 제출합니다.

2011년 6월 24일

주관연구기관명 : 한국식품연구원

주관연구책임자 : 이창호

세부연구책임자 : 김영언

세부연구책임자 : 김병목

연 구 원 : 김인호

연 구 원 : 한대석

연 구 원 : 김영언

연 구 원 : 이현유

연 구 원 : 성기승

연 구 원 : 최준혁

연 구 원 : 이혜성

협동연구기관명 : 경희대학교

협동연구책임자 : 백남인

참여기업명 : 백령도청정식품영농조합법인

참여기업대표자명 : 김덕일

요 약 문

I. 제 목

적하수오의 혈관계 개선 효과 규명 및 기능성 제품 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

적하수오는 예로부터 장기복용함으로써 혈압강하, 동맥경화의 방지효과를 나타내어 예로부터 민간요법에 많이 이용되어 왔으며 2000년부터 식품의 주원료로 사용될 수 있도록 식품공전 개정이 이루어져 적하수오를 이용한 다양한 가공제품의 개발이 기대되고 있는 실정이다. 적하수오에 관해 <중국본초도감>에서는 “형태는 다년생 덩굴성 초본으로 기원이 마디풀과의 식물인 적하수오 (*Polygonum multiflorum* Thunb.)의 덩이뿌리이다.”라고 설명하고 있고 예로부터 민간요법에 사용되어 왔다. 하수오는 크게 마디풀과에 속하는 적하수오와 박주가리과에 속하는 백하수오로 나누지만, 식물분류상 전혀 다른 종류이며, 적하수오 뿌리에는 옥시메틸안트라퀴논 유도체(크리소파놀, 이모딘, 레인 등), 녹말, 레시틴 등이 함유되어 있다. 적하수오의 약효성분은 anthraquinone류(emodin, chrysophanol, rhein, physcion)로서 그 중 emodin의 함량이 많아 하수오의 품질평가 시 지표성분으로 이용되며 백하수오는 pregnane계열 배당체가 다수 보고되었고 gagaminine이라는 향산화물질이 뿌리로부터 분리되어 지표성분으로 이용되고 있다. 적하수오의 약효성분인 emodin은 항산화 활성, 항염증작용, tyrosinekinase 억제활성, 콜레스테롤 저하 효과, 면역력 증가효과 등 여러 가지 유용한 활성을 지니고 있는 것으로 알려져 있어 적하수오를 활용한 고부가가치 기능성 제품 개발 기술이 필요하다. 현재까지 항산화효과, 고지혈증억제 효과 등에 대한 연구는 백하수오를 중심으로 이루어져 왔으나 적하수오에 대한 생리활성 연구는 거의 없는 실정이다. 또한 2020년에는 전체 인구의 15%이상이 노령인구로 심각한 노령화 문제가 야기되어 성인병 예방 및 개선 기능성 식품제품의 개발기술이 요구되며 국민건강증진 및 국가기술경쟁력 확보를 위해 자연산 적하수오를 이용한 혈관계 질환 예방 및 개선효과가 우수한 고기능성식품 개발이 요구되

고 있다. 특히 본 과제의 성공적인 수행은 고부가가치화에 따른 농민 및 생산자 단체의 소득증진과 지역경제 활성화에 기여함은 물론 국내 식품산업 기술개발의 선진화 및 국가경쟁력 제고로 해외수출증대에도 기여할 수 있을 것으로 기대되고 있다. 백하수오는 중국, 대만 및 일본에서는 거의 사용되지 않는 약재이며 주로 적하수오를 많이 사용하고 있고 국내에서는 경상북도, 강원도, 충청북도 등에서 적하수오보다 백하수오를 훨씬 많이 재배하며 사용하고 있는 실정이다. 국내에서 재배하는 적하수오는 대개 중국에서 품종을 가져다 심을 것으로 국내 야생 적하수오와는 그 모양이나 성분에서 많은 차이를 보이고 있으며 효능면에서도 국내 야생 적하수오가 중국산 적하수오 및 재배산 적하수오보다 약효가 훨씬 우수한 것으로 알려져 있다. 이러한 적하수오는 1990년에 70ha의 재배면적에서 228톤이 생산되었으나 2005년에 242ha의 재배면적에서 397톤을 생산하여 1990년에 비해 재배면적과 생산량은 2배 이상 증가하였다. 즉, 국내 자연산 적하수오의 효능은 수입산 적하수오보다 훨씬 우수하나, 증가하는 수입산 적하수오에 대처할 수 있는 국내 자연산 적하수오에 관한 산업적, 학술적 연구는 거의 없는 실정이며 이에 관한 연구가 필요한 실정이다. 전체 의약품 시장의 15%를 심장순환기 질환 치료제가 차지할 만큼 시장규모가 방대하고 콜레스테롤 강하제 시장은 연간 20-30%의 급성장을 하고 있어 자연산 적하수오를 활용한 혈관계 개선 기능성 제품을 개발할 경우 경제적 가치는 매우 클 것으로 예상된다. 본 연구는 국내 자연산 적하수오를 이용하여 혈관계 질환 예방용 건강기능 식품을 개발 하기 위하여 시험관 및 동물 실험을 실시하여 적하수오의 우수한 혈류 기능 개선을 규명하며 유용 성분을 분리 하고 질량분석기, NMR 등의 분석기기를 이용하여 활성성분을 분리하고 분자구조를 규명하고자 한다. 또한 동물 모델 시스템을 구축하고 이로부터 콜레스테롤 개선 효능, 혈압 저하 및 혈전 저해 효능 등을 분석하여 적하수오를 이용한 혈류개선용 건강 기능성 식품 소재를 개발하고자 한다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

1. 적하수오의 우수성 규명 및 콜레스테롤 개선 효과 분석
 - 가. 적하수오의 성분분석 및 콜레스테롤 개선효과 검색
 - 나. 콜레스테롤 개선 우수활성 물질의 선별 및 효과 검색

- 다. 적하수오 활성물질의 식품 소재화 응용연구
- 2. 적하수오의 혈전개선 소재화 및 활성성분의 안정성 연구
 - 가. 적하수오의 식품 소재화를 위한 전처리 방법 연구
 - 나. 혈전개선 우수 활성물질의 선별 및 동물계 생리특성 분석
 - 다. 혈전개선 활성물질의 식품 소재화 및 식품응용 연구
- 3. 적하수오의 혈압강하효과 및 기능성 제품화 가공기술 개발
 - 가. 적하수오의 성분 분석 및 유효성분의 탐색
 - 나. 항고혈압, 항산화 우수활성물질의 생리활성 분석
 - 다. 혈압 강하 활성물질의 식품 소재화 연구
- 4. 적하수오의 혈관계 개선 우수활성성분의 분리, 구조분석 및 응용 연구
 - 가. 적하수오의 추출물의 성분특성 조사
 - 나. 혈관계 개선 우수 활성물질의 분리·정제
 - 다. 우수활성 분리물질로부터 혈관계 개선 유효성분의 정제

IV. 연구개발결과

적하수오를 이용한 혈류개선 효능 건강기능성 식품을 개발하기 위하여 혈류개선 효능을 *in vitro* 및 *in vivo* 상에서 규명하였으며 용매 분획별로 활성 성분을 탐색, 분리한 후 구조를 결정하였다. 적하수오를 식품 소재로 활용하기 위하여 HUVEC 세포와 HepG2 세포를 이용하여 MTS assay를 수행하여 안전성을 분석한 결과 독성을 나타내지 않아 식품소재로 사용하는데 있어서 문제점이 없는 것으로 판단할 수 있었다. 혈류 개선과 밀접한 관계가 있는 것으로 예상되는 항산화 활성을 분석한 결과 Flavonoid, Total phenolic acid의 함량이 가장 높았던 적하수오의 경우 DPPH 라디칼 소거능 활성, ABTS 라디칼을 이용한 항산화능, SOD 억제 활성 역시 높은 것으로 나타났다. 동물 실험을 통하여 적하수오 및 백하수오 추출물 급여로 인하여 총 혈중 지질 함량이 낮아지는 경향을 보였다. 따라서 적하수오 및 백하수오의 공급이 혈청 중성지질 저하에 상당한 영향을 준 것으로 확인되었다. 또한 혈청 내 HDL-cholesterol의 함량을 분석한 결과 적하수오와 백하수오를 식이한 군 모두에서 대조군과 비교하여 HDL-cholesterol의 함량이 증가하였다. 간조직의 지방 축적 정도를 살펴본 결과 각각 적하수오와 백하수오를 보충 공급한 군의 간내

지방 축적량이 콜레스테롤 대조군에 비해 줄어드는 것을 확인하였다. 적하수오 및 백하수오의 혈전 개선 효능을 plasmin의 농도(0-20 μg)별로 fibrin plate 상에서의 혈전용해 활성을 살펴본 결과 적하수오의 최고농도인 200 mg/mL에서 투명환의 면적이 약 1.327 cm^2 로 plasmin 10 μg 의 농도와 같은 활성을 보였으나 완전히 농도의존적으로 증가하지는 않았다. 또한

항혈전 활성은 시료의 aPTT(Activated partial thromboplastin time) 및 공통경로(common pathway)에 기인하는 TT(thrombin time)를 측정하여 평가하였다.

SHR군의 aPTT의 경우 대조군은 33.43초를 기록했고, 적하수오 0.5% 처리군은 39.26초로 증가하였으나 1% 처리군은 28.11초로 대조군 보다 오히려 더 줄어드는 것을 확인할 수 있었다. 백하수오의 경우에는 0.5% 처리군이 27.21초로 대조군과 비교하여 감소하였으나 1% 처리군에서는 44.03초로 대조군 보다 증가하는 경향을 나타냈다. TT 또한 aPTT와 유사한 경향을 나타냈다. 이것은 SHR 쥐에서 적하수오 0.5% 처리군과 백하수오 1% 처리군이 혈액 응고 내인성 경로와 공통경로에 작용하여 혈액 응고를 억제 시킨 것으로 보여진다. SD 수컷 쥐에 적하수오 및 백하수오를 보충 공급시 aPTT의 경우 유의적인 차이를 보이지 않았으나 TT의 경우 증가하는 경향을 나타냈다. cation radical인 ABTS를 대상으로 하수오 추출물 및 순차 분획물의 radical 소거능을 측정한 결과 적하수오와 백하수오 Ethanol 추출물 및 Buthanol, Hexane 분획물을 최종 농도가 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 되도록 희석하여 항산화력을 측정한 결과 적하수오의 경우 Ethanol 추출물과 Butanol 분획물에서 ABTS^+ 소거능력이 가장 뛰어난 것으로 나타났고 Hexane 분획물에서는 다른층 보다 항산화력이 떨어지는 경향을 확인 할 수 있었다.

적하수오 및 백하수오의 혈압 저하 효능을 분석하기 위하여 농도별로 ACE inhibition activity를 측정한 결과 100ppm 이상의 농도에서 ACE inhibition activity를 나타내고 있으며 적하수오 시료의 경우 농도별로 10.5%~52.9%로 가장 높은 활성을 나타내었다. 동물 모델을 이용하여 혈압저하 효능을 알아본 결과 적하수오 0.5% 투여군은 2주차까지는 3주째부터 대조군에 비해 유의적으로 감소하는 경향을 나타내어 5주째에는 혈압이 큰 폭으로 떨어지는 것을 확인하였다. 적하수오를 첨가한 식이를 투여한 흰쥐의 혈청의 Glucose, Total cholesterol, triglyceride, LDL 및 HDL cholesterol 함량은 혈당의 경우 대조군 85.20 mg/dL에 비해서 0.5%, 1% 적하수오가 각각 88.00 mg/dL, 87.43 mg/dL로 높게 나타났다. 심장 순환기계 질환의

발생과는 밀접한 상관관계가 있는 것으로 알려진 혈중 LDL cholesterol은 적하수오를 섭취한 군은 대조군에 비해 유의적으로 감소하였다. 정상 흰쥐의 혈중 triglyceride 함량은 27~108 mg/dL이며 적하수오, 백하수오 섭취군 모두 정상범위에서 벗어나지 않는 경향을 나타냈다. 적하수오와 백하수오의 활성 성분을 용매 분획하여 EtOAc, BuOH, H₂O 분획물을 얻었으며 SiO₂(순상) 및 ODS(역상) TLC를 이용한 성분 profiling 실험 결과 EtOAc 분획에서 lipids를 비롯하여 phenyl 화합물을 확인하였다. Open column chromatography를 반복적으로 수행하여 지표성분을 포함한 단일 성분을 분리 정제 하였으며 순수 분리 정제된 성분들을 NMR, IR, MS 등의 data를 해석하여 구조 동정한 결과 백하수오로부터 cynandione A, 적하수오로부터 emodin등 페닐화합물을 동정하였다. 혈류 개선 효능이 우수한 적하수오 백하수오 추출물을 이용하여 기능성 식품을 제조하기 위하여 모델로 젤리 형태의 제품을 제조하여 첨가 농도 별 색도, 기계적 조직감 및 관능검사 등의 품질 특성을 살펴보았다. 젤리의 색도 및 기계적 조직감 측정 결과 적하수오 추출물을 첨가함에 따라 L 값이 감소, a값 및 b값이 증가하여 전체적으로 어두워졌으며 조직감 측정기로 측정된 기계적인 물성 측정 결과 경도는 대조군에 비하여 유의적으로 감소하였으며 Cohesiveness (응집성), Gumminess (점성), Chewiness (씹힘성)는 고농도군에서 대조군과 비교하여 유의적으로 감소하였다. 젤리 제품에 대한 관능검사 결과 색에 대한 선호도 측정 결과 적하수오 추출물을 0.5% 첨가한 군에서 가장 높은 선호도를 나타내었으며 1% 첨가한 군에서 5.14로 가장 낮은 선호도를 나타냈다. 전반적인 기호도는 적하수오 추출물을 0.5% 첨가한 군의 선호도가 유의적으로 높게 나타났다. 관능평가 결과 전반적으로 모든 항목에서 적하수오 추출물 0.5~1% 첨가군 에서 평가점수가 5.00이상으로 높은 선호도를 나타내었으며 0.25% 첨가군에서 낮은 선호도를 나타내었다. 관능평가 결과 전반적으로 모든 항목에서 백하수오 추출물 0.75~1% 첨가군 에서 높은 선호도를 나타내었다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

의학기술의 발달로 인한 노령인구의 증가로 당뇨병, 암, 고혈압, 고지혈증 등 성인병 예방 및 치료에 관한 관심이 크게 증대하고 있다. 특히 선진국에서 사망률의 30-40%가 순환기계 질환에 의한 것으로 국민 보건 상 매우 중요한 문제이며 동맥

경화증, 고지혈증, 고혈압 등 순환기계 질환의 대표 질환들은 현대의학의 획기적인 발달에도 불구하고 아직까지 만족스럽지 못하며 이러한 이유로 천연물에 대한 기대가 증가되고 있다. 현재까지 항산화 효능, 고지혈증 억제 효과 등에 대한 연구는 백하수오를 중심으로 이루어져 왔으며 적하수오의 생리활성에 대한 연구는 거의 전무한 실정이었다. 본 연구에서는 적하수오를 이용한 혈류개선 효능 건강기능성 식품을 개발하기 위하여 혈류개선 효능을 *in vitro* 및 동물 모델을 통하여 분석하여 적하수오 및 백하수오의 우수한 혈류 개선 효능을 규명하였다. 적하수오를 식품 소재로 활용하기 위하여 HUVEC 세포와 HepG2 세포를 이용하여 MTS assay를 수행하여 안전성을 분석한 결과 독성이 없는 우수한 식품소재임을 밝혀냈으며 혈류 개선 효능과 관계가 있는 다양한 분석 기법을 동원하여 효능을 분석하였다. 또한 활성 성분을 분리 정제하여 그 구조를 결정하였다. 본 연구를 통하여 현재까지 2편의 논문을 비롯하여 혈류 개선 효능과 관련하여 모두 7건의 특허를 출원하여 적하수오 연구 분야에 선도적인 연구를 수행하였으며 참여기업에 기술 이전하여 산업화를 추진하였다. 본 연구에서는 적하수오 및 백하수오 추출물을 이용하여 젤리 형태의 시제품을 제조하여 산업화의 가능성을 타진해보았다. 이러한 결과를 바탕으로 국내 자연산 적하수오의 생체 내 혈관계 개선 효과가 우수하며 안전하면서도 활성이 우수한 유효성분을 함유한 고기능성식품을 개발, 보급하여 국민건강증진과 국내 식품산업 기술개발의 선진화 및 국가경쟁력 제고로 해외수출증대에도 기여하고자 한다.

SUMMARY

During the past few decades, there has been a dramatic increase in obesity, hyperlipidemia and hypercholesterolemia in Korea. According to 2008 report of the national data of the Korean National Health and Nutrition Examination Survey (KNHANES) revealed that the rate of hypercholesterolemia population slightly increased from 10% in 1998 to 10.9% in 2008 and the hyperlipidemia population dramatically increased from 10.2% in 1998 to 17.3% in 2008. Hypercholesterolemia is seen in connection with diseases such as atherosclerosis, when cholesterol forms deposits in the artery walls, cardiovascular disease and diabetes. Epidemiological studies revealed that the risk factors of cardiovascular disease and diabetes are hypercholesterolemia and hyperlipidemia. *Polygonum Multiflorum* Thunberg which belongs to Polygonaceae is widely distributed in Korea, China, Vietnam and Japan. Traditionally, it has been used to treat elevated serum cholesterol and coronary heart diseases. It was also reported that *Polygonum multiflorum* Thunberg has a strong antioxidant effect. The purpose of this study is to elucidate the function of *Polygonum multiflorum* on improving blood vessel system and develop functional foods exhibited the beneficial function to prevent cardiovascular disease such as stroke. Several studies revealed that the dried root of *Polygonum Multiflorum* Thunb. has varieties of pharmacological actions, including anti-oxidant, vasorelaxant and anti-atherosclerosis effects. We are investigated the effects of ethanol extract of PM on blood lipid profile in the hypercholesterolemic Sprague-Dawley (SD) rats of both genders. 7 week-old male and female SD rats (n=50, each gender) were purchased. After a week of acclimation, each male rats (n=50) and female rats (n=50) were grouped into six groups and placed 6 blocks of 5 male and female rats each. The animals were allowed free access to the either a control diet or containing PM diets for 5 weeks. After sacrifice, serum lipid profile was analyzed. Serum total cholesterol levels of PM treated groups were

slightly decreased than control groups in both genders. Serum HDL-cholesterol levels of PM treatment groups were increased and LDL-cholesterol levels of PM treatment groups were decreased in both male and female. Serum triglyceride levels were significantly decreased in the PM fed male rats ($p < 0.05$). Also, serum total lipid levels of PM fed groups were slightly decreased in both genders. These results suggesting that intake of *Polygonum Multiflorum* might have a positive effect on hypercholesterolemia by improving the serum lipid profile. And also *Polygonum multiflorum* Thunberg has been used for the treatment of renal disorder, hematopoiesis, menstrual irregularity and anti-aging in Korean folk medicine. The study was conducted to investigate the effects of 80% ethanol extracts of *Polygonum multiflorum* (PM) on the blood pressure in spontaneously hypertensive rats (SHR) and anti-oxidative activities of its various fractions. The rats were divided into the following 3 groups: control group, control group treated with 0.5% PM, control group treated with 1% PM. Body weight gain and food efficiency ratio were not significantly different among the groups. But the treatment of 0.5% PMT and 1% PM for 5 weeks in SHR significantly suppressed the blood pressure rise with aging ($p < 0.05$). ABTS radical-scavenging activity of the ethanol extract was stronger than the butanol and hexane fractions at the same concentration. Thus, long term consumption of *Polygonum multiflorum* may be beneficial in lowering high blood pressure in SHR rats.

Fibrinolytic activity was estimated by a modified fibrin plate assay of Astrup and Mullertz. Fibrinolytic activity of *Polygonum multiflorum* was observed at a high concentration of 200 mg/ml in 80% EtOH extracts. We observed fibrinolytic activity at levels of 200mg/ml in 80% ethanol extracts. The fibrinolytic activity of *Polygonum multiflorum* 80% EtOH extracts at 200 mg/ml was equal to the activity of plasmin at 10 μ g.

Polygonum multiflorum was extracted with 80% EtOH, and the concentrated extract was successively partitioned using EtOAc, *n*-BuOH and H₂O. From the EtOAc fraction, lipid, phenolic compounds were isolated through TLC. The

chemical structure of these compounds were determined as emodin, 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-*O*-*b*-D-glucose, torachryson-8-*O*-*b*-D-glucoside, and *b*-sitosterol. Based on our results, *Polygonum multiflorum* has great potential in the development of functional food material has potential use as a cardiovascular protective food

CONTENTS

Summary in Korean	3
Summary in English	9
Chapter 1. Outline of the interest	25
Chapter 2. State of the art	29
Chapter 3. Contents and Results of the study	31
1. Analysis of composition and biological activity of <i>Polygonum multiflorum</i>	31
a. Materials and method	31
1) Materials	31
2) Reagents and device	31
3) Proximate composition analysis	32
4) Analysis of marker component	33
5) MTS assay	33
6) Quantify of Flavonoid	33
7) Total phenolic acid	34
8) Analysis of antioxidant activity	34
a) DPPH radical scavenging activity	35
b) ABTS radical scavenging activity	35
c) SOD scavenging activity	35
b. Statistical analysis	36
c. Results and discussion	36
1) Proximate composition analysis	36
2) Emodin	37
3) Flavonoid	39
4) Total phenolic acid compound	40
5) MTS assay	41
6) Antioxidant activity	43
a) DPPH radical scavenging activity	43
b) ABTS radical scavenging activity	43

c) SOD scavenging activity	44
2. Elucidation of cholesterol lowering effect of <i>Polygonum multiflorum</i>	46
a. HMG-CoA reductase inhibition activity	46
1) Materials and Methods	46
2) HMG-CoA reductase inhibition activity	46
3) Results and Discussion	47
b. Animal experiment for elucidation of cholesterol lowering effect	48
1) Materials and methods	48
a) Materials	48
b) Experimental diet	48
c) Blood and intestinal organs	51
d) Analysis of blood	51
e) Histological analysis of liver	51
f) Statistical analysis	51
2) Results and Discussion	52
a) Body weight gain, food intake and food efficiency ratio	52
b) Liver, kidney and spleen weights	54
c) Serum aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT)	57
d) Serum glucose concentration	59
e) Lipid concentration of liver	65
3. Improvement of blood clots	67
a. Fibrinolytic activity	67
1) Material and method	67
2) Fibrinolytic activity	67
3) Results and Discussion	68
b. Animal experiment for improvement of blood clots	70
1) Materials and methods	70
a) Materials	70
b) Experimental diet	70

c) Anti-clotting activity	72
d) Antioxidant activity	73
2) Results and Discussion	73
a) Plasma aPTT and TT	73
b) Antioxidant activity	76
4. Elucidation of blood pressure lowering	78
a. Analysis of ACE inhibition activity	78
1) Materials and pretreatments	78
2) ACE inhibition activity	78
3) Results and Discussion	78
b. Animal experiment for analysis of effect of blood pressure lowering	80
1) Materials and Methods	80
a) Materials	80
b) Methods	80
c) Experimental diet	80
d) Blood pressure	81
e) Sacrifice and harvesting of organs	82
g) Biochemical analysis of blood	82
h) Statistical analysis	82
2) Results and Discussion	82
a) Food intake, body weight gain and food efficiency ratio	82
b) blood pressure	84
c) Liver, kidney and spleen weights	85
d) Serum aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT)	86
e) Serum glucose and lipid concentration	87
5. Isolation and structural analysis of bioactive material	90
a. Preparation of solvent extract and fractions	90
1) Preparation of solvent extract and fractions from <i>Polygonum multiflorum</i>	90
2) Preparation of solvent extract and fractions from <i>Cynanchum wilfordii</i>	90

b. Isolation and purification	93
1) Isolation and purification from <i>Polygonum multiflorum</i>	93
2) Isolation and purification from <i>Cynanchum wilfordii</i>	95
c. Structural analysis	96
1) Structural analysis of bioactive material from <i>Polygonum multiflorum</i>	96
a) Compound 1 (2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-glucose)	96
b) Compound 2 (torachryson-8-O- β -D-glucoside)	96
c) Compound 3 (β -sitosterol)	96
d) Compound 4 (emodin)	97
2) Structural analysis of bioactive material from <i>Cynanchum wilfordii</i>	101
a) Compound 1 (2,3-dihydroxyacetophenone)	101
b) Compound 2 (cynandione A)	101
d. Preparation of bioactive fraction	102
1) Preparation of bioactive fraction from <i>Polygonum multiflorum</i>	102
2) Preparation of bioactive fraction from <i>Cynanchum wilfordii</i>	103
e. Analysis of bioactive material from <i>Polygonum multiflorum</i> and <i>Cynanchum wilfordii</i> using HPLC	104
1) quantification of emodin from <i>Polygonum multiflorum</i>	104
a) Preparation of emodin standard solution	104
b) Operation condition of HPLC for analysis emodin and chromatogram ..	105
c) Standard curve of emodin	106
2) Quantitative analysis of cynandione A from <i>Cynanchum wilfordii</i>	106
a) Preparation of standard solution of Cynandione A	106
b) Operation condition HPLC for analysis of Cynandione A	106
c) Standard curve of Cynandione A	108
d) Content of cynandione A from <i>Cynanchum wilfordii</i>	108
6. Development of Jelly product from <i>Polygonum multiflorum</i> and <i>Cynanchum wilfordii</i>	109
a. Materials and Methods	109
1) Materials	109

2) Methods	111
b. Analysis of quality characteristics of Jelly	113
1) Measurement of color	113
2) Texture profile analysis(TPA)	114
3) Sensory evaluation	115
4) Statistical analysis	117
c. Results and Discussion	117
1) Color	117
2) Texture profile analysis	119
3) Sensory evaluation	122
Chapter 4. Degree of achievement and contribution	125
Chapter 5. Application plan	126
Chapter 6. Information for international trends	143
Chapter 7. Reference	148

목 차

국문요약	3
영문요약	9
제 1 장 연구개발과제의 개요	25
제 2 장 국내외 기술개발 현황	29
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	31
제1절 하수오의 생화학적 성분분석 및 활성 분석	31
1. 재료 및 방법	31
가. 실험재료 및 전처리	31
나. 시약 및 기기	31
다. 일반성분분석	32
라. 지표성분분석	32
마. 세포독성분석	33
바. Flavonoid 함량	33
사. Total phenolic acid 함량	34
아. 항산화활성분석	34
1) DPPH radical 소거활성	34
2) ABTS radical 소거활성	35
3) SOD 소거활성	35
2. 통계처리	36
3. 결과 및 고찰	36
가. 일반성분분석	36
나. 지표물질 정량 분석	37
다. Flavonoid 정량분석	39
라. Total phenolic acid compound 정량 분석	40
마. 하수오의 세포독성 분석	41
바. 항산화활성 분석	43
1) DPPH radical 소거활성	43
2) ABTS radical 소거활성	43

3) SOD 소거활성	44
제2절 하수오의 콜레스테롤 개선 효능 규명	46
1. HMG-CoA reductase 저해 활성	46
가. 실험재료 및 전처리 방법	46
나. HMG-CoA reductase inhibition activity	46
다. 결과 및 고찰	47
2. 동물실험을 통한 하수오의 콜레스테롤 저하 효능	48
가. 재료 및 방법	48
1) 실험재료	48
2) 실험동물의 사육 및 실험식이	48
3) 혈액 및 각종 장기의 채취	51
4) 혈액분석	51
5) 간의 조직학적 관찰	51
6) 통계처리	51
나. 결과 및 고찰	52
1) 체중증가량, 식이섭취량 및 식이효율	52
2) 장기 무게	54
3) 혈청내 aspartate aminotransferase (AST)와 alanine aminotransferase (ALT)의 측정	57
4) 혈청 glucose 함량 및 지질성상의 영향	59
5) 간조직의 지방 축적	65
제3절 하수오의 혈전 개선 효능 규명	67
1. 혈전용해 활성 분석	67
가. 실험재료 및 전처리 방법	67
나. 혈전용해활성	67
다. 결과 및 고찰	68
2. 동물실험을 통한 혈전개선 효능 분석	70
가. 재료 및 방법	70
1) 실험 재료	70
2) 실험동물의 사육 및 실험식이	70

3) 하수오 추출물의 항 응고 활성 측정	72
4) 하수오 분획물의 항산화력 측정	73
나. 결과 및 고찰	73
1) 혈장의 aPTT 및 TT 측정	73
2) 하수오 분획물의 항산화력 측정	76
제4절 하수오의 혈압 강하 효능 규명	78
1. ACE 저해 활성 분석	78
가. 실험재료 및 전처리 방법	78
나. ACE 저해 활성	78
다. 결과 및 고찰	78
2. 동물실험을 통한 하수오의 혈압강하 효능 분석	80
가. 재료 및 방법	80
1) 실험 재료	80
2) 실험동물	80
3) 실험식이	80
4) 혈압 측정	81
5) 실험동물의 희생 및 장기 적출	82
6) 혈액의 생화학적 분석	82
7) 통계처리	82
나. 결과 및 고찰	82
1) 식이섭취량, 체중증가량 및 식이효율	82
2) 혈압측정	84
3) 장기무게	85
4) 혈청의 aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) 활성측정	86
5) 혈청 내 혈당 및 지질 수준	87
제5절 하수오의 혈류 개선 활성 성분의 분리 및 구조 분석	90
1. 용매추출물 및 용매분획물의 제조	90
가. 적하수오 뿌리로부터 용매추출물 및 용매분획물의 제조	90
나. 백하수오 뿌리로부터 용매추출물 및 용매분획물의 제조	90

2. 활성 지표성분의 분리 및 정제	93
가. 적하수오 뿌리로부터 활성 지표성분의 분리 및 정제	93
나. 백하수오 뿌리로부터 활성 지표성분의 분리 및 정제	95
3. 지표성분의 구조결정	96
가. 적하수오 지표성분의 구조결정	96
1) Compound 1 (2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O-β-D-glucose)	96
2) Compound 2 (torachryson-8-O-β-D-glucoside)	96
3) Compound 3 (β-sitosterol)	96
4) Compound 4 (emodin)	97
나. 백하수오 지표성분의 구조결정	101
1) Compound 1 (2,3-dihydroxyacetophenone)	101
2) Compound 2 (cynandione A)	101
4. 활성검정 분획물 및 화합물 제조	102
가. 적하수오로부터 활성 검정용 분획물 제조	102
나. 백하수오로부터 활성 검정용 분획물 및 화합물 제조	103
5. HPLC를 이용한 적하수오와 백하수오의 지표성분 분석방법 확립	104
가. 적하수오의 emodin 정량 분석	104
1) Emodin 표준용액 조제	104
2) Emodin HPLC 분석조건 및 chromatogram	105
3) Emodin 회귀곡선	106
나. 백하수오의 cynandione A 정량 분석	106
1) Cynandione A 표준용액 조제	106
2) Cynandione A HPLC 분석조건 및 chromatogram	106
3) Cynandione A 회귀곡선	108
4) 백하수오의 cynandione A의 함량분석	108
제6절 하수오를 이용한 젤리 제품 개발	109
1. 실험 재료 및 방법	109
가. 실험 재료	109
나. 실험 방법	109
1) 젤리의 배합비	109

2) 젤리 제조	111
2. 젤리의 품질 특성 평가	113
가. 색도 측정	113
나. 물성 측정 (Texture profile analysis: TPA)	114
다. 관능 평가	115
라. 통계 분석	117
3. 결과 및 고찰	117
가. 색도	117
나. 물성	119
다. 관능 평가	122
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	125
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	126
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외 과학기술정보	143
제 7 장 참고문헌	148

제 1 장 연구개발과제의 개요

적하수오는 다년생 덩굴성 초본으로 기원이 마디풀과의 식물인 적하수오 (*Polygonum multiflorum*)의 덩이뿌리이다. 잎은 어긋나며 좁은 난형 혹은 심장형이고, 탁엽의 끝은 막질로 줄기를 둘러싼다.⁽¹⁻³⁾ 꽃은 작고 많으며 밀집되어 가지가 여러 개인 원추화서에 달리고, 속에 작은 꽃이 2~4송이 혹은 다시 여러 송이가 피고 꽃은 녹색 혹은 백색이며, 길이는 6~15cm 가량이고 굵은 부분은 지름이 3~12cm가 되며 표면은 적갈색 또는 자갈색이고 가지런하지 않은 세로홈이 있으며 울퉁불퉁하고 양단에 뿌리의 흔적이 한 개씩 있다. 주산지는 중국의 하남, 호북, 귀주, 사천, 강소, 광서 등지에 분포하며 그 외 절강, 안징, 광둥, 산둥, 강서, 호남에서도 서식한다. 예로부터 간, 신을 보익하고 혈을 자양하며 풍을 제거하는 효능이 있다고 알려져 있으며 머리가 일찍 희어지는데, 허두, 눈앞이 아찔한데, 허리와 무릎 아픈데, 연약, 근골산통, 유정, 대량의 자궁 출혈, 붕루대하, 만성 학질, 만성 설사, 만성 간염, 옹종, 나력, 장풍, 치질에도 효능을 나타낸다. 하수오는 장기 복용함으로써 혈압강하, 동맥경화의 방지효과를 나타내어 예로부터 민간요법에 많이 이용되어 왔으며 2000년부터 식품의 주원료로 사용될 수 있도록 식품공전 개정이 이루어져 하수오를 이용한 다양한 가공제품의 개발이 기대되고 있다. 하수오에 관하여 <중국본초도감>에서는 “형태는 다년생 덩굴성 초본으로 기원이 마디풀과의 식물인 적하수오 (*Polygonum multiflorum* Thunb.)의 덩이뿌리이다.”라고 설명하고 있으며 두 가지 식물 모두 자양강장제 및 예로부터 민간요법에 사용되어 왔다. 하수오는 크게 마디풀과에 속하는 적하수오와 박주가리과에 속하는 백수오 혹은 백하수오로 나누지만, 식물분류상 전혀 다른 종류이며⁽⁴⁾, 적하수오 뿌리에는 옥시메틸안트라퀴논 유도체(크리소파놀, 이모딘, 레인 등), 녹말, 레시틴 등이 함유되어 있다. 적하수오의 약효성분은 anthraquinone류(emodin, chrysophanol, rhein, physcion)⁽⁵⁾로서 그 중 emodin의 함량이 많아 하수오의 품질평가 시 지표성분으로 이용되며 백하수오는 pregnane계열 배당체가 다수 보고되었고 gagaminine이라는 항산화물질이 뿌리로부터 분리되어 지표성분으로 이용되고 있다(Table 1).

Table 1. 적하수오와 백하수오의 약효성분과 이용

구 분	적하수오	백하수오
약용부위	뿌리	뿌리
약효성분	anthraquinone 화합물 : emodin, chrysophanol, rhein, physcion	preganane 계열의 배당체, gagaminine
효능	강장(強壯), 강정(強精), 보혈(補血), 자양(滋養), 익정(益情), 소종(消腫)	
이 용	생약재, 차, 술, 강장음료, 건강보조식품, 기능성 화장품 원료	

백하수오는(*Cynanchi wilfordii Radix*)는 박주가리과(Asclepiadaceae)에 속하는 덩굴속 다년초로서 중국과 일본, 한국에서 서식한다. 이명으로는 백수오가 있으며 적하수오(*Polygoni mulyiflori Radix*)와 혼용되기 쉬우나 식물학적 기원이 틀리고 그 성분과 효능이 틀려 구별에 주의 하여야 한다. 백하수오의 주성분으로는 gagaminine, wilfosideKIN, wilfosideCIN, cynandione A, cynanchone A 등이 있으며 반면 적하수오의 주성분은 anthraquinone, flavonoid, stilbene, tannine 류의 화합물이 있다고 알려져 있다. 백하수오의 효능으로는 자양강장, 보혈이 있으며 성분중의 gagaminine은 *in vitro*에서 hepatic aldehyde oxidase의 활성화에 대해 억제 활성을 가지고 또한 cynandione A는 신경세포의 손상을 억제한다는 보고 되는 등 황산화 활성화에 효과적이라고 알려져 있다. 백하수오는 중국, 대만 및 일본에서는 거의 사용되지 않는 약재이며 주로 적하수오를 많이 사용하고 있고 국내에서는 경상북도, 강원도, 충청북도 등에서 적하수오보다 백하수오를 훨씬 많이 재배하며 사용하고 있다. 국내에서 재배하는 적하수오는 대개 중국에서 품종을 가져다 심을 것으로 국내 야생 적하수오와는 그 모양이나 성분에서 많은 차이를 보이고 있으며 효능면에서도 국내 야생 적하수오가 중국산 적하수오 및 재배 적하수오보다 약효가 훨씬 우수한 것으로 알려져 있다. 이러한 적하수오는 1990년에 70ha의 재배면적에서 228톤이 생산되었으나 2005년에 242ha의 재배면적에서 397톤을 생산하여 1990년에 비해 재배면적과 생산량은 2배 이상 증가하였다.(Table 2)

Table 2. 적하수오 재배 면적 및 생산량

년도	1990	1995	2000	2005
재배면적 (ha)	70	134	173	242
생산량 (ton)	228	128	479	397

생활수준의 향상으로 인한 식생활 패턴의 변화와 함께 심장순환기계 질환 등 고지혈증과 더불어 동맥경화, 고혈압과 같은 각종 생활습관병의 유병률이 증가하고 있다. 그 중에서도 고혈압은 순환기계 질환의 근원이 되는 만성퇴행성 질환으로 비교적 증상이 없는 편이지만 뇌졸중, 심부전, 관상동맥질환 등 치명적인 합병증을 유발할 수 있기 때문에 보다 적극적인 관리와 치료가 요구되는 질환이다.⁽⁶⁾ 대부분의 고혈압은 원인 불명으로서 이것을 원발성 또는 본태성고혈압(spontaneously hypertension)이라고 하며 병인은 확실하게 밝혀져 있지는 않으나 유전적 요인과 과도한 식염 섭취, 고콜레스테롤 식이, 음주, 흡연, 비만, 스트레스 등의 환경적 요인에 의해 발병되는 것으로 보고되어 있다.⁽⁷⁾ 최근 순환기계 질환의 치료 및 예방을 위해 수많은 치료제가 지속적으로 개발되고 있으나 합성품에 한계를 보이고 있고 아직까지 개선의 여지가 미흡한 실정이기 때문에 천연물에 대한 기대가 증가하고 있다. 본 연구에서는 혈압강하, 동맥경화 방지 등 혈관계 개선 효과가 보고되고 있는 적하수오와 백하수오의 보충공급이 수컷과 암컷 흰쥐의 혈중 지질성상에 미치는 효과를 비교하여 하수오의 영양적 가치를 분석하고자 하였으며 또한 사람의 본태성 고혈압 모델로 활용되는 spontaneously hypertension rat(SHR)을 이용하여 유전적으로 혈압이 상승하는 기간을 포함하는 생후 8주부터 15주까지 적하수오와 백하수오 추출물 장기투여에 의한 혈압저하효과, 간독성, 지질대사에 대해서 알아보았다. 적하수오의 약효성분인 emodin은 항산화 활성, 항염증작용, tyrosinekinase 억제활성, 콜레스테롤 저하 효과, 면역력 증가효과 등 여러 가지 유용한 활성을 지니고 있는 것으로 알려져 있어 적하수오를 활용한 고부가가치 기능성 제품 개발 기술이 필요하며 또한 2020년에는 전체 인구의 15%이상이 노령인구로 심각한 노령화 문제가 야기되어 성인병 예방 및 개선 기능성 식품제품의 개발기술이 요구되며 국민건강증진 및 국가기술경쟁력 확보를 위해 자연산 적하수오를 이용한 혈관계 질환 예방 및 개선효과가 우수한 고기능성식품 개발이 요구되고 있다.

특히 본 과제와 성공적인 수행은 고부가가치화에 따른 농민 및 생산자 단체의 소득 증진과 지역경제 활성화에 기여함은 물론 국내 식품산업 기술개발의 선진화 및 국가경쟁력 제고로 해외수출증대에도 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

국내 자연산 적하수오의 효능은 수입산 적하수오보다 훨씬 우수하나, 증가하는 수입산 적하수오에 대처할 수 있는 국내 자연산 적하수오에 관한 산업적, 학술적 연구는 거의 없는 실정이며 이에 관한 연구가 절실하다. 전체 의약품 시장의 15%를 심장순환기 질환 치료제가 차지할 만큼 시장규모가 방대하고 콜레스테롤 강하제 시장은 연간 20-30%의 급성장을 하고 있어 자연산 적하수오를 활용한 혈관계 개선 기능성 제품 개발시 경제적 기대는 클 것으로 예상되고 있다. 산업발달과 의학기술의 발달, 삶의 질 향상 등 여러 요인들로 인해 세계적으로 고령층의 건강과 복지에 대한 대책마련이 시급한 실정이며 당뇨병, 암, 고혈압, 고지혈증 등 성인병 예방 및 치료에 관한 산업적·학술적 연구가 활발해지고 있다. 성인병은 성년기 이후에 남녀 모두에게 노화와 더불어 점차 많이 발생하는 비전염성의 만성퇴행성 질환 및 기능장애를 말하는 것으로 현대인에게서 불규칙한 생활습관, 스트레스, 운동부족, 영양불균형 및 환경오염 등으로 인해 발생하며 성인병 예방 및 개선 기능성제품 개발 연구는 천연자원의 유효성분을 활용한 연구가 활발히 진행중에 있다. 선진국에서 사망률의 30-40%가 순환기계 질환에 의한 것으로 국민 보건상 매우 중요한 문제이며 동맥경화증, 고지혈증, 고혈압 등 순환기계 질환의 대표 질환들은 현대과학이 발달하고 수많은 치료제가 지속적으로 개발되고 있으나 합성품에 한계를 보이고 있고 아직까지 개선의 여지가 미흡한 실정이며 천연물에 대한 기대가 증가되고 있다. 따라서 국내 자연산 적하수오의 생체내 혈관계 개선 효과를 규명하고 안전하면서도 활성이 우수한 유효성분을 함유한 고기능성식품을 개발하여 보급함으로써 국민건강 증진과 국내 식품산업 기술개발의 선진화 및 국가경쟁력 제고로 해외수출증대에도 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

식물을 활용한 콜레스테롤 저하, 동맥경화, 고혈압 등 성인병 예방과 치료는 전 세계적으로 연구되고 있으며 국내외에서 식물성 스테롤, 옥타코사놀, 해조류 추출물, 알로에추출물(베타시토스테롤) 등을 이용한 소재가 개발되어 성인병 예방 기능성식품시장을 형성하고 있다. 세계적으로 콜레스테롤, 동맥경화, 고혈압 등의 성인병은 고령화 사회의 중요한 의료문제로 대두됨에 따라 예방 및 치료제 개발에 많은 연구가 진행되어 수많은 약재들이 개발되었으나 부작용 등으로 인하여 일부 품목은 사용이 제한되어 있는 실정이다. 적하수오는 중국이 주산지로 국내 자연산 적하수오와는 모양, 성분 및 효능이 전혀 다른 것으로 보고되어 있으나 적하수오의 생리 기능적 특성에 대한 연구는 거의 없는 실정이어서 적하수오에 관한 생리적 특성 분석 자료를 통한 기술력 확보가 시급하다. 현재까지 하수오의 주성분으로 알려진 anthraquinone 화합물 중 항산화효과, 항암효과, 항염증 활성 등 생리기능효과가 보고된 emodin, rhein, aloin 등의 연구는 몇몇 있으나 하수오 또는 하수오의 활성성분을 활용한 고부가 가치 기능성 식품화에 대한 연구는 거의 없는 실정이다. 현재까지 국내에서는 다양한 생리활성성분을 함유한 한약재를 이용하여 고기능성식품 및 제재를 개발하고 있으나 생산량이 증가하고 있고 수입산 및 국내재배 적하수오보다 효능이 우수한 적하수오를 이용한 생리 기능적 특성 연구와 산업화는 거의 없는 실정이다. 국내에서는 천연물로부터 혈관계 질환 개선 및 예방 효과 기능성물질을 검색하는 연구가 이루고 있는데 해조류 추출물 유래 심혈관계 예방제 개발 연구, 감귤껍질 유래 비타민, 천연물추출 혈압강화 성분 분리 등 산학연에서 활발히 진행되고 있다. 김 등(2003)은 적하수오와 백하수오의 HPLC 패턴분석으로 두 물질이 유효적 성분차이를 나타낸다고 보고하였고, 나 등(2000)은 emodin을 지표성분으로 몇몇 지역에서 판매되는 적하수오의 품질평가를 실시하였으나 자연산과 재배산 적하수오의 차이에 대한 조사는 없었다. 이 등(1999)은 하수오가 TG(Triglyceride)와 LDL cholesterol치를 감소시켰으며 지질대사와 연관된 효소의 활성에 영향을 미칠 수 있음을 시사하였고, 정 등(2000)은 하수오의 에탄올 추출물을 500mg/kg 7일간 투여시 TG(Triglyceride)와 Total cholesterol 치의 상승을 억제하였다고 보고하였다. 성 등(1999)은 하수오 용매추출물(부탄올, 에틸아세테이트, 클로로포름 등) 1mg/mL 농도에서 유효적인 전자공여능과 지질과산화 억제율을

관찰하였다고 보고하였다. Emodin은 자연계에 존재하는 anthraquinone의 일종으로 *Cassia*, *Rhamnus*, *Rheum*, *Frangula* 등의 식물에 함유되어 있는 것으로 알려져 있으며, *Polygonum* 속의 식품의 줄기와 뿌리에도 많은 양이 함유되어 있다. 적하수오에서 약효를 나타내는 것으로 나타난 각종 anthraquinone 화합물들은 우리가 일상적으로 섭취하는 채소에도 분포하고 있고 여러 가지 기전을 통해 항암효과를 나타내고 있어 임상적으로 사용되고 있으나 일부 화합물에 의하 독성효과가 보고되어 있어 각 화합물의 구조와 활성에 관한 연구 및 독성 연구도 체계적으로 이뤄져야 할 것이다. Anthraquinone 화합물은 다양한 생리활성 효과가 있는 것으로 보고되었고 이 성분 가운데 함량이 많은 emodin은 monoamine oxidase 억제활성, 항균활성, 항산화활성, 항암활성, 항염증활성, myocardial protective effect 등의 작용이 보고되고 있다. Anthraquinone 화합물의 대표적인 성분인 emodin은 하수오 추출물 중에 다량 함유된 것으로 보고되었고 국내에서는 세포분열 및 분화와 관련되며 암세포분열시 그 활성이 증가되는 것으로 알려진 casein kinase II 의 활성을 낮추는 것으로 보고되며 anthraquinone 화합물 중 aloin은 쥐의 brain cortex 과산화를 억제하였고, emodin과 alizarin은 쥐의 심장 mitochondria 내에서 유도된 지질과산화를 효과적으로 저해한다고 보고되고 있다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제1절 하수오의 생화학적 성분분석 및 활성 분석

1. 재료 및 방법

가. 실험재료 및 전처리

실험에 사용된 하수오는 적하수와 대조구로서 백하수오2종 (백령도 자연산, 재배) 총 3종을 사용하였다. 하수오 시료는 완전히 마를 때까지 음건하고 분쇄기 (KA2610, Jworld tech, Gyeonggi-do, Korea)로 분쇄하였다. 분쇄된 분말시료 10 g에 80% EtOH 100 mL를 첨가하여 heating mantle (Changshin scientific Co., Korea)에서 냉각관을 연결한 후 가열하여 끓기 시작한 시점을 기준으로 3시간 동안 3회 반복 추출 후, 여과하였다. 여과액은 50 °C에서 감압 농축하여 동결건조한 후 분말로 하여 시험시료로 사용하였다. 분말로 된 시료를 실험에 사용하기 위해 필요한 농도별로 DMSO에 녹인 후 0.45 µm syringe filter로 여과하여 본 실험에 사용하였다.



Fig. 1. 적하수오 (A), 재배백하수오 (B, 건조) 및 백령도산 백하수오 외관 (C, 생물)

나. 시약 및 기기

본 실험에 사용된 시료의 추출 및 분석에는 1등급 용매를 사용하였으며 methanol, ethyl ether는 HPLC grade 제품을 사용하였고, 분석기기로 사용된 HPLC는 JASCO

사의 MD 2010plus Multiwavelength detector, AS-950-10 Intelligent sampler, LC-Net II/APC, PU-980 Intelligent HPLC pump를 사용하였다.

다. 일반성분분석

본 연구에 사용된 적하수오, 백령도산 백하수오, 재배산백하수오의 일반적인 특성의 차이를 알아보기 위해서 식품공전에 준하여 일반성분을 분석하였다. 수분은 상압가열건조법으로 105°C에서 4시간 건조하여 측정하였고, 회분은 550-600°C에서 여러 시간 가열하여 시료가 백색에서 회백색이 될 때까지 회화하여 측정하였다. 조단백질은 Kjeldahl식 질소 정량법으로 측정하였으며, 질소계수 6.25를 사용하여 환산하였다. 조지방은 에테르추출법으로 측정하였으며, 열량은 식품공전상 계산법에 의거하여 에트워터 계수를 사용하여 검체 100 g 중의 조단백질, 조지방 및 탄수화물 또는 당질의 함량에 단백질은 4, 지방은 9, 탄수화물은 4의 계수를 곱하여 각각의 에너지를 Kcal 단위로 산출하여 그 총계로 나타내었다. 탄수화물은 검체 100 g 중에서 수분, 조단백질, 조지방 및 회분의 양을 감하여 얻은 양으로서 백분율로 표시하였다.

라. 지표성분분석

적하수오 중에 존재하는 지표성분으로 알려진 emodin은 Wang 등의 방법⁽⁸⁾에 준하여 분석하였으며 건조한 적하수오, 백하수오, 재배산백하수오 각각을 10g씩 칭량하여 25 °C에서 80% EtOH 100 mL를 가하여 30분 동안 3회 반복 sonication 추출하였다. 추출물을 여과한 뒤 감압농축하여 물로 현탁시킨 후 ether로 용매분획하였고, 다시 감압농축한 농축물을 HPLC MeOH에 녹여 전체를 20 mL로 한 후 0.45 µm membrane filter로 여과한 것을 검액으로 하였다. 표준용액 조제를 위해서는 emodin (Sigma, St. Louis, MO, USA)을 HPLC MeOH에 녹여 62.5, 125, 250, 500, 750, 1,000, 2,000 µg/mL 농도로 하여 0.45 µm membrane filter로 여과하였다. 이 때 Emodin 분석은 JASCO (JASCO Co., Japan) HPLC pump (Model PU-980), column oven (Model CO-965), autoinjector (Model AS-950-10) 및 UV/VIS detector (Model UV-975)로 구성된 HPLC를 이용하여 Nova-Pak C18 column (60 Å, 3.9×300 mm, Waters, Milford, MA, USA)으로 30°C, 254 nm에서 검출하였으며, Table 1의 조건으로 분석하였다.

Table 1. Condition of mobile phase for HPLC analysis of Emodin

Mobile phase		A : 100% H ₂ O B : 100% CH ₃ OH		
Gradient table	Time	Flow (mL/min)	%A	%B
	0	1.0	100	0
	5	1.0	100	0
	30	1.0	0	100
	35	1.0	0	100

마. 세포독성분석

본 실험에 사용한 인간의 제대정맥 혈관내피세포인 HUVEC 세포는 Biobud, (Seoul, Korea)에서 분양받았으며, 인간의 간세포인 HepG2 세포는 ATCC (Rockville, MD, USA)에서 분양받아 사용하였다. 세포배양을 위해 10% FBS (Gibco)와 1% penicillin-streptomycin (Gibco)을 첨가하여 HUVEC 세포는 EBM-2 (Lonza, Walkersville, MD, USA) 배지에서 HepG2 세포는 MEM (Gibco, Grand Island, NY, USA) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

하수오의 EtOH 추출물의 세포 독성 측정은 MTS assay 방법으로 분석하였다.⁽⁹⁻¹¹⁾ 이는 살아있는 미토콘드리아의 dehydrogenase에 의해 노란색의 MTS tetrazolium compound가 갈색을 띄는 보라색의 formazan으로 전환되는 것을 측정하는 것이다. HUVEC 세포의 경우에는 96-well plate에 1×10³ cells/well의 농도로 분주하고, HepG2 세포의 경우에는 1×10⁴ cells/well의 농도로 분주하여 24시간 후 하수오 추출물을 농도별 (0, 25, 50, 100, 150, 200 µg/mL)로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 24시간 후에 well당 20 µL의 MTS solution (Celltiter 96[®] Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega, Madison, WI, USA)을 첨가하여 2시간 동안 37°C에서 반응시킨 후, microplate reader를 이용하여 490 nm에서 흡광도의 변화를 측정, 대조군에 대한 세포증식률을 백분율로 표시하였다.

바. Flavonoid 함량

적하수오, 백하수오 및 재배 백하수오 3종의 80% 에탄올 추출물을 대상으로 플라보노이드 함량을 분석하였다. 실험 전 0.45 µm의 syringe filter를 사용하여 여과하

였다. 총 플라보노이드 함량의 측정은 시료 0.5 mL에 증류수 3.2 mL을 첨가한 후 0.15 mL의 5% NaNO_2 와 5분간 반응시켰다⁽¹²⁾. 5분 후 10% AlCl_3 용액을 첨가하여 다시 1분간 반응시킨 후 1 M NaOH 를 넣고 잘 섞어주며 즉시 510 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 플라보노이드 함량은 catechin을 이용하여 만들어진 표준곡선을 이용하여 함량을 구하였다.

사. Total phenolic acid 함량

총 페놀함량은 Folin-Ciocalteu's phenol 시약을 이용한 colorimetric analysis법을 이용하였다^(13, 14). 시료용액에 증류수 2.6 mL과 Folin & Ciocalteu's phenol reagent 200 μL 를 첨가하여 잘 섞은 후 6분간 상온에서 반응시켰다. 혼합한 용액에 2 mL의 7% Na_2CO_3 solution을 첨가 후 1시간 30분 동안 방치시켰다. 750 nm에서 흡광도를 측정했으며 표준곡선의 검량선을 작성하기 위해 gallic acid를 이용하였다.

아. 항산화활성분석

식물의 뿌리나 잎에서 만들어지는 모든 화학 물질을 통틀어 일컫는 개념으로 식물 중에 존재하는 성분들 중 인체에 유익한 생리활성을 가진 성분들을 phytochemical 이라 한다. 이러한 phytochemical 중 플라보노이드나 페놀성 화합물은 radical acceptor로서 좋은 conjugated double bond 구조로 환원성이 강해 free radical에 전자를 공여하여⁽¹⁵⁾ 항산화 작용이 뛰어난 것으로 알려져 있다. 본 실험에서는 적하수 오 및 백하수오의 항산화 활성 효능을 알아보기 위하여 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼 소거활성, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) 라디칼 소거활성 및 superoxide dismutase (SOD) 저해 활성을 측정하였다.

1) DPPH radical 소거활성

세포가 성장하고 자라면서 발생하는 free radical에 의해 세포가 산화되어 손상된다. 페놀성 화합물은 환원성이 강해서 free radical에 전자를 공여하여 산화를 억제하는 항산화 능력이 있다고 알려져 있다. DPPH는 자체가 안정한 free radical을 지니고 있는 화합물로 항산화물질에 의해 환원되어 항산화 능력을 확인하는데 널리 사용되는 물질이다^(16, 17). DPPH 라디칼 소거능 실험은 Brand-Williams 등의 방

법을 응용하여 측정하였다⁽¹⁸⁾. DPPH 100 μ M과 80% 메탄올을 혼합하여 radical 용액을 제조하였다. 각 시료 50 μ L에 radical 용액 2.95 mL을 첨가하여 23 $^{\circ}$ C에서 30분간 어두운 장소에서 방치하였다. 이 때 DPPH radical 소거능은 vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC)으로 나타내었으며 517 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2) ABTS radical 소거활성

blue/green ABTS radicals을 이용하여 하수오의 항산화능을 측정하였다⁽¹⁹⁾. 1.0 mM AAPH (2,2'-azobis-(2-amidinopropane)HCl)에 2.5 mM ABTS²⁻(2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt), 100 mL의 PBS 용액을 혼합, 70 $^{\circ}$ C water bath에서 30분간 반응시켜 ABTS radical solution을 만들었다. PVDF 0.45 μ m (Gelman)를 이용하여 radical solution의 부유물을 걸러 준 후 PBS buffer를 이용하여 734 nm에서 0.650 ± 0.020 의 흡광도로 ABTS-(stable oxidized free radical) solution을 희석하였다. 980 μ L의 Radical solution과 20 μ L의 sample을 10분간 반응 후 37 $^{\circ}$ C, 734 nm에서 absorbance reduction을 측정하여 vitamin C equivalents antioxidant capacity (VCEAC)로 나타내었다.

3) SOD 소거활성

SOD는 사람과 동물의 장기와 혈액 내에 존재하는 생리활성 효소로 유해 산소를 제거하는 역할을 한다. SOD 유사활성 물질은 phytochemical에 속하는 물질이 SOD와 유사한 역할을 하여 superoxide radical의 반응성을 억제, 생체를 보호한다고 보고되어 있다⁽²⁰⁾. SOD 유사활성의 측정은 SOD Assay kit-wst (Dojindo, Rockvill, MD, USA)를 사용하였다. 96 well plate에 sample 20 μ L를 취한 후 WST working solution 200 μ L과 enzyme working solution 20 μ L를 넣고 반응시켰다. Blank 2와 3에는 dilution buffer 20 μ L와 WST working solution 200 μ L를 반응시켰다. micro reader를 사용하여 450 nm에서 측정하고 그 결과는 다음의 식에 대입하여 SOD 소거활성을 측정하였다.

$$\text{SOD activity (inhibition rate \%)} = \frac{\{(A_{\text{blank1}} - A_{\text{blank3}}) - (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank2}})\}}{(A_{\text{blank1}} - A_{\text{blank3}})} \times 100$$

2. 통계처리

본 연구의 실험결과는 평균과 표준편차로 표시하고 유의성 검정은 Sigma Plot을 이용하여 Student's t-test를 실시하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 일반성분분석

건조한 적하수오, 백하수오, 재배산백하수오 분말의 일반성분 분석 결과는 Table 2와 같다. 건조한 상태이기 때문에 3가지 하수오 모두 수분은 7-10%로 나타났다. 적하수오의 경우, 탄수화물이 81.92%로 가장 많았으며 조단백질 4.47%, 회분 4.45%, 조지방 0.27% 순서로 나타났다. 백하수오(재배)의 경우도 탄수화물이 80.27%로 가장 많았으며 조단백질 6.71%, 회분 2.44%, 조지방 0.86% 순서로 나타났다. 자연산 백하수오 역시 탄수화물이 78.45%, 조단백질 8.60%, 회분 3.59%, 조지방 1.97% 순서로 나타났다. 백하수오는 다른 하수오에 비해 조지방 및 조단백질에서 높은 값을 보였는데 현재 많이 식용하고 있는 인삼의 조지방 함량은 0.5%이며 조단백질의 경우 15.7%이다.

Table 2. Contents of nutrition facts

	Contents					
	Kcal/100g		g/100g			
	Calorie	Water	Crude lipid	Crude protein	Ash	Carbohydrate
적하수오	348	8.89	0.27	4.47	4.45	81.92
백하수오 (재배)	356	9.72	0.86	6.71	2.44	80.27
백하수오	366	7.39	1.97	8.60	3.59	78.45

나. 지표물질 정량 분석

하수오의 지표물질인 emodin을 분석하였다. Emodin의 구조는 Fig. 2와 같으며 시판되는 emodin의 표준용액을 조제하여 HPLC로 분석하였고, peak 면적과 표준용액의 농도를 변수로 하여 검량선을 작성하였다. 그 결과 62.5-2000 µg/mL의 농도 범위에서 $y = 2974x + 19970$ ($r^2 = 0.9985$)의 정비례 관계를 나타내었고 (Fig. 3) retention time은 약 30.6분이었다. 같은 조건으로 적하수오, 백하수오, 재배산 백하수오 검액에 대해 HPLC로 분석하였다 (Fig. 4). 그 결과 3가지 하수오 중 적하수오에서만 emodin이 0.015% 검출되었다. HPLC chromatogram 결과를 통해 emodin은 적하수오만의 지표물질임을 확인할 수 있었고, 3가지 하수오의 chromatogram이 다른 것으로 보아 3가지 하수오는 모두 다른 물질임을 확인할 수 있었다.

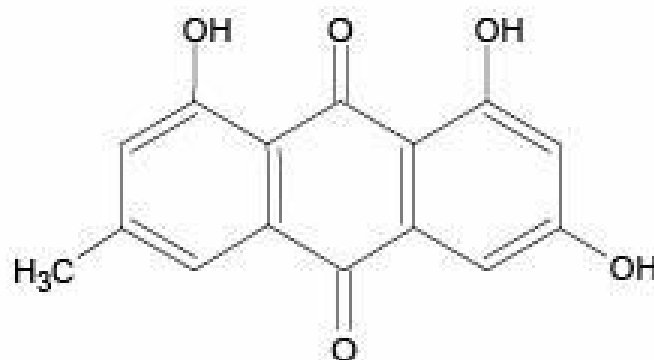


Fig. 2. Emodin 구조

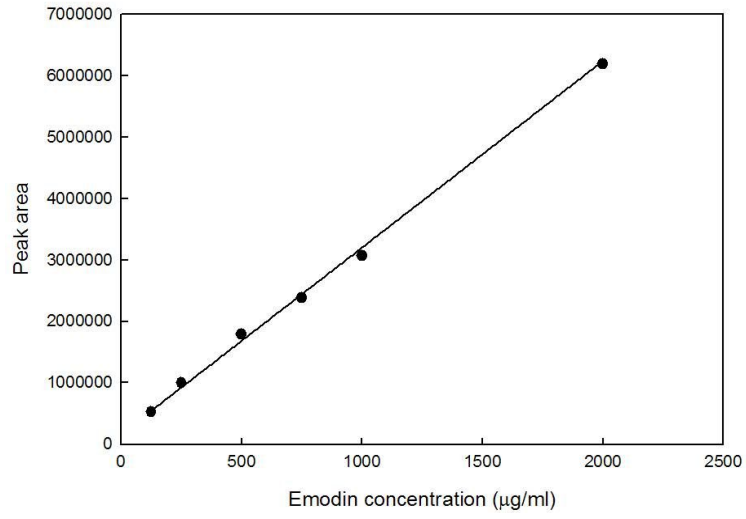


Fig. 3. Emodin 표준곡선 ($r^2 = 0.9944$)

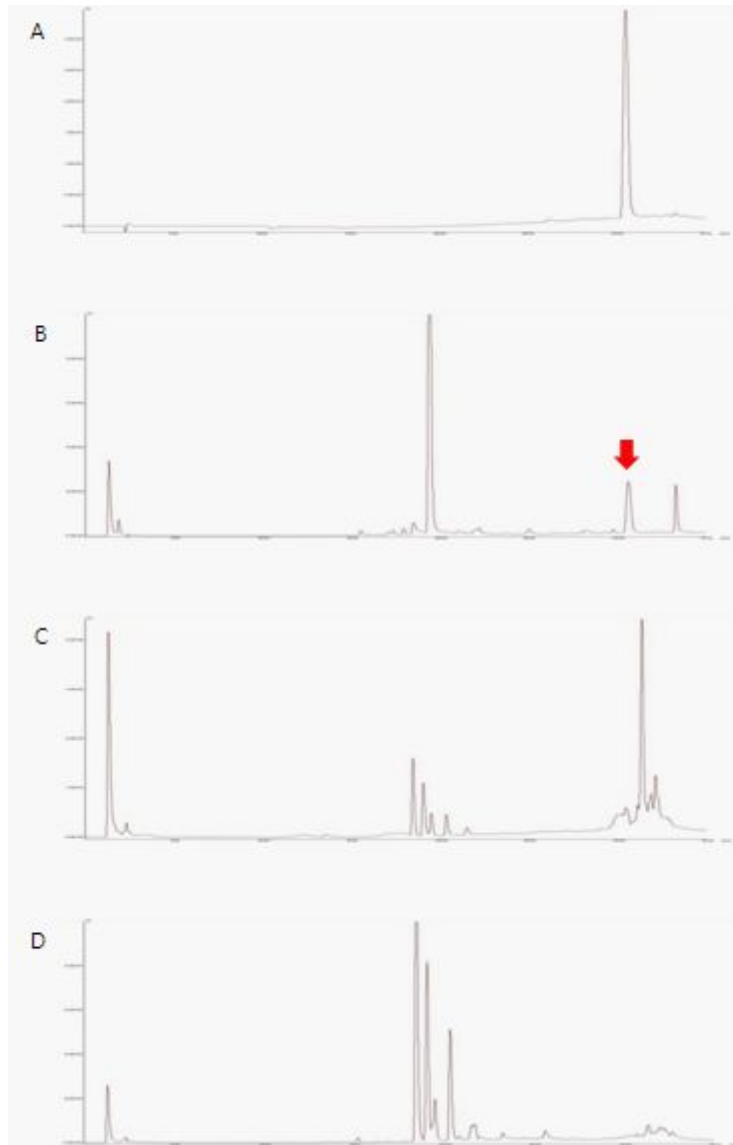


Fig. 4. HPLC 크로마토그램; emodin (A), 적하수오 (B), 백하수오 (재배, C), 백하수오 (D)¹

¹Nova-Pak C18 column; mobile phase: Water-MeOH; flow rate: 1 mL/min, UV detector: 254 nm; oven temperature: 30 °C.

다. Flavonoid 정량분석

하수오의 80% 에탄올 추출물의 플라보노이드 함량 분석 결과는 Fig. 5와 같다. Flavonoid의 함량이 농도가 증가할수록 함께 증가하여 0.01 %의 농도에서 14.56 mg/L, 1% 농도에서 76.7 mg/L의 flavonoid 함량을 나타내었으며 시료 종류의 플라

보노이드 함량의 유의적 차이는 나타나지 않았으나 적하수오의 경우 가장 높은 함량을 나타내었다.

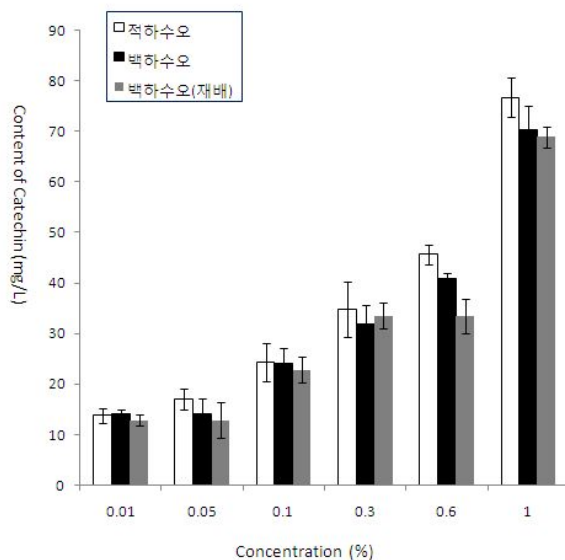


Fig. 5. 하수오 시료의 추출물 농도별 플라보노이드 함량

라. Total phenolic acid compound 정량 분석

하수오의 80% 에탄올 추출물의 총 페놀성 화합물의 함량은 Fig. 6과 같다. 0.01%의 농도에서 시료는 8.29 mg/L에서 9.10 mg/L로 비슷한 phenolic 함량을 보였으나 1% 농도에서 적하수오는 78.68 mg/L로 가장 높은 값을 보였고, 재배 백하수오는 45.37 mg/L로 가장 낮은 값을 나타내었다. 시료 모두 농도가 증가할수록 phenolic의 함량 역시 증가하지만 전반적으로 적하수오의 phenolic 함량이 가장 높고, 재배 백하수오의 phenolic 함량이 57 % 정도로 가장 낮은 값을 나타내었다.

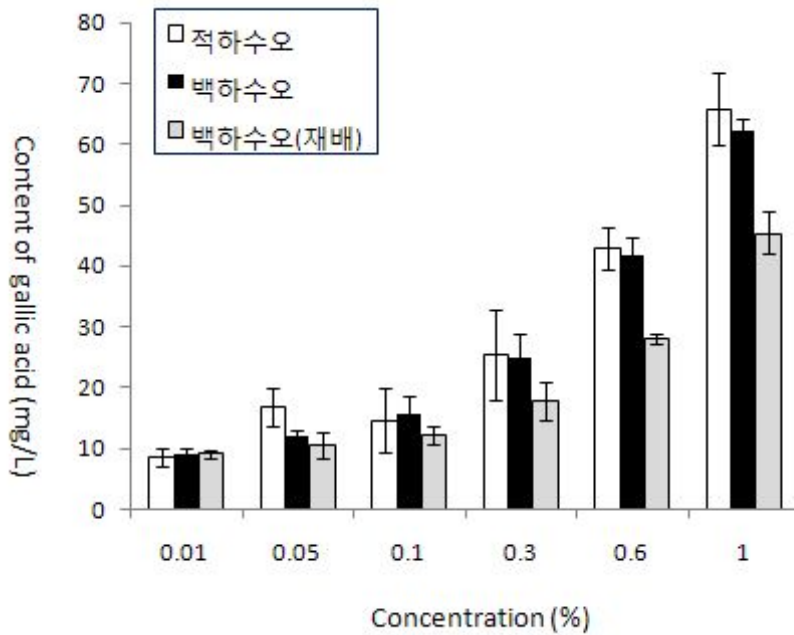


Fig. 6. 하수오 시료의 추출물 농도별 total phenolic compound 함량

마. 하수오의 세포독성 분석

인간의 체대정맥 혈관내피세포인 HUVEC 세포와 인간의 간세포인 HepG2 세포에 대한 적하수오, 백하수오, 재배산 백하수오의 세포독성을 알아보기 위하여 MTS assay를 수행하였다. 이 때 HUVEC 세포는 본 연구가 혈관계 개선효과를 알아보기 위한 것이므로 혈관내피세포로서 선택한 것이고, HepG2 세포는 음식으로 섭취한 물질이 간에 의해서 가장 먼저 해독되기 때문에 간독성을 알아보기 위해 선택하였다. 예비실험 결과에 의해 세포독성이 나타나기 시작하는 고농도를 제외한 추출물 농도 (0, 25, 50, 100, 150, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)로 24시간 동안 처리한 결과, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도까지는 두 가지 세포주 모두 독성을 나타내지 않았다 (Fig. 7, Fig. 8). 한편, Fig. 7의 A에서 적하수오의 추출물에 의해 세포가 증식하는 것처럼 보이지만 이는 적하수오 추출물 고유의 색이 MTS를 측정하는 파장대에 영향을 미쳐, 간섭의 결과로 나타나는 것이지 세포증식이 일어나는 것은 아니다.

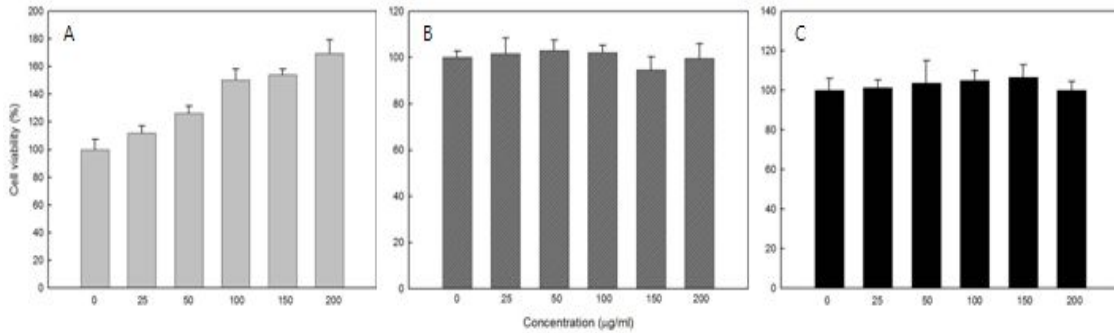


Fig. 7. Effect of *Polygonum multiflorum* (A), *Cynanchum wilfordii* (B) and *Polygonum multiflorum* from Baengnyeongdo (C) extracts on the cell viability of HUVEC cells

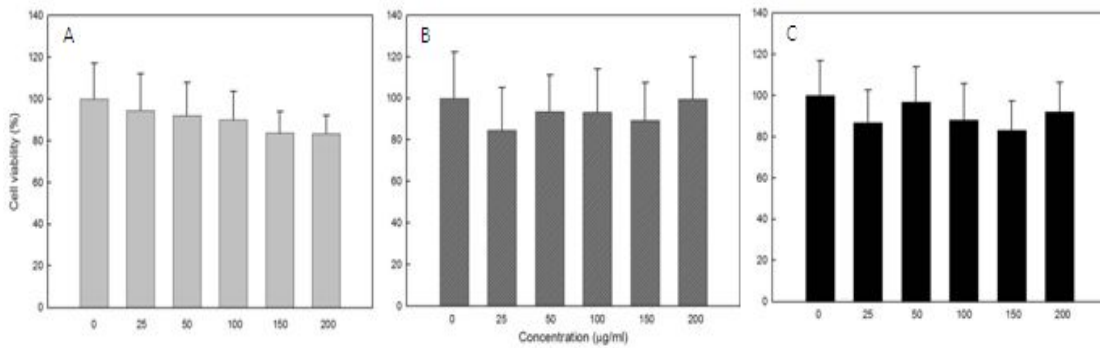


Fig. 8. Effect of *Polygonum multiflorum* (A), *Cynanchum wilfordii* (B) and *Polygonum multiflorum* from Baengnyeongdo (C) extracts on the cell viability of HepG2 cells

바. 항산화활성 분석

1) DPPH radical 소거활성

하수오 시료의 DPPH 라디칼 소거능을 비교한 결과는 Fig. 9에 제시하였다. 하수오 추출물 시료 사이의 유의적인 차이는 나타나지 않았으나 동일한 농도에서 백하수오가 가장 낮은 소거능을 나타내었다. 0.1%의 농도에서 적하수오 및 재배 백하수오의 경우 각각 29.1 mg/L, 30.36mg/L의 소거능을 나타내었으며 백하수오는 27.8 mg/L로 가장 낮은 소거능을 나타내었다. 전체적으로 농도에 따라 적하수오가 23.7 ~ 98.6 mg/L로 가장 높은 항산화 활성을 나타내었다.

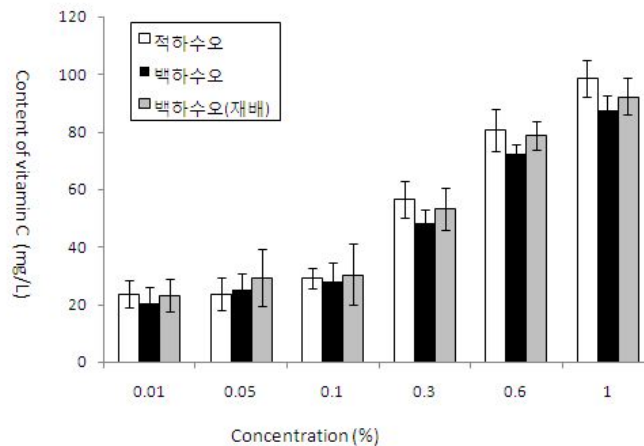


Fig. 9. 하수오 시료의 추출물 농도별 DPPH radical 소거능

2) ABTS radical 소거활성

ABTS 라디칼을 이용한 항산화 활성은 Fig. 10과 같다. 하수오 시료간의 유의적인 차이는 나타나지 않았으나 농도가 증가할수록 항산화 활성이 증가하였다. 적하수오, 백하수오 및 백하수오 (재배)의 추출물 0.01 %의 농도에서의 소거활성은 각각 9.4 mg/L, 9.5 mg/L, 7.4 mg/L를 나타내었으며 1% 농도에서는 각각 43.0 mg/L, 48.7 mg/L 및 56.2 mg/L를 나타내었다. 시료별 큰 차이를 보이지 않았으나 적하수오는 농도별로 9.4 ~ 89.2 mg/L, 백하수오는 9.5 ~ 97.2 mg/L, 재배산 백하수오의 경우 7.4 ~ 89.0 mg/L의 범위를 나타내어 자연산 백하수오의 경우 다소 높은 항산화 활성을 나타내었다.

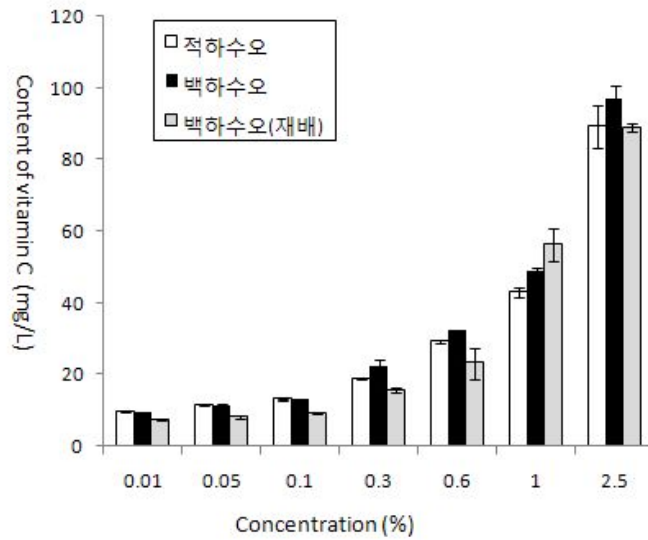


Fig. 10. 하수오 시료의 추출물 농도별 ABTS radical을 이용한 항산화 활성

3) SOD 소거활성

SOD 억제 활성 실험결과는 Fig. 11에 제시하였다. 시료간의 유의적인 차이는 나타나지 않았으나 농도가 증가할수록 SOD 억제 효능은 감소하였으며, 5% 이상의 시료 농도에서는 SOD 억제 효능이 나타나지 않았다. 결론적으로 하수오의 항산화 효능을 실험한 결과, Flavonoid, Total phenolic acid의 함량이 가장 높았던 적하수오의 경우 DPPH 라디칼 소거능 활성, ABTS 라디칼을 이용한 항산화능, SOD 억제 활성 역시 높은 것으로 나타났다.

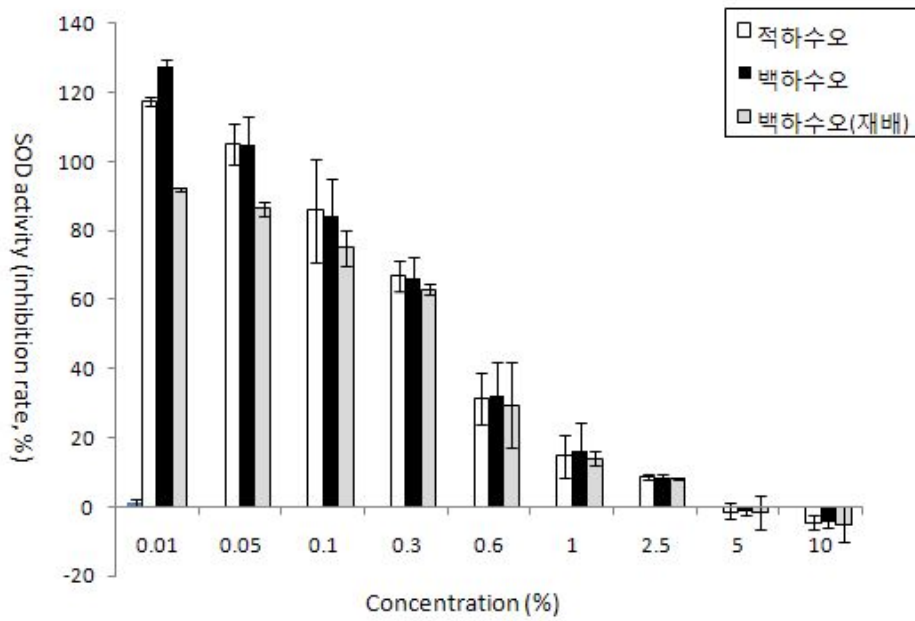


Fig. 11. 하수오 시료의 추출물 농도별 SOD 억제 활성 효능

제2절 하수오의 콜레스테롤 개선 효능 규명

1. HMG-CoA reductase 저해 활성화

가. 실험재료 및 전처리 방법

실험에 사용된 하수오는 적하수와 대조구로서 백하수오 2종 (자연산, 재배) 총 3종을 사용하였다. 하수오 시료는 완전히 마를 때까지 음건하고 분쇄기 (KA2610, Jworld tech, Gyeonggi-do, Korea)로 분쇄하였다. 분쇄된 분말시료 10 g에 80% EtOH 100 mL를 첨가하여 heating mantle (Changshin scientific Co., Korea)에서 냉각관을 연결한 후 가열하여 끓기 시작한 시점을 기준으로 3시간 동안 3회 반복 추출 후, 여과하였다. 여과액은 50 °C에서 감압 농축하여 동결건조한 후 분말로 하여 시험시료로 사용하였다. 분말로 된 시료를 실험에 사용하기 위해 필요한 농도별로 DMSO에 녹인 후 0.45 µm syringe filter로 여과하여 본 실험에 사용하였다.

나. HMG-CoA reductase inhibition activity

실험동물(SD, Sprague-Dawley, male rats weighed 200-220 g)은 일반 고형사료에 1% 콜레스테롤을 첨가한 사료를 공급하여 7일간 사육하였다. 사육이 끝난 흰쥐는 밤낮을 바꾸었고, 해부하여 간을 적출하여 무게를 측정하였다. 적출한 간 1g당 2 mL의 ice cold buffer (50 mM phosphate buffer, pH 7.0 with 0.2 M sucrose, 2 mM dithiothreitol)를 첨가한 후 PotterElvehjem type glass homogenizer로 15초간 최대속도로 균질한 후, 15,000 g에서 10분간 원심 분리하였다. 상등 액의 흰색의 지방층을 거즈나 면봉으로 완전히 제거하고 다시 100,000 g에서 70분간 초원심분리하여 상등 액을 버리고 microsome pellet을 취했다. 다시 buffer A로 microsome을 rat liver 1g당 1 mL씩 첨가하여 세척하고 100,000 g에서 60분간 초원심분리한 다음 상등 액은 버리고 -20 °C에서 보관하였다. -20 °C에서 최소 2시간에서 수 주간 보관된 microsome pellet을 실온에서 해동 후, 3 mL/1.5 g rat liver의 buffer B (50 mM phosphate buffer pH 7.0 with 0.1 M sucrose, 2mM dithiothreitol, 50 mM KCl, 30 mM EDTA)를 가하여 균질하였다. 다시 7 mL/1.5g rat liver의 buffer B를 첨가한 후에 상온에서 30분간 방치한 다음 100,000 g, 20

℃에서 60분간 초원심분리하여 상등 액을 효소원으로 하였고 사용할 때 까지 -7 0℃에서 보관하였다.

HMG-CoA reductase억제활성은 Kleinsek 등 ⁽²¹⁾의 방법에 따라 측정하였다. 1 mL cuvette에 20 μL의 각 시료 , 100 μL의 phosphate buffer (0.5 μM pH 7.0), 100uL의 DTT (20 mM), 100uL의 NADPH (3mM) , 100 μL의 효소원 을 가하고 반응 액의 온도를 37℃로 일정하게 유지하여 약 10분간 preincubation한 후, 100μL의 HMG-CoA (3mM)를 가하여 효소반응을 시작하였다. 반응이 시작됨과 동시에 340 nm에서 5분간의 흡광도 변화를 기록하였다. 각 시료는 DMSO에 용해 시켜 반응 액에 첨가하였다.

$$\text{Inhibition activity(\%)} = 1 - \frac{(\text{control의 흡광도} - \text{control blank의 흡광도})}{(\text{sample의 흡광도} - \text{sample blank의 흡광도})} \times 100$$

다. 결과 및 고찰

하수오 80% 에탄올 추출물의 농도별 HMG-CoA reductase inhibition activity를 측정한 결과는 Table 3과 같다. 추출물 농도 1000 ppm 이상에서 활성을 나타내었 으며 1000 ppm의 경우 HMG-CoA reductase inhibition activity가 적하수오, 백하 수오 및 재배 백하수오 시료에서 각각 77.9%, 49.0%, 57.9%로 나타났으며 10,000 ppm의 경우 각각 92.6%, 85.3%, 84.2%로 적하수오 시료가 가장 높은 값을 나타 내었다. HMG-CoA reductase는 콜레스테롤 생합성 단계에서 작용하는 rate-lim- iting enzyme으로써 스테롤이나 이소프레노이드계 화합물의 생합성 경로의 중간 단 계인 mevalonic acid의 합성을 매개하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다 ⁽²²⁾. 혈중 콜레스테롤, 혈중 LDL-콜레스테롤의 수치가 높을수록 관상동맥성 심장질환의 위험 성이 크다고 알려져 있어 지금까지 많은 콜레스테롤 저하제들은 높은 가격과 일부 부작용 등이 보고되고 있다. 따라서 독성이 없고 안전한 식품소재로부터의 콜레스 테롤 저하제 개발은 매우 시기 적절한 것으로 판단된다.

Table 3. HMG-CoA reductase inhibition activity of 80% EtOH extracts

(unit : %)			
농도	적하수오	백하수오	백하수오 (재배)
10 ppm	-182.7 ± 22.3	-391.2 ± 45.9	-484.2 ± 50.5
100 ppm	-72.3 ± 12.1	-62.9 ± 12.1	-87.3 ± 16.7
1,000 ppm	77.9 ± 8.2	49.0 ± 2.1	57.89 ± 3.9
10,000 ppm	92.6 ± 4.2	85.3 ± 9.4	84.21 ± 11.6

2. 동물실험을 통한 하수오의 콜레스테롤 저하 효능

가. 재료 및 방법

1) 실험재료

본 실험에 사용된 적하수오 (*Polygonum multiflorum*)와 백하수오 (*Cynanchum wilfordii*)를 세척한 후 완전히 마를 때까지 음건하고 분쇄기 (KA2610, Jworld tech, Gyeonggi-do, Korea)로 분쇄하였다. 분쇄된 분말시료 2 kg에 80% EtOH을 1:10 비율로 첨가하여 초고속 진공 저온 추출기 (COSMOS-660, KyungSeo Machine Co., Incheon, Korea)에서 끓기 시작한 시점을 기준으로 6시간 동안 95 °C에서 추출하였다. 추출액은 80 °C에서 감압 농축하여 시험시료로 사용하였다.

2) 실험동물의 사육 및 실험식이

7주령의 250 ~ 260 g의 암컷흰쥐 Sprague-Dawley종 50마리와 330 ~ 350 g 수컷흰쥐 Sprague-Dawley종 50마리를 ㈜오리엔트바이오로부터 분양 받아 고형사료와 물을 자유로이 공급하면서 적응시켰다. 1주일간 적응시킨 후 난괴법 (randomized block design)에 따라 수컷과 암컷을 각각 5마리씩 10군으로 나누어 5주간 실험 식이를 공급하였다. 실험군 (Table 4)은 정상식이군 (I)과 9개의 실험식이 군으로 나누어 식이무게의 0.5%의 적하수오 보충군 (II), 1%의 적하수오 보충군 (III), 0.5%의 백하수오 보충군 (IV), 1%의 백하수오 보충군 (V), 콜레스테롤 대조군 (VI), 콜레스테롤 - 0.5% 적하수오 보충군 (VII), 콜레스테롤 - 1% 적하수오 보충군 (VIII), 콜레스테롤 - 0.5% 백하수오 보충군 (IX), 콜레스테롤

- 1% 백하수오 보충군 (X)로 나누어 실험하였다. 실험에 사용된 식이는 AIN-93M을 기준으로 변형하여 조제하였다. 콜레스테롤군의 콜레스테롤의 첨가량은 식이무게의 1%가 첨가되었고, 하수오의 첨가량은 각각 식이무게의 0.5%와 1%를 첨가하였다. 물과 식이는 제한 없이 공급하였고 사육실의 온도 22 ± 0.5 °C, 상대습도 ($55 \pm 5\%$), 명암은 12시간 주기 (light 8:00 AM ~ 8:00 PM)로 일정하게 유지하였다. 체중과 식이섭취량은 일주일에 한번 일정한 시간에 측정하여 식이 효율을 계산하였다. 식이효율 (Food efficiency ratio: FER)은 매주 체중증가량을 같은 기간 동안 섭취한 식이섭취량으로 나누어 산출하였다.

Table 4. Design of experimental diet¹

Group (SD)	Diet composition
I	Control diet
II	Experimental diet containing 0.5% <i>Polygonum multiflorum</i> (5 g/kg of diet)
III	Experimental diet containing 1% <i>Polygonum multiflorum</i> (10 g/kg of diet)
IV	Experimental diet containing 0.5% <i>Cynanchum wilfordii</i> (5 g/kg of diet)
V	Experimental diet containing 1% <i>Cynanchum wilfordii</i> (10 g/kg of diet)
VI	Cholesterol control diet (1%, 10 g/kg of diet)
VII	Experimental diet containing 1% cholesterol and 0.5% <i>Polygonum multiflorum</i> (5 g/kg of diet)
VIII	Experimental diet containing 1% cholesterol and 1% <i>Polygonum multiflorum</i> (10 g/kg of diet)
IX	Experimental diet containing 1% cholesterol and 0.5% <i>Cynanchum wilfordii</i> (5 g/kg of diet)
X	Experimental diet containing 1% cholesterol and 1% <i>Cynanchum wilfordii</i> (10 g/kg of diet)

¹ I: Control diet, II: Experimental diet containing 0.5% *Polygonum multiflorum* (5 g/kg of diet), III: Experimental diet containing 1% *Polygonum multiflorum* (10 g/kg of diet), IV: Experimental diet containing 0.5% *Cynanchum wilfordii* (5 g/kg of diet), V: Experimental diet containing 1% *Cynanchum wilfordii* (10 g/kg of diet), VI: Cholesterol control diet (1%, 10 g/kg of diet), VII: Experimental diet containing 1% cholesterol and 0.5% *Polygonum multiflorum* (5 g/kg of diet), VIII: Experimental diet containing 1% cholesterol and 1% *Polygonum multiflorum* (10 g/kg of diet), IX: Experimental diet containing 1% cholesterol and 0.5% *Cynanchum wilfordii* (5 g/kg of diet), X: Experimental diet containing 1% cholesterol and 1% *Cynanchum wilfordii* (10 g/kg of diet)

3) 혈액 및 각종 장기의 채취

실험기간 종료 전 12시간 동안 실험동물을 절식시켰다. 혈액은 안와동맥에서 채혈 후 3,500 rpm에서 15분간 원심분리 (Desk top centrifuge, Hanikl Sci. Ind. Seoul, Korea) 하여 혈청을 채취한 후 분석 전까지 -80°C 에서 냉동 보관하였다. 혈액채취 후 즉시 실험동물을 경추 탈골시켜 희생시키고, 간을 적출하여 생리식염수에 세척, 여과지로 수분을 제거한 후 무게를 측정하였다. 간조직의 사진촬영을 위해 간의 일부조직을 취하여 포르말린용액에 보관하였다.

4) 혈액분석

혈청의 Triglyceride (TG) 분석은 triglycerides reagents kit, LDL-cholesterol은 LDL-Cholesterol kit, HDL-cholesterol은 Direct HDL-Cholesterol kit, Total cholesterol (TC)는 Cholesterol reagent kit (Bayer, USA)를 이용하여 혈액생화학 적 검사 자동분석기 ADVIA 1650 (Bayer, Japan)로 분석하였으며, Total lipid는 total lipid reagent kit (Medicos, USA)을 이용하여 Agilent 8453 photometer (Agilent, Germany)로 분석하였다.

5) 간의 조직학적 관찰

포르말린에 보관된 간 조직을 10% formalin에 고정하여 파라핀블록을 제작한 후 슬라이드 글라스에 mounting 하여 H&E 염색을 시행한 후 광학현미경 (Olympus BX51TF, Japan) 으로 100배율로 관찰, 사진 촬영 하였다.

6) 통계처리

본 연구의 모든 결과는 SPSS 12.0 for windows package를 이용하여 각 군의 평균 과 표준오차를 구하고, 실험군의 평균의 유의성은 일원배치 분산분석 (ONE-ANOVA) 검정을 수행하였으며, 각 실험군의 유의성 검정은 Duncan's multiple test에 의해 유의수준 $p < 0.05$ 에서 실시하였다.

나. 결과 및 고찰

1) 체중증가량, 식이섭취량 및 식이효율

실험기간 동안 체중증가량, 식이섭취량 및 식이효율을 비교한 결과는 Table 5와 Table 6에 제시하였다. 수컷 흰쥐의 식이섭취량은 대부분의 군에서 유의적인 차이를 보이지 않았으나 V군 (1% 백하수오), VII군 (1% cholesterol, 0.5% 적하수오), X군 (1% cholesterol, 1% 백하수오)에서 대조군에 비해 유의적으로 감소하였으며, 식이섭취량의 감소로 인해 V군, VII군, X군의 체중증가량이 유의적으로 감소하였고, 따라서 식이효율 또한 유의적으로 감소하였다 (Table 5).

암컷 흰쥐의 식이섭취량 (Table 6)은 IV군 (0.5% 백하수오), V군 (1% 백하수오), VIII군 (1% cholesterol, 1% 적하수오), X군 (1% cholesterol, 1% 백하수오)에서 대조군에 비해 유의적으로 감소하였으며, 식이섭취량의 감소로 인해 IV군, V군, VIII군, X군 체중증가량이 유의적으로 감소하였고, 이에 따라 식이효율 또한 유의적으로 감소하였다. 수컷과 암컷 모두에서 식이무게의 1%의 백하수오를 섭취한 모든 군에서 식이섭취량과 체중이 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다.

Table 5. Initial and final body weight, body weight gain, food intake, and food efficiency ratio (FER) in SD male rats¹

Group	Initial body weight (g)	Final body weight (g)	Body weight gain (g)	Food intake (g/day)	Food efficiency ratio (FER)
I	331.94 ± 9.49 ^{NS}	507.53 ± 16.41 ^a	175.59 ± 9.53 ^a	23.50 ± 1.05 ^a	0.21 ± 0.01 ^a
II	333.85 ± 10.11	502.13 ± 20.14 ^a	168.29 ± 10.41 ^{ab}	22.98 ± 0.49 ^{ab}	0.21 ± 0.01 ^{ab}
III	329.55 ± 7.16	494.59 ± 13.42 ^a	165.05 ± 8.74 ^{ab}	23.26 ± 0.81 ^a	0.20 ± 0.01 ^{ab}
IV	335.54 ± 4.75	503.28 ± 16.60 ^a	167.74 ± 14.80 ^{ab}	21.57 ± 0.70 ^{abc}	0.22 ± 0.02 ^a
V	328.76 ± 6.32	449.16 ± 10.37 ^{bc}	120.41 ± 4.69 ^c	20.04 ± 0.58 ^{bc}	0.17 ± 0.01 ^{bc}
VI	332.05 ± 5.23	504.19 ± 16.66 ^a	172.14 ± 12.23 ^a	22.49 ± 1.22 ^{ab}	0.22 ± 0.02 ^a
VII	334.93 ± 6.88	421.04 ± 14.80 ^{cd}	86.11 ± 9.51 ^d	19.26 ± 1.54 ^c	0.13 ± 0.01 ^d
VIII	335.57 ± 4.06	472.65 ± 17.31 ^{ab}	137.07 ± 13.97 ^{bc}	24.08 ± 1.29 ^a	0.16 ± 0.01 ^{cd}
IX	328.57 ± 2.57	514.19 ± 11.12 ^a	185.62 ± 11.85 ^a	23.07 ± 0.83 ^{ab}	0.23 ± 0.01 ^a
X	317.50 ± 3.92	394.03 ± 5.42 ^d	76.54 ± 5.65 ^d	16.32 ± 0.28 ^d	0.13 ± 0.01 ^{cd}

¹ I: Control (control diet meets the requirements in the AIN-93M formulations), II: Experimental diet containing 0.5% *Polygonum multiflorum* (5 g/kg of diet), III: Experimental diet containing 1% *Polygonum multiflorum* (10 g/kg of diet), IV: Experimental diet containing 0.5% *Cynanchum wilfordii* (5 g/kg of diet), V: Experimental diet containing 1% *Cynanchum wilfordii* (10 g/kg of diet), VI: Cholesterol control (1%, 10 g/kg of diet), VII: Experimental diet containing 1% cholesterol and 0.5% *Polygonum multiflorum* (5 g/kg of diet), VIII: Experimental diet containing 1% cholesterol and 1% *Polygonum multiflorum* (10 g/kg of diet), IX: Experimental diet containing 1% cholesterol and 0.5% *Cynanchum wilfordii* (10g/kg of diet), X: Experimental diet containing 1% cholesterol and 1% *Cynanchum wilfordii* (10 g/kg of diet) All data are expressed means ± SEM, n = 5 rats per group. Different letters in a column indicate significantly different values assessed by Duncan's multiple test ($P < 0.05$). NS (not significant)

Table 6. Initial and final body weight, body weight gain, food intake, and food efficiency ratio (FER) in SD female rats¹

Group	Initial body weight (g)	Final body weight (g)	Body weight gain (g)	Food intake (g/day)	Food efficiency ratio (FER)
I	256.17 ± 9.60 ^{NS}	365.86 ± 21.15 ^a	109.69 ± 16.93 ^a	22.01 ± 1.14 ^{ab}	0.14 ± 0.02 ^a
II	248.87 ± 10.18	334.10 ± 19.30 ^{ab}	85.23 ± 10.77 ^{ab}	22.15 ± 0.42 ^{abc}	0.12 ± 0.01 ^{abc}
III	243.47 ± 7.61	326.57 ± 17.30 ^{ab}	91.66 ± 8.67 ^{ab}	19.49 ± 0.90 ^{bc}	0.12 ± 0.01 ^{ab}
IV	238.08 ± 9.44	280.27 ± 11.28 ^{cde}	42.19 ± 7.35 ^{de}	15.61 ± 0.71 ^d	0.18 ± 0.01 ^{bcd}
V	242.27 ± 5.40	265.18 ± 6.32 ^{de}	22.91 ± 2.68 ^{ef}	15.48 ± 1.33 ^d	0.05 ± 0.01 ^d
VI	244.81 ± 5.76	321.89 ± 12.96 ^{abc}	77.09 ± 10.93 ^{bc}	18.96 ± 1.00 ^c	0.12 ± 0.01 ^{abc}
VII	248.43 ± 3.92	324.82 ± 10.65 ^{ab}	76.38 ± 9.36 ^{bc}	20.40 ± 1.13 ^{abc}	0.11 ± 0.01 ^{abc}
VIII	242.60 ± 4.29	296.31 ± 7.26 ^{bcd}	53.71 ± 6.52 ^{cd}	17.87 ± 0.13 ^{cd}	0.09 ± 0.01 ^{bcd}
IX	246.66 ± 4.43	316.52 ± 15.20 ^{bc}	61.61 ± 9.53 ^{bcd}	22.92 ± 1.13 ^a	0.09 ± 0.02 ^{bcd}
X	237.68 ± 2.82	248.12 ± 8.51 ^e	10.44 ± 8.03 ^f	7.03 ± 0.83 ^e	0.07 ± 0.03 ^{cd}

¹ I: Control (control diet meets the requirements in the AIN-93M formulations), II: Experimental diet containing 0.5% *Polygonum multiflorum* (5 g/kg of diet), III: Experimental diet containing 1% *Polygonum multiflorum* (10 g/kg of diet), IV: Experimental diet containing 0.5% *Cynanchum wilfordii* (5 g/kg of diet), V: Experimental diet containing 1% *Cynanchum wilfordii* (10 g/kg of diet), VI: Cholesterol control (1%, 10 g/kg of diet), VII: Experimental diet containing 1% cholesterol and 0.5% *Polygonum multiflorum* (5 g/kg of diet), VIII: Experimental diet containing 1% cholesterol and 1% *Polygonum multiflorum* (10 g/kg of diet), IX: Experimental diet containing 1% cholesterol and 0.5% *Cynanchum wilfordii* (10 g/kg of diet), X: Experimental diet containing 1% cholesterol and 1% *Cynanchum wilfordii* (10 g/kg of diet) All data are expressed means ± SEM, n = 5 rats per group. Different letters in a column indicate significantly different values assessed by Duncan's multiple test ($P < 0.05$). NS (not significant)

2) 장기 무게

수컷 흰쥐의 간, 신장, 비장의 상대적 증량은 Table 7에 제시하였다. 간 무게는 콜레스테롤 식이군 (VI, VII, VIII, VI, X) 모두에서 정상식이 보다 유의적으로 증가하였다. 이는 일반적으로 고 콜레스테롤을 장기간 급여시 콜레스테롤이 체외로 정상적으로 배출되지 못하고 간 내에 축적되어 간 비대증을 유발한다는 보고와

일치하였다⁽²³⁾. 콜레스테롤 보충군 중에서 일부 VIII군, VI군 (2.91 ±0.16 g/100g b.w., 3.04 ±0.17 g/100g b.w.)에서 간 무게가 대조군 VI군 (3.10 ±0.04 g/100g b.w.)과 비교하여 감소하는 경향을 보였다.

Table 7. Liver, kidney and spleen weights in SD male rats¹

Group	Liver (g/100g B.W.)	Kidney (g/100g B.W.)	Spleen (g/100g B.W.)
I	2.23 ± 0.05 ^b	0.57 ± 0.02 ^c	0.16 ± 0.02 ^b
II	2.24 ± 0.06 ^b	0.59 ± 0.02 ^{bc}	0.16 ± 0.01 ^b
III	2.33 ± 0.08 ^b	0.57 ± 0.02 ^{bc}	0.17 ± 0.01 ^{ab}
IV	2.37 ± 0.05 ^b	0.60 ± 0.18 ^{abc}	0.17 ± 0.00 ^{ab}
V	2.56 ± 0.09 ^b	0.64 ± 0.02 ^{ab}	0.18 ± 0.01 ^{ab}
VI	3.10 ± 0.04 ^a	0.59 ± 0.02 ^{bc}	0.18 ± 0.01 ^{ab}
VII	3.21 ± 0.07 ^a	0.66 ± 0.01 ^a	0.19 ± 0.01 ^{ab}
VIII	2.91 ± 0.16 ^a	0.59 ± 0.03 ^{bc}	0.17 ± 0.01 ^{ab}
IX	3.04 ± 0.17 ^a	0.60 ± 0.01 ^{abc}	0.20 ± 0.01 ^a
X	3.10 ± 0.09 ^a	0.64 ± 0.03 ^{ab}	0.19 ± 0.01 ^{ab}

¹ I: Control (control diet meets the requirements in the AIN-93M formulations), II: Experimental diet containing 0.5% *Polygonum multiflorum* (5 g/kg of diet), III: Experimental diet containing 1% *Polygonum multiflorum* (10 g/kg of diet), IV: Experimental diet containing 0.5% *Cynanchum wilfordii* (5 g/kg of diet), V: Experimental diet containing 1% *Cynanchum wilfordii* (10 g/kg of diet), VI: Cholesterol control (1%, 10 g/kg of diet), VII: Experimental diet containing 1% cholesterol and 0.5% *Polygonum multiflorum* (5 g/kg of diet), VIII: Experimental diet containing 1% cholesterol and 1% *Polygonum multiflorum* (10 g/kg of diet), IX: Experimental diet containing 1% cholesterol and 0.5% *Cynanchum wilfordii* (10 g/kg of diet), X: Experimental diet containing 1% cholesterol and 1% *Cynanchum wilfordii* (10 g/kg of diet) All data are expressed means ± SEM, n = 5 rats per group. Different letters in a column indicate significantly different values assessed by Duncan's multiple test ($P < 0.05$)

암컷 흰쥐의 간, 신장, 비장의 상대적 증량은 Table 8에 제시하였다. 간 무게는 수컷과 유사하게 콜레스테롤 식이군 (VI, VII, VIII, VI, X) 모두에서 정상식이 보다

유의적으로 증가하였고, 적하수오와 백하수오를 보충공급한 군 (VII, VIII, VI, X)에서 VI군 (3.28 ± 0.11 g/100 b.w.) 과 비교하여 유의적으로 감소하였다. 이로 미루어 적하수오와 백하수오의 보충공급이 고 콜레스테롤의 장기간 공급으로 인해 유도된 간 비대증의 지질축적량을 감소시키는데 긍정적인 효과를 나타낼 수 있음을 시사한다.

Table 8. Liver, kidney and spleen weights in SD female rats¹

Group	Liver (g/100g B.W.)	Kidney (g/100g B.W.)	Spleen (g/100g B.W.)
I	2.19 ± 0.07^d	0.53 ± 0.02^d	0.15 ± 0.01^d
II	2.29 ± 0.07^{cd}	0.55 ± 0.01^{cd}	0.18 ± 0.01^{cd}
III	2.29 ± 0.01^{cd}	0.54 ± 0.02^d	0.17 ± 0.01^{cd}
IV	2.45 ± 0.06^c	0.67 ± 0.01^{ab}	0.20 ± 0.02^{abc}
V	2.48 ± 0.13^c	0.67 ± 0.03^{ab}	0.23 ± 0.01^a
VI	3.28 ± 0.11^a	0.57 ± 0.01^{cd}	0.19 ± 0.02^{cd}
VII	2.98 ± 0.08^b	0.55 ± 0.02^{cd}	0.20 ± 0.01^{abc}
VIII	2.77 ± 0.03^b	0.64 ± 0.02^{ab}	0.18 ± 0.01^{cd}
IX	2.74 ± 0.09^b	0.61 ± 0.02^{bc}	0.19 ± 0.01^{bcd}
X	2.78 ± 0.07^b	0.70 ± 0.02^a	0.22 ± 0.01^{ab}

¹ I: Control (control diet meets the requirements in the AIN-93M formulations), II: Experimental diet containing 0.5% *Polygonum multiflorum* (5 g/kg of diet), III: Experimental diet containing 1% *Polygonum multiflorum* (10 g/kg of diet), IV: Experimental diet containing 0.5% *Cynanchum wilfordii* (5 g/kg of diet), V: Experimental diet containing 1% *Cynanchum wilfordii* (10 g/kg of diet), VI: Cholesterol control (1%, 10 g/kg of diet), VII: Experimental diet containing 1% cholesterol and 0.5% *Polygonum multiflorum* (5 g/kg of diet), VIII: Experimental diet containing 1% cholesterol and 1% *Polygonum multiflorum* (10 g/kg of diet), IX: Experimental diet containing 1% cholesterol and 0.5% *Cynanchum wilfordii* (10 g/kg of diet), X: Experimental diet containing 1% cholesterol and 1% *Cynanchum wilfordii* (10 g/kg of diet) All data are expressed means \pm SEM, n = 5 rats per group. Different letters in a column indicate significantly different values assessed by Duncan's multiple test ($P < 0.05$)

3) 혈청내 aspartate aminotransferase (AST)와 alanine aminotransferase (ALT)의 측정

하수오의 첨가 수준을 달리하여 5주간 급여한 흰쥐의 혈청 중 AST, ALT의 활성을 측정한 결과는 Table 9와 Table 10에 제시하였다. Park의 연구에서는 2% 콜레스테롤 식이에 의하여 ALT와 AST 활성이 증가하였다고 보고하였는데, 본 연구에서도 1% 콜레스테롤의 보충군 (VI, VII, VIII, VI, X) 에서 혈청 ALT와 AST 활성이 대조군 (I) 보다 증가하는 경향을 보였으나 유의적인 차이는 나타나지 않았다⁽²⁴⁾. 암컷 흰쥐의 AST 활성은 적하수오와 백하수오를 보충 공급시 활성이 줄어드는 경향을 보였다. Kim의 연구에서는 고지혈증 및 당뇨 유발 쥐에 백하수오 추출물을 자유로이 공급했을 때 AST의 활성이 대조군과 비교하여 감소하는 것으로 보고하여 본 연구와 일치하였다⁽²⁵⁾. 간장 장애의 지표가 되는 AST 및 ALT의 활성은 각종 간장 질병, 심근경색, 지방간 및 용혈 등에 의해 혈중으로 방출되어 나타나는 것으로 보고되고 있다⁽²⁶⁾.

Table 9. Serum AST (SGOT) and ALT (SGPT) activities in SD male rats¹

Group	AST (U/L)	ALT (U/L)
I	107.75 ± 2.39 ^{bcd}	40.33 ± 3.53 ^b
II	103.00 ± 8.53 ^{cde}	36.50 ± 0.96 ^b
III	98.40 ± 2.93 ^{de}	34.00 ± 1.10 ^b
IV	99.00 ± 5.97 ^{de}	35.33 ± 2.03 ^b
V	82.20 ± 5.08 ^e	33.25 ± 0.48 ^b
VI	124.50 ± 8.27 ^{bc}	50.20 ± 8.38 ^b
VII	107.60 ± 6.53 ^{bcd}	40.00 ± 1.53 ^b
VIII	115.50 ± 8.62 ^{bcd}	42.33 ± 2.33 ^b
IX	246.33 ± 16.18 ^a	125.33 ± 25.54 ^a
X	141.33 ± 12.44 ^b	54.33 ± 12.35 ^b

¹ I: Control (control diet meets the requirements in the AIN-93M formulations), II: Experimental diet containing 0.5% *Polygonum multiflorum* (5 g/kg of diet), III: Experimental diet containing 1% *Polygonum multiflorum* (10 g/kg of diet), IV: Experimental diet containing 0.5% *Cynanchum wilfordii* (5 g/kg of diet), V: Experimental diet containing 1% *Cynanchum wilfordii* (10 g/kg of diet), VI: Cholesterol control (1%, 10 g/kg of diet), VII: Experimental diet containing 1% cholesterol and 0.5% *Polygonum multiflorum* (5 g/kg of diet), VIII: Experimental diet containing 1% cholesterol and 1% *Polygonum multiflorum* (10 g/kg of diet), IX: Experimental diet containing 1% cholesterol and 0.5% *Cynanchum wilfordii* (10 g/kg of diet), X: Experimental diet containing 1% cholesterol and 1% *Cynanchum wilfordii* (10 g/kg of diet) All data are expressed means ± SEM, n = 5 rats per group. Different letters in a column indicate significantly different values assessed by Duncan's multiple test ($P < 0.05$).

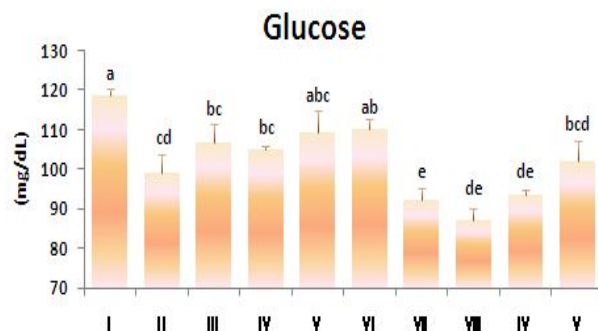
Table 10. Serum AST (SGOT) and ALT (SGPT) activities in SD female rats¹

Group	AST (U/L)	ALT (U/L)
I	97.20 ± 2.91 ^{ab}	32.80 ± 2.78 ^{bc}
II	77.25 ± 2.87 ^b	28.25 ± 0.25 ^c
III	79.75 ± 3.20 ^{ab}	28.50 ± 1.32 ^c
IV	86.75 ± 3.54 ^{ab}	28.40 ± 1.91 ^c
V	94.00 ± 3.11 ^{ab}	35.00 ± 1.52 ^{bc}
VI	109.40 ± 12.21 ^a	41.80 ± 5.85 ^{abc}
VII	108.00 ± 32.88 ^{ab}	58.33 ± 23.62 ^a
VIII	98.67 ± 4.10 ^{ab}	48.75 ± 3.97 ^{ab}
IX	83.00 ± 4.06 ^{ab}	35.50 ± 4.17 ^{bc}
X	81.20 ± 2.69 ^{ab}	28.60 ± 2.56 ^c

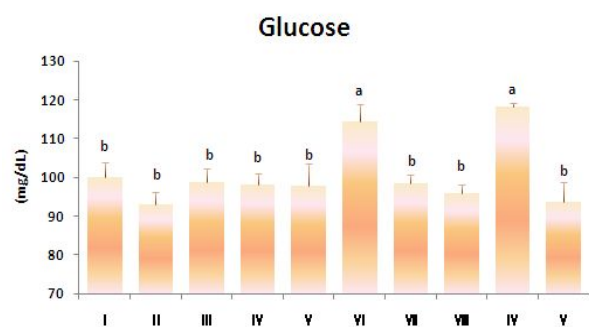
¹ I: Control (control diet meets the requirements in the AIN-93M formulations), II: Experimental diet containing 0.5% *Polygonum multiflorum* (5 g/kg of diet), III: Experimental diet containing 1% *Polygonum multiflorum* (10 g/kg of diet), IV: Experimental diet containing 0.5% *Cynanchum wilfordii* (5 g/kg of diet), V: Experimental diet containing 1% *Cynanchum wilfordii* (10 g/kg of diet), VI: Cholesterol control (1%, 10 g/kg of diet), VII: Experimental diet containing 1% cholesterol and 0.5% *Polygonum multiflorum* (5 g/kg of diet), VIII: Experimental diet containing 1% cholesterol and 1% *Polygonum multiflorum* (10 g/kg of diet), IX: Experimental diet containing 1% cholesterol and 0.5% *Cynanchum wilfordii* (10 g/kg of diet), X: Experimental diet containing 1% cholesterol and 1% *Cynanchum wilfordii* (10 g/kg of diet) All data are expressed means ± SEM, n = 5 rats per group. Different letters in a column indicate significantly different values assessed by Duncan's multiple test ($P < 0.05$).

4) 혈청 glucose 함량 및 지질성상의 영향

혈청 내 포도당 농도는 Fig. 12에 제시하였다. 혈당은 수컷 흰쥐에서 적하수오, 백하수오 급여군 (II, III, IV, V, VII, VIII, IX)에서 대조군 I군 (118.67 ± 1.86 mg/dL) 보다 유의적으로 감소하였고, 암컷 흰쥐에서는 콜레스테롤 군에서 적하수오, 백하수오 급여군 (VII, VIII, X)에서 콜레스테롤 대조군 VI군 (118.67 ± 1.86 mg/dL)과 비교하여 혈당이 유의적으로 감소한 것으로 미루어 적하수오와 백하수오의 보충공급이 혈당강하효과를 내재하고 있을 가능성을 나타내었다.



(A)



(B)

Fig. 12. Serum glucose concentration in SD male and female rats (A) SD male, (B) SD female¹

¹ I: Control (control diet meets the requirements in the AIN-93M formulations), II: Experimental diet containing 0.5% *Polygonum multiflorum* (5 g/kg of diet), III: Experimental diet containing 1% *Polygonum multiflorum* (10 g/kg of diet), IV: Experimental diet containing 0.5% *Cynanchum wilfordii* (5 g/kg of diet), V: Experimental diet containing 1% *Cynanchum wilfordii* (10 g/kg of diet), VI: Cholesterol control (1%, 10 g/kg of diet), VII: Experimental diet containing 1% cholesterol and 0.5% *Polygonum multiflorum* (5 g/kg of diet), VIII: Experimental diet containing 1% cholesterol and 1% *Polygonum multiflorum* (10 g/kg of diet), IX: Experimental diet containing 1% cholesterol and 0.5% *Cynanchum wilfordii* (10 g/kg of diet), X: Experimental diet containing 1% cholesterol and 1% *Cynanchum wilfordii* (10 g/kg of diet)

Bars represent as means \pm SEM, n = 5 rats per group. Different letters indicate significantly different values assessed by Duncan's multiple test ($P < 0.05$).

수컷과 암컷의 혈청 내 지질농도를 분석한 결과는 Table 11과 Table 12에 각각 제시하였다. 혈청 내 총지질의 함량 측정 결과 대부분의 군에서 유의적인 차이는 나타나지 않았으나 수컷과 암컷 모두에서 적하수오와 백하수오의 추출물의 보충으로 인해 총 지질 함량을 낮추는 경향을 보였다. 혈청 내 중성지방 함량 (Fig. 13)은 수컷과 암컷 모두에서 대조군에 비해 하수오 추출물을 보충 공급한 군에서 중성지방 함량이 유의적으로 감소하는 것을 확인하였으며, 콜레스테롤 군에서도 콜레스테롤 대조군 (VI)와 비교하여 감소하는 경향을 보여 하수오의 급여가 혈청 중성지방 저하에 상당한 영향을 준 것으로 확인되었다. 이는 Ham 등의 연구에서 백하수오 추출물을 고지혈증이 유발된 흰쥐에 경구투여 했을 때 혈중 중성지방의 농도를 유의적으로 감소시켰다고 보고하여 본 연구와 일치하는 바이다⁽²⁷⁾. 혈청 내 HDL-cholesterol의 함량은 Fig. 14에 제시하였다. 수컷 쥐의 대조군 I군 (12.40 ± 0.75 mg/dL)과 비교하여 콜레스테롤 대조군 VI군 (10.00 ± 0.71 mg/dL)의 HDL-cholesterol의 농도가 감소하는 것으로 확인되었다. 적하수오와 백하수오를 보충공급한 군 모두에서 대조군과 비교하여 HDL-cholesterol의 함량이 증가하였고, 백하수오 1%의 보충 공급군에서 가장 크게 증가하였다. 이와 유사하게 암컷 쥐의 HDL-cholesterol 농도는 대조군 I군 (17.33 ± 0.88 mg/dL)과 비교하여 콜레스테롤 대조군 VI군 (10.20 ± 2.87 mg/dL)의 HDL-cholesterol의 농도가 감소하는 것으로 확인되었고, 적하수오와 백하수오를 보충공급시 HDL-cholesterol의 농도가 유의적으로 증가하였다. 또한, 백하수오 1%를 보충공급시 가장 크게 증가 (30.00 ± 2.17 mg/dL)하여 수컷과 동일한 결과를 나타냈다. HDL-cholesterol은 조직에서 간으로 콜레스테롤을 운반하는 항동맥경화성 지단백으로서 본 연구의 적하수오 및 백하수오의 보충공급에 의한 혈청 HDL-cholesterol 농도의 상승으로 미루어 보아 혈청 지질개선 효과가 있는 것으로 사료되어진다. 혈청 내 LDL-cholesterol의 함량은 수컷 대조군 I군 (5.50 ± 0.29 mg/dL)과 비교하여 콜레스테롤 대조군 VI군 (10.00 ± 2.00 mg/dL)으로 콜레스테롤의 보충공급이 혈중 LDL-cholesterol의 농도를 증가시킴이 확인되었다. 이는 Kim 등의 연구에서 고 콜레스테롤 식이가 혈청 HDL-cholesterol의 함량을 낮추고 LDL-cholesterol의 함량을 높이는 것으로 보고하였는데 본 연구에서도 식이무게의 1%의 콜레스테롤의 보충공급이 HDL-cholesterol (VI)의 함량을 낮추고 LDL-cholesterol 함량 (VI)을 높이는 것을 확인하였다⁽²⁸⁾. LDL-cholesterol의 농도는 대부분의 수컷과 암컷 모두에서 유의의적 차이를 보이

지 않았으나 수컷의 일부 군 (V, X) 에서 증가하였다.

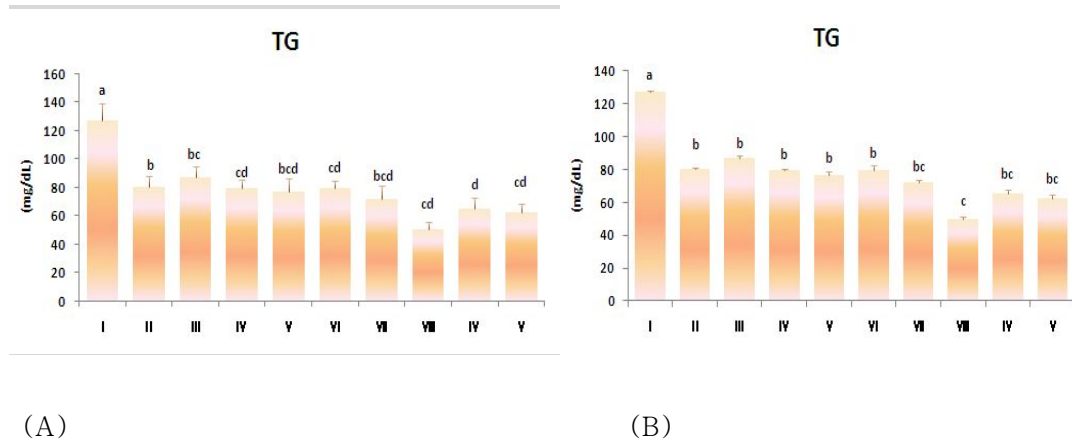


Fig. 13. Serum TG concentration in SD male and female rats (A) SD male, (B) SD female¹

¹ I: Control (control diet meets the requirements in the AIN-93M formulations), II: Experimental diet containing 0.5% *Polygonum multiflorum* (5 g/kg of diet), III: Experimental diet containing 1% *Polygonum multiflorum* (10 g/kg of diet), IV: Experimental diet containing 0.5% *Cynanchum wilfordii* (5 g/kg of diet), V: Experimental diet containing 1% *Cynanchum wilfordii* (10 g/kg of diet), VI: Cholesterol control (1%, 10 g/kg of diet), VII: Experimental diet containing 1% cholesterol and 0.5% *Polygonum multiflorum* (5g/kg of diet), VIII: Experimental diet containing 1% cholesterol and 1% *Polygonum multiflorum* (10 g/kg of diet), IX: Experimental diet containing 1% cholesterol and 0.5% *Cynanchum wilfordii* (10 g/kg of diet), X: Experimental diet containing 1% cholesterol and 1% *Cynanchum wilfordii* (10 g/kg of diet) Bars represent as means \pm SEM, n = 5 rats per group. Different letters indicate significantly different values assessed by Duncan's multiple test ($P < 0.05$).

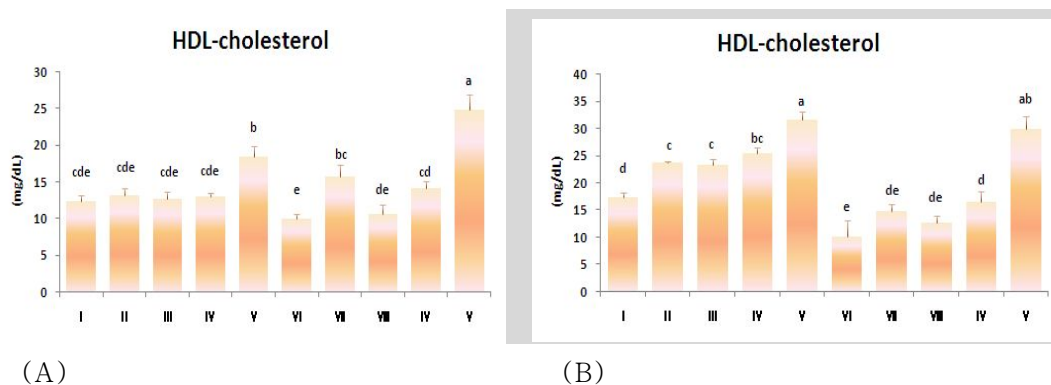


Fig. 14. Serum HDL-cholesterol concentration in SD male and female rats (A) SD male, (B) SD female¹

¹ I: Control (control diet meets the requirements in the AIN-93M formulations), II: Experimental diet containing 0.5% *Polygonum multiflorum* (5 g/kg of diet), III: Experimental diet containing 1% *Polygonum multiflorum* (10 g/kg of diet), IV: Experimental diet containing 0.5% *Cynanchum wilfordii* (5 g/kg of diet), V: Experimental diet containing 1% *Cynanchum wilfordii* (10 g/kg of diet), VI: Cholesterol control (1%, 10 g/kg of diet), VII: Experimental diet containing 1% cholesterol and 0.5% *Polygonum multiflorum* (5 g/kg of diet), VIII: Experimental diet containing 1% cholesterol and 1% *Polygonum multiflorum* (10 g/kg of diet), IX: Experimental diet containing 1% cholesterol and 0.5% *Cynanchum wilfordii* (10 g/kg of diet), X: Experimental diet containing 1% cholesterol and 1% *Cynanchum wilfordii* (10 g/kg of diet)

Bars represent as means \pm SEM, n = 5 rats per group. Different letters indicate significantly different values assessed by Duncan's multiple test ($P < 0.05$).

Table 11. Serum glucose and lipid profile in SD male rats¹

Group	Glucose (mg/dL)	Total-cholesterol (mg/dL)	HDL-cholesterol (mg/dL)	LDL-cholesterol (mg/dL)	Triglyceride (mg/dL)	Total lipid (mg/dL)
I	118.67 ± 1.86 ^a	52.75 ± 2.69 ^{bc}	12.40 ± 0.75 ^{cde}	5.50 ± 0.29 ^d	127.00 ± 12.12 ^a	397.00 ± 23.49 ^{bc}
II	99.00 ± 4.73 ^{cd}	42.33 ± 4.67 ^c	13.25 ± 0.85 ^{cde}	4.67 ± 0.33 ^d	80.67 ± 7.69 ^b	318.33 ± 21.06 ^c
III	106.67 ± 4.73 ^{bc}	44.00 ± 2.31 ^c	12.75 ± 0.85 ^{cde}	5.00 ± 0.00 ^d	87.33 ± 7.67 ^b	336.67 ± 36.92 ^c
IV	105.00 ± 1.00 ^{bc}	47.67 ± 4.26 ^c	13.00 ± 0.55 ^{cde}	5.00 ± 0.58 ^d	79.40 ± 5.94 ^b	333.00 ± 7.02 ^c
V	109.33 ± 5.70 ^{abc}	69.67 ± 3.84 ^b	18.40 ± 1.44 ^b	9.33 ± 0.67 ^{bc}	77.00 ± 9.25 ^b	340.33 ± 68.55 ^c
VI	110.20 ± 2.40 ^{ab}	69.75 ± 9.51 ^b	10.00 ± 0.71 ^e	10.00 ± 2.00 ^{bc}	79.50 ± 4.73 ^b	398.25 ± 20.32 ^{bc}
VII	92.33 ± 2.85 ^c	65.33 ± 5.81 ^b	15.80 ± 1.59 ^{bc}	7.33 ± 0.67 ^{bcd}	72.20 ± 9.18 ^{bc}	400.33 ± 21.84 ^{bc}
VIII	87.00 ± 3.11 ^{de}	48.00 ± 2.08 ^c	10.67 ± 1.20 ^{de}	7.00 ± 1.73 ^{cd}	50.20 ± 5.09 ^c	357.33 ± 17.74 ^{bc}
IX	93.67 ± 1.20 ^{de}	69.33 ± 1.45 ^b	14.20 ± 0.86 ^{cd}	10.33 ± 1.45 ^b	65.40 ± 7.00 ^{bc}	449.67 ± 13.32 ^{ab}
X	102.00 ± 5.00 ^{bcd}	93.00 ± 6.03 ^a	24.80 ± 2.18 ^a	13.33 ± 1.20 ^a	62.20 ± 5.82 ^{bc}	504.33 ± 30.99 ^a

¹ I: Control (control diet meets the requirements in the AIN-93M formulations), II: Experimental diet containing 0.5% *Polygonum multiflorum* (5 g/kg of diet), III: Experimental diet containing 1% *Polygonum multiflorum* (10 g/kg of diet), IV: Experimental diet containing 0.5% *Cynanchum wilfordii* (5 g/kg of diet), V: Experimental diet containing 1% *Cynanchum wilfordii* (10 g/kg of diet), VI: Cholesterol control (1%, 10 g/kg of diet), VII: Experimental diet containing 1% cholesterol and 0.5% *Polygonum multiflorum* (5 g/kg of diet), VIII: Experimental diet containing 1% cholesterol and 1% *Polygonum multiflorum* (10 g/kg of diet), IX: Experimental diet containing 1% cholesterol and 0.5% *Cynanchum wilfordii* (10 g/kg of diet), X: Experimental diet containing 1% cholesterol and 1% *Cynanchum wilfordii* (10 g/kg of diet) All data are expressed means ± SEM, n = 5 rats per group. Different letters in a column indicate significantly different values assessed by Duncan's multiple test ($P < 0.05$).

Table 12. Serum glucose and lipid profile in SD female rats¹

Group	Glucose (mg/dL)	Total-cholesterol (mg/dL)	HDL-cholesterol (mg/dL)	LDL-cholesterol (mg/dL)	Triglyceride (mg/dL)	Total lipid (mg/dL)
I	100.00 ± 3.74 ^b	77.25 ± 5.69 ^{NS}	17.33 ± 0.88 ^d	8.25 ± 0.48 ^b	132.33 ± 19.10 ^a	513.50 ± 33.54 ^{NS}
II	93.00 ± 3.21 ^b	74.00 ± 10.00	23.75 ± 0.25 ^c	7.50 ± 0.65 ^b	95.33 ± 15.65 ^b	494.50 ± 38.10
III	98.67 ± 3.76 ^b	74.67 ± 2.91	23.20 ± 1.20 ^c	7.50 ± 0.65 ^b	82.67 ± 26.08 ^{bc}	446.67 ± 26.19
IV	98.00 ± 3.06 ^b	83.00 ± 2.89	25.40 ± 1.17 ^{bc}	8.00 ± 0.45 ^b	57.00 ± 3.81 ^{cd}	453.67 ± 12.72
V	97.67 ± 5.90 ^b	101.33 ± 7.42	31.60 ± 1.53 ^a	9.67 ± 1.20 ^b	71.50 ± 4.72 ^{bcd}	514.33 ± 12.88
VI	114.40 ± 4.51 ^a	109.75 ± 31.36	10.20 ± 2.87 ^e	25.50 ± 12.28 ^a	53.00 ± 7.55 ^{cd}	508.00 ± 76.62
VII	98.33 ± 2.33 ^b	78.00 ± 4.73	14.75 ± 1.25 ^{de}	13.00 ± 2.65 ^{ab}	62.25 ± 8.62 ^{bcd}	400.33 ± 32.63
VIII	96.00 ± 2.00 ^b	94.00 ± 10.02	12.75 ± 1.11 ^{de}	20.00 ± 2.65 ^{ab}	53.20 ± 2.75 ^{cd}	408.50 ± 99.13
IX	118.33 ± 0.88 ^a	82.67 ± 3.71	16.40 ± 2.09 ^d	14.00 ± 0.41 ^{ab}	43.00 ± 1.96 ^d	488.33 ± 22.84
X	93.67 ± 5.21 ^b	92.00 ± 4.36	30.00 ± 2.17 ^{ab}	9.40 ± 0.24 ^b	60.50 ± 10.90 ^{cd}	470.33 ± 13.53

¹ I: Control (control diet meets the requirements in the AIN-93M formulations), II: Experimental diet containing 0.5% *Polygonum multiflorum* (5g/kg of diet), III: Experimental diet containing 1% *Polygonum multiflorum* (10g/kg of diet), IV: Experimental diet containing 0.5% *Cynanchum wilfordii* (5g/kg of diet), V: Experimental diet containing 1% *Cynanchum wilfordii* (10g/kg of diet), VI: Cholesterol control (1%, 10g/kg of diet), VII: Experimental diet containing 1% cholesterol and 0.5% *Polygonum multiflorum* (5g/kg of diet), VIII: Experimental diet containing 1% cholesterol and 1% *Polygonum multiflorum* (10g/kg of diet), IX: Experimental diet containing 1% cholesterol and 0.5% *Cynanchum wilfordii* (10g/kg of diet), X: Experimental diet containing 1% cholesterol and 1% *Cynanchum wilfordii* (10g/kg of diet) All data are expressed means ± SEM, n=5 rats per group. Different letters in a column indicate significantly different values assessed by Duncan's multiple test ($P < 0.05$). NS (not significant)

5) 간조직의 지방 축적

콜레스테롤 균의 간장의 조직사진을 Fig. 15에 제시하였다. 간장의 해부조직학적 소견은 콜레스테롤 대조군 (Fig. 15 B)이 정상식이(Fig. 15 A)에 비해 지방 축적량이 확연히 증가하였고, 콜레스테롤 군중 각각 적하수오와 백하수오를 보충 공급한 균의 지방 축적량이 콜레스테롤 대조군에 비해 줄어드는 것을 확인하였다. 간은 지방의 합성과 분해가 이루어지는 주요장기로서 적하수오와 백하수오의 추출물이 간 조직 내 지질축적량의 감소에 긍정적인 효과를 나타낼 수 있음을 시사해 준다.

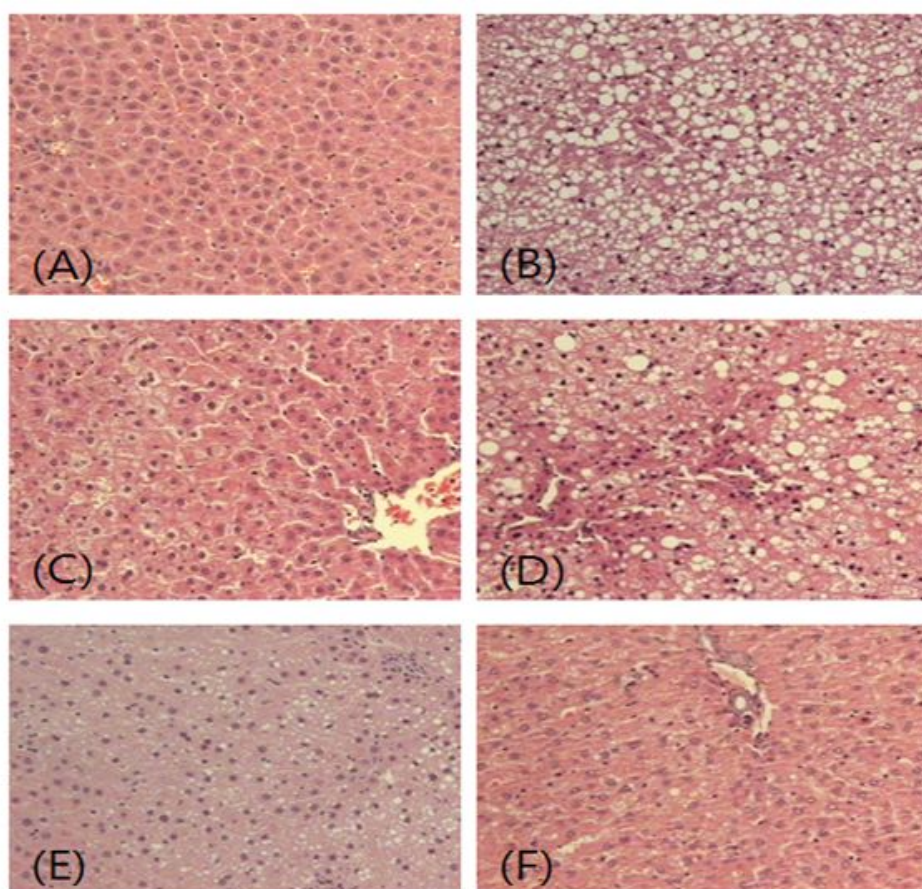


Fig. 15. Histological character of liver in SD male rats

(A) I (control), (B) VI (1% cholesterol control), (C) VII (1% cholesterol and 0.5% *Polygonum multiflorum*), (D) VIII (1% cholesterol and 1% *Polygonum multiflorum*), (E) IX (1% cholesterol and 0.5% *Cynanchum wilfordii*) and (F) X (1% cholesterol and 1% *Cynanchum wilfordii*).

제3절 하수오의 혈전 개선 효능 규명

1. 혈전용해 활성 분석

가. 실험재료 및 전처리 방법

실험에 사용된 하수오는 적하수와 대조 구로써 백하수오 2종 (자연산, 재배) 총 3종을 사용하였다. 하수오 시료는 완전히 마를 때까지 음건하고 분쇄기 (KA2610, Jworld tech, Gyeonggi-do, Korea)로 분쇄하였다. 분쇄된 분말시료 10 g에 80% EtOH 100 mL를 첨가하여 heating mantle (Changshin scientific Co., Korea)에서 냉각관을 연결한 후 가열하여 끓기 시작한 시점을 기준으로 3시간 동안 3회 반복 추출후, 여과하였다. 여과액은 50°C에서 감압 농축하여 동결건조한 후 분말로 하여 시험시료로 사용하였다. 분말로 된 시료를 실험에 사용하기 위해 필요한 농도별로 DMSO에 녹인 후 0.45 μm syringe filter로 여과하여 본 실험에 사용하였다.

나. 혈전용해활성

혈전용해 활성은 Astrup과 Mullertz의 fibrin plate법⁽²⁹⁾을 수정하여 사용하였다. 먼저 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4)에 human fibrinogen (Sigma, St. Louis, MO, USA)을 0.3%가 되도록 용해시킨 후 10 cm petri dish에 10 mL를 분주하고 human thrombin (100 U/mL, in the same buffer, Sigma, St. Louis, MO, USA) 100 μL 를 점적하였다. Fibrin clot이 형성되기 전에 0.5% agar 10 mL를 첨가하여 조심스럽게 섞어준 후 실온에서 3시간 방치하여 fibrin plate를 제조하였다. 혈전용해 활성을 측정하기 위해서는 지름 0.8 cm의 paper disc를 fibrin plate 위에 올려놓고 시료 50 μL 를 조심스럽게 점적하여 37°C에서 20시간 동안 반응시킨 후 생성된 투명환의 크기를 측정하였다. 이 때 사용된 시료는 0-200 mg/mL DMSO 농도로 제조하였고, 대조구로는 시료 대신 0-20 μg plasmin을 사용하였다. 하수오의 혈전용해 활성은 대조구인 plasmin이 fibrin을 용해시켜 생기는 투명 환의 크기를 측정하여 작성한 표준곡선에 대해 하수오의 용해면적을 상대적으로 비교함으로써 구할 수 있다.

다. 결과 및 고찰

하수오 (0-200 mg/mL)와 plasmin의 농도 (0-20 μ g)별로 fibrin plate 상에서의 혈전용해 활성은 Fig. 16와 Table 13에 제시한 바와 같으며, 이 때 생긴 투명 환이 타원형인 경우 긴 지름과 짧은 지름의 평균을 구하여 면적을 계산하였다. 실험 결과, 적하수오의 최고농도인 200 mg/mL에서 투명 환의 면적이 약 1.327 cm²로 plasmin 10 μ g의 농도와 같은 활성을 보였으나 완전히 농도 의존적으로 증가하지는 않았다. 한편, 백하수오는 25-200 mg/mL의 시료농도에서 fibrin plate를 대부분 용해하지 않아 혈전용해 활성이 거의 없는 것으로 사료된다. 재배 백하수오는 25 mg/mL의 시료농도에서 positive control로 사용한 plasmin 5 μ g의 농도와 유사한 수준의 혈전용해 활성을 보였으며 50 mg/mL과 200 mg/mL의 농도에서 가장 큰 혈전용해 활성을 보였다. 그러나 이 역시 농도 의존적인 결과는 아니었다.

재배 백하수오는 이미 혈관계 개선에 효과가 있다고 알려진 적하수오보다는 그 효과가 약하지만 백하수오에 비해서는 월등히 높은 혈전용해 활성을 나타낸 것으로 보아 혈관계 개선에 효과가 있는 기능성을 지닌 식품소재로서 활용할 수 있을 것으로 여겨진다.

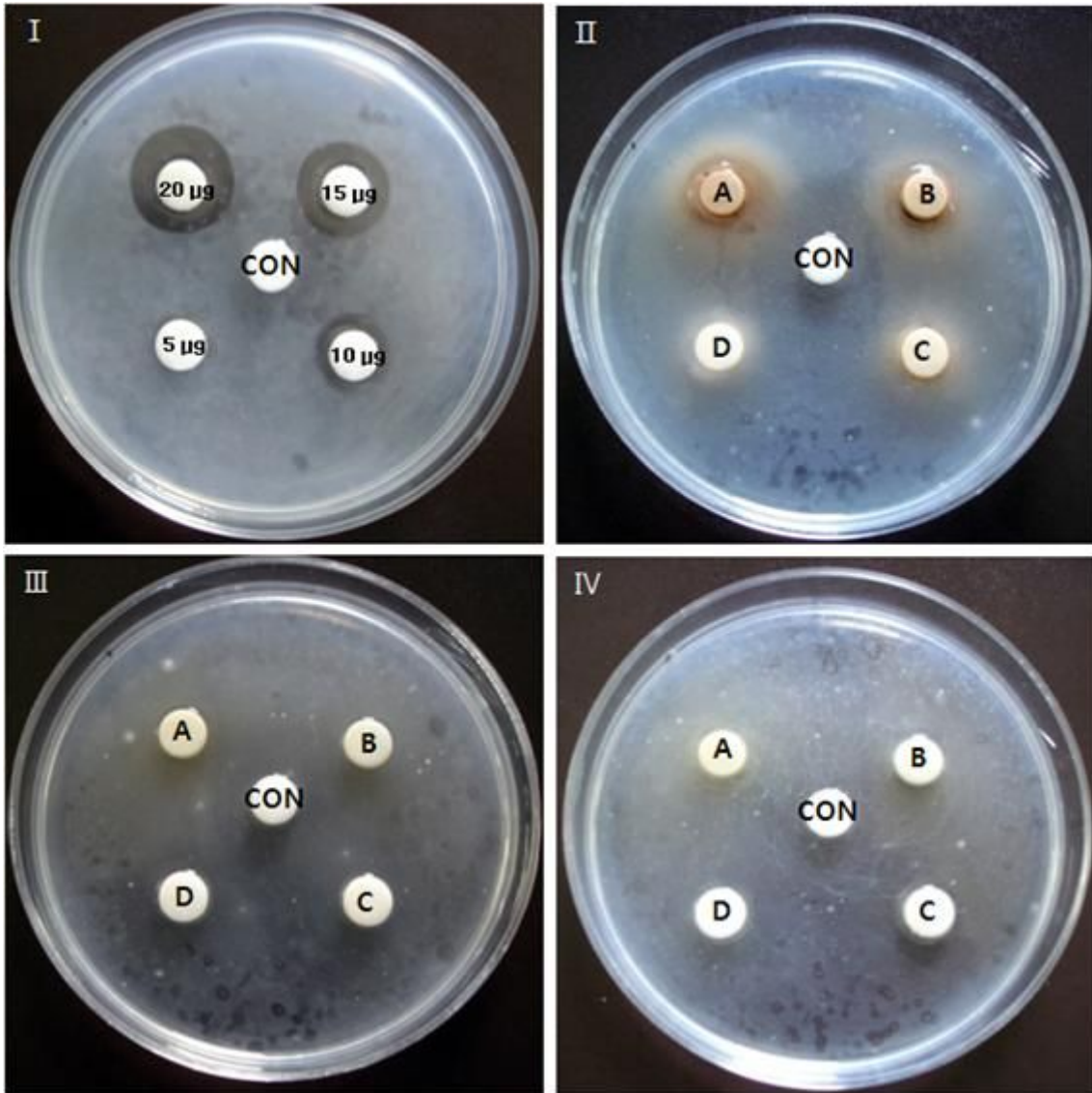


Fig. 16. Fibrinolytic activity of plasmin (I), 적하수오 (II), 백하수오 (재배) (III), 백하수오 (IV)¹

¹A: 200 mg/mL, B: 100 mg/mL, C: 50 mg/mL, D: 25 mg/mL, CON: control

Table 13. Fibrinolytic activity of plasmin

Plasmin (μg)	Area (cm^2)	적하수오 (mg/mL)	Area (cm^2)	백하수오 (재배) (mg/mL)	Area (cm^2)	백하수오 (mg/mL)	Area (cm^2)
5	0.785	25	0.785	25	0.636	25	0.785
10	1.327	50	0.785	50	0.636	50	0.950
15	2.010	100	0.950	100	0.636	100	0.636
20	2.404	200	1.327	200	0.636	200	0.950

2. 동물실험을 통한 혈전개선 효능 분석

가. 재료 및 방법

1) 실험 재료

본 실험에 사용된 적하수오 (*Polygonum multiflorum*)와 백하수오 (*Cynanchum wilfordii*)를 세척한 후 완전히 마를 때까지 음건하고 분쇄기 (KA2610, Jworld tech, Gyeonggi-do, Korea)로 분쇄하였다. 분쇄된 분말시료 2 kg에 80% EtOH을 1:10 비율로 첨가하여 초고속 진공 저온 추출기 (COSMOS-660, KyungSeo Machine Co., Incheon, Korea)에서 끓기 시작한 시점을 기준으로 6시간 동안 95 °C에서 추출하였다. 추출액은 80 °C에서 감압 농축하여 시험시료로 사용하였다.

2) 실험동물의 사육 및 실험식이

실험동물은 7주령의 수컷 본태성 고혈압 spontaneously hypertensive rat (SHR) 50마리, Sprague Dawley (SD) 암컷, 수컷 각각 50마리를 (주)오리엔트 바이오에서 구입하여 1주일간 일반식으로 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 동물 사육실의 온도와 습도는 각각 $22 \pm 0.5^\circ\text{C}$, $55 \pm 5\%$ 로 조절하였고, 명암 12시간 주기 조명 아래에서 안정시키면서 1주일간의 순화기간을 거쳐 실험에 사용하였다. 1주일 적응 기간을 거친 쥐 (평균 체중 $230 \pm 2.8 \text{ g}$)를 그룹별로 분류 (난괴법; Randomized complete block design)하였고 5주간 실험 식이를 급여하였다. 실험군은 고혈압 모델 군(SHR)은 정상식이군 (I), 0.5% 적하수오 투여군 (II), 1% 적하수오 투여군 (III), 0.5% 백하수오 투여군 (IV), 1% 백하수오 투여군 (V) 등 모두 5군으로 분

류하였고 (Table 14), 군당 10마리의 흰쥐를 난괴법으로 배치하여 해당 사료를 일주일에 400g씩 급여하여 자유 섭취하도록 하였고 물은 미세여과기를 이용하여 filtering된 지하수를 자유섭취 시켰다. SD 흰쥐는 수컷과 암컷 각각 식이실험군 (Table 15)으로 나누어 정상식이군 (I), 식이무게의 0.5%의 적하수오 보충군 (II), 1%의 적하수오 보충군 (III), 0.5%의 백하수오 보충군 (IV), 1%의 백하수오 보충군 (V), 콜레스테롤 대조군 (VI), 콜레스테롤-0.5% 적하수오 보충군 (VII), 콜레스테롤-1% 적하수오 보충군 (VIII), 콜레스테롤-0.5% 백하수오 보충군 (IX), 콜레스테롤-1% 백하수오 보충군 (X)로 나누어 실험하였다. 실험에 사용된 식이는 AIN-93M을 기준으로 변형하여 조제하였다. 콜레스테롤군의 콜레스테롤의 첨가량은 식이무게의 1%가 첨가되었고, 하수오의 첨가량은 각각 식이무게의 0.5%와 1%를 첨가하였다. 체중과 식이섭취량은 일주일에 한번 일정한 시간에 측정하여 식이효율을 계산하였다. 식이효율 (Food efficiency ratio: FER)은 매주 체중증가량을 같은 기간 동안 섭취한 식이섭취량으로 나누어 산출하였다.

Table 14. Design of experimental diet¹

Groups (SHR)	Diet composition
I	Control diet
II	Experimental diet containing 0.5% <i>Polygonum multiflorum</i> (5 g/kg of diet)
III	Experimental diet containing 1% <i>Polygonum multiflorum</i> (10 g/kg of diet)
IV	Experimental diet containing 0.5% <i>Cynanchum wilfordii</i> (5 g/kg of diet)
V	Experimental diet containing 1% <i>Cynanchum wilfordii</i> (10 g/kg of diet)

¹ I: Control (control diet meets the requirements in the AIN-93M formulations), II: Experimental diet containing 0.5% *Polygonum multiflorum* (5 g/kg of diet), III: Experimental diet containing 1% *Polygonum multiflorum* (10 g/kg of diet), IV: Experimental diet containing 0.5% *Cynanchum wilfordii* (5 g/kg of diet), V: Experimental diet containing 1% *Cynanchum wilfordii* (10 g/kg of diet).

Table 15. Design of experimental diet¹

Group (SD)	Diet composition
I	Control diet
II	Experimental diet containing 0.5% <i>Polygonum multiflorum</i> (5 g/kg of diet)
III	Experimental diet containing 1% <i>Polygonum multiflorum</i> (10 g/kg of diet)
IV	Experimental diet containing 0.5% <i>Cynanchum wilfordii</i> (5 g/kg of diet)
V	Experimental diet containing 1% <i>Cynanchum wilfordii</i> (10 g/kg of diet)
VI	Cholesterol control diet (1%, 10 g/kg of diet)
VII	Experimental diet containing 1% cholesterol and 0.5% <i>Polygonum multiflorum</i> (5 g/kg of diet)
VIII	Experimental diet containing 1% cholesterol and 1% <i>Polygonum multiflorum</i> (10 g/kg of diet)
IX	Experimental diet containing 1% cholesterol and 0.5% <i>Cynanchum wilfordii</i> (5 g/kg of diet)
X	Experimental diet containing 1% cholesterol and 1% <i>Cynanchum wilfordii</i> (10 g/kg of diet)

¹ I: Control (control diet meets the requirements in the AIN-93M formulations), II: Experimental diet containing 0.5% *Polygonum multiflorum* (5 g/kg of diet), III: Experimental diet containing 1% *Polygonum multiflorum* (10 g/kg of diet), IV: Experimental diet containing 0.5% *Cynanchum wilfordii* (5g/kg of diet), V: Experimental diet containing 1% *Cynanchum wilfordii* (10 g/kg of diet), VI: Cholesterol control (1%, 10 g/kg of diet), VII: Experimental diet containing 1% cholesterol and 0.5% *Polygonum multiflorum* (5 g/kg of diet), VIII: Experimental diet containing 1% cholesterol and 1% *Polygonum multiflorum* (10 g/kg of diet), IX: Experimental diet containing 1% cholesterol and 0.5% *Cynanchum wilfordii* (10 g/kg of diet), X: Experimental diet containing 1% cholesterol and 1% *Cynanchum wilfordii* (10 g/kg of diet).

3) 하수오 추출물의 항 응고 활성 측정

항혈전 활성은 흰쥐의 안와정맥에서 채혈하여 EDTA가 처리된 혈청분리관 (BD Vacutainer, BD Company, U.S)에 넣어 4°C, 3000rpm에서 10분간 원심 분리하여

(Desk-top centrifuge Hanil Sci. Ind., Seoul, Korea) 혈장을 분리했다. 분리된 혈장으로 Thrombin time (TT), activated partial thromboplastin time (aPTT)를 Coagulation machine (STA R Evolution, STAGO, France)과 정량용 kit (STA PTT A 5 & THOMBIN, STAGO, France)를 이용하여 측정하였다.

4) 하수오 분획물의 항산화력 측정

하수오의 항산화력은 Cayman's antioxidant assay kit (Cayman chemical company, U.S.A)을 이용하여 측정하였다. metmyoglobin과 H_2O_2 를 반응시키면 ferryl myoglobin radical이 생성되고 이 ferryl myoglobin radical은 ABTS를 라디칼 양이온을 가진 $ABTS^+$ 로 산화시켜 녹색을 띄는데 이때 antioxidant는 전자 공여 radical 소거에 의해 이 반응을 억제하고, 색을 띄는 ABTS radical 생성을 억제하게 되는 원리를 이용한 것이다. 하수오의 항산화력을 정량용 kit에 반응시켜 그 흡광치를 spectrophotometer (Epoch, D.I Biotech Ltd., U.S.A)에서 측정하였다.

나. 결과 및 고찰

1) 혈장의 aPTT 및 TT 측정

항혈전 활성은 시료의 aPTT 및 공통경로 (common pathway)에 기인하는 TT (thrombin time)를 측정하여 평가하였다. thrombin의 활성화는 혈전 형성의 여러 단계의 반응 중, 가장 중요하면서도 최종적인 반응이다. 활성화된 thrombin은 fibrinogen으로부터 fibrin monomer를 생성하고, 이 단량체들은 Ca^{++} 에 의해 중합되어 혈소판과 내피세포에 결합하게 되며, Factor XIII에 의해 교차 결합된 fibrin polymer를 형성하면서 최종적으로 혈전을 생성하게 한다. 또한 thrombin은 혈소판, V 인자, VII인자들을 활성화시켜 혈액응고 반응을 촉진한다⁽³⁰⁻³¹⁾. 활성화 부분트롬보플라스틴 시간을 측정한 aPTT (Activated partial thromboplastin time)은 혈장에 표면 활성화제 (surface activator: kaolin, ellagic acid, celite 등), 인지질, 칼슘 이온을 첨가 후 응괴가 생길 때까지의 시간이다. aPTT 시간이 연장되는 경우는 내인성 경로 (intrinsic pathway)의 XII, XI, IX, VIII 응고인자, 프리칼리크레인 (prekallikrein), 고분자중량 키니노겐 (high molecular weight kininogen, HMWK)의 결핍과 V, X, II, I 응고인자의 결핍을 의미한다. SHR군의 aPTT와 TT의 결과는 Table 16에 제시하였다. aPTT의 경우 대조군 (I)은 33.43초를 기록했고, 적하수오 0.5% 처

리군 (Ⅱ)은 39.26초로 증가하였으나 1% 처리군 (Ⅲ)은 28.11초로 대조군 보다 오히려 더 줄어드는 것을 확인할 수 있었다. 백하수오의 경우에는 0.5% 처리군 (Ⅳ)이 27.21초로 대조군과 비교하여 감소하였으나 1% 처리군 (Ⅴ)에서는 44.03초로 대조군 보다 증가하는 경향을 나타냈다. TT 또한 aPTT와 유사한 경향을 나타냈다. 이것은 SHR 쥐에서 적하수오 0.5% 처리군 (Ⅱ)과 백하수오 1% 처리군 (Ⅴ)이 혈액 응고 내인성 경로와 공통경로에 작용하여 혈액 응고를 억제 시킨 것으로 보인다. SD 수컷과 암컷의 aPTT와 TT의 결과는 Table 17과 Table 18에 각각 제시하였다. SD 수컷 쥐에 적하수오 및 백하수오를 보충 공급시 aPTT의 경우 유의적인 차이를 보이지 않았으나 TT의 경우 증가하는 경향을 나타냈다. SD 암컷 쥐의 aPTT의 경우 0.5%, 1% 백하수오 콜레스테롤 섭취군 (Ⅸ, Ⅹ)이 각각 33.72초와 42.80초를 나타내어 대조군인 콜레스테롤 섭취군 (Ⅵ) 22.73초에 비해 유의적으로 증가하는 것으로 나타나 백하수오 콜레스테롤 섭취군이 내인성 경로에 작용하여 혈액 응고를 억제시킨 것으로 보인다.

Table 16. Plasma activated partial thromboplastin time (aPTT) and thrombin time (TT) in SHR rats¹

Group (SHR)	aPTT (sec)	TT (sec)
I	33.43 ± 1.41 ^{NS}	42.37 ± 1.80 ^{NS}
Ⅱ	39.26 ± 5.39	54.00 ± 9.00
Ⅲ	28.11 ± 1.44	44.82 ± 5.06
Ⅳ	27.21 ± 2.08	38.30 ± 1.13
V	44.03 ± 16.37	43.19 ± 2.68

¹ I: Control (control diet meets the requirements in the AIN-93M formulations), Ⅱ: Experimental diet containing 0.5% *Polygonum multiflorum* (5 g/kg of diet), Ⅲ: Experimental diet containing 1% *Polygonum multiflorum* (10 g/kg of diet), Ⅳ: Experimental diet containing 0.5% *Cynanchum wilfordii* (5 g/kg of diet), V: Experimental diet containing 1% *Cynanchum wilfordii* (10 g/kg of diet). All data are expressed as means ± SEM. Different letters in a column indicate significantly different values assessed by Duncan's multiple test ($p < 0.05$), NS: Not significant.

Table 17. Plasma activated partial thromboplastin time (aPTT) and thrombin time (TT) in SD male rats¹

Group (SD Male)	aPTT (sec)	TT (sec)
I	26.76 ± 0.52 ^{NS}	38.24 ± 0.89 ^{ab}
II	38.18 ± 5.62	40.70 ± 1.39 ^{ab}
III	30.87 ± 2.40	40.53 ± 0.19 ^{ab}
IV	26.60 ± 0.76	41.68 ± 1.70 ^a
V	28.45 ± 1.06	41.23 ± 0.67 ^{ab}
VI	27.43 ± 1.82	38.57 ± 0.83 ^{ab}
VII	37.93 ± 5.46	43.10 ± 5.29 ^a
VIII	31.97 ± 2.03	41.87 ± 2.07 ^a
IX	32.90 ± 3.97	38.40 ± 1.79 ^{ab}
X	38.40 ± 15.87	35.25 ± 0.88 ^b

¹ I: Control (control diet meets the requirements in the AIN-93M formulations), II: Experimental diet containing 0.5% *Polygonum multiflorum* (5 g/kg of diet), III: Experimental diet containing 1% *Polygonum multiflorum* (10 g/kg of diet), IV: Experimental diet containing 0.5% *Cynanchum wilfordii* (5 g/kg of diet), V: Experimental diet containing 1% *Cynanchum wilfordii* (10 g/kg of diet), VI: Cholesterol control (1%, 10 g/kg of diet), VII: Experimental diet containing 1% cholesterol and 0.5% *Polygonum multiflorum* (5 g/kg of diet), VIII: Experimental diet containing 1% cholesterol and 1% *Polygonum multiflorum* (10 g/kg of diet), IX: Experimental diet containing 1% cholesterol and 0.5% *Cynanchum wilfordii* (10 g/kg of diet), X: Experimental diet containing 1% cholesterol and 1% *Cynanchum wilfordii* (10 g/kg of diet) All data are expressed as means ± SEM, n = 5. Different letters in a column indicate significantly different values assessed by Duncan's multiple test ($p < 0.05$) NS : Not significant

Table 18. Plasma activated partial thromboplastin time (aPTT) and thrombin time (TT) in SD female rats¹

Group (SD female)	aPTT (sec)	TT (sec)
I	24.20 ± 0.93 ^b	35.70 ± 0.61 ^{NS}
II	25.20 ± 1.70 ^{ab}	37.42 ± 1.17
III	37.03 ± 7.57 ^{ab}	47.80 ± 10.67
IV	29.37 ± 0.99 ^{ab}	36.55 ± 1.12
V	34.56 ± 3.46 ^{ab}	48.68 ± 5.21
VI	22.73 ± 0.77 ^b	36.48 ± 1.71
VII	38.80 ± 2.69 ^{ab}	42.30 ± 3.18
VIII	31.08 ± 2.01 ^{ab}	39.86 ± 1.27
IX	33.77 ± 4.54 ^a	48.94 ± 6.74
X	42.80 ± 8.9 ^a	43.27 ± 2.79

¹ I: Control (control diet meets the requirements in the AIN-93M formulations), II: Experimental diet containing 0.5% *Polygonum multiflorum* (5 g/kg of diet), III: Experimental diet containing 1% *Polygonum multiflorum* (10 g/kg of diet), IV: Experimental diet containing 0.5% *Cynanchum wilfordii* (5 g/kg of diet), V: Experimental diet containing 1% *Cynanchum wilfordii* (10 g/kg of diet), VI: Cholesterol control (1%, 10g/kg of diet), VII: Experimental diet containing 1% cholesterol and 0.5% *Polygonum multiflorum* (5 g/kg of diet), VIII: Experimental diet containing 1% cholesterol and 1% *Polygonum multiflorum* (10 g/kg of diet), IX: Experimental diet containing 1% cholesterol and 0.5% *Cynanchum wilfordii* (10 g/kg of diet), X: Experimental diet containing 1% cholesterol and 1% *Cynanchum wilfordii* (10 g/kg of diet) All data are expressed as means ± SEM, n = 5. Different letters in a column indicate significantly different values assessed by Duncan's multiple test ($p < 0.05$) NS : Not significant.

2) 하수오 분획물의 항산화력 측정

본 연구에서는 cation radical인 ABTS를 대상으로 하수오 추출물 및 순차 분획물의 radical 소거능을 측정하였다 (Fig. 17). 적하수오와 백하수오 Ethanol 추출물 및 Buthanol, Hexane 분획물을 최종 농도가 25 µg/ml, 50 µg/ml이 되도록 희석하여 항산화력을 측정한 결과 적하수오의 경우 Ethanol 추출물과 Butanol 분획물에서

ABTS⁺ 소거능력이 가장 뛰어난 것으로 나타났고 Hexane 분획물에서는 다른층 보다 항산화력이 떨어지는 경향을 확인 할 수 있었다. 백하수오도 이와 동일하게 Ethanol 추출물과 Buthanol 분획물에서 ABTS⁺ 소거 능력이 더 뛰어난 경향을 보였다.

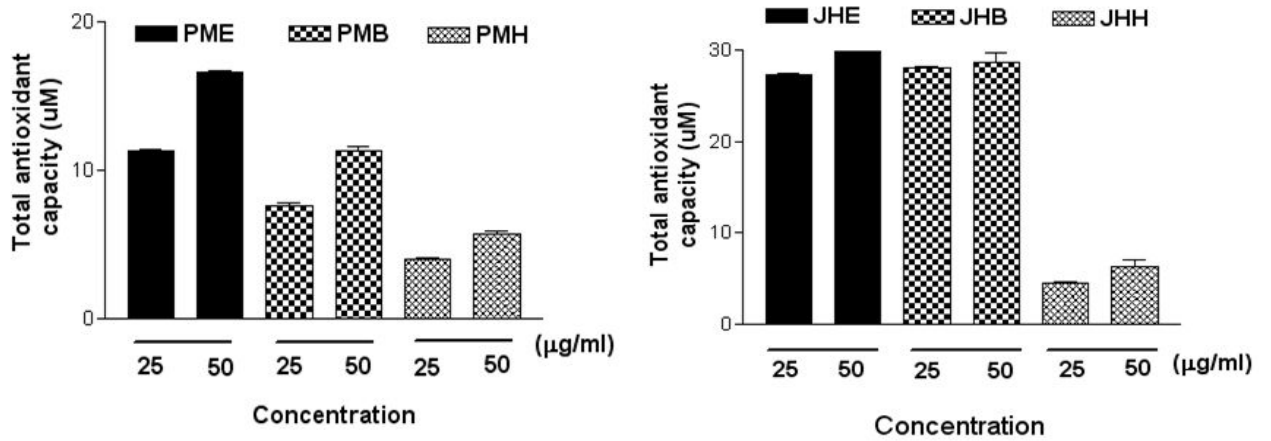


Fig. 17. ABTS radical scavenging activity of *Polygonum multiflorum* and *Cynanchum wilfordii* extracts and fractions¹

¹PME: EtOH extract of *Polygonum multiflorum*, PMB: Buthanol fraction of *Polygonum multiflorum*, PMH: Hexane fraction of *Polygonum multiflorum*, JHE: EtOH extract of *Cynanchum wilfordii*, JHB: Buthanol fraction of *Cynanchum wilfordii*, JHH: Hexane fraction of *Cynanchum wilfordii*. Results are means \pm SD of triplicate data

제4절 하수오의 혈압 강하 효능 규명

1. ACE 저해 활성 분석

가. 실험재료 및 전처리 방법

실험에 사용된 하수오는 적하수와 대조구로써 백하수오 2종 (자연산, 재배) 총 3종을 사용하였다. 하수오 시료는 완전히 마를 때까지 음건하고 분쇄기 (KA2610, Jworld tech, Gyeonggi-do, Korea)로 분쇄하였다. 분쇄된 분말시료 10 g에 80% EtOH 100 mL를 첨가하여 heating mantle (Changshin scientific Co., Korea)에서 냉각관을 연결한 후 가열하여 끓기 시작한 시점을 기준으로 3시간 동안 3회 반복 추출후, 여과하였다. 여과액은 50°C에서 감압 농축하여 동결건조한 후 분말로 하여 시험시료로 사용하였다. 분말로 된 시료를 실험에 사용하기 위해 필요한 농도별로 DMSO에 녹인 후 0.45 μm syringe filter로 여과하여 본 실험에 사용하였다.

나. ACE 저해 활성

Angiotensin-I converting enzyme (ACE) 저해활성은 Chsuman and Cheung의 방법⁽³²⁾에 의하여 측정하였다. 즉, Angiotensin-I 전환효소는 토끼의 허파에서 아세톤 분말로 정제한 1 g에 400 mM sodium borate buffer (pH 8.3) 10.0 mL를 가한 다음 5 °C에서 24시간 교반한 후 원심분리 (8,000×g, 30 min)하여 얻은 상층액을 ACE 조효소액으로 사용하였다. 시료 50 μL 에 ACE 조효소액 50 μL 및 0.1 M sodium borate buffer (pH 8.3) 100 μL 를 가한 다음 37°C에서 5분간 pre-incubation 시켰다. 기질로써 0.5 mM His-His-Leu (2.14 mg/mL) 50 μL 를 첨가하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후 1 N HCl 250 μL 를 가하여 반응을 정지시켰다. 여기에 ethyl acetate 1.5 mL를 가하여 15초간 교반한 후 200×g에서 5분간 원심 분리시켜 상층액 1.0 mL를 취하였다. 이 상층액을 완전히 건조시킨 뒤 증류수 3.0 mL를 가하여 용해한 다음 228 nm에서 흡광도를 측정하였다.

다. 결과 및 고찰

Angiotensin 전환효소 (ACE, Lung acetone powder)는 토끼의 허파로부터 얻은 아

세톤 침전분말이다. ACE는 혈압강화작용을 가지는 bradykinin을 분해하여 불활성화시키는 한편 불활성상태의 angiotensin-I을 절단하여 강한 혈압상승작용을 나타내는 angiotensin-II로 활성화시킴으로써 고혈압의 원인이 된다고 알려져 있다⁽³³⁾. 고혈압은 2000년도 우리나라 순환기계 질환에 의한 사망원인 중 4위에 해당하는 질환이다. 고혈압 즉, 혈압상승과 관련된 기전의 일부는 angiotensin I converting enzyme에 의해 일어나는 것으로 알려져 있으며 ACE는 불활성형인 angiotensin I의 C 말단에 존재하는 His-Leu을 절단하여 강한 혈압상승작용을 나타내는 angiotensin II를 생성하고, 혈압을 감소시키는 bradykinin을 불활성화시키는 효소이다.⁽³⁴⁾ ACE저해제는 ACE의 작용을 저해함으로써 angiotensin II의 생성저해, aldosterone 분비감소, 혈관확장제인 bradkinin의 증가 등의 과정을 통해 신장혈관을 확장시켜 sodium의 배설을 촉진하여 혈압을 낮추어 줄 수 있다⁽³⁵⁾. 또한, angiotensin I 전환효소의 작용으로 Angiotensin I 으로부터 생성된 Angiotensin II는 직접 동맥 및 소동맥을 수축시키는 작용과 부신피질을 흥분시켜 알도스테론의 유리를 촉진시킴으로써 결국 혈압을 올려주는 작용을 한다⁽³⁶⁾.

80% 에탄올 추출물시료 농도별로 측정된 ACE inhibition activity 결과는 Table 19와 같다. 100ppm 이상의 농도에서 ACE inhibition activity를 나타내고 있으며 적하수오 시료의 경우 농도별로 10.5 ~ 52.9%로 가장 높은 활성을 나타내었다.

Table 19. ACE inhibition activity of 80% EtOH extracts

(unit : %)

농도	적하수오	백하수오	백하수오(재배)
10 ppm	-2.1 ± 0.01	-3.2 ± 0.04	-3.8 ± 0.01
100 ppm	10.5 ± 2.1	6.6 ± 0.7	7.5 ± 0.1
1,000 ppm	17.3 ± 1.3	5.2 ± 0.5	7.9 ± 0.2
10,000 ppm	52.9 ± 3.7	29.5 ± 3.0	35.3 ± 4.1

2. 동물실험을 통한 하수오의 혈압강하 효능 분석

가. 재료 및 방법

1) 실험 재료

본 실험에 사용된 적하수오 (*Polygonum multiflorum*)와 백하수오 (*Cynanchum wilfordii*)를 세척한 후 완전히 마를 때까지 음건하고 분쇄기 (KA2610, Jworld tech, Gyeonggi-do, Korea)로 분쇄하였다. 분쇄된 분말시료 2 kg에 80% EtOH을 1:10 비율로 첨가하여 초고속 진공 저온 추출기 (COSMOS-660, KyungSeo Machine Co., Inchon, Korea)에서 끓기 시작한 시점을 기준으로 6시간 동안 95 °C에서 추출하였다. 추출액은 80 °C에서 감압 농축하여 시험시료로 사용하였다.

2) 실험동물

7주령의 수컷 SHR (spontaneously hypertensive rat) 50마리를 (주)오리엔트 바이오에서 구입하여 1주일간 일반식으로 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 동물 사육실의 온도와 습도는 각각 $22 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$, $55 \pm 5\%$ 로 조절하였고, 명암 12시간 주기 조명아래에서 안정시키면서 1주일간의 순화기간을 거쳐 실험에 사용하였다. 1주일 적응기간을 거친 쥐 (평균 체중 230 ± 2.8 g)를 그룹별로 분류 (난괴법; Randomized complete block design)하였고 5주간 실험 식이를 급여하였다.

3) 실험식이

실험 식이는 AIN-93M을 기준으로 하여 적하수오 백하수오 각각 0.5%, 1%가 되게 제조하였다. 실험군은 정상식이군 (I), 0.5% 적하수오 투여군 (II), 1% 적하수오 투여군 (III), 0.5% 백하수오 투여군 (IV), 1% 백하수오 투여군 (V) 등 모두 5군으로 분류하였고 (Table 20), 군당 10마리의 흰쥐를 난괴법으로 배치하였다. 해당 사료를 일주일에 400 g씩 급여하여 자유 섭취하도록 하였고 물은 미세여과기를 이용하여 filtering된 지하수를 자유섭취 시켰다. 일일 사료 섭취량은 일주일 간격으로 섭취량을 조사하여 식이섭취량 (g/day)을 산출하였으며 체중은 1주에 한 번 측정하여 체중증가량 (g/day)로 나타내었다.

Table 20. Design of experimental diet¹

Groups	Diet composition
I	Control diet
II	Experimental diet containing 0.5% <i>Polygonum multiflorum</i> (5 g/kg of diet)
III	Experimental diet containing 1% <i>Polygonum multiflorum</i> (10 g/kg of diet)
IV	Experimental diet containing 0.5% <i>Cynanchum wilfordii</i> (5 g/kg of diet)
V	Experimental diet containing 1% <i>Cynanchum wilfordii</i> (10 g/kg of diet)

¹ I: Control (control diet meets the requirements in the AIN-93M formulations), II: Experimental diet containing 0.5% *Polygonum multiflorum* (5 g/kg of diet), III: Experimental diet containing 1% *Polygonum multiflorum* (10 g/kg of diet), IV: Experimental diet containing 0.5% *Cynanchum wilfordii* (5 g/kg of diet), V: Experimental diet containing 1% *Cynanchum wilfordii* (10 g/kg of diet).

4) 혈압 측정

혈압은 주 1회 측정하였으며 홀더에 쥐를 넣은 다음 꼬리정맥에 측정센서가 달린 cuff를 장착하고 37 °C로 조절된 항온상자에서 10분 정도 안정시킨 후 수축기 및 이완기 혈압을 혈압 측정기 (LE 5002 storage pressure meter, LSi Leticia, Spain)를 이용하여 5회 반복 측정하였다.



Fig 18. LE5002 storage pressure meter and a fake rat tail with cuff, sensor and restrainer

5) 실험동물의 희생 및 장기 적출

실험식으로 5주 사육 후 쥐를 12시간 절식시키고 안와동맥에서 채혈한 후 경추 탈골시켰다. 혈액은 1시간 냉장보관 후 4 °C, 3000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 (Desk-top centrifuge Hanil Sci. Ind., Seoul, Korea) 혈청을 분리했고, 일부는 EDTA를 처리하여 4 °C, 3000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 혈장을 분리하였다. 그리고 간 조직과 신장, 비장을 채취하여 생리식염수로 씻은 다음 표면의 수분을 완전히 제거시킨 후 무게를 측정하였으며 간 조직의 일정량을 절개하여 조직 검사를 실시하였다.

6) 혈액의 생화학적 분석

Total cholesterol, triglyceride, LDL/HDL-cholesterol 등 지질성분 분석과 간의 손상 정도를 측정하기 위해 아미노산 전이효소인 AST, ALT 활성은 원심분리를 통해 얻은 혈청으로 자동혈액분석기 (ADVIA 1650, Bayer Co., Japan)와 정량용 kit를 사용하여 측정하였다. 또한 항혈전 활성은 Thrombin time (TT), activated partial thromboplastin time (aPTT)를 Coagulation machine (STA R Evolution, STAGO, France)과 정량용 kit를 이용하여 측정하였다.

7) 통계처리

실험결과는 SPSS 12.0 (Chicago, IL, USA) 통계프로그램을 이용하여 각 실험군의 평균±표준편차로 표시하였고, 일원배치분산분석으로 비교하였으며 Duncan's multiple range test에 의해 각 실험군 간에 유의성을 $p < 0.05$ 수준에서 검정하였다.

나. 결과 및 고찰

1) 식이섭취량, 체중증가량 및 식이효율

7주령의 SHR에 5주간 하수오 추출물을 급여한 결과 식이 섭취량, 체중증가량, 식이효율은 대조군과 비교해서 유의적인 차이를 나타내지 않았다 (Fig. 19, Table 21). 정상식이 대조군인 I 군의 일일평균체중변화량은 2.05 g/day로 증가하였고 평균사료섭취량은 18.21 g/day이었다. II, III, V 군은 일일평균체중변화량 각각 1.90 g/day, 2.07 g/day, 1.98 g/day로 정상식이 대조군과 유의적인 차이가 나타나지 않

았으나 IV군은 1.63 g/day로 대조군에 비해 감소하는 결과를 나타내었다. 이처럼 IV군의 체중이 대조군에 비해 감소된 이유는 식이섭취량 감소와 다른 군보다 식이 효율이 낮다는 것이 우선적인 원인이 되었을 것으로 보인다.

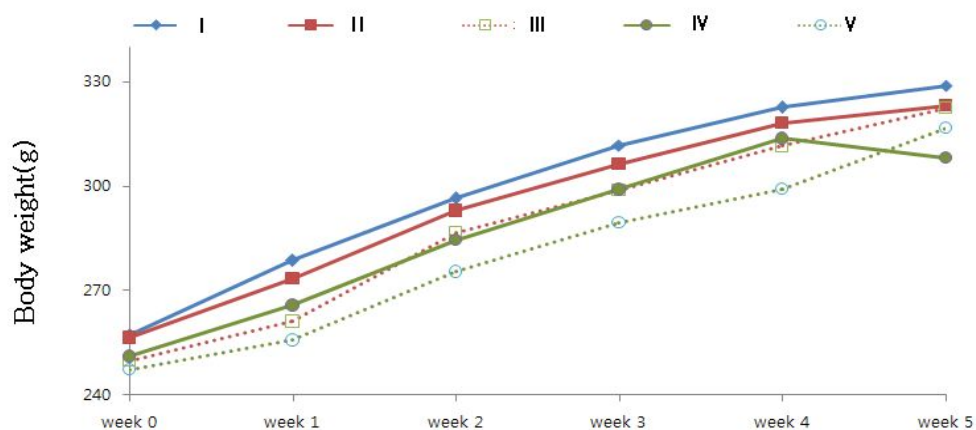


Fig. 19. Changes of weight in SHR fed *Polygonum multiflorum* Thunberg and *Cynanchum wilfordii* Radix extract¹

¹ I: Control (control diet meets the requirements in the AIN-93M formulations), II: Experimental diet containing 0.5% *Polygonum multiflorum* (5 g/kg of diet), III: Experimental diet containing 1% *Polygonum multiflorum* (10 g/kg of diet), IV: Experimental diet containing 0.5% *Cynanchum wilfordii* (5 g/kg of diet), V: Experimental diet containing 1% *Cynanchum wilfordii* (10 g/kg of diet).

Table 21. Table. Body weight gain, food intake, food efficiency ratio (FER) rat fed experimental diet for 5 week¹

Group	Body weight gain (g/5week)	Food intake (g/day)	FER
I	2.05 ± 0.40 ^a	18.21 ± 1.70 ^a	0.11 ± 0.02 ^{ab}
II	1.90 ± 0.19 ^{ab}	17.95 ± 1.37 ^a	0.10 ± 0.01 ^{ab}
III	2.07 ± 0.40 ^a	18.03 ± 1.41 ^a	0.11 ± 0.02 ^a
IV	1.63 ± 0.35 ^b	17.65 ± 1.18 ^{ab}	0.09 ± 0.0 ^{2b}
V	1.98 ± 0.50 ^{ab}	16.89 ± 0.99 ^b	0.11 ± 0.03 ^a

¹ I: Control (control diet meets the requirements in the AIN-93M formulations), II: Experimental diet containing 0.5% *Polygonum multiflorum* (5 g/kg of diet), III: Experimental diet containing 1% *Polygonum multiflorum* (10 g/kg of diet), IV: Experimental diet containing 0.5% *Cynanchum wilfordii* (5 g/kg of diet), V: Experimental diet containing 1% *Cynanchum wilfordii* (10 g/kg of diet). All data are expressed as means ± SEM. Different letters in a column indicate significantly different values assessed by Duncan's multiple test ($p < 0.05$). FER: Food efficiency ratio : body weight gain / food intake

2) 혈압측정

하수오 추출물 급여에 의한 혈압의 변화는 Fig. 20에 제시하였다. 7주부터 혈압이 상승하여 13주령이 되면 수축기 혈압이 200 mmHg 이상을 유지하는 SHR은 혈압 증가 원인이 불분명하여 사람의 본태성 고혈압의 기전 연구에 많이 활용되어 왔다. 이러한 특성을 이용하여 생후 7주령의 SHR에 5주 동안 하수오 추출물을 식이로 섭취 시킨 결과 대조군에서는 거의 일정하게 혈압이 유지되는 경향을 보이다가 5주차에는 다시 증가한 반면에 적하수오 0.5% 투여군 (II)은 2주차까지는 3주째부터 대조군에 비해 유의적으로 감소하는 경향을 나타내어 5주째에는 혈압이 큰 폭으로 떨어지는 것을 확인하였다. 적하수오 1% 투여군 (III)은 1주째에 큰 폭으로 떨어져서 2, 3, 4, 5주째에는 소폭으로 떨어지는 것으로 확인되었는데 이는 초기혈압이 높게 측정되어 나타난 결과로 보인다.

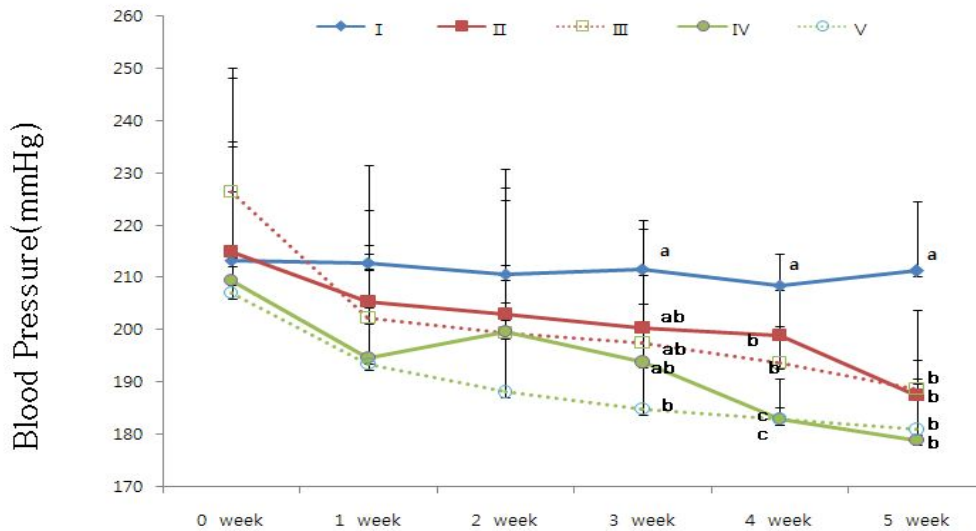


Fig. 20. Changes of systolic blood pressure of spontaneously hypertensive rats fed *Polygonum multiflorum* and *Cynanchum wilfordii* for 5 weeks¹

¹ I: Control (control diet meets the requirements in the AIN-93M formulations), II: Experimental diet containing 0.5% *Polygonum multiflorum* (5 g/kg of diet), III: Experimental diet containing 1% *Polygonum multiflorum* (10 g/kg of diet), IV: Experimental diet containing 0.5% *Cynanchum wilfordii* (5 g/kg of diet), V: Experimental diet containing 1% *Cynanchum wilfordii* (10 g/kg of diet). Different letters indicate significantly different values assessed by Duncan's multiple test ($p < 0.05$).

백하수오 0.5% 투여군 (IV)은 초기혈압에서 떨어지는 경향을 보이다가 2주째에 혈압이 상승 후 다시 감소하는 경향을 보였다. 백하수오 1% 투여군 (V)은 일정하게 혈압이 감소하는 경향을 나타냈다. 적하수오 및 백하수오 추출물을 섭취시킨 군에서 2주차까지는 유의성이 나타나지 않았지만 3주차부터 혈압상승을 억제시켜 5주차에는 적하수오, 백하수오 추출물을 섭취시킨 군 모두가 대조군에 비해 크게 혈압을 낮추어 주는 결과를 나타내었다. 따라서 적하수오, 백하수오 추출물은 선천적으로 고혈압을 나타내는 SHR 쥐에 있어 혈압 강하효과가 있는 것으로 사료된다.

3) 장기무게

각각의 식이를 급여한 SHR을 실험종료 전 12시간 동안 절식시킨 후 측정된 장기무게는 Table 22과 같다. 간장무게는 대조군 (I) 2.52 g, 적하수오 0.5%군 (II) 2.54 g, 적하수오 1%군 (III) 2.49 g, 백하수오 1%군 (V) 2.61 g으로 유의적인 차이가 없었고, 백하수오 0.5%군 (IV)은 2.80 g으로 대조군에 비해 증가한 것으로

나타났다 ($p < 0.05$). 신장의 무게는 5군 모두 0.66 ~ 0.77 g으로 통계적으로 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다 ($p < 0.05$). Do와 Choi⁽³⁷⁾ 및 Kim⁽³⁸⁾의 마늘과 한국산 겨우살이 추출물을 이용한 혈압 상승 억제 실험에 의하면 군간의 혈압 차이가 나타났지만 신장과 같이 혈압과 관계있는 장기는 체중대비 유의적인 차이가 없는 것으로 나타나 본 실험 결과와 유사하였다. 따라서 적하수오 및 백하수오의 장기투여가 체중 및 장기무게에 유의적인 영향을 주지 않았다는 것을 알 수 있었다.

Table 22. The liver, kidney, and spleen weight of rats fed experimental diet for 5 weeks¹

Group	Liver (g/100g)	Kidney (g/100g)	Spleen (g/100g)
I	2.52 ± 0.08 ^b	0.72 ± 0.10 ^{ab}	0.26 ± 0.09 ^{NS}
II	2.53 ± 0.12 ^b	0.72 ± 0.11 ^{ab}	0.27 ± 0.10
III	2.49 ± 0.17 ^b	0.72 ± 0.11 ^{ab}	0.28 ± 0.10
IV	2.80 ± 0.27 ^a	0.77 ± 0.12 ^a	0.30 ± 0.11
V	2.61 ± 0.60 ^b	0.66 ± 0.04 ^b	0.23 ± 0.07

¹ I: Control (control diet meets the requirements in the AIN-93M formulations), II: Experimental diet containing 0.5% *Polygonum multiflorum* (5 g/kg of diet), III: Experimental diet containing 1% *Polygonum multiflorum* (10 g/kg of diet), IV: Experimental diet containing 0.5% *Cynanchum wilfordii* (5 g/kg of diet), V: Experimental diet containing 1% *Cynanchum wilfordii* (10 g/kg of diet). All data are expressed as means ± SEM. Different letters in a column indicate significantly different values assessed by Duncan's multiple test ($p < 0.05$). NS: not significant.

4) 혈청의 aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) 활성측정

혈청 중의 AST, ALT활성은 Table 23에 나타내었다. AST와 ALT는 생체내 아미노산을 합성하는 효소로서 여러 장기세포에 존재하지만 그 중 간에 가장 많은 양이 존재하고 간 손상의 지표로 널리 사용되는 효소이다. 그 유출 과정은 세포내의 에너지 공급이 감소되어 세포내의 K⁺이온이 세포외로 유출되면 Na⁺, Ca²⁺ 및 수분이 세포내로 유입이 된다. 그 결과 세포는 팽창되고 세포막이 늘어나게 되어 세포질에 존재하는 AST와 ALT가 유출된다. 그러므로 혈청 중 AST와 ALT 등의 증가는 간

독성으로 인한 간세포의 괴사와 간조직의 파괴가 진행됨을 의미하므로 혈중에 이들 효소의 유리정도를 측정하여 간독성 연구에 이용하고 있다⁽³⁹⁾. Table 23에서 나타난 바와 같이 AST는 대조군 (I)이 133.90 U/L과 비교하여 0.5%, 1% 적하수오 (II, III)를 섭취시킨 군이 112.25 U/L, 122.33 U/L로 더 낮게 나타났고, 0.5%, 1% 백하수오 역시 124.44 U/L, 133.50 U/L로 대조군 보다 낮게 나타났다. ALT의 경우에는 대조군 (I)이 40.30 U/L과 비교하여 0.5%, 1% 적하수오 (II, III)를 섭취시킨 군이 36.70 U/L, 38.10 U/L로 더 낮게 나타났으나 0.5%, 1% 백하수오는 41.00 U/L, 45.63 U/L로 대조군에 비해 높게 나타났다. 그중에서도 1% 백하수오는 대조군에 비해 유의적으로 증가하는 경향이 나타나 간에 어느 정도 영향을 미칠 것으로 보여 진다. 따라서 적하수오는 간세포에 영향을 나타내지 않지만 백하수오는 간세포에 손상을 일으킬 수 있을 것으로 사료되어 차후 추출물의 투여기간을 늘려 구체적인 검토가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

Table 23. Serum AST (SGOT) and ALT (SGPT) concentrations¹

Group	AST (U/L)	ALT (U/L)
I	133.90 ± 4.97 ^a	40.30 ± 1.55 ^{bc}
II	112.25 ± 4.01 ^b	36.70 ± 0.79 ^c
III	122.33 ± 5.92 ^{ab}	38.10 ± 0.72 ^{bc}
IV	124.44 ± 4.45 ^{ab}	41.00 ± 1.64 ^b
V	133.50 ± 5.08 ^a	45.63 ± 1.79 ^a

¹ I: Control (control diet meets the requirements in the AIN-93M formulations), II: Experimental diet containing 0.5% *Polygonum multiflorum* (5 g/kg of diet), III: Experimental diet containing 1% *Polygonum multiflorum* (10 g/kg of diet), IV: Experimental diet containing 0.5% *Cynanchum wilfordii* (5 g/kg of diet), V: Experimental diet containing 1% *Cynanchum wilfordii* (10 g/kg of diet). All data are expressed as means ± SEM. Different letters in a column indicate significantly different values assessed by Duncan's multiple test ($p < 0.05$).

5) 혈청 내 혈당 및 지질 수준

적하수오 및 백하수오를 첨가한 식이를 투여한 흰쥐의 혈청의 Glucose, Total

cholesterol, triglyceride, LDL 및 HDL cholesterol 함량을 나타낸 결과는 Table 24와 같다. 혈당의 경우 대조군 (I) 85.20 mg/dL에 비해서 0.5%, 1% 적하수오 (II, III)가 각각 88.00 mg/dL, 87.43 mg/dL로 높게 나타났고, 0.5%, 1% 백하수오가 (IV, V) 각각 81.11 mg/dL, 83.33 mg/dL로 대조군에 비해서 낮게 나타났다. 정상 흰쥐의 혈중 Total cholesterol량은 20 ~ 92 mg/dL 인데 모든 군은 정상 수치로 나타났다. 하지만 0.5% 백하수오 섭취군과 1% 백하수오 섭취군은 각각 50 mg/dL, 56 mg/dL로 대조군에 비해 유의적으로 증가하는 것으로 나타났다. HDL cholesterol은 항동맥경화의 지표로서 콜레스테롤을 말초혈관에서 간으로 수송하여 동맥경화를 진행시키지 않는 방향으로 콜레스테롤을 운반하여 관상성 심장질환에 대한 방어 작용을 지니고 있다 ⁽⁴⁰⁾. 본 실험에서 HDL cholesterol은 적하수오를 섭취한 군에서는 유의적인 차이가 없었지만 백하수오를 섭취한 군에서는 15.60 mg/dL, 17.20 mg/dL로 대조군 12.60 mg/dL에 비해 유의적으로 증가하였다. LDL cholesterol은 혈중 콜레스테롤의 주된 운반 형이며 동맥 혈관 벽에 콜레스테롤을 축적시켜 동맥경화를 촉진시키므로 혈중 LDL cholesterol 농도와 심장 순환기계 질환의 발생과는 밀접한 상관관계가 있다 ⁽⁴¹⁾. LDL cholesterol은 적하수오를 섭취한 군은 대조군에 비해 유의적으로 감소하였고, 백하수오를 섭취한 군은 대조군에 비해 유의적으로 증가하는 경향을 나타냈다. 백하수오가 LDL cholesterol 함량이 대조군 보다 높게 나온 이유는 Total cholesterol 함량이 백하수오 자체가 높게 나왔기 때문에 증가한 것처럼 보이나 Total cholesterol 함량 자체가 정상 흰쥐의 수치 범위에 들기 때문에 LDL cholesterol 함량자체가 조금 높게 나왔다는 것은 큰 의미가 없는 것으로 보인다. 정상 흰쥐의 혈중 triglyceride 함량은 27~108 mg/dL이며 적하수오, 백하수오 섭취군 모두 정상범위에서 벗어나지 않는 경향을 나타냈다. Total lipid 함량은 적하수오 백하수오 모두 대조군과 유의한 결과를 나타냈다.

Table 24. Serum glucose and lipid profile¹

Group	Glucose (mg/dL)	Total- cholesterol (mg/dL)	HDL- cholesterol (mg/dL)	LDL- cholesterol (mg/dL)	Triglyceride (mg/dL)	Total lipid (mg/dL)
I	85.20 ± 1.55 ^{ab}	43.10 ± 0.94 ^c	12.60 ± 0.22 ^c	6.14 ± 0.14 ^b	58.00 ± 1.86 ^a	313.50 ± 4.23 ^{abc}
II	88.00 ± 1.44 ^b	42.00 ± 0.62 ^c	12.90 ± 0.31 ^c	5.33 ± 0.17 ^c	54.22 ± 1.28 ^{ab}	276.88 ± 9.94 ^a
III	87.43 ± 1.00 ^{ab}	42.14 ± 1.18 ^c	13.10 ± 0.23 ^c	5.67 ± 0.17 ^c	52.00 ± 1.20 ^b	285.63 ± 10.05 ^{ab}
IV	81.11 ± 0.95 ^{ab}	50.00 ± 0.93 ^b	15.60 ± 0.31 ^b	6.67 ± 0.17 ^a	46.50 ± 1.80 ^{bc}	293.57 ± 22.32 ^c
V	83.33 ± 1.86 ^a	56.29 ± 0.84 ^a	17.20 ± 0.25 ^a	6.67 ± 0.17 ^a	50.70 ± 2.31 ^c	318.57 ± 8.91 ^{bc}

¹ I: Control (control diet meets the requirements in the AIN-93M formulations), II: Experimental diet containing 0.5% *Polygonum multiflorum* (5 g/kg of diet), III: Experimental diet containing 1% *Polygonum multiflorum* (10 g/kg of diet), IV: Experimental diet containing 0.5% *Cynanchum wilfordii* (5 g/kg of diet), V: Experimental diet containing 1% *Cynanchum wilfordii* (10 g/kg of diet). All data are expressed as means ± SEM. Different letters in a column indicate significantly different values assessed by Duncan's multiple test ($p < 0.05$)

제5절 하수오의 혈류 개선 활성 성분의 분리 및 구조 분석

1. 용매추출물 및 용매분획물의 제조

가. 적하수오 뿌리로부터 용매추출물 및 용매분획물의 제조

건조하여 분쇄한 적하수오 뿌리 1.7 kg에 대하여 80% MeOH 수용액에 24시간 담가서 실온에서 추출하였다. 추출물을 여과하고, 남은 것을 동일한 방법으로 3회 더 추출하였다. 얻어진 여액을 모두 합쳐 감압 농축하여 MeOH 추출물을 얻었다. 얻어진 MeOH 추출물을 EtOAc (3 L × 3) / H₂O (3 L)로 분배 추출하였고, 다시 H₂O층을 *n*-BuOH (3 L × 2)로 분배 추출하였다. 각층을 감압 농축하여, EtOAc 분획 (JHE, 105 g)과 *n*-BuOH 분획 (JHB, 84 g) 및 H₂O 분획을 얻었다 (Fig. 21).

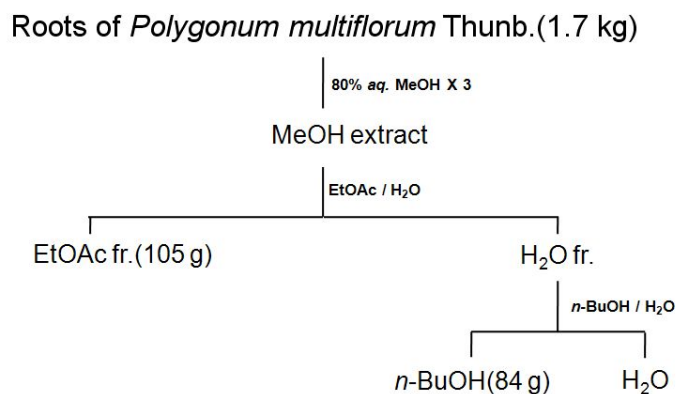


Fig. 21. Schematic Procedure of solvent fractionation from methanolic extract of *Polygonum multiflorum*

나. 백하수오 뿌리로부터 용매추출물 및 용매분획물의 제조

건조하여 분쇄한 백하수오 뿌리 5 kg에 대하여 80% MeOH 수용액에 24시간 담가서 실온에서 추출하였다. 추출물을 여과하고, 남은 것을 동일한 방법으로 2회 더 추출하였다. 얻어진 여액을 모두 합쳐 감압 농축하여 MeOH 추출물을 얻었다. 얻어진 MeOH 추출물을 EtOAc (3 L × 3) / H₂O (3 L)로 분배 추출하였고, 다시 H₂O층을 *n*-BuOH (3 L × 2)로 분배 추출하였다. 각층을 감압 농축하여, EtOAc 분획

(PME, 78 g)과 *n*-BuOH 분획 (PMB, 91 g)과 H₂O 분획을 얻었다 (Fig. 22). 얻어진 각 분획에 대하여 전개용매를 달리하여 TLC 분석하였다 (Fig. 23, 24). 사용한 TLC 의 종류 및 전개용매는 다음과 같다. EtOAc 분획: SiO₂ TLC를 이용하였으며, 전개용매는 *n*-hexane-EtOAc=5:1, CHCl₃-MeOH=10:1, CHCl₃-MeOH-H₂O=16:3:1→8:3:1를 사용 하였으며, BuOH 분획도 위와 같은 조건으로 분석하였다. 그리고 UV 램프를 이용하여 UV흡수 특성을 관찰하였고, 10% 황산 수용액을 분무한 후 가열하여 발색된 pattern 을 획득하였으며 이로부터 성분을 추정하였다 (Table 24).

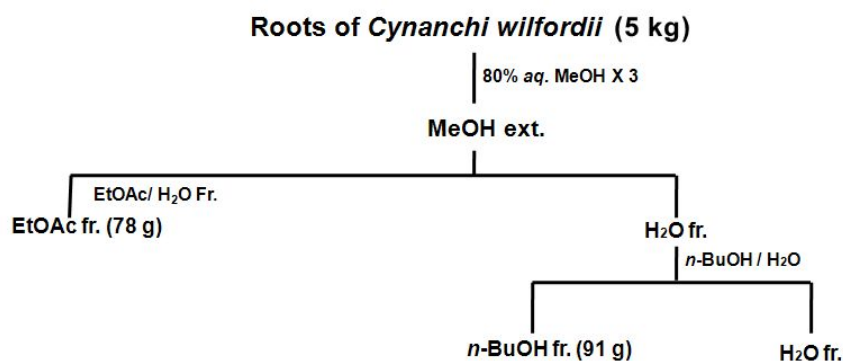


Fig. 22. Schematic Procedure of solvent fractionation from methanolic extract of *Cynanchi wilfordii*

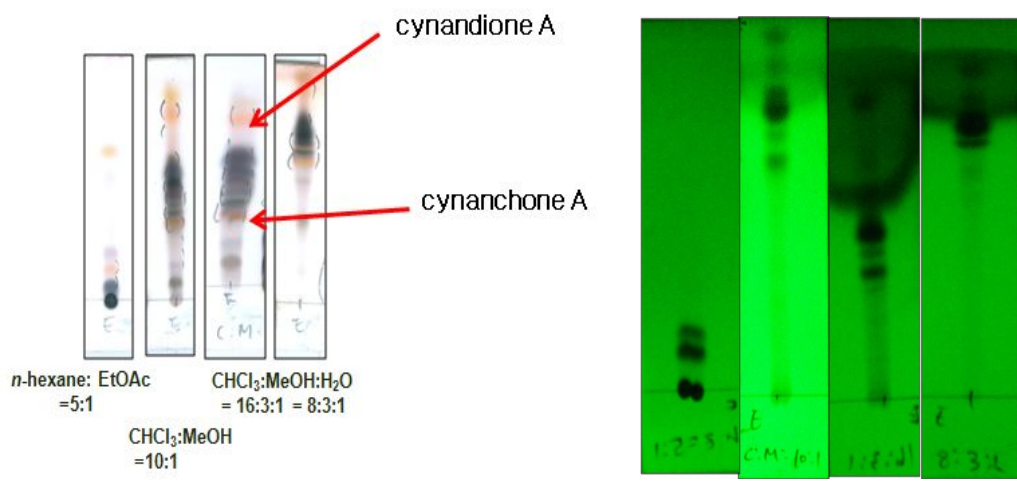


Fig. 23. SiO₂ TLC of EtOAc fraction

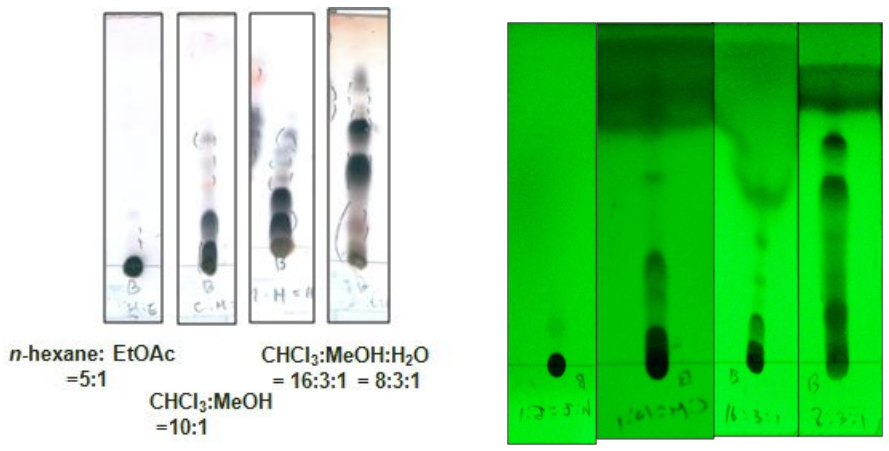


Fig. 24. SiO₂ TLC of BuOH fraction

Table 24. 각 분획에 함유된 추정 성분 profile

	EtOAc fraction	BuOH fraction
	acetophenone:	
secondary metabolites	2,5-dihydroxyacetophenone, cynanchone A, cynandione	polyoxypregnane : wilfoside C3N, C2G, D1N, W3G
	polyoxypregnane: wilfoside K1N, wilfoside C1N	

2. 활성 지표성분의 분리 및 정제

가. 적하수오 뿌리로부터 활성 지표성분의 분리 및 정제

위에서 얻어진 EtOAc 분획 (105 g)에 대하여 Sil-100g SNAP cartridge를 이용한 flash column chromatography (이하 c.c.)를 진행하였다 (Fig. 25). 용출용매는 $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}=5:1$ 로 정하여 실시하였고, 총 6개의 분획 (JHE-1~JHE-6)을 얻었다. 그 중에서 JHE-3 분획 (8.8 g)에 대하여 Sil-100g SNAP cartridge를 이용한 flash column c.c.를 진행하였고, 용출용매는 $\text{CHCl}_3\text{-MeOH} = 10:1$ 로 하여 5개의 분획 (JHE-3-1~JHE-3-5)으로 나누었다. 이 중에서 JHE-3-2 분획 (3.1 g)에 대하여 역상 ODS c.c. ($\text{MeOH-H}_2\text{O} = 1:1$)를 실시하여 9개의 분획 (JHE-3-2-1~JHE-3-2-9)으로 나누었으며, JHE-3-3분획에서 compound 1 (150 mg)을 분리하였다. JHE-3-2-3 분획 (21 mg)에 대하여 KP-C18-HS 30 g SNAP cartridge를 이용하여 ODS c.c. ($\text{MeOH-H}_2\text{O} = 2:3$)를 진행한 결과 compound 2[JHE-3-2-3-2(9 mg)]를 정제하였다. 또한, JHE-3-2-8 분획 (890 mg)에 대하여 SiO_2 c.c. ($n\text{-Hexane-CHCl}_3 = 5:1 \rightarrow 1:1 \rightarrow 1:2 \rightarrow 1:3 \rightarrow n\text{-Hexane-CHCl}_3\text{-MeOH} = 10:5:1$)를 실시하여 27개의 분획 (JHE-3-2-8-1~JHE-3-2-8-27)으로 나누었으며, 이 중 JHE-3-2-8-16 분획 (124 mg)과 JHE-3-2-8-22 분획 (203 mg)에 대하여 각각 SiO_2 c.c.를 진행하여 compound 3[JHE-3-2-8-16-4(67 mg)]과 compound 4[JHE-3-2-8-22-6(9 mg)]를 정제하였다.

Roots of *Polygonum multiflorum* Thunb.(1.7 kg)

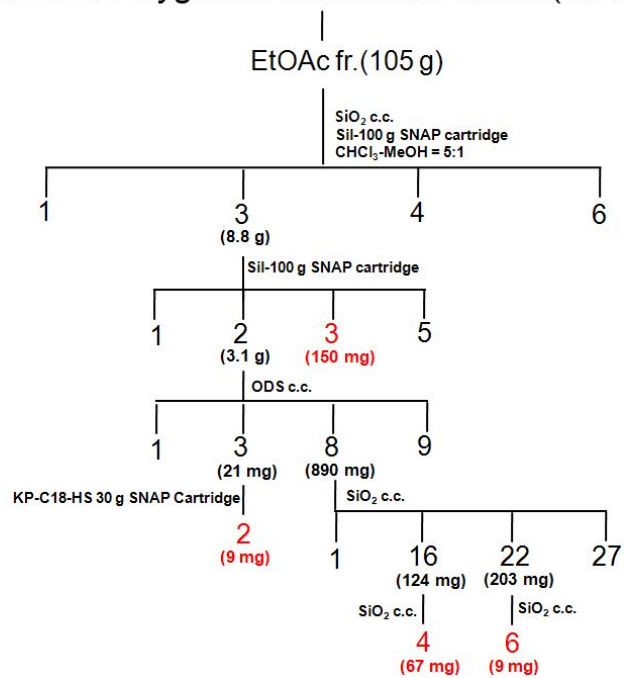


Fig. 25. Schematic Procedure of solvent fractionation from ethylacetate extract of *Polygonum multiflorum*

나. 백하수오 뿌리로부터 활성 지표성분의 분리 및 정제

EtOAc 분획 (78 g)으로 부터 silica gel column chromatography (이하 c.c.) (*n*-hexane-EtOAc = 5:1→3:1→1:1, CHCl₃-MeOH=1:1)를 실시하여 총 17개의 분획 (PME-1~PME-19)을 얻었다 (Fig. 26). 그 중에서 PME-6 분획[7 g, Ve/Vt (elution volume/total volume)]에 대하여 silica gel c.c.(*n*-hexane-CHCl₃-MeOH = 10:3:1)를 실시하여 8개의 분획 (PME-6-1~PME-6-8)으로 나누었다. 이 중에서 PME-6-5 분획[3.65 g, Ve/Vt (elution volume/total volume) 0.45-0.56]에 대하여 역상 ODS c.c. (MeOH-H₂O = 1:2)를 실시하여 7개의 분획 (PME-6-5-1~6-5-7)으로 나누었 으며, 이 중에서 PME-6-5-5분획에서 compound 1[25 mg, Ve/Vt (elution volume/total volume) 0.51-0.63]을 분리 하였다. PME-7 분획[4.53 g, Ve/Vt (elution volume/total volume)]에 대하여 silica gel c.c.(*n*-hexane-CHCl₃-MeOH = 10:5:1)를 실시하여 6개의 분획 (PME-7-1~PME-7-6)으로 나누었고, 이 중 에서 PME-7-6 분획에서 compound 2[24 mg, Ve/Vt (elution volume/total volume) 0.85-1.00]을 분리하였다.

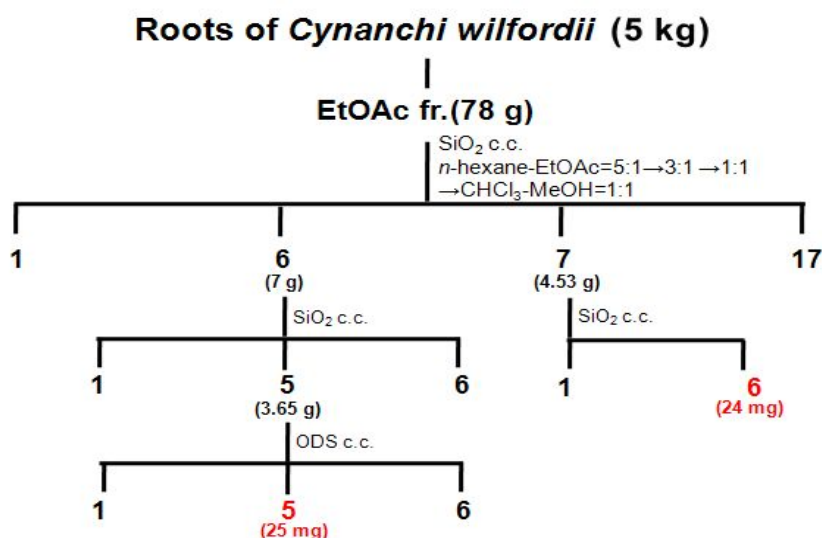


Fig. 26. Schematic Procedure of solvent fractionation from ethylacetate extract of *Cynanchi wilfordii*

3. 지표성분의 구조결정

가. 적하수오 지표성분의 구조결정

1) Compound 1 (2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-glucose)

Yellow amorphous powder (MeOH); EI/MS m/z 406 $[M]^+$; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD , δ_{H}) 7.67 (1H, d, $J=16.4$ Hz, H-8), 7.42 (2H, d, $J=8.4$ Hz, H-2',6'), 6.89 (1H, d, $J=16.4$ Hz, H-7), 6.74 (2H, d, $J=8.4$ Hz, H-3',5'), 6.59 (1H, d, $J=2.4$ Hz, H-6), 6.23 (1H, d, $J=2.4$ Hz, H-4), 4.48 (1H, d, $J=7.6$ Hz, H-1"), 3.77-3.23 (6H, m, H-2",3",4",5",6") $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD , δ_{C}) 158.1 (C-4'), 155.7 (C-5), 151.8 (C-3), 137.7 (C-2), 133.5 (C-7), 130.6 (C-8), 130.6 (C-1'), 129.9 (C-2',6'), 121.5 (C-1), 116.3 (C-3',5'), 108.1 (C-6), 103.5 (C-4), 102.6 (C-1"), 78.1 (C-3"), 77.8 (C-5"), 75.4 (C-4"), 62.1 (C-6") (Fig. 27, Fig 28).

2) Compound 2 (torachryson-8-O- β -D-glucoside)

Yellow amorphous powder (MeOH); negative FAB/MS m/z 407 $[M-1]^+$; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD , δ_{H}) 7.03 (1H, br. s, H-4), 7.00 (1H, d, $J=2.4$ Hz, H-7), 6.83 (1H, d, $J=2.4$ Hz, H-5), 5.11 (1H, d, $J=7.6$ Hz, H-1'), 3.95-3.45 (6H, m, H-2',3',4',5',6'), 3.86 (3H, s, 6-OCH₃), 2.57 (3H, s, C=O-CH₃), 2.28 (3H, s, 3-CH₃). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD , δ_{C}) 206.0 (C=O), 160.2 (C-6), 157.0 (C-8), 149.2 (C-1), 139.1 (C-3), 134.6 (C-10), 125.2 (C-2), 120.2 (C-4), 109.4 (C-9), 104.3 (C-7), 104.2 (C-1"), 102.4 (C-5), 78.8 (C-5'), 78.1 (C-3'), 74.9 (C-2'), 71.2 (C-4'), 62.4 (C-6'), 55.9 (6-OCH₃), 30.8(C=O-CH₃), δ 20.3 (3-CH₃) (Fig. 27, Fig. 29).

3) Compound 3 (β -sitosterol)

White powder (CHCl_3); EI/MS m/z 414 $[M]^+$, $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CHCl_3 , δ_{H}) 5.31 (1H, br. s, H-6), 3.45 (1H, m, H-3), 0.98 (3H, s, H-19), 0.90 (3H, d, $J=6.4$ Hz, H-21), 0.84 (3H, t, $J=7.6$ Hz, H-29), 0.81 (3H, d, $J=7.6$ Hz,

H-26), 0.78 (3H, d, $J=8.4$ Hz, H-27), 0.65 (3H, s, H-18) ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3 , δ_{C}) 140.6 (C-5), 121.64 (C-6), 71.78 (C-3), 56.72 (C-14), 55.99 (C-17), 50.08 (C-9), 45.78 (C-24), 42.29 (C-4), 42.27 (C-13), 39.75 (C-12), 37.24 (C-1), 36.52 (C-10), 36.17 (C-20), 33.92 (C-22), 31.94 (C-7), 31.89 (C-8), 31.66 (C-2), 29.10 (C-25), 28.3 (C-16), 25.99 (C-23), 24.35 (C-15), 23.06 (C-28), 21.12 (C-11), 19.9 (C-19), 19.46 (C-26), 19.06 (C-27), 18.83 (C-21), 12.05 (C-29), 11.93 (C-18) (Fig. 27, Fig. 30).

4) Compound 4 (emodin)

Yellow powder (MeOH); negative EI/MS m/z 270 $[\text{M}]^+$, ^1H -NMR (400 MHz, CD_3OD , δ_{H}) 7.52 (1H, br. s, H-4), 7.23 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-2), 7.02 (1H, br. s, H-5), 6.54 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-7), 2.40 (3H, s, 6- CH_3) ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD , δ_{C}) 191.2 (C-9), 182.9 (C-10), 166.5 (C-6), 165.6 (C-8), 162.6 (C-1), 148.6 (C-3), 135.9 (C-10a), 133.7 (C-4a), 124.7 (C-2), 121.4 (C-4), 114.2 (C-9a), 110.0 (C-8a), 109.8 (C-5), 108.7 (C-7), 22.2 (6- CH_3) (Fig. 27, Fig. 31).

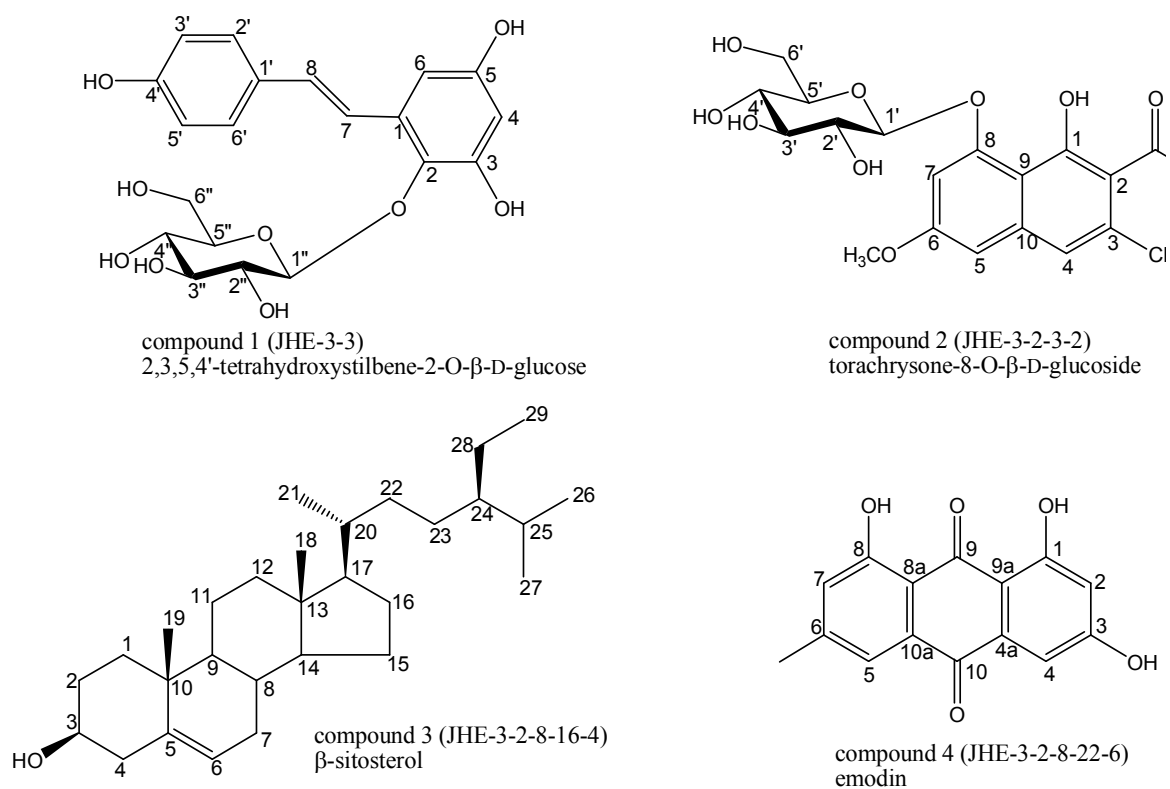


Fig. 27. Molecular structure of compounds of solvent fractionation from *Polygonum multiflorum* extract

Compound 1 (JHE-3-3)

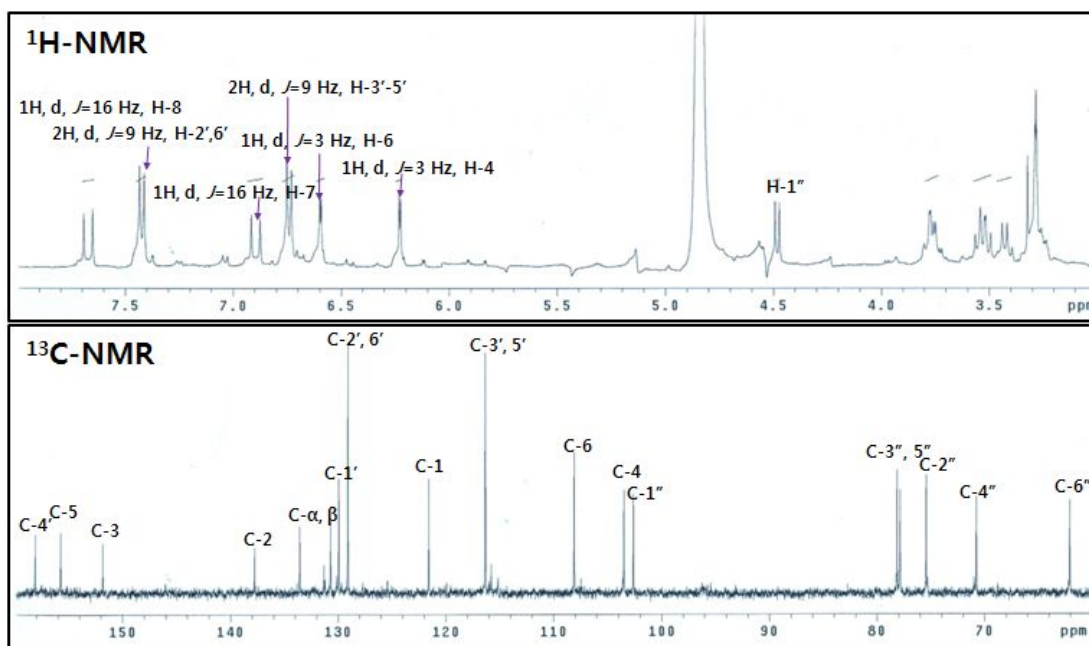


Fig. 28. NMR spectrum of compound 1 (JHE-3-3)

Compound 2 (JHE-3-2-3-2)

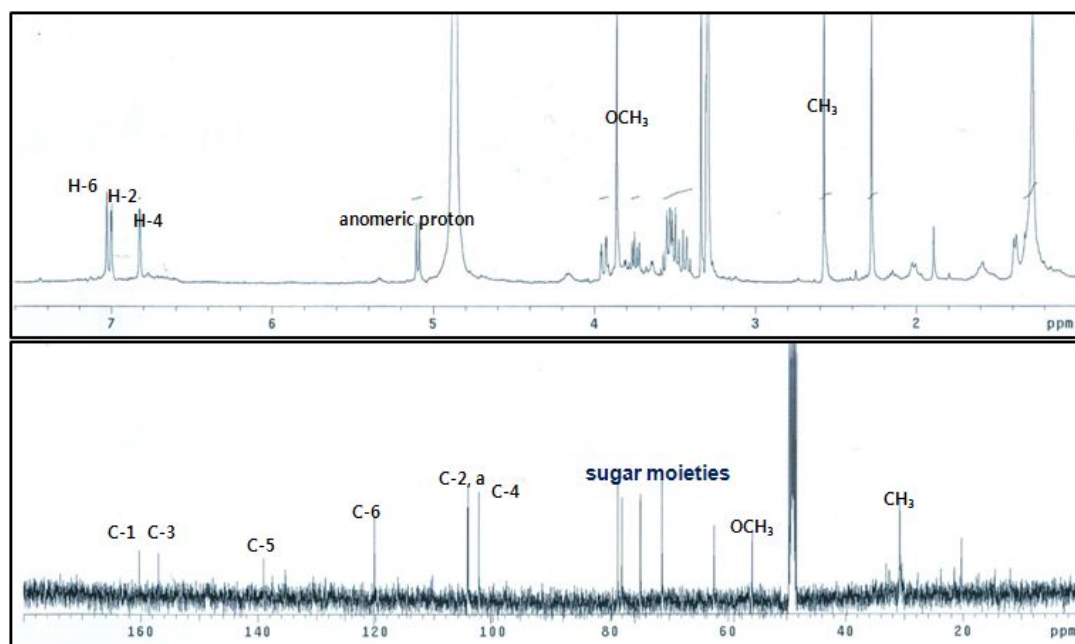


Fig. 29. NMR spectrum of compound 2 (JHE-3-2-3-2)

Compound 3 (JHE-3-2-8-16-4)

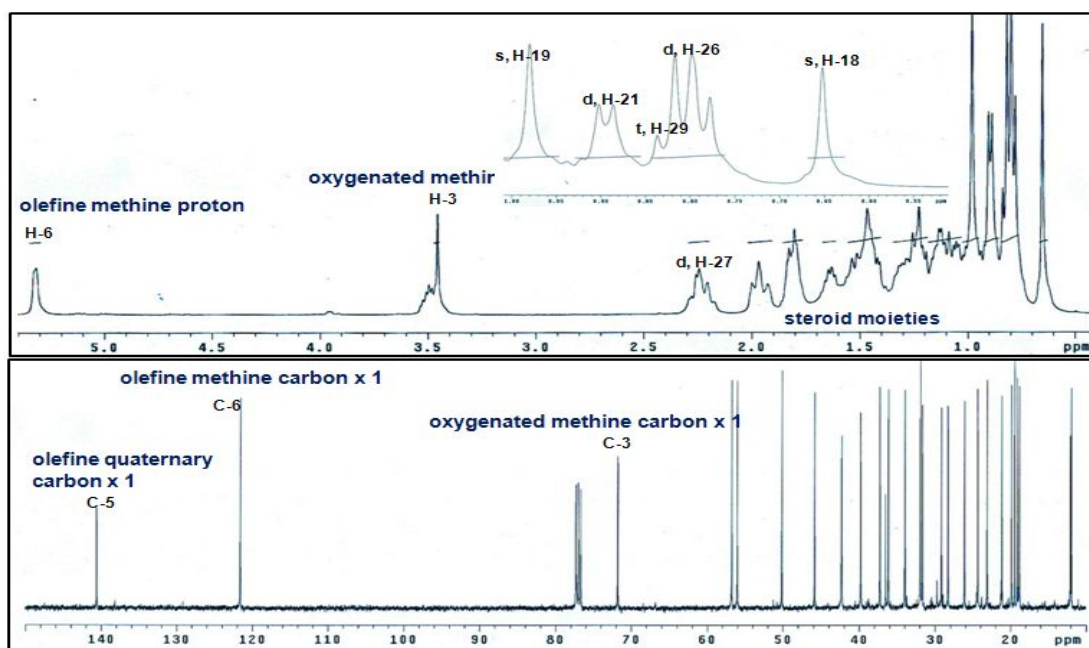


Fig. 30. NMR spectrum of compound 3 (JHE-3-2-8-16-4)

Compound 4 (JHE-3-2-8-22-6)

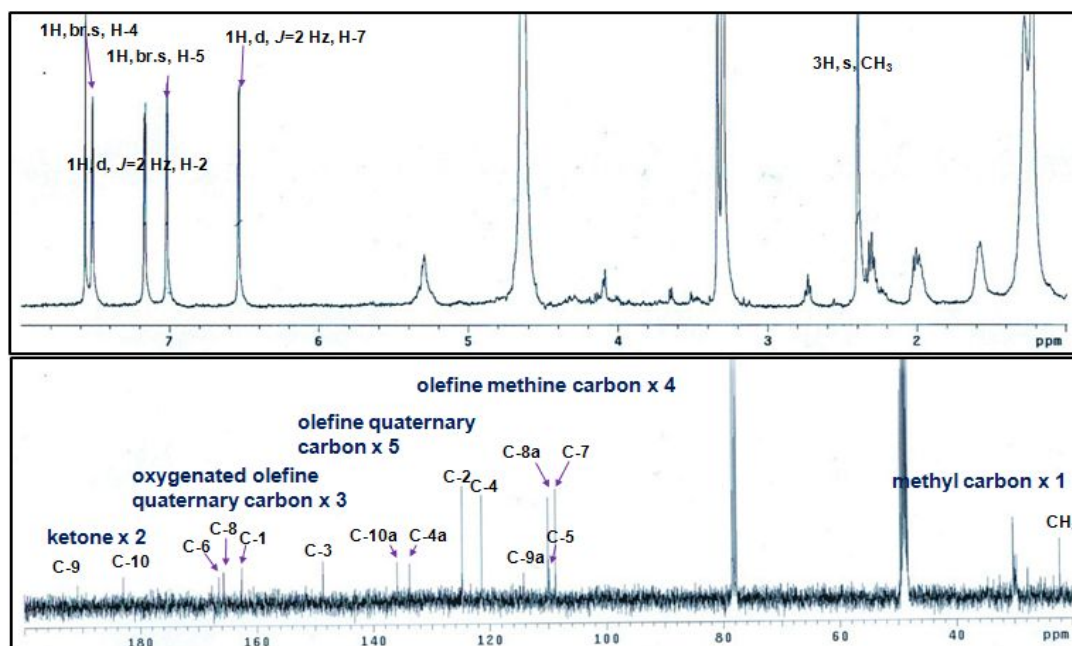


Fig. 31. NMR spectrum of compound 4 (JHE-3-2-8-22-6)

나. 백하수오 지표성분의 구조결정

1) Compound 1 (2,3-dihydroxyacetophenone)

EI/MS m/z : 152 $[M]^+$; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , δ) 7.86(1H, d, $J=8.4$ Hz, H-6), 6.34(1H, dd, $J=8.8, 2.4$ Hz, H-5), 6.22(1H, br.s, $J=2.4$ Hz, H-3), 2.49(3H, s, H-8), $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , δ) 203.9 (C-7), 166.3(C-2), 166.0(C-4), 134.3(C-6), 108.9(C-5), 103.4(C-3), 26.2(C-8).

2) Compound 2 (cyanation A)

마황색의 침상형 물질; EI/MS m/z : 302 $[M]^+$; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , δ_{H}) 7.73(1H, d, $J=8.8$ Hz, H-4'), 6.96(1H, d, $J=8.8$ Hz, H-5), 6.79(1H, d, $J=8.8$ Hz, H-4), 6.49(1H, d, $J=8.8$ Hz, H-5'), 2.53(3H, s, H-8'), 2.14(3H, s, H-8), $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , δ_{C}) 206.8 (C-7), 203.9(C-7'), 163.0(C-2',6'), 152.4(C-3), 148.3(C-6), 134.5(C-4'), 126.3(C-1), 121.5(C-5), 119.2(C-2), 118.3(C-4), 114.0(C-1'), 112.6(C-3'), 108.8(C-5'), 30.8(C-8), 26.3(C-8').

Compound 1은 EI/MS spectrum에서는 m/z : 152 $[M]^+$ molecular ion peak를 나타내었으며 $^1\text{H-NMR}$ spectrum에서 δ_{H} 7.86 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H-6), δ_{H} 6.34 (1H, dd, $J=8.8, 2.4$ Hz, H-5), δ_{H} 6.22 (1H, br.s, $J=2.4$ Hz, H-3)에서 3, 5, 6-삼치환 benzene ring signal이 관측되었고, δ_{H} 2.49 (3H, s, H-8)에서 methyl group signal이 관측되었다. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서 총 8개의 carbon signal이 관측되었으며, δ_{C} 203.9 (C-7)에서 ketone carbon을 δ_{C} 26.2 (C-8)에서 methyl group signal이 관측되었다. 이상의 분광학적 데이터를 바탕으로 Compound1은 2,4-dihydroxyacetophenone으로 구조동정 하였다. 이 화합물은 백하수오에서는 처음으로 분리 및 구조동정되었다.

Compound 2는 미황색 침상결정으로 EI/MS spectrum에서는 m/z : 302 $[M]^+$ molecular ion peak를 나타내었으며 $^1\text{H-NMR}$ spectrum에서 δ_{H} 7.73 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H-4'), δ_{H} 6.96 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H-5), δ_{H} 6.79 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H-4), δ_{H} 6.49 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H-5'), δ_{H} 2.14 (3H, s, H-8)으로 두쌍의 1,

3, 4, 5-사치환 benzene ring signal이 관측되었고, 2.53 (3H, s, H-8')과 2.14 (3H, s, H-8)에서 두 개의 methyl group signal이 관측되었다. ^{13}C -NMR spectrum에서 총 17개의 carbon signal이 관측되었으며, δ_{C} 206.8 (C-7)과 δ_{C} 203.9 (C-7')에서 두 개의 ketone carbon이 관측되었으며, 또한 30.8 (C-8)과 26.3 (C-8')에서 두 개의 methyl group signal이 관찰되었다. 이상의 분광학적 데이터를 바탕으로 Compound2는 cynandione A로 구조동정 하였다. cynandione A은 백하수오의 기지 화합물로서 적하수오라고 의뢰 받은 시료가 백하수오라는 것 또한 규명 할 수 있었다.

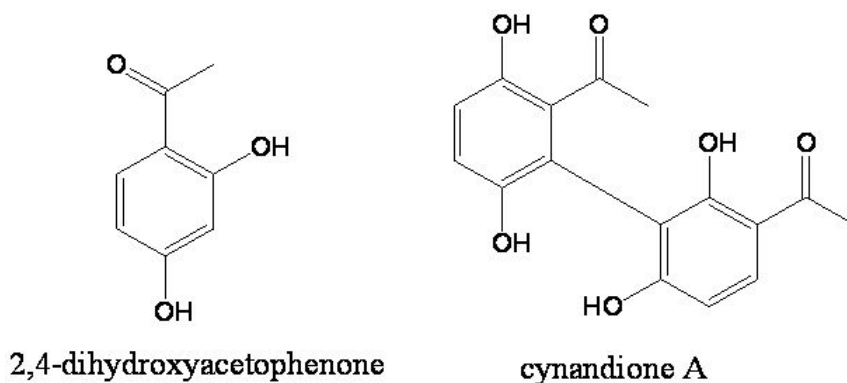


Fig. 32. Molecular structure of compounds of solvent fractionation from *Cynanchi wilfordii*

4. 활성검정 분획물 및 화합물 제조

가. 적하수오로부터 활성 검정용 분획물 제조

적하수오 뿌리를 80% MeOH 로 추출, 농축하여 얻어진 추출물에 대하여 EtOAc, n-BuOH 및 물을 이용하여 용매 분획하여 EtOAc, BuOH 및 분획물을 얻었다. 3종의 용매분획물을 10 mg 이상씩 취하여 활성 검정용 시료로 제조하였다. 시료는 Table 25 와 같다.

Table 25. 활성 분석용 적하수오 용매분획물

	1 st column	분획명	시료량
1	적하수오	JHE	19.4 mg
2	적하수오	JHB	37.1 mg
3	적하수오	JHH	14.4 mg

나. 백하수오로부터 활성 검정용 분획물 및 화합물 제조

백하수오를 80% MeOH 로 추출, 농축하여 얻어진 추출물에 대하여 EtOAc, n-BuOH 및 물을 이용하여 용매 분획하여 EtOAc, BuOH 및 분획물을 얻었다 (Table 26). 3종의 용매분획물을 10 mg 이상씩 취하여 활성 검정용 시료로 제조하였다. EtOAc 및 BuOH 분획에 대하여 column chromatography를 반복하여 소분획을 제조하였으며, 각 소분획을 10 mg 이상씩 취하여 활성 검정용 시료를 제조하였다. 소분획은 다시 column chromatography를 반복하여 분획물을 얻거나 순수한 단일화합물로 분리, 정제하였으며, 10 mg 이상씩 취하여 활성 검정용 시료를 제조하였다. 시료는 아래와 같다.

Table 26. 활성 분석용 백하수오 용매분획물

	1 st column	분획명	시료량
1	PME		11.5 mg
2	PMB		56.0 mg
3	PMH		21.5 mg
4	PME-1		83.8 mg
5	PME-2		20.9 mg
6	PME-3		24.6 mg
7	PME-4		16.4 mg
8	PME-5		25.2 mg
9	PME-9		18.0 mg
10	PME-10		11.3 mg
11	PME-12		10.2 mg
12	PME-13		10.2 mg
13	PME-14		20 mg
14	PME-16		22.8 mg
15	PME-17		11.5 mg
16	PME-6	PME-6-2	24.0 mg

17		PME-6-3	12.7 mg
18		PME-6-4	19.9 mg
19		PME-6-5-7	12.1 mg
20		PME-7-1	15.5 mg
21		PME-7-2	22.2 mg
22	PME-7	PME-7-3	26.1 mg
23		PME-7-4-4	9.1 mg
24		PME-7-4-3-1	14.5 mg
25		PME-7-4-3-6	9.3 mg
26		PME-8-2	21.5 mg
27	PME-8	PME-8-4	8.0 mg
28		PME-8-3-9	9.8 mg
29		PME-11-2	16.3 mg
30	PME-11	PME-11-1-3	34.1 mg
31		PME-11-4-3	10.4 mg
32		PME-13-3	14.9 mg
33	PME-13	PME-13-10	10.0 mg
34		PME-13-6-5	18.2 mg
35		PME-13-6-17	11.7 mg
36		PME-15-2	14.1 mg
37	PME-15	PME-15-5	43.8 mg
38		PME-15-8	11.3 mg
39		PMB-1	14.1 mg
40		PMB-2	23.8 mg
41		PMB-4	40.7 mg
42		PMB-5	41.0 mg
43		PMB-7	54.0 mg

5. HPLC를 이용한 적하수오와 백하수오의 지표성분 분석방법 확립

가. 적하수오의 emodin 정량 분석

1) Emodin 표준용액 조제

적하수오 (*Polygonummultiflorum* Thunb.) 중에 주요 성분으로 함유되어 있는

emodin의 함량을 분석하여 지표성분으로 사용하고자 하였다. 표준용액은 Emodin 0.5 mg을 취하여 1 ml의 MeOH (HPLC)에 녹인 후 적절한 농도 범위 500 ppm, 250 ppm, 125 ppm, 62.5 ppm, 31.25 ppm, 15.625 ppm, 7.813 ppm 으로 희석하여 사용하였다.

2) Emodin HPLC 분석조건 및 chromatogram

표준액 및 검액의 HPLC 분석조건은 다음과 같다. Column은 Luna C₁₈(2) (4.6 × 250 mm, 5 μm, Phenomenex)를 사용하였고, 이동상으로는 0.01분에 H₂O (0.1% formicacid):acetonitrile (0.1% formicacid)의 비율 10:90에서 2분에 0:100 이 되도록 gradient 를 주어 흘려주었으며 20 분까지 100% acetonitrile (0.1% formic acid)을 계속 흘려주었다. 유속은 0.6 mL/min로, UV detector를 이용하여 290 nm 에서 peak 를 검출하였다. 그 결과 Emodin의 농도별 HPLC spectrum (Fig. 33)은 아래와 같이 머무름 시간이 10.453-10.459분에서 peak를 양호하게 검출할 수 있었다.

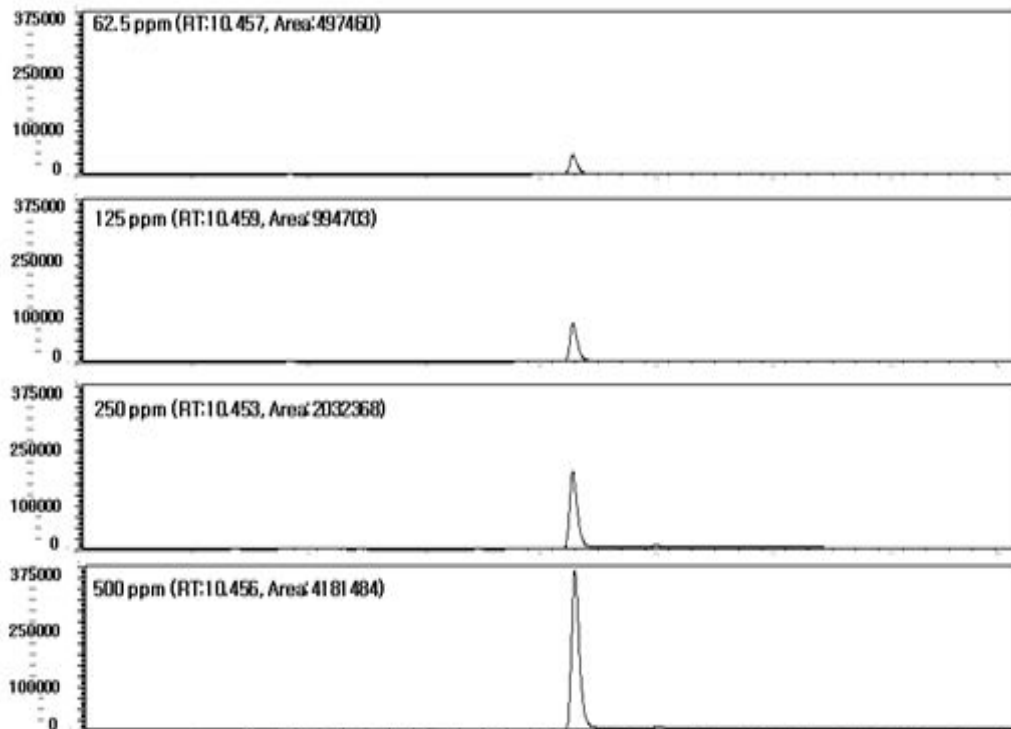


Fig. 33. HPLC spectrtm of emodin.

3) Emodin 회귀곡선

각각의 농도별 표준용액 20 mL를 HPLC로 분석하여 chromatogram의 면적을 구하고 농도와 면적에 따른 검량선을 그어 함량계산을 실시하였다. 회귀방정식은 $y = 8442798.6087x - 52277.1739$ 이고 상관계수는 0.9998이었다 (Fig. 34).

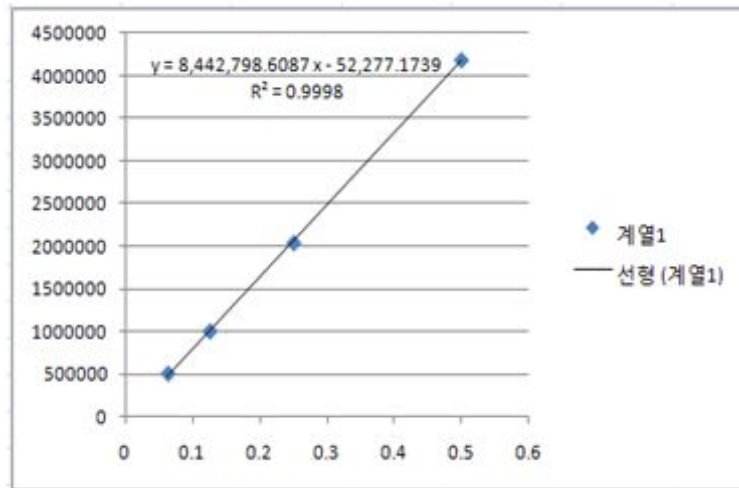


Fig. 34. Regression curve on HPLC spectrum of emodin.

나. 백하수오의 cynandione A 정량 분석

1) Cynandione A 표준용액 조제

백하수오 (*Cynanchum wilfordii*)중에서 주요 성분으로 함유되어 있는 cynandione A의 함량을 분석하여 지표성분으로 사용하고자 하였다. 표준용액은 Cynandione A를 0.5 mg을 취하여 1 mL의 MeOH (HPLC grade)에 녹인 후 적절한 농도 범위 500 ppm, 250 ppm, 125 ppm, 62.5 ppm, 31.25 ppm, 15.625 ppm, 7.813 ppm으로 희석하여 사용하였다. 시험용액은 백하수오 분말 2 g을 정확히 취하여, 50 mL의 MeOH을 가하여 75-80 °C에서 4시간 reflux하여 추출하였고, MeOH 추출물을 filter paper로 여과한 후 50 mL 중 20 mL를 취하여 아래와 같은 조건으로 HPLC를 이용하여 분석하였다.

2) Cynandione A HPLC 분석조건 및 chromatogram

표준액 및 검액의 HPLC 분석조건은 다음과 같다. Column은 Luna C₁₈(2) (4.6 × 250 mm, 5 μm, Phenomenex)를 사용하였고, 이동상으로는 0.01분에 H₂O (0.1%

formic acid):acetonitrile (0.1% formic acid)의 비율 60:40에서 20분에 0:100 이 되도록 gradient 를 주어 흘려 주었으며, 유속은 0.6 mL/min로, UV detector를 이용하여 290 nm에서 peak 를 검출하였다. 그 결과 Cynandione A의 농도별 HPLC spectrum (Fig. 35)과 같이 머무름 시간이 8.615 ~ 8.630분에서 peak를 양호하게 검출할 수 있었다.

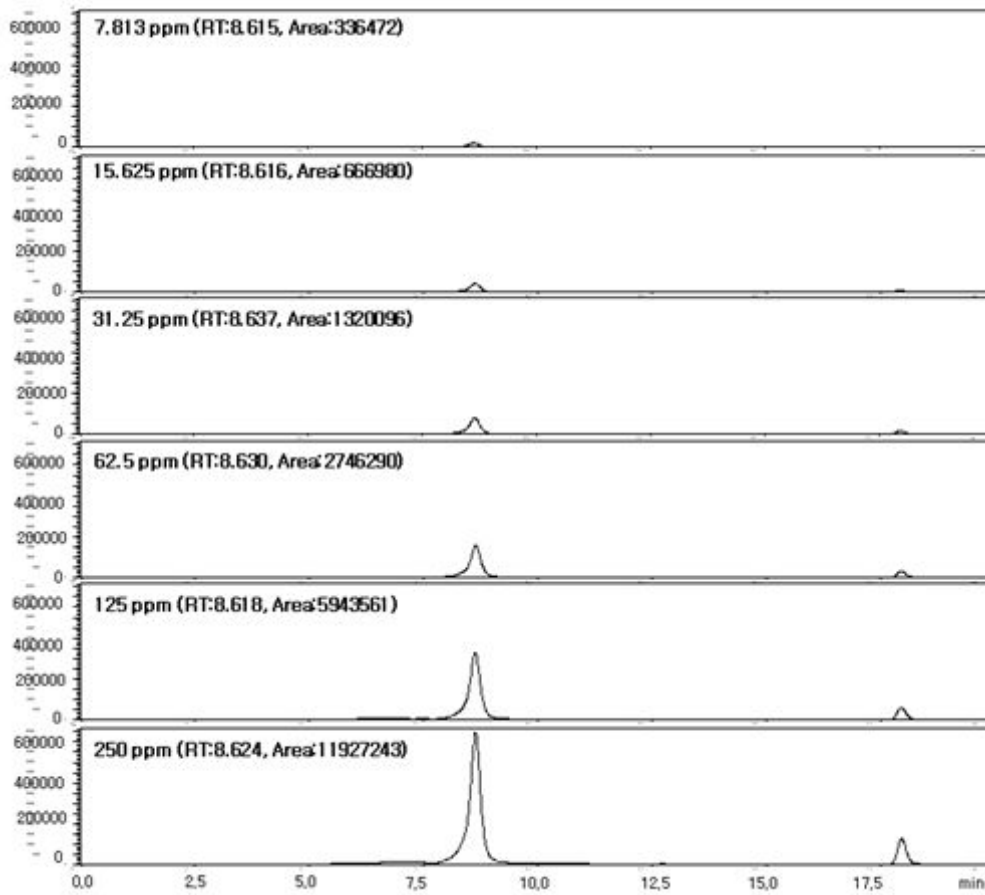


Fig. 35. HPLC spectra of cynandione A.

3) Cynandione A 회귀곡선

각각의 농도별 표준용액 20 mL를 HPLC로 분석하여 chromatogram의 면적을 구하고 농도와 면적에 따른 검량선을 그어 함량계산을 실시하였다. 회귀방정식은 $y = 48182065.1258x - 128994.6965$ 이고 상관계수는 0.9997이었다 (Fig. 36).

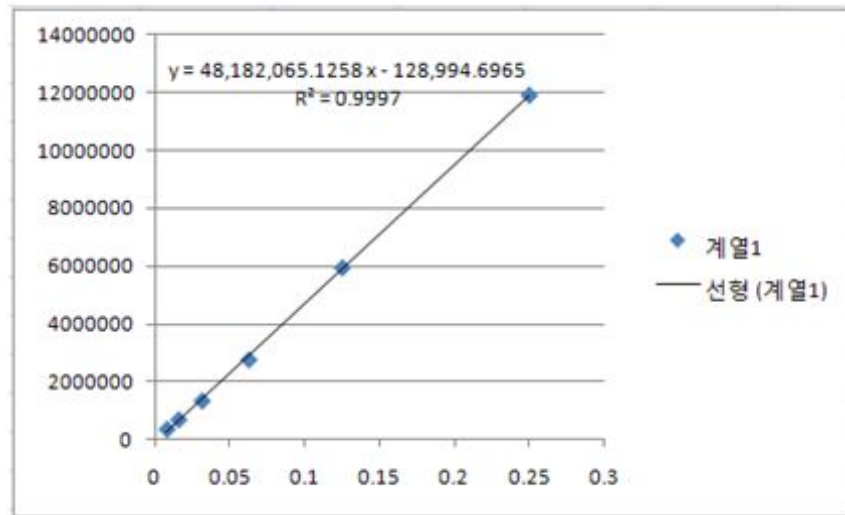


Fig. 36. Regression curve on HPLC spectrum of cynandione A

4) 백하수오의 cynandione A의 함량분석

백하수오 MeOH 추출물을 HPLC로 분석하여 RT (8.621 min)으로부터 cynandione A의 peak를 검출할 수 있었다 (Fig. 37). Area 값이 336472로 확인되었으며 회귀방정식으로부터 함량을 분석한 결과 백하수오 분말 중 cynandione A 0.0885%, MeOH 추출물 중 3.54%를 나타내었다.

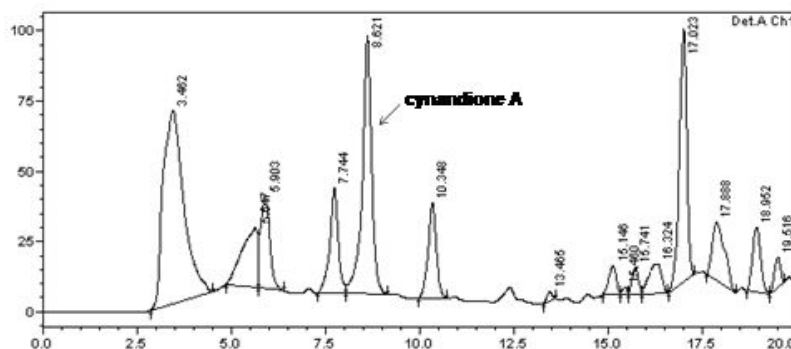


Fig. 37. HPLC spectrum of MeOH extract of *Cynanchum wilfordii*

제6절 하수오를 이용한 젤리 제품 개발

1. 실험 재료 및 방법

가. 실험 재료

본 실험에서 사용된 시료는 건조 분쇄된 적하수오와 백하수오에 각각 2 kg에 80% EtOH을 1:10 비율로 첨가하여 초고속 진공 저온 추출기 (COSMOS-660, KyungSeo Machine Co., Inchon, Korea)에서 끓기 시작한 시점을 기준으로 6시간 동안 95 °C에서 추출하였다. 추출액은 80 °C에서 감압 농축하여 시험시료로 사용하였다. 농축된 시료는 -80°C에 보관하여 결빙시킨 후 동결건조기로 건조하여 분말형태의 시료가 실험에 사용되었다. 적하수오와 백하수오의 수율은 각각 20.5%, 10.9% 이었다. 한천 분말 ((주) 브레드가든-제조원 (주) 화인한천, 국산), 설탕 (정백당, 큐원), 물엿 ((주) 대상 청정원)을 사용하였다.

나. 실험 방법

1) 젤리의 배합비

펙틴, 젤라틴, 한천, 전분의 다양한 겔화 체를 이용하여 젤리의 겔화 예비실험을 실시하였다. 펙틴젤리는 표면이 거칠고 잘 끊어지고, 젤라틴 젤리는 질기고 씹힘성이 뛰어나나 입안에서의 부드러움이 떨어지는 한계가 있었다. 전분젤리는 다른 젤리와 비교하여 단단한 조직감을 특성으로 가지고 있다고 보고되고 있다⁽⁴²⁻⁴⁴⁾. 한천젤리는 씹힘성은 좋으나 잘 끊어지는 한계가 있었으나 겔 형성 후 건조 과정을 거쳐 원하는 질감을 얻을 수 있었다. 한천 첨가시 기호도가 전체적으로 높게 나타난 연구논문과 예비실험결과를 참고하여 겔화제로 한천을 사용하였다. 적하수오 젤리의 조성은 Table 27에 백하수오 젤리의 조성은 Table 28에 제시하였다. 젤리의 한천의 조성을 다르게 첨가한 예비 실험을 통하여 최적의 한천 양을 6 g 으로 결정하여 제조하였다. 적하수오 젤리는 Table 27과 같이 한천 6 g, 설탕 90 g, 물엿 90 g를 첨가한 것을 대조군으로 하여 수분의 양을 15%로 하였을 때, 적하수오 추출물은 각각 0.25%, 0.5%, 0.75%, 1% 첨가한 군으로 하였다. 백하수오 젤리는 Table 28와 같이 한천 6 g, 설탕 90 g, 물엿 90 g를 첨가한 것을 대조군으로 하여 수분

의 양을 15%로 하였을 때 백하수오 추출물은 각각 0.75%, 1%, 1.25%, 1.5% 첨가한 군으로 하였다.

Table 27. Formula for the *Polygonum multiflorum* (PM) jelly¹

Sample	Agar powder (g)	Sugar (g)	Corn starch syrup (g)	Water (g)	PM powder (g)
Control	6	90	90	114	0
PM1 ¹	6	90	90	114	0.58
PM2	6	90	90	114	1.20
PM3	6	90	90	114	1.75
PM4	6	90	90	114	2.40

¹ PM 1 - 0.25 %, PM 2 - 0.5 %, PM 3 - 0.75 % and PM 4 - 1 %

Table 28. Formula for the *Cynanchum wilfordii* (CW) jelly¹

Sample	Agar powder (g)	Sugar (g)	Corn starch syrup (g)	Water (g)	CW powder (g)
Control	6	90	90	114	0
CW1 ¹	6	90	90	114	1.75
CW2	6	90	90	114	2.40
CW3	6	90	90	114	2.93
CW4	6	90	90	114	3.50

¹ CW 1 - 0.75 %, CW 2 - 1 %, CW 3 - 1.25 % and CW 4 - 1.5 %

2) 젤리 제조

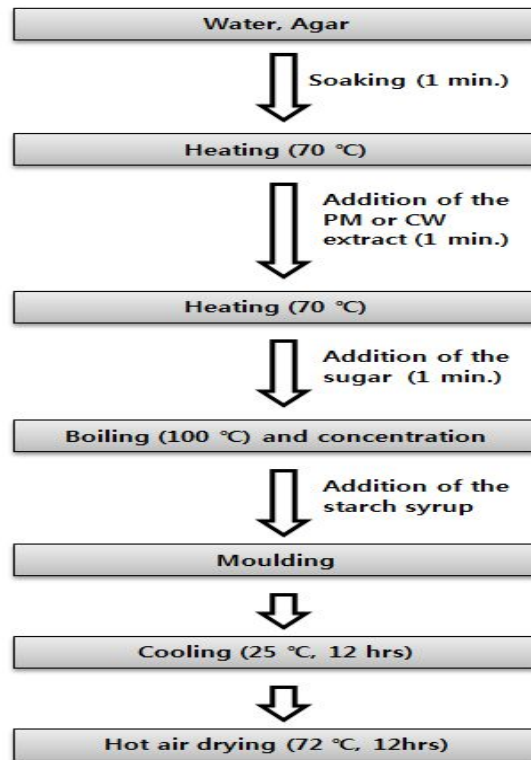
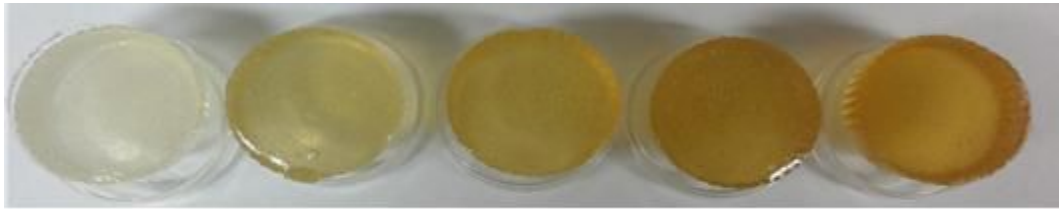


Fig. 38. The procedure for the PM or CW jelly¹

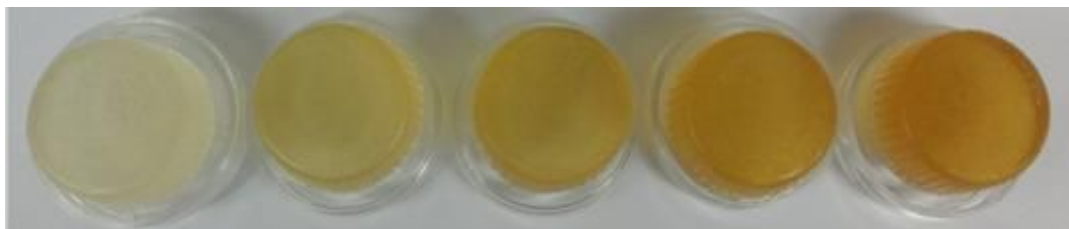
¹ PM (*Polygonum multiflorum*) and CW (*Cynanchum wilfordii*)

하수오 젤리의 제조과정은 Fig 38.과 같다. 114 g의 물에 6 g의 한천을 넣고 1분 간 불린 후 약불로 가열하면서 하수오 추출물을 넣는다. 추출물이 모두 용해되면 설탕과 물엿을 차례로 넣고 완전히 용해시켰다. 젤리 액을 끓여 수분을 15%만 남기고 증발시킨 후에 실리콘 틀에 넣어 상온에서 12시간동안 응고시켰다. 젤리를 틀에서 분리하여 드라이 오븐에서 70 °C, 12시간 열풍 건조시켰다. 열풍건조 전, 후의 젤리는 Fig 39.와 Fig 40.에 각각 제시하였다.



CONTROL PM 1(0.25%) PM 2 (0.5%) PM 3 (0.75%) PM 4 (1%)

(A)



CONTROL PM 1(0.25%) PM 2 (0.5%) PM 3 (0.75%) PM 4 (1%)

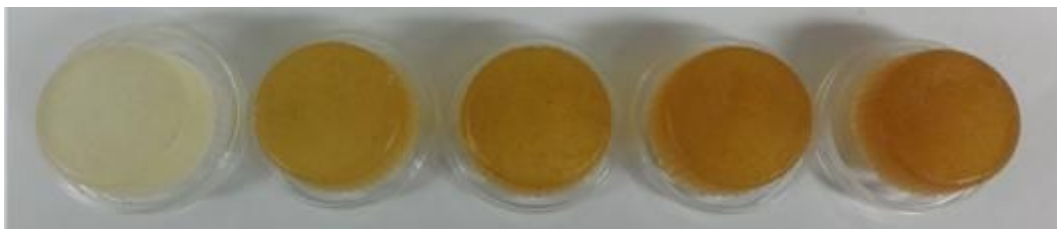
(B)

Fig. 39. The PM Jelly. (A) the PM jelly before hot-air drying (B) the PM jelly after hot-air drying



CONTROL CW 1(0.75%) CW 2 (1%) CW 3 (1.25%) CW 4 (1.5%)

(A)



CONTROL CW 1(0.75%) CW 2 (1%) CW 3 (1.25%) CW 4 (1.5%)

(B)

Fig. 40. The CW Jelly. (A) the CW jelly before hot-air drying (B) the CW jelly after hot-air drying

2. 젤리의 품질 특성 평가

가. 색도 측정

완성된 젤리는 petri dish (35×10 mm)에 담아 색도계 (Chromameter CR-400, Konica minolta sensing inc., Japan)를 이용하여 명도 (L-value, lightness), 적색도 (a-value, redness), 황색도 (b-value, yellowness) 값을 2회 반복 측정, 평균 값으로 나타내었다 (Fig. 41).



Fig. 41. Chromameter

나. 물성 측정 (Texture profile analysis: TPA)

젤리의 물리적 특성은 TA-XT2 (Fig. 42) (Stable micro system, United kingdom)로 측정하였다. 시료는 2회 반복 압착실험으로 원통형 probe (20mm diameter)를 이용하여 측정하였다. 측정 후 얻어진 force-distance curve로부터 hardness (견고성: 원하는 변형에 도달하는데 필요한 힘), farcturability (메짐성), adhesiveness (부착성), springiness (탄력성: 변형된 샘플이 힘이 제거된 후에 원래의 상태로 돌아가려는 성질), cohesiveness (응집성: 물체가 있는 그대로의 형태를 유지하려는 힘), gumminess (겉성: 반고체 상태의 샘플을 삼킬 수 있는 상태로 만드는 성질), chewiness (씹힘성: 고체 상태의 샘플을 삼킬 수 있는 상태로 만드는 성질), resilience (회복력: 가해진 속도, 힘과 관련하여 변형된 샘플이 회복하는 성질)를 측정, texture expert program으로 분석하였다.



Fig. 42. Texture analysis system

다. 관능 평가

관능검사는 20대부터 50대 남녀 한국식품연구원 14명을 패널로 선정하여 본 실험의 목적과 평가 방법 및 측정 항목에 대해 충분히 숙지시킨 후 실시하였다. 평가방법은 9점 척도 법에 의해 젤리의 냄새, 색, 단맛, 경도, 부착성, 탄력성, 전반적 기호도에 대해 선호도가 가장 높을수록 9점, 선호도가 가장 낮을수록 1점을 표시하도록 하였다 (Fig. 43). 각 시료마다 무작위로 조합된 3자리 숫자가 주어졌으며, 동일한 크기의 시료를 담아 물과 함께 관능검사원들에게 동시에 제공하였다.

관능검사 용지

2011년 월 일

시 료 : 젤리 (R) 성 명 : 나 이:

제시된 시료에 대해서 다음의 각 항목을 평가하여 해당 점수 시료번호를 표시하여 주십시오.

1. 냄새	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
대단히 싫다				보통이다				대단히 좋다
2. 맛	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
대단히 싫다				보통이다				대단히 좋다
3. 색깔	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
대단히 싫다				보통이다				대단히 좋다
4. 단맛	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
대단히 싫다				보통이다				대단히 좋다
5. 조직감								
5-1) 경도	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
대단히 싫다				보통이다				대단히 좋다
5-2) 부착성 (입안에 달라붙는 정도)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
대단히 싫다				보통이다				대단히 좋다
5-3) 탄력성	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
대단히 싫다				보통이다				대단히 좋다
6. 종합적인 기호도	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
대단히 싫다				보통이다				대단히 좋다
7. 기타의견								

Fig. 43. Sensory evaluation form for the PM or CW jelly.

라. 통계 분석

모든 실험은 2회 이상 반복 측정하여 그 결과는 SPSS 12.0 package (Statistical Package for Social Science, Chicago IL, USA)를 이용, 일원배치 분산분석을 실시하였다. 각 시험구의 평균과 표준편차를 산출하고, 유의적 차이가 있는 항목에 대해서는 Duncan의 다중범위검정 (Duncan's multiple range test)을 실시하여 유의적인 차이를 $p < 0.05$ 수준에서 비교분석하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 색도

적하수오 추출물 첨가 젤리의 색도 측정 결과는 Table 29과 같다. 색의 밝기를 나타내는 L 값은 대조군이 43.45 ± 1.11 로 적하수오 추출물을 첨가함에 따라 유의적으로 감소하여 어두워졌다. 적하수오 추출물의 함량이 가장 높은 PM 4군의 L값이 39.28 ± 0.74 로 가장 낮았다. 적색 도를 나타내는 a값은 대조군이 0.01 ± 0.07 로 적하수오 추출물의 함량이 높아질수록 유의적으로 높은 a값을 나타내었다. 황색도인 b값 역시 대조군이 2.80 ± 0.11 로 가장 낮아 적하수오 추출물을 첨가에 따른 유의차를 나타내었다. 적하수오 추출물을 0.25 % ~ 0.75 %까지 첨가시 황색도가 증가하다가 1%에서 감소하였다. 젤리에 대한 적하수오 추출물의 첨가는 대조군에 비해 젤리의 명도는 낮추고 적색도와 황색 도는 감소시키나 황색도의 경우 일정수준 이상을 첨가할 경우 오히려 감소하는 것으로 확인되었다.

Table 29. Hunter's color value of the PM jelly¹

Sample	Hunter's color value		
	L	a	b
Control	43.45 ± 1.11 ^a	0.01 ± 0.07 ^d	2.80 ± 0.11 ^e
PM 1	41.63 ± 0.61 ^b	0.04 ± 0.09 ^d	4.94 ± 0.37 ^d
PM 2	40.55 ± 0.58 ^c	0.60 ± 0.12 ^c	6.19 ± 0.62 ^c
PM 3	41.56 ± 0.81 ^b	1.04 ± 0.07 ^b	8.28 ± 0.69 ^a
PM 4	39.28 ± 0.74 ^d	1.63 ± 0.11 ^a	6.88 ± 0.72 ^b

¹ PM: *Polygonum multiflorum*, PM 1 - 0.25 %, PM 2 - 0.5 %, PM 3 - 0.75 % and PM 4 - 1 %, All data are expressed as means ± SD (n = 10), Different letters in the column indicate significantly different values assessed by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

백하수오 추출물 첨가 젤리의 색도 측정 결과는 Table 30과 같다. 색의 밝기를 나타내는 L 값은 대조군이 43.45 ± 1.11로 백하수오 추출물을 첨가함에 따라 유의적으로 감소하여 어두워졌다. CW 2 (백하수오 1%)군 밝기가 39.45 ± 0.83으로 CW 1보다 증가하였으나 백하수오 추출물의 함량이 가장 높은 CW 4군의 L값이 39.28 ± 0.74로 가장 낮았다. 이와 같은 결과는 Cho Y와 Choi MY (2010)의 강황과 비트 분말을 첨가하여 젤리를 제조시 분말의 첨가량이 증가할수록 L 값이 감소하였다는 보고와 같은 결과를 나타내었다⁽⁴⁵⁾. 적색 도를 나타내는 a값은 대조군이 0.01 ± 0.07로 백하수오 추출물의 함량이 높아질수록 유의적으로 높은 a값을 나타내었다. 황색도인 b값 역시 대조군이 2.80 ± 0.11로 가장 낮아 백하수오 추출물을 첨가에 따른 유의차를 나타내었다. 백하수오 추출물을 0.75~1% 첨가시 황색도 값이 유의적으로 증가하였으나 1.25~1.5%에서는 유의적으로 감소하였다. 젤리에 대한 백하수오 추출물의 첨가는 대조군에 비해 젤리의 명도는 낮추고 적색도와 황색도는 감소시키나 황색도의 경우 일정수준 이상을 첨가할 경우 오히려 감소하는 것으로 확인되었다.

Table 30. Hunter's color value of the CM jelly¹

Sample	Hunter's color value		
	L	a	b
Control	43.45 ± 1.11 ^a	0.01 ± 0.07 ^d	2.80 ± 0.11 ^e
CW 1	38.77 ± 0.65 ^b	1.08 ± 0.11 ^c	6.66 ± 0.45 ^b
CW 2	39.45 ± 0.83 ^b	1.84 ± 0.12 ^b	8.51 ± 0.63 ^a
CW 3	36.51 ± 1.31 ^c	1.92 ± 0.21 ^b	6.04 ± 1.15 ^c
CW 4	35.21 ± 0.84 ^d	2.18 ± 0.11 ^a	5.13 ± 0.55 ^d

¹ CW: *Cynanchum wilfordii*, CW 1 - 0.75 %, CW 2 - 1 %, CW 3 - 1.25 % and CW 4 - 1.5 %, All data are expressed as means ± SD (n = 10), Different letters in the column indicate significantly different values assessed by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

나. 물성

적하수오 추출물 첨가된 젤리의 물성을 측정하여 Table 31에 나타내었다. Hardness (경도)는 대조군이 15.54 ± 1.99 로 적하수오 추출물 0.25~0.5% 첨가군에서는 경도의 변화가 없었으나 0.75~1% 첨가군에서 유의적으로 감소하였다. Fracturability (메짐성)는 대조군과 적하수오 추출물 첨가군 사이 유의적 차이가 없었다. Adhesiveness (부착성)는 경도와 마찬가지로 PM 1, PM 2 군에서는 대조군과 같았으나 PM 3, PM 4군에서 대조군과 비교하여 유의적으로 증가하였다. Springiness (탄력성)의 경우 대조군과 적하수오 추출물 사이 유의적 차이를 보이지 않았다. Cohesiveness (응집성), Gumminess (겉성), Chewiness (씹힘성)는 대조군, PM 1, PM 2 군에서는 유의적 차이를 보이지 않았으나 PM 3, PM 4군에서 대조군과 비교하여 유의적으로 감소하였다. Resilience (회복력)는 대조군이 0.41 ± 0.06 으로 PM 1, PM 2군과 유의적 차이를 보이지 않았으나 PM 3군이 0.38 ± 0.02 로 유의적으로 가장 낮은 값을 나타냈다.

백하수오 추출물 첨가된 젤리의 물성을 측정하여 Table 32에 나타내었다. Hardness (경도)는 대조군이 15.54 ± 1.99 로 백하수오 추출물을 첨가한 모든 군에서 대조군과 비교하여 유의적으로 감소하였으나 추출물 농도에 따른 유의적인 차이는 보이지 않았다. 이와 같은 결과는 Kim AJ 등 (2007)의 오디분말 첨가 젤리

에서 오디분말의 농도가 높을수록 경도가 높았다는 결과와 반대의 결과를 나타내었으나⁽⁴⁶⁾, Kim AJ등의 동충하초 분말을 첨가한 젤리의 경우 동충하초의 농도가 높아짐에 따라 경도가 감소하는 것과 같은 결과를 보였다⁽⁴⁷⁾. Fracturability (메짐성), Adhesiveness (부착성), Springiness (탄력성)의 경우 대조군과 백하수오 추출물 첨가군 사이 유의적 차이를 보이지 않았다. Cohesiveness (응집성), Gumminess (검성), Chewiness (씹힘성)는 백하수오 추출물을 첨가한 모든 군에서 대조군과 비교하여 유의적으로 감소하였으나 추출물 농도에 따른 유의적인 차이는 보이지 않았다. Resilience (회복력)는 대조군이 0.41 ± 0.06 으로 0.75 ~ 1% 백하수오 추출물 첨가시 대조군과 비교하여 유의적으로 감소하였으나 1.25 ~ 1.5% 첨가군 에서 감소하는 경향을 나타내었다.

Table 31. Texture profile of PM jelly¹

Sample	TPA parameters			
	Hardness (Kg)	Fracturability (Kg)	Adhesiveness (Kgs)	Springiness
Control	15.54 ± 1.99 ^a	14.48 ± 3.37 ^{NS}	-1.24 ± 0.15 ^b	0.95 ± 0.05 ^{NS}
PM 1	16.28 ± 1.23 ^a	16.09 ± 1.35	-1.50 ± 0.30 ^b	0.94 ± 0.02
PM 2	15.23 ± 1.57 ^a	16.04 ± 0.74	-1.49 ± 0.27 ^b	0.93 ± 0.02
PM 3	12.49 ± 1.57 ^b	12.96 ± 1.33	-0.48 ± 0.19 ^a	0.94 ± 0.02
PM 4	12.01 ± 0.64 ^b	12.96 ± 1.33	-0.59 ± 0.24 ^a	0.96 ± 0.02

Sample	TPA parameters			
	Cohesiveness	Gumminess	Chewiness	Resilience
Control	0.77 ± 0.07 ^a	11.67 ± 2.45 ^a	10.94 ± 2.97 ^a	0.41 ± 0.06 ^a
PM 1	0.74 ± 0.03 ^{ab}	12.18 ± 1.35 ^a	11.48 ± 1.06 ^a	0.41 ± 0.01 ^a
PM 2	0.76 ± 0.02 ^{ab}	9.99 ± 4.18 ^a	10.69 ± 0.94 ^a	0.42 ± 0.01 ^a
PM 3	0.73 ± 0.02 ^b	8.95 ± 1.02 ^b	8.53 ± 0.91 ^b	0.38 ± 0.02 ^b
PM 4	0.74 ± 0.01 ^b	8.85 ± 0.48 ^b	8.46 ± 0.57 ^b	0.39 ± 0.01 ^{ab}

¹ PM: *Polygonum multiflorum*, PM 1 - 0.25 %, PM 2 - 0.5 %, PM 3 - 0.75 % and PM 4 - 1 %, All data are expressed as means ± SD (n = 6), Different letters in the column indicate significantly different values assessed by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

Table 32. Texture profile of PM jelly¹

Sample	TPA parameters			
	Hardness (Kg)	Fracturability (Kg)	Adhesiveness (Kgs)	Springiness
Control	15.54 ± 1.99 ^a	14.48 ± 3.37 ^{NS}	-1.02 ± 0.27 ^{NS}	0.95 ± 0.05 ^{NS}
CW 1	12.75 ± 1.23 ^b	13.30 ± 1.68	-0.90 ± 0.28	0.96 ± 0.01
CW 2	13.29 ± 0.69 ^b	13.26 ± 1.28	-0.88 ± 0.43	0.96 ± 0.01
CW 3	13.48 ± 1.66 ^b	14.98 ± 0.23	-1.02 ± 0.30	0.95 ± 0.02
CW 4	12.66 ± 1.76 ^b	13.36 ± 1.53	-0.81 ± 0.29	0.94 ± 0.03

Sample	TPA parameters			
	Cohesiveness	Gumminess	Chewiness	Resilience
Control	0.77 ± 0.07 ^a	11.67 ± 2.45 ^a	10.94 ± 2.97 ^a	0.41 ± 0.06 ^a
CW 1	0.73 ± 0.02 ^b	9.28 ± 0.78 ^b	8.86 ± 0.77 ^b	0.39 ± 0.01 ^b
CW 2	0.72 ± 0.02 ^b	9.59 ± 0.48 ^b	9.22 ± 0.48 ^b	0.39 ± 0.01 ^b
CW 3	0.74 ± 0.03 ^b	9.82 ± 0.86 ^b	9.42 ± 0.80 ^b	0.39 ± 0.02 ^{ab}
CW 4	0.73 ± 0.02 ^b	9.17 ± 0.91 ^b	8.68 ± 0.94 ^b	0.39 ± 0.01 ^{ab}

¹ CW: *Cynanchum wilfordii*, CW 1 - 0.75 %, CW 2 - 1 %, CW 3 - 1.25 % and CW 4 - 1.5 %, All data are expressed as means ± SD (n = 6), Different letters in the column indicate significantly different values assessed by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

다. 관능 평가

적하수오 추출물이 첨가된 젤리의 관능검사 결과는 Table 33에 나타내었다. 냄새에 대한 선호도는 시료 간에 유의적인 차이는 보이지 않았으나 PM 3 군에서 가장 선호도가 증가하였고 PM 1군의 선호도가 가장 낮았으나 적하수오 첨가에 따른 일정한 경향을 나타내지 않았다. 색에 대한 선호도 측정 결과 적하수오 추출물을 0.5% 첨가한 군에서 7.07로 가장 높은 선호도를 나타내었으며 1% 첨가한 군에서 5.14로 가장 낮은 선호도를 나타냈다. 적하수오 추출물을 첨가할수록 젤리의 색이 짙어 지는데 어느 정도 색이 첨가된 젤리를 패널들이 선호하고, 0.75% 이상으로 색이 짙어질수록 선호도가 감소하는 것으로 여겨진다. 단맛에 대한 선호도는 시료 간에 유의적인 차이를 보이지 않았으나 적하수오 추출물을 0.75% 첨가하였을 때 가장 선호도가 높게 나타났으며 적하수오 첨가에 따른 일정한 경향을 나타내지 않았다. 경도는 유의적 차이를 보이지 않았으나 적하수오 추출물을 0.5~0.75% 첨가군에서 선호도가 가장 높게 나타났다. 부착성과 탄력성 대한 선호도는 PM 2 군에서 가장 높았으나 유의적인 차이는 나타내지 않았다. 전반적인 기호도는 PM 1, PM 4군의 선호도가 5.00으로 가장 낮았으며 PM 2군인 적하수오 추출물을 0.5% 첨가한 군의 선호도가 6.29로 유의적으로 높은 선호도를 나타냈다.

관능평가 결과 전반적으로 모든 항목에서 적하수오 추출물 0.5~1% 첨가군에서 평가점수가 5.00이상으로 높은 선호도를 나타내었으며 0.25% 첨가 군에서 낮은 선호도를 나타내었다. 따라서 젤리에 대한 적하수오 추출물의 0.25% 이하 첨가는 고려하지 않는 것이 좋을 것이라 사료된다.

백하수오 추출물이 첨가된 젤리의 관능검사 결과는 Table 34.에 나타내었다. 냄새에 대한 선호도는 CW 3군이 4.86으로 선호도가 가장 낮았고, CW 1군이 5.93으로 선호도가 가장 높았으나 백하수오 추출물 첨가에 따른 일정한 경향을 나타내지 않았다. 색에 대한 선호도 측정 결과 CW 1군이 6.43으로 가장 높은 선호도를 나타내었으며 백하수오가 가장 많이 첨가된 CW 4군에서 4.64로 가장 낮은 선호도를 나타냈다. 이는 백하수오 추출물을 첨가할수록 젤리의 색이 짙어 지는데 어느 정도 색이 첨가된 젤리를 패널들이 선호하고, 0.75% 이상으로 색이 짙어질수록 선호도가 감소하는 것으로 적하수오 젤리의 색 선호도와 같은 결과이다. 단맛에 대한 선호도는 시료 간에 유의적인 차이를 보이지 않았으나 백하수오 추출물의 첨가량이

증가할수록 선호도가 감소하여 CW 4군이 4.77로 선호도가 가장 낮았다. 경도는 유의적 차이를 보이지 않았으나 CW 1군에서 선호도가 가장 높게 나타났으며 CW 3군에서 가장 낮게 나타났다. 부작성에 대한 선호도는 CW 1군이 5.79로 가장 높았고 추출물의 농도가 높아질수록 선호도가 감소하는 경향을 나타냈다. 탄력성 대한 선호도는 CW 2 군이 6.21로 가장 높았으나 유의적인 차이는 나타내지 않았고 백하수오 추출물 첨가에 대한 일정한 경향을 나타내지 않았다. 전반적인 기호 도는 CW 2군의 선호도가 6.25로 가장 높았으며 CW 3군인 백하수오 추출물을 1.25% 첨가한 군의 선호도가 4.58로 가장 낮게 나타났다.

관능평가 결과 전반적으로 모든 항목에서 백하수오 추출물 0.75~1% 첨가군 에서 높은 선호도를 나타내었으며 1.25% 이상 첨가 군에서 낮은 선호도를 나타내었다. 따라서 젤리에 대한 적하수오 추출물의 1.25% 이상 첨가는 고려하지 않는 것이 좋을 것이라 사료된다.

Table 33. Sensory evaluation of the PM Jelly¹

Sample	Sensory characteristics			
	Odor	Color	Sweetness	Hardness
PM 1	4.86 ± 0.66 ^{NS}	6.00 ± 1.36 ^{bc}	5.86 ± 1.51 ^{NS}	4.43 ± 1.50 ^{NS}
PM 2	5.31 ± 0.75	7.07 ± 1.27 ^a	6.07 ± 1.77	5.43 ± 1.99
PM 3	5.62 ± 1.39	6.43 ± 1.22 ^{ab}	6.14 ± 1.61	5.43 ± 1.74
PM 4	5.31 ± 1.18	5.14 ± 0.95 ^c	5.07 ± 1.07	5.00 ± 1.80

Sample	Sensory characteristics		
	Adhesiveness	Springiness	Overall acceptance
PM 1	4.79 ± 1.58 ^{NS}	5.14 ± 1.10 ^{NS}	5.00 ± 1.04 ^b
PM 2	6.21 ± 1.67	6.14 ± 1.51	6.29 ± 1.44 ^a
PM 3	5.36 ± 2.27	5.64 ± 1.55	5.79 ± 1.58 ^{ab}
PM 4	5.00 ± 1.41	5.21 ± 1.19	5.00 ± 0.96 ^b

¹ PM: *Polygonum multiflorum*, PM 1 - 0.25 %, PM 2 - 0.5 %, PM 3 - 0.75 % and PM 4 - 1 %, All data are expressed as means ± SD (n = 14), Different letters in the column indicate significantly different values assessed by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

Table 34. Sensory evaluation of the CW Jelly¹

Sample	Sensory characteristics			
	Odor	Color	Sweetness	Hardness
CW 1	5.93 ± 0.92 ^a	6.43 ± 1.16 ^a	5.54 ± 1.27 ^{NS}	6.07 ± 1.07 ^{NS}
CW 2	5.57 ± 1.22 ^{ab}	6.21 ± 1.63 ^a	5.54 ± 1.66	5.79 ± 1.25
CW 3	4.86 ± 0.95 ^b	5.14 ± 1.29 ^b	5.15 ± 1.07	5.43 ± 1.50
CW 4	5.36 ± 1.28 ^{ab}	4.64 ± 1.01 ^b	4.77 ± 1.17	5.50 ± 1.74

Sample	Sensory characteristics		
	Adhesiveness	Springiness	Overall acceptance
CW 1	Adhesiveness	Springiness	Overall acceptance
CW 2	5.79 ± 1.72 ^{NS}	6.07 ± 1.49 ^{NS}	6.00 ± 1.47 ^a
CW 3	5.57 ± 1.60	6.21 ± 1.31	6.25 ± 1.36 ^a
CW 4	5.36 ± 1.69	5.64 ± 1.65	4.58 ± 1.24 ^b

¹ CW: *Cynanchum wilfordii*, CW 1 – 0.75 %, CW 2 – 1 %, CW 3 – 1.25 % and CW 4 – 1.5 %, All data are expressed as means ± SD (n = 14), Different letters in the column indicate significantly different values assessed by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

구분	연구 목표	평가착안점	목표달성도 및 기여도
1차년도 (2008)	적하수오의 혈류 개선 효능의 in vitro 분석 및 용매 분획별 활성 성분 분석	<ul style="list-style-type: none"> ○ 혈류 개선 효능 분석 방법의 적절성 ○ 시료의 전처리방법의 적절성 ○ 활성 성분 분석을 위한 분획 방법 및 assay 방법의 적절성 	<ul style="list-style-type: none"> ○ in vitro assay를 통한 적하수오의 혈류 개선 효능 분석 ○ 적하수오 지표성분 물질 분석완료 ○ 용매분획별 활성 성분 분석 완료 ○ HMG-Co A reductase 저해활성 측정 ○ Fibrinolytic activity 조사 ○ ACE 저해 활성 분석 ○ 전처리방법에 의한 원료의 물리화학적 특성 조사
2차년도 (2009)	동물실험 모델을 이용한 혈류 개선 효능 규명 및 혈관계개선 우수활성물질의 분리·정제	<ul style="list-style-type: none"> ○ 혈류 개선 동물 모델 시스템디자인의 적절성 ○ 동물 실험의 윤리 기준 적합성 여부 ○ 적하수오 유효성분 효능 분석을 위한 동물실험 분석 항목 선정의 타당성 ○ 혈관계 개선 우수활성 성분의 분리의 적절성 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 우수활성물질의 HMG-CoA 저해 활성 측정 ○ 혈중 및 간조직의 Total lipid, TG, Cholesterol 등 조성분석 ○ Fibrinolytic activity 조사 ○ 항혈전(APTT & TT) 작용 측정 ○ 항산화, 항고혈압 관련 지표인자 설정 ○ SOD 활성, TBARS, Catalase 활성 측정 ○ 극성별 용매추출물의 우수활성 물질 분리
3차년도 (2010)	적하수오 혈류 개선 활성물질의 식품 소재화 및 활성 물질 정제, 구조 분석	<ul style="list-style-type: none"> ○ 식품소재화를 제조방법의 적절성 ○ 시제품 제조를 위한 제품 제형 선정의 적절성 ○ 활성물질의 정제방법의 유효성 ○ 구성성분의 구조분석을 위한광학기기 활용의 적정성 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 적하수오 및 유효성분을 이용한 식품소재의 시제품 생산 및 품질개선 ○ 국외 혈류개선 신제품 동향 및 개발시제품 소개 ○ 식품응용제품의 제조 및 전문패널을 통한 품질평가 ○ Prep-LC, Prep-TLC 등을 이용한 활성물질의 정제 및 NMR 등을 활용한 구성성분의 구조분석

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

○ 실용화 산업화 계획

본 연구 사업은 과제기획 단계에서부터 참여기업의 적극적인 실용화 의지를 가지고 시작된 사업으로써 과제의 수행 과정에서 주관연구기관과 참여 기업과의 활발한 의견 교환을 통해 연구진행 방향을 산업화에 중점을 두어 진행 시켰으며 현재 참여 기업에 기술이전이 완료되어 개발 제품의 출시를 준비 중에 있음

○ 교육, 지도, 홍보 등 기술 확산 계획

참여기업에서 현재 개발 제품의 출시를 준비 중이며 순조롭게 개발 제품의 출시가 되도록 지속적인 지도 및 조언을 해 나갈 예정임

○ 특허, 논문 등 지식 재산권 확보 계획

현재 모두 2건의 논문이 게재되어 있으며 모두 7건의 특허가 출원되어 있음. 이중 1개 특허는 현재 특허 결정이 완료된 상태임.

논문게재

학술지명	국내 국외	논문 제목	게재일자
Journal of Applied Biological Chemistry	국내	Inhibition on LDL-oxidation by Phenolic compounds from the fruits body of <i>Phellinus linteus</i>	2009. 6.

논문발표

1. 한국식품과학회 2009 학술대회(2009. 5. 28, 대전컨벤션센터)
2. 한국식품과학회 2010 학술대회(2010. 6. 17, 인천 송도컨벤시아)
3. 한국식품영양과학회 2010 학술대회(2010. 10. 28, 대구 인터볼고 호텔)

특허출원

발명의 명칭	국명	출원 등록	출원/등록번호 (출원/등록일자)
혈관질환 예방 또는 개선용 조성물	대한민국	출원	10-2009-0080585 (2009. 8. 28)
유효성분으로 적하수오 에탄올 추출물을 포함하는 혈중콜레스테롤 저하용 조성물	대한민국	출원	10-2010-0045607 (2010. 5. 14)
유효성분으로 백하수오 에탄올 추출물을 포함하는 혈중콜레스테롤 저하용 조성물	대한민국	출원	10-2010-0045616 (2010. 5. 14)
유효성분으로 적하수오 에탄올 추출물을 포함하는 혈전감소용 조성물	대한민국	출원	10-2010-0045617 (2010. 5. 14)
유효성분으로 백하수오 에탄올 추출물을 포함하는 혈전감소용 조성물	대한민국	출원	10-2010-0045618 (2010. 5. 14)
유효성분으로 적하수오 에탄올 추출물을 포함하는 혈압강하용 조성물	대한민국	출원	10-2010-0045620 (2010. 5. 14)
유효성분으로 백하수오 에탄올 추출물을 포함하는 혈압강하용 조성물	대한민국	출원	10-2010-0045621 (2010. 5. 14)

기술실시 계약

○ 기술실시 계약

실시기업 : 백령도 청정식품영농조합법인

농림기술개발사업 성과활용에 따른 기술실시 계약서

- 연구개발과제명 : 혈관계 개선에 효과가 있는 하수오추출물 조성물 제조기술
- 총 연구개발비 : 411,000천원(정부출연금액 : 300,000천원, 참여기업부담금액 : 111,000천원)
- 기술료 징수액 : 무상
- 기술사용기간 : 8년 2011. 3. 2 ~ 2019. 3. 1
- 계약당사자
 - (갑) 주관연구기관 : 한국식품연구원
 - (을) 실시기업(참여기업) : 백령도청정식품영농조합법인 대표

실시기업대표자 (이하 "실시자"라 한다)와 주관연구기관장은 주관연구기관이 농림부 "농림기술개발사업"으로 개발한 KNOW-HOW(이하 "기술"이라 한다)를 실시자가 실시함에 있어 다음과 같이 계약을 체결한다.

제1조 (정의)

- (1) 본 계약에서 "기술"이라 함은 혈관계 개선에 효과가 있는 하수오추출물 조성물 제조기술을 말한다.
- (2) 본 계약에서 "기술활용"이라 함은 상기기술을 이용하여 제품을 생산하고 매출이 발생하는 것을 말하며 "기술활용일"이라 함은 최초의 매출발생일을 말한다.

제2조 (실시권의 내용)

- (1) 주관연구기관은 실시자가 본 협약의 조건에 따라 대한민국내에서 "기술"(특허가 발생하는 경우 특허권 포함)을 실시하는데 동의하여 "실시자"에 **통상실시권**을 설정한다. 단, 국외실시의 경우에는 제3조에 따른다.
- (2) 제1항의 "실시권"은 기술을 이용한 제품생산, 원가절감(생산성향상), 품질향상 등의 권리를 말한다.
- (3) "실시자"는 "주관연구기관"의 사전 서면동의 없이 제3자에게 동 실시권을 제공하거나 양도할 수 없다.
- (4) "주관연구기관"은 "실시자"가 "기술"을 실시하지 아니하는 부분에 대하여는 실시권을 포기한 것으로 간주할 수 있다.

제3조 (국외실시)

"국외실시"는 대한민국 이외의 지역에 실시권을 허여하거나 기술을 수출하는 것(동 지역에서 제품을 생산, 판매하는 행위 포함)을 말하며, "실시자"가 "기술"을 "국외실시"코자 하는 경우 사전에 "주관연구기관"과 협의하여 본 계약과 별도로 "국외실시"에 관한 실시계약을 체결하여야 한다.

제4조 (실시기간)

본 계약기간은 “실시자”가 제1조의 “기술”을 활용하는 날(이하 “기술활용일”이라 한다)로부터 기산하여 8년이 되는 2019년 연도 말에 만료되는 것으로 한다.

제5조 (기술활용시기)

“실시자”는 본 기술을 이용하여 특약이 없는 한 계약일로부터 1년 이내에 기술을 활용하여야 하며 정당한 사유없이 동 기간내에 기술활용을 하지 못한 경우에는 본 기술의 실시를 포기한 것으로 간주한다.

제6조 (기술료 납부)

“실시자”의 본 실시권에 대한 대가는 무상으로 한다. 단 기술이전에 소요되는 재료비 등 실소요 경비는 실시자가 부담하여야 한다.

제7조 (산업재산권 및 기술의 개량)

- (1) (산업재산권) “주관연구기관”이 본 기술의 결과로서 특허권, 실용신안권 등의 산업재산권을 취득, 소유하였을 경우 “실시자”는 본 계약에 의거 자동적으로 동 특허권, 실용신안권 등을 실시하며, 진행중인 산업재산권의 출원, 등록, 보존에 필요한 경비는 “실시자”가 부담한다. 다만, 국유특허권을 특허청장과 별도의 “국유특허권실시계약”을 체결하여야 한다.
- (2) (기술의 개량) “실시자” 또는 “실시자”의 임원 및 피용자가 “기술의 개량, 확장, 대체 또는 추가발명에 의한 기술(이하 “개량기술”이라 한다)을 적용하거나, 이를 근거로 새로운 산업재산권을 취득하고자 할 경우 “실시자”는 사전에 “주관연구기관”에 통보하여 상호 협의하여 추진하여야 하며, 취득한 산업재산권은 쌍방의 공동소유로 한다. 특약이 없는 한, “개량기술”의 실시 역시 본 계약에 의하여 실시되는 것으로 보고 본 계약은 계속 유효하다.

제8조 (신의성실의 의무와 자료협조)

본 계약이 목적하는 바를 상호 충족시키기에 필요한 제반사항에 대하여 “주관연구기관”은 신의, 성실을 다하여 “실시자”에게 적극 협조하여야 하고, “실시자”는 본 계약을 성실히 이행하여야 하며 또한 “주관연구기관”은 필요시 “실시자”에게 연구개발 성과의 활용 등 필요한 자료를 요구할 수 있으며 “실시자”는 응하여야 한다.

제9조 (비밀보장)

“실시자”는 “기술”이 타인에게 제공되거나 누설되지 않도록 보안에 유의하여야 하며 이 의무에는 “실시기업”의 임원 및 피용자나 그 승계인을 통하여 사실상 위반됨이 없도록 하는 의무도 포함한다. 또한 본 조항은 본 계약이 해제 또는 해지되었을 경우에도 계속 유효하다.

제10조 (계약의 변경 등)

- (1) 본 계약의 내용은 “실시자”와 “주관연구기관”의 서면합의에 의하여 변경될 수 있다. 다만, “실시자”의 생산능력이 제품수요를 충족하지 못하거나 “실시자”가 “기술”을 기술적으로 충분히 실현하지 못하여 “실시자”가 이를 개선할 능력이 없다고 인정될 경우 “주관연구기관”은 “기술”의 “실시권”을 제3자에게도 허용할 수 있는 권리를 갖는다.
- (2) “실시자”가 본 계약체결 후 법인의 주소 등 중요사항을 변경하였을 경우에는 이를 지체 없이 “주관연구기관”에 통보하여야 하며, 그 불이행으로 인한 “주관연구기관”의 착오는 “실시자”의 항변으로부터 면책된다.

제11조 (계약의 해지)

- (1) “주관연구기관”은 다음의 경우 30일전의 기한을 두고 “실시자”에게 그 이행을 서면으로 최고함으로써 본 계약을 취소할 권리를 가지며 이에 따라 해제되었을 경우에도 “주관연구기관”은 기지급 받은 금액을 환불하지 아니하며, “실시자”는 기술자료를 “주관연구기관”에 반환하고 본 계약상의 모든 권리를 포기하여야 한다.
 - 가. “기술활용일”까지 활용을 개시하지 아니하거나 “기술활용일” 전이라도 “실시자”가 활용을 포기한 것으로 “주관연구기관”이 인정하는 경우
 - 나. 제5조에 정한 “기술활용일”이후라도 “실시자”가 조업을 중단하여 계속할 수 없다고 인정한 때
 - 다. 기타 본 계약상의 의무를 위반할 때
- (2) 본 계약이 해지 또는 해제되었을 경우, “실시자”는 스스로 또는 제3자로 하여금 “기술”을 실시도록 하거나 본 계약제품의 생산을 행할 수 없다.

제12조 (손해배상)

“실시자”는 본 계약을 위반하여 “주관연구기관”에 손해를 끼쳤을 때에는 이를 배상하여야 한다.

제13조 (명칭사용)

“실시자”는 본 계약과 관련하여 취득한 정보 및 “주관연구기관”이 “실시자”에게 제공한 보고서나 문서의 일부 또는 전부에 대한 그 원본이나 복제, 복사물을 광고 판매 촉진, 기타 선전의 목적 및 경쟁상의 자료로 사용할 수 없으며, 또한 상기의 목적으로 “주관연구기관(농림수산식품부 포함)”의 명칭을 암시하거나 사용하여서는 아니된다.

제14조 (권리양도의 제한)

“주관연구기관”과 “실시자”는 본 계약상 특약이 있는 경우를 제외하고 상호 상대방의 동의없이 본 사업의 수행과정에서 취득되는 제반 권리를 제3자에게 제공하거나 양도할 수 없다.

제15조 (분쟁해결)

본 계약과 관련하여 혹은 쌍방의 의무이행과 관련하여 분쟁이나 이견이 발생하는 경우 “주관연구기관”과 “실시자”는 이를 상호협의하여 원만히 해결토록 노력하여야 하며, 이러한 분쟁이나 이견이 해결되지 않은 경우에는 「사단법인 대한상사중재원」의 상사중재 규칙에 따라 중재로 최종 해결한다.

제16조 (계약의 효력)

본 계약의 효력은 쌍방이 서명 날인한 날부터 유효하다.

제17조 (해석)

본 계약에 명기되지 아니하거나 본 계약상의 해석상 의의가 있는 사항에 대하여는 쌍방의 합의에 의하여 결정한다. 본 계약서는 2통을 작성하여 서명 날인하고, “실시자”와 “주관연구기관”이 각각 1통씩 보관한다.

2011년 2월 28일

주 관 연 구 기 관 : 경기도 성남시 분당구 백현동 526
한국식품연구원장 이무하 (인)

실 시 자 : 인천광역시 옹진군 백령면 진촌리 1259-5
백령도청정식품영농조합법인 대표 김덕일 (인)

총 괄 연 구 책 일 자 : 산업원천기술연구본부 책임연구원 이창호 (인)

○ 논문 및 특허 출원 현황

■ 논문 발표

1. 한국식품과학회 2009 학술대회(2009. 5. 28, 대전컨벤션센터)

P11 -132

백령도 적하수오의 혈관계 개선효과

김수정*, 김영언, 김인호, 한대석, 이창호 한국식품연구원, 김덕일 백령도 청정식품

본 연구는 백령도 적하수오의 혈관계 개선효과를 알아보기 위해서 수행되었다. 먼저 백령도 적하수오 추출물의 세포독성을 알아보기 위해 간세포인 HepG2 세포와 혈관내피세포인 HUVEC 세포에서 MTS assay를 실시하였다. 실험결과, 두 세포주 모두 200 $\mu\text{g/mL}$ 이하 농도에서 세포독성을 나타내지 않았다. 두 번째로, Custman과 Cheung의 방법에 의해서 ACE 저해활성을 측정하였다. ACE는 레닌-안지오텐신계에서 혈압을 조절하는 효소로 백령도 적하수오 10,000 ppm 농도에서 약 35.3%의 억제효과를 나타냈다. 세 번째로, Kleinsek의 방법에 의해서 HMG-CoA reductase 저해활성을 측정하였다. HMG-CoA reductase는 콜레스테롤 생합성을 조절하는 속도조절 효소로 동맥경화에 중요한 영향을 미친다. 실험결과, 백령도 적하수오 1,000 ppm 농도에서 약 57.9%의 억제효과를 나타냈으며, 특히 10,000 ppm 농도에서는 약 84.2%의 억제효과를 나타냈다. 이러한 결과를 종합해 볼 때, 백령도 적하수오는 혈관계 개선에 우수한 생리활성을 보임으로써 기능성 제품 개발에 이용할 가치가 있음을 확인하였다.

2. 한국식품과학회 2010 학술대회(2010. 6. 17, 인천 송도컨벤시아)

P11 -087

Effects on Lowering Blood Pressure in Spontaneously Hypertensive Rats and Anti-oxidative Activity of *Polygonum multiflorum* Thunberg

Junhweok Choi*, Hyesung Lee, Youngeon Kim Korea Food Research Institute, Duckil Kim Baengnyeong-do ChungJung Food Agricultural Corporation, Changho Lee Korea Food Research Institute

Polygonum multiflorum Thunberg has been used for the treatment of renal disorder, hematopoiesis, menstrual irregularity and anti-aging in Korean folk medicine. This study was conducted to investigate the effects of 80% ethanol extracts of *Polygonum multiflorum* Thunberg (PMT) on the blood pressure in spontaneously hypertensive rats (SHR) and anti-oxidative activities of its various fractions. The rats were divided into the following 3 groups: control group, control group treated with 0.5% PMT, control group treated with 1% PMT. Body weight gain and food efficiency ratio were not significantly different among the groups. But the treatment of 0.5% PMT and 1% PMT for 5 weeks in SHR significantly suppressed the blood pressure rise with aging ($p < 0.05$). ABTS radical-scavenging activity of the ethanol extract was stronger than the butanol and hexane fractions at the same concentration. Thus, long term consumption of *Polygonum multiflorum* Thunberg, may be beneficial in lowering high blood pressure in SHR rats.

249

3. 한국식품영양과학회 2010 학술대회(2010. 10. 28, 대구 인터볼고 호텔)

P8-22

Effect of ethanol extract of *Polygonum Multiflorum* on serum lipid profile in hypercholesterolemia rats

Hysung Lee*, Junhyeok Choi, Young-Eon Kim, In-Ho Kim, Chang-Ho Lee. Korea Food Research Institute

Polygonum Multiflorum Radix. (PM) which belongs to Polygonaceae is widely distributed in Korea, China, Vietnam and Japan. Several studies revealed that the dried root of *Polygonum Multiflorum* Thunb. has varieties of pharmacological actions, including anti-oxidant, vasorelaxant and anti-atherosclerosis effects. The purpose of this study is to investigate the effects of ethanol extract of PM on blood lipid profile in the hypercholesterolemic Sprague-Dawley (SD) rats of both genders. 7 week-old male and female SD rats (n=50, each gender) were purchased. After a week of acclimation, each male rats (n=50) and female rats (n=50) were grouped into six groups and placed 6 blocks of 5 male and female rats each. The animals were allowed free access to the either a control diet or containing PM diets for 5 weeks. After sacrifice, serum lipid profile was analyzed. Serum total cholesterol levels of PM treated groups were slightly decreased than control groups in both genders. Serum HDL-cholesterol levels of PM treatment groups were increased and LDL-cholesterol levels of PM treatment groups were decreased in both male and female. Serum triglyceride levels were significantly decreased in the PM fed male rats (p<0.05). Also, serum total lipid levels of PM fed groups were slightly decreased in both genders. These results suggest that intake of *Polygonum Multiflorum* might have a positive effect on hypercholesterolemia by improving the serum lipid profile.

00000 00000

■ 논문게재

학술지명	국내 국외	논문제목	게재일자
Journal of Applied Biological Chemistry	국내	Inhibition on LDL-oxidation by Phenolic compounds from the fruits body of <i>Phellinus linteus</i>	2009. 6.

Inhibition on LDL-oxidation by Phenolic Compounds from the Fruit Body of *Phellinus linteus*

Ha-Na Lyu¹, Dae-Young Lee¹, Min-Kyung Lee¹, Moon-Hee Cho², Tae-Sook Jeong², In-Ho Kim³, Chang-Ho Lee³, and Nam-In Baek^{1*}

¹Graduate School of Biotechnology, Kyung Hee University, Yongin 446-701, Korea

²National Research Laboratory of Lipid Metabolism & Atherosclerosis,

Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Daejeon 305-333, Korea

³Korea Food Research Institute, Sungnam 463-746, Korea

Received July 6, 2009; Accepted September 2, 2009

The fruit body of *Phellinus linteus* was extracted with 80% aqueous MeOH, and the concentrated extract was successively partitioned using EtOAc, *n*-BuOH and H₂O. From the EtOAc and *n*-BuOH fractions, three phenolic compounds were isolated through repeated silica gel and ODS column chromatography. The chemical structures of these compounds were determined as 2-(3',4'-dihydroxyphenyl)-1,3-benzodioxole-5-aldehyde (1), 4-(3,4-dihydroxyphenyl)-3-buten-2-one (2), and protocatechuic acid methyl ester (3) by spectroscopic data including NMR, MS and IR. Compounds 1~3 exhibited low density lipoprotein (LDL) antioxidant activity with IC₅₀ values of 1.7, 0.7, and 2.4 μM, respectively.

Key words: 2-(3',4'-dihydroxyphenyl)-1,3-benzodioxole-5-aldehyde, 4-(3,4-dihydroxyphenyl)-3-buten-2-one, LDL-oxidation, *Phellinus linteus*, protocatechuic acid methyl ester, phenolic compound

Phellinus linteus is a fungus belonging to the family Hymenochaetaeaceae, which is distributed mainly in Asia, tropical America, and North Africa [Dai and Xu, 1998]. Extracts from this fungus have long been used as a traditional oriental medicine in Korea and Japan for the treatment of various diseases including arthritis of the knee, oral ulcers, gastroenteric disorders, lymphatic disease, and various cancers [Heo, 1993; Kang *et al.*, 2004]. It has been reported that *P. linteus* has anti-cancer [Choi *et al.*, 1996; Han *et al.*, 1999], anti-tumor [Ikekawa *et al.*, 1968], anti-mutagenic [Ji *et al.*, 2000], anti-angiogenic [Song *et al.*, 1995], anti-oxidant [Lee *et al.*, 2000], and immune activity [Kim *et al.*, 1996]. A number of researchers have reported various chemical constituents of *P. linteus* such as polysaccharides [Lee *et al.*, 2001], proteoglycans [Lee *et al.*, 2001], sphingolipids [Kang *et al.*, 2004] and hispidine [Park *et*

al., 2004], etc. Among these, β-glucan is especially important as it is known to have anti-tumor activity and immuno-stimulating effects [Han *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2000]. From our previous phytochemical research on the fruit body of this mushroom, we reported the presence of ergosterols [Lyu *et al.*, 2007a; 2007b; 2007c] and phenolic compounds [Lyu *et al.*, 2008]. Except for polysaccharides, however, there has been little research studying various pharmacological activities of lower molecular weight compounds from *P. linteus*. Furthermore, only a few reports have claimed that extracts of the fruit body of *P. linteus* act to prevent atherosclerosis or to inhibit LDL-oxidation.

It has been suggested that the oxidation of LDL cholesterol is an important step in the formation of atherosclerotic lesions [Steinberg *et al.*, 1989; Diaz *et al.*, 1997]. Evidence to support this hypothesis is based in part on observational studies that demonstrate associations between oxidized LDL cholesterol and the presence of both atherosclerotic lesions [Regnstrom *et al.*, 1992] and the progression of carotid artery atherosclerosis [Salonen *et al.*, 1992]. This paper describes three phenolic compounds isolated from *P. linteus* that inhibit LDL oxidation.

Extraction and isolation. The dried fruit body of *P. linteus* (1 kg) was extracted two times at room temperature with 80% aqueous MeOH (3 L×2). The extracts were successively partitioned with water (1 L), EtOAc (1 L×2) and *n*-BuOH (1 L×2). The EtOAc extract (10 g) was applied to a silica gel cc (6.5×17 cm) and was eluted with a gradient of CHCl₃:MeOH (15:1→

*Corresponding author

Phone: +82-31-201-2661; Fax: +82-31-201-2157

E-mail: nibaek@khu.ac.kr

Abbreviations: cc, column chromatography; CHCl₃, chloroform; EI-MS, electron ionization mass spectrometry; EtOAc, ethylacetate; IR, infra-red; LDL, low density lipoprotein; MeOH, methanol; *n*-BuOH, normal-butanol; ODS, octadecyl silica gel; PLB, *n*-butanol fraction of *P. linteus*; PLE, ethyl acetate fraction of *P. linteus*; TLC, thin layer chromatography; V_d/V₀, elution volume/total volume

doi:10.3839/iabc.2009.025

■ 특허출원

발명의 명칭	국명	출원 등록	출원/등록번호 (출원/등록일자)
혈관질환 예방 또는 개선용 조성물	대한민국	출원	10-2009-0080585 (2009. 8. 28)
유효성분으로 적하수오 에탄올 추출물을 포함하는 혈중콜레스테롤 저하용 조성물	대한민국	출원	10-2010-0045607 (2010. 5. 14)
유효성분으로 백하수오 에탄올 추출물을 포함하는 혈중콜레스테롤 저하용 조성물	대한민국	출원	10-2010-0045616 (2010. 5. 14)
유효성분으로 적하수오 에탄올 추출물을 포함하는 혈전감소용 조성물	대한민국	출원	10-2010-0045617 (2010. 5. 14)
유효성분으로 백하수오 에탄올 추출물을 포함하는 혈전감소용 조성물	대한민국	출원	10-2010-0045618 (2010. 5. 14)
유효성분으로 적하수오 에탄올 추출물을 포함하는 혈압강하용 조성물	대한민국	출원	10-2010-0045620 (2010. 5. 14)
유효성분으로 백하수오 에탄올 추출물을 포함하는 혈압강하용 조성물	대한민국	출원	10-2010-0045621 (2010. 5. 14)

관인생략
출원번호통지서

출원일자 2009.08.28
 특기사항 심사청구(유) 공개신청(무) 참조번호(7626)
 출원번호 10-2009-0080585 (접수번호 1-1-2009-0530796-69)
 출원인명칭 한국식품연구원(3-1998-007755-3)
 대리인성명 황이남(9-1998-000610-1)
 발명자성명 이창호 김인호 한대석 김영연 성기승 김병욱 이현유 김수정 김덕일 백남인
 발명의명칭 혈관질환 예방 또는 개선용 조성물

특 허 청 장

1. 출원번호통지서 출원 이후 심사진행 상황 등을 확인하실 때에는 출원번호가 필요하오니 출원번호통지서는 출원절차가 종료될 때까지 보관하시기 바랍니다.
2.
 - 2-가. 특허 및 실용신안 출원은 심사청구 후 평균 16개월에 1차 심사처리가 이루어지고, 상표 및 디자인은 출원 후 평균 10개월에 1차 심사처리가 이루어집니다.
 - 2-나. 특허 및 실용신안은 특허청 홈페이지(<http://www.kipero.go.kr>)의 "고객지원서비스-민원처리과정 통지 서비스" 코너에서 1차 심사결과통지 예고서비스를 신청하시면, 1차 심사처리 약 1개월 전에 해당 출원 건의 1차 심사결과통지 예정시기를 SMS 또는 E-mail 서비스로 제공 받을 수 있습니다.
 - 2-다. 상표 및 디자인은 특허청 홈페이지(공지사항)에 유별 1차 심사결과통지 예정시기를 매월 게시하고 있으며, 특허정보검색서비스 시스템(<http://www.kipris.or.kr>)을 통해 개별 출원건에 대한 1차 심사결과통지 예정시기를 알려드립니다. 또한, 출원시 1차 심사결과통지 예정시기 알림 서비스를 신청하시면, SMS 또는 E-mail 서비스로 제공해 드립니다.

※ 상기 1차 심사결과통지 예정시기는 사정에 의해 다소 늦거나 빨라 질 수 있습니다.

 - 2-라. 1차 심사결과통지서(심사관이 특허결정의 등본을 송달하기 전 또는 심사관이 최초로 거절이유를 통지한 후 출원인이 그 거절이유를 받기 전 중 빠른 때)까지 귀하께서는 특허출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 명세서 또는 도면을 보정할 수 있습니다.
3. 심사청구 특허출원은 출원일로부터 5년 이내에 특허법시행규칙 별지 제24호서식에 의거 심사청구를 하지 않으면 그 출원은 출원취하된 것으로 간주하여 처리함을 알려드립니다.
4. 우선심사 특허(실용신안등록)출원 또는 디자인등록출원, 상표등록출원에 대해 조기에 심사를 원하시면 "우선심사제도"를 이용하실 수 있습니다.
5. 주소 등 변경신고 출원인의 주소 등을 변경하고자 하는 경우에는 특허법 시행규칙 별지 제4호의 2서식에 의한 출원인 정보변경(경정) 신고서를 제출하여야 합니다.
6. 산업재산권 표시, 광고요령 특허 등 산업재산권을 출원 중에 있는 경우에는 해당 산업재산이 출원상태임을 다음과 같이 표시하여야 하며, 이를 위반할 경우 특허법 제224조 및 제227조에 의거 처벌 받게 됩니다.
 예) 특허출원 10-2001-0000001, 실용신안등록출원 20-2001-0000001, 디자인등록출원 30-2001-0000001, 상표등록출원 40-2001-0000001
7. 미성년자 미성년자인 출원인이 만20세에 도달하는 경우 출원인의 부모 등 법정대리인의 대리권은 소멸하게 되므로, 출원인은 직접 또는 대리인을 새로이 선임하여 특허에 관한 절차를 밟을 수 있습니다.
8. 문의처 기타 문의사항이 있으시면 특허고객 콜센터(1544-8080)에 문의하시거나 특허청 홈페이지(www.kipo.go.kr)를 참고하시기 바랍니다.
9. 특허청 주소 302-701 대전광역시 서구 선사로 139 정부대전청사 4동
 특허청 서울사무소 주소 135-911 서울특별시 강남구 역삼동 647-9 한국지식센터
 FAX) 대전 : 042-472-7140, 서울 : 02-566-8454

관인생략
출원번호통지서

출원일자 2010.05.14
 특기사항 심사청구(유) 공개신청(무) 참조번호(0002)
 출원번호 10-2010-0045616 (접수번호 1-1-2010-0312157-71)
 출원인명칭 한국식품연구원(3-1998-007755-3)
 대리인성명 최규환(9-2005-001504-0)
 발명자성명 이창호 김인호 한대석 김영언 성기승 김병목 이현유 최준혁
 이해성 김덕일 백남인
 발명의명칭 유효성분으로 백하수오 에탄올 추출물을 포함하는 혈중 콜레스테롤 저하용 조성물

특 허 청 장

1. 출원번호통지서 출원 이후 심사진행 상황 등을 확인하실 때에는 출원번호가 필요하오니 출원번호통지서는 출원절차가 종료될 때까지 보관하시기 바랍니다.
2. 2-가. 특허 및 실용신안 출원은 **심사청구 후 평균 16개월**에 1차 심사처리가 이루어지고, 상표 및 디자인은 **출원 후 평균 10개월**에 1차 심사처리가 이루어집니다.
 2-나. 특허 및 실용신안은 **특허청 홈페이지**(<http://www.patent.go.kr>)의 "고객지원서비스-민원처리과정 통지 서비스" 코너에서 1차 심사결과통지 예고서비스를 신청하시면, 1차 심사처리 약 1개월 전에 해당 출원 권의 1차 심사결과통지 예정시기를 SMS 또는 E-mail 서비스로 제공 받을 수 있습니다.
 2-다. 상표 및 디자인은 **특허청 홈페이지(공지사항)**에 **유별 1차 심사결과통지 예정시기**를 매월 게시하고 있으며, **특허정보검색서비스 시스템**(<http://www.kipris.or.kr>)을 통해 개별 출원권에 대한 1차 심사결과통지 예정시기를 알려드립니다. 또한, 출원시 1차 심사결과통지 예정시기 알림 서비스를 신청하시면, **SMS 또는 E-mail 서비스**로 제공해 드립니다.
 ※ 상기 1차 심사결과통지 예정시기는 사정에 의해 다소 늦거나 빨라 질 수 있습니다.
 2-라. 1차 심사결과통지서(심사관이 특허결정의 등본을 송달하기 전 또는 심사관이 최초 거절이유를 통지한 후 출원인이 그 거절이유를 받기 전 중 **빠른 때**)까지 귀하께서는 특허출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 명세서 또는 도면을 보정할 수 있습니다.
 특허출원은 출원일로부터 5년 이내에 특허법시행규칙 별지 제24호서식에 의거 심사청구를 하지 않으면 그 출원은 출원취하된 것으로 간주하여 처리됨을 알려드립니다.
3. 우선심사 특허(실용신안등록)출원 또는 디자인등록출원, 상표등록출원에 대해 조기에 심사를 원하시면 "우선심사제도"를 이용하실 수 있습니다.
4. 주소 등 변경신고 출원인의 주소 등을 변경하고자 하는 경우에는 특허법 시행규칙 별지 제4호의 2서식에 의한 출원인 정보변경(경정) 신고서를 제출하여야 합니다.
5. **산업재산권 표시, 광고요령** 특허 등 산업재산권을 출원 중에 있는 경우에는 해당 산업재산이 출원상태임을 다음과 같이 표시하여야 하며, 이를 위반할 경우 특허법 제224조 및 제227조에 의거 처벌 받게 됩니다.
 예) 특허출원 10-2001-0000001, 실용신안등록출원 20-2001-0000001, 디자인등록출원 30-2001-0000001, 상표등록출원 40-2001-0000001
6. **미성년자** 미성년자인 출원인이 만20세에 도달하는 경우 출원인의 부모 등 법정대리인의 대리권은 소멸하게 되므로, 출원인은 직접 또는 대리인을 새로이 선임하여 특허에 관한 절차를 밟을 수 있습니다.
7. **문의처** 기타 문의사항이 있으시면 특허고객상담센터(1544-8080)에 문의하시거나 특허청 홈페이지(www.patent.go.kr)를 참고하시기 바랍니다.

<http://www.patent.go.kr/jsp/kiponet/ir/receipt/online/applNoOfcAct.so> 2010-05-14

관인생략
출원번호통지서

출원일자 2010.05.14
 특기사항 심사청구(유) 공개신청(무) 참조번호(0006)
 출원번호 10-2010-0045621 (접수번호 1-1-2010-0312172-56)
 출원인명칭 한국식품연구원(3-1998-007755-3)
 대리인성명 최규환(9-2005-001504-0)
 발명자성명 이창호 김인호 한대석 김영언 성기승 김병목 이현유 최준혁
 이해성 김덕일 백남인
 발명의명칭 유효성분으로 백하수오 에탄올 추출물을 포함하는 혈압 강
 하용 조성물

특 허 청 장

1. 출원번호통지서 출원 이후 심사진행 상황 등을 확인하실 때에는 출원번호가 필요하시니 출원번호통지서는 출원절차가 종료될 때까지 보관하시기 바랍니다.
2. 2-가. 특허 및 실용신안 출원은 심사청구 후 평균 16개월에 1차 심사처리가 이루어지
고, 상표 및 디자인은 출원 후 평균 10개월에 1차 심사처리가 이루어집니다.
2-나. 특허 및 실용신안은 특허청 홈페이지(<http://www.patent.go.kr>)의 "고객지원서비
스-인원처리과정 통지 서비스" 코너에서 1차 심사결과통지 예고서비스를 신청하시면,
1차 심사처리 약 1개월 전에 해당 출원 건의 1차 심사결과통지 예정시기를 SMS 또는
E-mail 서비스로 제공 받을 수 있습니다.
2-다. 상표 및 디자인은 특허청 홈페이지(공지사항)에 류별 1차 심사결과통지 예정시기
를 매월 게시하고 있으며, 특허정보검색서비스 시스템(<http://www.kipris.or.kr>)을 통해
개별 출원건에 대한 1차 심사결과통지 예정시기를 알려드립니다. 또한, 출원시 1차 심
사결과통지 예정시기 알림 서비스를 신청하시면, SMS 또는 E-mail 서비스로 제공해 드
립니다.
※ 상기 1차 심사결과통지 예정시기는 사정에 의해 다소 늦거나 빨라 질 수 있습니다.
2-라. 1차 심사결과통지서(심사관이 특허결정의 등본을 송달하기 전 또는 심사관이 최
초로 거절이유를 통지한 후 출원인이 그 거절이유를 받기 전 중 배론 때)까지 귀하께서
는 특허출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 명세서
또는 도면을 보정할 수 있습니다.
특허출원은 출원일로부터 5년 이내에 특허법시행규칙 별지 제24호서식에 의거 심사청
구를 하지 않으면 그 출원은 출원취하된 것으로 간주하여 처리됨을 알려드립니다.
3. 우선심사 특허(실용신안등록)출원 또는 디자인등록출원, 상표등록출원에 대해 조기에
심사를 원하시면 "우선심사제도"를 이용하실 수 있습니다.
4. 주소 등 변경신고 출원인의 주소 등을 변경하고자 하는 경우에는 특허법 시행규칙 별지
제4호의 2서식에 의한 출원인 정보변경(경정) 신고서를 제출하여야 합니다.
5. 산업재산권 표시, 광고요령 특허 등 산업재산권을 출원 중에 있는 경우에는 해당 산업재
산이 출원상태임을 다음과 같이 표시하여야 하며, 이를 위반할 경우 특허법 제224조 및
제227조에 의거 처벌 받게 됩니다.
예) 특허출원 10-2001-0000001, 실용신안등록출원 20-2001-0000001, 디자인등록
출원 30-2001-0000001, 상표등록출원 40-2001-0000001
6. 미성년자 미성년자인 출원인이 만20세에 도달하는 경우 출원인의 부모 등 법정대리인
의 대리권은 소멸하게 되므로, 출원인은 직접 또는 대리인을 새로이 선임하여 특허에 관
한 절차를 밟을 수 있습니다.
7. 문의처 기타 문의사항이 있으시면 특허고객상담센터(1544-8080)에 문의하시거나 특허
청 홈페이지(www.patent.go.kr)를 참고하시기 바랍니다.

관인생략
출원번호통지서

출원일자 2010.05.14
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무) 참조번호(0004)
출원번호 10-2010-0045618 (접수번호 1-1-2010-0312165-36)
출원인명칭 한국식품연구원(3-1998-007755-3)
대리인성명 최규환(9-2005-001504-0)
발명자성명 이창호 김인호 한대석 김영언 성기승 김병목 이현유 최준혁
 이혜성 김덕일 백남인
발명의명칭 유효성분으로 백하수오 에탄올 추출물을 포함하는 혈전 감소용 조성물

특 허 청 장

1. 출원번호통지서 출원 이후 심사진행 상황 등을 확인하실 때에는 출원번호가 필요하시니 출원번호통지서는 출원절차가 종료될 때까지 보관하시기 바랍니다.
2.
 - 2-가. 특허 및 실용신안 출원은 **심사청구 후 평균 16개월**에 1차 심사처리가 이루어지고, 상표 및 디자인은 **출원 후 평균 10개월**에 1차 심사처리가 이루어집니다.
 - 2-나. 특허 및 실용신안은 **특허청 홈페이지**(<http://www.patent.go.kr>)의 "고객지원서비스-민원처리과정 통지 서비스" 코너에서 1차 심사결과통지 예고서비스를 신청하시면, 1차 심사처리 약 1개월 전에 해당 출원 건의 1차 심사결과통지 예정시기를 SMS 또는 E-mail 서비스로 제공 받을 수 있습니다.
 - 2-다. 상표 및 디자인은 **특허청 홈페이지(공지사항)**에 **특별 1차 심사결과통지 예정시기**를 매일 게시하고 있으며, **특허정보검색서비스 시스템**(<http://www.kipris.or.kr>)을 통해 개별 출원건에 대한 1차 심사결과통지 예정시기를 알려드립니다. 또한, 출원사 1차 심사결과통지 예정시기 알림 서비스를 신청하시면, **SMS 또는 E-mail 서비스**로 제공해 드립니다.

※ 상기 1차 심사결과통지 예정시기는 사정에 의해 다소 늦거나 빨리 될 수 있습니다.
 2-라. 1차 심사결과통지서(심사관이 특허결정의 등분을 송달하기 전 또는 심사관이 최초로 거절이유를 통지한 후 출원인이 그 거절이유를 받기 전 중 **빠른 때**)까지 귀하께서 특허출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 명세서 또는 도면을 보정할 수 있습니다.
 특허출원은 출원일로부터 5년 이내에 특허법시행규칙 별지 제24호서식에 의거 심사청구를 하지 않으면 그 출원은 출원취하된 것으로 간주하여 처리됨을 알려드립니다.
3. **우선심사 특허(실용신안등록)출원** 또는 **디자인등록출원**, **상표등록출원**에 대해 조기에 심사를 원하시면 "우선심사제도"를 이용하실 수 있습니다.
4. **주소 등 변경신고** 출원인의 주소 등을 변경하고자 하는 경우에는 특허법 시행규칙 별지 제4호의 2서식에 의한 출원인 정보변경(경정) 신고서를 제출하여야 합니다.
5. **산업재산권 표시, 광고요청** 특허 등 산업재산권을 출원 중에 있는 경우에는 해당 산업재산이 출원상태임을 다음과 같이 표시하여야 하며, 이를 위반할 경우 특허법 제224조 및 제227조에 의거 처벌 받게 됩니다.
 예) 특허출원 10-2001-0000001, 실용신안등록출원 20-2001-0000001, 디자인등록출원 30-2001-0000001, 상표등록출원 40-2001-0000001
6. **미성년자** 미성년자인 출원인이 만20세에 도달하는 경우 출원인의 부모 등 법정대리인의 대리권은 소멸하게 되므로, 출원인은 직접 또는 대리인을 새로이 선임하여 특허에 관한 절차를 밟을 수 있습니다.
7. **문의처** 기타 문의사항이 있으시면 특허고객상담센터(1544-8080)에 문의하시거나 특허청 홈페이지(www.patent.go.kr)를 참고하시기 바랍니다.

<http://www.patent.go.kr/jsp/kiponet/ir/receipt/online/appiNoOfcAct.so> 2010-05-14

관인생략
출원번호통지서

출원일자 2010.05.14
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무) 참조번호(0001)
출원번호 10-2010-0045607 (접수번호 1-1-2010-0312124-75)
출원인명칭 한국식품연구원(3-1998-007755-3)
대리인성명 최규환(9-2005-001504-0)
발명자성명 이창호 김인호 한대석 김영언 성기승 김병욱 이현유 최준혁
이혜성 김덕일 백남인
발명의명칭 유효성분으로 적하수용 에탄올 추출물을 포함하는 혈중 콜레스테롤 저하용 조성물

특 허 청 장

1. 출원번호통지서 출원 이후 심사진행 상황 등을 확인하실 때에는 출원번호가 필요하오니 출원번호통지서는 출원절차가 종료될 때까지 보관하시기 바랍니다.
2. 2-가. 특허 및 실용신안 출원은 **심사청구 후 평균 16개월**에 1차 심사처리가 이루어지고, 상표 및 디자인은 **출원 후 평균 10개월**에 1차 심사처리가 이루어집니다.
 2-나. 특허 및 실용신안은 **특허청 홈페이지**(<http://www.patent.go.kr>)의 "고객지원서비스-민원처리과정 통지 서비스" 코너에서 1차 심사결과통지 예고서비스를 신청하시면, 1차 심사처리 약 1개월 전에 해당 출원 건의 1차 심사결과통지 예정시기를 SMS 또는 E-mail 서비스로 제공 받을 수 있습니다.
 2-다. 상표 및 디자인은 **특허청 홈페이지(공지사항)**에 **류별 1차 심사결과통지 예정시기**를 매일 게시하고 있으며, **특허정보검색서비스 시스템**(<http://www.kipris.or.kr>)을 통해 개별 출원건에 대한 1차 심사결과통지 예정시기를 알려드립니다. 또한, 출원시 1차 심사결과통지 예정시기 알림 서비스를 신청하시면, **SMS 또는 E-mail** 서비스로 제공해 드립니다.
 ※ 상기 1차 심사결과통지 예정시기는 사정에 의해 다소 늦거나 빨라 질 수 있습니다.
 2-라. 1차 심사결과통지서(심사관이 특허결정의 등본을 송달하기 전 또는 심사관이 최초로 거절이유를 통지한 후 출원인이 그 거절이유를 받기 전 중 빠른 때)까지 귀하께서는 특허출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 명세서 또는 도면을 보정할 수 있습니다.
 특허출원은 출원일로부터 5년 이내에 특허법시행규칙 별지 제24호서식에 의거 심사청구를 하지 않으면 그 출원은 출원취하된 것으로 간주하여 처리됨을 알려드립니다.
3. 우선심사 특허(실용신안등록)출원 또는 디자인등록출원, 상표등록출원에 대해 조기에 심사를 원하시면 "우선심사제도"를 이용하실 수 있습니다.
4. 주소 등 변경신고 출원인의 주소 등을 변경하고자 하는 경우에는 특허법 시행규칙 별지 제4호의 2서식에 의한 출원인 정보변경(경정) 신고서를 제출하여야 합니다.
5. **산업재산권 표시, 광고요령** 특허 등 산업재산권을 출원 중에 있는 경우에는 해당 산업재산이 출원상태임을 다음과 같이 표시하여야 하며, 이를 위반할 경우 특허법 제224조 및 제227조에 의거 처벌 받게 됩니다.
 예) 특허출원 10-2001-0000001, 실용신안등록출원 20-2001-0000001, 디자인등록출원 30-2001-0000001, 상표등록출원 40-2001-0000001
6. **미성년자** 미성년자인 출원인이 만20세에 도달하는 경우 출원인의 부모 등 법정대리인의 대리권은 소멸하게 되므로, 출원인은 직접 또는 대리인을 새로이 선임하여 특허에 관한 절차를 밟을 수 있습니다.
7. 문의처 기타 문의사항이 있으시면 특허고객상담센터(1544-8080)에 문의하시거나 특허청 홈페이지(www.patent.go.kr)를 참고하시기 바랍니다.

관인생략 출원번호통지서

출원일자 2010.05.14

특기사항 심사청구(유) 공개신청(무) 참조번호(0005)

출원번호 10-2010-0045620 (접수번호 1-1-2010-0312170-65)

출원인명칭 한국식품연구원(3-1998-007755-3)

대리인성명 최규환(9-2005-001504-0)

발명자성명 이창호 김인호 한대석 김영언 성기승 김병목 이현유 최준혁
이혜성 김덕일 백남인

발명의명칭 유효성분으로 적하수오 에탄올 추출물을 포함하는 혈압 강하용 조성물

특 허 청 장

1. **출원번호통지서** 출원 이후 심사진행 상황 등을 확인하실 때에는 출원번호가 필요하므로 출원번호통지서는 출원절차가 종료될 때까지 보관하시기 바랍니다.
2.
 - 2-가. 특허 및 실용신안 출원은 **심사청구 후 평균 16개월**에 1차 심사처리가 이루어지고, 상표 및 디자인은 **출원 후 평균 10개월**에 1차 심사처리가 이루어집니다.
 - 2-나. 특허 및 실용신안은 **특허청 홈페이지**(<http://www.patent.go.kr>)의 "고객지원서비스-민원처리과정 통지 서비스" 코너에서 1차 심사결과통지 예고서비스를 신청하시면, 1차 심사처리 약 1개월 전에 해당 출원 건의 1차 심사결과통지 예정시기를 SMS 또는 E-mail 서비스로 제공 받을 수 있습니다.
 - 2-다. 상표 및 디자인은 **특허청 홈페이지(공지사항)**에 **류별 1차 심사결과통지 예정시기**를 매월 게시하고 있으며, **특허정보검색서비스 시스템**(<http://www.kipris.or.kr>)을 통해 개별 출원건에 대한 1차 심사결과통지 예정시기를 알려드립니다. 또한, 출원시 1차 심사결과통지 예정시기 알림 서비스를 신청하시면, **SMS 또는 E-mail 서비스**로 제공해 드립니다.

※ 상기 1차 심사결과통지 예정시기는 사정에 의해 다소 늦거나 빨라 질 수 있습니다.
2-라. 1차 심사결과통지시(심사관이 특허결정의 등본을 송달하기 전 또는 심사관이 최초로 거절이유를 통지한 후 출원인이 그 거절이유를 받기 전 중 빠른 때)까지 귀하께서는 특허출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 명세서 또는 도면을 보정할 수 있습니다.
특허출원은 출원일로부터 5년 이내에 특허법시행규칙 별지 제24호서식에 의거 심사청구를 하지 않으면 그 출원은 출원취하된 것으로 간주하여 처리됨을 알려드립니다.
3. **우선심사 특허(실용신안등록)출원** 또는 **디자인등록출원, 상표등록출원**에 대해 조기에 심사를 원하시면 "우선심사제도"를 이용하실 수 있습니다.
4. **주소 등 변경신고** 출원인의 주소 등을 변경하고자 하는 경우에는 특허법 시행규칙 별지 제4호의 2서식에 의한 출원인 정보변경(경정) 신고서를 제출하여야 합니다.
5. **산업재산권 표시, 광고요령** 특허 등 산업재산권을 출원 중에 있는 경우에는 해당 산업재산이 출원상태임을 다음과 같이 표시하여야 하며, 이를 위반할 경우 특허법 제224조 및 제227조에 의거 처벌 받게 됩니다.
예) 특허출원 10-2001-0000001, 실용신안등록출원 20-2001-0000001, 디자인등록출원 30-2001-0000001, 상표등록출원 40-2001-0000001
6. **미성년자 미성년자인 출원인**이 만20세에 도달하는 경우 출원인의 부모 등 법정대리인의 대리권은 소멸하게 되므로, 출원인은 직접 또는 대리인을 새로이 선임하여 특허에 관한 절차를 밟을 수 있습니다.
7. **문의처** 기타 문의사항이 있으시면 특허고객상담센터(1544-8080)에 문의하시거나 특허청 홈페이지(www.patent.go.kr)를 참고하시기 바랍니다.

관 인 생 략
출 원 번 호 통 지 서

출 원 일 자 2010.05.14
특 기 사 항 심사청구(유) 공개신청(무) 참조번호(0003)
출 원 번 호 10-2010-0045617 (접수번호 1-1-2010-0312162-00)
출 원 인 명 칭 한국식품연구원(3-1998-007755-3)
대 리 인 성 명 최규환(9-2005-001504-0)
발 명 자 성 명 이창호 김인호 한대석 김영언 성기승 김병목 이현유 최준혁
이해성 김덕일 백남인
발 명 의 명 칭 유효성분으로 적하수오 에탄올 추출물을 포함하는 혈전 감
소용 조성물

특 허 청 장

1. 출원번호통지서 출원 이후 심사진행 상황 등을 확인하실 때에는 출원번호가 필요하오니 출원번호통지서는 출원절차가 종료될 때까지 보관하시기 바랍니다.
2. 2-가. 특허 및 실용신안 출원은 심사청구 후 평균 16개월에 1차 심사처리가 이루어지고, 상표 및 디자인은 출원 후 평균 10개월에 1차 심사처리가 이루어집니다.
2-나. 특허 및 실용신안은 특허청 홈페이지(<http://www.patent.go.kr>)의 "고객지원서비스-민원처리과정 통지 서비스" 코너에서 1차 심사결과통지 예고서비스를 신청하시면, 1차 심사처리 약 1개월 전에 해당 출원 건의 1차 심사결과통지 예정시기를 SMS 또는 E-mail 서비스로 제공 받을 수 있습니다
2-다. 상표 및 디자인은 특허청 홈페이지(공지사항)에 류별 1차 심사결과통지 예정시기를 매일 게시하고 있으며, 특허정보검색서비스 시스템(<http://www.kipris.or.kr>)을 통해 개별 출원건에 대한 1차 심사결과통지 예정시기를 알려드립니다. 또한, 출원시 1차 심사결과통지 예정시기 알림 서비스를 신청하시면, SMS 또는 E-mail 서비스로 제공해 드립니다.
* 상기 1차 심사결과통지 예정시기는 사정에 의해 다소 늦거나 빨라 질 수 있습니다.
2-라. 1차 심사결과통지서(심사관이 특허결정의 통보를 송달하기 전 또는 심사관이 최초로 거절이유를 통지한 후 출원인이 그 거절이유를 받기 전 중 빠른 때)까지 귀하께서는 특허출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 명세서 또는 도면을 보정할 수 있습니다.
특허출원은 출원일로부터 5년 이내에 특허법시행규칙 별지 제24호서식에 의거 심사청구를 하지 않으면 그 출원은 출원취하된 것으로 간주하여 처리함을 알려드립니다.
3. 우선심사 특허(실용신안등록)출원 또는 디자인등록출원, 상표등록출원에 대해 조기에 심사를 원하시면 "우선심사제도"를 이용하실 수 있습니다
4. 주소 등 변경신고 출원인의 주소 등을 변경하고자 하는 경우에는 특허법 시행규칙 별지 제4호의 2서식에 의한 출원인 정보변경(경정) 신고서를 제출하여야 합니다.
5. 산업재산권 표시, 광고요청 특허 등 산업재산권을 출원 중에 있는 경우에는 해당 산업재산이 출원상태임을 다음과 같이 표시하여야 하며, 이를 위반할 경우 특허법 제224조 및 제227조에 의거 처벌 받게 됩니다.
예) 특허출원 10-2001-0000001, 실용신안등록출원 20-2001-0000001, 디자인등록출원 30-2001-0000001, 상표등록출원 40-2001-0000001
6. 미성년자 미성년자인 출원인이 만20세에 도달하는 경우 출원인의 부모 등 법정대리인의 대리권은 소멸하게 되므로, 출원인은 직접 또는 대리인을 새로이 선임하여 특허에 관한 절차를 밟을 수 있습니다.
7. 문의처 기타 문의사항이 있으시면 특허고객상담센터(1544-8080)에 문의하시거나 특허청 홈페이지(www.patent.go.kr)를 참고하시기 바랍니다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

산업발달과 의학기술의 발달, 삶의 질 향상 등 여러 요인들로 인해 세계적으로 고령층의 건강과 복지에 대한 대책마련이 시급한 실정이다. 특히 당뇨병, 암, 고혈압, 고지혈증 등 성인병은 성년기 이후에 남녀모두에게 노화와 더불어 점차 많이 발생하는 비전염성의 만성퇴행성 질환 및 기능장애를 말하는 것으로 현대인에게서 불규칙한 생활습관, 스트레스, 운동부족, 영양불균형 및 환경오염 등으로 인해 발생하며 성인병 예방 및 개선 기능성제품 개발 연구는 현재 천연자원의 유효성분을 활용한 연구가 활발히 진행 중이다. 이에 “적하수오의 혈관계 개선 효과 규명 및 기능성 제품 개발” 과제와 관련하여 안전하면서도 활성이 우수한 유효성분을 함유한 고기능성식품을 개발하여 보급함으로써 국민건강증진과 국내 식품산업 기술개발의 선진화 및 국가경쟁력 제고로 해외수출증대에도 기여 할 수 있는 우수한 제품을 개발하기 위해 일본에서 열리는 국제 식품 박람회 “Foodex Japan 2011”를 직접 방문하여 현재 기능성 식품 산업의 국제적 연구동향, 기능성식품산업 현황 및 최신 연구 자료 등을 수집하였으며 국제 식품 산업 동향과 혈류 개선 효능과 관련된 다양한 상품화 사례에 대한 조사를 실시하고 이를 이용하여 본 연구의 완성도를 제고하였다.



사진 1. Foodex Japan 전경(내부 사진촬영을 금지한 관계로 원거리에서의 전경 사진과 일부 제품 관련 사진 및 관련 자료 사진만을 첨부함).

아시아 최대의 식품 음료 전문전시회 Foodex Japan 2011은 3월1일부터 4일까지 4일 동안 일본 도쿄 마쿠하리 전시장에서 개최되었다. Foodex Japan 국제식품, 음료전은 아시아, 환태평양 지역에서 최대 규모이며, 세계적으로는 3번째 규모를 자랑하는 식품, 음료의 전문 전시회 이며 이번 전시회는 세계 65개국, 2,450개의 업체 및 단체가 출전, 관람객수 8만 명에 달하는 성황을 이루었다. 또한 Fresh mart, grocery mart, sweets & snacks mart, drink mart, great food from japan, imported food mart, well food 등의 다양한 품목들이 전시되었으며 이를 통하여 현재 식품의 개발 동향과 앞으로의 건강기능식품 시장의 흐름을 예측할 수 있는 기회가 되었다. 특히 혈류개선, 심혈관질환 예방, 고혈압예방, 혈중 콜레스테롤 저하 효능 식품 등이 다양하게 소개, 전시되고 있었다. 예를 들면 GABA함량을 높인 쌀 분말 제품과 녹차, 그리고 낫토, 다이어트 Bar와 이온음료 등이 다양한 형태로 가공되어 전시되었다. 또한 slow food가 다시 조명되기 시작하고, 발효식품이 세계 각국의 부스에 흔하게 자리 잡고 있는 것은 주목할 만한 부분이었다. 현재 대부분의 선진국에서 당뇨병, 암, 고혈압, 고지혈증 등 성인병 예방 및 치료에 관한 산업적 학술적 연구가 활발해지고 있고 유럽과 미국의 경우 1.2 Bilion(\$U.S)~2.4

Billion(\$U.S)의 비용이 직접 치료에 사용되어 이로인한 사회적 손실이 심각한 실정이다. 출장자는 본 박람회 참관을 통하여 건강기능식품 시장을 선도하고 있는 일본 및 유럽의 건강 기능성 식품 실태 및 각국의 medicinal herb를 이용한 다양한 건강 기능 식품의 흐름과 경향을 파악할 수 있었으며 이러한 자료 조사를 바탕으로 본 연구과제를 성공적으로 수행할 수 있었다.

< 당 박람회에 전시된 품목 >

- 농산 식재전
- 조미료, 조리/가공식품전
- 과자, 디저트, 스낵전
- 소프트드링크, 알콜류 전
- 전국 식품전
- 수입 식품전
- Well food 전



사진 2. 혈전을 분해시켜 뇌졸중이나 심혈관 질환 개선 효능이 있다고 알려져 있는 낫또 가공제품으로 본 제품 이외에 저장 유통이 용이한 건조분말제품 등으로도 출시되어 있음



사진 3. 고혈압강하, 항비만 효능 및 인슐린 효과의 증대, 식욕 감퇴 및 우울증 등에 효과가 있으며 간기능 활성화와 알코올 대사 촉진 기능으로 숙취제거 음료에 이용되기도 하며 뇌세포 대사 기능을 활발하게 함으로서 중풍 치매 예방, 정신집중력 강화, 기억력 증진, 불면 등에 효과를 인정받고 있는 GABA를 주요 성분으로 한 제품으로 GABA는 비만해소 작용과 신장 기능 촉진 작용과 HGH (human growth hormone)분비 자극 효능이 있어 청소년 성장 및 발육 촉진이 효과가 있는 것으로 알려져 있음





사진 4. 발효 기법을 이용하여 제조된 다양한 세계 각국의 발효 식품류(치즈 가공 제품, 각종 과일 등 기능성 식물 소재를 원료로 발효 숙성시켜 혈류 개선 효능이 우수한 기능성 식초 제품 및 스페인의 전통 발효육 제품)



사진 5. 항산화 활성, 항암 활성 등의 효능이 뛰어난 다양한 기능성 두부류 및 대두 요구르트 가공 제품

제 7 장 참고문헌

1. 박종희 한약백과도감(하), 도서출판신일상사, 서울 : 881-882(2002)
2. 육창수 아세아 생약도감, 도서출판 경원, 서울: 136 (1997)
3. 대한약전 한약(생약)규격집, 보건사회부, 서울: 395(1987)
4. Choi H, Zhu M, Kim C, Lee J. Studies of name and herbal origins of Ha-Soo-Oh. Korean Journal of Oriental Medicine. 9(1):81-89(2003)
5. Lee HW, Park SY, Choo BK, Chae SW, Lee AY, Kim HK. Quantitative analysis of anthraquinones in *Polygonum multiflorum* Thunberg. Korean Journal of Oriental Medicine. 13(3):157-163(2007)
6. Kannel WB. 1976. Components of blood pressure and risk of athrothrombotic brain infarction. *Stroke* 7: 327
7. Han Soo Kim. 2006. Effects of the Feral peach (*Prunus persica* Batsch var. *daurica* Max.) extract on the lipid compositions and blood pressure level in spontaneously hypertensive rat. *Journal of life science* 16(7): 1071-1079
8. Lu Wang, Dan Li, Changli Bao, Jingyan You, Ziming Wang, Yuhua Shi and Hanqi Zhang. (2008) Ultrasonic extraction and separation of anthraquinones from *Rheum palmatum* L. *Ultrasonics Sonochemistry*, 15, 738-746
9. Barltrop, JA, 5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4,5-dimethylthiazoly)-3-(4-sulfophenyl)tetrazolium, inner salt (MTS) and related analogs of

- 3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reducing to purple watersoluble formazans as cell-viability indicators. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1, 611-4(1991)
10. Cory, A.H. Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer Comm.* 3, 207-212(1991).
 11. Riss, T.L., and Moravec, R.A. Comparison of MTT, XTT, and a novel tetrazolium compound MTS for in vitro proliferation and chemosensitivity assays. *Mol. Biol. Cell (Suppl.)* 3, 184a(1992)
 12. Qing, Z.; Shen, J.; Silval, A.; Dennis D. A. Colin J. Barrow C. J. A sample 96-well microplate method for estimation of total polyphenol content in seaweed. *J. Applied Phycology.* 106, 424-431(2006)
 13. Singleton, V. L.; Rossi, J. A., Jr. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 16, 144-158(1965)
 14. Kim, D. O.; Padilla-Zakour, O. I. Jam processing effect on phenolics and antioxidant capacity in anthocyanin-rich fruits: cherry, plum, and raspberry. *Sensory and nutritive qualities of food.* 69, 395 - 400(2004)
 15. Issa AY, Volate SR, Wargovich MJ. The role of phytochemicals in inhibition of cancer and inflammation new directions and perspectives. *J. Food Compos. Anal.* 19: 405-419 (2006)
 16. Hassan O, Fan LS, The anti-oxidation potential of polyphenol extract from cocoa leaves on mechanically deboned chicken meat (MDCM). *LWT-Food Sci. Technol.* 38: 315-321 (2005)

17. Sanchez CS, Gonzalez AMT, Garcia-Parrilla MC, Granados JJQ, SerranaHLG, Martinez MCL. Different radical scavenging tests in virgin olive oil and their relation to the total phenol content. *Anal. Chim. Acta.* 593: 103–107 (2007)
18. Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. E.; Berset. C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. –Wiss. Technol.* 28, 25 – 30(1995)
19. Kim, D. O.; Lee, K. W.; Lee, H. J.; Lee, C. Y. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. *J Agric Food Chem.*50, 3713 – 3717(2002)
20. Murakamo A, Takahashi D, Koshimizu K, Ohigashi H. Synergistic suppression of superoxide and nitric oxide generation from inflammatory cells by combined food factors. *Mutat. Fes.* 523–524: 151–161 (2003)
21. Kleinsek DA, Dugan RE, Baker TA, Porter JW. "Method in Enzymology", Vol 71, Academic Press, New York, 462–479(1981)
22. Endo A. The discovery and development of HMG-CoA reductase inhibitors. *J. Lipid Res.* 33: 1569–1582(1992)
23. Turley E, Armstrong NC, Wallace JMW, Gilore WS, Mckelvey-Martin JV, Allen TM, Strain JJ. 1999. Effect of cholesterol feeding on DNA damage in male and female Syrian hamsters. *Ann Nutr Metab* 43: 47–51
24. Park SO. 1995. Effects of aloe vera powder on lipid metabolism in rats fed cholesterol added diet. PhD Dissertation. Ewha Women's University, Seoul, Korea

25. Kim HS, Effects of *Cynanchum wilfordii* extract on serum lipid componetnts and enzyme activities in hyperlipudemic and streptozotocin-induced diabetic rats. *Korean J. of Human Ecology* 7(2) : 1~ 11 (2004)
26. Yi, K.N., Rhee. C.S. Clinical pathology file, pp 101-126, Euihak Munwasa Co., Seoul)
27. Ham IH, Lee JY, Yoon YJ, Yang GS, Tae Jin, Bu YM, Kim HC and Choi HY, Effects of *Cynanchum* spp. on the hyperlipidemia in rats induced by tritition WR-1399. *Kor J Herbology* 22(4):279-286 (2007)
28. Ah Ra Kim, Jae Joon Lee, Yu Mi Lee, Hae Ok Jung, and Myung Yul Lee. 2010. Cholesterol-lowering and Anti-obesity Effects of *Polymnia Sonchifolia* Poepp. & Endl. Powder in Rats Fed aHigh Fat-High Cholesterol Diet. *J Korean Soc Food Sci Nutr*
29. Astrup T, Mullertz. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. *Arch. Biochem. Biophys.*, 40, 346-350(1952)
30. Butenas, S. and K. G. Mann. 2002. *Blood coagulation Biochemisrty* (Moscow) 67: 3-12
31. Hsieh, K. H. 1997. Thrombin interaction with fibrin polymerization sites. *Thrombosis Research* 86: 301-316
32. Chushman DW, Cheung HS. Spectrophotometric assay and propeties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochem. Pharmacol.* 20(&), 1637-1648(1971)
33. 신현경. 기능성식품의 개발현황. *식품기술*, 7(3), p3(1994)

34. Noh. H, Song KB. Isolation of an angiotensin converting enzyme inhibitor from *Oenanthe javanica*. *Agric. Chem. Biotechnol.* 44. 98–99(2001).
35. Oh SJ, Kim SH, Kim SK, Baek YJ, Cho KH. Angiotensin I converting enzyme inhibitory activity of the K-casein fragments hydrolyzated by chymosin, pepsin, and trypsin. *Korean J Food Sci Technol.* 29, p1316–1318(1997)
36. William, O. A., L. L. Thomas and A. W. David. Rennin–angiotensin inhibitors. In *Principles of Medical Chemistry*. 4th ed., William & Wilkins, Baltimore. p724(1995)
37. Do SG, Choi PW. . Effects of garlic on the blood pressure of spontaneously hypertensive rats (SHR). *Kor J Lab Anim Sci* 15: 275–282(1999)
38. Kim HS. Effect of Korean mistletoe hot–water extract on the lipid components and blood pressure level in spontaneously hypertensive rats. *Kor J Pharmacogn* 37: 168–176(2006)
39. Plaa GL. Detection and evaluation of chemically induced liver injury. In *Principle and methods of toxicology*. Hayes AW, ed. Taylor & Francis, Philadelphia, USA. p 839–870(1994)
40. Gordon, T., Casfelli, W. P. Hjortland, M. C., Kennel, W. B. and Dawher, T. R. High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease, the Framingham study. *Am. J. Med.* 62: 707(1977)
41. Myant, N. B. Cholesterol metabolism, LDL, and the LDL receptor, pp.407, Academic Press Inc., New York(1990)

42. Kim KH, Lee KH, Kim SH, Kim NY and Yook HS. Quality Characteristics of Jelly Prepared with Flowering Cherry (*Prunus serrulata* L. var. *spontanea* Max. wils.) Fruit Powder. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39: 110~115(2010)
43. Lee TH, Lee YH, Yoo MS, Rhee KS. Instrumental and sensory characteristics of jelly. *Korean J Food Sci Technol* 23: 336-340(1991)
44. Kim IC. Manufacture of citron jelly using the citron extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 28: 396-403(1999)
45. Cho Y and Choi MY. Quality Characteristics of Jelly Containing Added Turmeric (*Curcuma longa* L.) and Beet (*Beta vulgaris* L.). *Korean J Food Cookery Sci.* 26: 481-489(2010)
46. Kim AJ, Yuh CS, Bang IS, Park HY, Lee GS. An investigation the preparation and physicochemical properties of *oddi* jelly using *mulberry* fruit powder. *Korean J Food cookery Sci.* 22: 56-61(2007b)
47. Kim AH, Yuh CS and Bang IS. A Qualitative Investigation of *Dongvhunghacho* Jelly with Assorted Increments of *Paeciomyces japonica* powder. *Korean J Food & Nutr.* 1: 40-46(2007)