

발간등록번호

11-1543000-001282-01

비타민나무(갈매보리수나무) 열매와 잎을 활용한  
정신적/육체적 피로개선 기능성식품 원료 소재화

(Study to develop the product-specific functional food for  
anti-stress/anti-fatigue using *Hippophae rhamnoides* L.)

(주)뉴트리플랜

농림축산식품부

# 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “고부가가치식품기술개발사업” 과제(세부과제 “비타민나무 열매와 잎을 활용한 정신적/육체적 피로개선 기능성식품 원료 소재화에 관한 연구”)의 보고서로 제출합니다.

2016 년 1 월 29 일

주관연구기관명 : (주)뉴트리플랜

주관연구책임자 : 강 남 길

세부연구책임자 : 강 남 길

협동연구기관명 : 천연자원연구원

협동연구책임자 : 김 선 오

위탁연구기관명 : 경희대학교

협동연구책임자 : 이 정 민

# 요 약 문

## I. 제 목

비타민나무 열매와 잎을 활용한 정신적/육체적 피로개선 기능성식품 원료 소재화

## II. 연구성과 목표 대비 실적

비타민나무의 열매와 잎을 활용한 기능성식품 원료 소재화를 위하여 1차년도에는 비타민나무 열매와 잎 추출물을 제조하여 HTS를 이용하여 정신적/육체적 피로 개선 활성을 확인하였 각각의 소재를 확보하였고, 비타민나무 잎, 열매 생산지역, 국가별 효능차이를 확인하기 위하여 국내 및 해외 소재를 확보하여 효능평가를 실시하였으며, 확보된 소재의 추출조건에 대한 추출공정을 확립하였다. 또한 효능 평가를 위한 최적 농도범위를 결정하기 위하여 독성시험을 통해 최적 시험 농도범위를 확인하였다. 2차년도에는 in vivo 시험을 통한 항스트레스, 피로 개선 기능성을 규명하였고, 각각의 기능성 결과를 토대로 정신적 스트레스 완화 및 육체적 피로회복 개선에 대한 특허를 출원 및 SCI(E)급 학회에 투고하였다. 비타민나무 잎 열수추출분말의 안전성을 확인하기 위하여 GLP 안전성 평가 기관을 통한 안전성을 확인하였다. 또한 비타민나무 잎 열수 추출물의 표준화를 위하여 지표성분을 “quercetin, kaempferol, isorhamnetin의 합”으로 설정하여, 분석조건 등을 확립하였고, 추출물을 활용하여 3차년도 실시할 사내 임상시험용 시제품을 treatment와 placebo 각각 제조하였다. 3차년도에는 추출물 성분분석을 통한 유효성분을 탐색하여 유효성분이 quercetin, kaempferol, isorhamnetin인 것을 확인하였고, in vitro 및 in vivo 기전규명 연구를 통한 활성 기전을 규명하였으며, 사내 간이임상을 통한 정신적/육체적 스트레스 해소에 대한 기능성 평가를 실시하여 기능성이 있음을 확인하였다. 또한 비타민나무 잎 열수 추출물을 대량생산하기 위한 가공기술을 확립하였으며, 가공기술을 통해 생산된 원료를 이용하여 “活力旺”이라는 수출용 제품을 개발하여 제주 국제보세 등에 런칭하였다. 따라서, 본 연구결과 연구목표에 대한 성과는 100% 달성하였으며, 그 결과 수출용 제품을 생산할 수 있어 추후 비타민나무 농가의 소득 증대 및 수출 증대가 예상된다.

## III. 연구개발의 목적 및 필요성

현대사회에서 학업, 일과 인간관계에서 발생하는 육체적/정신적 스트레스, 미래에 대한 막연한 불안 및 고민을 생각하면 현대인들에게 가장 부족한 것은 마음의 건강이다. 이러한 현상은 지금까지 편리성 향상을 위해 발전해온 상품에 「육체와 정신을 만족시킨다」는 새로운 기능 첨가를 요구하고 있다. 삶의 질 향상과 의학의 비약적인 발전을 통해 세계적으로 노령화가 급속도로 진행되어 가고 있음에 따라 육체적인 건강관리(헬스케어)는 기능성식품의 도움으로 유지가 잘되고 있으나, 신경계 및 정신적인 건강관리(멘탈케어)를 유지하기 위한 기능성식품은 매우 열악한 상황이다. 세계적으로 식품업계에서 멘탈 케어(mental care) 소재에 관심이 커지고 있고, 육체적/정신적 스트레스 개선, 업무능력 향상, 수면 보조(개선), 다이어트 시 불안감, 초조감의 억제, 기억력 향상, 집중력 향상 등 육체적/정신적 개선 작용을 통하여 효과가 기대되는 기능성식품개발을 위해 많은 투자가 시작되고 있었다. 소재가 신선한 비타민 이미지의 갈매보리수나무는 이명으로 ‘비타민나무’라는 이름을 가지고 있으며 주요 성분으로는 탄닌

비타민 C, 비타민 E, 카로틴, 티아민, 리보플라민등을 함유하고 있다. 주요 산지는 강원도, 경기도, 전남 남해안 등에 분포하고 있다. 갈매보리수나무는 400편에 가까운 국제연구논문이 발표되어 있으며 1950년대부터 연구가 진행되어 왔을 정도로 오래 전부터 연구가 진행되어 왔다. 국내에서도 관련 소재로 많은 제품이 생산되어 왔다.

따라서 본 과제에는 이러한 관점에서 현재 천연비타민 열풍에 대응하여 신규 개발 자원으로 서 비타민나무(갈매보리수나무)의 열매와 잎을 대상으로 소재를 탐색하여 멘탈 케어 기능성 소재의 탐색, 과학적 기전 검증 및 규명, 임상시험, 제품 표준화 및 가공기술개발 연구를 통해 육체적/정신적건강 토탈케어 기능성 식품 시장의 모범적인 성공사례를 제시하고자 한다.

#### IV. 연구개발 내용 및 범위

##### 1. 비타민나무 잎 원료의 가공공정 확립과 표준화

###### 1.1 비타민나무의 국내·외 소재 확보 및 확보소재의 추출물 생산

비타민나무의 국내·외 소재 확보를 위해 국내 비타민나무 농가를 대상으로 조사하였으며 국외 비타민나무 주 생산지 및 국내 수입량을 조사하였다. 확보한 국내·외 비타민나무 원료를 바탕으로 잎과 열매를 각각의 용매별로 추출을 진행하였다. 추출물들 중 in vitro 효능이 가장 우수한 추출물 대상으로 Scale-up 테스트 및 문제점을 개선하였다.

###### 1.2 비타민나무 잎 추출물의 일반·미량성분 분석 및 유해물질 분석

비타민나무의 일반성분(탄수화물, 단백질, 지방, 수분) 및 미량성분(무기질, 비타민, 아미노산, 페놀류) 분석을 위해 식품공전과 건강기능식품공전의 시험법을 이용하여 분석을 시행하였다. 또한 중금속 시험법을 이용하여 비타민나무 추출물의 유해물질 설정 분석을 시행하였다.

###### 1.3 비타민나무 잎 추출물의 지표성분 분석

지표성분 분석을 위하여 총폴리페놀 함량 분석, 고속크로마토그래피를 이용한 quercetin, kaempferol, isorhamnetin의 분석을 시행하였다. 또한 국내·외 비타민나무 잎 추출물을 대상으로 quercetin, kaempferol, isorhamnetin의 함량을 비교 분석하였으며 추출물을 분획하여 분획층별 지표물질인 quercetin, kaempferol, isorhamnetin의 함량을 비교 분석하였다.

##### 2. 비타민나무 잎 시제품 개발을 위한 제형 연구

###### 2.1 비타민나무 잎 추출분말을 이용한 건강기능식품 제형 개발

추출물의 적합한 제형을 적용성을 확인하기 위하여 대표적인 고상제형인 정제, 경질캡슐 제형, 대표적인 액상제형인 연질캡슐, 액상제형에 대하여 각 제형 각 제형별 특성에 대해 검토하였다.

###### 2.2 임상시험용 시제품 개발

제형연구가 된 결과를 토대로 비타민나무 열수추출분말에 가장 적합한 제형을 선택하여 시제품을 개발하였다.

##### 3. 비타민나무 잎 시제품 개발을 위한 유통기한 설정

개발된 시제품을 대상으로 유통기한 설정을 시행하였다. 시료의 분석항목은 식품 및 건강기능식품 유통기한 설정 가이드라인을 참고하여 선정하였으며 검사 항목은 정상, 대장균군, 지표성분(quercetin, kaempferol, isorhamnetin 합) 함량을 온도와 저장기간에 따라 측정을 실시하였으며 이를 바탕으로 유통기간을 산출하였다.

#### 4. 비타민나무의 시제품 개발 및 상품화

비타민나무 추출분말을 활용한 시제품 개발은 Target 시장 선정 후 제품 유형, 배합비, 디자인 등을 선정 한 후 제품을 제조하였다.

#### 5. 비타민나무의 정신적 항피로 기능성 및 활성기전 규명

##### 5.1. 비타민나무 부위 별 지역별 활성 비교실험을 통한 최종시료 선정

실험 시료로서 지역별로는 강원도, 경기도, 전라남도 장흥군, 수입산(중국)에서 확보 하였으며, 부위별로 잎(전지역), 열매(전남 장흥군), 덩은잎, 그리고 추출용매로는 열수와 5%, 30%, 50%, 70% 에탄올을 사용한 추출물을 이용하여 실험을 수행하였다. 총 4가지의 in vitro screening tool (corticosterone 보호효과 screening 모델, 5-HT6 매개 cAMP 활성 screening 모델, NMDA 매개  $Ca^{2+}$  유입 억제능 활성 screening 모델, HO-1 효소 활성 모델)을 활용하여 건강기능식품 소재로서의 비타민나무의 부위와 지역, 용매별 추출물을 선택하고자 실험을 수행하였다.

##### 5.2. 비타민나무잎 열수추출물 안전성평가

비타민나무잎 열수추출물의 단회투여 및 14일 반복투여 독성평가를 수행하였다. 평가 지표로는 사망률 및 일반 증상, 체중변화, 변 상태 변화, 조직의 외관 상태와 무게변화, 혈청 AST 및 ALT 의 변화를 측정하였다.

##### 5.3. in vivo 비타민나무 열수 추출물의 정신적 피로활성 평가

in vivo 실험으로서 전기쇼크를 통해 실험동물에 극심한 스트레스를 줌으로 정신적 스트레스에 대한 시료의 효과를 탐색 하였다. 혈청과 뇌(해마) 부위에서의 평가 지표로서, corticosterone 수치와 5-HT의 수준, dopamine 및 norepinephrine 수준의 변화를 측정하였다.

##### 5.4. 비타민나무 열수 추출물의 생리활성 후보물질 탐색

LC-MS-MS를 활용하여 비타민나무잎 열수추출물에서 생리활성 단일 후보물질들을 규명하였으며, 스크리닝을 통한 최종 후보물질들의 비타민나무잎 열수추출물 에서의 HPLC 를 이용한 정량적 분석을 수행하였다.

##### 5.5. 비타민나무 정신적 항피로 생리활성 물질 및 활성기작 규명

LC-MSMS 분석을 통해 규명한 생리활성 후보물질들을 이용하여 in vitro screening tool들 (corticosterone 보호효과 screening 모델, 5-HT6 매개 cAMP 활성 screening 모델, NMDA 매개  $Ca^{2+}$  유입 억제능 활성 screening 모델)을 활용하여 최종 생리활성 후보 물질을 screening 하였다. 최종 선정된 생리활성 후보물질을 이용하여 in vivo 실험을 통해 활성기작을 규명하고자 하였다. 사용 모델로서 전기쇼크를 통해 실험동물에 극심한 스트레스를 줌으로 정신적 스트레스에 대한 시료의 효과를 탐색 하였으며, 행동양상의 변화와 혈청과 뇌(해마) 부위에서의 평가 지표로서, corticosterone 수치의 변화와 5-HT의 수준 변화, dopamine 및 norepinephrine 수준의 변화를 측정하였다.

#### 6. 비타민나무의 육체적 항피로 기능성 및 활성기전 규명

##### 6.1. in vivo 비타민나무잎 열수 추출물의 육체적 피로활성 평가

비타민나무잎 열수추출물의 in vivo assay로서 유속 pool을 활용한 육체적 피로와 관련된 biomarker들 (수영시간, Lactate level, glycogen content, LDH activity, BUN level 등)을 확인하여 전임상 수준에서의 비타민나무잎 열수추출물의 육체적 항피로활성을 확인 하였다.

## 6.2. 비타민나무 육체적 항피로 생리활성 물질 및 활성기작 규명

LC-MSMS 분석을 통해 규명한 생리활성 후보물질들을 이용하여 in vitro screening tool들 (L6 근육세포에서의 과산화수소에 대한 보호효과 모델과 세포내 ROS 소거능 평가 모델)을 활용하여 최종 생리활성 후보물질을 screening 하였다. 선정된 최종 후보물질을 이용하여 in vivo 수준에서의 활성기작 규명을 위해, 유속 pool을 활용한 육체적 피로와 관련된 biomarker들 (수영시간, Lactate level, glycogen content, LDH activity, BUN level, 신체내 항산화 효소 활성 수준 등)을 확인하여 전임상 수준에서의 생리활성물질의 육체적 항피로활성기작을 규명하였다.

## V. 연구개발결과

### 1. 비타민나무 잎 원료의 가공공정 확립과 표준화

#### 1.1 비타민나무의 국내·외 소재 확보 및 확보소재의 추출물 생산

비타민나무의 일반성분 분석결과 탄수화물이 가장 많은 함량을 차지함을 나타냈으며 무기질 중에서는 칼륨이 가장 많은 양을 차지함을 나타내었다. 무기질 중에서는 비타민 C의 함량이 가장 풍부한 것으로 조사되었다. 비타민나무의 주요 활성 성분으로 생각되어지는 총 폴리페놀의 양은 284.73 mg/g 이상으로 분석되었다. 또한 플라보노이드와 조사포닌, 카테킨이 각각 검출되었다.

#### 1.2 비타민나무 잎 추출물의 일반·미량성분 분석 및 유해물질 분석

유해물질 및 잔류농약 분석을 진행 한 결과 중금속인 납, 카드뮴, 비소, 수은은 기준치 이하의 함량을 나타내었으며 잔류 농약 59종의 검사 결과 모두 검출되지 않은 결과를 나타내었다. 이는 비타민나무 잎이 식품 소재로서 안전성이 검증되었다.

#### 1.3 비타민나무 잎 추출물의 지표성분 분석

비타민나무 잎의 지표성분 탐색의 일환으로 추출물로부터 지표성분인 quercetin, kaempferol, isorhamnetin을 HPLC 분석법을 이용하여 지표성분 성분을 탐색한 결과 quercetin(5.237 mg/g), kaempferol(2.725 mg/g), isorhamnetin(5.395 mg/g) 이 각각 정량된 결과를 보였다. 또한 용매 분획을 통하여 활성 분획을 찾은 결과 에틸아세테이트 층에서 quercetin(6.319 mg/g)과 isorhamnetin(4.225 mg/g), kaempferol(5.935 mg/g)이 정량됨을 확인 할 수 있었다.

### 2. 비타민나무 잎 시제품 개발을 위한 제형 연구

#### 2.1 비타민나무 잎 추출분말을 이용한 건강기능식품 제형 개발

여러 제형의 적합성을 연구해본 결과 경질캡슐, 역상, 연질캡슐의 경우 건강기능식품 제조 시 지표성분 함량이 배합비 대비 회수율의 손상이 높아 각각의 제형으로 제조하였을 때 제품 품질상 문제가 없을 것으로 나타났으며 다만 정제 제형의 경우 지표성분 함량의 회수율은 문제가 없으나 봉해 지연현상으로 인해 텍스트린을 혼합하여 흡습, 점도 등을 개선해야 한다는 결과를 확인 할 수 있었다.

#### 2.2 임상시험용 시제품 개발

임상시험용 시제품은 제형 검토 결과 비타민나무잎 열수추출분말의 경우 경질캡슐, 연질캡슐, 액상, 정 등의 제형에 모두 적합한 것으로 나타나 4개의 제형 중 경질캡슐로 제조하였으며, GMP 시설을 갖춘 전문 제조업체인 (주)뉴트리바이오텍에서 제조하여 임상용 시제품 개발을 진행하였다.

### 3. 비타민나무 잎 시제품 개발을 위한 유통기한 설정

비타민나무 잎 시제품의 유통기간 설정 실험 결과 6개월의 저장기간 동안 성상은 변하지 않았으며 미생물(대장균)은 모두 음성의 결과를 나타냈으며 저장기간동안 줄어든 지표성분(quercetin, kaempferol, isorhamnetin 합)의 함량을 바탕으로 제품의 유통기간을 산출한 결과 최소 2년 이상의 유통기간을 설정 할 수 있었다.

### 4. 비타민나무의 시제품 개발 및 상품화

비타민나무 추출분말을 활용한 제품은 중국 수출용 상품으로 기획되었으며, 제품명은 “活力旺”으로 피로회복(육체적 스트레스 해소) 및 간기능 개선 컨셉의 제품으로 (주)뉴트리바이오텍 수출 브랜드인 “H-Tree” 라인으로 런칭하였다.

### 5. 비타민나무의 정신적 항피로 기능성 및 활성기전 규명

#### 5.1. 비타민나무 부위 별 지역별 활성 비교실험을 통한 최종시료 선정

총 4가지의 in vitro screening 실험 결과 시료들은 glucocorticoid에 대한 보호효과와 NMDA 수용체 매개 Ca<sup>2+</sup> 유입에 대한 억제효과와 5-HT<sub>6</sub> 수용체에 대한 억제효과를 보였으며, 그 중에서도 강원, 경기지역 비타민나무잎 열수추출물이 가장 유의적으로 높은 활성을 보임으로 본 사업의 건강기능식품 소재로서 최종 선정하였다.

#### 5.2. 비타민나무잎 열수추출물 안전성평가

비타민나무잎 열수추출물의 단회투여 및 14일 반복투여 독성평가 결과, 사망률 및 일반 증상, 체중변화, 변 상태 변화, 조직의 외관 상태와 무게변화, 혈청 AST 및 ALT 의 변화에 있어 유의적 변화를 확인할 수 없었다.

#### 5.3. in vivo 비타민나무 열수 추출물의 정신적 피로활성 평가

in vivo 실험으로서 전기쇼크를 통해 실험동물에 극심한 스트레스를 줌으로 정신적 스트레스에 대한 시료의 효과를 탐색한 결과, 혈청과 뇌(해마) 부위에서의 평가 지표로서, 스트레스에 의해 증가한 corticosterone 수치와 감소한 5-HT의 수준, 증가한 dopamine 및 norepinephrine 수준 비타민나무잎 열수추출물을 투여함으로써 회복됨을 확인하였다.

#### 5.4. 비타민나무 열수 추출물의 생리활성 후보물질 탐색

LC-MS-MS를 활용하여 비타민나무잎 열수추출물에서 생리활성 단일 후보물질들(chrysin, isorhamnetin, quercetin, kaempferol, myricetin, protocatechuic acid, p-hydroxybenzoic acid, vanillic acid, salicylic acid, p-coumaric acid, cinnamic acid, caffeic acid)을 규명하였으며, 스크리닝을 통한 최종 후보물질들(항정신적 스트레스: kaempferol, 항육체적 스트레스: isorhamnetin)의 비타민나무잎 열수추출물에서의 HPLC를 이용한 정량적 분석을 완료하였다.

#### 5.5. 비타민나무 정신적 항피로 생리활성 물질 및 활성기작 규명

LC-MSMS 분석을 통해 규명한 생리활성 후보물질들(chrysin, isorhamnetin, quercetin, kaempferol, myricetin, protocatechuic acid, p-hydroxybenzoic acid, vanillic acid, salicylic acid, p-coumaric acid, cinnamic acid, caffeic acid)을 대상으로 in vitro screening tool들(corticosterone 보호효과 screening 모델, 5-HT<sub>6</sub> 매개 cAMP 활성 screening 모델, NMDA 매개 Ca<sup>2+</sup> 유입 억제능 활성 screening 모델)을 활용하여 최종 생리활성 후보물질로서 isorhamnetin을 선정하였다. kaempferol을 이용하여 in vivo 실험을 통해 활성기작을 규명하고자 하였으며, 사용 모델로서 전기쇼크를 통해 실험동물에 극심한 스트레스를 줌으로 정신적 스트레스에 대한 시료의 효과를 탐색 하였다. 우울증 상태의 행

동양상이 회복되었으며 혈청과 뇌(해마) 부위에서의 평가 지표로서, corticosterone 수치와 5-HT의 수준 변화, dopamine 및 norepinephrine 수준이 회복되는 것을 확인하였다.

## 6. 비타민나무의 육체적 항피로 기능성 및 활성기전 규명

### 6.1. in vivo 비타민나무잎 열수 추출물의 육체적 피로활성 평가

비타민나무잎 열수추출물의 in vivo assay로서 유속 pool을 활용한 육체적 피로와 관련된 biomarker들을 측정된 결과, 수영시간이 유의적으로 증가하였으며, Lactate level이 음성대조군과 비교하여 감소하였다. 또한 간과 근육내의 glycogen content가 증가하였고, 감소한 LDH 활성이 다시 회복되었으며, 혈청 내 증가하였던 BUN의 수준이 유의적으로 감소하였다.

### 6.2. 비타민나무 육체적 항피로 생리활성 물질 및 활성기작 규명

LC-MS/MS 분석을 통해 규명한 생리활성 후보물질들 (chrysin, isorhamnetin, quercetin, kaempferol, myricetin, protocatechuic acid, p-hydroxybenzoic acid, vanillic acid, salicylic acid, p-coumaric acid, cinnamic acid, caffeic acid)을 이용하여 in vitro screening tool들 (L6 근육세포에서의 과산화수소에 대한 보호효과 모델과 세포내 ROS 소거능 평가 모델)을 활용하여 최종 생리활성 후보물질을 screening 한 결과, isorhamnetin이 가장 유의적으로 높은 활성을 보여 최종 후보물질로 선정되었다. isorhamnetin을 이용하여 in vivo 수준에서의 활성기작 규명을 위해, 유속 pool을 활용한 육체적 피로와 관련된 biomarker들을 측정된 결과, 수영시간이 유의적으로 증가하였으며, Lactate level이 음성대조군과 비교하여 감소하였다. 또한 간과 근육내의 glycogen content가 증가하였고, 감소한 LDH 활성이 다시 회복되었으며, 혈청내 증가하였던 BUN의 수준이 유의적으로 감소하였다. 또한 극심한 육체적 피로에 의해 감소하였던 신체내 항산화 효소들 (SOD, CAT, GPX, GR)의 활성과 항산화단백질인 환원형 글루타치온의 함량이 isorhamnetin의 투여로 인해 유의적으로 증가하였다.

## VI. 연구성과 및 성과활용 계획

본 연구를 통해 비타민나무 잎 열수 추출물의 정신적 육체적 스트레스 완화에 대한 기능성을 확인하였으며, 정식적 스트레스 완화 및 육체적 피로회복 개선에 대한 특허출원 및 논문 투고를 하여 본 소재의 기능성 자료를 확보하였다. 따라서, 본 결과를 바탕으로 추가 인체적용시험을 실시하여 건강기능식품 기능성원료인정(개별인정형 원료)을 받을 수 있는 근거자료가 확보되어 추가연구 진행이 가능할 것으로 판단된다.

또한 본 연구를 통해 주관기관인 (주)뉴트리플랜에서 직접 제품화를 할 수 있게 되어, 중국 수출용 제품을 생산하여 제주 국제보세전시장에 런칭하였으며, (주)뉴트리바이오텍 수출상품인 "H-Tree" 라인에 피로회복 및 간기능개선 제품으로 런칭하여 수출판로를 확대하였다. 또한 중국 현지 면세점 및 보세점에 입점할 예정이어서 판매가 증대할 것으로 예상된다. 따라서, 본 연구를 통하여 국내 비타민나무 생산 농가의 소득 증대 및 수출 증가에 기여할 것으로 사료된다.

## SUMMARY

This research tried to present the possibility of development on domestic agricultural products as a material of health functional food indicating. Through mental care functional material exploration, scientific validation and identification mechanisms, clinical trials, product standardization and processing technology research and development, we should proposed that Physical / mental health care total functional food market exemplary success stories. We have confirmed that flavonoid glycosides an indicator substance in *Hippophae rhamnoides* L. leaf extract.

We confirmed that the aqueous extract (HRW) and various compounds from HR confer protective effects against CORT-induced impairments in SH-SY5Y cells and antagonistic effects on NMDA receptors and the 5-HT<sub>6</sub> receptor by using primary cultured rat hippocampal neurons and a stable 5-HT<sub>6</sub> receptor-expressing cell line, respectively. In addition, we confirmed the anti-stress effects of HRW and kaempherol in an electric foot shock stress model in mice and explored the underlying mechanisms of its action. We observed that HRW treatment significantly reversed the reduction in immobility times and increased climbing times in the forced swimming tests (FST) that were induced by electric foot shocks in the stress model. The levels of CORT, dopamine (DP) and norepinephrine (NE) were increased and the level of serotonin (5-HT) in the hippocampus was decreased in the electric foot shock stress model. The standardized HRW and kaempherol effectively restored abnormal CORT and monoamine levels in the hippocampus that were induced by stress. The results of the present study demonstrate that the standardized HRW produces novel multi-functional anti-stress effects.

To screen the most potential compound for protectant against muscular ROS among various flavonoids confirmed in HRW using LC analytical system, we used *in vitro* cell model. When compared to cells treated with 150  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> alone, cell viability and intracellular ROS were the most recovered in the cells pretreated with isorhamnetin (IR) prior to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment. Thus, isorhamnetin was selected as the target material for the present experiments. To evaluate the endurance exercise capacity of mice, we carried out forced swimming test using adjustable-current water pool. Administration of HRW and IR improved exercise capacity and reduced lactic acid level elevated by intense exercise. Furthermore, HRW and IR-administered groups showed sparing effects of muscular and liver glycogen contents and blood glucose levels. When evaluating the indicators of fatigue status, the lactic dehydrogenase (LDH) activities and blood urea nitrogen (BUN) contents increased by exhaustive swimming were significantly reduced in HRW and IR-treated groups compared with the control group. There were not significant differences in creatine kinase (CK) level of extract treated groups compared with those of control group. Also, the administration of IR significantly protected the depletion of enzymatic-antioxidants and glutathione levels by exhaustive exercise. These results

suggest that HRW and IR have an improvement effect on endurance exercise capacity, which is attributed to its ability to ameliorate oxidative stress by improving antioxidant and to recover glucose metabolism efficiency.

CONTENTS  
(영 문 목 차)

Chapter I. Introduction .....	12
Chapter II. Research and development status in domestic and abroad .....	18
Chapter III. Research contents and results .....	21
Chapter IV. Achievement and contribution .....	301
Chapter V. Plans for the use of the results .....	305
Chapter VI. International trend and scientific information .....	325
Chapter VII. Equipment .....	329
Chapter VIII. References .....	329

## 목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요 및 성과 목표 .....	12
제 2 장 국내외 기술개발 현황 .....	18
제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과 .....	21
제 1 절 비타민나무 잎 원료의 가공공정 확립과 표준화 .....	21
제 2 절 비타민나무 잎 추출분말을 활용한 제품 개발 .....	56
제 3 절 비타민나무 잎 시제품 개발을 위한 유통기한 설정 .....	71
제 4 절 비타민나무 추출물의 효능 연구 .....	81
제 5 절 비타민나무 추출물의 안전성 연구 .....	107
제 6 절 비타민나무 정신적 향피로 기능성 및 활성기전 규명 .....	186
제 7 절 비타민나무 육체적 향피로 기능성 및 활성기전 규명 .....	266
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	301
제 1 절 연구목표의 달성도 .....	301
제 2 절 관련분야의 기여도 .....	304
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획 .....	305
제 1 절 실용화 및 상업화 계획 .....	305
제 2 절 연구개발 성과 .....	317
제 3 절 추가연구, 타연구에 활용 계획 .....	324
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	325
제 1 절 비타민나무 효능·효과와 관련된 국제학술논문 자료 .....	325
제 2 절 비타민나무 주요 성분과 관련된 국제학술논문 자료 .....	328
제 7 장 연구시설·장비 현황 .....	329
제 8 장 참고문헌 .....	329

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 1. 21세기 현대사회인에게 가장 필요한 “멘탈케어”

- 치열한 경쟁 사회에서 대부분의 현대인은 그 어떤 시대보다 육체적/정신적 스트레스에 노출되어있고, 이러한 스트레스가 만병의 근원임은 널리 알려진 사실
- 어린이들 가운데서도 스트레스로 인한 우울증이나 공격성이 늘어나고 있음
- 육체적/정신적 스트레스를 극복하면서도 경쟁 사회에서 인정받기 위해 육체적 노동력 강화, 학업 및 업무의 집중력 강화, 기억력 증진 또한 절대적으로 필요로 함
- 현대사회에서 학업, 일과 인간관계에서 발생하는 육체적/정신적 스트레스, 미래에 대한 막연한 불안 및 고민을 생각하면 현대인들에게 가장 부족한 것은 마음의 건강임. 이러한 현상은 지금까지 편리성 향상을 위해 발전해온 상품에 「육체와 정신을 만족시킨다」는 새로운 기능 첨가를 요구하고 있음
- 육체적/정신적 편안함과 안심을 추구하는 소비자들의 경향이 더욱 심화되어 더더욱 ‘항스트레스’로 치중되는 경향이 점점 커져 해를 거듭하면서 정신 건강에 중요성을 두는 마인드가 형성되었음



- 삶의 질 향상과 의학의 비약적인 발전을 통해 세계적으로 노령화가 급속도로 진행되어 가고 있음에 따라 육체적인 건강관리(헬스케어)는 기능성식품의 도움으로 유지가 잘되고 있으나, 신경계 및 정신적인 건강관리(멘탈케어)를 유지하기 위한 기능성식품은 매우 열악한 상황임



[그림1. 건강 관련 시장에서의 소비자 요구도 변화]

- 멘탈케어 범위 : 항 피로, 항스트레스, 기억력 개선, 집중력 증가, 치매 등 육체적/정신적 스트레스 억제 및 개선

## 2. 차세대 건강기능식품 시장의 주요 테마

- 세계적으로 식품업계에서 멘탈 케어(mental care) 소재에 관심이 커지고 있고, 육체적/정신적 스트레스 개선, 업무능력 향상, 수면 보조(개선), 다이어트 시 불안감, 초조감의 억제, 기억력 향상, 집중력 향상 등 육체적/정신적 개선 작용을 통하여 효과가 기대되는 기능성식품개발을 위해 많은 투자가 시작되고 있음
- 차세대 건강기능식품 시장의 주요 테마는 무엇일까? 건강·기능식품 전문가들은 한결 같이 '90 ~ '00년대가 '콜레스테롤 개선보호 식품' 시대였다면 '10년부터는 '토탈 스트레스 개선 기능성 식품'이라고 입을 모으고 있음
- 국내 건강기능식품 관련 업계에서도 육체적/정신적 항스트레스 기능성식품 시장이 차세대 건강·기능식품 시장의 주요 이슈로 자리 매김 할 것이라는 의견이며 최근 현대인들은 과중한 업무와 학업이 계속되며 육체적/정신적 스트레스로 인한 관련 기능성식품에 대한 마케팅 전략에 적극 나서야 할 것으로 관측
- 일본 기능성 식품 시장은 계속 커져 2010년엔 7조엔이 넘는 시장을 형성하였고 이같이 급성장하고 있는 일본 기능성 식품 시장에서 올해 가장 주목받고 있는 것 중 하나는 긴장 완화, 육체적 스트레스 억제 효과가 있는 소재개발임
- 지난해 일본 기능성식품 시장에서 가장 주목받은 항스트레스 소재는 ‘유자 씨 엑스’, ‘산테아닌’, ‘고추냉이 솔피닐’, ‘감마아미노낙산(GABA)’임
- 에자키 그룹이 발매한 ‘멘탈 밸런스 초콜릿 GABA’(캔 제품 GABA 420mg 배합·파우치 제품 GABA 140mg 배합)가 히트 치는 등 GABA를 사용한 상품들이 개발됨
- ‘멘탈 밸런스 초콜릿 GABA’는 “스트레스 사회에서 분투하고 있는 당신에게”란 표어로도 알 수 있듯이 항스트레스·긴장이완 효과를 내세워 대 히트 성공
- 최근들어 국내에서도 심신 피로에 대한 건강기능식품이 개발되고 출시되는등 산업계 및 소비자들의 관심이 극대화 되고 있다. 올해 동구제약에서 ‘피로닥터 더블’이라는 제품을 출시하면서 육체적/정신적 스트레스를 겨냥한 심신 스트레스 케어제품이다.
- JT(일본 담배회사)에서도 기능성 음료인 ‘GABA 쿨 워터’(병당 GABA 50mg 배합)를 개발, “머릿속을 안정시킨다(cool down)”는 것을 내세워 시장에서 대 히트
- 우리나라에서는 CJ에서 대두 포스파티딜세린(PS)을 함유한 인지능력개선 개별인정형 건강기능식품과 KT&G에서 홍삼을 함유한 기억력 증강 기능성식품이 판매중임

					
Ezaki Glico사	Ezaki Glico사	JT	Jones Soda	CJ(국내)	동구제약(국내)
항스트레스	항스트레스	정신안정	항스트레스	인지능력개선	육체/정신 피로개선

### 3. 멘탈케어 기능성식품소재 개발을 위한 우리나라 현황과 해결책

#### 가. 멘탈케어 기능성식품 수요(소비자) 대비 개발을 위한 연구(학계, 기업)추진 부재



○ 소비자는 피로회복 및 정신적 피로회복 등 멘탈케어가 가능한 기능성식품 개발에 대한 요구도는 70%가 넘는 수준으로 강하게 요구를 하고 있으나, 학계 및 기업에서는 이에 관련된 소재 및 제품화 연구는 거의 전무한 것이 현실임

#### 나. 멘탈케어 효능 규명을 위한 전문적 기술 보유 연구기관, 장비의 부족으로 인한 개발어려움

○ 육체피로 개선, 기억력 증강, 집중력 개선, 스트레스 예방 및 완화 효과에 대한 기능성 연구는 전문적인 동물행동학적 시험장비, 시험 기술, 전문 인력이 필요한 분야로서, 현재 대부분의 과학자는 기초원천기술개발 분야에서의 연구개발에 치우쳐져 있어, 육체적/정신적 스트레스 분야 전문가가 건강기능식품 소재 개발 및 기능성 규명 연구에 차지하는 비율은 매우 낮음

#### 다. 소재 탐색과 선정에 많은 비용, 인력 및 시간 소요

○ 국내에는 기능성소재로 개발이 가능한 자원은 세계적으로 우수한 자원을 보유한 국가이지만 이를 신속하고 정확하게 탐색하는 기술 및 장비가 대부분 의약품 개발에 집중되어 있음

○ 특히 건강기능성소재를 탐색하기 위한 HTS 시스템과 기술력을 보유하고 있는 국내 연구 기관은 국내 오직 한 기관만이 전문적으로 기능성식품 소재를 고속으로 탐색하고 있음

#### 라. 육체적/정신적 스트레스 관련 건강기능식품 국내 시장 성공 제품화 사례 부재 및 마케팅 전략 부족

멘탈케어 범위	고시형	개별인정형 식품	인정 건수	제품
기억력, 집중력 인지능력 개선	없음	홍삼, 포스파티딜세린, 은행잎, 녹차 테아닌 복합추출물 누에고치 피브로인 추출물	5건	
항스트레스 (긴장완화)	없음	유단백가수분해물, L-테아닌	2건	없음
피로개선	발효생 성아미 노산복 합물, 홍경천 추출물	인삼, 홍삼, 매실추출물	5건	

#### 4. 성공적 멘탈케어 기능성식품소재 개발을 위한 문제 해결책 및 전략

##### 가. 멘탈케어 기능성식품 개발 의지가 강한 산·학·연 발굴 및 연계 협력체계 지원

- 연구기관(학·연)은 산업화를 위한 연구를 지향하고, 멘탈케어 소재 발굴 및 기능성 규명 시스템이 확보된 연구기관과 제품화 의지가 있는 기업은 상호 정보 공개 및 공유를 통해 산·학·연 협동 연계 연구개발 체계를 구축하여 정부의 지원을 유도하여야 함
- 연구기관(학·연)은 산업화를 위한 연구를 지향하고, 멘탈케어 소재 발굴 및 기능성 규명 시스템이 확보된 연구기관과 제품화 의지가 있는 기업은 상호 정보 공개 및 공유를 통해 산·학·연 협동 연계 연구개발 체계를 구축하여 정부의 지원을 유도하여야 함

##### 나. 멘탈케어 효능 규명을 위한 전문적 기술 보유 연구기관, 인력 풀 확보 및 양성

- 뇌과학 기초학문분야 및 원천기술개발분야 종사자, 멘탈케어 기능성식품 전문연구 기관 및 종사자 DB를 확보하여 지속적인 지원과 성과유도를 통해 멘탈케어 기능성식품 개발 분야의 학문적, 기술적, 산업적 발전을 유도하여야 함

##### 다. 전문적 기능성식품 소재 고속 탐색 연구기관 적극 활용

- 기능성 소재의 고속생리활성검색 시스템이 확보된 공공연구기관(예; 천연자원연구원)을 적극 활용하여 국내 우수한 자원의 기능성 검색을 통한 신속한 기능성 제품화 유도, 자원 확보, 농어촌 특화 작물 양성 등 기대효과

##### 라. 정신건강 관련 건강기능식품 국내 시장 성공 제품화를 위한 소재 선정 및 제품화

- 스마트 소비자를 만족할 수 있는 제품을 통한 성공사례를 이끌어 내는데 가장 필요한 것은 소재 탐색, 과학적 검증 및 신뢰도, 고품질 제품, 공격적 마케팅 어느 하나 중요하지 않는 것이 없지만 기능성 식품분야에서는 소재선정과 마케팅(디자인 포함) 부분이

**가장 중요함**

- 소재선정과 마케팅은 서로 상호보완적임. 즉 선정된 소재에 대한 스토리텔링과 같은 마케팅 전략이 수립되고 디자인이 완성되어 상품의 고부가가치가 증가됨
- 따라서 소재선정은 그 시대의 소비자의 심리, 사회적 이슈, 소비자의 인지도 등 사회의 전을 반영한 소재가 선정되어, 과학적 신뢰도를 더하여 개발되어야 함
- 따라서 본 과제에는 이러한 관점에서 현재 천연비타민 열풍에 대응하여 신규 개발 자원으로써 비타민나무(갈매보리수나무)의 열매와 잎을 대상으로 소재를 탐색하여 멘탈케어 기능성 소재의 탐색, 과학적 기전 검증 및 규명, 임상시험, 제품 표준화 및 가공기술개발 연구를 통해 육체적/정신적건강 토탈케어 기능성 식품 시장의 모범적인 성공사례를 제시하고자 함

**5. 연구개발 대상 자원의 개요 및 소재 선정 이유**

**가. 자원의 개요**

<p><b>비타민 나무</b></p> 	<p><b>원재료명</b> : 갈매보리수나무</p> <p><b>학명</b> : <i>Hippophae rhamnoides</i> L.</p> <p><b>이명</b> : Sea buckthorn, 비타민나무</p> <p><b>주요성분</b> : tannin, 비타민 C, 비타민 E, 카로틴, 티아민, 리보플라빈 등</p> <p><b>주요 산지</b> : 강원도 및 경기도, 전남 남해안 등</p> <p><b>식용가능 여부</b> : 열매/잎/씨 가능(식약청 식품원재료 데이터 검색 시 식품 가능 소재)</p>
---	--

**나. 연국 현황(국제학술연구논문)**

총 연구논문수	391편 국제연구논문 발표
최초 발표논문	1948년 러시아에서 연구논문 발표 (2편)
1950년대	6편 (모두 러시아에서 연구발표)
1960년대	9편
1970년대	15편
1980년대	19편
1990년대	37편
2000년대	229편 전세계적으로 연구열풍
2010년대	60편 지속적 연구결과 발표

다. 관련 제품 현황



- 따라서 본 과제에는 식용 가능한 비타민나무의 열매와 잎을 활용하고, 또한 다양한 기능성 연구를 통해 여러 기능성을 갖고 있는 비타민나무 소재를 활용하여 육체적/정신적 스트레스 해소를 위한 멘탈케어 건강기능식품 소재를 개발하고자 함

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 1. 국내·외 개발기술동향

#### 가. 국내

- 2013년 건강기능식품 기능성원료 인정 현황을 분석한 결과, 기능성 인정 건수가 전반적으로 줄어드는 추세 속에서 국내 제조 원료의 인정은 급증한 반면 수입 원료의 인정은 감소하였음
- 지난해 국내 제조원료의 기능성 인정은 '12년(10건)에 비해 1.2배(22건) 증가하였으나 수입 원료는 같은 기간 28건에서 15건으로 감소하였음
- 이는 국내 건강기능식품 제조업체들이 국내 천연생물자원을 활용한 다양한 기능성 원료 개발에 집중하는 반면 수입 소재의 신규 발굴은 주춤한데 따른 것으로 분석됨
  - ※ 개별인정 현황 : '09년(97건)→'10년(68건)→'11년(42건)→'12년 (38건)→'13년(37건)
  - ※ 국내 제조원료 인정 비율 : ('09)25%→('10)27%→('11)29% →('12)26% →('13)59%
- 현재까지 홍삼제품(한국인삼공사)이 건강기능식품의 40%를 차지하고 있으나 2011년 이후 지속적으로 감소하고 있음
- 기능성별로는 면역기능 개선 관련 제품의 점유율이 25%로 가장 높았고, 혈행개선(22%), 항산화(21%), 영양소 보충(7%), 장 건강 (5%) 제품 순임
- 본 사업을 통하여 개발되는 최종제품은 개별인정형 건강기능식품으로서 연구 완료 후 단독 제품으로 산업화 가능하며 국내산 농산물을 이용하여 산업화함으로써 국내산 농산물을 이용한 연구에 선도 모델로 제시 될 수 있음
- 또한, 원료로 사용된 농산물 기능이 확인됨으로서 단순 가공하여 식품으로 생산된 제품들의 위상이 제고 될 것으로 예상됨

#### 나. 국외

- 고령화 사회에 접어들며, 만성질환이 증가하고 삶의 질 향상에 대한 욕구가 높아지면서 건강에 대한 관심이 더욱 고조되고 있음, 이러한 여파로 건강관련 산업은 지속적으로 성장세를 보이고 있으며, 2010년 세계 건강식품 시장(Global Health Food Industry) 규모는 약 301,386백만 달러로 조사되었음(2013년 건강기능식품 시장 현황 및 소비자실태 조사, 한국건강기능식품 협회)
- 세계 건강식품 시장은 2009년 성장률이 3.8%로 감소하는 현상을 보였으나, 2010년 전년대비 연평균 6% 성장률을 보이며 꾸준한 성장세를 이어갈 것으로 보임, 향후 세계 건강식품시장은 평균 7.2%의 성장률로 2015년에는 426,098백만 달러로 성장할 것으로 전망됨
- 세계 건강식품 시장(Global Health Food Industry)의 품목은 Supplements, Natural/Organic Food, N&OPC & Household Products, Functional Food 4가지로 분류되며, 2010년 품목별 세계 건강식품 시장현황은 Functional Food 101,836백만 달러 (33.8%)로 가장 높았고, Supplements 84,500백만 달러(28%), Natural/Organic Food 84,064백만 달러(27.9%), N&OPC & Household Products 30,985백만 달러(10.3%) 순임

## 2. 국내외 경쟁·대체기술 동향

### 가. 국내

- 국내 2013년 건강기능식품 생산실적을 분석한 결과, 총 생산액은 1조 4,820억 원으로 '12년(1조 4,091억 원)에 비해 5% 증가로 나타났다
- 지난해 성장은 새로운 기능성 원료를 사용한 '개별인정형' 제품(전년대비 29% 증가)과 프로바이오틱스 제품(전년대비 55% 증가)이 주도한 것으로 나타났다
  - ※ 개별인정형: 고시된 품목 이외에 안전성, 기능성을 개별로 인정받은 원료로 제조한 건강기능식품(백수오등복합추출물, 당귀혼합추출물 등)
  - ※ 프로바이오틱스: 유산균을 주원료로 사용하여 배변활동에 도움을 주는 기능성을 가진 건강기능식품
- 또한 '13년 국내 건강기능식품 시장규모는 1조 7,920억 원으로 조사되어 '09년 이후 지속적인 성장세를 유지하고 있음
  - ※ 국내 시장규모(억 원): 11,600('09) → 12,804('10) → 16,855('11) → 17,039('12) → 17,920('13)
  - ※ 국내 시장규모: 생산+수입-수출  
수출은 754억 원으로 '12년(584억 원)보다 29% 증가했으며, 수입도 3,854억 원으로 '12년(3,532억 원)보다 9% 증가하였음
- 2013년 건강기능식품 생산은 국내외 경기침체에도 건강에 대한 관심이 높아지면서 새로운 기능성을 찾는 다양한 계층의 소비자 욕구가 반영되어 성장세가 지속되는 것으로 분석되었음
- 2013년 건강기능식품 기능성원료 인정 현황을 분석한 결과, 기능성 인정 건수가 전반적으로 줄어드는 추세 속에서 국내 제조 원료의 인정은 급증한 반면 수입 원료의 인정은 감소한 것으로 나타났다. 개별인정형 건강기능식품의 생산은 2,324억 원으로 '12년 1,807억 원에 비해 29% 증가하였음

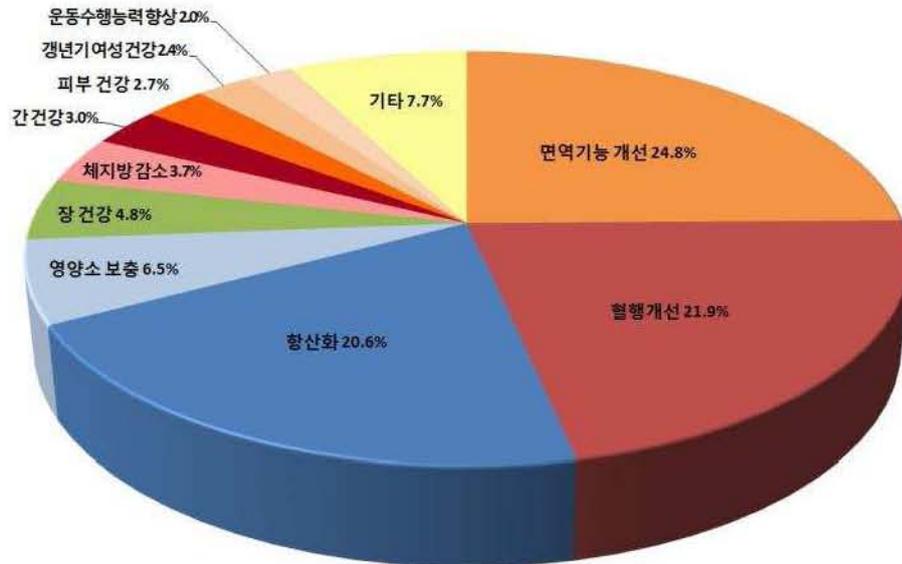
**[연도별 건강기능식품 생산실적]**

('13.12.31.기준, 출처: 식약처)



### [기능성별 건강기능식품 생산실적(점유율)]

(‘13.12.31.기준, 출처: 식약처)



#### 나. 국외

- 세계적으로 식품제조업은 2009년부터 지속적인 흑자 성장을 해왔으며, 2011년의 성장률은 10.8%로 가장 높았음, 2009년부터 2013년까지 연평균 성장률은 6%를 기록하고 있으며, 2013년 2.6% 성장하였으며, 시장가치는 약 4조7,311억 달러로 평가 되고 있음

표 1 세계 식품제조업 시장가치

연도	시장 가치 (달러)	단위: 달러, %
		성장률(%)
2009	3조 7,483억	
2010	4조 230억	7.3
2011	4조 4,566억	10.8
2012	4조 6,109억	3.5
2013	4조 7,311억	2.6
연평균성장률		6.0

자료: MARKETLINE(2014).

## 제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

### 제 1 절. 비타민나무 잎 원료의 가공공정 확립과 표준화

(주관기관 : 뉴트리플랜 강남길)

#### 1. 서론

본 연구는 비타민나무(*Hippophae rhamnoides* L.) 소재를 사용하여 식품업계에서 각광받고 있는 분야인 멘탈케어(mental care) 부분에 접목 시켜 육체적/정신적 스트레스 완화 건강기능성 식품 개발을 꾀 하고자 한다. 비타민나무 잎과 열매의 원산지 별 소재를 확보하고 확보 소재의 추출전 전처리 조건, 추출조건을 확립하며 소재 각각의 지표물질 함량 분석을 하여 최적 가공공정 확립을 토해 비타민나무의 상업화 가능성을 극대화하였다.

#### 2. 방법 및 결과

##### 가. 비타민나무의 국내·외 소재 확보

###### (1) 국내

###### (가) 방법

국내 비타민나무 재배 농가를 대상으로 업체, 지역, 비타민나무 원물 가격 판매 별로 조사함

###### (나) 결과

국내 비타민나무는 블루베리 등과 같은 특용 작목으로 재배 면적이 매년 증가하고 있는 추세에 있으며 비타민나무는 주로 잎과 열매가 상업적으로 이용되고 있으며, 잎은 대부분 차 형태로 판매되고 있으며, 열매는 압착 주스 형태로 판매되고 있다. 비타민나무 잎과 열매의 가격은 잎은 재배 지역마다 차이가 있으나 건조잎의 경우 대략 kg당 30,000원에 판매되고 있으며, 적절한 소비처가 없어 생산량을 조절하고 있다. 열매의 경우 kg당 약 40,000원 선에서 판매되고 있으나 생산량이 미비하여 상업적으로 제품화 하기에는 문제가 있을것으로 판단됨. 올해의 경우 방송국에서 소개가 된 이후 열매의 가격이 kg당 120,000원까지 오르기도 하는 등 안정적인 원료 수급에 문제가 있다.

업체명	지역	가격	비고
강원비타민나무 영농조합법인	강원 춘천, 철원 지역	비타민나무 잎 분말 : 60,000원/500g 비타민나무 열매 : 자사 가공용으로 이용	
화천 비타민나무 영농조합	강원도 화천	비타민나무 잎 분말 : 10,000원/40g 비타민나무 열매 : 66,000원/kg	
연천 비타민나무 농원	경기 연천, 파주 지역	비타민나무 잎 분말 : 40,000원/kg	
대한 비타민 농원	전북 익산	비타민나무 잎 분말 : 30,000원/kg	
참농비타민	전남 장흥	비타민나무 잎 분말 : 30,000원/kg 비타민나무 열매 : 36,000원/kg	

## (2) 국외

### (가) 방법

국외의 비타민나무 주 생산지와 생산량 그리고 국내 수입량 등의 정보를 조사

### (나) 결과

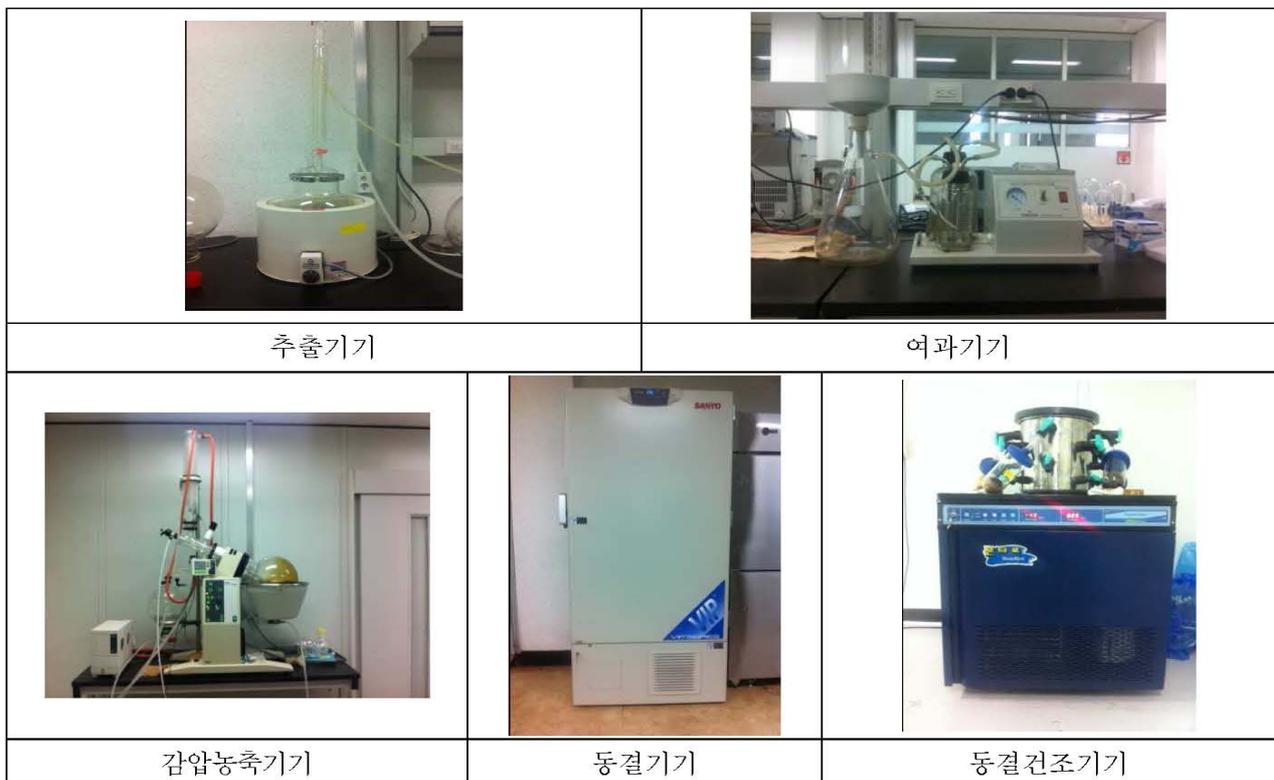
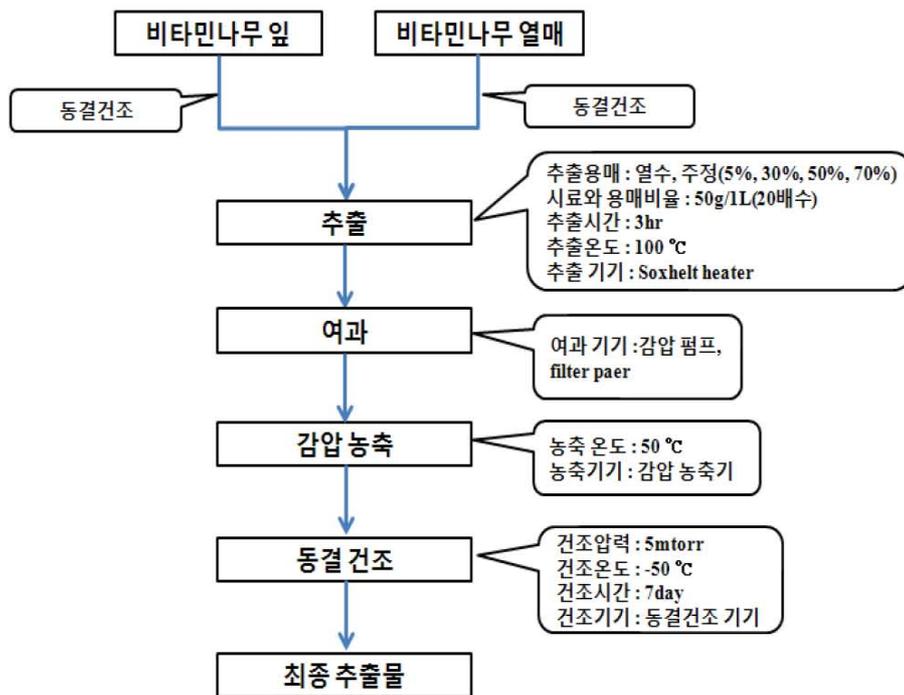
비타민나무 최대 생산지역은 티벳지역과 중국이며, 독일 및 유럽 각지에 넓게 분포되어 주스, 잼, 차, 젤리, 쿠키, 오일 등 다양한 상품으로 이용한다. 중국은 전 세계 비타민나무 재배 면적의 95%를 차지하고 있음. 랴오닝성, 허북성, 산서성, 섬서성, 감숙성, 내몽고 자치구, 영하회족 자치구, 강서성, 티벳 자치구 등 넓은 지역에서 비타민나무 분포한다. 중국의 경우 많은 회사들이 비타민나무의 잎과 열매를 식품 원료화 하여 비타민나무 잎, 열매의 추출분말을 상업적으로 판매하고 있다. 비타민나무 열매 추출물의 경우 flavone 함량이 10~50%의 규격 제품이 보편적으로 판매되고 있으며, 가격은 kg당 10~100\$의 제품이 보편적으로 판매되고 있으며, 잎보다는 주로 열매를 상업적으로 이용하고 있다. 몽고는 중국 다음으로 비타민나무의 주요 산지이며, 몽고 서부의 오투사원 지대와 사막 지대의 표고 1,400~2,000m 부근에 퍼져 있음. 국내 일부 업체의 경우 몽고에서 직접 열매를 구매, 냉동하여 국내에서 소재로 활용되고 있

다.

나. 비타민나무 잎/열매 추출

(1) 방법

동결건조 → 추출 → 여과 → 감압농축 → 동결건조 과정으로 진행하여 최종 추출물을 완성하였다.



(2) 결과

(가) 비타민나무 잎(강원)

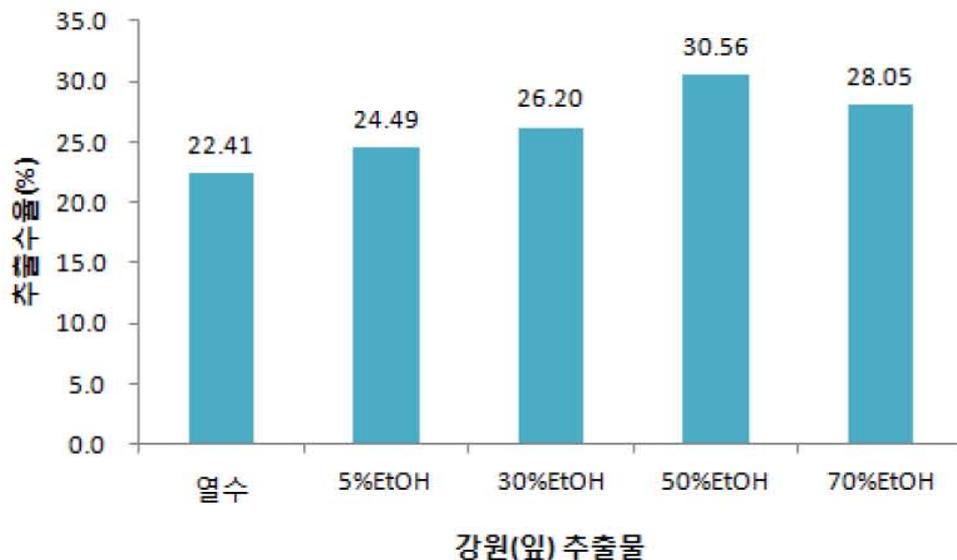
① 추출물 사진

추출물	열수 추출물	5% 주정추출물	30% 주정추출물	50% 주정추출물	70% 주정추출물
추출물 사진					

② 추출 및 농축 조건

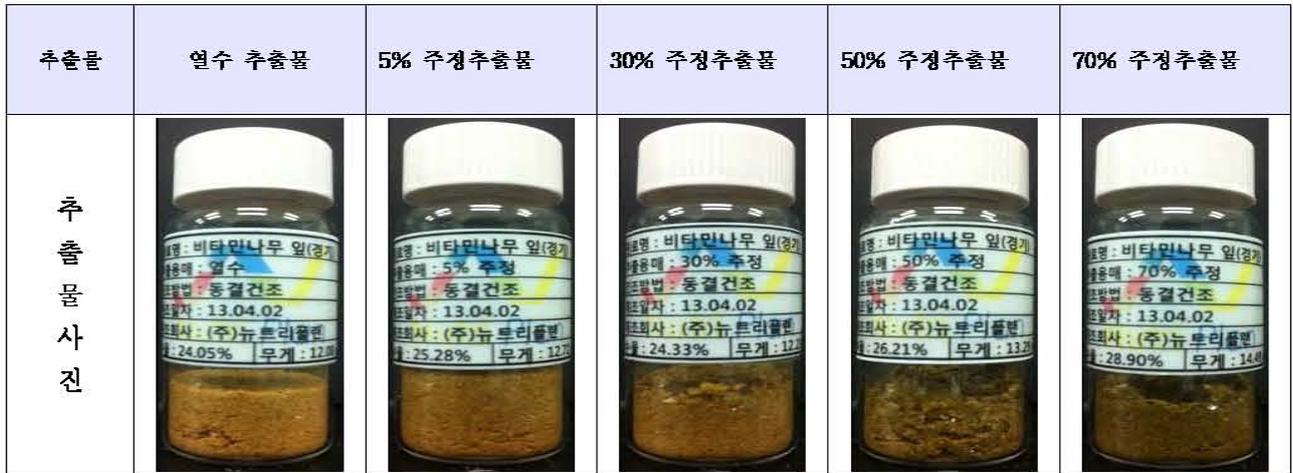
추출물		강원-열수	강원-5%	강원-30%	강원-50%	강원-70%
추출 조건	원물량(g)	50.03 g	50.72 g	50.61 g	50.16 g	50.95 g
	용매종류/량(L)	water/1L	5%EtOH/1L	30%EtOH/1L	50%EtOH/1L	70%EtOH/1L
농축 조건	추출 온도/시간	100℃/3h	100℃/3h	100℃/3h	100℃/3h	100℃/3h
	농축 온도	50℃	50℃	50℃	50℃	50℃
건조량(g)		11.21 g	12.42 g	13.26 g	15.33 g	14.29 g

③ 용매별 추출물 수율



(나) 비타민나무 잎(경기)

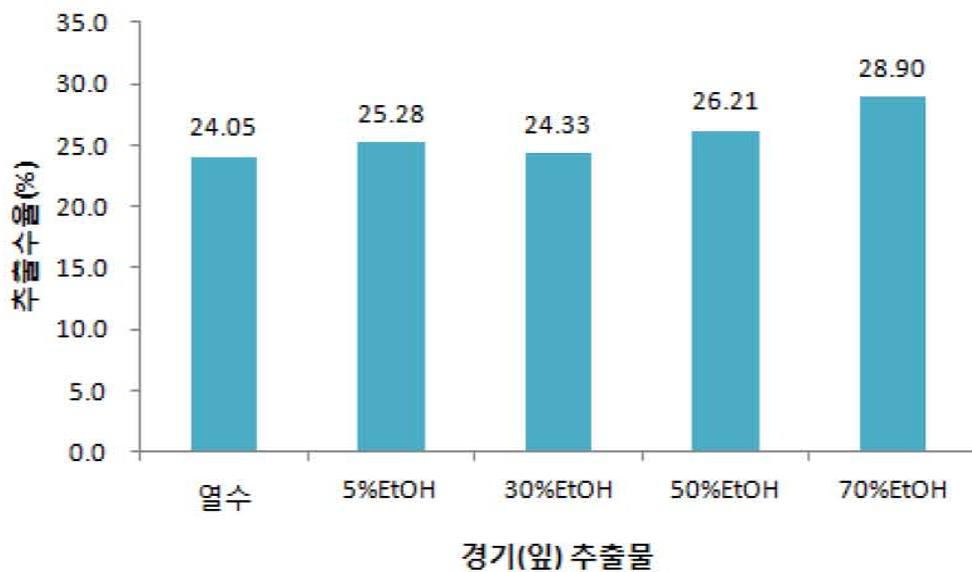
① 추출물 사진



② 추출 및 농축 조건

추출물		경기-열수	경기-5%	경기-30%	경기-50%	경기-70%
조건	원물량(g)	50.22 g	50.32 g	50.27 g	50.71 g	50.13 g
	용매종류/량(L)	water/1L	5%EtOH/1L	30%EtOH/1L	50%EtOH/1L	70%EtOH/1L
농축 조건	추출 온도/시간	100℃/3h	100℃/3h	100℃/3h	100℃/3h	100℃/3h
	농축 온도	50℃	50℃	50℃	50℃	50℃
건조량(g)		12.08 g	12.72 g	12.23 g	13.29 g	14.49 g

③ 용매별 추출물 수율



(다) 비타민나무 잎(장흥)

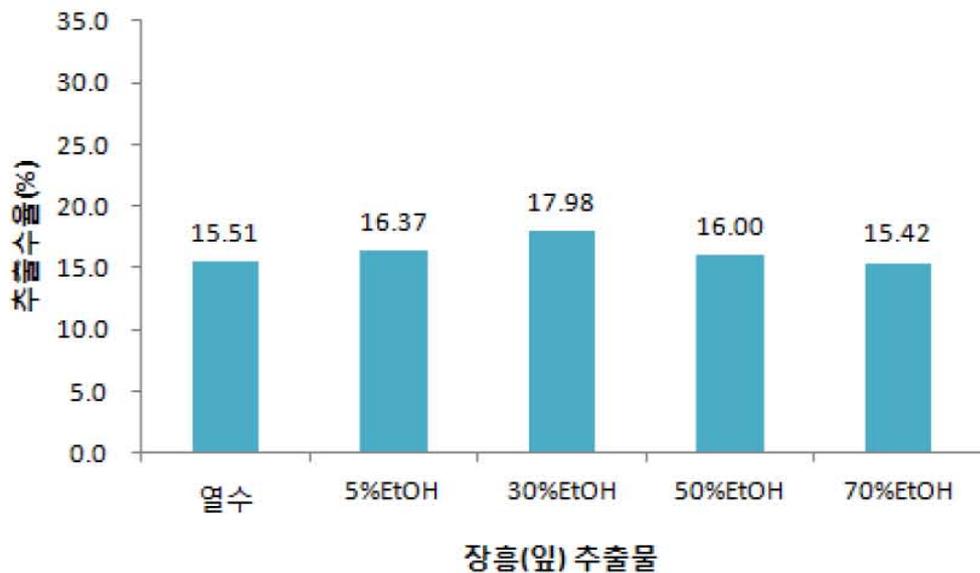
① 추출물 사진

추출물	열수 추출물	5% 주정추출물	30% 주정추출물	50% 주정추출물	70% 주정추출물
추출물 사진					

② 추출 및 농축 조건

추출물		장흥-열수	장흥-5%	장흥-30%	장흥-50%	장흥-70%
조건	원물량(g)	50.81 g	50.1 g	50.9 g	50.01 g	50.44 g
	용매종류/량(L)	water/1L	5%EtOH/1L	30%EtOH/1L	50%EtOH/1L	70%EtOH/1L
농축 조건	추출 온도/시간	100℃/3h	100℃/3h	100℃/3h	100℃/3h	100℃/3h
	농축 온도	50℃	50℃	50℃	50℃	50℃
건조량(g)		7.88 g	8.2 g	9.15 g	8 g	7.78 g

③ 용매별 추출물 수율



(라) 비타민나무 덩은잎(장홍)

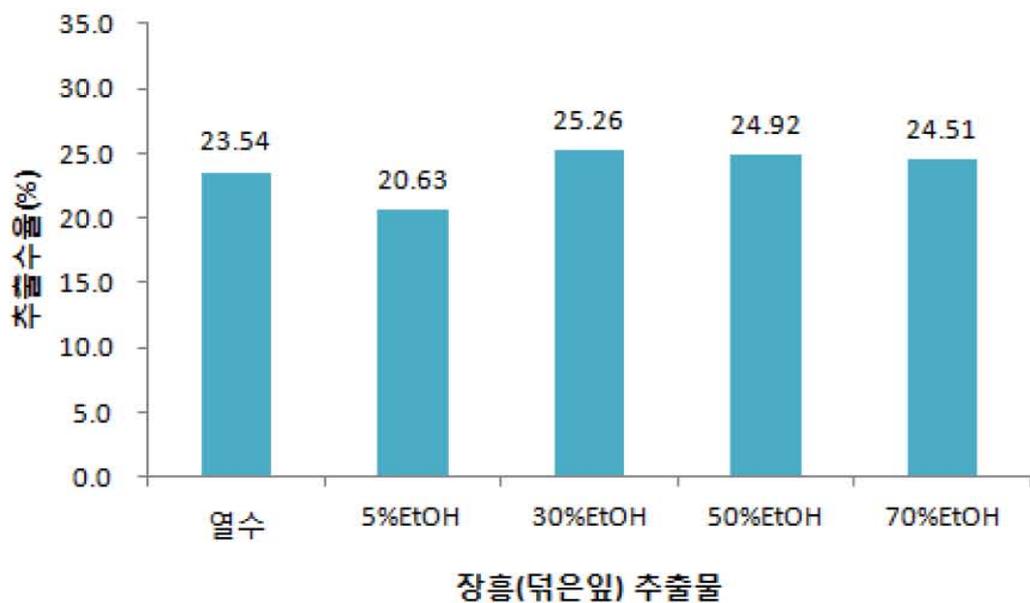
① 추출물 사진



② 추출 및 농축 조건

추출물		장홍(덩은잎)- 열수	장홍(덩은잎)- 5%	장홍(덩은잎)- 30%	장홍(덩은잎)- 50%	장홍(덩은잎)- 70%
조건	원물량(g)	20.05 g	21.81 g	20.55 g	20.59 g	20.51 g
	용매종류/ 용량(L)	water/1L	5%EtOH/1L	30%EtOH/1L	50%EtOH/1L	70%EtOH/1L
농축 조건	추출 온도/시간	100℃/3h	100℃/3h	100℃/3h	100℃/3h	100℃/3h
	농축 온도	50℃	50℃	50℃	50℃	50℃
건조량(g)		4.72 g	4.5 g	5.19 g	5.13 g	4.91 g

③ 용매별 추출물 수율



(마) 비타민나무 잎(중국)

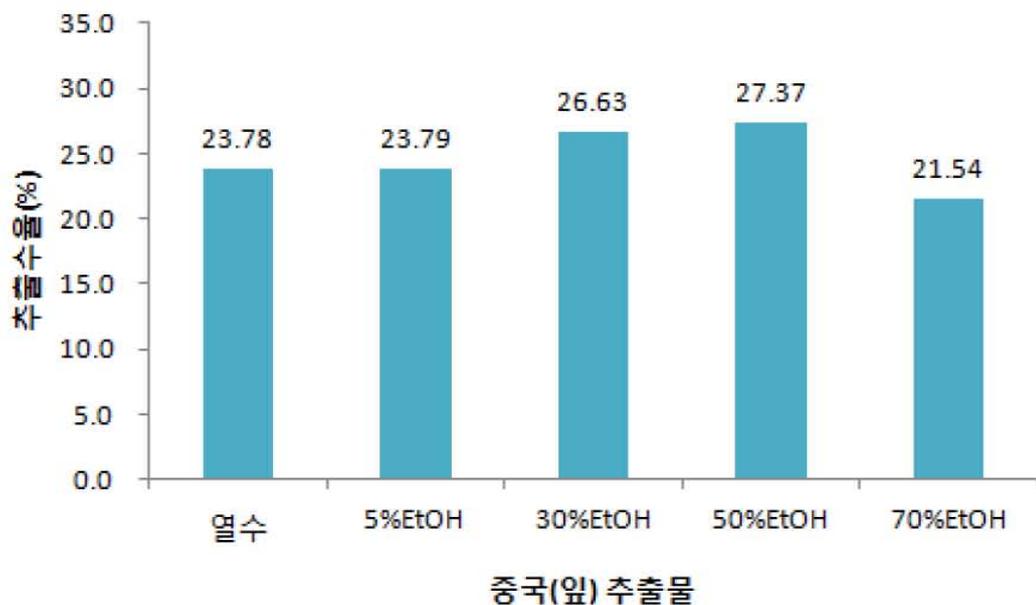
① 추출물 사진



② 추출 및 농축 조건

추출물		중국-열수	중국-5%	중국-30%	중국-50%	중국-70%
추출 조건	원물량(g)	50.41 g	50.82 g	50.43 g	51.05 g	52.22 g
	용매종류/양(L)	water/1L	5%EtOH/1L	30%EtOH/1L	50%EtOH/1L	70%EtOH/1L
농축 조건	추출 온도/시간	100℃/3h	100℃/3h	100℃/3h	100℃/3h	100℃/3h
	농축 온도	50℃	50℃	50℃	50℃	50℃
건조량(g)		11.99 g	12.09 g	13.43 g	13.97 g	11.25 g

③ 용매별 추출물 수율



(바) 비타민나무 열매(장흥)

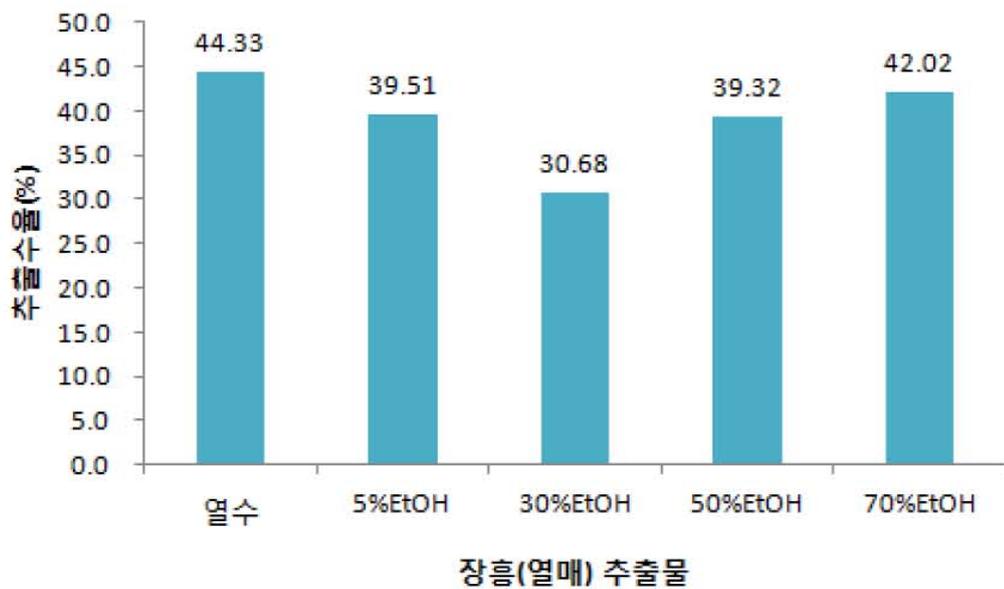
① 추출물 사진



② 추출 및 농축 조건

추출물		장흥(열매) -열수	장흥(열매) -5%	장흥(열매) -30%	장흥(열매) -50%	장흥(열매) -70%
추출 조건	원물량(g)	53.3 g	50.87 g	52.21 g	50.18 g	50.21 g
	용매종류/ 량(L)	water/1L	5%EtOH/1L	30%EtOH/1L	50%EtOH/1L	70%EtOH/1L
농축 조건	추출 온도/시간	100℃/3h	100℃/3h	100℃/3h	100℃/3h	100℃/3h
	농축 온도	50℃	50℃	50℃	50℃	50℃
건조량(g)		23.63 g	20.1 g	16.02 g	19.73 g	21.1 g

③ 용매별 추출물 수율



**다. 비타민나무 잎의 Scale-up 테스트 및 문제점 개선**

**(1) 방법**

Scale-up test는 in vitro 결과 효능이 가장 우수하게 나타난 잎/열수 추출분말 생산 조건을 바탕으로 비타민나무 잎 200~300kg을 한 batch로 생산하였다. 비타민나무 잎 열수추출분말을 생산은 농업회사법인 (주)엘바이오텍(1차년도)에 의뢰하여 동결건조물로 생산하였으며, 동결건조물은 in vitro, in vivo 실험에 사용하였으며, 2차년도에는 상업화를 위하여 (주)MSC에 의뢰하여 분무건조물로 생산하였다. 생산된 비타민나무 잎 분말은 원료 품목제조 보고 후 시제품 생산에 사용하였다.

**(2) 결과**

Scale-up test 결과 동결건조시 수율 약 15%를 보였으며, 분무건조시 19%의 수율(비타민나무 함량 81.1% 환산시 수율 15.4%)을 보였으며, 원료의 흡습, 수율 등을 고려하여 최종 제품은 분무건조로 설정하였다.

분말공정	가공량	생산량	수율
동결건조	200kg	30kg	15%
분무건조*	300kg	57kg	19%

\* 분무건조시 농축액(고형분 30%) 93%, 텍스트린 7% 배합 후 분무건조

비타민나무잎추출분말 품목제조신고서는 다음과 같다.

(별지 제43호서식)

**식품(첨가물) 품목제조보고서**

① 실명	장남길	② 생년월일	1970년 03월 03일
③ 주소	경기도 용인시 기흥구 구교로118번길 7, 107호 403호 (마포동 구일차리3로아파트)		
④ 명칭(상호)	(주)뉴트리플랜		
⑤ 소재지	경기도 파주시 조리읍 능안로 265번길 20 가나 등		
⑥ 식품의 유형	기타가공품	⑦ 형질 신고 번호	2011035373
⑧ 제품명	비타민나무잎추출분말	⑨ 유통기한	24개월
⑩ 원재료명 또는 성분명 및 배합비율	(별첨)		
⑪ 용도 용법	(별첨)		
⑫ 보관방법 및 포장재질	(별첨)		
⑬ 포장방법 및 포장단위	(별첨)		
⑭ 성상	(별첨)		
⑮ 기타	원료생산 (주)엘에스에 영남 황산시 소유피아로 45-73(소주동)		

「식품위생법」 제37조제5항 및 같은 법 시행규칙 제45조제1항에 따라 식품(식품첨가물)품목제조 사항을 보고합니다.

2015년 월 일  
장남길 (서명) (인)

과주사장 귀하

※ 구비사항  
1. 제조방법설명서 1부  
2. 식품위생장기기관이 발급한 식품등의 합성적 기준 및 규격 검토서 1부  
3. 식품의약품안전청장이 정하여 고시한 방법에 따라 설정한 유통기한의 설정사유서 1부

※ 유의사항  
1. 품목제조보고서는 제품생산의 개시 전이나 개시 후 7일 이내에 제출하여야 합니다.  
2. 배합비를 표시는 식품공전 및 식품첨가물공전에 사용기준이 정하여져 있는 원재료 또는 성분에 한한다.

210mm×297mm(일반용지)60g/㎡(제량용종)

**제조방법 설명서**

- 제품명(식품의 유형) : 비타민나무잎추출분말
- 원료 및 성분명
 

원료 및 성분	배합비율(%)	비고
비타민나무잎추출농축액 (고형분30%)	93.0	영남 황산 제14-0-551호
말트덱스트린	7.0	
계	100	
- 제조방법
  - 추출 : 원료대비 10~20배의 정제수를 투입한다.
  - 여과 : 파라이트를 이용하여 기압여과한다.
  - 농축 : 30brix이상 진공 농축한다.
  - 배합 : 배합비대로 덱스트린을 배합한다.
  - 살균 : 90℃에서 30분간 살균한다.
  - 분무건조 : 90~92℃로 분무건조한다.
  - 선별 : 20Mesh로 진동체를 통과시킨다.
  - 포장 : 포장하여 제품을 한다.
- 성상 : 고유색과 향미를 가지며 이비, 이취가 없다.
- 용도 및 용법 : 음료 등 가공식품에 원료로 사용한다.
- 보관방법 및 포장재질 : 실온 보관 / 물리에달린재질의 내포장지에 밀봉후 사각편 또는 드럼에 포장한다.
- 포장방법 및 포장단위 : 밀봉포장  
10KG , 15KG , 18KG , 20KG , 100KG , 200KG 등

## 라. 비타민나무 잎 추출물의 일반성분 및 미량성분 분석

### (1) 방법

#### (가) 일반성분

‘식품공전’에서 ‘제 7 일반시험법’ → ‘1. 일반성분시험법’의 시험법에 준하여 실험을 진행 하였다. (수분, 회분, 질소화합물, 지질, 탄수화물, 열량)

#### (나) 무기질

‘건강기능식품공전’에서 ‘Ⅲ건강기능식품 시험법’ → ‘Ⅲ.3 개별 성분별 시험법’ → ‘Ⅲ.3.2 무기질’의 시험법에 준하여 실험을 진행하였다.

#### (다) 비타민

‘건강기능식품공전’에서 ‘Ⅲ건강기능식품 시험법’ → ‘Ⅲ.3 개별 성분별 시험법’ → ‘Ⅲ.3.1 비타민’의 시험법에 준하여 실험을 진행하였다.

#### (라) 유리아미노산 및 구성아미노산

‘건강기능식품공전’에서 ‘Ⅲ건강기능식품 시험법’ → ‘Ⅲ.3 개별 성분별 시험법’ → ‘Ⅲ.3.3 아미노산 및 단백질류’→‘Ⅲ.3.3.2 아미노산’의 시험법에 준하여 실험을 진행하였다.

#### (마) 페놀류

‘건강기능식품공전’에서 ‘Ⅲ건강기능식품 시험법’ → ‘Ⅲ.3 개별 성분별 시험법’ → ‘Ⅲ.3.6 페놀류’의 시험법에 준하여 실험을 진행하였다.

## (2) 결과

### (가) 일반성분 분석

비타민 나무 잎의 일반성분을 분석하기 위하여 식품공전 시험법을 바탕으로 실험을 시행하였다. 분석 결과 열량은 284.13 Kcal/100g으로 분석되었으며 탄수화물은  $83.00 \pm 5.15\%$ , 조단백질은  $5.31 \pm 0.02\%$ , 조지방은  $4.73 \pm 0.04\%$ , 수분은  $3.65 \pm 0.05\%$ , 회분은  $3.31 \pm 0.19\%$ 으로 분석되었다. 당류는  $13.88 \pm 0.10$  mg/100g, 포화지방산은  $0.3 \pm 0.005$  g/100g, 불포화지방산은  $2.71 \pm 0.07$  g/100g으로 포화지방산보다 월등히 높게 나타남을 확인 할 수 있었다. 식이섬유는 전체  $55.84 \pm 1.45\%$ 로 잎 성분 중 가장 높은 양을 차지하였으며 나트륨은  $6.21 \pm 0.65$  mg/100g, 트랜스지방산은 0.002 g/100g으로 분석되었다. 콜레스테롤은 검출되지 않았다.

항목	단위	합량
열량	(Kcal/100g)	284.13
탄수화물	(%)	$83.00 \pm 5.15$ (식이섬유55.84%함유)
조단백질	(%)	$5.31 \pm 0.02$
조지방	(%)	$4.73 \pm 0.04$
수분	(%)	$3.65 \pm 0.05$
회분	(%)	$3.31 \pm 0.19$
당류	(mg/100g)	$13.88 \pm 0.10$
포화지방산	(g/100g)	$0.3 \pm 0.005$
콜레스테롤	(mg/100g)	-
불포화지방산	(g/100g)	$2.71 \pm 0.07$
식이섬유	(%)	55.84
나트륨	(mg/100g)	$6.21 \pm 0.65$
트랜스지방산	(g/100g)	0.002

(나) 무기질성분 분석

아래의 표를 보는바와 같이 비타민나무 잎의 무기질의 조성을 나타내었다. 칼슘은  $486.13 \pm 2.41$  mg/100g으로 전체 무기질 양 중 두 번째로 많은 함량을 나타내었으며 칼륨의 양은  $855.05 \pm 25.70$  mg/100g으로 가장 많은 양을 나타내었다. 철은  $1.83 \pm 0.15$  mg/100g, 마그네슘은  $167.44 \pm 0.77$  mg/100g, 인은  $134.39 \pm 2.22$  mg/100g, 아연은  $0.71 \pm 0.04$  mg/100g, 구리는  $0.29 \pm 0.01$  mg/100g 망간은  $2.84 \pm 0.02$  mg/100g으로 각각 분석되었다. 무기물 중 미량원소로는 셀레늄이  $3.26 \pm 1.16$   $\mu$ g/100g, 요오드가  $26.39 \pm 0.76$   $\mu$ g/100g, 폴리브덴이  $3.74 \pm 0.43$   $\mu$ g/100g, 크롬이  $16.4 \pm 2.99$   $\mu$ g/100g으로 각각 나타내었다.

항목	단위	함량
칼슘	(mg/100g)	$486.13 \pm 2.41$
철	(mg/100g)	$1.83 \pm 0.15$
마그네슘	(mg/100g)	$167.44 \pm 0.77$
인	(mg/100g)	$134.39 \pm 2.22$
아연	(mg/100g)	$0.71 \pm 0.04$
구리	(mg/100g)	$0.29 \pm 0.01$
칼륨	(mg/100g)	$855.05 \pm 25.70$
셀레늄	( $\mu$ g/100g)	$3.26 \pm 1.16$
요오드	( $\mu$ g/100g)	$26.39 \pm 0.76$
망간	(mg/100g)	$2.84 \pm 0.02$
폴리브덴	( $\mu$ g/100g)	$3.74 \pm 0.43$
크롬	( $\mu$ g/100g)	$16.4 \pm 2.99$

(다) 비타민성분 분석

비타민 나무 잎의 다양한 비타민 성분을 분석한 결과 비타민E의 경우  $12.68 \pm 0.47$  mg  $\alpha$ -TE/100g의 양이 포함되어 있었으며 베타카로틴은  $5.78 \pm 0.09$  mg/100g, 비타민 B2는  $0.08 \pm 0.01$  mg/100g, 판토텐산은  $18.82 \pm 0.29$  mg/100g으로 각각 측정되었다. 비타민C의 경우 검출된 비타민 중 가장 많은 양인  $134.62 \pm 1.45$  mg/100g이 검출되었다. 비타민A, 비타민D3, 비타민K, 비타민B1, 비타민B6, 비타민B12, 나이아신, 엽산, 비타민D2는 비타민나무 잎에서 검출되지 않았다.

항목	단위	함량
비타민A	( $\mu$ g RE/100g)	-
비타민D3	( $\mu$ g/100g)	-
비타민E	(mg $\alpha$ -TE/100g)	$12.68 \pm 0.47$
비타민K	( $\mu$ g/100g)	-
베타카로틴	(mg/100g)	$5.78 \pm 0.09$
비타민B1	(mg/100g)	-
비타민B2	(mg/100g)	$0.08 \pm 0.01$
비타민B6	(mg/100g)	-
비타민B12	( $\mu$ g/100g)	-
비타민C	(mg/100g)	$134.62 \pm 1.45$
나이아신	(mgNE/100g)	-
판토텐산	(mg/100g)	$18.82 \pm 0.29$
엽산	( $\mu$ g/100g)	-
비타민D2	( $\mu$ g/100g)	-

(라) 유리아미노산 및 구성아미노산 분석

비타민나무의 유리아미노산 및 구성 아미노산의 구성은 아래와 같다. 유리아미노산인 트레오닌, 티로신, 아르기닌, 알라닌, 프롤린, 라이신, 로이신, 페닐알라닌, 트립토판, 발린, 글루탐산, 아스파라긴산, 세린, 글리신의 경우 각각 0.18 mg/100g, 0.46 mg/100g, 3.06 mg/100g, 1.23 mg/100g, 3.9 mg/100g, 1.21 mg/100g, 0.35 mg/100g, 0.25 mg/100g, 2.29 mg/100g, 0.22 mg/100g, 1.33 mg/100g, 0.24 mg/100g, 1.09 mg/100g, 0.38 mg/100g의 양이 정량되었으며 시스틴, 히스티딘, 이소로이신, 메티오닌의 경우 검출되지 않은 결과를 나타내었다. 구성아미노산의 경우 티로신, 글리신, 세린, 알라닌, 글루탐산, 라이신, 로이신, 메티오닌, 발린, 아르기닌, 아스파라긴산, 이소로이신, 트레오닌, 페닐알라닌, 프롤린, 히스티딘의 경우 각각 53.35 mg/100g, 223.85 mg/100g, 193.81 mg/100g, 173.98 mg/100g, 1137.62 mg/100g, 124.29 mg/100g, 244.28 mg/100g, 30.47 mg/100g, 141.09 mg/100g, 264.13 mg/100g, 420.54 mg/100g, 117.04 mg/100g, 134.85 mg/100g, 145.27 mg/100g, 103.99 mg/100g, 132.42 mg/100g으로 정량된 결과를 나타내었다.

항 목	단위	유리아미노산 함량	구성아미노산 함량
트레오닌	(mg/100g)	0.18	53.35
시스틴	(mg/100g)	-	223.85
티로신	(mg/100g)	0.46	193.81
아르기닌	(mg/100g)	3.06	173.98
알라닌	(mg/100g)	1.23	1137.62
프롤린	(mg/100g)	3.9	124.29
라이신	(mg/100g)	1.21	244.28
히스티딘	(mg/100g)	-	30.47
이소로이신	(mg/100g)	-	141.09
로이신	(mg/100g)	0.35	264.13
메티오닌	(mg/100g)	-	420.54
페닐알라닌	(mg/100g)	0.25	117.04
트립토판	(mg/100g)	2.29	134.85
발린	(mg/100g)	0.22	145.27
글루탐산	(mg/100g)	1.33	103.99
아스파라긴산	(mg/100g)	0.24	132.42
세린	(mg/100g)	1.09	68.79
글리신	(mg/100g)	0.38	90.12

(마) 플라보노이드, 사포닌, 카테킨 분석

폴리페놀은 대표적인 항산화 물질로 종류는 수천가지가 넘으며 플라보노이드와 카테킨이 대표적인 폴리페놀의 일종이다. 비타민나무의 측정결과 총 플라보노이드의 양은  $2.14 \pm 0.03$  mg/g 으로 나타났다. 조사포닌과 카테킨은 각각  $8.19 \pm 0.23$  mg/g,  $0.07 \pm 0.002$  mg/g 으로 나타났다.

항목	단위	함량
조사포닌	(mg/g)	$8.19 \pm 0.23$
총플라보노이드	(mg/g)	$2.14 \pm 0.03$
카테킨	(mg/g)	$0.07 \pm 0.002$

마. 비타민나무 잎 추출물의 유해물질 설정 분석

(1) 방법

(가) 중금속 시험법

‘식품공전’에서 제 10. 일반시험법 → ‘7. 식품 중 유해물질시험법’ → ‘7.1.2 금속별 시험 → 7.1.2.1 납(Pb), 1) 시험용액의 조제, 가)습식분해법, (1) 황산-질산법, 2)측정, 가)원자흡광광도법(AAs)의 방법으로 실험 진행

(나) 잔류농약 시험법

‘제 10. 일반시험법’ → ‘4. 식품 중 잔류농약 분석법’ → ‘4.1.2 다중농약다성분분석법’ → ‘4.1.2.2. 다중농약다성분분석법’의 방법으로 실험 진행

(2) 결과

식품 소재에서 안전성의 확보는 식품으로서의 이용가능성을 결정짓는 가장 중요한 항목이다. 따라서 본 연구에서는 비타민나무의 안전성을 검증하고자 유해물질인 중금속과 잔류농약의 양을 평가하였다. 평가한 결과 중금속의 경우 납은  $0.0667 \pm 0.0011$  mg/kg, 카드뮴은  $0.0038 \pm 0.0008$  mg/kg 비소는  $0.0067 \pm 0.0007$  mg/kg으로 기준치 이하의 양이 검출되었으며 수은은 검출되지 않았다. 또한 잔류 농약 59종의 검사 결과 모두 검출되지 않는 것으로 나타났다.

항목	단위	함량
납	(mg/kg)	$0.0667 \pm 0.0011$
카드뮴	(mg/kg)	$0.0038 \pm 0.0008$
수은	(mg/kg)	-
비소	(mg/kg)	$0.0067 \pm 0.0007$
잔류농약59종		전항목 불검출

**바. 비타민나무 잎 추출물의 지표성분 분석**

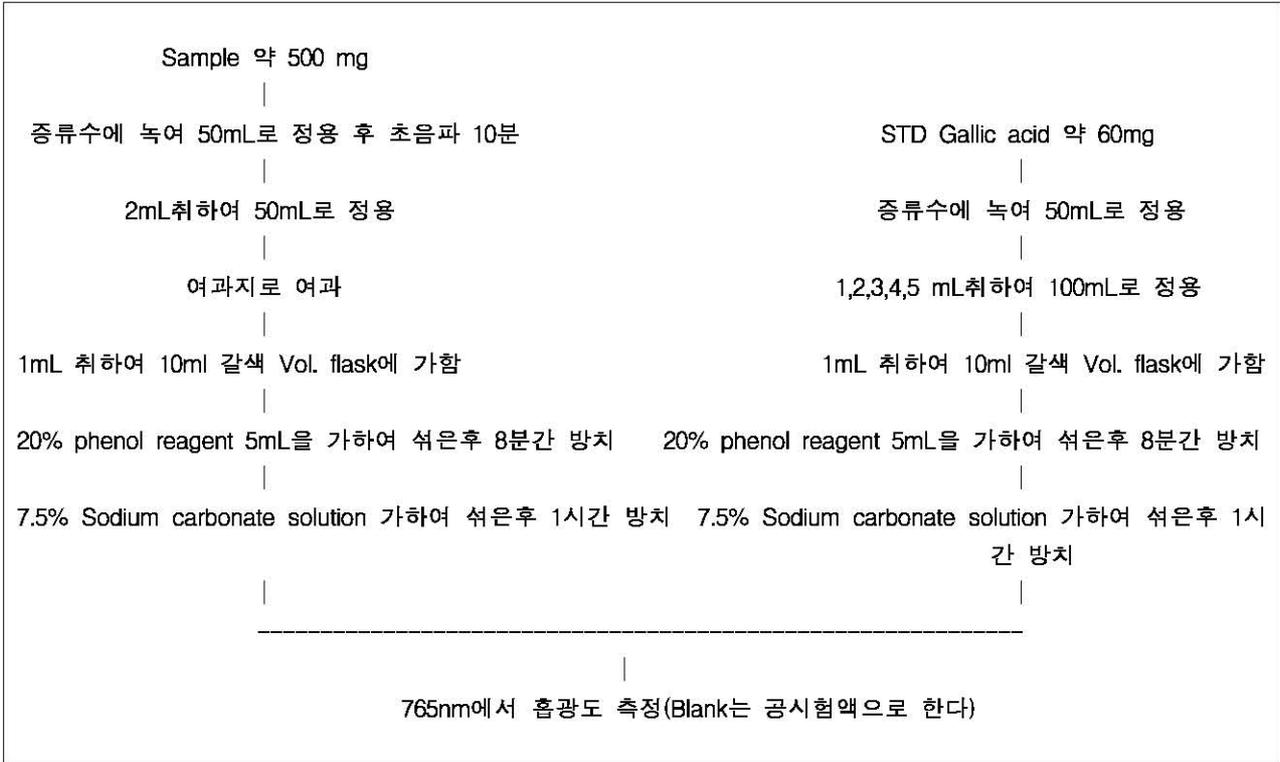
**(1) 방법**

**(가) 총폴리페놀 함량 분석**

① 시약 및 표준품

0% phenol reagent, 7.5% Sodium carbonate(Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) solution, 표준품(gallic acid)

② 시험방법



③ 계산

$$\text{Total polyphenol} = \frac{\text{검량선 검출량(ug/mL)}}{\text{시료량(mg)/회석용량(mL)}} \times \frac{1\text{mg}}{1000\text{ug}} \times \frac{\text{기준중량(mg)}}{\text{기준중량(g)}} = \text{mg/기준중량(g)}$$

**(나) 지표성분인 quercetin, kaempferol, isorhamnetin의 분석**

비타민 나무의 지표성분 분석을 위해 선행 연구되어 있는 비타민나무 지표성분 분석 자료를 바탕으로 탐색할 성분을 정리한 결과 퀘르세틴(quercetin), 캄페롤(kaempferol), 이소람네틴(isorhamnetin)의 세가지 성분을 선정 하였으며 이들을 분석하기 위하여 건강기능식품공전 내의 플라보놀 배당체 분석시험 방법을 택하여 실험을 진행하였다.

① 시험방법

본 시험법은 시료 중 플라보놀 배당체를 가수 분해시킨 후 액체크로마토그래피/자외부흡광광도검출기를 이용하여 분석하는 방법으로 최대흡수파장인 370 nm에서 정량 분석하였다.

② 장비 및 시약

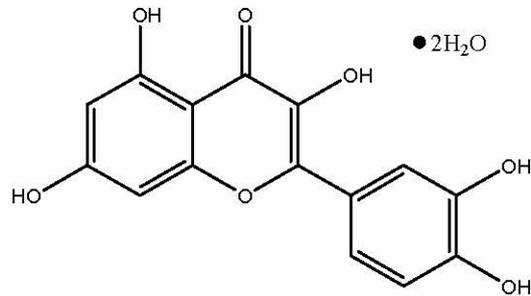
메탄올, 인산, 증류수, 염산, 에탄올, 부피플라스크(10 mL, 50 mL), 메스실린더,

삼각플라스크, 일회용 실린지, 여과용 membrane filter, HPLC용 유리병, water bath, 고속액체크로마토그래피(waters), UV Decter, Capcellpak C18, UG120 컬럼

③ 표준물질

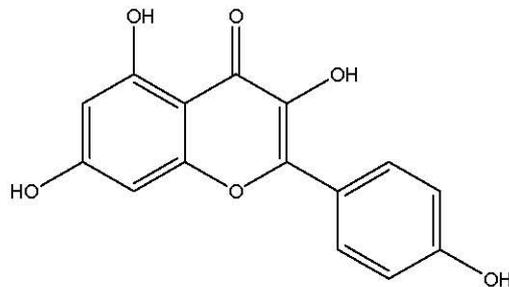
㉑ 퀘르세틴 이수화물(Quercetin dihydrate)

분자식 :  $C_{15}H_{10}O_7 \cdot 2H_2O$ , 분자량 : 338.27, CAS No. : 6151-25-3



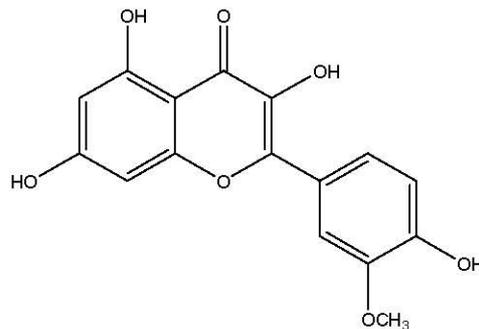
㉒ 캄페롤(Kaempferol)

분자식 :  $C_{15}H_{10}O_6$ , 분자량 : 286.24, CAS No. : 520-18-3



㉓ 이소람네티(Isorhamnetin)

분자식 :  $C_{16}H_{12}O_7$ , 분자량 : 316.26, CAS No. : 480-19-3



④ 기기분석 조건

㉑ 고속액체크로마토 그래피 조건

항목	조건
주입량	20 $\mu$ L
검출기 파장	370 nm
컬럼온도	35 $^{\circ}$ C
이동상	A : 0.1% phosphoric acid , B : 메탄올
유속	1.0 mL/분

㉔ 이동상 조건

시간(분)	이동상(%)	
	A	B
0-8	35	65
8-38	35-50	65-50
38-40	50-100	50-0
40-50	100-35	0-65
50-51	35	65
51-55	35	65

㉕ 계산

지표성분 함량은 캄페롤, 퀘르세틴, 이소람네티닌의 합으로 계산하였다.

$$\text{각각의 지표성분 함량(mg/g)} = \frac{A \times B \times C \times D}{E}$$

A : 시험용액중의 각각의 플라보놀배당체의 농도(mg/mL)

B : 시험용액 전량(mL)

C : 희석배수

D : 전환 계수(kaempferol= 2.588, quercetin = 2.504, isorhamnetin = 2.437)

E : 시료무게(g)

(2) 결과

(가) 총폴리페놀 함량 분석

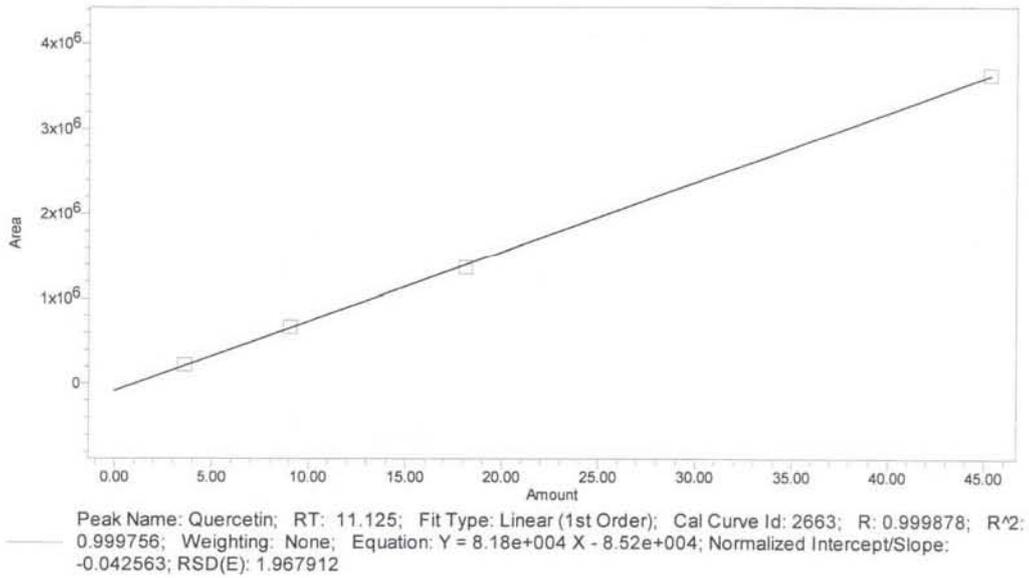
비타민나무 잎의 총 폴리페놀 함량을 분석한 결과 284.73±0.75 mg/g 의 함량을 나타내는 것으로 조사되었다.

항목	단위	함량
총 폴리페놀	(mg/g)	284.73±0.75

(나) 지표성분 함량 분석

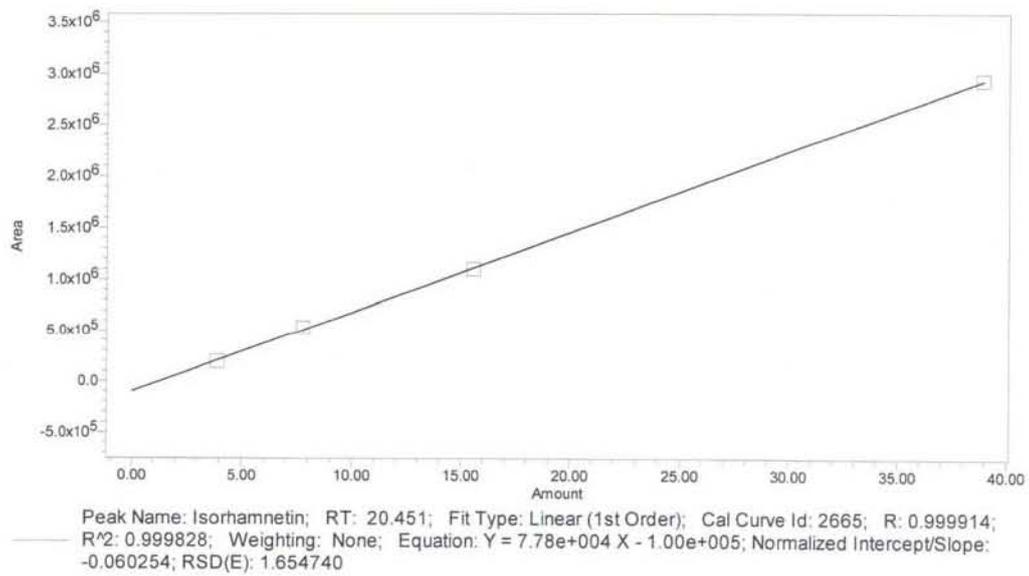
① Quercetin

Quercetin 표준용액 검량선의 R<sup>2</sup>값은 0.999878을 나타내었다.



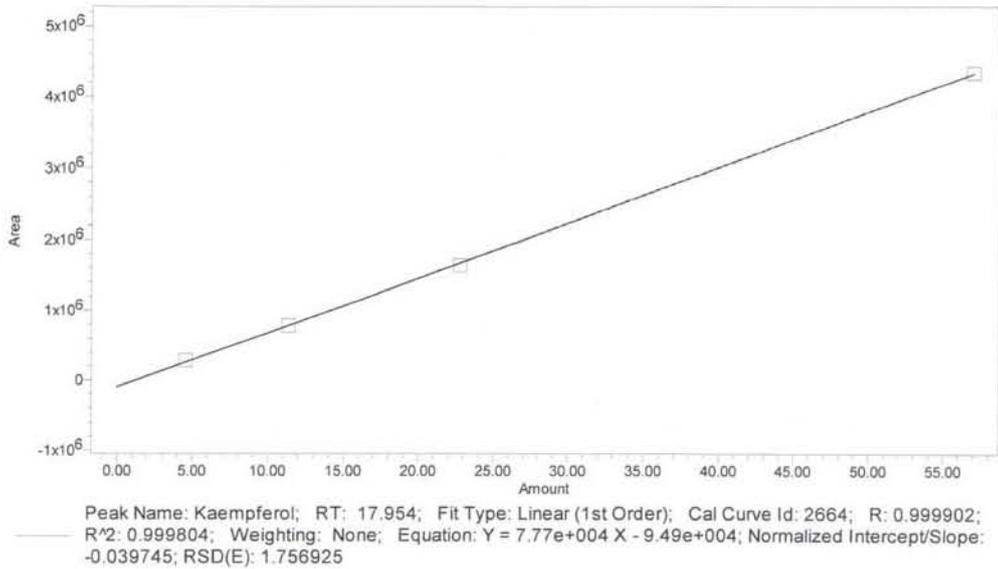
② Isoramnetin

Isoramnetin 표준용액 검량선의 R<sup>2</sup>값은 0.999914을 나타내었다.



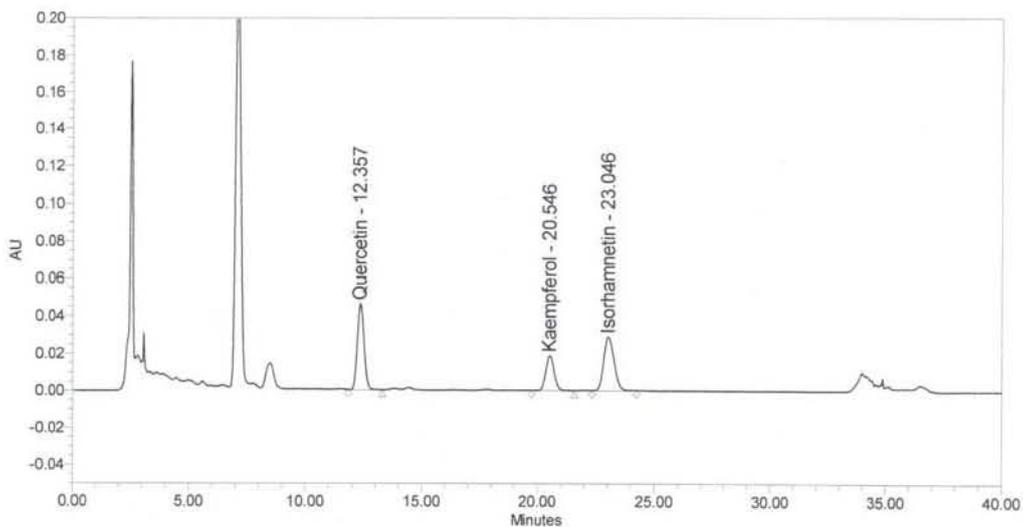
③ Kaempferol

Kaempferol 표준용액 검량선의 R<sup>2</sup>값은 0.999902를 나타내었다.



④ quercetin, kaempferol, isorhamnetin의 지표성분 분석 및 정량

비타민나무 잎의 멘탈케어 기능성분 탐색의 일환으로 추출물로부터 페놀성 성분인 quercetin, kampferol, isorhamnetin을 HPLC 분석법을 이용하여 검토하였다. 그 결과 세 가지 성분 모두 정량적 분석으로 확인 할 수 있었다. Quercetin의 경우 5.237 mg/g이 정량되었으며 kaempferol은 2.725 mg/g이 정량되었다. Isorhamnetin의 경우 5.395 mg/g으로 세 가지 중 가장 많이 정량된 결과를 나타내었다.



성분명	단위	함량
Quercetin	mg/g	5.237
Kaempferol	mg/g	2.725
Isorhamnetin	mg/g	5.395
Quercetin+Kaempferol+Isorhamnetin의 합	mg/g	13.357

## 사. 산지별 비타민나무 잎 추출물의 지표성분 함량 분석

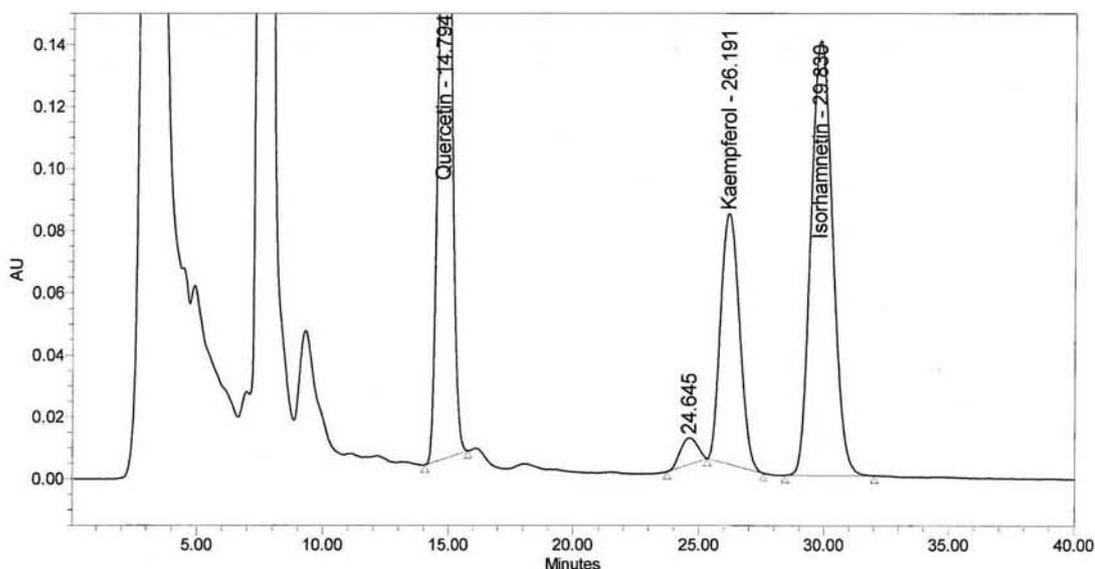
### (1) 방법

본 시험법은 각각의 산지별 비타민나무 잎의 지표성분인 quercetin, kampferol, isorhamnetin을 분석하기 위하여 시료 중 플라보놀 배당체를 가수 분해시킨 후 액체크로마토그래피/자외부흡광광도검출기를 이용하여 분석하는 방법으로 최대흡수파장인 370 nm에서 정량 분석하였다. HPLC기기 조건과 용매의 이동상 조건은 위 실험 조건과 동일하게 측정하였다.

### (2) 결과

#### (가) 강화지역 비타민나무 잎

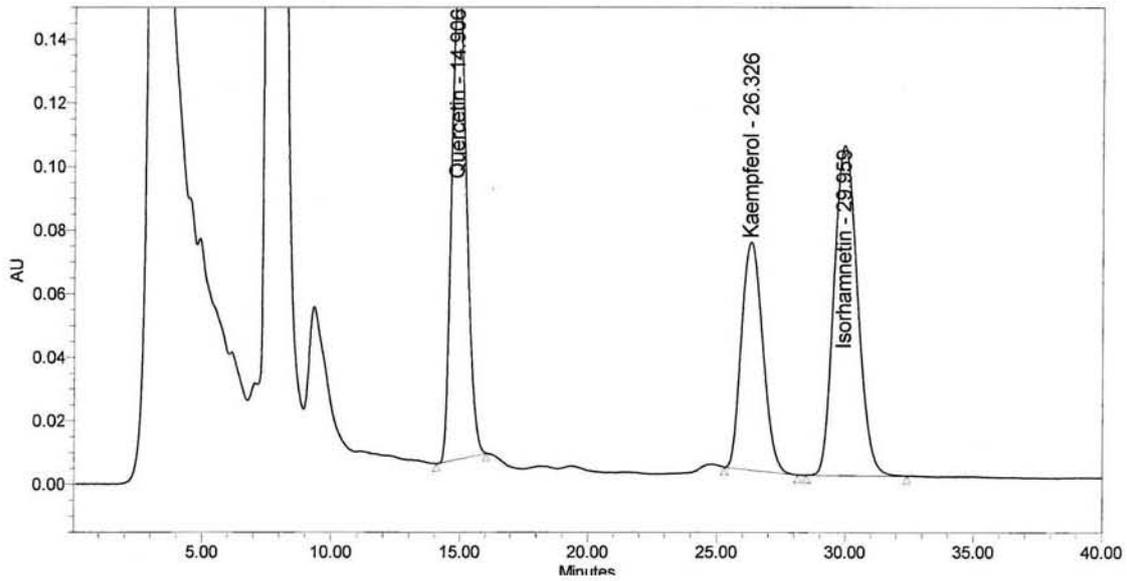
산지별 비타민나무 잎의 기능성분 비교 분석의 일환으로 강화지역 비타민나무 잎 추출물로부터 지표성분 성분인 quercetin, kampferol, isorhamnetin을 HPLC 분석법을 이용하여 검토하였다. 그 결과 세 가지 성분 모두 정량적 분석으로 확인 할 수 있었다. Quercetin의 경우 4.650 mg/g이 정량되었으며 kaempferol은 2.436 mg/g이 정량되었다. Isorhamnetin의 경우 5.045 mg/g으로 세 가지 중 가장 많이 정량된 결과를 나타내었다.



성분명	단위	함량
Quercetin	mg/g	4.650
Kaempferol	mg/g	2.436
Isorhamnetin	mg/g	5.045
Quercetin+Kaempferol+Isorhamnetin의 합	mg/g	12.132

(나) 상주지역 비타민나무

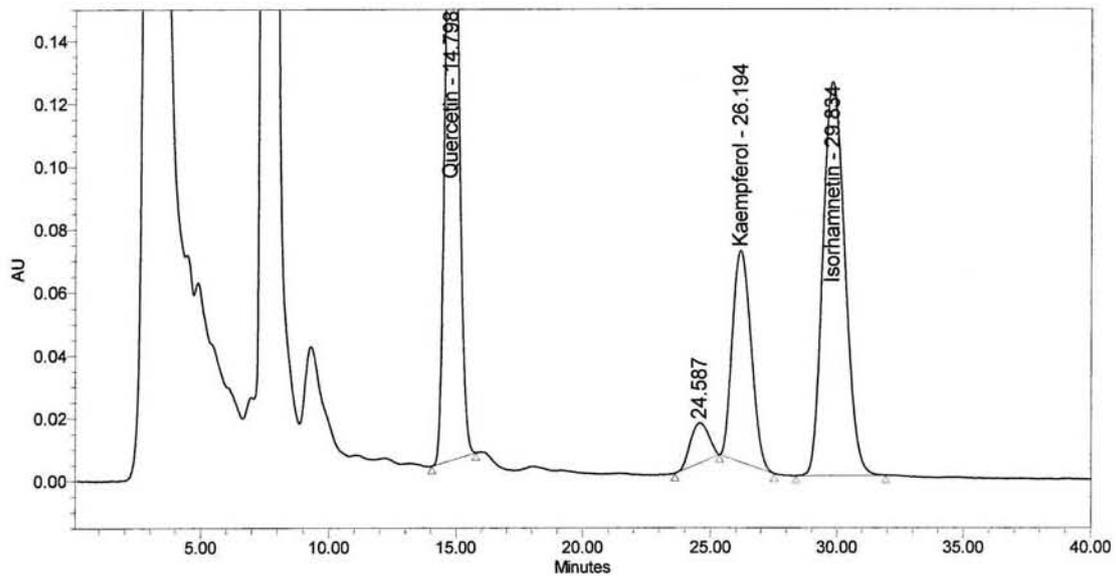
산지별 비타민나무 잎의 기능성분 비교 분석의 일환으로 상주지역 비타민나무 잎 추출물로부터 지표성분 성분인 quercetin, kampfferol, isorhamnetin을 HPLC 분석법을 이용하여 검토했다. 그 결과 세 가지 성분 모두 정량적 분석으로 확인 할 수 있었다. Quercetin의 경우 3.423 mg/g이 정량되었으며 kaempferol은 2.378 mg/g이 정량되었다. Isorhamnetin의 경우 3.989 mg/g으로 세 가지 중 가장 많이 정량된 결과를 나타내었다.



성분명	단위	합량
Quercetin	mg/g	3.423
Kaempferol	mg/g	2.378
Isorhamnetin	mg/g	3.989
Quercetin+Kaempferol+Isorhamnetin의 합	mg/g	9.791

(다) 양구지역 비타민나무 잎

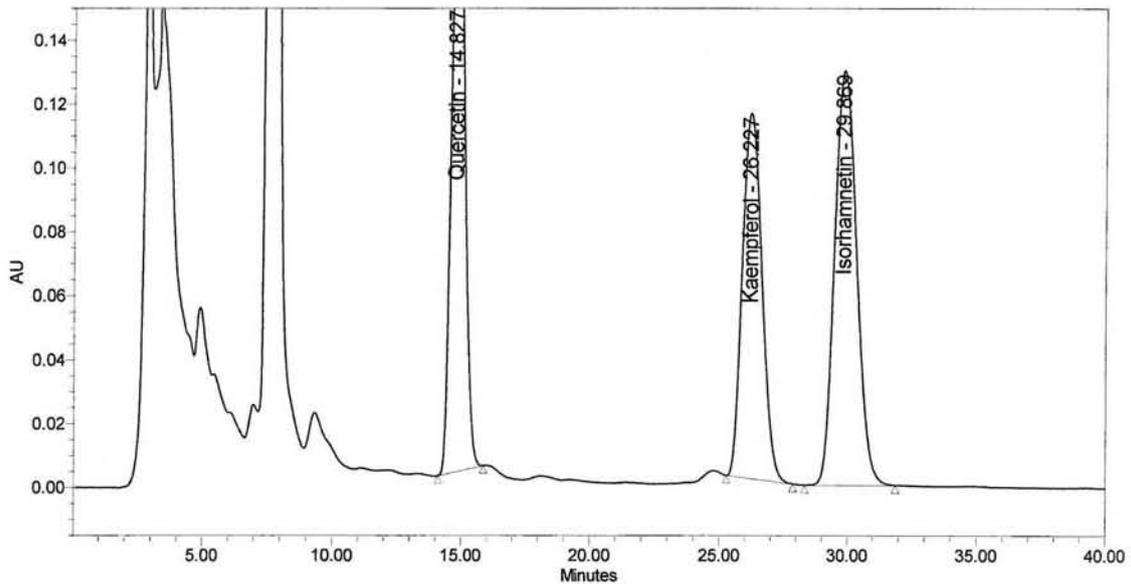
산지별 비타민나무 잎의 기능성분 비교 분석의 일환으로 양구지역 비타민나무 잎 추출물로부터 지표성분 성분인 quercetin, kaempferol, isorhamnetin을 HPLC 분석법을 이용하여 검토했다. 그 결과 세 가지 성분 모두 정량적 분석으로 확인 할 수 있었다. Quercetin의 경우 4.494 mg/g이 정량되었으며 kaempferol은 2.008 mg/g이 정량되었다. Isorhamnetin의 경우 4.494 mg/g으로 세 가지 중 가장 많이 정량된 결과를 나타내었다.



성분명	단위	함량
Quercetin	mg/g	4.494
Kaempferol	mg/g	2.007
Isorhamnetin	mg/g	4.494
Quercetin+Kaempferol+Isorhamnetin의 합	mg/g	10.996

(라) 화천(2010년산) 비타민나무 잎

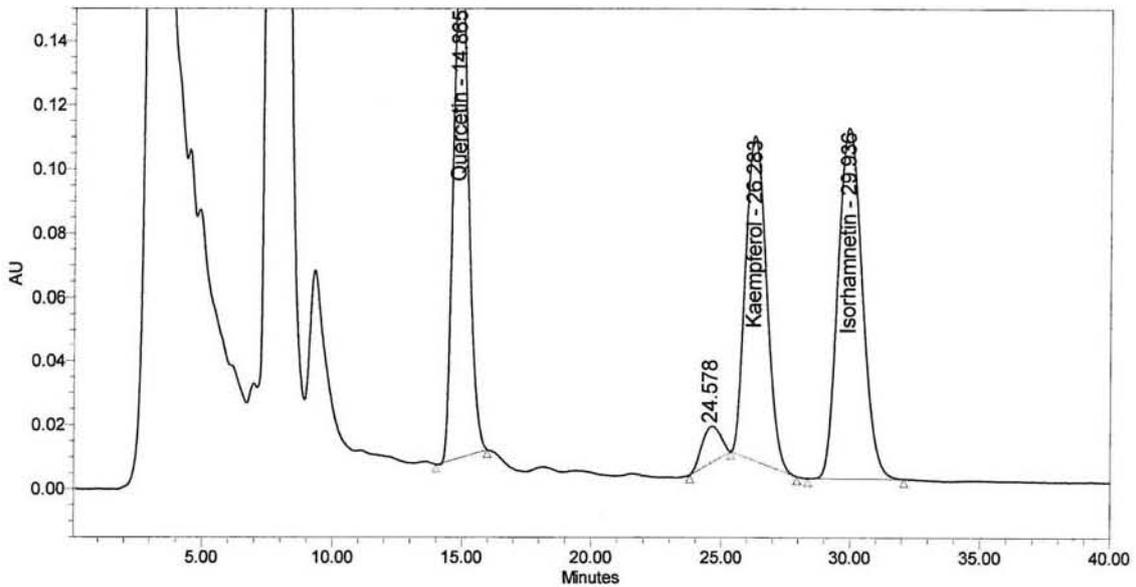
산지별 비타민나무 잎의 기능성분 비교 분석의 일환으로 화천(2010년산)지역 비타민나무 잎 추출물로부터 지표성분 성분인 quercetin, kaempferol, isorhamnetin을 HPLC 분석법을 이용하여 검토했다. 그 결과 세 가지 성분 모두 정량적 분석으로 확인 할 수 있었다. Quercetin의 경우 4.065 mg/g이 정량되었으며 kaempferol은 3.613 mg/g이 정량되었다. Isorhamnetin의 경우 4.803 mg/g으로 세 가지 중 가장 많이 정량된 결과를 나타내었다.



성분명	단위	함량
Quercetin	mg/g	4.065
Kaempferol	mg/g	3.613
Isorhamnetin	mg/g	4.803
Quercetin+Kaempferol+Isorhamnetin의 합	mg/g	12.482

(마) 화천지역 비타민나무 잎

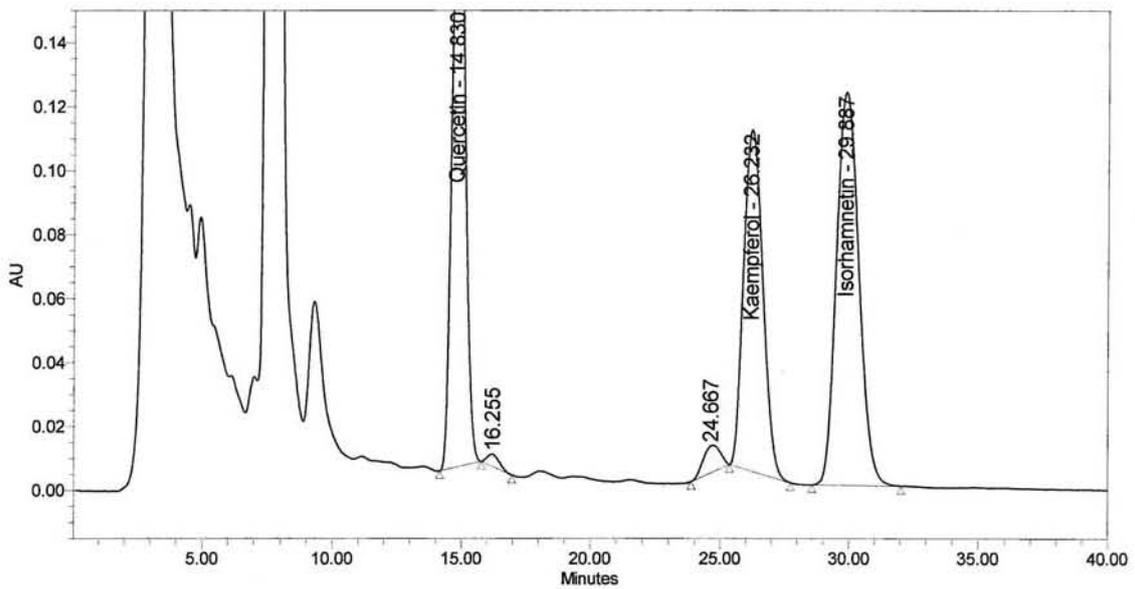
산지별 비타민나무 잎의 기능성분 비교 분석의 일환으로 화천지역 비타민나무 잎 추출물로부터 지표성분 성분인 quercetin, kaempferol, isorhamnetin을 HPLC 분석법을 이용하여 검토하였다. 그 결과 세 가지 성분 모두 정량적 분석으로 확인 할 수 있었다. Quercetin의 경우 3.634 mg/g이 정량되었으며 kaempferol은 3.352 mg/g이 정량되었다. Isorhamnetin의 경우 4.270 mg/g으로 세 가지 중 가장 많이 정량된 결과를 나타내었다.



성분명	단위	함량
Quercetin	mg/g	3.634
Kaempferol	mg/g	3.352
Isorhamnetin	mg/g	4.270
Quercetin+Kaempferol+Isorhamnetin의 합	mg/g	11.257

(바) 몽골지역 비타민나무 잎

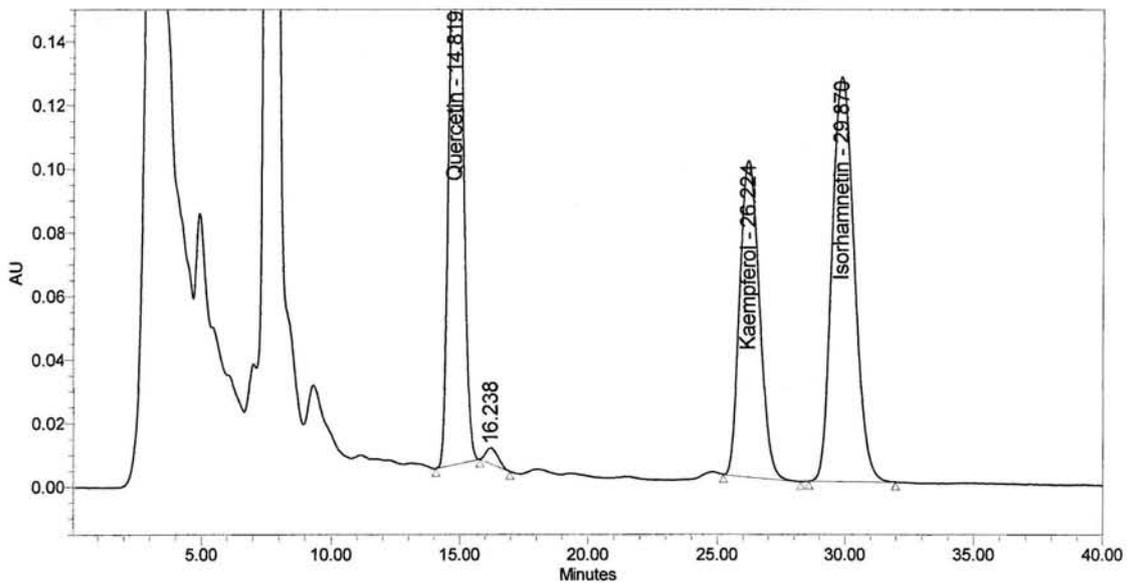
산지별 비타민나무 잎의 기능성분 비교 분석의 일환으로 몽골지역 비타민나무 잎 추출물로부터 지표성분 성분인 quercetin, kaempferol, isorhamnetin을 HPLC 분석법을 이용하여 검토하였다. 그 결과 세 가지 성분 모두 정량적 분석으로 확인 할 수 있었다. Quercetin의 경우 3.893 mg/g이 정량되었으며 kaempferol은 3.223 mg/g이 정량되었다. Isorhamnetin의 경우 4.435 mg/g으로 세 가지 중 가장 많이 정량된 결과를 나타내었다.



성분명	단위	함량
Quercetin	mg/g	3.893
Kaempferol	mg/g	3.223
Isorhamnetin	mg/g	4.435
Quercetin+Kaempferol+Isorhamnetin의 합	mg/g	11.819

(사) 중국(백주)지역 비타민나무 잎

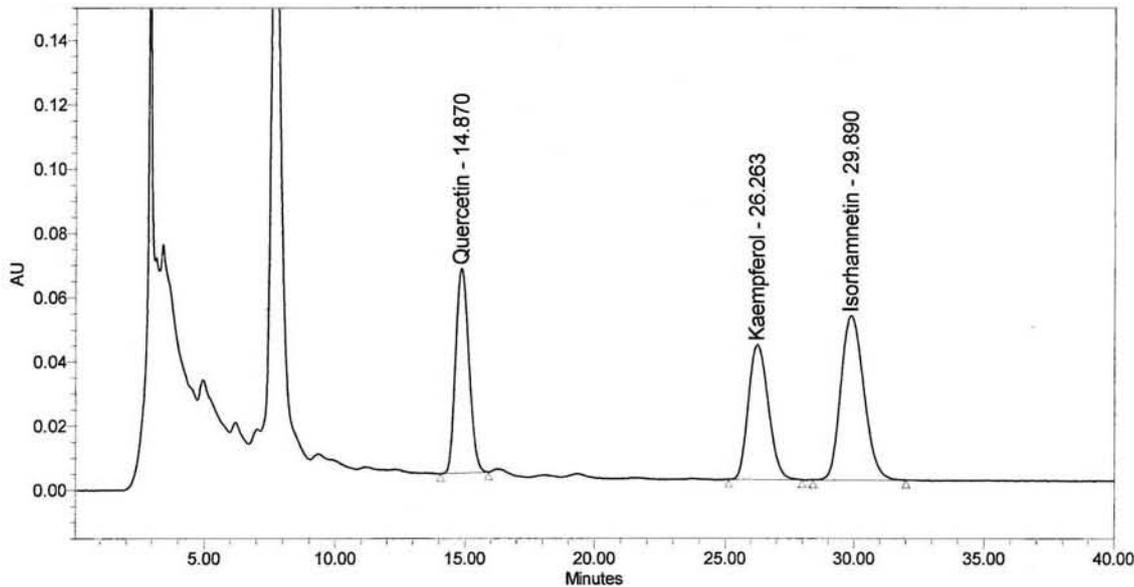
산지별 비타민나무 잎의 기능성분 비교 분석의 일환으로 중국(백주)지역 비타민나무 잎 추출물로부터 지표성분 성분인 quercetin, kaempferol, isorhamnetin을 HPLC 분석법을 이용하여 검토하였다. 그 결과 세 가지 성분 모두 정량적 분석으로 확인 할 수 있었다. Quercetin의 경우 4.149 mg/g이 정량되었으며 kaempferol은 3.060 mg/g 이 정량되었다. Isorhamnetin의 경우 4.610 mg/g으로 세 가지 중 가장 많이 정량된 결과를 나타내었다.



성분명	단위	합량
Quercetin	mg/g	4.149
Kaempferol	mg/g	3.060
Isorhamnetin	mg/g	4.610
Quercetin+Kaempferol+Isorhamnetin의 합	mg/g	11.819

(아) 중국(안국)지역 비타민나무 잎

산지별 비타민나무 잎의 기능성분 비교 분석의 일환으로 중국(안국)지역 비타민나무 잎 추출물로부터 지표성분 성분인 quercetin, kaempferol, isorhamnetin을 HPLC 분석법을 이용하여 검토하였다. 그 결과 세 가지 성분 모두 정량적 분석으로 확인 할 수 있었다. Quercetin의 경우 1.278 mg/g이 정량되었으며 kaempferol은 1.324 mg/g이 정량되었다. Isorhamnetin의 경우 1.895 mg/g으로 세 가지 중 가장 많이 정량된 결과를 나타내었다.



성분명	단위	함량
Quercetin	mg/g	1.278
Kaempferol	mg/g	1.324
Isorhamnetin	mg/g	1.895
Quercetin+Kaempferol+Isorhamnetin의 합	mg/g	4.498

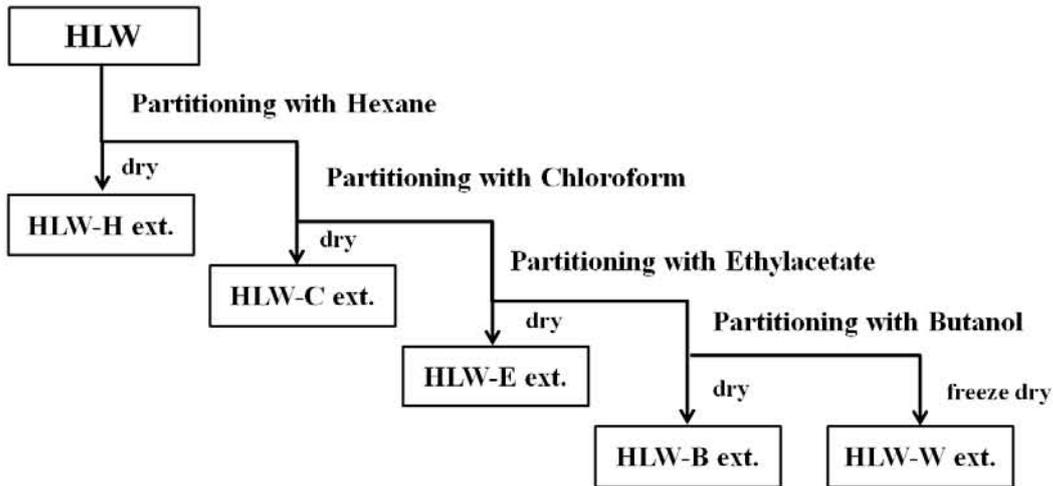
아. 비타민나무 잎 추출물의 분획

(1) 방법

(가) 비타민나무 잎의 농축 및 분획

비타민나무 잎 (*Hippophae rhamnoides* L. Leaves)을 열수 추출 및 감압 농축하여 비 타민나무 잎 열수추출물(HLW)을 얻었다. 이 추출물 50 g을 증류수 (5 L)와 n-Hexane(5 L)의 1:1 비율에 현탁하여 1차 용매이행을 3회 수행하여 물 층과 n-Hexane ext.로 분리하였다. 물 층을 다시 동일한 양의 chloroform(5 L)으로 2차 용매이행을 3회 수행하여 CHCl<sub>3</sub> ext.로 분리하였다. 동일한 방법으로 Ethylacetate(5 L)로 3차 용매이행을 3회 수행하여 EtOAc ext.를 확보하였다. 마지막으로 n-butanol(5

L)로 4차 용매이행을 3회 수행하여 n-BuOH ext.를 확보하였다. 각각의 분리된 층은 감압 농축하여 동결건조 후 최종적으로 질소를 사용하여 용매를 기화시켜 각각의 분획물을 얻었다.(Scheme 1)



## (2) 결과

각각의 층에서 분리된 분획물의 양은 각각 HLW-H ext.에서 1.051 g, HLW-C ext.에서 2.362 g, HLW-E ext.에서 6.405 g, HLW-B ext.에서 7.025 g을 얻었으며 수율은 각각 2.1%, 4.7%, 12.8%, 14.05%로 나타났다.

분획물 종류	분획량 (g)	수율 (%)
HLW-H(hexane)	1.051	2.1
HLW-C(Chloroform)	2.362	4.7
HLW-E(Ethylacetate)	6.405	12.8
HLW-B(Butanol)	7.025	14.5
HLW-W(Water)	35.324	70.6

## 자. 비타민나무 잎 분획물의 지표성분 분석

### (1) 방법

비타민 나무 용매별 분획물에서 비타민나무 추출물에서 확인된 지표성분 함량 분석을 위해 지표성분인 퀘르세틴(queracetin), 캄페롤(kaempferol), 이소람네티(isorhamnetin)의 세가지 성분을 식품공전 내의 플라보놀 배당체 분석시험 방법을 택하여 실험을 진행하였다.

#### (가) 시험방법

본 시험법은 시료 중 플라보놀 배당체를 가수 분해시킨 후 액체크로마토그래피/자외부흡광도검출기를 이용하여 분석하는 방법으로 최대흡수파장인 370 nm에서 정량 분석하였다.

#### (나) 장비 및 시약

메탄올, 인산, 증류수, 염산, 에탄올, 부피플라스크(10 mL, 50 mL), 메스실린더, 삼각플라스크, 일회용 실린지, 여과용 membrane filter, HPLC용 유리병, water bath, 고속액체크로마토그래피(waters, ), UV Decter, Capcellpak C<sup>18</sup> UG120 컬럼

(다) 표준물질

① 퀘르세틴 이수화물(Quercetin dihydrate)

분자식 : C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>7</sub>·2H<sub>2</sub>O, 분자량 : 338.27, CAS No. : 6151-25-3

② 캄페롤(Kaempferol)

분자식 : C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>6</sub>, 분자량 : 286.24, CAS No. : 520-18-3

③ 이소람네티(Isorhamnetin)

분자식 : C<sub>16</sub>H<sub>12</sub>O<sub>7</sub>, 분자량 : 316.26, CAS No. : 480-19-3

㉞ 고속액체크로마토 그래피 조건

항목	조건
주입량	10 µL
검출기 파장	370 nm
컬럼온도	40℃
이동상	A : 메탄올, B : 0.1% formic acid
유속	1.0 mL/분

㉟ 이동상 조건

시간(분)	이동상(%)	
	A	B
0-8	35	65
8-38	35-50	65-50
38-40	50-100	50-0
40-50	100-35	0-65
50-51	35	65
51-55	35	65

⑤ 계산

지표성분 함량은 캄페롤, 퀘르세틴, 이소람네티의 합으로 계산하였다.

$$\text{각각의 지표성분 함량(mg/g)} = \frac{A \times B \times C \times D}{E}$$

A : 시험용액중의 각각의 플라보놀배당체의 농도(mg/mL)

B : 시험용액 전량(mL)

C : 회석배수

D : 전환 계수(kaempferol= 2.588, quercetin = 2.504, isorhamnetin = 2.437)

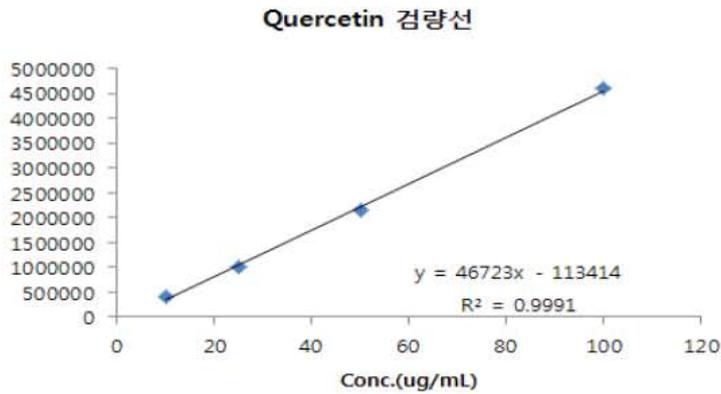
E : 시료무게(g)

## (2) 결과

### (가) 표준용액의 크로마토그램

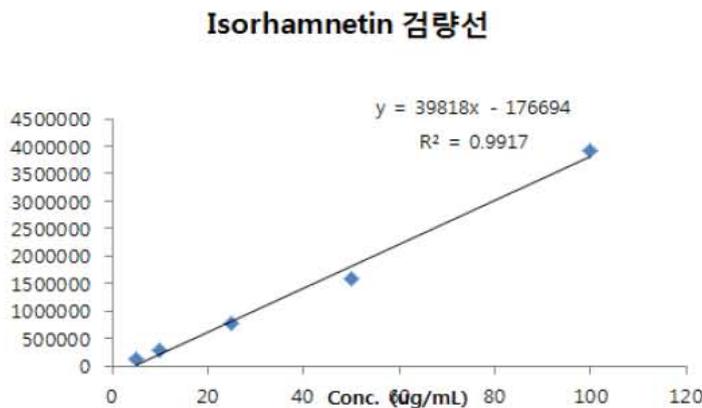
#### ① Quercetin

Quercetin 표준용액 검량선의  $R^2$ 값은 0.9991을 나타내었다



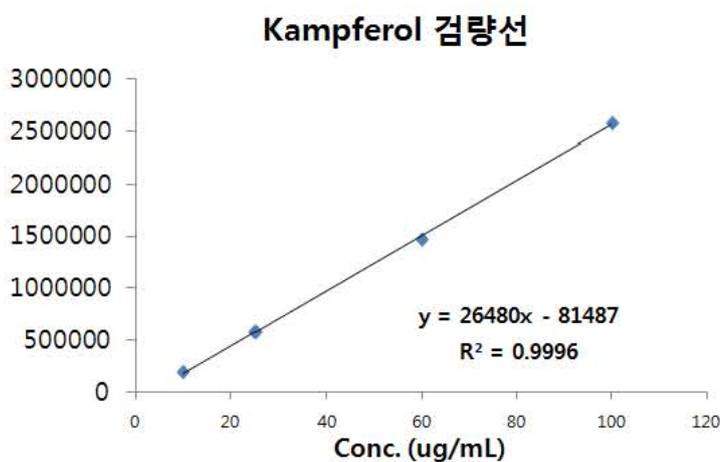
#### ② Isorhamnetin

Isorhamnetin 표준용액 검량선의  $R^2$ 값은 0.9991을 나타내었다.



#### ③ Kaempferol

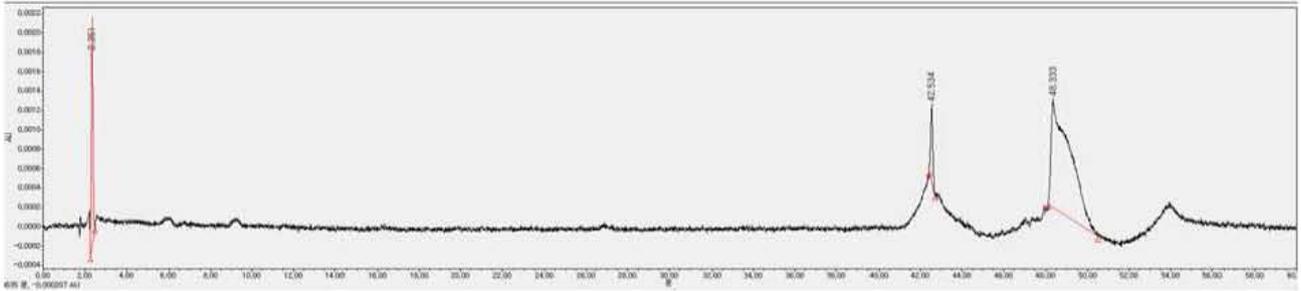
Kaempferol 표준용액 검량선의  $R^2$ 값은 0.9991을 나타내었다.



(나) 분획별 크로마토그램

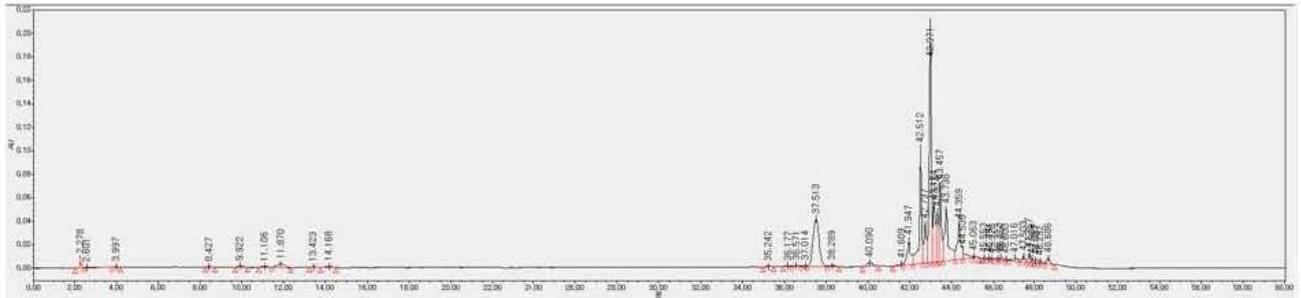
① 비타민나무 분획 n-Hexane 층 크로마토그램

n-Hexane 층 분획에서 분석한 결과 quercetin, kaempferol, isorhamnetin 모두 검출되지 않은 결과를 나타냈다.



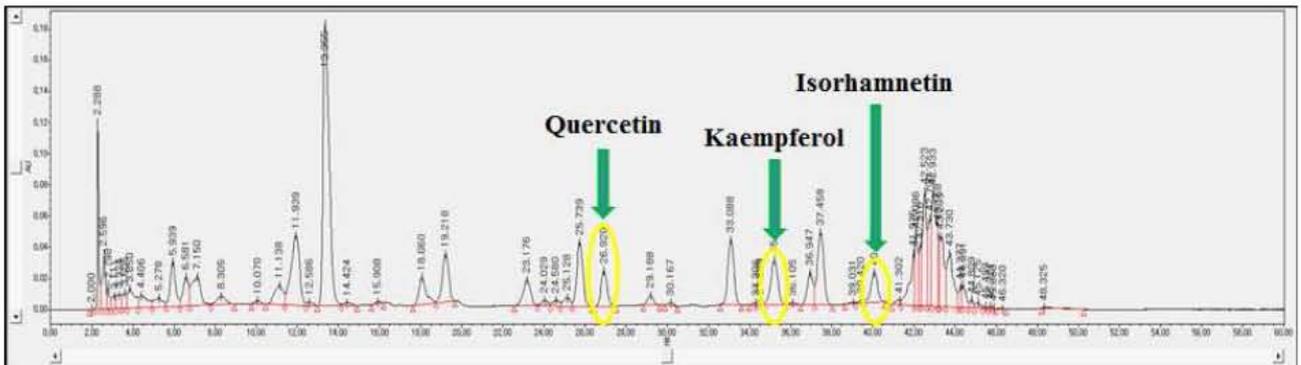
② 비타민나무 분획 chloroform 층 크로마토그램

Chloroform 층 분획에서 분석한 결과 quercetin, kaempferol, isorhamnetin 모두 검출되지 않은 결과를 나타냈다.



③ 비타민나무 분획 ethyl acetate 층 크로마토그램

Ethyl acetate 층 분획에서 분석한 결과 quercetin 6.319 mg/g, kaempferol 4.225 mg/g, isorhamnetin 5.935 mg/g이 정량되었다.



분석 항목	단위	함량
Quercetin	mg/g	6.319
Kaempferol	mg/g	4.225
Isorhamnetin	mg/g	5.935



표준화를 통한 비타민나무 잎 추출분말의 기준·규격을 다음과 같이 설정하였다.

기준	규격
정상 quercetin, kaempferol, isorhamnetin 의 합 함량	이미·이취가 없는 갈색 분말 8.2 ~ 15.2 mg/g
납	1 mg/kg 이하
비소	1 mg/kg 이하
카드뮴	1 mg/kg 이하
수은	1 mg/kg 이하
대장균군	대장균군

## 제 2 절. 비타민나무 잎 추출분말을 활용한 제품 개발

(주관기관 : (주)뉴트리플랜 강남길)

### 1. 서론

본 연구에서는 비타민나무 잎 추출물의 시제품 개발을 위해 적합한 제형이 무엇인지 연구하는데 목적이 있다. 따라서 각각의 제형(정제, 환, 캡슐, 분말, 과립, 액상)들을 비타민나무 잎 추출분말에 대입하여 최적 제형을 선택하였다.

### 2. 방법 및 결과

#### 가. 비타민나무 잎 열수 추출분말을 사용한 건강기능식품 제형개발

##### (1) 방법

건강기능식품의 제형은 정제(tablet, 일정한 형상으로 압축된 것), 캡슐(capsule, 캡슐 기체에 충전 또는 피포한 것으로 경질캡슐과 연질캡슐 두 종류), 환(pill, 구상(球狀)으로 만든 것), 과립(granule, 입자형태로 만든 것), 액체 또는 액상(liquid, 유동성이 있는 액체 상태의 것 또는 액체상태의 것을 그대로 농축한 것), 분말(powder, 입자의 크기가 과립 제품보다 작은 것), 편상(flake, 얇고 편편한 조각상태의 것), 페이스트(paste, 고체와 액체의 중간상태로 점성이 강한 유동성의 반 고상의 것), 시럽(syrup, 고체와 액체의 중간상태로 점성이 약한 유동성의 반 액상의 것), 겔(gel, 액상에 펙틴, 젤라틴, 한천 등 겔화제를 첨가하여 만든 유동성이 있는 고체나 반고체 상태의 것), 젤리(jelly, 액상에 펙틴, 젤라틴, 한천 등 겔화제를 첨가하여 만든 유동성이 없는 고체나 반고체 상태의 것), 바(bar, 막대 형태의 것)로 12개 제형의 제품을 제조할 수 있으며, 또한 식품유형의 건강기능식품도 제조가 가능하다.

비타민나무 잎 열수추출분말의 제형 적용성을 확인하기 위하여 대표적인 고상제형인 정제, 경질캡슐 제형, 대표적인 액상제형인 연질캡슐, 액상 제형에 대하여 각 제형별 특성에 대하여 검토하였으며, 이때 1일 섭취량을 동물실험 300mg를 환산하여 1,500mg/day로 하여 제조하였다.

## (2) 결과

### (가) 경질캡슐

#### ① 배합비

비타민나무잎 열수추출분말을 사용한 경질캡슐은 500mg 캡슐로 1일 3회, 1회 2캡슐을 섭취하는 시제품을 생산하였다. 시제품의 배합비는 다음과 같으며, 이때 제품의 pH는 5.2였다.

표 2-1. 비타민나무잎 열수추출분말을 사용한 경질캡슐 배합비

순번	원료명	배합비율(%)	합량(mg)	1일 섭취량(mg)
1	비타민나무잎열수추출분말	50.0	250.0	1,500.0
2	유당혼합물	31.5	157.5	945.0
3	결정셀룰로오스	13.0	65.0	390.0
4	베타시클로덱스트린	3.0	15.0	90.0
5	이산화규소	1.0	5.0	30.0
6	스테아린산마그네슘	1.0	5.0	30.0
7	히드록시프로필메틸셀룰로오스	0.5	2.5	15.0
합 계		100.0	500.0	3,000.0

#### ② 경질캡슐 적용성 검토

비타민나무잎 열수추출분말을 사용한 경질캡슐의 적용성 검토는 캡슐제의 봉해 test와 지표성분인 quercetin, keampferol, isorhamnetin 함량을 확인하였다.

- 봉해시험 결과 봉해는 16분에 완료되었으며, 내용물은 13분에 봉해가 되어 적합하였다.

- 지표성분 확인결과 quercetin, keampferol, isorhamnetin 합 함량이 8.041 mg/g으로 배합비 대비 약 106%의 회수율을 보여 경질캡슐 제조시 문제가 없을 것으로 판단된다.

표 2-2. 경질캡슐 중 지표성분 함량

지표성분	합량(mg/g)	회수율(%)
Quercetin	3.042	105
Keampferol	1.816	106
Isorhamnetin	3.183	106
quercetin+keampferol+isorhamnetin 합	8.041	

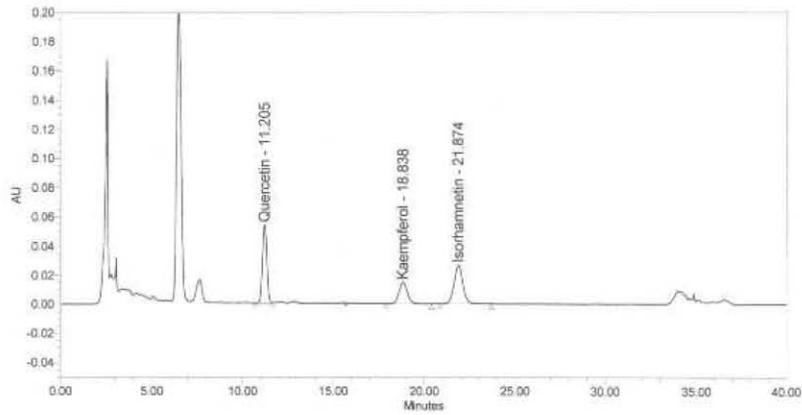


그림 2-1. 비타민나무잎 열수추출분말을 사용한 경질캡슐 제형.

(나) 정제

① 배합비

비타민나무잎 열수추출분말을 사용한 정제는 장방형 16 mm 정제로 800mg 정으로 제조하였으며, 1일 2회, 1회 2정을 섭취하는 제품형태로 조제하였다. 이때 정제의 성상은 탁한 활갈색을 보였으며, 배합비는 다음과 같으며, 이때 pH는 5.2였다.

표 2-3. 비타민나무잎 열수추출분말 첨가 정제 배합비

순번	원료명	배합비율(%)	함량(mg)	1일 섭취량(mg)
1	비타민나무잎열수추출분말	46.8750	375.0	1,500.0
2	말토덱스트린	33.6250	269.0	1,076.0
3	결정셀룰로오스	15.0000	120.0	480.0
4	히드록시프로필메틸셀룰로오스	2.0000	16.0	64.0
5	이산화규소	1.5000	12.0	48.0
6	스테아린산마그네슘	1.0000	8.0	32.0
합 계		100.0	800.0	3,200.0

② 정제 적용성 검토

비타민나무잎 열수추출분말을 사용한 정제의 적용성 검토는 정제의 중량, 경도, 두께, 마손도, 봉해 test와 지표성분 함량 변화를 통하여 확인하였다.

- 정제특성 측정결과 평균 중량은 809.91 mg, 평균 경도는 15.161 kgf/cm<sup>2</sup>, 평균두께는 6.428 mm, 마손도는 0.19로 정제 제조가 가능하였다. 그러나, 봉해가 32분으로 비타민나무잎 열수추출물의 당에 의해 봉해가 지연되는 것을 확인하여 추후 정제 제조시 비타민나무잎 열수추출분말의 함량을 낮추거나, 비타민나무잎 열수추출분말 제조시 dextrin을 혼합하여 흡습, 점도 등을 개선할 필요가 있음을 확인하였다.

표 2-4. 비타민나무잎 열수추출분말 혼합 정제의 특성

측정항목	결과
평균 중량 (mg)	809.91
평균 경도 (kgf/cm <sup>2</sup> )	15.161
평균 두께 (mm)	6.428
마손도 (%)	0.19
봉해 (분)	32

- 지표성분 함량 실험결과 지표성분 함량이 7.583 mg/g으로 배합비 대비 약 106%의 회수율을 보여 정제 제조시 문제가 없을 것으로 판단된다.

표 2-5. 경질캡슐 중 지표성분 함량



지표성분	함량(mg/g)	회수율(%)
Quercetin	2.872	106
Keampferol	1.687	105
Isorhamnetin	3.024	107
quercetin+keampferol+isorhamnetin 합	7.583	



그림 2-2. 비타민나무잎 열수추출분말을 사용한 정제 제형.

(다) 액상

① 배합비

비타민나무잎 열수추출분말을 사용한 액상제품은 50 ml 병으로 제조하였으며, 1일 회, 1회 1병을 섭취하는 제품형태로 제조하였다. 액상의 성상은 어두운 갈색의 액체로, 중량은 비중 1.079를 적용하여 53.95 g으로 하였다. 이때 당도는 19.2 Brix, 공형분 35%, 수분 65%, pH는 4.8이었으며, 배합비는 다음과 같다.

표 2-6. 비타민나무잎 열수추출분말 첨가 액상제품 배합비

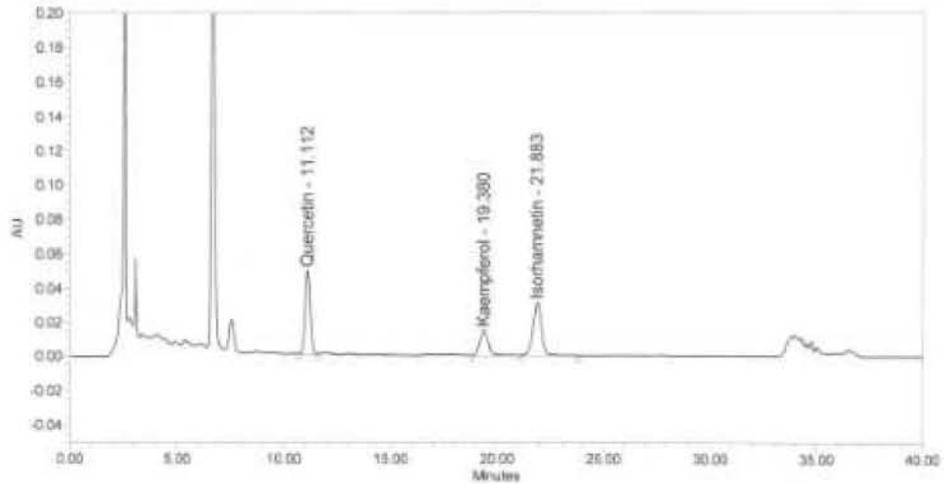
순번	원료명	배합비율(%)	함량(mg)	1일 섭취량(mg)
1	비타민나무잎열수추출분말	2.7804	1,500.026	1,500.026
2	프락토올리고당	10.0000	5,395.000	5,395.000
3	별꽃	7.0000	3,776.500	3,776.500
4	대보농추액	2.0000	1,079.000	1,079.000
5	베타시클로텍스트린	2.0000	1,079.000	1,079.000
6	대추향	0.3000	161.850	161.850
7	연잎추출물	0.2000	107.900	107.900
8	젤란검	0.0100	5.395	5.395
9	정제수	75.7096	40,845.329	40,845.329
<b>합 계</b>		100.0	53,950.000	53,950.000

② 액상 적용성 검토

비타민나무잎 열수추출분말을 사용한 액상 제품의 적용성 검토는 액상에서의 지표성분 함량 변화를 통하여 확인하였다.

- 지표성분 함량 실험결과 지표성분 함량이 0.411 mg/g으로 배합비 대비 약 99.3%의 회수율을 보여 액상 제품 제조시 문제가 없을 것으로 판단된다.

표 2-7. 경질캡슐 중 지표성분 함량



지표성분	함량(mg/g)	회수율(%)
Quercetin	0.151	96
Keampferol	0.091	98
Isorhamnetin	0.169	104
quercetin+keampferol+isorhamnetin 합	0.411	



그림 2-3. 비타민나무잎 열수추출분말을 사용한 액상제품 및 내용물.

(라) 연질캡슐

① 배합비

비타민나무잎 열수추출분말을 사용한 연질캡슐은 1,015 mg 연질캡슐로 내용물 700 mg, 캡셀기제 315 mg로 제조하였으며, 1일 2회, 1회 2캡슐을 섭취하는 제품형태로 제조하였다. 연질캡슐의 성상은 갈색 점조성 내용물을 함유한 암갈색 장방형 연질캡슐로, 내용물의 점도는 1671.65 CPS, 비중 1.184,, pH는 4.8이었으며, 배합비는 다음과 같다.

표 2-8. 비타민나무잎 열수추출분말 첨가 연질캡슐 배합비

내용물 배합비 (700mg)				
순번	원료명	배합비율(%)	함량(mg)	1일 섭취량(mg)
1	비타민나무잎열수추출분말	53.572	375.004	1,500.016
2	대두유	43.228	302.596	1,210.384
3	밀납	1.800	12.600	50.400
4	대두레시틴	1.400	9.800	39.200
합 계		100.000	700.000	2,800.000
연질캡슐 피막 배합비 (315mg)				
1	젤라틴	66.406		
2	글리세린	22.272		
3	D-소르비톨액	7.954		
4	카카오색소	1.368		
합 계		100.000		

② 연질캡슐 적용성 검토

비타민나무잎 열수추출분말을 사용한 연질캡슐의 적용성 검토는 연질캡슐의 지표성분 함량 변화를 통하여 확인하였다.

- 지표성분 함량 실험결과 지표성분 함량이 8.686 mg/g으로 배합비 대비 약 105%의 회수율을 보여 연질캡슐 제조시 문제가 없을 것으로 판단된다.

표 2-9. 연질캡슐 중 지표성분 함량

지표성분	함량(mg/g)	회수율(%)
Quercetin	3.309	107
Keampferol	1.894	103
Isorhamnetin	3.423	106
quercetin+keampferol+isorhamnetin 합	8.626	

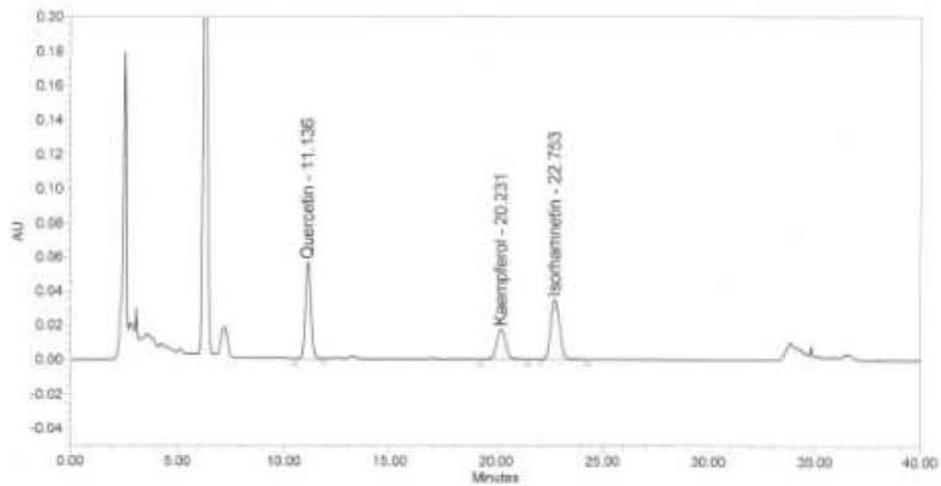


그림 2-4. 비타민나무잎 열수추출분말을 사용한 연질캡슐 및 내용물.

## 나. 임상시험용 시제품 개발

### (1) 방법

(가) 임상시험용 시제품은 제형 검토 결과 비타민나무잎 열수추출분말의 경우 경질캡슐, 연질캡슐, 액상, 정 등의 제형에 모두 적합한 것으로 나타나 4개의 제형 중 경질캡슐로 제조하였음.

### (2) 결과

(가) 임상용 시제품 제조는 건강기능식품 GMP 업체인 (주)뉴트리바이오텍에서 위약과 본약 두 종류를 생산하였다. 임상용 시제품에 사용된 비타민나무 잎 추출분말은 (주)MSC에서 생산된 원료를 사용하였으며, 1정은 800mg 정제로 비타민나무잎 추출물 463.2mg이 포함되어 있어 1일 2회 섭취할 경우 1일 비타민나무 잎 추출물 750mg을 섭취하도록 하였다.

표 2-10. 임상용 시제품 태합비

	원료명	Treatment		Placevo	
		태합비(%)	중량(mg)	태합비(%)	중량(mg)
내용물	비타민나무잎추출분말	57.9000	463.2000	-	-
	유당	10.0000	80.0000	30.0000	240.0000
	결정셀룰로오로스(102D)	26.3735	210.9880	65.5735	524.5880
	이산화규소	1.5000	12.0000	0.5000	4.0000
	스테아린산마그네슘	0.8000	6.4000	0.5000	4.0000
코팅	HPMC	2.4000	19.2000	2.4000	19.2000
	글리세린지방산에스테르혼합제	0.2400	1.9200	0.2400	1.9200
	이산화티타늄	0.5200	4.1600	0.5200	4.1600
	치자황색600	0.1950	1.5600	0.1950	1.5600
	치자블루에스티	0.0715	0.5720	0.0715	0.5720
합 계		100	800	100	800



그림 2-5. 임상용 시제품.

**다. 비타민나무 잎 열수 추출분말을 사용한 제품개발**

**(1) 방법**

(가) 비타민나무 잎 열수 추출분말을 활용한 제품개발은 “Target 시장 설정 → 제품 유형 설정 → 배합비 설정 → 디자인 설정 → 제품제조” 순으로 개발하였다.

**(2) 결과**

(가) Target 시장 및 제품 설정

비타민나무 잎 추출분말을 활용한 제품의 경우 국내에서는 효능 광고 등 어려움이 있으며 시장규모도 해외시장보다는 작은 것으로 판단되어, 개발을 해외(중국)시장을 Target으로 선정하였다. 또한 제품은 중국인들이 쉽게 섭취가능하며 선호하는 정제 타입으로 결정하였다.

시장	주요 장·단점
국내시장	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 건강기능식품으로 제조는 어려우나 식품유형으로 건강지향 식품으로 제조 가능</li> <li>- 효능 등 광고에 어려움 있음</li> <li>- 많은 업체에서 관심은 있으나 개별인정형 원료로 요구</li> <li>- 개별인정형 원료로 개발하기 까지는 인체시험 등 필요</li> </ul>
해외시장 (중국)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 한국 식품, 건강지향식품, 건강기능식품에 대한 관심 및 수요가 높음</li> <li>- 건강지향식품의 경우 분말스틱, 정제 등 가공가능</li> <li>- 국내 국제보세, 사후면세점 및 중국내 면세점 등 국내 제품의 수출 시장 규모가 확대되고 있는 추세.</li> <li>- 중국인 선호 제품의 경우 간보호, 피로회복, 면역증진 등 제품으로 본 제품의 육체적 스트레스가 중국인 선호 기능 중 하나임.</li> <li>- 건강지향식품의 효능 광고가 어느정도 허용</li> <li>- 시장 진입이 어려우나, 진입 후 많은 판매가 예상됨.</li> </ul>

(나) 배합비 설정

비타민나무 잎 추출분말을 활용한 중국수출용 제품은 육체적 피로 및 간보호를 컨셉으로하여 비타민나무 잎 추출분말, 헛개나무열매 추출분말을 주재료로 하여 배합비를 설정 후 500mg 정제로 1일 1회 2정을 섭취하는 제품으로 생산하였다.

표 2-11. 비타민나무 잎 추출분말을 활용한 제품의 배합비

원료명	배합비(%)	함량(%)
비타민나무추출물	20.000	100.00
헛개나무열매추출분말	21.000	105.00
키토올리고당(70%)	7.100	35.50
비타민 B1염산염	0.320	1.60
비타민 B2	0.320	1.60
비타민 B6염산염	0.500	2.50
비타민 B12혼합제제	0.009	0.05
판토텐산칼슘	1.000	5.00
니코틴산아미드	1.200	6.00
비타민 C	5.000	25.00
녹차씨추출분말	1.000	5.00
밀크씨슬추출분말	0.500	2.50
결정셀룰로오스	14.996	74.98
말토덱스트린	20.000	100.00
정제포도당	5.700	28.50
히드록시프로필메틸셀룰로오스	0.550	2.75
스테아린산마그네슘	1.000	5.00
구연산	0.900	4.50
클리세린	0.005	0.03
합계	101.100	505.50

(다) 디자인 설정

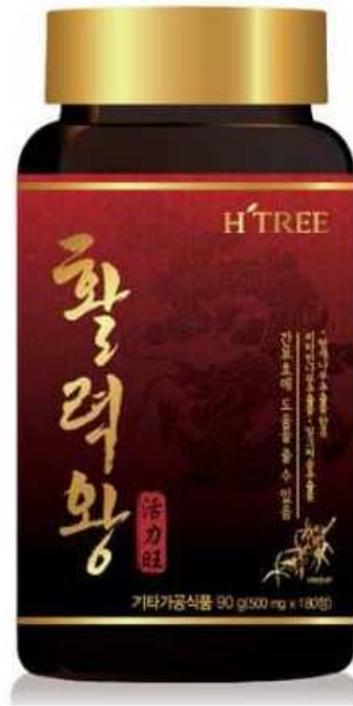
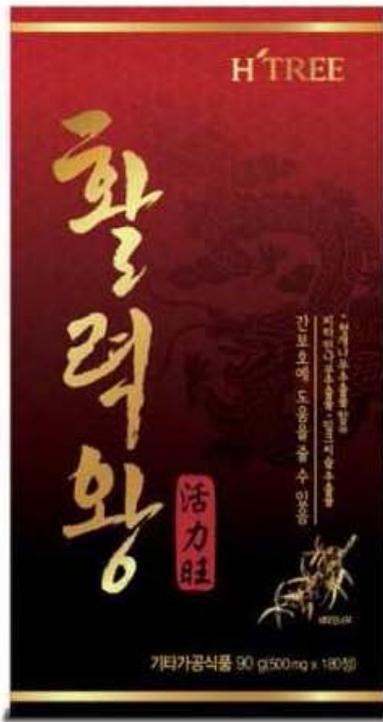
비타민나무 잎 추출분말 활용 제품의 디자인은 중국 수출용으로 중국인들이 선호하는 디자인으로 개발하였다.



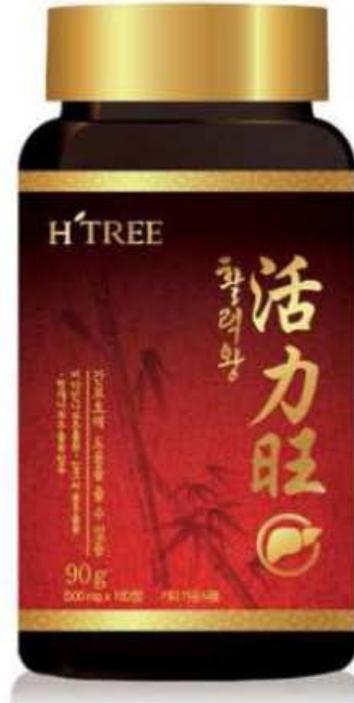
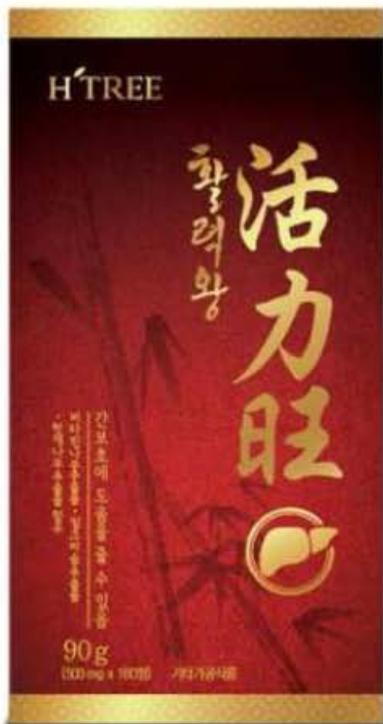
<검토시안 A-1>



<검토시안 A-2>



<검토시안 B>



<검토시안 C>

제품의 시안은 검토회 B와 C의 장점을 살려 선정하였다.

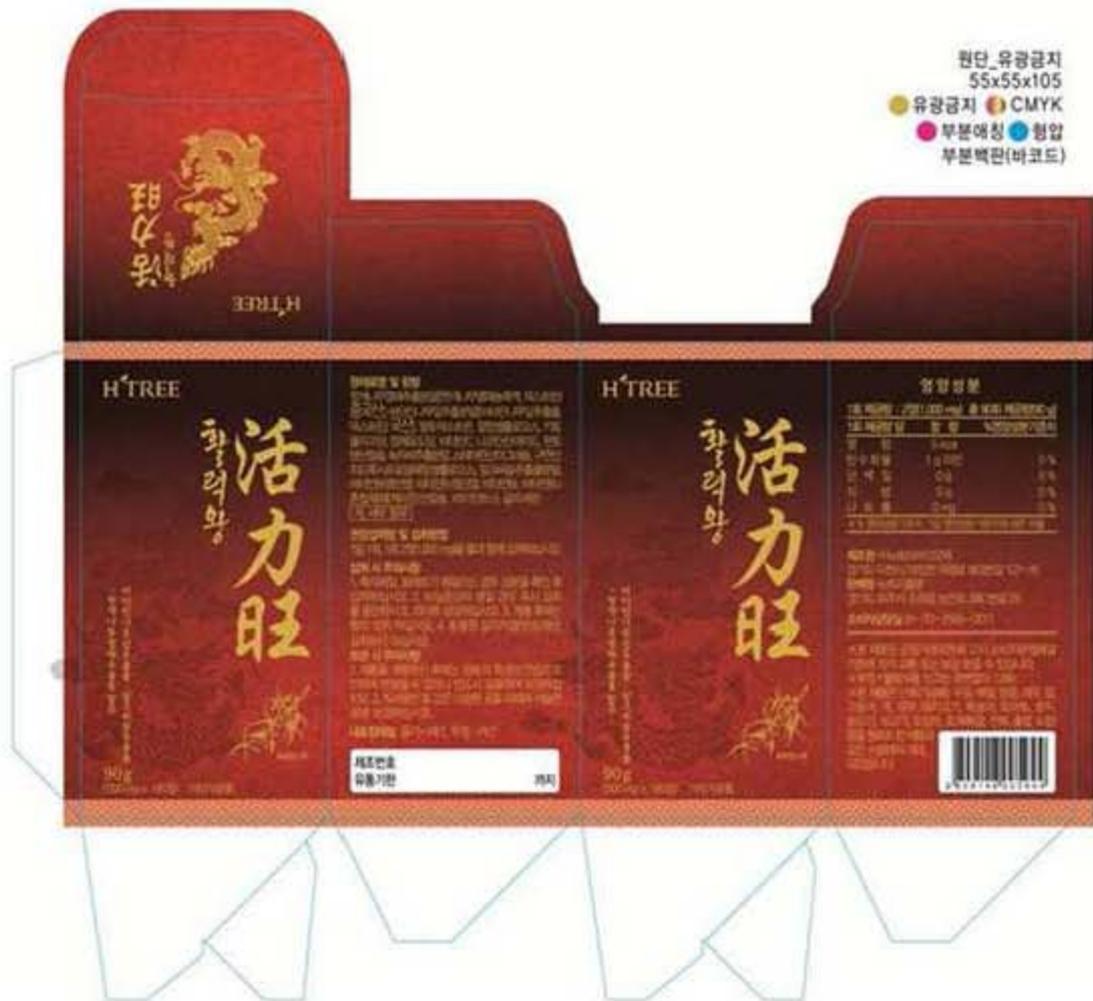


그림 2-6. 활력왕 표지디자인.

(라) 제품런칭

활력왕 제품은 신규브랜드 진입시 제품 판매 등 어려움이 예상되어, (주)뉴트리바이 오텍의 수출 브랜드인 "H-Tree" 라인으로 런칭하였다. 또한 1차로 국내 국제보세 제주점에 입점하였으며, 2016년 상반기에 국제보세 동대문점에 입점할 예정이며, 2016년 중국내 면세점에 입점할 예정이다.

<제주 국제보세 입점 사진>



그림 2-7. 활력왕 제주 국제보세전시장 입점사진.

<제주 국제보세 전경>



그림 2-8. 제주 국제보세 전시장 전경.

3. 결론

비타민나무 잎 열수 추출분말을 활용한 건강기능식품 및 건강지향식품의 제형 적용성 연구는 경질캡슐, 정제, 연질캡슐, 액상에 대하여 수행하였다. 고상제품 및 액상제품 모두 안정성을 확인하였으며, 제형특성에 문제가 없는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 비타민나무 잎 열수 추출분말을 활용한 다양한 제형의 건강지향식품 및 건강기능식품을 제조할 수 있는 것을 확인하였다. 또한 산업화를 위하여 중국 수출용 제품을 생산하여 제주 국제보세전시장에 입점하였다.

# 제 3 절. 비타민나무 잎 시제품 개발을 위한 유통기한 설정 (주관기관 : (주)뉴트리플랜 강남길)

## 1. 서론

## 2. 방법 및 결과

### 가. 실험방법

#### (1) 재료

유통기한 설정에 사용된 시료는 비타민나무 잎 열수추출분말을 식품용 POLE ETHYLENE 포장(밀폐포장)에 100g 단위로 포장된 상태로 각 온도 항온기에 저장하였으며, 저장한 시료는 측정시기마다 항온기에서 수거한 후 즉시 실험에 이용하였다.

#### (2) 분석 항목 설정

시료의 분석항목은 식품 및 건강기능식품 유통기간 설정 가이드라인을 참고하여 선정한 것으로 표에 나타나있다. 분석항목 중 성상, 대장균군 분석은 각 포인트별로 1회 분석만 하였으며, 지표성분 함량은 3반복으로 실험을 진행하였다.

분류	실험항목
관능	성상
이화학	quercetin+keampferol+isorhamnetin 합
미생물	대장균군

#### (3) 실험 방법

성상, 대장균군, 지표성분인 quercetin+keampferol+isorhamnetin 합 함량의 실험방법은 식품공전 및 건강기능식품공전 방법에 준하여 분석하였다.

검사항목	실험방법
성상	식품공전 제9. 일반시험법 성상시험법(관능시험법)
지표성분	건강기능식품공정 제 4. 3-66 플라보놀배당체
대장균군	식품공전 제9. 일반시험법 3.7 대장균군

#### (가) 성상

성상은 식품공전과 한국표준색표(산업자원부 기술표준원)을 참고하여 측정함

#### (나) 플라보놀 배당체

##### ① 회석용액 조제

에탄올, 물, 염산을 50 : 20 : 8의 부피로 회석용액을 제조하여 200 mL 메스실린더에 에탄올 100 mL를 넣은 후 증류수 40 mL를 넣고, 조심스럽게 염산 16 mL를 넣는

다.

② 표준용액의 조제

㉠ 퀘르세틴 이수화물 100 mg을 정밀하게 칭량하여 100 mL 부피플라스크에 취한 후 메탄올을 가하여 정용한다[퀘르세틴 이수화물(mg) × 302/338 = Quercetin(mg)].

㉡ 캄페롤 100 mg을 정밀하게 칭량하여 100 mL 부피플라스크에 취한 후 메탄올을 가하여 정용한다.

㉢ 이소람네티 25 mg을 정밀하게 칭량하여 100 mL 부피플라스크에 취한 후 메탄올을 가하여 정용한다.

㉣ 위의 표준원액을 메탄올로 적정농도로 희석하여 표준용액으로 사용한다.

③ 비타민나무 플라보놀 배당체(캄페롤, 퀘르세틴, 이소람네티) 시험용액 제조

㉠ 비타민나무 열수 추출물 약 300 mg을 칭량하여 가수분해용 삼각플라스크에 취한 후 10 mL 희석용액을 가한다.

㉡ 90°C 수용상에서 1시간 동안 가수분해한다.

㉢ 위의 용액을 50 mL 부피플라스크에 넣은 후 메탄올로 표선까지 맞춘다.

㉣ 위의 시험용액을 0.45 μm 멤브레인 필터로 여과하여 시험용액으로 한다.

④ 기기분석

㉠고속액체크로마토그래피 조건

항목	조건
주입량	20 μL
검출기 파장	370 nm
컬럼온도	35°C
이동상	A : 0.1% phosphoric acid , B : 메탄올
유속	1.0 mL/분

㉡ 이동상 조건

시간(분)	이동상(%)	
	A	B
0-8	35	65
8-38	35-50	65-50
38-40	50-100	50-0
40-50	100-35	0-65
50-51	35	65
51-55	35	65

⑤ 계산

지표성분 함량은 캄페롤, 퀘르세틴, 이소람네티의 합으로 계산하였다.

$$\text{각각의 지표성분 함량(mg/g)} = \frac{A \times B \times C \times D}{E}$$

A : 시험용액중의 각각의 지표성분의 농도(mg/mL)

B : 시험용액 전량(mL)

C : 희석배수

D : 전환 계수(kaempferol= 2.588, quercetin = 2.504, isorhamnetin = 2.437)

E : 시료무게(g)

(다) 대장균군

- ① 접체 10~25g에 0.85% 멸균생리식염수(x9)를 넣고 120초간 균질화한다.
- ② BGLB배지 2개에 시료액 1ml씩 접종하여 35±1℃에서 48±3hr 배양한 후 가스 발생 유무를 확인한다. (추정시험)
- ③ 가스발생시 EMB 평판배지에 희석 접종하여 35±1℃에서 24±2hr 동안 배양한 후 전형적인 집락을 확인한다. (확정시험)
- ④ 전형적인 집락 확인 후 유당부 이온발효관과, 보통한천사면배지에 이식하여 35±1에서 48±3시간 동안 배양한다.
- ⑤ 배양 후 가스를 발생한 발효관에 해당하는 한천사면배지의 집락에 대하여 그람 염색을 실시하고 그람음성, 무아포성 간균이 증명되면 완전시험 양성, 대장균군 양성으로 판정한다. (완전시험)

(라) 온도 조건 설정 및 저장 중 측정시기

비타민나무 잎 추출분말 유통기한 설정을 위한 저장 온도조건 및 저장 중 측정시기는 표 2-4과 같다. 시료는 25℃, 35℃, 40℃로 설정된 항온기에 저장하여 연구를 진행하였다.

저 장 조 건	측 정 시 기 (개월)
25℃ ± 2℃	0, 1, 2, 3, 4, 5, 6
35℃ ± 2℃	0, 1, 2, 3, 4, 5, 6
40℃ ± 2℃	0, 1, 2, 3, 4, 5, 6

(마) 품질한계

비타민나무 잎 추출분말의 유통기간 설정을 위하여 분석을 실시한 항목은 정상, 지표성분 함량, 대장균군이며, 이 중 품질지표로 설정이 가능한 항목은 지표성분 함량이다.

건강기능식품 제품의 기능성분 규격은 일반적으로 표시량의 80~120%으로 설정하므로 표시량이 정해지지 않은 본 제품은 초기값을 기준으로 초기값의 80%를 품질한계로 설정하였다.

(바) 통계처리방법 및 유통기간 예측방법

온도에 의한 가속시험에서 가장 널리 사용하는 수명-스트레스 관계 해석기법은 아레니우스모델(Arrhenius Model)이다. 이 모델은 액체, 기체, 고체의 화학반응시 발생하는 활성화에너지와 온도의 반응률로 나타난 것으로 아래와 같은 여러 가지 수식으로 로그 변환하여 수명 예측에 적용된다.

① 품질지표의 반응차수 결정

각 저장 온도별 품질지표의 반응속도 및 반응속도상수를 산출하여 품질지표의 반응차수를 결정한다.

㉞, ㉟ 식을 이용하여 각 항목의 0차, 1차 반응식을 산출한다.

㉞ $A = A_0 + kt$	㉟ $\ln A = \ln A_0 + kt$
A : t시간 후의 측정값	A : t시간 후의 측정값
$A_0$ : $t_0$ 시간에서 측정값	$A_0$ : $t_0$ 시간에서 측정값
k : 반응속도상수	k : 반응속도상수
t : 반응시간(유통기간)	t : 반응시간(유통기간)

② 온도 영향에 따른 활성화 에너지 산출

품질지표의 온도의존성 분석을 위하여 ㉟식(Arrhenius식)을 변형한 식에 따라 1차 선형 회귀분석법으로  $\ln K$ (y축),  $1/T$ (x축)으로 얻은 직선의 기울기로부터 ㉟식을 이용하여 활성화에너지를 구한다.

㉟ $K = Ae^{-E_a/RT}$	㉟ $E_a = -\text{Slope} \times R$
$\leftrightarrow \ln K = -(E_a/R)(1/T) + \ln A$	
A : 아레니우스 상수	A : 아레니우스 상수
$E_a$ : 활성화에너지(cal/mol)	$E_a$ : 활성화에너지(cal/mol)
R : 기체상수(1.986cal/mol)	R : 기체상수(1.986cal/mol)
T : 절대온도	
K : 반응속도상수	

③ 반응속도상수 산출

㉟식(변형 아레니우스식)에 따라 시험하지 않은 온도구간의 회귀방정식 추정을 통해 반응속도상수를 산출한다.

$$\textcircled{마} \text{ LnK} = -(E_a/R)(1/T) + \text{LnA}$$

A : 아레니우스 상수

E<sub>a</sub> : 활성화에너지(cal/mol)

R : 기체상수(1.986cal/mol)

T : 절대온도

K : 반응속도상수

#### ④ 유통기간의 산출

국내유통온도를 적용하여 각 온도에 노출되는 기간을 산정한 후 해당제품의 유통기간을 산출한다.

실온유통제품을 위한 실제 국내 유통온도 및 시간을 파악하기 위하여 2015년도 기상청 자료를 참조한다.

2015년 국내 주요 지역 월별 기온											(단위 : °C)	
	1월	2월	3월	4월	5월	6월	7월	8월	9월	10월	11월	12월
서울	-0.9	1.0	6.3	13.3	18.9	23.6	25.8	26.3	22.4	15.5	8.9	1.6
인천	-0.8	1.2	5.4	12.5	17.0	21.8	24.5	25.8	22.5	16.0	9.4	2.4
대전	0.0	1.9	7.2	13.3	19.5	23.4	25.4	26.4	21.7	15.5	10.1	3.1
대구	2.3	3.8	9.2	14.6	21.7	22.9	25.0	26.0	20.6	15.8	11.0	4.5
광주	1.7	3.0	8.0	13.9	19.4	22.5	25.4	26.0	22.0	16.9	11.6	5.3
울산	3.5	4.5	8.9	13.8	20.0	21.5	24.4	26.4	21.1	16.6	12.4	6.5
부산	4.7	5.4	9.5	13.9	18.8	21.0	23.9	26.1	22.1	18.1	13.6	7.9
강릉	2.2	3.1	8.2	12.1	20.0	21.0	23.8	25.8	20.2	16.0	9.9	4.9
제주	7.4	7.3	10.4	15.1	18.8	22.0	25.6	26.4	23.2	19.2	15.2	10.0
평균	2.2	3.5	8.1	13.6	19.3	22.2	24.9	26.1	21.8	16.6	11.3	5.1

1, 2, 3, 12월(4개월:121일)의 평균기온은 10°C이하였으며, 4, 11월(2개월:61일) 11~14°C, 5, 10월(2개월:61일) 16~19°C, 6, 9월(2개월:60일) 21~23°C, 7, 8월(2개월:62일) 25~26°C인 것으로 나타났다.

따라서 연간 온도별 유통시간을 아래와 같이 정리할 수 있다.

연간 온도별 유통시간					
온도	10°C	15°C	20°C	25°C	30°C
시간	121일	61일	61일	60일	62일

## 나. 결과

### (1) 제품저장에 따른 품질변화

#### (가) 색상

저장 초기의 비타민나무 잎 추출분말 색상은 '고유의 향미를 가진 연한 황갈색의 미세 분말'이었다. 6개월간 측정된 결과, 저장기간 및 저장온도에 따른 색상 변화는 관찰되지 않아 비타민나무 잎 추출분말의 색상이 일정한 수준으로 유지되는 것이 확인되었다.

표 3-1. 비타민나무 잎 추출분말 저장 중 색상 결과

항목	저장기간 (개월)	저장온도		
		25℃	35℃	40℃
	0	고유의 향미를 가진 연한 황갈색의 미세 분말		
색상	1	변화없음	변화없음	변화없음
	2	변화없음	변화없음	변화없음
	3	변화없음	변화없음	변화없음
	4	변화없음	변화없음	변화없음
	5	변화없음	변화없음	변화없음
	6	변화없음	변화없음	변화없음

#### (나) 지표성분 함량

비타민나무 잎 추출분말의 지표성분은 건강기능식품 중 은행잎추출물의 지표성분으로 오랜기간 동안 은행잎추출물 건강기능식품이 생산, 판매되고 있어 안정성이 높을 것으로 예상되었다.

비타민나무 잎 추출분말의 저장 중 지표성분의 함량 변화는 다음 표에 나타나 있다. 저장 중 지표성분 함량은 저장기간이 길어질수록, 저장온도가 높아질수록 감소하는 경향을 나타냈다.

표 3-2. 비타민나무 잎 추출분말 저장 중 지표성분 함량의 변화

항목	저장기간 (개월)	저장온도		
		25℃	35℃	40℃
지표성분 함량 ( $\mu\text{g/g}$ )	0		13.3917 $\pm$ 0.046	
	1	14.2148 $\pm$ 0.447	13.8605 $\pm$ 0.156	13.6094 $\pm$ 0.077
	2	13.5936 $\pm$ 0.208	13.5376 $\pm$ 0.153	13.0462 $\pm$ 0.124
	3	14.2377 $\pm$ 0.040	13.8020 $\pm$ 0.302	13.1787 $\pm$ 0.076
	4	13.9576 $\pm$ 0.070	13.5897 $\pm$ 0.036	12.9813 $\pm$ 0.123
	5	13.8484 $\pm$ 0.256	13.4921 $\pm$ 0.320	12.8554 $\pm$ 0.136
	6	13.0478 $\pm$ 0.326	12.7687 $\pm$ 0.162	12.1913 $\pm$ 0.095

(다) 미생물 측정 결과

대장균군은 저장기간 동안 모든 온도구간에서 음성으로 확인되었다.

표 3-3. 비타민나무 잎 추출물의 저장 중 대장균군 측정 결과

항목	저장기간 (일)	저장온도		
		25℃	35℃	40℃
대장균군	0		Negative	
	1	Negative	Negative	Negative
	2	Negative	Negative	Negative
	3	Negative	Negative	Negative
	4	Negative	Negative	Negative
	5	Negative	Negative	Negative
	6	Negative	Negative	Negative

(2) 유통기한 예측

(가) 품질지표의 반응차수 결정

비타민나무 잎 추출분말의 저장 중 지표성분의 온도별 반응속도상수는 다음과 같다. 반응속도상수 측정결과 지표성분의 0차 방정식의 상관계수가 가장 높게 나타났다. 따라서 유통기간의 예측은 지표성분의 0차 반응식을 사용하여 비타민나무 잎 추출분말의 유통기간을 예측하였다.

표 3-4. 저장온도별 반응속도상수

측정 항목	반응차수	온도(℃)	회귀방정식	상관계수(R <sup>2</sup> )
지표성분	0차	25	$y = -0.0500x + 13.906$	0.0488
		35	$y = -0.0912x + 13.765$	0.2432
		<b>40</b>	<b><math>y = -0.1848x + 13.591</math></b>	<b>0.7514</b>
	1차	25	$y = -0.0037x + 2.6321$	0.0504
		35	$y = -0.0069x + 2.3224$	0.2479
		40	$y = -0.0143x + 2.6101$	0.7468

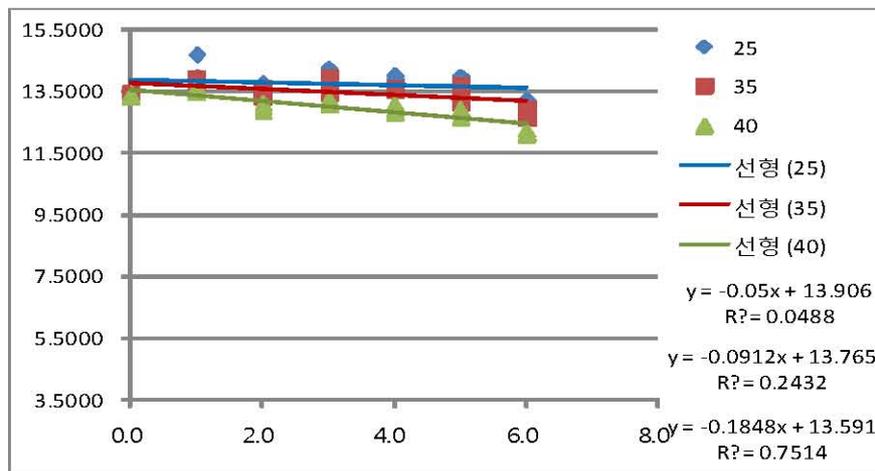


그림 3-1. 지표성분의 0차 회귀방정식.

표 3-5. 저장기간 내 온도별 지표성분 측정 결과 (0차)

저장기간(개월)	저장온도		
	25℃	35℃	40℃
0	13.3570	13.3570	13.3570
	13.4439	13.4439	13.4439
	13.3743	13.3743	13.3743
1	14.0031	13.9457	13.6200
	14.7284	13.6808	13.6800
	13.9128	13.9550	13.5281
2	13.7829	13.6085	13.1586
	13.3702	13.3615	12.9133
	13.6277	13.6427	13.0668
3	14.2476	13.9483	13.1764
	14.1937	13.4549	13.2554
	14.2717	14.0028	13.1042
4	13.9400	13.6243	13.1040
	13.8979	13.5522	12.9814
	14.0348	13.5926	12.8584
5	13.5539	13.6306	12.9601
	14.0132	13.1257	12.9040
	13.9782	13.7199	12.7022
6	13.2546	12.9556	12.2984
	12.6719	12.6883	12.1187
	13.2170	12.6621	12.1569

(나) 온도 영향에 따른 활성화 에너지 산출 결정

지표성분의 0차 회귀방정식을 통해 각 온도별 반응속도상수를 파악하고 이를 토대로 온도와 반응속도 간의 회귀방정식을 산출한다.

이를 통해 지표성분의 활성화에너지는 15349.162(Kcal/mol), 온도와 반응속도간 방정식은  $\text{LnK} = -7724.79x + 22.87$ 임을 알 수 있다.

표 3-6. 온도와 반응속도간 방정식 산출

온도	온도(T)	1/T(x축)	K	LnK(y축)	$\text{LnK} = -(Ea/R)(1/T) + \text{LnA}$
25℃	298	0.00336	0.0500	-2.9954	$\text{LnK} = -7724.79x + 22.87$ $Ea(\text{Kcal/mol}) = 15349.162$
35℃	308	0.00325	0.0912	-2.3946	
40℃	313	0.00319	0.1848	-1.6886	

(다) 실험하지 않은 온도구간의 반응속도상수(K) 산출

(나)에서 구한 온도와 반응속도 간 방정식을 이용하여 실험하지 않은 온도 구간의 반응속도상수를 산출한다.

표 3-7. 온도별 반응속도상수(K) 산출

(저장온도)	온도(T)	1/T(x축)	K	LnK(y축)
10℃	283	0.00353	0.0119	-4.4281
15℃	288	0.00347	0.0192	-3.9542
20℃	293	0.00341	0.0303	-3.4965
25℃	298	0.00336	0.0500	-2.9954
30℃	303	0.00330	0.0723	-2.6264

(라) 유통기간 예측

온도별 반응속도상수와 국내 온도별 유통기간을 토대로 지표성분의 연간변화량을 산출한다. 산출 결과 지표성분 함량은 연간 약 0.3914 감소하는 것으로 나타났다. 이에 따라 지표성분 함량이 품질한계(초기값의 80%)에 도달하는데 걸리는 시간은 약 81개월이다. 따라서 비타민나무 잎 추출분말의 유통기간 중 안정함을 확인하였으며, 이때 유통기한은 6년까지 가능하였다.

표 3-8. 지표성분의 연간변화량 산출

저장온도	국내온도별 유통기간	반응속도상수(-K)	연간변화량(%)
	A	B	A × B
10	4개월(121일)	-0.0119	-0.0477
15	2개월(61일)	-0.0192	-0.0383
20	2개월(61일)	-0.0303	-0.0606
25	2개월(60일)	-0.0500	-0.1000
30	2개월(62일)	-0.0723	-0.1447
누 계	12개월(365일)		-0.3914

표 3-9. 유통기간 산출

최초함량	최소기준치	연간변화량	A-B	유통기간 산출
A	B	C		(A-B)/C×12
13.357	10.686	0.3914	2.671	81.90

## 제 4 절. 비타민나무 추출물의 효능 연구

(위탁기관 : 경희대학교 이정민)

### 1. 연구의 필요성 및 연구 목적

- 질병은 흡연, 음주, 약물, 환경 오염물질, 자외선, 식습관 등의 외부요인이나 세포 내 에너지대사 과정에서 체내에 생성된 자유 라디칼(free radical) 또는 활성산소종(Reactive Oxygen Species, ROS)의해 발생하는 세포 손상이나 세포 내 산화적 손상이 근본적인 메카니즘으로 먼저 나타난다.
- 산화적 스트레스는 생체 내 지질과산화물을 유도하고 인체의 가장 작은 구성단위인 세포를 비롯하여, 단백질성분인 피부 등의 모든 조직에 손상을 주며 유전자 정보를 담아두는 DNA를 공격하여 유전자의 변형을 초래해 세포막의 형성과 안정화를 방해하여 각종 질환의 원인이 된다.
- 최근 이러한 반응성이 강한 활성 산소를 조절하거나 제거할 수 있는 항산화제에 관한 연구가 활발하게 진행되고 있으며 특히 항산화 기능성 물질에 관한 연구와 새로운 항산화제 개발에 대한 관심이 증가하고 있다.
- 활성산소종은 체내 항산화 방어 체계에 의해 제거되어 균형을 유지하여 세포를 보호하는 역할을 하고, 체내에는 항산화 효소계인 superoxide dismutase(SOD), catalase(CAT), glutathione peroxidase(GSH-Px), glutathione S-transferase(GST) 등이 존재하여 인체를 보호하는 것으로 알려져 있다.
- 정신적/육체적 피로에 의해 미토콘드리아의 호흡량이 증가하게 되고 이로 인해 부수적으로 증가되는 활성산소에 의하여 산화적 스트레스가 심화되어 세포 및 조직 손상을 일으킬 수 있다. 체내의 항산화 효소의 활성 증진은 이러한 산화적 스트레스에서 세포와 조직의 손상에 대한 저항성을 증가시킬 수 있다.
- 본 연구에서는 비타민나무 열매 및 잎을 대상으로 항산화 효능을 규명하고, 안전성 평가를 통해 추후 육체적/정신적 피로개선에 도움이 되는 기능성 식품의 소재화에 대한 가능성을 규명하고자 한다.

## 2. 비타민나무(갈매보리수나무) 열매와 잎의 항산화 효과 연구(1차년도)

### 가. 방법

#### (1) 재료 및 시약

ABTS(2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid))와 DPP H(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2-5-diphenyltetrazoliumbromide), potassium persulfate, DMSO는 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였으며, 세포배양에 사용된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium), FBS(fetal bovine serum), 0.25% trypsin-EDTA 및 antibiotics는 Thermo scientific(Hyclone, MA, USA)에서 구입하였다. 모든 시약 및 용매는 일급 또는 특급 이상의 등급을 사용하였다.

#### (2) ABTS 라디칼 소거능 측정

ABTS 라디칼 소거능 활성은 Re 등의 방법을 변형하여 측정하였다. Potassium phosphate buffer 용액(pH 7.4)에 7.4 mM ABTS와 2.6 mM potassium persulfate을 용해시켜 ABTS+ 라디칼 용액을 만들었으며, 96-well plate 각 well에 제조된 ABTS+ 라디칼 용액 180  $\mu$ L와 비타민 나무 추출물 20  $\mu$ L를 넣어 잘 혼합하여 실온에 30분간 반응시킨 후 732 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 ABTS 라디칼 소거능은 아래의 식으로 계산하여 백분율로 나타내었다.

$$\text{ABTS 라디칼 소거능 (\%)} = \frac{\text{대조구흡광도} - \text{시료첨가구흡광도}}{\text{대조구흡광도}} \times 100$$

#### (3) DPPH 라디칼 소거능 측정

DPPH 라디칼 소거능 측정은 Blois의 방법을 변형하여 측정하였다. 96-well plate에 비타민 나무 추출물 100  $\mu$ L에 200  $\mu$ M DPPH 용액 100  $\mu$ L를 첨가하여 상온에서 30분간 반응시킨 후 microplate reader를 사용하여 515 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 DPPH 라디칼 소거능은 아래의 식으로 계산하여 백분율로 나타내었다.

$$\text{DPPH 라디칼 소거능 (\%)} = \frac{\text{대조구흡광도} - \text{시료첨가구흡광도}}{\text{대조구흡광도}} \times 100$$

#### (4) 세포배양

본 실험에 사용된 인간 간암세포주 HepG2는 ATCC(American type culture collection)에서 구입하였으며, 10% FBS와 penicillin(100 units/mL), streptomycin(100 g/mL)이 함유된 DMEM 배지를 사용하여 배양하였고, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% humid air로 조절된 배양기에서

배양하였다.

#### (5) 비타민나무 추출물의 세포 독성

세포 생존율은 Mosmann 방법을 변형하여 측정하였다. HepG2세포를  $1 \times 10^4$  cells/well 농도로 96-well plate에 분주하여 24시간 동안 배양한 후, 각 well에 비타민나무 추출물을 농도별로 분주하여 24시간 배양시켜 비타민나무 추출물의 독성을 살펴보았다. 24시간 후, MTT 용액 500  $\mu\text{g/mL}$ 을 첨가하고 4시간 동안 배양한 후, 배지를 제거하고 DMSO 200  $\mu\text{L}$ 를 첨가하여 560 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### (6) $\text{H}_2\text{O}_2$ 에 의한 산화적 스트레스 유발 및 비타민나무 추출물 처리

6 well plate에 HepG2 세포를  $3 \times 10^5$  cells/well 농도로 분주하여 24시간 동안 배양한 후, 각 well에  $\text{H}_2\text{O}_2$  200  $\mu\text{M}$ 와 비타민나무 추출물 처리하여 24시간 배양시켰다. 그 후 0.25% trypsin-EDTA로 세포를 분리하여 원심분리한 후 PBS에 2회 세척 후 Protein lysis buffer(50mM Tris-HCl(pH7.5), Triton X-100 1%, 150mM NaCl 0.5%, NP<sub>4</sub>O 1%, SDC 0.5%, SDS 0.1%)를 처리하여 4°C에서 용해시킨 후 원심 분리하여 단백질을 분리하였다. 분리한 단백질을 이용하여 항산화 효소 활성을 측정하였으며 단백질 정량을 통하여 결과값을 보정하였다.

#### (7) 항산화 효소 활성 측정

항산화 효소인 SOD(Superoxide dismutase), GPx(Glutathione peroxidase), catalase(CAT)의 활성을 측정하였다. SOD 활성은 SOD assay Kit-WST(Dojindo, Kumamoto, Japan)를 이용하여 측정하였다. 96 well plate에 샘플을 넣고 WST-1(2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, mono-sodium salt)과 xanthine oxidase working solution을 첨가한 후 37°C에서 20분간 배양하여 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. GPx 활성은 Glutathione peroxidase activity assay kit(BioVision Inc., CA, USA)를 이용하여 측정하였다. 96 well plate에 NADH, Glutathione, Glutathione reductase용액을 첨가한 후 340nm에서 흡광도의 변화값을 측정하였다. CAT는 Catalase assay kit(BioVision Inc., CA, USA) 이용하여 활성을 관찰하였다.  $\text{H}_2\text{O}_2$ 를 기질로 사용하여 반응되는 변화값을 570nm에서 사용하였다. 모든 항산화 활성의 결과 값은 총 단백질 양을 보정하여 비교하였다.

### 나. 결과

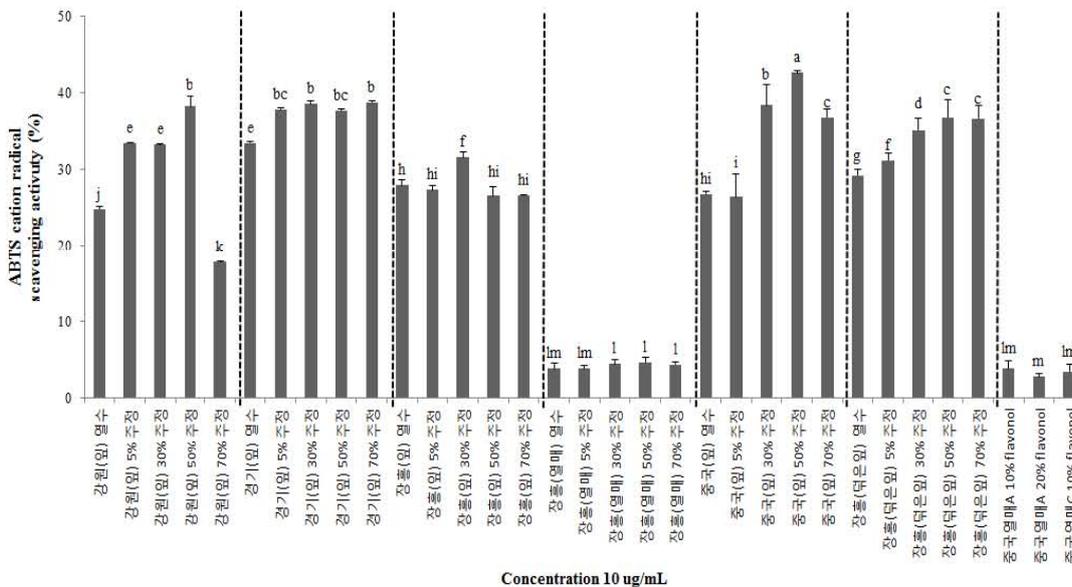
#### (1) ABTS 라디칼 소거능

ABTS는 양이온 라디칼(cation radical)로 유리기(hydroxyl, peroxy, alkoxy)들과 반응하

여 상대적으로 안정한 ABTS·+를 형성함. 항산화 물질과 반응하여 청록색이 탈색되어 흡광도 값을 변화시켜 항산화능을 측정할 수 있다.

비타민나무 지역별 용매별 추출물을 각각 10 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL에서 ABTS 라디칼 소거능을 측정하였으나 50 µg/mL이상의 농도에서는 95% 이상의 활성을 보이면서 활성이 포화상태가 되어 10 µg/mL의 농도에서 측정한 결과를 제시하였다(Fig. 4-1). 지역별로 비교하였을 때 경기, 중국, 강원 지역의 라디칼 소거능이 높았다. 용매별로 비교하였을 때는 전반적으로 50%주정이나 70%주정 추출물이 높았다. 잎 추출물들의 활성이 높은 반면 열매 추출물들의 활성은 유의적으로 매우 낮았다( $p<0.05$ ).

전체를 비교하였을 때 중국 50%주정 추출물( $42.599\pm0.300\%$ )이 유의적으로 가장 높았으며 그 다음으로 강원 50%주정( $38.196\pm1.425\%$ ), 경기 5%주정( $37.825\pm0.150\%$ ), 경기 30%주정( $38.515\pm0.375\%$ ), 경기 50%주정( $37.718\pm0.150\%$ ), 경기 70%주정( $38.727\pm0.225\%$ ), 중국 30%주정( $38.408 \pm 2.626\%$ ) 추출물 군들이 군간 유의적인 차이를 보이지 않으면서, 두 번째로 유의적으로 높았다( $p<0.05$ ).



**Fig. 4-1. Effect of *Hippophae rhamnoides* L. on ABTS cation radical scavenging activity.** Values are mean  $\pm$  SD. Different letters show a significantly difference at  $p<0.05$  as determined by Duncan's multiple range test.

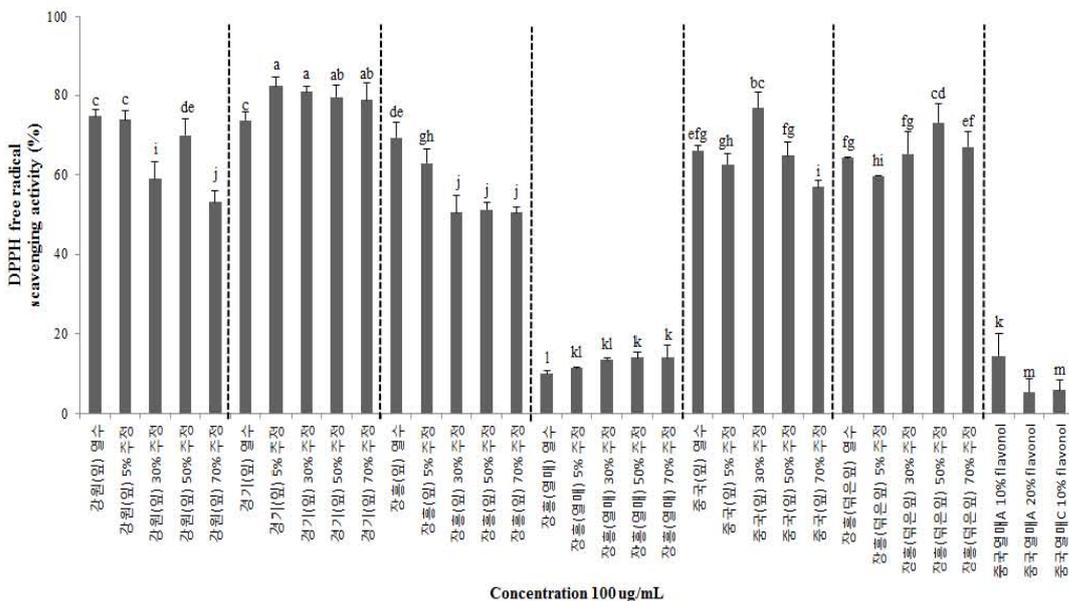
## (2) DPPH 라디칼 소거능

DPPH는 안정적인 자유 라디칼(free radical)로 함유황아미노산과 ascorbic acid, aromatic amine 등에 의해 diphenylpicrylhydrazine로 환원되어 보라색에서 무색으로 변하는 원리로 ABTS 라디칼 소거능과 함께 항산화능 측정에 유용한 방법이다. DPPH 라디칼 소거능과 ABTS 라디칼 소거능을 측정은 인위적으로 라디칼을 제거하는 작용기작으로 유의적인 상관성을 보이는 것으로 알려져 있는데 DPPH가 친수성 항산화제에 제한적으로 반응하는 반

면 ABTS는 친수성 항산화제와 소수성 항산화제 모두에서 반응을 하기 때문에 ABTS의 소거능이 높게 측정된다.

DPPH 라디칼 소거능을 측정한 결과는 Fig. 4-2와 같다. 지역별 추출물을 비교하였을 때 경기지역의 추출물이 가장 라디칼 소거능이 높았다. 경기지역 추출물들 중에서는 주정 추출물들이 유의적으로 높은 활성을 보였으나, 강원지역과 전남 장흥지역에 추출물에서는 열수 추출물이 유의적으로 가장 높은 라디칼 소거능을 보였다. ABTS 라디칼 소거능의 결과와 같이 열매 추출물들에서는 유의적으로 활성이 가장 낮았다( $p < 0.05$ ).

전반적으로 비교하였을 때 경기 5%주정(82.286±2.363%), 경기 30%주정(80.815±1.418%), 경기 50%주정(79.612±2.931%), 경기 70%주정(78.877 ±4.159%)이 서로 군 간 유의적인 차이를 보이지 않으면서 가장 높은 활성을 보였다. 다음으로 강원 열수(74.733±1.701%), 강원 5%주정(73.864 ±2.174%), 경기 열수(73.729±1.985%), 중국 30%주정(76.738±3.970%)이 서로 군 간의 유의적인 차이 없이 높은 활성을 보였다( $p < 0.05$ ).



**Fig. 4-2. Effect of *Hippophae rhamnoides* L. on DPPH free radical scavenging activity.** Values are mean ± SD. Different letters show a significantly difference at  $p < 0.05$  as determined by Duncan's multiple range test.

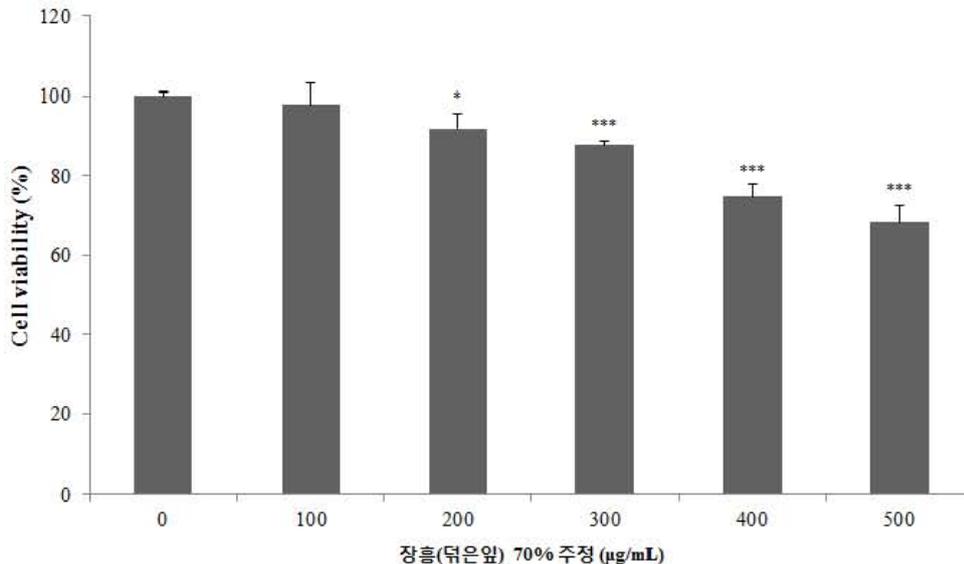
### (3) 비타민나무 추출물의 세포 독성

인체 내에서 간은 해독 및 무독화를 위한 중심적인 역할을 수행하는 중요기관으로  $H_2O_2$  로 산화적 스트레스가 유도된 간세포에서는 SOD, CAT, GSH, GPx 등의 항산화 효소가 감소된다고 알려져 있다. 따라서 이번 연구에서 산화적 스트레스의 보호 효과를 관찰하기 위하여 인체 유래 간암세포인 HepG2 세포를 사용하였다.

추후 기능성 식품으로서 개발하기 위하여 안전성이 타당한 농도에서의 효능이 입증되어

야 한다. 따라서 본 실험에 앞서 비타민나무 추출물의 안전한 농도 범위를 살펴보고자 세포 독성 시험을 진행하였다.

비타민나무 잎 및 열매의 지역별 용매별 추출물의 세포 독성을 측정한 결과 다른 추출물에서는 300 µg/mL 이상에서 유의적으로 생존율의 차이를 보였다. 하지만 전남 장흥 덕은잎 70% 주정 추출물이 200 µg/mL 이상에서 유의적으로 생존율이 감소되었다(Fig. 4-3)( $p < 0.05$ ). 이러한 결과를 바탕으로 추후 진행되는 세포실험에서는 모든 추출물의 안전한 농도인 100 µg/mL를 선택하여 항산화 효소 활성 변화를 관찰하였다.

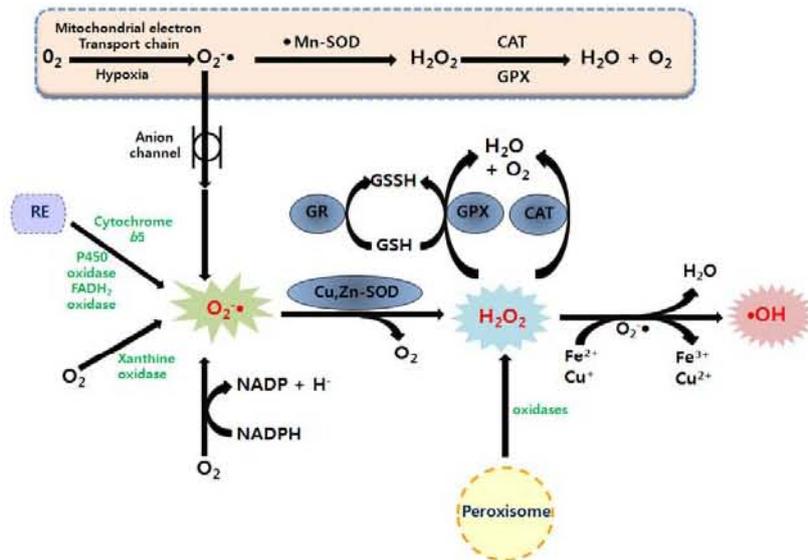


**Fig. 4-3. Viability of HepG2 cell following 24 h of treatment with different concentrations of *Hippophae rhamnoides* L..**

The results were presented mean  $\pm$  SD at least three independent experiments, each performed in triplicate (n=3). Asterisks indicate statistically significant differences from *Hippophae rhamnoides* L. 0 µg/ml group (\* $p < 0.05$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ).

#### (4) 항산화 활성 측정

항산화란 산화적 스트레스로부터 신체를 보호하는 것을 의미한다. 산화적 스트레스를 유발시키는 산화유발물질(oxidants)은 본래 영양소를 이용하여 에너지를 만드는 과정, 외부에서 침입한 박테리아나 바이러스를 파괴하는 면역반응 등과 같은 정상적인 대사과정에서 자연적으로 발생된다. 산화유발물질은 매우 불안정하여 필요 이상으로 생성 또는 축적될 경우 DNA 및 세포를 손상시키고 그 결과 노화와 만성질환을 유발하는 등 해로운 영향을 주지만 체내에는 산화유발물질을 제거해 주는 항산화 시스템(antioxidant system)이 존재하므로 크게 문제되지 않지만 노화, 심리적·환경적 스트레스, 질병, 체내 대사의 불균형 등으로 활성산소의 생성속도와 제거속도 간의 균형이 깨지는 경우 산화적 스트레스(oxidative stress)라는 문제가 발생하게 된다.



### Antioxidant enzyme system

우리 몸은 지속적으로 발생하는 활성산소를 제거하거나 손상된 세포를 치유할 수 있는 항산화 시스템을 갖추고 있다. 체내 항산화 시스템은 효소계 시스템과 비효소계 시스템으로 나뉜다. 효소계 시스템은 SOD, GPx, CAT, glutathione reductase(GR), glutathione-S-transferase(GST)와 같은 것이 있고, 비효소계 시스템으로 식이를 통하여 공급되는 비타민 A, C, E 등과 같은 항산화 비타민과 효소의 구성성분인 여러 가지 항산화 무기질 등이 이에 속한다. 이들은 우리 몸에서 생성된 활성산소를 공격성이 없는 물질로 전환시키거나 활성산소와 결합하여 활성산소를 제거하는 역할을 한다.

인체 내의 정상적인 대사 과정 중에 완전히 소비되지 않은 전자들은 독성이 강한 superoxide radical을 발생시키게 되는데 이때 체내에 존재하는 항산화 효소들은 이러한 superoxide radical(O<sub>2</sub><sup>•-</sup>)을 hydrogen peroxide(과산화수소, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)로 변환시키고, 생성된 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 다시 물(H<sub>2</sub>O)로 분해함으로써 hydroxyl radical 형성을 막아 유해한 활성산소를 제거하여 세포를 보호하는 역할을 한다.

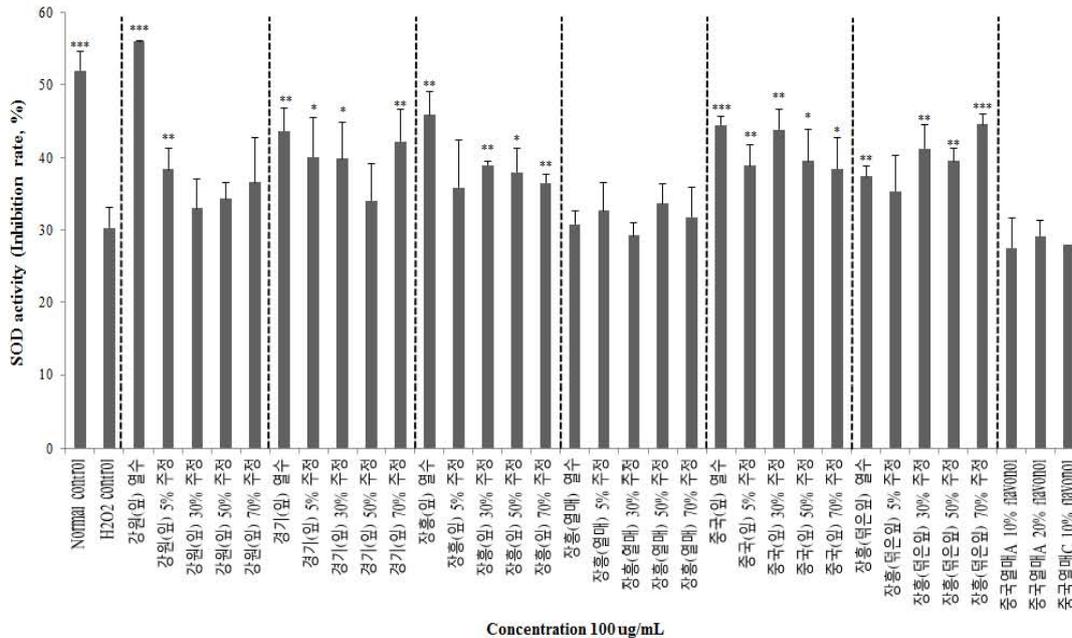
#### ① 비타민나무 추출물이 SOD 활성에 미치는 영향

SOD는  $[2O_2^{\bullet-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2]$ 의 반응을 촉매하여 효과적으로 O<sub>2</sub><sup>•-</sup>와 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 제거함으로써 활성산소종의 형성을 줄여 세포 손상에 대응하는 첫 번째 방어 역할을 하는 효소이다. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의하여 산화적 스트레스를 유발시킨 HepG2 cell에서 비타민나무 추출물의 효능을 살펴보았다(Fig. 4-4).

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리하지 않은 군(51.956±2.766%)과 비교하여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리한 군(30.286±2.857%)은 유의적으로 SOD의 활성이 낮아졌다. 강원지역의 용매별 추출물의 SOD 활성은 열수는 55.952±0.240%, 5%주정은 38.336 ±2.929%, 30%주정은 32.976±4.112%, 50%주정은 34.319±2.212%, 70%주정은 36.564±6.253%으로 열수에서 유

의적으로 가장 높은 활성을 보였고 30%주정, 50%주정, 70%주정에서는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리한 비교군과 유의적인 차이를 보이지 않았다. 경기지역은 50%주정 추출물을 제외하고 유의적으로 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>처리에 의해 감소된 SOD 활성을 증가시켰다. 전남 장흥지역은 5%주정 추출물을 제외한 군에서 유의적으로 SOD 활성을 증가시켰으며, 전남 장흥 뒀은앞에서도 5%주정 추출물을 제외한 군에서 유의적으로 SOD 활성을 증가시켰다.

반면 중국의 모든 용매 추출물에서 유의적으로 증가되었다. 라디칼 소거능의 결과와 같이 열매에서는 SOD 활성의 유의적인 변화를 보이지 않았다( $p < 0.05$ ).



**Fig. 4-4. Effect of *Hippophae rhamnoides* L. on superoxide dismutase (SOD) activity in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced HepG2 cell.**

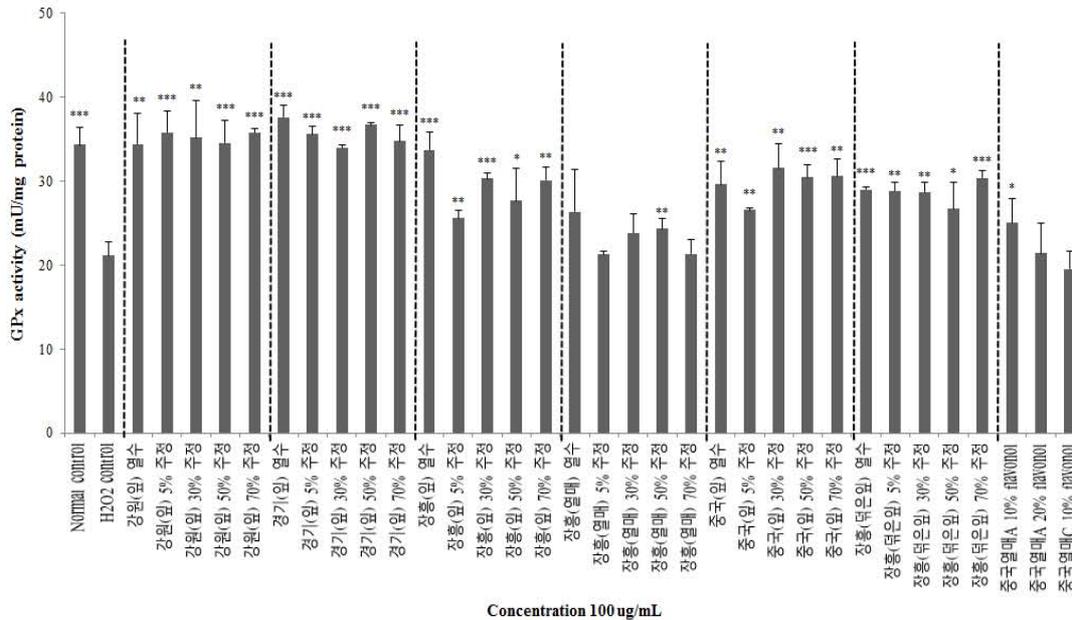
Values are mean  $\pm$  SD. Different letters show a significantly difference at  $p < 0.05$  as determined by Duncan's multiple range test.

## ② 비타민나무 추출물이 GPx 활성에 미치는 영향

SOD에 의하여 합성된 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>는 GPx에 의하여 [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+2GSH  $\rightarrow$  GSSG+ 2H<sub>2</sub>O]의 반응이 촉매되어 세포내에서의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 축적을 방지하도록 도와준다.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의하여 산화적 스트레스 유발이 일어나 정상군(34.326 $\pm$ 2.022 mU/mg protein)에 비하여 GPx의 활성이 유의적으로 감소되었다(21.137 $\pm$ 1.568 mU/mg protein). 위의 모든 지역과 용매별 추출물들은 유의적으로 감소된 GPx의 활성을 증가시켰다. 강원지역의 GPx 활성은 열수가 34.427 $\pm$ 3.604 mU/mg protein, 5%주정이 35.809 $\pm$ 2.599 mU/mg protein, 30%주정이 35.162 $\pm$ 4.477 mU/mg protein, 50%주정이 34.520 $\pm$ 2.6613 mU/mg protein, 70%주정이 5.776 $\pm$ 0.498 mU/mg protein 으로 활성이 증가되었다. 경기지역의 용매별 추출물의 각 GPx 활성은 열수 37.586  $\pm$ 1.396 mU/mg protein, 5%주정

35.621±0.935 mU/mg protein, 30%주정 34.016±0.228 mU/mg protein, 50%주정 36.717±0.171 mU/mg protein, 70%주정 34.750±1.988 mU/mg protein 으로 나타나 열수 추출물의 활성이 가장 높은 경향을 보였다. 전남 장흥지역의 용매별 추출물에서도 열수 추출물이 가장 높은 경향을 보였다. 일부 열매 추출물에서 유의적으로 증가된 결과가 있었으나 전반적으로 유의적인 차이를 보이지 않았다(Fig. 4-5.)( $p<0.05$ ).



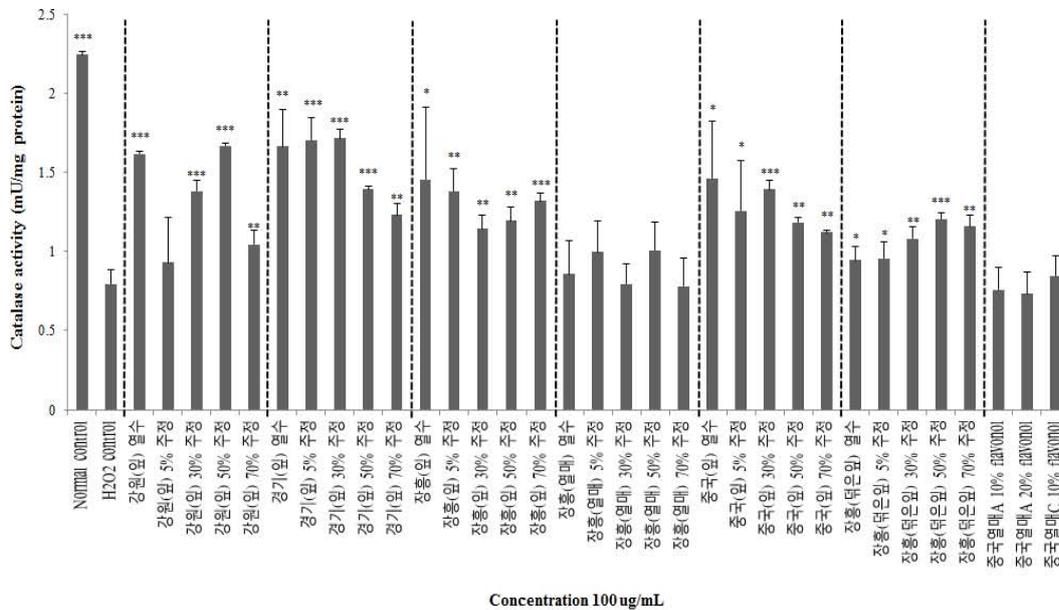
**Fig. 4-5. Effect of *Hippophae rhamnoides* L. on glutathione peroxidase (GPx) activity in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced HepG2 cell.** Values are mean ± SD. Different letters show a significantly difference at  $p<0.05$  as determined by Duncan's multiple range test.

### ③ 비타민나무 추출물이 CAT 활성에 미치는 영향

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 농도가 증가하면 CAT도 작용하여 [2H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> → 2H<sub>2</sub>O+O<sub>2</sub>]의 반응을 촉매함으로써 세포 내에서의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 축적을 방지하도록 도와준다.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리하지 않은 정상군에서는 활성이 2.246±0.017 mU/mg protein이었으나 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리한 군에서는 0.795±0.088 mU/mg protein으로 유의적으로 감소되었다. 지역별로 관찰하였을 때 경기지역의 추출물들이 전반적으로 높은 활성을 보였다(열수 : 1.667±0.232 mU/mg protein, 주정5% : 1.707±0.141mU/mg protein, 주정30% : 1.718±0.053 mU/mg protein, 주정 50% : 1.394±0.017 mU/mg protein 주정70% : 1.232 ±0.070 mU/mg protein). 강원지역 추출물은 5% 주정을 제외한 추출물들에서 유의적으로 활성을 증가시켰다(열수 : 1.618±0.017 mU/mg protein, 주정5% : 0.931±0.283mU/mg protein, 주정30% : 1.382±0.070 mU/mg protein, 주정50% : 1.668±0.017 mU/mg protein 주정70% : 1.044 ±0.088 mU/mg protein). 전남 장흥과 중국의 잎 추출물에서는 용매별로 비교하였을 때 열수 추출물이 가장 높은 활성을 보였다. CAT의 활성 변화의 결과도

열매추출물들은 유의적인 변화를 보이지 않았다(Fig. 4-6.)( $p < 0.05$ ).



**Fig. 4-6.** Effect of *Hippophae rhamnoides* L. on catalase activity in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced HepG2 cell.

Values are mean  $\pm$  SD. Different letters show a significantly difference at  $p < 0.05$  as determined by Duncan's multiple range test.

#### 다. 요약

○ 비타민나무 열매와 잎의 지역별 및 용매별 추출물의 항산화 활성을 측정 및 비교하고자 ABTs 라디칼 소거능과 DPPH 라디칼 소거능을 측정하고 산화적 스트레스를 유발시킨 HepG2 cell에서 항산화 효소 활성에 미치는 영향 관찰하였다.

○ 잎과 열매의 활성을 비교한 결과에서는 열매에 비교하여 잎에서 모든 항산화 효능이 훨씬 뛰어났음을 관찰하였다. 항산화 효소 활성 변화에 있어서는 잎 추출물들이 대부분 유의적으로 활성을 증가시켰으나 열매 추출물에서는 유의적인 변화를 관찰하기 어려웠다.

○ 지역별 활성을 비교하였을 때 경기와 강원 지역의 항산화 활성이 전반적으로 높았으며, 특히 경기지역이 라디칼 소거능과 항산화 효소 활성이 가장 높은 경향을 보였다. 반면 전남 장흥 잎과 전남 장흥 뒤은 잎은 항산화 효소 활성을 증가시켰으나 경기, 강원지역의 활성보다 낮았다.

○ 용매별 활성을 비교한 결과에서는 각 실험마다 차이를 보였다. ABTS 라디칼 소거능에서 주정 추출물들에서 활성이 좋았으나 DPPH 라디칼 소거능에서는 큰 차이를 보이지 않았고, DPPH가 친수성 항산화제에 제한적으로 반응하므로 이러한 결과를 보였다고 여겨진다. 반면 항산화 효소 활성의 변화에서는 열수 추출물의 활성이 뛰어난 경향을 여러 지역 추출물들에서 관찰할 수 있었다.

○ 따라서 2차년도에서는 항산화 활성이 뛰어난 비타민나무 잎 추출물의 안전성을 평가하여 육체적/정신적 피로개선에 도움이 되는 기능식품의 소재화에 대한 가능성을 규명하고 하였다.

### 3. 비타민나무 추출물 섭취에 따른 육체적/정신적 스트레스 피로개선 효과(간이임상시험, 3차년도)

인체적용시험 진행 일정표

Periods	Screening		Active treatment
Visit	1	2	3
Week	-2 이내	0	4
Window period	+/-7		
피험자 적합성 평가	☐		
서면 동의서	☐		
인구학적 조사	☐		
병력 /약물복용력 조사	☐		
신체계측 (체중, 신장)	☐	☐	☐
활력징후 (혈압, 맥박) 측정	☐	☐	☐
스트레스 반응 설문지 작성	☐	☐	
식습관 조사 / 식이섭취량 조사 <sup>1</sup>	☐	☐	☐
식이섭취빈도조사		☐	
무작위배정		☐	
시험식품 및 대조식품 처방		☐	☐
복약일지 / 식사일기 배부		☐	☐
이상반응확인 <sup>2</sup>			☐
순응도 확인			☐
약물투여력 및 병용요법 변화 확인	☐	☐	☐

<sup>1)</sup> 식사기록법 (평일 2일, 주말 1일)을 통한 영양섭취량 조사

<sup>2)</sup> 시험군의 경우, 매 섭취 시 마다 섭취율과 이상반응 확인

## 가. 실험방법

**Table 4-1. 최종 분석 대상자수**

측정자 수					
Placebo group		HD (high dose) group		LD (low dose) group	
baseline (n=8)	week 4 (n=6)	baseline (n=10)	week 4 (n=7)	baseline (n=10)	week 4 (n=6)
최종 분석 대상자수					
Placebo group (n=6)		HD group (n=7)		LD group (n=6)	

### (1) 정신적 스트레스

다음과 같은 질문을 통해 이루어 졌다.

스트레스 요인 조사
------------

시험대상자 이니셜		성 별	M/F
생 년 월 일	/ /	결혼유무	Y/N
방 문 일 자	/ /		

지난 한달동안 당신이 스트레스를 받았다면 어떤 문제로 인해 가장 큰 영향을 받았습니까?

중요하다고 생각되는 것을 하나만 선택하세요.

	스트레스의 종류	확 인
1	(스스로 원하던 원치 않던 간에)일, 직업 및 학교와 관련된 일	
2	대인관계(가족 및 기타 중요한 사람들과의 관계)	
3	대인관계의 변화(사망, 출생, 이혼, 결혼 등)	
4	자신 혹은 타인의 병이나 상해	
5	금전적인 문제	
6	일상적인 것이 아닌 사건들(범죄, 자연재해, 우발사고, 이사 등)	
7	일상생활의 변화 혹은 변화가 없기 때문에	

**스트레스의 지각검사 (Global Assessment of Recent Stress(GARS) Scales)**

다음은 지난 일주간 당신이 받은 스트레스의 양을 평가하기 위해서 스트레스가 일어날 수 있는 상황을 기술한 것 입니다. 스트레스를 일종의 압박감으로 생각하고 그 정도에 따라 아래와 같이 등급을 매겨 당신이 지난 일주간 받은 스트레스의 양이 어느 정도인지를 해당되는 번호에 0 표 하십시오. 단, 스트레스는 반드시 나쁜 사건에서만 일어나는 것이 아니고 좋은 일에서도 일어날 수 있다는 점을 유의하시기 바랍니다.

- |                   |            |
|-------------------|------------|
| 0 : (스트레스가) 전혀 없다 | 5: 상당히 있다  |
| 1: 거의 없다          | 6: 약간 심하다  |
| 2: 드물게 있다         | 7: 웬만큼 심하다 |
| 3: 약간 있다          | 8: 꽤 심하다   |
| 4: 웬만큼 있다         | 9: 극도로 심하다 |

0 은 일상생활을 방해하는 사건이나 문제없이 걱정이나 고통이 없는 쾌적한 상태에 있음을 의미하고 9는 몹시 기분이 상한 상태로 긴장, 위장장애, 두통 등과 같은 신체적 반응이 나타나거나 정신적으로 고통스럽고 불안하고 비애 등을 경험하는 것을 의미합니다.

1. (스스로 원하던 원치 않던 간에)일, 직업 및 학교와 관계된 압박감의 정도는?  

1	2	3	4	5	6	7	8	9
---	---	---	---	---	---	---	---	---
2. 대인관계(가족 및 기타 중요한 사람들과의 관계)에 있어서의 압박감 정도는?  

1	2	3	4	5	6	7	8	9
---	---	---	---	---	---	---	---	---
3. 대인관계의 변화(사망, 출생, 결혼, 이혼 등)로 인한 압박감의 정도는?  

1	2	3	4	5	6	7	8	9
---	---	---	---	---	---	---	---	---
4. (자신 혹은 타인의)병이나 상해에 의한 압박감의 정도는?  

1	2	3	4	5	6	7	8	9
---	---	---	---	---	---	---	---	---
5. 금전적인 문제로 인한 압박감의 정도는?  

1	2	3	4	5	6	7	8	9
---	---	---	---	---	---	---	---	---
6. 일상적인 것이 아닌 사건들(범죄, 자연재해, 우발사고, 이사 등)로 인한 압박감의 정도는?  

1	2	3	4	5	6	7	8	9
---	---	---	---	---	---	---	---	---
7. 일상생활의 변화 때문에 혹은 변화가 없기 때문에 생기는 압박감의 정도는?  

1	2	3	4	5	6	7	8	9
---	---	---	---	---	---	---	---	---
8. 지난 일주간 전반적으로 느끼는 압박감의 정도는?  

1	2	3	4	5	6	7	8	9
---	---	---	---	---	---	---	---	---

**상태-불안척도(State scale of the State-Trait Anxiety Inventory, S-STAI)**

다음 질문들은 당신의 평소 일반적인 마음상태 알아보려는 것입니다. 각 문항을 잘 읽고 평소에 일반적으로 느끼는 바를 가장 나타내는 번호에 표시하여 주십시오.

문 항	전혀 그렇지 않다	조금 그렇다	보통 그렇다	대단히 그렇다
1. 나는 마음이 차분하다	1	2	3	4
2. 나는 마음이 든든하다	1	2	3	4
3. 나는 긴장되어 있다	1	2	3	4
4. 후회스럽고 서운하다	1	2	3	4
5. 나는 마음이 편하다	1	2	3	4
6. 나는 당황해서 어쩔할 바를 모르겠다	1	2	3	4
7. 나는 앞으로 불행이 있을까 봐 걱정하고 있다	1	2	3	4
8. 나는 마음이 놓인다	1	2	3	4
9. 나는 불안하다	1	2	3	4
10. 나는 편안하게 느낀다	1	2	3	4
11. 나는 자신감이 있다	1	2	3	4
12. 나는 짜증스럽다	1	2	3	4
13. 나는 마음이 조마조마하다	1	2	3	4
14. 나는 극도로 긴장되어 있다	1	2	3	4
15. 내 마음은 긴장이 풀려 푸근하다	1	2	3	4
16. 나는 만족스럽다	1	2	3	4
17. 나는 걱정하고 있다	1	2	3	4
18. 나는 흥분되어 어쩔줄을 모르겠다.	1	2	3	4
19. 나는 즐겁다	1	2	3	4
20. 나는 기분이 좋다	1	2	3	4

**특성-불안척도(Trait scale of the State-Trait Anxiety Inventory, T-STAI)**

다음 질문들은 사람들이 자신을 표현하는데 사용되는 것들입니다. 각 문항을 잘 읽고 평소에 일반적으로 느끼는 바를 가장 나타내는 번호에 표시하여 주십시오.

문 항	전혀 그렇지 않다	조금 그렇다	보통 그렇다	대단히 그렇다
1. 나는 기분이 좋다	1	2	3	4
2. 나는 쉽게 피로해 진다	1	2	3	4
3. 나는 울고 싶은 심정이다	1	2	3	4
4. 나도 다른 사람들처럼 행복했으면 한다	1	2	3	4
5. 나는 마음을 빨리 정하지 못해서 실패를 한다	1	2	3	4
6. 나는 마음이 놓인다	1	2	3	4
7. 나는 차분하고 침착하다	1	2	3	4
8. 나는 너무 많은 어려운 문제가 밀어 닦쳐서 극복할 수 없을 것 같다	1	2	3	4
9. 나는 하찮은 일에 너무 걱정을 한다	1	2	3	4
10. 나는 행복하다	1	2	3	4
11. 나는 무슨 일이건 힘들게 생각한다	1	2	3	4
12. 나는 자신감이 부족하다	1	2	3	4
13. 나는 마음이 든든하다	1	2	3	4
14. 나는 위기나 어려움을 피하려고 애쓴다	1	2	3	4
15. 나는 울적하다	1	2	3	4
16. 나는 만족스럽다	1	2	3	4
17. 사소한 생각이 나를 괴롭힌다	1	2	3	4
18. 나는 실망을 지나치게 예민하게 받아들이기 때문에 머릿속에서 지워버릴 수가 없다	1	2	3	4
19. 나는 착실한 사람이다	1	2	3	4
20. 나는 요즈음의 걱정거리나 관심거리를 생각만 하면 긴장되거나 어찌할 바를 모른다	1	2	3	4

스트레스 반응 척도(Stress Response Inventory, SRI)

문항	전혀 그렇지 않다	조금 그렇다	보통 그렇다	대단히 그렇다
1. 일에 실수가 많다	1	2	3	4
2. 말하기 싫다	1	2	3	4
3. 가슴이 답답하다	1	2	3	4
4. 화가 난다	1	2	3	4
5. 안절부절 못한다	1	2	3	4
6. 소화가 안된다	1	2	3	4
7. 배가 아프다	1	2	3	4
8. 소리를 지르고 싶다	1	2	3	4
9. 한숨이 나온다	1	2	3	4
10. 어지럽다	1	2	3	4
11. 만사가 귀찮다	1	2	3	4
12. 잠념이 생긴다	1	2	3	4
13. 쉽게 피로를 느낀다	1	2	3	4
14. 온몸에 힘이 빠진다	1	2	3	4
15. 자신감을 잃었다	1	2	3	4
16. 긴장된다	1	2	3	4
17. 몸이 떨린다	1	2	3	4
18. 누군가를 때리고 싶다	1	2	3	4
19. 의욕이 떨어진다	1	2	3	4
20. 울고싶다	1	2	3	4
21. 신경이 날카로워졌다				
22. 내가 하는 일에 전망이 없다				
23. 멍하게 있다				
문항	전혀 그렇지 않다	조금 그렇다	보통 그렇다	대단히 그렇다

	않다			그렇다
24. 누군가를 미워한다.				
25. 한가지 생각에서 헤어나지 못한다				
26. 목소리가 커졌다				
27. 마음이 급해지거나 일에 쫓기는 느낌이다				
28. 행동이 거칠어 졌다 (난폭운전, 욕설, 몸싸움 등)				
29. 무언가를 부수고싶다				
30. 말이 없어졌다				
31. 머리가 무겁거나 아프다				
32. 가슴이 두근거린다				
33. 누군가를 죽이고 싶다				
34. 얼굴이 붉어지거나 화끈거린다				
35. 지루하다				
36. 참을성이 없다				
37. 얼굴표정이 굳어졌다				
38. 나는 아무 쓸모없는 사람이다.				
39. 움직이기 싫다				

스트레스 지각 설문(Perceived Stress Questionnaire, PSQ)

문 항	전혀 그렇지 않다	조금 그렇다	보통 그렇다	대단히 그렇다
1. 마음이 편안하다고 느낀다	1	2	3	4
2. 나에게 요구되는 것이 너무 많다고 느낀다	1	2	3	4
3. 나는 신경질적이고 까다롭다	1	2	3	4
4. 처리해야 할 일이 너무도 많다	1	2	3	4
5. 외로움이나 소외감을 느낀다	1	2	3	4
6. 내가 갈등상황에 놓여 있다고 느낀다	1	2	3	4
7. 피곤하다	1	2	3	4
8. 스스로 목적을 달성하지 못할까 봐 두렵다	1	2	3	4
9. 평온함을 느낀다	1	2	3	4
10. 결정해야 할 일들이 너무 많다	1	2	3	4
11. 좌절감을 느낀다	1	2	3	4
12. 원기 왕성하다	1	2	3	4
13. 항상 긴장하고 있다	1	2	3	4
14. 해결해야 할 문제가 쌓여 있다	1	2	3	4
15. 매사에 서두르고 있다고 여겨진다	1	2	3	4
16. 안전하며 보호받고 있다고 느낀다	1	2	3	4
17. 걱정거리가 너무 많다	1	2	3	4
18. 다른 사람으로부터 압박을 받고 있다는 생각이 든다	1	2	3	4
19. 낙담하고 있다	1	2	3	4
20. 즐겁게 지내고 있다	1	2	3	4
21. 다가올 장래의 일들이 두렵다				
22. 내가 원해서가 아니라 어쩔수 없어서 일하고 있다고 느낀다				
문 항	전혀	조금	보통	대단히

23. 나를 비난하는 사람들이 많다고 여겨진다				
24. 내 성격은 낙천적이다				
25. 정신적으로 지쳐 있음을 느낀다				
26. 긴장감이 잘 해소되지 않는다				
27. 내가 진정 좋아하는 일들을 하고 있다고 느끼다				
28. 책임감으로 인해 부담스럽다				
29. 나만의 시간을 충분히 갖고 있다				
30. 시간에 쫓기고 있음을 느낀다.				

**(2) 육체적 스트레스 (피로회복)**

다음과 같은 설문지를 통해 이루어 졌다.

신체적 스트레스 조사

- |              |              |
|--------------|--------------|
| 0 점 : 전혀 없었다 | 2 점 : 자주 느꼈다 |
| 1 점 : 가끔 있었다 | 3 점 : 항상 느꼈다 |

신체적 스트레스	점 수
1. 불면	
2. 심장 두근거림 얼굴 화끈거림	
3. 신체 일부가 경련	
4. 현기증	
5. 땀이 많이 남	
6. 감각이 예민	
7. 요통	
8. 눈의 피로	
9. 목이나 어깨 결림	
10. 두통	
11. 감염증	
12. 변비	
13. 발열	
14. 소화불량	
15. 설사	

## 거부반응 문진표

- 증상에 따라 표시해 주세요.

증 상	증상정도			
	없음	보통	심함	매우심함
머리가 뻣근하고 어깨, 팔, 다리가 저리다				
허리가 목직하고 불편하다				
어지럼증이 있다				
잠이 잘 오지 않는다				
생리가 불규칙하고 생리통이 심하다				
몸이 무겁고 나른하다. 항상 피곤하다				
손발이 차다				
가스가 찬 듯하다				
소변을 자주보고, 보고 난 뒤에도 불편하다				
무릎이나 발목이 아프고 다리가 잘 붓는다				
가슴이 답답하고 숨이 차다				

- 기타 다른 증상이 있으시면 기록하여 주십시오.

신체 기관별 부작용 증상 조사					
기관명	증상	O / X	기관명	증상	O / X
위장관	설사		뇌신경 / 정신관련	기타 신경계 이상	
	위염			수면이상	
	소화불량			얼굴신경이상	
	위경련			마비	
	위등			어지러움	
	혈변			두통	
	변비			경련	
	변색갈 이상		심혈관 / 호흡기	기타 순환계 이상	
	복통			혈관 파열	
	구토			저림	
	메스꺼움			가슴 답답	
	속쓰림			두근거림	
				혈압상승	
				호흡이상	
피부	수포		대사성 장애	감상선이상	
	여드름			발열	
	아토피			고열	
	피부염			탈수	
	피부발진			발한	
	가려움			오한	
	피부각질화			혈당상승	
	두드러기		기타	시력저하	
	탈모			안구통증	
	얼굴색변화			안염	
	안면홍조			편도염	
간 / 신장 비노기	간기능 이상		통증		
	신장기능 이상		생리이상		
	배뇨 곤란		체중증가 및 감소		
	빈뇨		지아이상		
	혈뇨		식욕부진 및 기력쇠약		
	황달		영양실조 / 쇼크		
	요실금				
	부종				

### (3) 통계분석 방법

무작위배정되어 인체적용시험에 참여한 연구대상자로부터 수집된 자료 (일반사항, 불안척도 지표 (Beck Anxiety Inventory, BAI), 스트레스 반응 지표 (Stress Response Inventory, SRI), 신체적 스트레스 조사)를 평가하였으며, 평가변수 모두 “Per-Protocol (PP)” 방법으로 분석하였다. 통계분석은 SPSS version 23.0을 이용하여 분석하였으며, p-value가 <0.05인 경우 유의한 것으로 간주하였다. 연구대상자의 인구통계학적 자료 및 스트레스 지표에 관하여 기술 통계량을 구하였다. 연속형 자료는 평균, 표준오차를 구하고, 범주형 자료의 경

우 빈도수를 구하였다. 군간 비교는 연속형 변수는 Kruskal-Wallis 검정, 범주형 자료는 Chi-square 검정을 이용하여 분석하였다. 연구 전후의 비교는 Wilcoxon의 부호순위검정을 이용하여 분석하였다.

## 나. 결과

### (1) 인구통계학적 정보

대상자 19명에 대해 조사한 인구학적 일반 정보는 Table 4-1에 제시하였다. 대조군과 HD군, LD 군 각각의 남성 수는 5명 (83.3%), 4명 (57.1%), 3명 (50.0%)이었고, 연령은 대조군이 평균 33.3세, HD군, LD 군이 각각 33.9세, 31.0세로 나타났다. 인구학적 일반정보에 해당되는 지표는 군간에 유의적인 차이가 없었다.

**Table 4-1. General characteristics of all the subjects**

Characteristics	Placebo (n=6)	HD (n=7)	LD (n=6)	p-value <sup>a)</sup>
Gender (male/female)	5 / 1	4 / 3	3 / 3	0.448
Age (year, [range])	33.3 ± 6.3 [26.7-39.9]	33.9 ± 6.3 [28.0-39.7]	31.0 ± 4.2 [26.6-35.5]	0.651

HD, high dose; LD, low dose. Mean ± SD.

<sup>a)</sup> Kruskal-Wallis test or Chi-square test comparing the placebo, HD and LD groups.

### (2) 정신적 스트레스

#### ① 불안척도 (Beck Anxiety Inventory, BAI)

불안과 관련된 평가변수 분석결과는 Table 4-2과 Fig. 4-7과 같다. 불안척도는 Baseline 과 4주간 섭취 후 군간 유의적인 차이를 보이지 않았고, 4 주간 변화율에서는 대조군, HD 군, LD군 간의 유의적인 차이를 보이지 않았다(mean percent change -47.0% vs. -48.3% vs. -25.1%). 그러나 Baseline과 4 주 후를 비교해 본 결과, HD 군에서 불안척도가 유의적으로 감소한 것으로 나타났다(p<0.027).

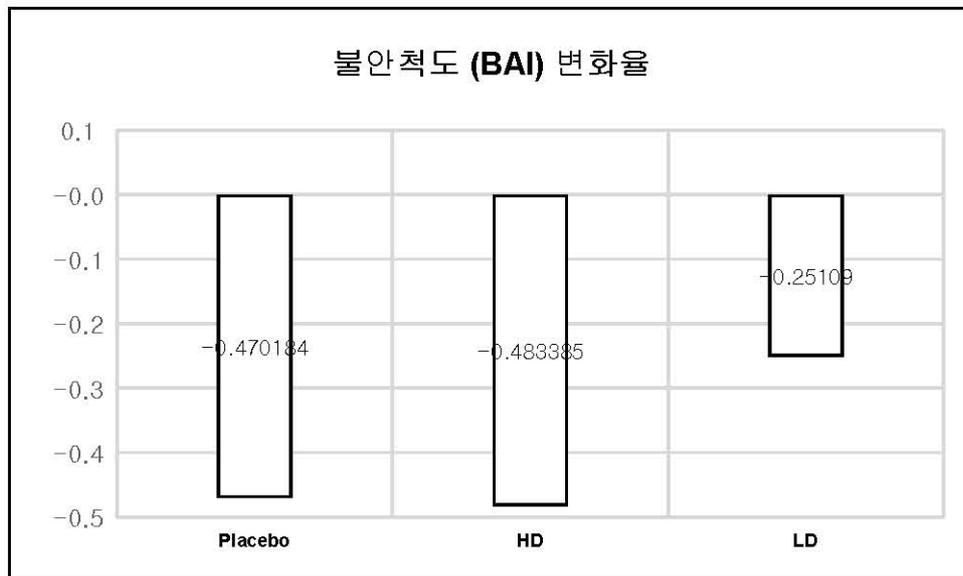
**Table 4-2. Beck Anxiety Inventory at the baseline and after 4 weeks of the consumption**

Variables	Placebo (n=6)	HD (n=7)	LD (n=6)	P-value <sup>b)</sup>
Week 0	9.8±6.6	14.3±13.3	12.3±8.7	0.893
Week 4	6.3±7.5	8.1±9.2	9.5±7.5	0.586
P-value <sup>a)</sup>	0.173	<b>0.027*</b>	0.168	

HD, high dose; LD, low dose. Mean ± SD.

a) Wilcoxon signed rank test comparing values of baseline and week 4 at \*p<0.05.

b) Kruskal-Wallis test comparing values of placebo, HD and LD groups.



**Fig. 4-7. Percent change of the Beck Anxiety Inventory**

HD, high dose; LD, low dose.

No significantly different by Kruskal-Wallis test.

② 스트레스 반응 척도 (Stress Response Inventory, SRI)

스트레스 반응과 관련된 평가변수 분석결과는 Table 4-3와 Fig. 4-8와 같다. 스트레스 반응 지표는 Baseline과 4주간 섭취 후 군간 유의적인 차이를 보이지 않았고, 4 주 후 변화율에서도 대조군, HD군, LD군 간의 유의적인 차이를 보이지 않았다 (mean percent change -20.6% vs. -9.9% vs. -1.3%). 그러나 Baseline과 4 주 후를 비교해 본 결과, 대조군에서 스트레스 반응 척도가 유의적으로 감소한 것으로 나타났다 ( $p < 0.046$ ).

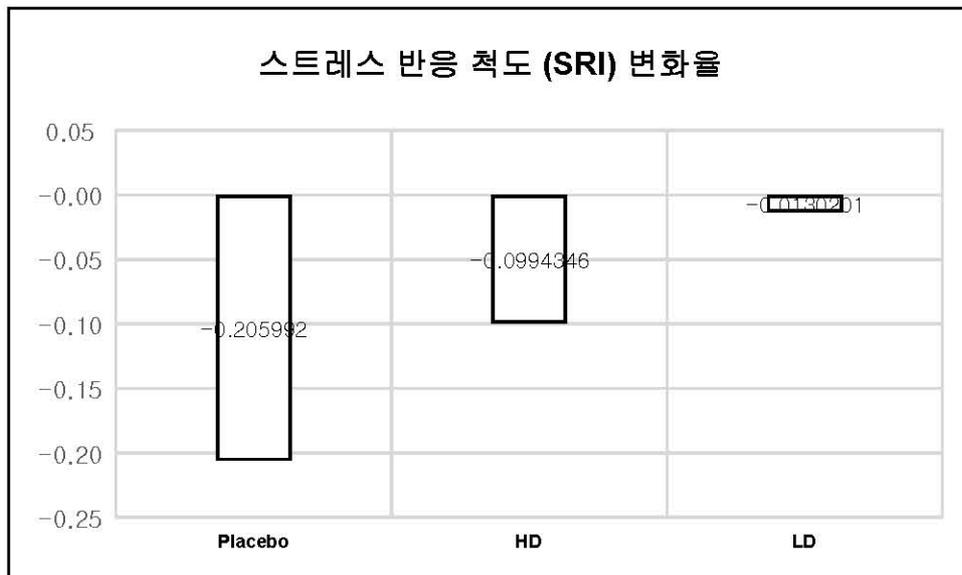
**Table 4-3. Stress Response Inventory at the baseline and after 4 weeks of the consumption**

Variables	Placebo (n=6)	HD (n=7)	LD (n=6)	P-value <sup>b)</sup>
Week 0	61.5±10.6	73.9±28.0	63.0±18.3	0.704
Week 4	49.0±14.8	63.3±13.5	62.3±19.2	0.173
P-value <sup>a)</sup>	0.046*	0.075	0.581	

HD, high dose; LD, low dose. Mean ± SD.

<sup>a)</sup> Wilcoxon signed rank test comparing values of baseline and week 4 at  $*p < 0.05$ .

<sup>b)</sup> Kruskal-Wallis test comparing values of placebo, HD and LD groups.



**Fig. 4-8. Percent change of the Stress Response Inventory**

HD, high dose; LD, low dose.

No significantly different by Kruskal-Wallis test.

### (3) 신체적 스트레스

신체적 스트레스와 관련된 평가변수 분석결과는 Table 4-4와 Fig. 4-9과 같다. 스트레스 반응 지표는 Baseline과 4주간 섭취 후 군간 유의적인 차이를 보이지 않았고, 4주간 변화율에서도 대조군, HD군, LD군 간의 유의적인 차이를 보이지 않았다(mean percent change -48.8% vs. -38.8% vs. -21.0%). 그러나 Baseline과 4 주 후를 비교해 본 결과, HD군에서 신체적 스트레스 지표가 유의적으로 감소한 것으로 나타났다 ( $p < 0.017$ ).

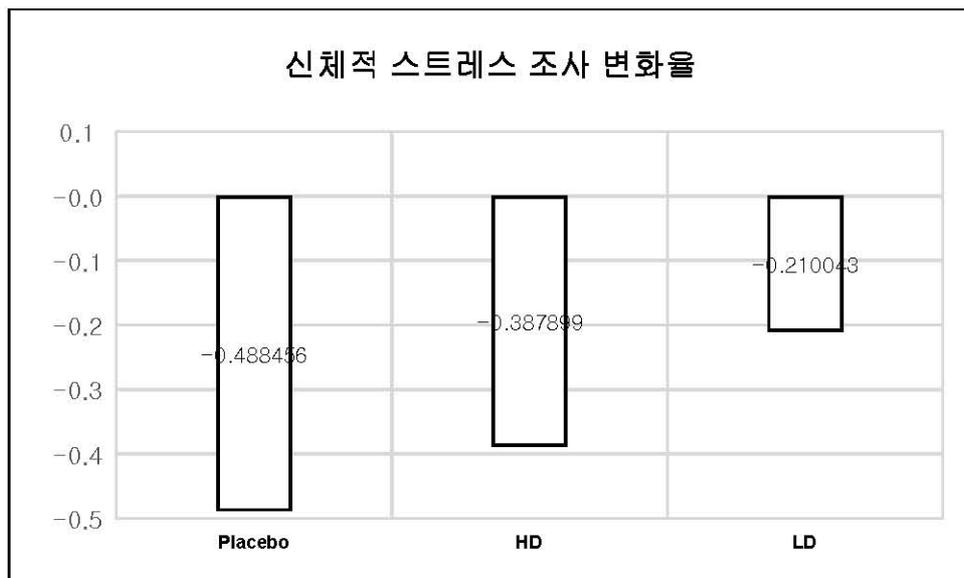
**Table 4-4. Physical stress at the baseline and after 4 weeks of the consumption**

Variables	Placebo (n=6)	HD (n=7)	LD (n=6)	P-value <sup>b)</sup>
Week 0	11.7±6.1	13.7±7.8	12.3±5.6	0.798
Week 4	6.5±7.6	10.0±8.7	10.5±7.2	0.490
P-value <sup>a)</sup>	0.116	<b>0.017*</b>	0.206	

HD, high dose; LD, low dose. Mean ± SD.

<sup>a)</sup> Wilcoxon signed rank test comparing values of baseline and week 4 at  $*p < 0.05$ .

<sup>b)</sup> Kruskal-Wallis test comparing values of placebo, HD and LD groups.



**Fig. 4-9. Percent change of the physical stress**

HD, high dose; LD, low dose.

No significantly different by Kruskal-Wallis test.

## 다. 요약

○ 본 연구는 1, 2차년도 연구에서 항산화 활성 뿐만 아니라 안전성이 입증된 비타민나무 추출물의 섭취에 따른 육체적/정신적 스트레스의 변화를 알아보려고 간이임상시험을 진행하였다.

○ 스트레스 관련 임상 실험에서 대조군과 HD군, LD군 각각의 남성 수는 5명 (83.3%), 4명 (57.1%), 3명 (50.0%)이었고, 연령은 대조군이 평균 33.3세, HD군, LD 군이 각각 33.9세, 31.0세로 나타났다.

○ 정신적 스트레스의 지표인 불안척도(BAI)에서 고농도를 섭취한 군에서 섭취 전에 비해 4 주간의 섭취 후 유의적으로 감소하였고, 스트레스 반응 척도(SRI)에서는 저농도 군과 고농도 군 간의 차이가 없었으며, 섭취 전 후의 비교에서 유의적인 차이가 나타나지 않았음을 확인하였다.

○ 신체적 스트레스 지표에서는 그룹 간의 유의적인 차이가 나타나지 않았으나, 고농도 섭취군에서 섭취 전에 비해 4주간의 섭취 후 유의적으로 감소하였다.

## 제 5 절. 비타민나무 추출물의 안전성 연구

(위탁기관 : 경희대학교 이정민)

### 1. 비타민나무(갈매보리수나무) 잎 추출물의 안전성 평가(2차년도)

#### 가. 실험 방법 및 재료

##### (1) 실험동물

중앙동물실험 사육장으로부터 공급받은 20g 내외의 6주령 수컷 BALB/c 마우스를 일주일 동안 설치류 사육실에서 적응시킨 후 적응기간 중 일반 상태를 관찰하여 건강한 개체만 실험에 사용하였다. 사육환경은 온도  $23\pm 3^{\circ}\text{C}$ , 습도  $50\pm 5\%$ 에서 Light cycle 이 12시간으로 유지하였고, 순화기간 중 건강하다고 판정된 동물에 대하여 체중을 측정하고 평균체중에 가까운 개체를 선택하여 무작위법을 이용하여 각 군당 8마리의 마우스를 사용하였다. 비타민나무의 면역 독성에 대한 유발 비교 관찰을 위하여 Ovalbumin을 통한 알러지 유발군을 실험에 함께 진행하였다. 군 분리는 다음과 같다 ; 정상군(Normal control), 알러지 유발군(Allergy control), 비타민나무 500 mg/kg 식이투여 군. 알러지 유발 동물 모델을 만들기 위하여 Ovalbumin을 1주째 25  $\mu\text{g}/200\ \mu\text{L}$ 의 농도로 주 2회, 2주째 50  $\mu\text{g}/200\ \mu\text{L}$ 의 농도로 주 2회, 3주째 100  $\mu\text{g}/200\ \mu\text{L}$ 의 농도로 주 2회, 마지막 4주째에 200  $\mu\text{g}/200\ \mu\text{L}$ 농도로 주 2회 주사하여 알러지를 유발시켰다. 정상군과 알러지 유발군에는 정상식을 사용하였고, 섭취한 식이량, 체중을 매주 2회씩 측정하고 4주 후 희생시켰다.

##### (2) T/B 세포의 증식 능력 측정

T-dependent Antibody forming cell response와 B-dependent Antibody forming cell response를 측정하기 위한 splenocyte의 분리 및 배양을 위해 실험중인 마우스를 경추탈골로 희생시킨 다음 70% 에탄올로 복부를 소독한 후 비장을 무균적으로 적출하였다. 멸균된 homogenizer로 비장을 균일화 시킨 다음 50 mL Cornig tube에 40-mesh 크기의 망을 올려놓고, 10% Fetal Bovine Serum(FBS), 1% Penicillin이 포함된 RPMI 1640 배양액으로 적신 후 균일화 된 비장을 통과시켜 다시 RPMI 1640으로 2회 washing 하였다. 적혈구를 제거하기 위해 RBC lysis buffer과 PBS를 동량으로 혼합한 용액에서 적혈구를 파괴한 다음 PBS 용액으로 다시 두 번 동일한 방법으로 washing하여 trypan blue dye exclusion test로 세포의 생존 정도를 확인 한 후 96well plate에 각 well 당  $1\times 10^6$  cells/200  $\mu\text{L}$  씩 seeding 하였다. T cell, B cell 각각 LPS 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , ConA 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 각각 처리하여 48시간 동안  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ 에서 incubation시킨 후 EZ-cytox cell viability assay kit(대일랩서비스)를 사용하여 증식능을 측정하였다.

### (3) 비장세포 사이토카인 생성 능력 측정

비장세포(Splenocyte)의 분리 및 배양을 위해 실험중인 마우스를 경추탈골로 희생시킨 다음 70% 에탄올로 복부를 소독한 후 비장을 무균적으로 적출하였다. 멸균된 homogenizer 로 비장을 균일화 시킨 다음 50 mL Cornig tube에 40-mesh 크기의 망을 올려놓고, 10% Fetal Bovine Serum(FBS), 1% Penicillin이 포함된 RPMI 1640 배양액으로 적신 후 균일화 된 비장을 통과시켜 다시 RPMI 1640으로 2회 washing 하였다. 적혈구를 제거하기 위해 RBC lysis buffer과 PBS를 동량으로 혼합한 용액에서 적혈구를 파괴한 다음 PBS 용액으로 다시 두 번 동일한 방법으로 washing하여 trypan blue dye exclusion test로 세포의 생존 정도를 확인 한 후 96well plate에 각 well 당  $1 \times 10^6$  cells/200  $\mu$ L 씩 seeding 하였다. Seeding한 96well plate에 다음 표와 같이 ConA 5  $\mu$ g/mL 또는 LPS 5  $\mu$ g/mL의 농도로 well에 넣은 후 표에 나온 시간동안 배양하여 생성된 cytokine의 양을 DuoSet sandwich ELISA Mouse kit(R&D system, 확인한 Cytokine의 종류는 IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF-a, IFN-r)를 사용하여 측정하였다.

Cytokine	Mitogen	Incubation time
IL-2	ConA	24h
IL-4	ConA	24h
IL-6	LPS	24h
IL-10	ConA	24h
TNF-a	LPS	24h
IFN-r	ConA	72h

ELISA용 96 well plate에 각 cytokine 측정에 특성화 된 1차 항체를 PBS에 희석 후 100 $\mu$ L 씩 분주해 하루 동안 처리하였다. 그 다음날, washing buffer (PBST, 0.05% Tween 20 in PBS)로 1차 항체를 씻어낸 뒤, 항체가 붙지 않은 plate의 다른 공간을 메워주기 위해 assay buffer [(1%BSA in PBS(IL-4, IL-6, IL-10, TNF-a) 또는 0.1% BSA in TBST (IL-2, IFN-r)]를 넣어 2시간 동안 처리한 뒤 washing buffer로 씻어내었다. Standard curve를 위한 용액과 위에서 seeding한 splenocyte 세포의 배양액을 100  $\mu$ L씩 각 well에 넣어 2시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 뒤 washing buffer로 씻어내고 assay buffer에 2차 항체를 희석시켜 준비한 뒤 각 well에 100  $\mu$ L씩 분주하고 2시간 동안 처리하였다. 이 과정이 끝나면 washing buffer를 이용해 plate를 씻어내고 발색을 도와주는 substrate 시약을 100  $\mu$ L 넣어 반응 시킨 뒤 570 nm에서 흡광도를 측정하였고, Standard curve를 이용해 세포에서 생성된 cytokine의 양을 계산했다.

#### (4) Natural killer cell 활성화 평가 : Yac-1 세포주에 대한 자연살해 활성화 기능측정

NK세포 (암세포를 직접 파괴하는 면역세포)의 분리 및 배양을 위해 실험중인 마우스를 경추탈골로 희생시킨 다음 70% 에탄올로 복부를 소독한 후 비장을 무균적으로 적출하였다. 멸균된 homogenizer로 비장을 균일화 시킨 다음 50 mL Cornig tube에 40-mesh 크기의 망을 올려놓고, 10% Fetal Bovine Serum(FBS), 1% Penicillin이 포함된 RPMI 1640 배양액으로 적신 후 균일화 된 비장을 통과시켜 다시 RPMI 1640으로 2회 washing하였다. 적혈구를 제거하기 위해 RBC lysis buffer과 PBS를 동량으로 혼합한 용액에서 적혈구를 파괴한 다음 PBS 용액으로 다시 두 번 동일한 방법으로 washing하여 trypan blue dye exclusion test로 세포의 생존 정도를 확인 한 후 배양하였다. 조직배양액은 10% Fetal Bovine Serum(FBS), 1% Penicillin이 포함된 RPMI 1640 배양액을 이용하여 37°C 5% CO<sub>2</sub> 에 overnight incubation하였다.

NK세포의 세포독성능력을 보는 방법으로 NK세포가 암세포의 일종인 YAC-1 세포(NK sensitive cell line)을 공격하여 파괴된 YAC-1 세포로부터 유리된 LDH를 측정하는 방법 (Cytotox 96 Non-radioactive Cytotoxicity assay)을 이용하였다. 96 well plate에 1x10<sup>3</sup>/100 µL가 되도록 YAC-1세포수를 조정하고 NK세포와 같이 배양하였고, Effector-to target세포 비가 1:5와 1:1이 되도록 세포수를 달리하여 37°C 5% CO<sub>2</sub> 의 배양기에서 4시간 동안 반응이 되도록 배양하였다. 상층액을 채취하기 45분 전 Target cell maximum LDH Release control이 있는 well에 10 µL의 Lysis solution(10X)를 첨가하고, 세포배양 4시간 후 4분간 원심분리 하여 LDH가 유리된 상층액 50 µL만을 채취하여 96 well plate에 다시 옮겼다. Reconstitute된 substrate mix 50 µL를 각 well에 첨가한 후 30분간 빛을 피해 실온에서 배양시킨 후 490nm에서 흡광도를 측정하였다. Spontaneous LDH측정을 위한 well에는 배양액만을 첨가하고 YAC-1세포로부터 유리된 LDH의 최대치를 알기 위한 maximum LDH well에는 Lysis solution을 첨가하여 세포가 완전히 용해되도록 배양하였고, 독성의 백분율 (% of cytotoxicity)은 각각의 배양액으로부터 유리된 LDH로 다음과 같은 공식을 이용하였다.

$$\% \text{cytotoxicity} = \frac{\text{EffectorSpontaneous} - \text{TargetSpotaneous}}{\text{TargetMaximum} - \text{TargetSpotaneous}} \times 100$$

Experimental : 1:5 cell ratio(avg)-culture medium background(avg)

Effector spontaneous : effector spontaneous(avg)-culuture medium backgroun(avg)

Target spontaneous : target spontaneous(avg)-culture medium background(avg)

Target maximum : target maximum(avg)-volume correction control(avg)

## (5) IgE, IgA-mediated allergy 반응 측정

동물을 희생시켜 얻은 혈액을 16000 rpm에서 20분동안 원심 분리하여 혈청을 얻어서 다음 실험에 사용하였다.

### ① IgE

ELISA용 96 well plate에 IgE 측정에 특성화 된 1차 항체를 PBS에 희석 후 100  $\mu$ L씩 분주해 하루 동안 처리하였다. 그 다음날, washing buffer(PBST, 0.05% Tween 20 in PBS)로 1차 항체를 씻어낸 뒤, 항체가 붙지 않은 plate의 다른 공간을 메워주기 위해 assay buffer (10% FBS in PBS)를 넣어 1시간 동안 처리한 뒤 washing buffer로 씻어내고, Standard curve를 위한 용액과 위에서 채취한 혈청 100  $\mu$ L씩 각 well에 넣어 2시간 동안 반응시킴. 반응이 끝난 뒤 washing buffer로 씻어내고 assay buffer에 2차 항체를 희석시켜 준비한 뒤 각 well에 100  $\mu$ L씩 분주하고 1시간 동안 처리하였다. 이 과정이 끝나면 washing buffer를 이용해 plate를 씻어내고 발색을 도와주는 substrate시약을 100  $\mu$ L 넣어 반응 시킨 뒤 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. Standard curve를 이용해 혈청 내에 생성된 IgE의 양을 계산하였다.

### ② IgA

IgA용 96 well plate에 Standard curve를 위한 용액과 위에서 채취한 혈청을 100  $\mu$ L씩 각 well에 넣어 1 시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 뒤 washing buffer로 씻어내고 Running buffer에 ENZYME-ANTIBODY CONJUGATE를 희석시켜 준비한 뒤 각 well에 100  $\mu$ L씩 분주하고 30분 동안 처리하였고, 이 과정이 끝나면 washing buffer를 이용해 plate를 씻어내고 발색을 도와주는 substrate 시약을 100  $\mu$ L 넣어 상온에 어두운 상태에서 10분간 반응시킨 후 흡광도 570 nm에서 측정하여 Standard curve를 이용해 혈청 내에 생성된 IgA의 양을 계산하였다.

## (6) 통계처리

본 실험결과는 SPSS (Statistical Package for the Social Science) version 20.0 프로그램을 이용하여 분석하였다. 모든 측정 항목의 결과는 평균(mean)  $\pm$  표준편차 (standard deviation, SD)로 표시하였고 실험군간 평균의 차이는 one-way ANOVA로 유의성을 확인한 후 Duncan's multiple range test를 이용하여 사후 검증 하였으며  $p < 0.05$ 수준에서 유의성의 여부를 검증하였다.

## 나. 결과

### (1) 식이 효율 및 장기무게 변화

식이효율은 모든 군간에 유의적인 차이가 없었다. 조직의 무게변화를 관찰한 결과에서는 신장과 림프절의 무게는 유의적인 차이가 없었으나 간과 비장의 무게가 알러지 유발균에서 유의적으로 높았음을 확인하였다. 알러지 반응 시 산화적 스트레스가 급격히 증가하고 이렇게 생성된 산화적 스트레스는 간세포에 존재하는 비타민 C와 비타민 E를 포함한 항산화 비타민과 항산화성 물질들에 의해 일부 제거되지만 지속적인 알러지 유발에 의한 산화적 스트레스의 생성은 간세포 내의 항산화 비타민과 항산화성 물질의 고갈을 초래하게 되고 염증반응을 유발하여 간의 크기가 미세하지만 증가하게 된 것으로 사료된다. 비장은 면역 기능을 담당하는 제일 중요한 기관으로서 면역세포가 밀집되어 있고 memory 세포 또한 존재하기 때문에 항원이 제시되었을 때 이에 대해 반응하여 면역세포의 mitogenesis를 동반하여 급격하게 spleen의 크기가 증가하는 megasplenocyte를 유발하게 되며 이것이 가장 일반적인 현상으로 인식된다. 결과적으로 비타민나무의 식이투여는 식이효율과 장기무게 변화에 영향을 미치지 않았음을 확인하였다(Table 5-1).

**Table 5-1. FER and organ weights in mice with dietary supplement of *Hippophae rhamnoides* L.**

	Normal control	Allergy control	비타민나무 500mg/kg
Weight gain (g)	3.55 ± 1.03	3.90 ± 0.62	3.07 ± 0.77
FER	3.41 ± 0.99 <sup>ns</sup>	3.91 ± 0.63	3.22 ± 0.80
Organ weight (g/100 g b.w.)			
Liver	4.14 ± 0.23 <sup>b</sup>	4.52 ± 0.14 <sup>a</sup>	3.97 ± 0.23 <sup>b</sup>
Spleen	0.39 ± 0.08 <sup>b</sup>	0.53 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.32 ± 0.04 <sup>b</sup>
Kidney	1.57 ± 0.05 <sup>ns</sup>	1.54 ± 0.09	1.49 ± 0.04
Lymph node	0.21 ± 0.11 <sup>ns</sup>	0.20 ± 0.09	0.19 ± 0.08

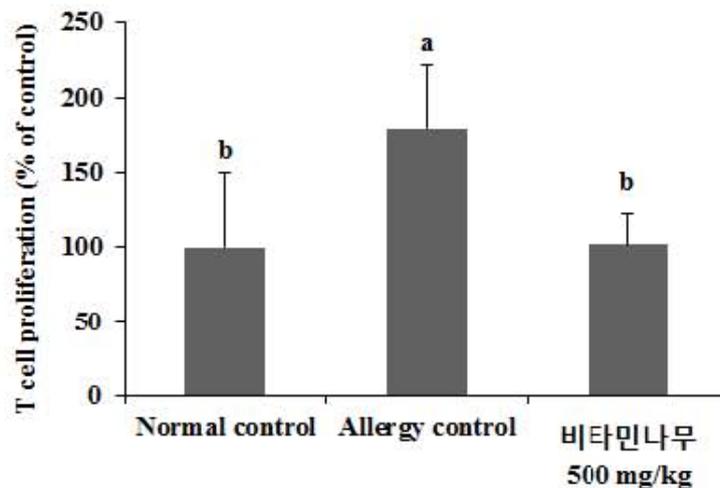
<sup>1)</sup> FER (Food efficiency rate) = weight gain (g) /total food consumption (g) x 100

All data are expressed as mean ± standard deviation (n=8). Differences were considered statistically significant at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

## (2) T/B 세포의 증식능에 미치는 영향

### ① T세포의 증식능

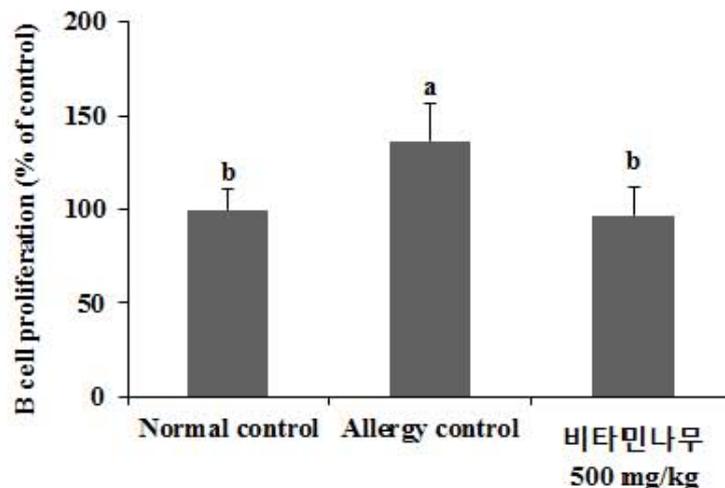
외부로부터 유래한 항원이 체내에 침투 시, 면역체제에서는 antigen presenting cell이 이를 인식하여 MHC (Major Histocompatibility complex) molecule에 결합시켜, 작은 peptide 형태로 T 세포에 전달되게 된다. 면역반응에서 중요한 역할을 담당하는 T세포는 다양한 항원에 대하여 특이적인 T 세포 수용체들을 가지고 있어, antigen presenting cell에 의해 전달되는 항원 유래 peptide에 특이적인 T세포만 활성화 되고, 이후 전개되는 면역 반응에 필요한 cytokine들의 분비와 활성화된 T cell clone의 증식이 일어나게 된다. T세포의 증식능의 경우는 Fig. 7에서 보는 바와 같이 정상군에 비하여 알러지 유발균에서 T세포의 증식능이 현저히 증가하였지만 이는 알러지 유발은 즉시형 과민반응이 일어나 면역반응이 아닌 염증이 발생되어 일어나는 것으로 해석되며 이는 알러지 유발균에 알러지 반응이 정상적으로 유발되었음을 알 수 있었다. 비타민나무 식이주여군은 정상군과 유의적인 차이를 보이지 않아 T세포의 증식능에 영향을 미치지 않았음을 확인하였다(Fig. 5-1).



**Fig. 5-1. T-cell proliferation by Con A-stimulated splenocyte of experimental groups.** All data are expressed as mean  $\pm$  standard deviation (n=8). Differences were considered statistically significant at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test.

## ② B세포의 증식능

표면에 면역글로블린(Ig) 수용체를 발현하는 골수 유래성 림프구. 항원자극 및 T세포를 매개로 한 자극에 따라 항체생산세포로 성숙하여 IgM, IgG, IgA, IgE의 항체를 생산하고 분비한다. 또 B세포는 항원제시세포로서 Ig 수용체를 매개로 하여 세포 내에 항원을 수습, 분단하고, 항원유래 펩티드를 조직적 합성 항원과 더불어 세포 표면에 제시하여 T세포를 활성화하는 역할을 한다. 또한 체액성 면역에는 B세포에 의하여 이루어지는데, 항원특이성 분자인 항체에 의해 이루어지고 세포보다는 혈청 내에 존재하며 신체 각 부위에서 전달되는데, 이러한 항체는 T세포의 도움을 받아 B-cell에 의해 생성되므로 B세포의 증식능 측정로 인하여 체액성 면역반응을 판단할 수 있다. 본 연구 결과에서는 알리지 유발균에서 B세포의 증식능이 유의적으로 증가되었음을 확인할 수 있었다. 반면 비타민나무 식이투여군은 정상군과 유의적인 차이를 보이지 않았다. 따라서 T/B세포의 증식능에 비타민나무의 섭취는 영향을 미치지 않아 면역독성은 없는 것으로 나타났다(Fig. 5-2).



**Fig. 5-2. B-cell proliferation by Con A-stimulated splenocyte of experimental groups.** All data are expressed as mean  $\pm$  standard deviation (n=8). Differences were considered statistically significant at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test.

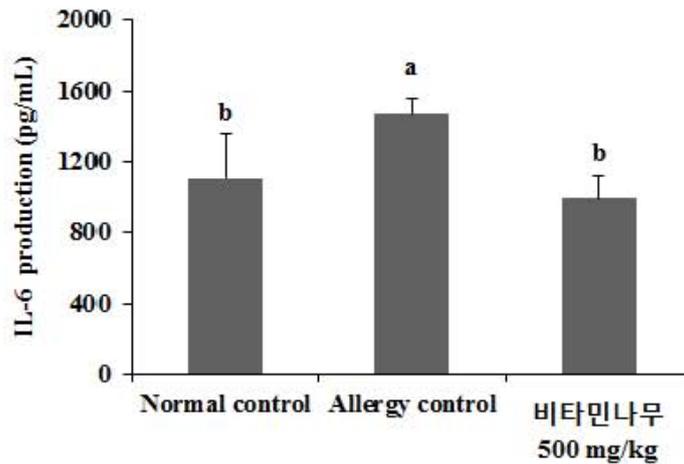
### (3) 비장세포 사이토카인 생성능에 미치는 영향

#### ① pro-inflammatory 사이토카인 (IL-6, TNF- $\alpha$ )

Pro-inflammatory cytokines인 TNF- $\alpha$ 와 IL-6는 NF- $\kappa$ B를 활성화시켜 염증반응을 야기시킨다. IL-6는 여러 가지 기능을 가지고 있는 cytokine으로 염증 반응과 면역 반응을 매개하는 것으로 잘 알려져 있다. IL-6의 중요한 생물학적 작용 중 하나는 B림프구(B lymphocyte) 성숙의 마지막 단계를 자극 하는 것인데, IL-6의 영향 하에 B 림프구는 성숙한 형질 세포(plasma cell)로 분화되고, 면역 글로블린(immunoglobulin)을 분비한다. 또한 IL-6는 IL-1 $\beta$ 와 TNF- $\alpha$ 와 더불어 급성 반응 단백질들을 유도하는데 중요한 역할을 하는

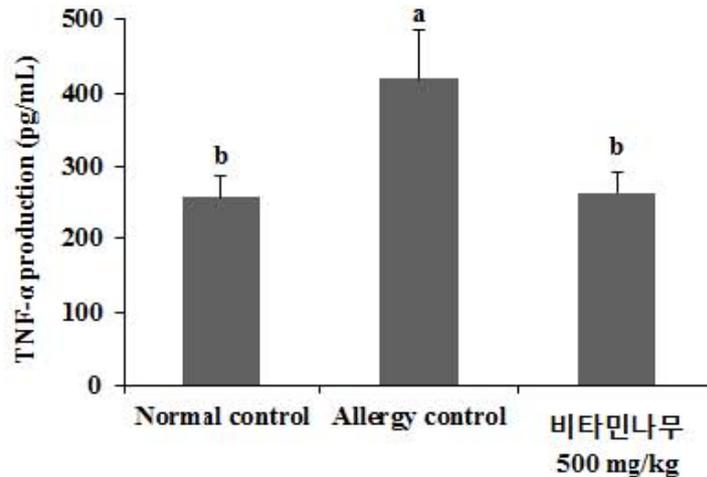
것으로 알려져 있다.

본 연구 결과에서는 알러지 유발균에서 정상군과 비교하여 유의적으로 증가되었음을 확인하였고, 이는 알러지 유발은 즉시형 과민반응이 일어나 염증이 발생되어 일어나는 것으로 해석되며 이는 알러지 유발균에 알러지 반응이 정상적으로 유발되었음을 알 수 있었다. 반면 비타민나무 식이투여군은 정상군과 유의적인 차이를 보이지 않았음을 확인하였다(Fig. 5-3).



**Fig. 5-3. IL-6 production by LPS-stimulated splenocyte of experimental groups.** All data are expressed as mean  $\pm$  standard deviation (n=8). Differences were considered statistically significant at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test.

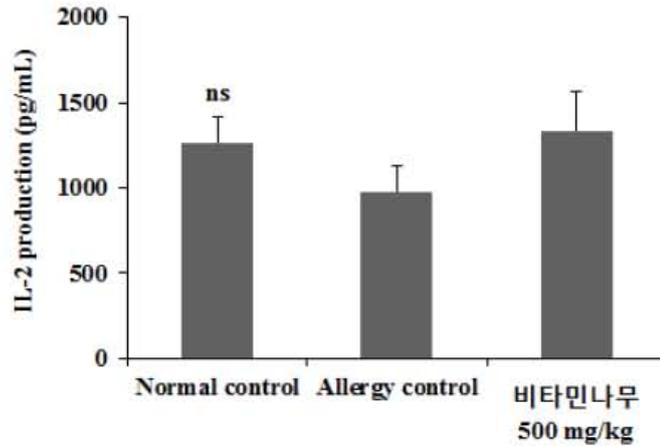
TNF- $\alpha$ 는 암세포를 파괴하는 작용뿐만 아니라 염증작용, 면역세포를 활성화하는 작용을 한다. 체내에 감염원이 유입되었을 때, 면역에 관련된 모든 세포들은 염증을 발생시키는 cytokine을 분비하게 되는데, 이 염증 매개물질이 병적으로 급격히 과발현되면 체내 세포의 DNA, 지질, 항산화 영양소는 손상을 입게 되고 이로 인해 발암 가능성이 높아질 수 있다. 따라서 염증성 cytokine의 발현을 억제 하면 항염증 효과가 있고, 면역 조절에 도움을 준다고 말할 수 있다. TNF- $\alpha$ 는 염증을 유발시키는 proinflammatory cytokine의 대표적인 물질이며 일반 세포의 생리활성 뿐만 아니라 면역세포의 활성조절에 있어서도 가장 중요한 물질의 하나로 인식된다. 본 연구 결과에서는 알러지 유발균에서 TNF- $\alpha$ 의 양이 정상군에 비하여 유의적으로 증가되었음을 확인하였다. 즉시형 과민반응이 일어나 염증이 발생되어 일어나는 것으로 해석되며 이는 알러지 유발균에 알러지 반응이 정상적으로 유발되었음을 알 수 있었다. 비타민나무 식이투여군은 정상군과 유의적인 차이를 보이지 않았음을 관찰하여 비타민나무 식이로 인한 알러지가 발생하지 않았음을 알 수 있다(Fig. 5-4).



**Fig. 5-4. TNF- $\alpha$  production by LPS-stimulated splenocyte of experimental groups.** All data are expressed as mean  $\pm$  standard deviation (n=8). Differences were considered statistically significant at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test.

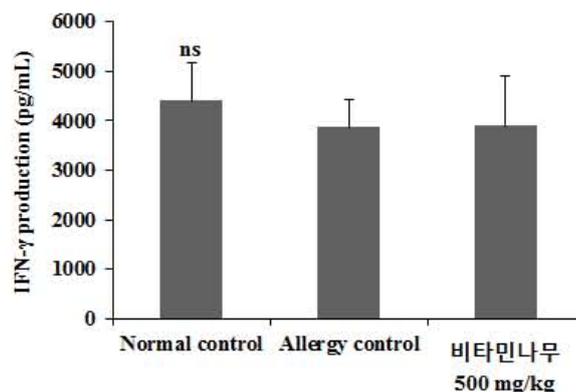
## ② Th1사이토카인 (IL-2, IFN- $\gamma$ )

CD4<sup>+</sup> Th 세포에는 Th1 type 사이토카인을 생성하는 Th1 세포와 Th2 type cytokines을 생성하는 Th2 세포가 있다. Th1 type 사이토카인은 주로 대식세포의 활성을 증가시켜 탐식작용을 자극하며, Th2 type 사이토카인은 B 세포의 활성을 자극시켜 항체생산을 증가시킨다. 이러한 Th1/Th2 type 사이토카인의 상호보완적인 조절에 의하여 면역 균형을 유지시킨다. Interleukin-2 (IL-2)는 면역조절에 관여하는 단백질로서, T-cell growth factor (TCGF)라고 알려져 있고, T 세포를 증식시키고 T 세포1에 작용하여 Interferon- $\gamma$ 을 분비시키는 작용을 하며, B 세포를 자극시키는 활성이 있다. 또한 Natural killer(NK) cells, lymphokine-activated killer cells과 같은 면역세포를 활성화시킨다. IL-2의 경우 Fig. 11.에서 보는 바와 같이 모든 동물 실험 군에서 유의성이 없이 유사한 값을 나타내었다. 이는 알러지 유발과 비타민나무 식이 투여군이 IL-2에 의한 면역독성에 영향을 주지 않았다는 것을 확인할 수 있다(Fig. 5-5).



**Fig. 5-5. IL-2 production by Con A-stimulated splenocyte of experimental groups.** All data are expressed as mean  $\pm$  standard deviation (n=8). Differences were considered statistically significant at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test.

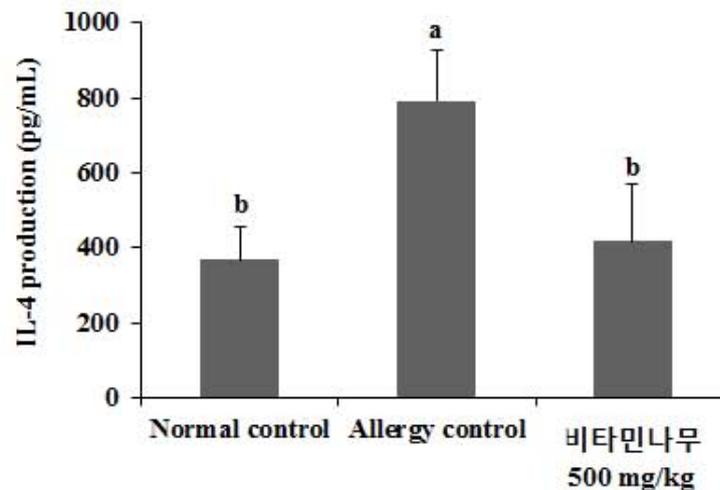
Interferon- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )는 Th1의 효과분자인 동시에 Th1 분화를 유도하는 사이토카인이다. IFN- $\gamma$ 는 주로 NK 세포나 CD8+T 세포, 또는 CD4+T 세포 자신에 의하여 생성되나 수상 세포에 의한 생성도 보고하고 있으며 여러 가지에 걸쳐서 세포에서 생성된다고 생각된다. 또한 Th1 type 사이토카인과 Th2 type 사이토카인을 상대적으로 보완 조절하는 중요한 역할을 IL-10과 함께 담당하고 있어서 전체적인 면역조절과 항상성 유지에 매우 중요한 사이토카인으로 인식되어 있다. 본 연구에서는 모든군에서 유의적인 차이가 없었다. 따라서 알러지 유발과 비타민나무 식이투여 모두 Th1사이토카인에 영향을 미치지 않았음을 확인하였다(Fig. 5-6).



**Fig. 5-6. IFN- $\gamma$  production by Con A-stimulated splenocyte of experimental groups.** All data are expressed as mean  $\pm$  standard deviation (n=8). Differences were considered statistically significant at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test.

### ③ Th2사이토카인 (IL-4, IL-10)

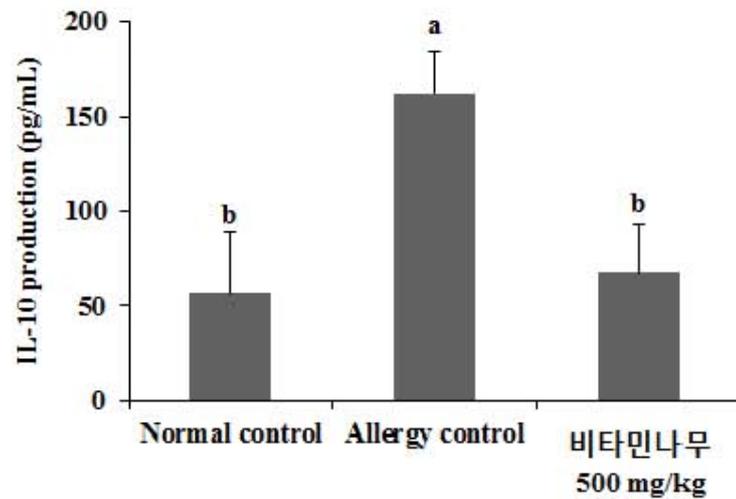
IL-4는 CD4 T세포와 activated mast cell에 의해 만들어지며, B세포 growth factor의 작용을 하고, 또한 B세포의 immunoglobulin의 class switch에 관여하는 differentiation factor로 작용할 수 있으며, CD4 T세포와 mast cell, macrophage등을 활성화하기도 한다. 본 연구 결과에서는 IL-4의 생성이 알러지 유발균에서 정상군과 비교하여 약 2배가 증가되었음을 확인하였다. 이는 B세포의 activation이 아닌 즉시형 과민반응이 일어나 염증이 발생되어 일어나는 것으로 해석되며 이는 알러지 유발균에 알러지 반응이 정상적으로 유발되었음을 알 수 있었다. 반면 비타민나무 식이투여군은 정상군과 유의적인 차이가 없었음을 확인하였다(Fig. 5-7).



**Fig. 5-7. IL-4 production by Con A-stimulated splenocyte of experimental groups.** All data are expressed as mean  $\pm$  standard deviation (n=8). Differences were considered statistically significant at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test.

IL-10의 발현은 Th1 type 사이토카인을 상대 보완적으로 억제하여 Th1 type과 Th2 type 사이토카인의 항상성을 유지하는 역할을 담당한다. 그러나 IL-10은 과도하게 증가하면 Th2 type 사이토카인은 증가시키고 상대적으로 Th1 type 사이토카인을 억제시켜 항상성을 파괴하는 원인이 되기도 한다.

IL-10의 경우는 Fig. 14에서 보는 바와 같이 정상군에 비하여 알러지 유발균에서 IL-10의 생성이 현저히 증가하였지만 이는 알러지 유발은 즉시형 과민반응이 일어나 염증이 발생되어 일어나는 것으로 해석되며 이는 알러지 유발균에 알러지 반응이 정상적으로 유발되었음을 알 수 있었다. 반면 비타민나무 식이투여군은 정상군과 통계적 유의성 없이 유사한 값을 나타내어 IL-10생성에 영향을 미치지 않았음을 확인하였다(Fig. 5-8).

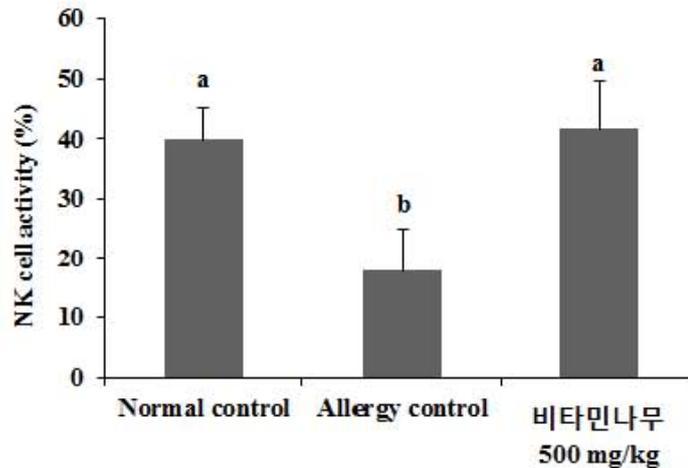


**Fig. 14. IL-5-8 production by Con A-stimulated splenocyte of experimental groups.** All data are expressed as mean  $\pm$  standard deviation (n=8). Differences were considered statistically significant at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test.

#### (4) 자연살해세포(Natural killer cell; NK) 활성화에 미치는 영향

NK 세포는 림프구의 극히 일부분을 차지하고 있지만 면역방어 기전에 매우 중요한 부분을 차지하고 있는데 T 림프구와 B 림프구와는 달리 특별히 항원에 의한 면역이 만들어져 그에 대한 기억이 되어 있지 않아도 어떤 암세포나 바이러스에 감염된 세포들을 자발적으로 공격하는 세포 독성을 나타내 표적세포를 살해함으로써 감염이나 이형성 세포의 증식으로부터 우리 몸을 보호한다. 내재면역에서 virus에 감염된 세포, 종양세포, 비정상 세포를 인지하여 죽이는 역할을 하며, IL-12와 IL-15등의 cytokines에 의하여 활성이 자극되어 IFN- $\gamma$ 등의 분비를 증가시킨다. NK 세포는 활성신호와 억제신호를 가짐으로서 virus에 감염된 세포와 결합하여 활성 신호를 받아 세포를 공격한다. 또한 항원과의 반응을 방해하여 일차적인 면역반응을 조절할 뿐 아니라 B 림프구의 면역 글로블린 생산을 조절하는 면역제의 억제 세포(suppressor cells)이기도 한다.

본 연구결과에서는 알러지 유발군에서 NK 세포의 활성화가 정상군과 비교하여 유의적으로 낮아졌음을 확인하였으며 반면 비타민나부 식이투여군은 정상군과 유의적인 차이를 보이지 않았다(Fig. 5-9).

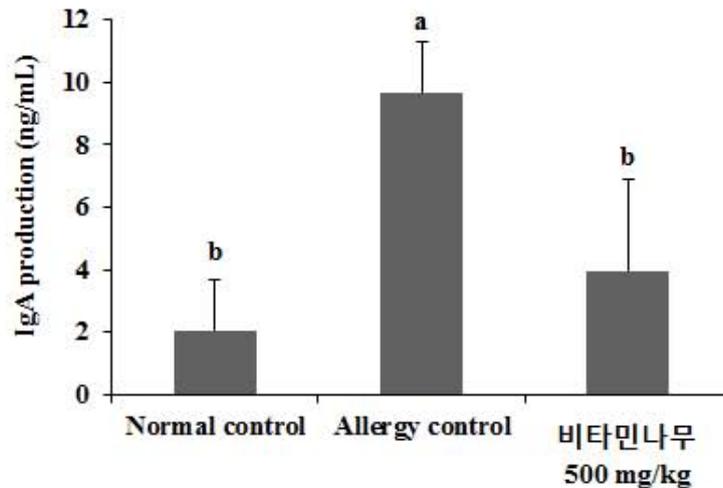


**Fig. 5-9. NK cell activity by splenocyte (Effector cell : YAC-1=5:1) from mice of experimental groups.** All data are expressed as mean  $\pm$  standard deviation (n=8). Differences were considered statistically significant at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test.

#### (5) 혈중 IgA, IgE 농도에 미치는 영향

점막표면은 외부환경과 직접 연결되어 있어 항상 항원에 노출되어 있는 부위이며 이들 표면을 감싸고 있는 외분비는 숙주방어에 한 면역계를 형성한다. 외분비의 주가 되는 immunoglobulin은 IgA(immunoglobulin A)이며, IgA는 혈청 IgA와 점막에서 생성되는 IgA로 나눌 수 있다. 두 IgA는 구조적인 차이를 보이고 있으며, IgA는 직장, 대장, 위, 십이지장 그리고 공장의 혈질세포에서 형성되며 이러한 혈질세포는 세기관지 및 비점막 그리고 이하선에서도 발견되고 또한 편도선, 림프절, 그리고 말초혈액세포에서도 발견된다.

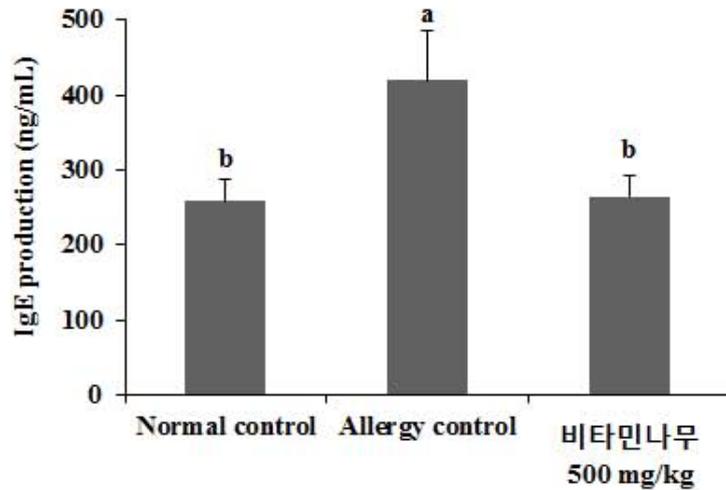
본 연구에서 IgA의 경우는 Fig. 16에서 보는 바와 같이 정상군에 비하여 알러지 유발군에서 혈청 IgA 농도가 현저히 증가되었음을 확인하였다. 반면 비타민나무 식이투여군은 정상군과 유의적인 차이를 보이지 않았다(Fig. 5-10).



**Fig. 5-10. IgA production by Con A-stimulated splenocyte of experimental groups.** All data are expressed as mean  $\pm$  standard deviation (n=8). Differences were considered statistically significant at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test.

알러지는 면역계가 무해한 항원에 대해 민감하게 반응하여 신체에 이상반응을 일으키는 것으로, 식품 알러지는 섭취한 식품이 항원으로 작용하여 즉시형 과민반응이 일어나는 것을 말한다. 대부분의 식품 알러지는 Allergen-specific IgE (immunoglobulin E)에 의해 매개되며, 실제로 대표적인 알러지성 질환인 비염, 천식, 아토피 피부염 등을 앓고 있는 환자 들은 특정 항원에 대한 높은 혈청 IgE 분비량을 나타내는 것을 확인할 수 있다. IgE항체는 분자 내 Fc fragment의 C $\epsilon$ 3 domain을 통해 비만세포의 IgE 수용체인 Fc $\epsilon$ R1과 결합한다. 동일한 항원에 의해 mast 세포 표면의 IgE가 교차결합 되면 mast 세포가 활성화되어 histamine, proteoglycan, esrine protesases, 염증성 cytokine 등과 같은 염증성 매개체들이 분비되고, 이들에 의해 알레르기 염증의 초기 반응이 일어난다. 게다가 이러한 화학 매개체 들이 세포로부터 지속적으로 생산되고 방출되면 T세포와 eosinophil이 관여하는 후기 염증 반응을 일으키게 된다.

본 연구결과에서는 알러지 유발군에서 정상군과 비교하여 IgE 농도가 유의적으로 증가되었음을 확인하여 알러지 유발이 정상적으로 일어났음을 확인하였다. 반면 비타민나무 식이 투여군은 IgE 농도에 영향을 미치지 않았음을 확인하였다(Fig. 5-11).



**Fig. 5-11. IgE production by Con A-stimulated splenocyte of experimental groups.** All data are expressed as mean  $\pm$  standard deviation (n=8). Differences were considered statistically significant at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test.

#### 다. 요약

○ 본 실험은 비타민나무 식이 섭취가 면역 독성반응에 영향을 미치는지 평가하기 위하여 실험을 실시하였다. 알러지 유발군과 비교하여 면역 독성반응에 대해 비교하였으며, T세포/B세포 증식능, 사이토카인, 면역글로블린, NK세포 활성화에 미치는 영향을 측정하였다.

○ 알러지 유발군에서는 간과 비장의 무게가 정상군과 비교하여 유의적으로 증가하였으며, T세포/B세포 증식능이 증가되었고 Th1 사이토카인을 제외한 모든 사이토카인의 생성량이 증가되었음을 확인하였다. 또한 이에 따른 면역글로블린의 혈중 농도가 유의적으로 증가되었음. NK세포 활성을 관찰한 결과에서는 알러지 유발군에서 억제되었음을 확인하였다.

○ 반면 비타민나무 추출물 500 mg/kg의 식이투여는 모든 인자에서 정상군과 유의적인 차이를 보이지 않았음을 확인할 수 있었다. 결과적으로 비타민나무 추출물은 면역 독성 및 알러지에 영향을 미치지 않아 안전성을 입증할 수 있었다.

○ 안전성이 입증된 비타민나무 추출물을 이용하여 3차년도에서는 향후 건강기능식품 신청 목적으로 동물실험에서 얻어진 효능 결과를 토대로 하여 간이적이지만 소규모의 인체적용 시험을 통해 육체적/정신적 피로개선 효과를 평가하고, 비타민나무 추출물 성분들의 안전성을 평가하고자 하였다.

별첨 1) 비타민나무 잎 추출물의 단회투여독성 시험 및 복귀돌연변이 실험



## 최 종 보 고 서

TGW-0135-14-Rev. 1

갈매보리수나무 잎 열수 추출물

Rat에 대한 갈매보리수나무 잎 열수 추출물의  
단회경구투여독성시험

한국화학융합시험연구원장





**신뢰성보증 확인서**  
[ Quality Assurance Statement ]

시 험 제 목 : Rat에 대한 갈매보리수나무 잎 열수 추출물의 단회경구투여독성시험  
[Study title]

시 험 번 호 : TGW-0135-14-Rev. 1  
[Study number]

점검한 시험단계	점 검 일 자	시험책임자 보 고 일 자	운영책임자 보 고 일 자
시험계획서(초안)의 점검	2014-08-21	2014-08-21	2014-08-21
시험계획서의 점검	2014-08-22	2014-08-22	2014-08-22
실험동물 도입의 점검	2014-08-26	2014-08-27	2014-08-28
군분리의 점검	2014-09-01	2014-09-01	2014-09-01
시험물질 및 대조물질 보관/조제의 점검	2014-09-02	2014-09-02	2014-09-03
시험물질투여의 점검(1)	2014-09-02	2014-09-02	2014-09-03
시험물질투여의 점검(2)	2014-09-04	2014-09-05	2014-09-05
시험물질투여의 점검(3)	2014-09-12	2014-09-12	2014-09-12
실험동물 부검의 점검(1)	2014-09-16	2014-09-16	2014-09-16
실험동물 부검의 점검(2)	2014-09-24	2014-09-24	2014-09-24
실험동물 부검의 점검(3)	2014-09-26	2014-09-26	2014-09-26
시험기초자료의 점검	2014-09-29 - 30	2014-09-30	2014-09-30
최종보고서(초안)의 점검	2014-09-29 - 30	2014-09-30	2014-09-30
최종보고서의 점검	2014-10-08	2014-10-08	2014-10-08
최종보고서 수정본의 점검	2014-11-24	2014-11-24	2014-11-24

한국화학융합시험연구원 헬스케어연구소 신뢰성보증부서는 시험계획서에 따라 기록된 점검일자에 주요 시험 단계의 점검을 수행 하였다.

본 최종보고서는 한국화학융합시험연구원 헬스케어연구소의 신뢰성보증부서에 의하여 점검되었으며, 보고된 시험결과는 시험기초자료 및 시험 과정을 정확하게 반영하고 있다.

시험에 대한 점검 결과는 시험책임자 및 운영책임자에게 보고되었다. 이러한 점검을 바탕으로 최종보고서를 검토하였다. 본 시험은 GLP 규정에 따라 수행되었다.

신뢰성보증담당자  
[QA person]

조 기 연

조 기 연 [Jo Ki-yeon, B.S.]

2014-11-24

Date

신뢰성보증책임자  
[QA manager]

홍 승 국

홍 승 국 [Hong Seung-guk, M.S.]

2014-11-24

Date

- II -



## 시험참여자 [Study Staffs]

다음의 시험자는 시험 중 중요한 시험단계 및 기록을 한국화학융합시험연구원 헬스케어연구소의 표준작업지침서와 본 시험의 시험계획서에 따라 수행하였다.

시험 담당자 : 이택진/B.S.  
                  김상호/B.S.  
                  백형선/D.V.M., M.S.

시험물질 조제책임자 : 정정욱/B.S.

시험물질 조제담당자 : 정정욱/B.S.

동물관리 책임자 : 김용우/B.S.

검역 책임자 : 김준호/B.S.

보고서 작성자 : 김준호/B.S.

보고서 수정본 작성자 : 김준호/B.S.

## 목 차

[Contents]

보고서표지	
GLP 진술서 [GLP Statement]	I
신뢰성보증 확인서 [Quality Assurance Statement]	II
시험참여자 [Study Staffs]	III
목차 [Contents]	IV
1. 요약 (Summary)	1
2. 서론 (Introduction)	2
2.1. 시험일정	2
3. 재료 및 방법 (Materials & methods)	3
3.1. 시험물질 및 부형제	3
3.2. 시험물질 조제	3
3.3. 시험물질 분석	3
3.4. 시험계	3
3.5. 사육환경	4
4. 시험방법 (Test method)	5
4.1. 실험계획	5
4.2. 군 구성	5
4.3. 시험물질의 투여 경로 및 방법	5
4.4. 관찰항목	5
5. 시험계획서의 변경 및 이탈 (Amendments and deviations from the study plan)	6
5.1. 시험모니터 추가	6
5.2. 기타	6
6. 최종보고서의 수정 (Amendments from the final report)	6
6.1. 시험물질명의 수정	6
6.2. COA 추가	6
7. 자료의 보관 (Archives)	6
7.1. 보관기록 및 자료의 종류	6
7.2. 보관장소	6
8. 결과 (Results)	7
8.1. 사망률 및 일반증상	7
8.2. 체중변화	7
8.3. 부검소견	7
9. 고찰 및 결론 (Discussion & conclusion)	8
10. 참고문헌 (References)	9
11. Tables (Group summary)	10
Table 1. Mortality	10
Table 2. Clinical signs	11
Table 3. Body weight	12
Table 4. Necropsy findings	13

12. Appendices (Individual data) .....	14
Appendix 1. Clinical signs of female rats .....	14
Appendix 2. Body weight of female rats .....	15
Appendix 3. Necropsy findings of female rats .....	16
13. Annexes .....	17
Annex 1. Information of test substance (Submitted by sponsor) .....	17
Annex 2. Test procedure with a starting dose of 300 mg/kg body weight .....	19
Annex 3. Amendment document of study plan .....	20
Annex 4. Document for final report amendment .....	21
Annex 5. Certificate of analysis (Submitted by sponsor) .....	22

## 1. 요약 (Summary)

갈매보리수나무 잎 열수 추출물에 대한 단회 경구투여 독성시험을 실시하기 위해 SD계 암컷 rat를 사용하여 시험물질 투여용량을 300 mg/kg B.W. (1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup> step)와 2000 mg/kg B.W. (3<sup>rd</sup>, 4<sup>th</sup> step)로 단계를 나누어 각각 3 마리에 1 회 경구 투여하였다. 시험물질 투여 후 14 일간 사망률, 일반증상 및 체중변화를 관찰하였으며, 생존 동물은 부검하여 육안적으로 장기의 이상 유무를 검사하였다.

- 실험기간 중, 시험물질 투여에 의한 사망동물은 관찰되지 않았다.
- 일반증상 관찰결과, 시험물질 투여에 의한 이상증상은 관찰되지 않았다.
- 생존동물에 대한 체중측정 결과, 모든 투여군에서 정상적인 체중증가가 관찰되었다.
- 생존동물의 부검 소견 결과, 모든 투여군에서 이상소견은 관찰되지 않았다.

이상의 결과로부터 갈매보리수나무 잎 열수 추출물은 국제적으로 공인되고 조화된 화학물질 및 혼합물의 분류 시스템 GHS (Globally Harmonized Classification System for Chemical Substances and Mixtures) Category 5 (2000 mg/kg body weight < LD<sub>50</sub> < 5000 mg/kg body weight)로 분류되었다.

## 2. 서론 (Introduction)

본 시험은 rat를 이용하여 갈매보리수나무 잎 열수 추출물을 단회 경구투여시 나타나는 독성 반응을 평가하기 위하여 실시하였다.

본 시험은 동물보호법 [법률 제12512호(2014-03-24, 일부개정)] 및 실험동물에 관한 법률[법률 제11987호(2013-07-30, 일부개정)]에 근거한 한국화학융합시험연구원 헬스케어연구소의 동물윤리 위원회에 의해 승인하여 실시하였다.

### 2.1 시험일정

시험개시일	: 2014-08-22
실험개시일	: 2014-08-26
실험동물도입일	: 2014-08-26
검역 및 순화기간	: 2014-08-26 - 2014-09-01
군분리일	: 2014-09-01
투여일	: 2014-09-02(1 <sup>st</sup> step), 2014-09-04(2 <sup>nd</sup> step), 2014-09-10(3 <sup>rd</sup> step), 2014-09-12(4 <sup>th</sup> step)
일반증상 관찰기간	: 2014-09-02 - 2014-09-16(1 <sup>st</sup> step), 2014-09-04 - 2014-09-18(2 <sup>nd</sup> step), 2014-09-10 - 2014-09-24(3 <sup>rd</sup> step), 2014-09-12 - 2014-09-26(4 <sup>th</sup> step)
부검일	: 2014-09-16(1 <sup>st</sup> step), 2014-09-18(2 <sup>nd</sup> step), 2014-09-24(3 <sup>rd</sup> step), 2014-09-26(4 <sup>th</sup> step)
실험종료일	: 2014-09-26
최종보고서(초안) 제출일	: 2014-09-30
시험종료일	: 2014-10-08
최종보고서 수정일	: 2014-11-24

### 3. 재료 및 방법 (Materials & methods)

#### 3.1 시험물질 및 부형제

##### 3.1.1 시험물질 (Annex 1.)

물질명	: 갈매보리수나무 잎 열수 추출물
KTR 코드	: TS-00087
보관조건	: 상온 [(15 - 25) °C]
공급원	: (재)천연자원연구원
제조일	: 2014-03-15
입수일	: 2014-08-07
입수량	: 650,780 g(Gross)
시험기간 중 보관조건	: 상온 [(15 - 25) °C]
유효기간	: 2015-03-15 (제조 후 1 년)
외관 및 색상	: 진한 갈색 분말
순도	: 99.9 %
수용해도	: water soluble
잔여시험물질처리	: 반환

##### 3.1.2 부형제

물질명	: 멸균증류수(주사용수)
제조원	: ㈜대한약품공업
Lot No.	: W2N6K21

※ 부형제는 시험물질에 대해 현탁이 가능한 물질로 선택하였다.

#### 3.2 시험물질 조제

시험의뢰자가 제공한 시험물질을 순도환산하지 않고 그대로 이용하여, 본 시험물질을 칭량한 후 부형제인 멸균증류수(주사용수)에 30 mg/mL (1<sup>st</sup> · 2<sup>nd</sup> step) 및 200 mg/mL (3<sup>rd</sup> · 4<sup>th</sup> step)농도로 조제하여 사용하였다.

#### 3.3 시험물질 분석

시험의뢰자와 협의하여 시험물질 및 시험물질 조제물의 농도, 안정성 및 균질성에 대한 분석은 별도로 시행하지 않았다.

#### 3.4 시험계

계통 및 종	: CrI:CD(SD), Rat, SPF
공급원	: (주)오리엔트 바이오 (경기도 가평군 북면 화악산로 124번길 8)
도입 시 성별, 동물수	: 암컷, 13 마리
도입 시 주령, 체중범위	: 8 주령, 181.0 g - 193.2 g

투여 시 성별, 동물수	: 암컷, 12 마리 (1 <sup>st</sup> - 4 <sup>th</sup> step 각각 3 마리)
투여 시 주령, 체중범위	: 9 주령, 187.0 g - 201.4 g (1 <sup>st</sup> step) 9 주령, 193.7 g - 196.4 g (2 <sup>nd</sup> step) 10 주령, 206.0 g - 209.7 g (3 <sup>rd</sup> step) 10 주령, 201.6 g - 213.5 g (4 <sup>th</sup> step)

#### 3.4.1 시험계의 선택사유

본 시험에 사용된 SD rat는 단회독성시험 등의 안전성 시험에 널리 사용되고 있으며, 비교할 많은 시험기초자료가 축적되어 있어 선택하였다.

#### 3.4.2 검역 및 순화

동물을 도입 후 7 일 동안 한국화학융합시험연구원 헬스케어연구소의 동물사육실의 환경하에서 검역 및 순화시키면서 일반 건강상태를 관찰한 후, 건강한 개체를 선별하여 시험에 사용하였다.

#### 3.4.3 개체식별

유성펜을 이용하여 꼬리에 표시하였고, cage는 개체식별카드를 부착하여 식별하였다.

#### 3.4.4 군분리

순화 후 건강한 개체를 선별하여, 각 군간 평균체중 및 표준편차가 균일하도록 무작위법으로 군분리를 실시하였다.

#### 3.4.5 잔여동물의 처리

잔여동물은 군 분리 후 안락사 시켰다.

### 3.5 사육환경

#### 3.5.1 동물실 번호

검역 및 순화	: 청정동물 사육실 12
실험 및 관찰	: 청정동물 사육실 1

#### 3.5.2 환경조건

온도	: (21.4 - 22.2) °C
상대습도	: (52.7 - 57.9) % R.H.
환기횟수	: (10 - 20) 회/h
조명주기	: 광조건 12 시간 (08:00 - 20:00) 암조건 12 시간 (20:00 - 08:00)
조도	: (150 - 300) Lux
Cage 종류	: Stainless steel wire cage
Cage 크기	: (310W × 500D × 200H) mm
Cage당 수용마리 수	: 3 마리 이하

동물실의 온·습도는 자동 온습도 측정기에 의하여 매 30 분마다 측정 되었으며, 조도 등의 환경조건은 표준작업지침서에 따라 측정하였다. 동물실의 환경 측정 결과, 시험에 영향을 미치는 요인은 발견되지 않았다.

3.5.3 사료 및 음수 공급

사료는 방사선 멸균된 Labdiet 5L79 [Labdiet, USA]를, 음수는 R/O수를 자유섭취 시켰다.

3.5.4 사료 및 음수 중의 오염물질 확인

사료는 제조업체의 정기적 검사에 따른 분석성적서를 사료공급자로부터 받아 확인하였다. 음수는 한국화학융합시험연구원 헬스케어연구소의 표준작업지침서에 따른 정기적 검사를 통해 확인한 결과 시험에 영향을 미치는 요인은 발견되지 않았다.

4. 시험방법 (Test method)

4.1 실험계획

시험물질의 독성정보가 없어 300 mg/kg B.W. 용량으로 하여 1 단계로 3 마리에 투여하였다. 그 이후 Annex 2 항에 첨부된 단계별 흐름도에 따라 다음 단계를 진행하였다. 시험물질 투여 간격은 일반증상 및 정도에 의해 결정되었다(Annex 2. Test procedure with a starting dose of 300 mg/kg body weight).

4.2 군 구성

시험	성	동물번호	마리수	투여량 (mg/kg B.W.)	투여액량 (mL/kg B.W.)	투여경로
G1	암컷	2101 - 2103	3	300	10	경구
G2	암컷	2201 - 2203	3	300	10	
G3	암컷	2301 - 2303	3	2000	10	
G4	암컷	2401 - 2403	3	2000	10	

※ G1 : 1<sup>st</sup> step, G2 : 2<sup>nd</sup> step, G3 : 3<sup>rd</sup> step, G4 : 4<sup>th</sup> step

4.3 시험물질의 투여 경로 및 방법

약 18 시간 절식 시킨 실험동물에 시험물질 조제물을 경구 투여용 sonde를 장착 한 주사기를 이용하여 위내에 1 회 강제 투여하였다.

4.4 관찰항목

4.4.1 일반증상 관찰

모든 동물에 대하여 매일 1 회 증상관찰을 실시하였다. 단, 투여 당일에는 투여 후 0.5, 1, 2, 3 시간을 포함하여, 4 시간까지는 매 시간마다 관찰하였으며, 투여 후 14 일까지 실시하였다.

4.4.2 체중변화

체중은 도입 시, 군분리 시, 시험물질투여 개시 직전, 투여 개시 후 7 일 및 14 일째에 측정하였다.

4.4.3 부검 소견

투여 후 14 일째 모든 생존동물의 외관 검사를 실시한 후, 방혈치사 하여 육안으로 장기를 검사하였다.

## 5. 시험계획서의 변경 및 일탈 (Amendments and deviations from the study plan)

### 5.1 시험모니터 추가

시험의뢰자 요청으로 시험모니터가 추가 되었지만, 시험결과에 미치는 영향은 없었다(Annex 3).

### 5.2 기타

이외, 시험기간 동안 시험계획서에 대한 변경 및 일탈사항은 없었다.

## 6. 최종보고서의 수정 (Amendments from the final report) (Annex 4)

### 6.1 시험물질명의 수정

시험의뢰자 요청으로 시험물질명이 수정되었다.

### 6.2 COA 추가

시험의뢰자 요청으로 COA를 추가하였다.

## 7. 자료의 보관 (Archives)

시험기간중에 발생한 모든 시험기초자료는 품목허가일로부터 3 년간 보관하며, 최종보고서 발급 후 5 년이 경과된 자료의 경우 표준작업지침서에 따른다.

### 7.1 보관기록 및 자료의 종류

- (1) 시험계획서에 관한 기록
- (2) 시험물질에 관한 기록 및 자료
- (3) 시험계에 관한 기록 및 자료
- (4) 관찰, 측정 및 검사에 관한 기록
- (5) 시험의뢰자와의 송수신 기록
- (6) 최종보고서에 관한 기록

### 7.2 보관장소

한국화학융합시험연구원 헬스케어연구소 자료보관실 (1)

## 8. 결과 (Results)

### 8.1 사망률 및 일반증상 (Table 1, 2 and Appendix 1)

실험기간 중, 시험물질 투여에 의한 사망동물 및 이상소견은 관찰되지 않았다.

### 8.2 체중변화 (Table 3, Appendix 2)

생존동물에 대한 체중측정 결과, 모든 투여군에서 정상적인 체중증가가 관찰되었다.

### 8.3 부검소견 (Table 4, Appendix 3)

생존동물의 부검 소견결과, 모든 투여군에서 이상소견은 관찰되지 않았다.

## 9. 고찰 및 결론 (Discussion & conclusion)

갈매보리수나무 잎 열수 추출물에 대한 단회경구투여독성시험을 실시하기 위해 SD계 암컷 rat를 사용하여 시험물질 투여용량을 300 mg/kg B.W. (1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup> step)와 2000 mg/kg B.W. (3<sup>rd</sup>, 4<sup>th</sup> step)로 단계를 나누어 각각 3 마리에 1 회 경구 투여하였다. 시험물질 투여 후 14 일간 사망률, 일반증상 및 체중변화를 관찰하였으며, 생존 동물은 부검하여 육안적으로 장기의 이상 유무를 검사하였다.

실험기간 중, 시험물질 투여에 의한 사망동물 및 이상소견은 관찰되지 않았다.

생존동물에 대한 체중측정 결과, 모든 투여군에서 정상적인 체중증가가 관찰되었다.

생존동물의 부검 소견결과, 이상소견은 관찰되지 않았다.

이상의 결과로부터 갈매보리수나무 잎 열수 추출물은 국제적으로 공인되고 조화된 화학물질 및 혼합물의 분류 시스템 GHS (Globally Harmonized Classification System for Chemical Substances and Mixtures) Category 5 (2000 mg/kg body weight < LD<sub>50</sub> < 5000 mg/kg body weight)로 분류되었다.

## 10. 참고문헌 (References)

- 식품의약품안전처 고시 제2013-217호(2013-09-11) “건강기능식품 기능성 원료 및 기준·규격 인정에 관한 규정”
- 식품의약품안전처 고시 제2014-67호(2014-02-12) “비임상시험관리기준”
- OECD “Principle of Good Laboratory Practice, ENV/MC/CHEM (98)17 (as revised in 1997)”
- OECD Guideline for testing of chemicals, Section 4, TG 423 “Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method” (December 17, 2001)

**11. Tables (Group summary)**

Table 1. Mortality

Group	Dose (mg/kg B.W.)	Sex	Mortality
G1	300	Female	0 % (0 / 3) <sup>a</sup>
G2	300	Female	0 % (0 / 3)
G3	2000	Female	0 % (0 / 3)
G4	2000	Female	0 % (0 / 3)

<sup>a</sup> : Number of dead animals / Number of tested animals

Table 2. Clinical signs

Group	Dose (mg/kg B.W.)	Sex	Number of animals	Clinical signs
G1	300	Female	3	Normal
G2	300	Female	3	Normal
G3	2000	Female	3	Normal
G4	2000	Female	3	Normal

Table 3. Body weight

Unit : g

Group	Dose (mg/kg B.W.)	Sex	Days after administration			
			0	7	14	
			Mean	193.3	230.9	246.4
G1	300	Female	S.D.	7.4	14.9	22.7
			N	3	3	3
			Mean	194.7	215.6	228.3
G2	300	Female	S.D.	1.5	3.5	1.9
			N	3	3	3
			Mean	208.1	216.5	243.0
G3	2000	Female	S.D.	1.9	6.4	4.7
			N	3	3	3
			Mean	206.5	242.1	250.6
G4	2000	Female	S.D.	6.2	10.3	15.0
			N	3	3	3

S.D. : Standard deviation, N : Number of animals

Table 4. Necropsy findings

Findings		G1 (300 mg/kg B.W.)	G2 (300 mg/kg B.W.)	G3 (2000 mg/kg B.W.)	G4 (2000 mg/kg B.W.)
		Female	Female	Female	Female
Number of animals		3	3	3	3
External findings	No gross findings	3	3	3	3
Internal findings	No gross findings	3	3	3	3

**12. Appendices (Individual data)**

Appendix 1. Clinical signs of female rats

Group	Dose (mg/kg B.W.)	Animal number	Hours after administration					Days after administration			
			0.5 h	1 h	2 h	3 h	4 h	1	2	3	4
G1	300	2101	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2102	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2103	N	N	N	N	N	N	N	N	N
G2	300	2201	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2202	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2203	N	N	N	N	N	N	N	N	N
G3	2000	2301	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2302	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2303	N	N	N	N	N	N	N	N	N
G4	2000	2401	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2402	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2403	N	N	N	N	N	N	N	N	N

N : Normal

Group	Dose (mg/kg B.W.)	Animal number	Days after administration										
			5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
G1	300	2101	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2102	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2103	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
G2	300	2201	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2202	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2203	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
G3	2000	2301	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2302	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2303	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
G4	2000	2401	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2402	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		2403	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

N : Normal

## Appendix 2. Body weight of female rats

Unit : g

Group	Dose (mg/kg B.W.)	Animal number	Days after administration		
			0	7	14
G1	300	2101	187.0	222.8	236.2
		2102	201.4	248.1	272.5
		2103	191.5	221.7	230.7
		Mean	193.3	230.9	246.4
		S.D.	7.4	14.9	22.7
G2	300	2201	193.7	212.5	227.5
		2202	196.4	219.4	227.0
		2203	194.0	214.8	230.5
		Mean	194.7	215.6	228.3
		S.D.	1.5	3.5	1.9
G3	2000	2301	208.7	215.0	238.6
		2302	206.0	211.0	242.4
		2303	209.7	223.5	248.0
		Mean	208.1	216.5	243.0
		S.D.	1.9	6.4	4.7
G4	2000	2401	204.4	239.5	242.4
		2402	201.6	233.4	241.6
		2403	213.5	253.4	267.9
		Mean	206.5	242.1	250.6
		S.D.	6.2	10.3	15.0

S.D. : Standard deviation

## Appendix 3. Necropsy findings of female rats

Animal Number : 2101	Group : G1	Dose : 300 mg/kg	Terminal sacrifice : Day 14
External findings : No gross findings			
Internal findings : No gross findings			
Animal Number : 2102	Group : G1	Dose : 300 mg/kg	Terminal sacrifice : Day 14
External findings : No gross findings			
Internal findings : No gross findings			
Animal Number : 2103	Group : G1	Dose : 300 mg/kg	Terminal sacrifice : Day 14
External findings : No gross findings			
Internal findings : No gross findings			
Animal Number : 2201	Group : G2	Dose : 300 mg/kg	Terminal sacrifice : Day 14
External findings : No gross findings			
Internal findings : No gross findings			
Animal Number : 2202	Group : G2	Dose : 300 mg/kg	Terminal sacrifice : Day 14
External findings : No gross findings			
Internal findings : No gross findings			
Animal Number : 2203	Group : G2	Dose : 300 mg/kg	Terminal sacrifice : Day 14
External findings : No gross findings			
Internal findings : No gross findings			
Animal Number : 2301	Group : G3	Dose : 2000 mg/kg	Terminal sacrifice : Day 14
External findings : No gross findings			
Internal findings : No gross findings			
Animal Number : 2302	Group : G3	Dose : 2000 mg/kg	Terminal sacrifice : Day 14
External findings : No gross findings			
Internal findings : No gross findings			
Animal Number : 2303	Group : G3	Dose : 2000 mg/kg	Terminal sacrifice : Day 14
External findings : No gross findings			
Internal findings : No gross findings			
Animal Number : 2401	Group : G4	Dose : 2000 mg/kg	Terminal sacrifice : Day 14
External findings : No gross findings			
Internal findings : No gross findings			
Animal Number : 2402	Group : G4	Dose : 2000 mg/kg	Terminal sacrifice : Day 14
External findings : No gross findings			
Internal findings : No gross findings			
Animal Number : 2403	Group : G4	Dose : 2000 mg/kg	Terminal sacrifice : Day 14
External findings : No gross findings			
Internal findings : No gross findings			

13. Annexes

Annex 1. Information of test substance (Submitted by sponsor)

**시험물질 정보기록지**

- \* 정확하고 신뢰성있는 시험의 진행을 위하여 시험물질에 대한 내용을 정확하게 작성하여 주십시오.
- \* 물질이 2종 이상인 경우, 각 물질마다 기록지를 작성하여 주십시오.

Page (1/2)

작성일	2014년 7월 24일	작성자 :	김옥경 (서명)
시험물질 (Test substance)			
시험물질명 (Name of test substance)	갈매보리수나무 잎 열수 추출물		
분류 (Classification)	<input checked="" type="checkbox"/> 건강기능식품 <input type="checkbox"/> 농약 <input type="checkbox"/> 의약품 <input type="checkbox"/> 화학물질 <input type="checkbox"/> 화장품 <input type="checkbox"/> 기타		
공급원 (Supplier)	(재) 천연자원연구원		
제조일 (Manufacturing date)	2014년 3월 15일		
재공량 (Delivery amount)	<input type="checkbox"/> 실중량(Net): g <input type="checkbox"/> 용기포함(Gross): g ( ( g ) * ( (개) (병) ) )		
Cas. No.	<input type="checkbox"/> ( ) ; <input type="checkbox"/> 추후제공 <input checked="" type="checkbox"/> 무		
로트번호 (LOT No)	<input type="checkbox"/> ( ) ; <input type="checkbox"/> 추후제공 <input checked="" type="checkbox"/> 무		
시험기간 중 보관조건 (Storage condition)	<input type="checkbox"/> 실온(1~30°C) <input checked="" type="checkbox"/> 상온(15~25°C) <input type="checkbox"/> 냉장(2~8°C) <input type="checkbox"/> 냉동(-15~-25°C); <input type="checkbox"/> 기타 ( )		
유효기간 (Expiration date)	2015년 3월 15일 (제조 후 1년)		
외관 및 색상 (Physical description)	흰색 갈색 분말		
순도 (Purity)	( 99.9 % ) <input type="checkbox"/> 추후제공 <input type="checkbox"/> 무		
분자식(분자량) (Molecular formula or weight)	( ) ; <input type="checkbox"/> 추후제공 <input checked="" type="checkbox"/> 무		
비중 (Specific gravity)			
pH			
옥탄올분배계수 (KOW)			
수용해도 (Solubility in water)	water soluble		
잔여시험물질 처리방법 (Treatment after the end of study)	<input checked="" type="checkbox"/> 반환 <input type="checkbox"/> 폐기 (* 본 시설에서 일부 보관)		
취급 / 폐기시 주의사항 (Caution in handling or disposal)	<input type="checkbox"/> MSOS 참조 <input checked="" type="checkbox"/> 무 <input type="checkbox"/> 기타		

KG-APM-001-F01 V.01

2014-01-20

(Continued)

Page 17 of 23

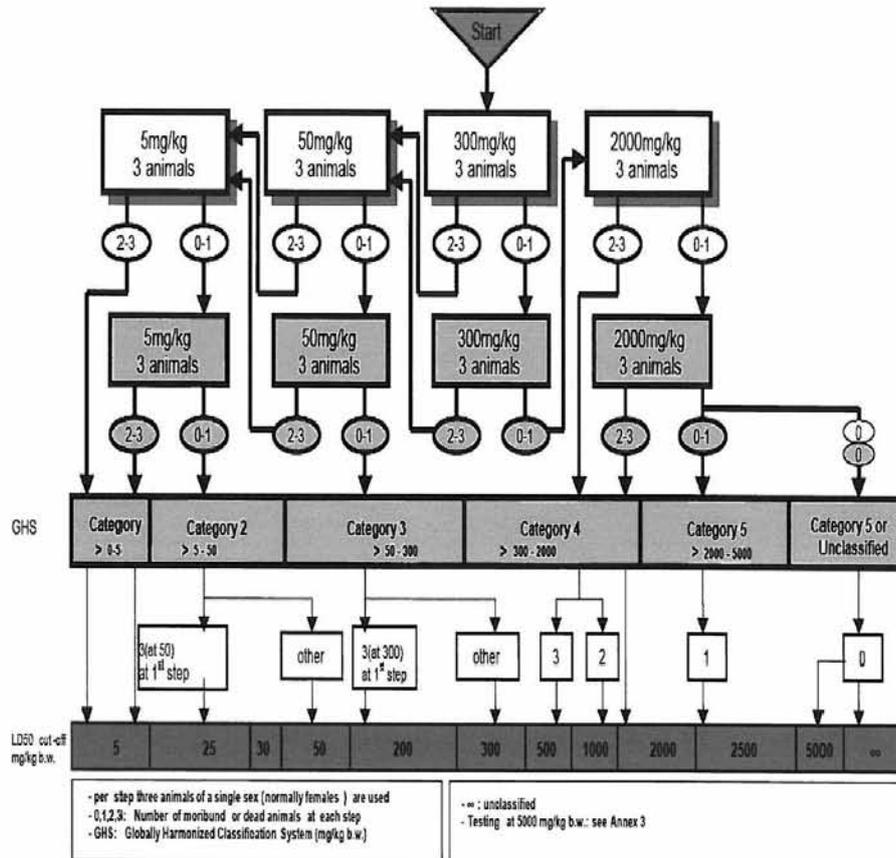
Annex. 1 (Continued)

Page (2/2)

입상예정경로 (Route of clinic)	<input checked="" type="checkbox"/> 경구 <input type="checkbox"/> 경피 <input type="checkbox"/> 정맥 <input type="checkbox"/> 기타: )	임상예정용량 (Dose conc. of clinic)	<input type="checkbox"/> (mg/kg B.W.) <input type="checkbox"/> (mL/kg B.W.)
운송방법 (Delivery method)	<input checked="" type="checkbox"/> 우편 <input type="checkbox"/> 직접전달 <input type="checkbox"/> 기타 ( )		
운송조건 (Delivery condition)	<input type="checkbox"/> 실온(1~30℃) <input checked="" type="checkbox"/> 상온(15~25℃) <input type="checkbox"/> 냉장(2~8℃) <input type="checkbox"/> 냉동(-15~-25℃) <input type="checkbox"/> 기타 ( )		
발송(예정)일 (Delivery date)	2014 년 7 월 30 일		
시 험 물 질 조 제 (Preparation of the dosing solution)			
부형제 / 용해도 (Vehicle and solubility)	<input type="checkbox"/> 주사용수 <input checked="" type="checkbox"/> 생리식염수 <input type="checkbox"/> DMSO <input type="checkbox"/> DMF <input type="checkbox"/> 바세린 <input type="checkbox"/> 에탄올 <input type="checkbox"/> 아서톤 <input type="checkbox"/> 식물오일 (Corn oil/Olive oil) <input type="checkbox"/> ( )% CMC <input type="checkbox"/> ( )% MC <input type="checkbox"/> 기타( )		
안정성 (Stability)	( )	균 질 성 (Homogeneity)	<input type="checkbox"/> 추후제공 <input checked="" type="checkbox"/> 무 <input type="checkbox"/> 기타( )
조제물 보관조건 (Storage condition of dosing solution)	<input type="checkbox"/> 실온(1~30℃) <input checked="" type="checkbox"/> 상온(15~25℃) <input type="checkbox"/> 냉장(2~8℃) <input type="checkbox"/> 냉동(-15~-25℃) <input type="checkbox"/> 기타( )		
조제방법 (Preparation method)	<input type="checkbox"/> 첨부자료 참고 <input type="checkbox"/> E-mail 등으로 전달 <input type="checkbox"/> 기타( )		
주 의 사 함 (caution)	<input type="checkbox"/> 차광 <input type="checkbox"/> 밀폐 <input checked="" type="checkbox"/> 제습 <input type="checkbox"/> 기타( )		
조제물 분석 (Analysis of the dosing solution)			
조제물 분석 필요 (Analysis of the dosing solution in the study)	<input type="checkbox"/> 필요 <input checked="" type="checkbox"/> 불필요(조제물 분석 성적서 제공, 시험물질 CoA류 대체) <input type="checkbox"/> 기타 ( )		
분석법 (Analytical method)	<input type="checkbox"/> 제공 (검출한계: ) <input type="checkbox"/> 분석법 개발 필요		
표준물질 (Standard material)	<input type="checkbox"/> 제공 <input type="checkbox"/> 시험물질로 대체		
분석기기 (Analytical instrument)	<input type="checkbox"/> LC <input type="checkbox"/> GC <input type="checkbox"/> 기타( )		
검출기 (Detector)	<input type="checkbox"/> UVD <input type="checkbox"/> FLD <input type="checkbox"/> PDA <input type="checkbox"/> MSD <input type="checkbox"/> ECD <input type="checkbox"/> INPD		
첨 부 자 료 (Attachment)	<input checked="" type="checkbox"/> 시험물질의 성적서(Certificate of Analysis) <input type="checkbox"/> MSDS <input type="checkbox"/> 시험물질 안정성자료 <input type="checkbox"/> 약효약리자료 <input type="checkbox"/> 독성시험자료 <input type="checkbox"/> 타기관 보고서 <input type="checkbox"/> 시험물질 참고자료 <input type="checkbox"/> 참고문헌 <input type="checkbox"/> 시험물질 조제방법 <input type="checkbox"/> 분석법 <input type="checkbox"/> 표준물질 <input type="checkbox"/> 기타( )		
비 고 (Remark)	(고객희망사항 혹은 기타정보등에 대하여 기술하여 주십시오)		

(End)

Annex 2. Test procedure with a starting dose of 300 mg/kg body weight.



Annex 3. Amendment document of study plan

시험계획서 변경 기록지

시험제목	Rat에 대한 갈테브리수나우 배수 추출물의 단기경구투여독성시험		
시험번호	TGW-0135-14	변경일	2014-08-27
변경 전		변경 후	
<p>시험의뢰자 (Sponsor)</p> 명 칭 : 경희대학교 소 재 지 : 경기도 용인시 기흥구 보정로 1732 동 연 구 소 : 의학교육국제협력부 대 표 자 : 이경민 담당자 : 김옥경 (부사) / 박지현 (부사) / 동서연대학원 연 락 처 : Tel 031-204-3779 Fax 031-204-8119		<p>시험의뢰자 (Sponsor)</p> 명 칭 : 에뉴트리플린 소 재 지 : 경기도 파주시 조리읍 농안로 262번길 29 대 표 자 : 김남길 담당자 : 이호재 (부사) / 김희재 (부사) / 기업부설연구소 / 연구소장 연 락 처 : Tel 070-7509-0886 Fax 02-6280-9071	
<p>시험모니터 (Monitor)</p> 명 칭 : 김복길 소 재 지 : 경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 동 연 구 소 : 경희대학교 국제협력부 국제경영관 207호 대 표 자 : 이영민 담당자 : 김옥경 (부사) / 박지현 (부사) / 동서연대학원 연 락 처 : Tel 031-204-3779 Fax 031-204-8119		<p>시험모니터 (Monitor)</p> 명 칭 : 김복길 소 재 지 : 경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 동 연 구 소 : 경희대학교 국제협력부 국제경영관 207호 대 표 자 : 이영민 담당자 : 김옥경 (부사) / 박지현 (부사) / 동서연대학원 연 락 처 : Tel 031-204-3779 Fax 031-204-8119	
시험의뢰자 (Sponsor) 김 옥 경 Date _____			
시험모니터 (Monitor) 김 옥 경 Date _____			
시험계획서 (Sponsor) 미 안 재 Date _____			
시험모니터 (Monitor) 김 옥 경 Date _____			
변경 사유 및 시험에 대한 영향 평가			
<input type="checkbox"/> 시험모니터가 추가 됨 <input checked="" type="checkbox"/> 시험에 미치는 영향은 없음			
시험책임자: 김 준 호 날짜: 2014년 8월 27일	의뢰자: 김복길 날짜: 2014년 8월 27일		
Q A U : 홍 승 호 운영책임자 : 박지현	날짜: 2014년 8월 27일 날짜: 2014년 8월 27일		

Annex 4. Document for final report amendment

최종보고서 수정기록서

시험제목	Rat에 대한 갈매보리수나무 잎 열수 추출물의 단회경구투여독성시험		
시험번호	TGW-0135-14		
수정번호	1	수정일자	2014년 11월 24일
시험기관	한국화학융합시험연구원		

수정내용 및 수정시류			
1. 시험물질명의 수정 - 의뢰자 요청으로 인해 수정 - 수정 전 갈매보리수나무 열수 추출물 - 수정 후 갈매보리수나무 잎 열수 추출물  2. COA 추가 - 의뢰자 요청으로 COA 추가			
시험책임자	김준호	일자	2014년 11월 24일
QAU책임자	김승희	일자	2014년 11월 24일
운영책임자	박종필	일자	2014년 11월 24일

시험의뢰자 확인	회사명:	한국화학융합시험연구원
	주소:	경기도 용인시 처인구 모곡읍 처인로 111-1 (한국화학융합시험연구원 본사)
	성명/직책:	김준호 / 연구원
	일자:	2014년 11월 24일

Annex 5. Certificate of analysis (Submitted by sponsor)

갈매보리수나무 잎 열수추출물 성분 검사 결과

○ 일반성분 분석결과

항목	단위	함량
열량	(Kcal/100g)	284.13
탄수화물	(%)	83.00±5.15 (식이섬유 55.84% 함유)
조단백질	(%)	5.31±0.02
즈시황	(%)	4.73±0.04
수분	(%)	3.65±0.05
회분	(%)	3.31±0.19
당류	(mg/100g)	13.88±0.10
포화지방산	(g/100g)	0.3±0.005
콜레스테롤	(mg/100g)	-
불포화지방산	(g/100g)	2.71±0.07
식이섬유	(%)	55.84
나트륨	(mg/100g)	6.21±0.65
트랜스지방산	(g/100g)	0.002

\*한국기능식품연구원 분석결과

주 뉴트리플랜



주 뉴트리플랜 경기도 과천시 호암로 386번길 29 (www.neonutrition.com) 070-7569-0071

(Continued)

Annex 5. (Continued)

갈매보리수나무 잎 열수추출물 규격(안)

성분명	규격	함량
성상	이미, 이취가 없는 갈색의 분말	이미, 이취가 없는 갈색의 분말
플라보놀 배당체함량 (Quercetin+Kaempferol+1-sorhamnetin)(mg/g)	12 ± 30%	13.357
비소 (mg/kg)	1	0.0067
납 (mg/kg)	1	0.0667
수은 (mg/kg)	1	불검출
카드뮴 (mg/kg)	1	0.0038
대장균군	음성	음성

\*한국기능식품연구원 분석결과

주 뉴트리플랜



주 뉴트리플랜 경기도 파주시 조리읍 탄현로268번길 29 www.nutrition1.co.kr 070-7565-0071

(End)



## 최 종 보 고 서

TGW-0136-14

갈매보리수나무 잎 열수 추출물

갈매보리수나무 잎 열수 추출물에 대한 세균을 이용한  
복귀돌연변이시험

한국화학융합시험연구원



## GLP 진술서

[ GLP statement ]

시험제목 : 갈매보리수나무 잎 열수 추출물에 대한 세균을 이용한 복귀돌연변이시험  
[Study title]

시험번호 : TGW-0136-14  
[Study number]

### 시험의뢰자(Sponsor)

명 칭 : ㈜뉴트리헬스  
소재지 : 경기도 파주시 조리읍 능안로 266번길 29  
대표자 : 강 남 길  
담당자 : 이 민 재                      부서 및 직책 : 기업부설연구소/연구소장  
연락처 : Tel. 070-7569-0686                      Fax. 02-6290-0071

### 시험기관[Test facility]

명 칭 : 한국화학융합시험연구원 헬스케어연구소  
소재지 : 전라남도 화순군 화순읍 신단길 12-63  
운영책임자 : 박 종 일  
연락처 : Tel. 061-370-7700                      Fax. 061-370-7777

이 보고서에 기술된 시험과정은 시험책임자의 책임하에 수행되었으며, 보고서는 GLP 규정에 준수하여 실시하였다.

#### 1. GLP 규정

- 1.1. 식품의약품안전처 고시 제2014-67호 (2014-02-12), 비임상시험관리기준
- 1.2. OECD Principles of Good Laboratory Practice, ENV/MC/CHEM (38)17 (as revised in 1997)

#### 2. 시험방법

- 2.1. 식품의약품안전처 고시 제2014-136호(2014-07-30), 의약품등의 독성시험기준, [별표 4] 유전독성시험(박테리아를 이용한 복귀돌연변이 시험)

본 보고서는 승인된 시험계획서에 따라 수행되었으며, 시험 진행 중 신뢰성을 저해할 만한 상황이 발생하지 않았음을 확인하였다.

시험책임자

이 종 윤  
[Study director] 이 종 윤 [Lee Jong-yun, B.S.]

2014-11-07

Date

운영책임자

박 종 일  
[Test Facility Management] 박 종 일 [Park Jong-il, Ph.D. candidate]

2014-11-09

Date

**신뢰성보증 확인서**  
[ Quality assurance statement ]

시험제목 [Study title] : 갈매보리수나무 잎 열수 추출물에 대한 세균을 이용한 복귀돌연변이시험  
 시험번호 [Study number] : TGW-0136-14

점검한 시험단계	점검일자	시험책임자 보고일자	운영책임자 보고일자
시험계획서(초안) 점검	2014-08-21	2014-08-21	2014-08-21
시험계획서의 점검	2014-08-28	2014-08-28	2014-08-28
농도결정시험의 점검	2014-09-22	2014-09-22	2014-09-22
본시험의 점검	2014-10-07	2014-10-07	2014-10-07
시험물질 조제 및 처리의 점검	2014-10-07	2014-10-07	2014-10-07
시험기초자료의 점검	2014-10-29	2014-10-29	2014-10-29
최종보고서(초안)의 점검	2014-10-29	2014-10-29	2014-10-29
최종보고서의 점검	2014-11-07	2014-11-07	2014-11-07

한국화학융합시험연구원 헬스케어연구소 신뢰성보증부서는 시험계획서에 따라 기록된 점검일자에 주요 시험 단계의 점검을 수행 하였다.

본 최종보고서는 한국화학융합시험연구원 헬스케어연구소의 신뢰성보증부서에 의하여 점검되었으며, 보고된 시험결과는 시험기초자료 및 시험 과정을 정확하게 반영하고 있다.

시험에 대한 점검 결과는 시험책임자 및 운영책임자에게 보고되었다. 이러한 점검을 바탕으로 최종보고서를 검토하였다. 본 시험은 GLP 규정에 따라 수행되었다.

신뢰성보증담당자 [QA person] 이 준 연 2014-11-07.  
 이 준 연 Date  
 [Lee Jun-yeon, Ph.D. Candidate]

신뢰성보증책임자 [QA manager] 홍 승 국 2014-11-07.  
 홍 승 국 Date  
 [Hong Seung-guk, M.S.]



## 시험참여자

[Study staffs]

다음의 시험자는 시험 중 중요한 시험단계 및 기록을 한국화학융합시험연구원 헬스케어연구소의 표준직업지침서와 본시험의 시험계획서에 따라 수행하였다.

시험 담당자 : 김지수/B.S.  
김지연/B.S.

시험물질 조제담당자 : 정정욱/B.S.

시험물질 조제책임자 : 정정욱/B.S.

시험물질 처리 : 김지연/B.S.  
이종윤/B.S.

자료의 해석 및  
보고서 작성 : 이종윤/B.S.

# 목 차

[Contents]

보고서표지	
GLP 진술서 [GLP statement]	I
신뢰성보증 확인서 [Quality assurance statement]	II
시험참여자 [Study staffs]	III
목차 [Contents]	IV
1. 요약 (Summary)	1
2. 서론 (Introduction)	2
2.1. 시험일정	2
3. 재료 및 방법	3
3.1. 시험물질	3
3.2. 대조물질	3
3.3. 시험균주	4
3.4. 배지	5
3.5. S9 mix	6
3.6. 시험물질용액 및 양성대조물질용액 조제	7
3.7. 시험물질용량 및 양성대조물질용량	8
3.8. 복귀돌연변이시험	9
4. 시험계획서의 변경 및 일탈	11
5. 기록 및 자료 보관	11
6. 결과	12
7. 고찰 및 결론	13
8. 참고문헌 (References)	14
9. Tables	15
Table 1. Result of concentration range-finding test (Group summary)	15
Table 2. Result of main test (Group summary)	16
10. Appendices	17
Appendix 1. Result of concentration range-finding test (Individual summary)	17
Appendix 2. Result of main test (Individual summary)	18
11. Annexes	19
Annex 1. Historical background data	19
Annex 2. Information of test substance (Submitted by sponsor)	20
Annex 3. Certificate of analysis (Submitted by sponsor)	22

## 1. 요약 (Summary)

시험물질 갈매보리수나무 잎 열수 추출물에 대한 미생물 복귀돌연변이 유발여부를 평가하기 위하여 *Salmonella typhimurium*의 histidine 요구성 균주인 TA98, TA100, TA1535 및 TA1537의 4개의 균주와 *Escherichia coli*의 tryptophan 요구성 균주인 WP2uvrA를 이용하여 시험을 실시하였다. 시험은 대사활성계 미적용 (S9-) 및 적용(S9+)에서 pre-incubation법으로 실시하였다.

용량설정시험을 50, 100, 500, 1000 및 5000 µg/plate로 실시한 결과, 대사활성계 미적용 (S9-) 및 적용(S9+)에서 모든 시험물질 처리군에서 생육저해는 확인되지 않았다.

대사활성계 미적용에서 TA98, TA100 시험균주는 5000 µg/plate 용량에서 복귀돌연변이 콜로니수가 증가 양상을 나타내었다.

대사활성계 적용 유무에 관계없이 모든 시험물질 처리군에서 plate 위에 시험물질의 침전은 확인되지 않았다.

이상의 결과를 토대로 본시험은 아래의 용량에서 실시하였다.

대사활성계 미적용(S9-) 및 적용(S9+) :

313, 625, 1250, 2500, 5000 µg/plate (TA100, TA1535, TA98, TA1537, WP2uvrA)

본시험의 결과, 대사활성계 미적용(S9-) 및 적용(S9+)에서 모든 시험물질 처리군에서 생육저해는 확인되지 않았다.

대사활성계 미적용에서 TA98, TA100 시험균주는 시험물질 처리용량에 따라 복귀돌연변이 콜로니수가 음성대조군과 비교하였을 때 증가 양상을 나타내었다.

대사활성계 적용 유무에 관계없이 모든 시험물질 처리군에서 plate 위에 시험물질의 침전은 확인되지 않았다.

본시험의 음성(용매)대조값 및 양성 대조값은 historical background data의 적정 범위 내였다. 또한 양성 대조 물질에서 유발된 복귀변이 콜로니 측정은 대사활성계 미적용(S9-)및 적용(S9+)의 모든 시험균주에 대하여 음성(용매)대조 값이 현격히 증가하는 양성 결과를 보였다.

용량설정시험과 본시험에서 TA98, TA100 시험균주에서 시험물질 처리군에서 복귀돌연변이 콜로니수가 재현성있는 증가가 관찰되었다.

이상의 결과로부터 시험물질 갈매보리수나무 잎 열수 추출물은 본 시험조건에서 변이원성을 보여주는 (양성) 것으로 판단하였다.

## 2. 서론 (Introduction)

본 시험은 의뢰된 시험물질 갈매보리수나무 잎 열수 추출물에 대하여 미생물 복귀돌연변이시험을 실시함으로써 본 시험물질에 돌연변이 유발성 물질의 존재 유무를 검증하기 위하여 실시하였다.

본 시험에 사용한 균주는 유전독성시험의 미생물 복귀돌연변이시험에 널리 사용되고 있으며, 비교적 기초자료가 축적되어 있어 결과에 대한 분석이 용이하여 선택하였다.

이 시험은 식품의약품안전처 고시 제2014-136호(2014-07-30), 의약품등의 독성시험기준, [별표 4] 유전독성시험(박테리아를 이용한 복귀돌연변이 시험)에 준하여 시험을 진행하였다.

### 2.1 시험일정

시험개시일	: 2014-08-28
실험개시일	: 2014-09-18
용량설정시험일	: 2014-09-19
본시험일	: 2014-10-07
실험종료일	: 2014-10-10
최종보고서(초안) 제출일	: 2014-10-30
시험종료일	: 2014-11-07

3. 재료 및 방법

3.1 시험물질

물질명	: 갈매보리수나무 잎 열수 추출물
KTR 코드	: TS-00087
공급원	: (재)천연자원연구원
제조일	: 2014-03-15
입수일	: 2014-08-07
입수량	: 650,780 g (gross)
CAS No.	: 없음
Lot No.	: 없음
시험기간 중 보관조건	: 상온[(15 ~ 25) °C]
유효기간	: 2015-03-15
외관 및 색상	: 진한 갈색 분말
순도	: 99.9 %
수용해도	: 용해
잔여시험물질처리	: 반환

3.2 대조물질

3.2.1 음성대조물질

3.2.1.1 명칭 및 제조원 등

명 칭(약 칭)	제 조 원	Lot No.	보 관 조 건
멸균증류수	대한약품공업(주)	W2N6K21	상온 [(15 ~ 25) °C]

3.2.1.2 음성대조물질 선정이유

용매 검토 결과, 시험물질은 50 mg/mL로 멸균증류수에 용해되었다. 또, 시험물질을 멸균증류수와 혼합했을 때에 발열, 발포, 변색이 없었다. 이러한 결과로부터, 본 시험물질의 용매(음성대조물질)에는 멸균증류수를 선택하였다.

3.2.2 양성대조물질

3.2.2.1 명칭 및 제조원 등

명 칭(약 칭)	Lot No.	순도 (%)	사용기한 *	제조원	보관 조건
2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide (AF-2)	STQ3987	99.7	2018-11-12	Wako Pure Chemical Industries, Ltd.	실온
Sodium azide (NaN <sub>3</sub> )	BCBJ4642V	100.3	2018-06-30	Sigma-Aldrich Co.	실온
2-aminoanthracene (2-AA)	STBB1901V	97.5	2018-11-12		
9-Aminoacridine (9-AA)	09820CEV	99.4	2018-11-12		

\* : Certification of analysis에 지정되어 있지 않을 경우 입수일로부터 5년

3.2.2.2 양성대조물질 선정이유

세균을 이용한 복귀돌연변이시험에 넓게 사용되고 있으며, 적용 가이드라인에서 추천되어있다.

3.3 시험균주

3.3.1 시험균주

시 험 균 주	입 수 원(입 수 일)
<i>Salmonella typhimurium</i> TA100, TA1535 TA98, TA1537	Molecular Toxicology, Inc. (2013-09-11)
<i>Escherichia coli</i> WP2uvrA	

3.3.2 시험균주의 선택이유

세균을 이용한 복귀돌연변이시험에 넓게 사용되고 있으며, 적용 가이드라인에서 추천되고 있다.

3.3.3 시험균주의 보관

3.3.3.1 조성

Nutrient broth 배지 중에서 37 °C, 8시간 전배양을 실시한 균 현탁액 0.8 mL에 0.07 mL의 비율로 Dimethylsulfoxide (DMSO, Waco pure chemical industries Ltd.)를 혼합했다.

3.3.3.2 보관방법

분주동결(분주량: 0.5 mL)

3.3.3.3 보관조건

-80 °C 이하(허용범위: -60 °C 이하)

3.3.3.4 보존일 및 사용기한

시 험 균 주	보 존 일	사 용 기 한
TA100, TA1535, TA98 TA1537, WP2uvrA	2013-12-20(용량설정시험) 2014-09-17(본시험)	2014-12-19(용량설정시험) 2015-09-16(본시험)

3.3.4 시험균주의 유전적특성

3.3.4.1 유전적특성

시험균주	아미노산 요구성 <sup>(1)</sup>	자외선감수성 <sup>(2)</sup>	막변이 <sup>(3)</sup>	약제내성 <sup>(4)</sup>
TA98	<i>his-</i> (frame-shift형)	$\Delta$ <i>uvrB</i>	<i>rfa</i>	+ (pKM101)
TA1537	<i>his-</i> (frame-shift형)	$\Delta$ <i>uvrB</i>	<i>rfa</i>	-
TA100	<i>his-</i> (염기치환형)	$\Delta$ <i>uvrB</i>	<i>rfa</i>	+ (pKM101)
TA1535	<i>his-</i> (염기치환형)	$\Delta$ <i>uvrB</i>	<i>rfa</i>	-
WP2uvrA	<i>trp-</i> (염기치환형)	$\Delta$ <i>uvrA</i>	Wild type	-

(1) *his-*는 히스티딘요구성, *trp-*는 트립토판요구성을 나타낸다.

(2)  $\Delta$  *uvrA* 및  $\Delta$  *uvrB*는 DNA수복유전자가 결여되어 자외선 감수성을 보여준다.

(3) *rfa*는 세포벽의 lipopolysaccharide가 결실되어 crystal violet 감수성을 보여준다.

(4) +(pKM101)은 약제내성인자를 보유하여 Ampicillin 내성을 나타낸다.

3.3.4.2 유전적성질 확인

시험 균주의 유전적 특성을 2013-12-21 및 2014-09-17에 확인했다. 시험에는 삼기(3.3.4.1항)의 특성을 유지하고 있는 균주를 이용하였다.

3.3.5 균 현탁액

3.3.5.1 배양

배양온도: 37 °C

배양시간: 10 시간

배양방법: 왕복 진탕(진탕 회수 : 120 회/분)

배양용기: 삼각플라스크(용량 : 50 mL)

배 양 액: Nutrient broth (15 mL)

균주 및 접종량: 보존 균주를 해동하여 0.03 mL 접종

3.3.5.2 균 현탁액의 균 농도

전배양하여 이용한 균액을 일부분 취해, 단계희석법으로 생균수를 측정하여 그 결과를 기록하였다. 각 세균 현탁액의 생균수는 아래에 나타내었다.

시험균주		열기치환형			frame-shift형	
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
생균수 (×10 <sup>9</sup> CFU/mL)	용량설정시험	1.2	1.4	3.4	1.2	1.2
	본시험	1.2	2.8	4.1	1.3	1.3

3.4 배지

3.4.1 Nutrient broth 조제

정제수 100 mL에 대하여 Oxoid Nutrient Broth No. 2 (Oxoid Ltd., Lot No.: 1347750)를 2.5 g의 비율로 더해 용해하였다. 이것을 121 °C에서 15 분간 autoclave멸균하고 냉장 보관하였다.

3.4.2 Top agar 조제

3.4.2.1 연한천 조제

정제수 100 mL에 대하여 Bacto-agar (Becton Dickinson and Company, Lot No.:2346914) 0.6 g 및 NaCl (Sigma-Aldrich Co., Lot No.: SZBC1650V) 0.5 g의 비율로 합하고, 이것을 121 °C에서 15 분간 autoclave멸균하고 약 (45 ± 5) °C에 보관하였다.

3.4.2.2 Top agar조제

연한천에 아래의 수용액을 각각 사용 직전에 10 %로 첨가하였다. Top agar는 사용 시 조제하여 약 (45 ± 5) °C에 보존하였다.

살모넬라균: 0.5 mmol/L D-Biotin-L-Histidine 혼합 수용액<sup>†</sup>

대장균: 0.5 mmol/L L-Tryptophan수용액

<sup>†</sup> : D-Biotin (Sigma-Aldrich Co., Lot No. SLBF8048V)  
 L-Histidine (Sigma-Aldrich Co., Lot No. SLBF8256V)  
 L-Tryptophan (Sigma-Aldrich Co., Lot No. SLBG1056V)

3.4.2.3 Minimal glucose agar plate

시험시설에서 2014-08-04, 2014-08-19에 조제하였다.

명 칭	제 조 원	등 급
Vogel-Bonner Medium (X10) <sup>†</sup>	-	-
Glucose	Sigma-Aldrich Co.	≥99.5 % (GC)
Agar	Sigma-Aldrich Co.	cell culture tested

Composition: Vogel-Bonner Medium (X10) 10 %, 20 % Glucose solution 10 %, Agar 1.875 %

<sup>†</sup> : MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O (Sigma-Aldrich Co., Lot No. SLBG4889)  
 Citric Acid · H<sub>2</sub>O (Sigma-Aldrich Co., Lot No. SLBC9864V)  
 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich Co., Lot No. BCBJ8937V)  
 NaNH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 4H<sub>2</sub>O (Sigma-Aldrich Co., Lot No. SLBF6499)

3.5 S9 mix

3.5.1 S9

3.5.1.1 명칭 및 제조원 등

명칭 : S9 Rat liver  
 제조원 : Molecular Toxicology, Inc. (USA)  
 제조일 : 2014-08-30  
 입수일 : 2014-09-16  
 Lot No. : 3324  
 단백질량 : 34.3 mg/mL  
 보관방법 : -80 ℃ 이하 (하용범위: -60 ℃ 이하)  
 사용기한 : 2016-08-30 (제조일로부터 24개월)

3.5.1.2 제조방법

수컷 SD rat에 Aroclor1254를 500 mg/kg의 용량으로 단회 복강내 투여하여 효소를 유도한 후 5 일째에 간으로부터 조제되었다.

3.5.1.3 S9 조제

동결건조 된 S9 1 vial에 멸균정제수 2.1 mL을 첨가하여 현탁하였다.

3.5.2 Cofactor mix

3.5.2.1 명칭 및 제조원 등

명 칭	제 조 원	Lot No.	보 관 조 건
Cofactor-I	ORIENTAL YEAST Co., Ltd. (Japan)	999401	냉장 [(2 ~ 8) ℃]

3.5.2.2 조제

Cofactor-I에 멸균정제수 9 mL를 넣어 용해한 후, membrane filter (pore size: 0.45 μm) 로 여과한 것을 Cofactor mix로 하였다. Cofactor mix는 사용 시 조제하였다.

### 3.5.3 S9 mix의 조제 및 조성

Cofactor mix 9 mL 당 S9 1 mL의 비율로 추가하여 S9 mix로 한다. S9 mix는 사용 시 조제하고 사용할 때까지 얼음에 꽂아 보존하였다.

S9 mix 1 mL의 조성은 아래와 같다.

S9	0.1 mL
MgCl <sub>2</sub>	8 μmol
KCl	33 μmol
Glucose-6-phosphate	5 μmol
NADPH*	4 μmol
NADH**	4 μmol
Sodium phosphate buffer (pH 7.4)	100 μmol

\* : Nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate, reduced form

\*\* : Nicotinamide-adenine dinucleotide, reduced form

## 3.6 시험물질용액 및 양성대조물질용액 조제

### 3.6.1 시험물질용액 조제

(1) 용량설정시험의 경우, 일정양의 시험물질을 칭량하고 적당량의 용매를 넣어 진탕교반에 의해 용해시켜, 50 mg/mL 용액으로 조제하였다. 조제 후 용액은 제균을 위하여 필터(pore size 0.45 μm)를 실시하였다. 이 용액의 일부를 용매로 단계 희석하여 0.5, 1.0, 5.0 및 10 mg/mL 농도의 시험물질 용액을 조제하였다.

(2) 본시험의 경우, 일정양의 시험물질을 칭량하고 적당량의 용매를 넣어 진탕교반에 의해 용해시켜, 50 mg/mL 용액으로 조제하였다. 조제 후 용액은 제균을 위하여 필터(pore size 0.45 μm)를 실시하였다. 이 용액의 일부를 용매로 단계 희석하여 3.13, 6.25, 12.5 및 25 mg/mL 농도의 시험물질 용액을 조제하였다.

(3) 시험물질용액은 사용 시 조제하였고, 조제 후 사용할 때까지 실온, 황색등 밑에서 보관하였다.

(4) 시험물질의 칭량, 용액의 희석, 분주 및 시험물질 처리를 포함한 모든 조작은 실온, 황색등 밑에서 실시하였다.

### 3.6.2 시험물질의 분석

시험의뢰자와 협의하여 시험물질 및 시험물질 조제물의 농도, 안정성 및 균질성에 대한 분석은 별도로 시행하지 않았다.

### 3.6.3 양성대조물질용액

#### 3.6.3.1 양성대조물질용액 조제

양성대조물질용액은 아래에 따라 조제한 보존액을 사용 시 용해하여 시험에 사용하였다.

(1) NaN<sub>3</sub>는 멸균정제수(자체제조)에 AF-2, 9-AA 및 2-AA는 DMSO (Wako pure chemical industries, Ltd.)에 용해하였다.

(2) 이것을 같은 용매로 희석해 일정 농도의 양성대조물질용액으로 하였다.

#### 3.6.3.2 보존방법

동결분주(분주량: 1.0 mL)

3.6.3.3 보존조건

-80 ℃ 이하(허용범위: -60 ℃ 이하)

3.6.3.4 조제농도 및 사용기한

명칭 및 농도(μg/mL)	조제일	사용기한
AF-2 0.1, 1	2014-07-11 (용량설정시험)	2015-07-10 (용량설정시험)
NaN <sub>3</sub> 5		
9-AA 400	2014-09-19 (본시험)	2015-09-18 (본시험)
2-AA 5, 10, 20, 100		

3.6.3.5 양성대조값의 확인

동결보존 한 양성대조물질용액에 대하여 pre-incubation method로 시험을 실시하여, 양성 대조 값이 적정 범위 내인 것을 확인하였다.

3.7 시험물질용량 및 양성대조물질용량

3.7.1 시험물질용량

3.7.1.1 용량설정시험

가이드라인에 따라 5000 μg/plate를 최고 용량으로 하여 이하의 용량을 설정하였다.

시 험 군 주	용 량(μg/plate)
	대사활성계 미적용(S9-) 및 적용(S9+)
TA100, TA1535, TA98 TA1537, WP2uvrA	50, 100, 500, 1000, 5000

3.7.1.2 본시험

용량설정시험결과, 대사활성계 미적용 (S9-) 및 적용(S9+)에서 모든 처리용량에서 생육저해가 확인되지 않았다. 시험물질 처리군 중 대사활성계 미적용에서 TA98, TA100 시험군주는 5000 μg/plate에서 복귀 돌연변이 콜로니수는 음성대조군과 비교하였을 때 증가 양상을 나타내었다. 대사활성계의 적용 유무에 관계없이 모든 시험물질 처리군에서 plate 위에 침전은 확인되지 않았다.

이상의 결과를 바탕으로 아래의 용량으로 설정하였다.

시험군주	용량 (μg/plate)
	대사활성계 미적용(S9-) 및 적용(S9+)
TA100, TA1535, TA98, TA1537, WP2uvrA	313, 625, 1250, 2500, 5000

3.7.2 양성대조물질 용량

3.7.2.1 명칭 및 용량

시험균주	명 칭 및 용 량(μg/plate)			
	대사활성계 미적용(S9-)		대사활성계 적용(S9+)	
TA100	AF-2	0.01	2-AA	1
TA1535	NaN <sub>3</sub>	0.5	2-AA	2
TA98	AF-2	0.1	2-AA	0.5
TA1537	9-AA	40	2-AA	2
WP2 <sub>uvrA</sub>	AF-2	0.01	2-AA	10

3.7.2.2 양성대조물질 용량의 선택이유

이러한 용량은 각 시험 균주에 대해서 양성을 나타내는 것으로 알려져 있다.

3.8 복귀돌연변이시험

3.8.1 시험법의 선택

시험은 pre-incubation method를 이용하고, 대사활성계 미적용(S9-) 및 적용(S9+)에서 실시하였다.

3.8.2 Pre-incubation Method

- (1) 각 용량에 대해 별균한 시험관에 시험물질 용액, 음성(용매)대조물질 및 양성대조물질 용액을 0.1 mL첨가하였다.
- (2) 대사활성계 미적용(S9-)의 경우, 0.1 mol/L sodium-phosphate buffer (pH 7.4)을 0.5 mL 넣어 혼합하고, 균 현탁액을 0.1 mL 추가하였다.
- (3) 대사활성계 적용(S9+)의 경우, S9 mix 0.5 mL을 넣어 혼합하고, 균 현탁액을 0.1 mL 추가하였다.
- (4) 이 혼합액을 37 °C에서 20 분간 천천히 진탕(진탕 횟수: 120 회/분)하여 incubation하였다 (pre-incubation).
- (5) Pre-incubation 후, 이 혼합액에 top agar를 2 mL 넣어 minimal glucose agar plate 위에 증충하였다.
- (6) 증충한 top agar가 응고된 후, 37 °C에서 (72 ± 2) 시간 배양하였다.

3.8.3 관찰

침전물: 약 (72 ± 2) 시간 배양 후 육안으로 관찰하였다.  
 균의 생육저해: 약 (72 ± 2) 시간 배양 후 현미경으로 관찰하였다.

3.8.4 콜로니계수

육안으로 계수하였다.

3.8.5 Plate 수

용량설정시험 : 3 plate/용량  
 본 시험 : 3 plate/용량

3.8.6 결과의 집계

음성(용매)대조, 양성대조 및 시험물질의 각 처리에 대해서 계수한 콜로니수의 평균값 및 표준 편차를 산출하였다. 평균값 및 표준 편차는 소수점 이하를 사사오입하여 표시하였다.

### 3.8.7 무균시험

최고용량의 시험물질용액 및 S9 mix에서 각각 1 개의 plate를 사용하여 시험마다 실시하였다.

- (1) 최고용량의 시험물질용액 0.1 mL 및 S9 mix 0.5 mL에 top agar 2 mL를 넣어 혼합하였다.
- (2) 각각 minimal glucose agar plate에 증충하였다.
- (3) 증충한 top agar가 응고한 후, 37 °C에서 (72 ± 2) 시간 배양하고 잡균의 혼입에 대해 육안으로 확인하였다.

### 3.8.8 시험성립조건

아래의 조건을 모두 충족하였다.

- (1) 음성(용매)대조치(평균값) 및 양성대조치(평균값)가 historical background data의 적정 범위에 있음.
- (2) 양성대조치(평균값)가 대응하는 시험 균주의 음성(용매)대조치와 비교해 분명하게 2 배를 넘어 증가하였음.
- (3) 생육저해의 없는 용량이 4 용량 이상 있고, 평가 가능한 용량이 5 용량 이상 있음.
- (4) 본시험의 최고용량은 5000 µg/plate 또는 분명한 생육저해가 인정되는 농도임.
- (5) 무균 시험의 결과, 잡균에 의한 오염이 없음.
- (6) 시험 plate가 오염 혹은 다른 불가항력의 사태에 의해서 계속 불가능이 되어 없어지지 않을 것.

### 3.8.9 시험결과의 판정

대사활성계 적용 여부에 상관없이 최소 1 개 균주에서 평판 당 복귀돌연변이 집락수가 1 개 이상의 농도에서 재현성 있는 증가를 나타낼 때 양성으로 판정하였다. 집락 수의 용량상관성 및 음성대조군에 비해 증가하는 정도 또한 고려하였다. 시험 결과의 평가는 통계학적 검정을 실시하지 않았다.

### 3.8.10 재현성의 확인

시험결과의 재현성은 용량설정시험과 본시험으로 확인하였다.

#### 4. 시험계획서의 변경 및 일탈

기 승인된 시험계획서 상에서 수정 및 이탈 사항은 없었다.

#### 5. 기록 및 자료 보관

시험기간중에 발생한 모든 시험기초자료는 품목허가일로부터 3 년간 보관하며, 최종보고서 발급 후 5 년이 경과된 자료의 경우 표준작업지침서에 따른다.

##### 5.1 보관기록 및 자료의 종류

- (1) 시험계획서에 관한 기록
- (2) 시험물질에 관한 기록 및 자료
- (3) 시험계에 관한 기록 및 자료
- (4) 관찰, 측정 및 검사에 관한 기록
- (5) 시험의뢰자와의 송수신 기록
- (6) 최종보고서에 관한 기록

##### 5.2 보관장소

한국화학융합시험연구원 헬스케어연구소 자료보관실(Ⅰ), (Ⅱ)

## 6. 결과

### 6.1 용량설정시험

용량설정시험 결과를 Table 1 및 Appendix 10에 나타내었다. 대사활성계 미적용(S9-) 및 적용(S9+)의 모든 처리군에서 생육저해는 확인되지 않았다.

대사활성계 미적용에서 TA98, TA100 시험균주 중 5000 µg/plate 용량에서 복귀돌연변이 콜로니수가 증가 양상을 나타내었다. 대사활성계의 적용 유무에 관계없이 모든 시험물질 처리군에서 plate 위에 시험물질의 침전은 확인되지 않았다.

### 6.2 본시험

본시험 결과를 Table 2 및 Appendix 20에 나타내었다. 대사활성계 미적용(S9-) 및 적용(S9+)의 모든 시험물질 처리군에서 생육저해는 확인되지 않았다. 대사활성계 미적용에서 TA98, TA100 시험균주는 시험물질 처리용량에 따라 복귀돌연변이 콜로니수가 음성대조군과 비교하였을 때 증가 양상을 나타내었다. 대사활성계의 적용 유무에 관계없이 모든 시험물질 처리군에서 시험물질의 침전은 확인되지 않았다.

### 6.3 무균시험

용량설정시험, 본시험 모두 최고용량의 시험물질 조제액 및 S9 mix는 세균과 곰팡이의 오염이 관찰되지 않았다.

## 7. 고찰 및 결론

용량설정시험 및 본시험을 최고용량 5000  $\mu\text{g}/\text{plate}$ 로 실시한 결과, S9 mix 미적용의 시험균주 TA98, TA100에 대하여 시험물질 처리군에서 복귀돌연변이 콜로니수는 음성(용매)대조군에 비해 증가하는 것이 나타났다. 용량설정시험과 본시험으로 재현성이 확인되었다.

본 시험의 음성(용매)대조값 및 양성 대조값은 historical background data 범위 내에 있었다(Annex 1). 또한 양성대조물질에서 유발된 복귀돌연변이 콜로니수는 대사활성계 미적용(S9-) 및 적용(S9+)의 모든 시험 균주에 대해서 현격히 증가되는 양성 결과를 보였다.

그리고 시험에서 생육저해가 확인되지 않는 용량이 4 용량 이상이 있고, 평가 가능한 용량이 5 용량 이상 얻을 수 있었다. 따라서 시험은 적절히 실시되었다고 할 수 있다.

이상의 결과로부터 시험물질 갈매보리수나무 잎 열수 추출물은 본 시험 조건에서 복귀돌연변이를 유발하는 것(양성)으로 판단된다.

## 8. 참고문헌 (References)

식품의약품안전처 고시 제2014-67 호 (2014-02-12), 비임상시험관리기준

식품의약품안전처 고시 제2014-136 호 (2014-07-30), 의약품등의 독성시험기준, 별표 4, 유전독성시험 (박테리아를 이용한 복귀돌연변이시험)

Maron, D.M. and Ames, B.N (1983) Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. Mutation Res. 113, 173-215

OECD Guidelines for the testing of chemicals, Section 4, TG. No. 471 'Bacterial Reverse Mutation Test' (1997-07-21)

OECD Principles of Good Laboratory Practice, ENV/MC/CHEM (98)17 (as revised in 1997)

9. Tables

Table 1 . Result of concentration range-finding test (Group summary)

Tester strain	Chemical treated	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Colonies/plate (Mean $\pm$ S.D.) [Factor] <sup>al</sup>	
			Without S9 mix	With S9 mix
TA98	Test solution	0	32 $\pm$ 4	35 $\pm$ 5
		50	27 $\pm$ 1 [ 0.9 ]	49 $\pm$ 2 [ 1.4 ]
		100	24 $\pm$ 0 [ 0.8 ]	41 $\pm$ 4 [ 1.2 ]
		500	33 $\pm$ 4 [ 1.0 ]	35 $\pm$ 5 [ 1.0 ]
		1000	4) $\pm$ 4 [ 1.3 ]	29 $\pm$ 1 [ 0.8 ]
		5000	8) $\pm$ 11 [ 2.5 ]	30 $\pm$ 2 [ 0.8 ]
TA100	Test solution	0	121 $\pm$ 3	127 $\pm$ 7
		50	121 $\pm$ 8 [ 1.0 ]	117 $\pm$ 7 [ 0.9 ]
		100	115 $\pm$ 6 [ 1.0 ]	117 $\pm$ 6 [ 0.9 ]
		500	123 $\pm$ 5 [ 1.0 ]	126 $\pm$ 5 [ 1.0 ]
		1000	127 $\pm$ 12 [ 1.0 ]	133 $\pm$ 10 [ 1.0 ]
		5000	331 $\pm$ 17 [ 2.7 ]	127 $\pm$ 9 [ 1.0 ]
TA1535	Test solution	0	11 $\pm$ 2	15 $\pm$ 1
		50	17 $\pm$ 3 [ 1.2 ]	15 $\pm$ 2 [ 1.0 ]
		100	15 $\pm$ 1 [ 1.1 ]	15 $\pm$ 1 [ 1.0 ]
		500	15 $\pm$ 3 [ 1.0 ]	14 $\pm$ 1 [ 0.9 ]
		1000	15 $\pm$ 2 [ 1.1 ]	13 $\pm$ 1 [ 0.9 ]
		5000	15 $\pm$ 2 [ 1.1 ]	14 $\pm$ 1 [ 0.9 ]
TA1537	Test solution	0	9 $\pm$ 1	13 $\pm$ 1
		50	3 $\pm$ 1 [ 1.0 ]	15 $\pm$ 1 [ 1.1 ]
		100	3 $\pm$ 2 [ 1.0 ]	15 $\pm$ 1 [ 1.1 ]
		500	11 $\pm$ 2 [ 1.3 ]	13 $\pm$ 1 [ 1.0 ]
		1000	10 $\pm$ 2 [ 1.2 ]	13 $\pm$ 1 [ 1.0 ]
		5000	15 $\pm$ 1 [ 1.8 ]	14 $\pm$ 1 [ 1.1 ]
WP2uvrA	Test solution	0	41 $\pm$ 3	47 $\pm$ 3
		50	43 $\pm$ 3 [ 1.0 ]	43 $\pm$ 2 [ 0.9 ]
		100	45 $\pm$ 3 [ 1.0 ]	42 $\pm$ 2 [ 0.9 ]
		500	43 $\pm$ 2 [ 1.0 ]	41 $\pm$ 1 [ 0.9 ]
		1000	35 $\pm$ 4 [ 0.8 ]	39 $\pm$ 5 [ 0.8 ]
		5000	27 $\pm$ 5 [ 0.6 ]	30 $\pm$ 2 [ 0.6 ]
Positive controls				
TA98	AF-2	0.1	495 $\pm$ 53 [ 15.7 ]	
TA100	AF-2	0.01	430 $\pm$ 21 [ 3.6 ]	
TA1535	NaN <sub>3</sub>	0.5	354 $\pm$ 35 [ 24.7 ]	
TA1537	9-AA	40.0	169 $\pm$ 13 [ 19.5 ]	
WP2uvrA	AF-2	0.01	485 $\pm$ 13 [ 11.1 ]	
TA98	2-AA	0.5		247 $\pm$ 18 [ 7.0 ]
TA100	2-AA	1.0		459 $\pm$ 30 [ 3.6 ]
TA1535	2-AA	2.0		163 $\pm$ 11 [ 10.9 ]
TA1537	2-AA	2.0		168 $\pm$ 13 [ 12.6 ]
WP2uvrA	2-AA	10.0		374 $\pm$ 7 [ 8.0 ]

<sup>al</sup> No. of colonies of treated plate/No. of colonies of negative control plate  
 NaN<sub>3</sub> : Sodium azide, AF-2 : 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide  
 9-AA : 9-Aminoacridine, 2-AA : 2-Aminoanthracene

Table 2 . Result of main test (Group summary)

Tester strain	Chemical treated	Dose ( $\mu$ g/plate)	Colonies/plate (Mean $\pm$ S.D.) [Factor] <sup>a)</sup>	
			Without S9 mix	With S9 mix
TA98	Test solution	0	39 $\pm$ 4	41 $\pm$ 2
		313	42 $\pm$ 1 [ 1.1 ]	44 $\pm$ 5 [ 1.1 ]
		625	47 $\pm$ 2 [ 1.2 ]	42 $\pm$ 2 [ 1.0 ]
		1250	52 $\pm$ 3 [ 1.3 ]	44 $\pm$ 2 [ 1.1 ]
		2500	57 $\pm$ 4 [ 1.5 ]	41 $\pm$ 3 [ 1.0 ]
		5000	85 $\pm$ 4 [ 2.2 ]	43 $\pm$ 2 [ 1.0 ]
TA100	Test solution	0	135 $\pm$ 9	118 $\pm$ 7
		313	164 $\pm$ 6 [ 1.2 ]	111 $\pm$ 4 [ 0.9 ]
		625	181 $\pm$ 12 [ 1.3 ]	122 $\pm$ 1 [ 1.0 ]
		1250	199 $\pm$ 58 [ 1.5 ]	126 $\pm$ 8 [ 1.1 ]
		2500	269 $\pm$ 14 [ 2.0 ]	123 $\pm$ 11 [ 1.0 ]
		5000	321 $\pm$ 12 [ 2.4 ]	124 $\pm$ 4 [ 1.1 ]
TA1535	Test solution	0	14 $\pm$ 2	16 $\pm$ 1
		313	12 $\pm$ 2 [ 0.8 ]	14 $\pm$ 2 [ 0.9 ]
		625	14 $\pm$ 2 [ 1.0 ]	14 $\pm$ 1 [ 0.9 ]
		1250	13 $\pm$ 4 [ 0.9 ]	15 $\pm$ 3 [ 0.9 ]
		2500	13 $\pm$ 1 [ 0.9 ]	14 $\pm$ 1 [ 0.9 ]
		5000	13 $\pm$ 1 [ 0.9 ]	13 $\pm$ 2 [ 0.8 ]
TA1537	Test solution	0	7 $\pm$ 1	12 $\pm$ 2
		313	7 $\pm$ 2 [ 0.9 ]	13 $\pm$ 1 [ 1.1 ]
		625	8 $\pm$ 2 [ 1.1 ]	12 $\pm$ 2 [ 0.9 ]
		1250	6 $\pm$ 1 [ 0.9 ]	11 $\pm$ 1 [ 0.9 ]
		2500	7 $\pm$ 1 [ 1.0 ]	12 $\pm$ 2 [ 0.9 ]
		5000	8 $\pm$ 1 [ 1.0 ]	10 $\pm$ 1 [ 0.8 ]
WP2uvrA	Test solution	0	44 $\pm$ 4	48 $\pm$ 3
		313	42 $\pm$ 3 [ 1.0 ]	50 $\pm$ 3 [ 1.0 ]
		625	44 $\pm$ 4 [ 1.0 ]	40 $\pm$ 2 [ 0.8 ]
		1250	41 $\pm$ 2 [ 0.9 ]	39 $\pm$ 2 [ 0.8 ]
		2500	36 $\pm$ 3 [ 0.8 ]	38 $\pm$ 6 [ 0.8 ]
		5000	30 $\pm$ 2 [ 0.7 ]	30 $\pm$ 1 [ 0.6 ]
Positive controls				
TA98	AF-2	0.1	418 $\pm$ 40 [ 10.7 ]	
TA100	AF-2	0.01	396 $\pm$ 15 [ 2.9 ]	
TA1535	NaN <sub>3</sub>	0.5	314 $\pm$ 16 [ 21.9 ]	
TA1537	9-AA	40.0	163 $\pm$ 19 [ 22.2 ]	
WP2uvrA	AF-2	0.01	466 $\pm$ 14 [ 10.7 ]	
TA98	2-AA	0.5		240 $\pm$ 21 [ 5.8 ]
TA100	2-AA	1.0		389 $\pm$ 25 [ 3.3 ]
TA1535	2-AA	2.0		163 $\pm$ 9 [ 10.2 ]
TA1537	2-AA	2.0		172 $\pm$ 7 [ 14.0 ]
WP2uvrA	2-AA	10.0		368 $\pm$ 13.9 [ 7.6 ]

<sup>a)</sup> No. of colonies of treated plate/No. of colonies of negative control plate  
 NaN<sub>3</sub> : Sodium azide, AF-2 : 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide  
 9-AA : 9-Aminoacridine, 2-AA : 2-Aminoanthracene

### 10. Appendices

Appendix 1 . Result of concentration range-finding test (Individual summary)

Tester strain	Chemical treated	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Colonies/plate (Plate A, B and C)					
			Without S9 mix			With S9 mix		
TA98	Test solution	0	26	29	34	39	30	37
		50	32	26	28	50	50	47
		100	26	24	24	37	42	45
		500	31	30	36	30	40	35
		1000	35	43	37	29	28	30
		5000	76	87	72	32	29	28
TA100	Test solution	0	119	124	120	124	135	123
		50	123	113	128	125	115	111
		100	122	113	110	124	112	115
		500	123	127	118	129	120	129
		1000	116	126	139	139	122	138
		5000	312	335	345	123	120	137
TA1535	Test solution	0	15	16	12	15	14	16
		50	18	19	14	14	18	14
		100	15	17	15	15	14	15
		500	15	12	18	14	13	15
		1000	14	16	17	14	13	13
		5000	14	18	15	14	14	13
TA1537	Test solution	0	9	9	8	14	12	14
		50	8	8	9	15	14	15
		100	8	10	7	15	15	14
		500	12	9	12	14	12	14
		1000	12	10	8	12	14	14
		5000	16	16	14	14	14	15
WP2uvrA	Test solution	0	47	44	41	45	45	51
		50	40	43	46	46	42	42
		100	41	47	47	42	41	44
		500	45	41	43	42	42	40
		1000	32	40	35	35	38	45
		5000	22	31	27	31	31	28
Positive controls								
TA98	AF-2	0.1	436	512	537			
TA100	AF-2	0.01	420	417	454			
TA1535	NaN <sub>3</sub>	0.5	336	332	394			
TA1537	9-AA	40.0	155	171	180			
WP2uvrA	AF-2	0.01	472	490	497			
TA98	2-AA	0.5				226	259	255
TA100	2-AA	1.0				432	454	492
TA1535	2-AA	2.0				152	173	165
TA1537	2-AA	2.0				162	159	182
WP2uvrA	2-AA	10.0				368	382	371

NaN<sub>3</sub> : Sodium azide, AF-2 : 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide  
 9-AA : 9-Aminoacridine, 2-AA : 2-Aminoanthracene

Appendix 2 . Result of main test (Individual summary)

Tester strain	Chemical treated	Dose (ug/plate)	Colonies/plate (Plate A, B and C)					
			Without S9 mix			With S9 mix		
TA98	Test solution	0	36	44	37	43	41	40
		313	41	43	42	41	42	50
		625	45	48	49	40	41	44
		1250	50	55	52	46	42	43
		2500	53	58	61	39	41	44
		5000	89	85	81	44	43	41
TA100	Test solution	0	124	139	141	123	121	110
		313	158	169	166	109	108	115
		625	169	193	182	123	121	122
		1250	223	133	241	136	121	122
		2500	256	267	284	125	133	111
		5000	307	324	331	128	120	124
TA1535	Test solution	0	13	16	14	15	16	17
		313	12	10	13	12	16	14
		625	13	16	12	13	15	14
		1250	10	12	17	17	12	15
		2500	13	14	12	15	14	14
		5000	12	12	14	13	15	11
TA1537	Test solution	0	8	8	6	11	12	14
		313	5	7	8	14	13	12
		625	6	8	10	14	11	10
		1250	7	6	6	10	10	12
		2500	8	6	7	11	14	10
		5000	7	8	8	10	9	10
WP2uvrA	Test solution	0	42	41	48	45	49	51
		313	41	46	40	49	53	48
		625	42	48	41	42	40	39
		1250	40	43	39	38	38	41
		2500	38	37	32	44	38	32
		5000	31	28	32	30	29	31
Positive controls								
TA98	AF-2	0.1	389	463	402			
TA100	AF-2	0.01	411	394	382			
TA1535	NaN <sub>3</sub>	0.5	330	312	299			
TA1537	9-AA	40.0	159	184	146			
WP2uvrA	AF-2	0.01	481	454	464			
TA98	2-AA	0.5				222	263	236
TA100	2-AA	1.0				412	394	362
TA1535	2-AA	2.0				154	163	172
TA1537	2-AA	2.0				168	169	180
WP2uvrA	2-AA	10.0				361	359	384

NaN<sub>3</sub> : Sodium azide, AF-2 : 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide  
 9-AA : 9-Aminoacridine, 2-AA : 2-Aminoanthracene

## 11. Annexes

### Annex 1. Historical background data

	TA98		TA100		TA1535		TA1537		WP2uvrA	
	Negative Control									
S9 Mix	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
Mean Colony	21	29	108	130	16	19	9	14	41	55
SD	5	8	19	21	10	12	3	6	10	22
Minimum	11	17	69	68	6	7	4	5	28	23
Maximum	36	45	151	171	58	72	17	29	73	129
	Positive Control									
	AF-2	2-AA	AF-2	2-AA	NaN3	2-AA	9-AA	2-AA	AF-2	2-AA
S9 Mix	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
Mean Colony	497	243	413	503	339	152	241	183	374	344
SD	106	77	55	106	66	38	121	55	102	112
Minimum	301	78	297	266	208	84	64	96	135	185
Maximum	774	391	564	698	504	287	656	266	646	790

(update August 29, 2014)

Number of experiments : 7, Number of positive controls : 42, Number of negative controls : 42

Negative control (Vehicle : distilled water, DMSO)

NaN3 : Sodium azide (0.5µg/plate)

AF-2 : 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide  
(0.1µg/plate for TA98, 0.01µg/plate for TA100 and E. coli WP2uvrA)

9-AA : 9-Aminoacridine (40µg/plate)

2-AA : 2-Aminoanthracene  
(0.5µg/plate for TA98, 1.0µg/plate for TA100, 2.0µg/plate for TA1535 and TA1537, 10.0µg/plate for E. coli WP2uvrA)

Annex 2. Information of test substance (Submitted by sponsor)

**시험물질 정보기록지**

- \* 정확하고 신뢰성있는 시험의 진행을 위하여 시험물질에 대한 내용을 정확하게 작성하여 주십시오.
- \* 물질이 2종 이상인 경우, 각 물질마다 기록지를 작성하여 주십시오.

Page (1/2)

작성일 :	2014 년 7 월 24 일	작성자 :	김 옥 경 
<b>시 험 물 질 (Test substance)</b>			
시험물질명 (Name of test substance)	갈대보리수나무 잎 열수 추출물		
분류 (Classification)	<input checked="" type="checkbox"/> 건강기능식품 <input type="checkbox"/> 농약 <input type="checkbox"/> 의약품 <input type="checkbox"/> 화학물질 <input type="checkbox"/> 화장품 <input type="checkbox"/> 기타		
공급원 (Supplier)	[재] 천연자원연구원		
제조일 (Manufacturing date)	2014년 3월 15일		
제 공 량 (Delivery amount)	<input type="checkbox"/> 실중량(Net): g <input type="checkbox"/> 용기포함(Gross): g ( ( g ) * ( □ 가 □ 병 ) )		
Cas. No.	<input type="checkbox"/> ( ) <input type="checkbox"/> 추후제공 <input checked="" type="checkbox"/> 무		
로트번호 (LOT No.)	<input type="checkbox"/> ( ) <input type="checkbox"/> 추후제공 <input checked="" type="checkbox"/> 무		
시험기간 중 보관조건 (Storage condition)	<input type="checkbox"/> 실온(1~30°C) <input checked="" type="checkbox"/> 상온(15~25°C) <input type="checkbox"/> 냉장(2~8°C) <input type="checkbox"/> 냉동(-15~-25°C) <input type="checkbox"/> 기타 ( )		
유효기간 (Expiration date)	2015 년 3 월 15 일 (제조 후 1년 )		
외관 및 색상 (Physical description)	진한 갈색 분말		
순도 (Purity)	( 99.9 % ) <input type="checkbox"/> 추후제공 <input type="checkbox"/> 무		
분자식(분자량) (Molecular formula or weight)	( ) <input type="checkbox"/> 추후제공 <input checked="" type="checkbox"/> 무		
비중 (Specific gravity)			
pH			
옥탄올분배계수 (KOW)			
수용해도 (Solubility in water)	water soluble		
잔여시험물질 처리방법 (Treatment after the end of study)	<input checked="" type="checkbox"/> 반환 <input type="checkbox"/> 폐기 (※ 본 시설에서 일부 보관)		
취급 / 폐기시 주의사항 (Caution in handling or disposal)	<input type="checkbox"/> MSDS 참조 <input checked="" type="checkbox"/> 무 <input type="checkbox"/> 기타 ( )		

KG-APM-001-F01 V.01

2014-01-20

(Continued)

Annex. 2 (Continued)

Page (2/2)

임상예정경로 (Route of clinic)	<input type="checkbox"/> 경구 <input type="checkbox"/> 경피 <input type="checkbox"/> 정맥 <input type="checkbox"/> 기타( )	임상예정용량 (Dose conc. of clinic)	<input type="checkbox"/> (mg/kg B.W) <input type="checkbox"/> (mL/kg B.W)
운송방법 (Delivery method)	<input checked="" type="checkbox"/> 우편 <input type="checkbox"/> 직접전달 <input type="checkbox"/> 기타( )		
운송조건 (Delivery condition)	<input type="checkbox"/> 실온(1~30℃) <input checked="" type="checkbox"/> 상온(15~25℃) <input type="checkbox"/> 냉장(2~8℃) <input type="checkbox"/> 냉동(-15~-25℃) <input type="checkbox"/> 기타( )		
발송(여정)일 (Delivery date)	2014 년 7 월 30 일		
시 험 물 질 조 제 (Preparation of the dosing solution)			
부형제 / 용해도 (Vehicle and solubility)	<input type="checkbox"/> 주사용수 <input checked="" type="checkbox"/> 염리시염수 <input type="checkbox"/> DMSO <input type="checkbox"/> DMF <input type="checkbox"/> 비세린 <input type="checkbox"/> 예탄유 <input type="checkbox"/> 아세톤 <input type="checkbox"/> 식물오일 (Corn oil/Olive oil) <input type="checkbox"/> % CMC <input type="checkbox"/> % MC <input type="checkbox"/> 기타( )		
안정성 (Stability)	<input type="checkbox"/> 추후제공 <input type="checkbox"/> 무	균 질 성 (Homogeneity)	<input type="checkbox"/> 추후제공 <input checked="" type="checkbox"/> 무 <input type="checkbox"/> 기타( )
조제물 보관조건 (Storage condition of dosing solution)	<input type="checkbox"/> 실온(1~30℃) <input checked="" type="checkbox"/> 상온(15~25℃) <input type="checkbox"/> 냉장(2~8℃) <input type="checkbox"/> 냉동(-15~-25℃) <input type="checkbox"/> 기타( )		
조제방법 (Preparation method)	<input type="checkbox"/> 경부자료 참고 <input type="checkbox"/> E-mail 등으로 전달 <input type="checkbox"/> 기타( )		
주 의 사 항 (caution)	<input type="checkbox"/> 차광 <input type="checkbox"/> 밀폐 <input checked="" type="checkbox"/> 재용 <input type="checkbox"/> 기타( )		
조제물 분석 (Analysis of the dosing solution)			
조제물 분석 필요 (Analysis of the dosing solution in the study)	<input type="checkbox"/> 필요 <input checked="" type="checkbox"/> 불필요(조제물 분석 성적서 제공, 시험물질 CoA로 대체) <input type="checkbox"/> 기타( )		
분석법 (Analytical method)	<input type="checkbox"/> 재공 (검출한계) <input type="checkbox"/> 분석법 개발 필요		
표준물질 (Standard material)	<input type="checkbox"/> 재공 <input type="checkbox"/> 시험물질로 대체		
분석기기 (Analytical instrument)	<input type="checkbox"/> LC <input type="checkbox"/> GC <input type="checkbox"/> 기타( )		
검출기 (Detector)	<input type="checkbox"/> UVD <input type="checkbox"/> FLD <input type="checkbox"/> PDA <input type="checkbox"/> MSD <input type="checkbox"/> ECD <input type="checkbox"/> NPD		
첨 부 자 료 (Attachment)	<input checked="" type="checkbox"/> 시험물질의 성적서(Certificate of Analysis) <input type="checkbox"/> MSDS <input type="checkbox"/> 시험물질 안정성자료 <input type="checkbox"/> 역효역리자료 <input type="checkbox"/> 독성시험자료 <input type="checkbox"/> 타기관 보고서 <input type="checkbox"/> 시험물질 참고자료 <input type="checkbox"/> 참고문헌 <input type="checkbox"/> 시험물질 조제방법 <input type="checkbox"/> 분석법 <input type="checkbox"/> 표준물질 <input type="checkbox"/> 기타( )		
비 고 (Remark)	(고려사항 혹은 기타정보 등에 대하여 기술하여 주십시오)		

KG-APM-001-F01 V.01

2014-01-20

(End)

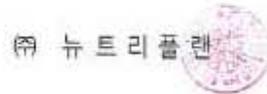
Annex 3. Certificate of analysis (Submitted by sponsor)

갈매보리수나무 잎 열수추출물 성분 검사 결과

○ 일반성분 분석결과

항목	단위	함량
열량	(Kcal/100g)	284.13
탄수화물	(%)	83.00±5.15 (식이섬유55.84%함유)
조단백질	(%)	5.31±0.02
조지방	(%)	4.73±0.04
수분	(%)	3.65±0.05
회분	(%)	3.31±0.19
당류	(mg/100g)	13.88±0.10
포화지방산	(g/100g)	0.3±0.005
콜레스테롤	(mg/100g)	-
불포화지방산	(g/100g)	2.71±0.07
식이섬유	(%)	55.84
나트륨	(mg/100g)	6.21±0.65
트랜스지방산	(g/100g)	0.002

\*한국기능식품연구원 분석결과



㈜뉴트리플랜 경기도 고양시 조리동 농안로266번길 29 [www.nutriplan.co.kr](http://www.nutriplan.co.kr) 070-7569-0071

## 2. 비타민나무(갈매보리수나무) 성분의 안전성 평가(3차년도)

### 가. 실험방법

#### (1) 세포배양 및 세포독성

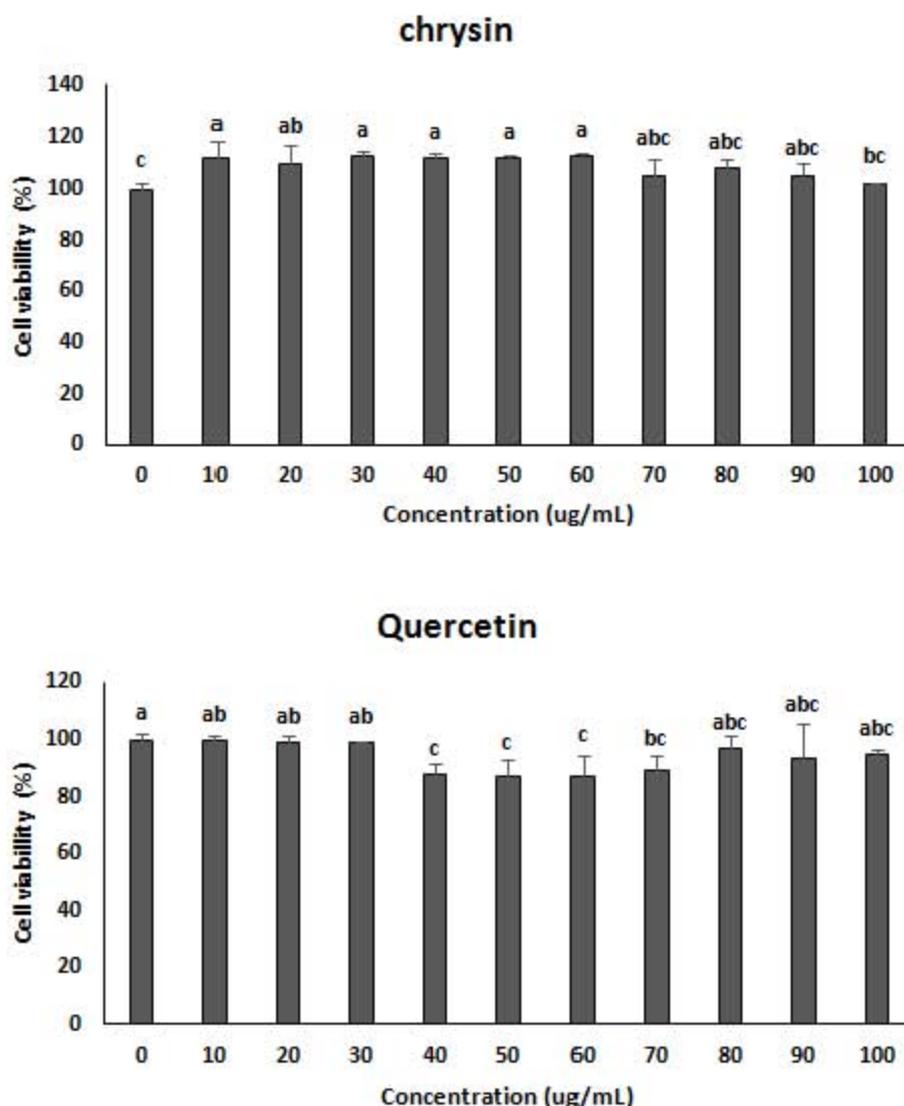
본 실험에 사용된 인간 간암세포주 HepG2는 ATCC(American type culture collection)에서 구입하였으며, 10% FBS와 penicillin(100 units/mL), streptomycin(100 g/mL)이 함유된 DMEM 배지를 사용하여 배양하였고, 37℃, 5% CO<sub>2</sub>, 95% humid air로 조절된 배양기에서 배양하였다. 세포 생존율은 Mosmann 방법을 변형하여 측정하였다. HepG2세포를 1×10<sup>4</sup> cells/well 농도로 96-well plate에 분주하여 24시간 동안 배양한 후, 각 well에 비타민나무 추출물을 농도별로 분주하여 24시간 배양시켜 각 성분들의 독성을 살펴보았다. 24시간 후, MTT 용액 500 µg/mL을 첨가하고 4시간 동안 배양한 후, 배지를 제거하고 DMSO 200 µL를 첨가하여 560 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 나. 결과

#### (1) 비타민나무 성분의 세포 독성

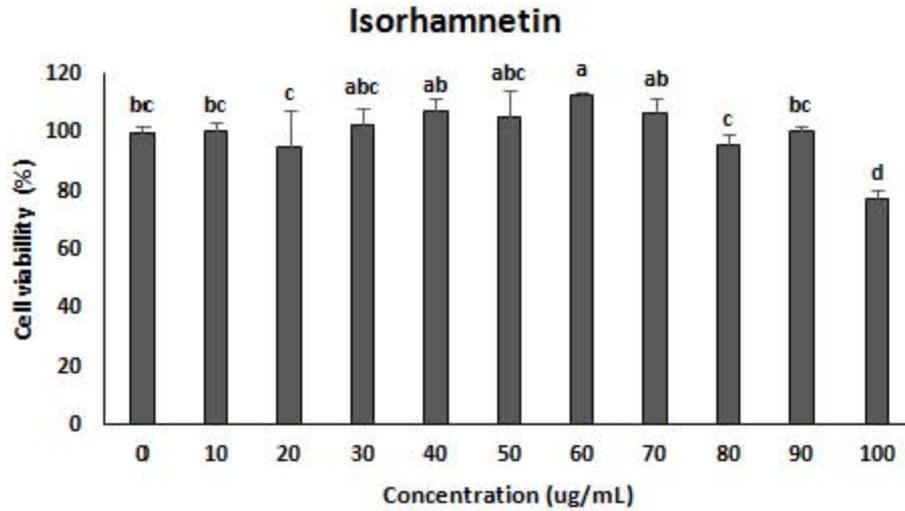
기능성 식품으로서 개발하기 위하여 안전성이 타당한 농도에서 효능이 입증되어야 한다. 따라서 본 실험에서는 각 성분들의 안전한 농도 범위를 살펴보고자 각 성분들을 0-100 µg/mL의 농도로 세포에 처리하여 세포 독성 시험을 진행하였다.

Chrysin과 Quercetin은 0-100 µg/mL의 농도에서 세포독성이 나타나지 않았다. Quercetin의 경우, 40, 50, 60 µg/mL 농도에서 통계적으로 유의적인 차이를 보이는데 이는 실험적인 오류로 판정된다(Fig. 5-12). Isorhamnetin은 90, 100 µg/mL에서 유의적으로 생존율이 감소되었다. 따라서 isorhamnetin은 0-80 µg/mL의 농도에서 안전한 농도로 관찰되었다(Fig. 5-13).



**Fig. 5-12. Viability of HepG2 cell following 24 h of treatment with different concentrations of Chrysin and Quercetin.**

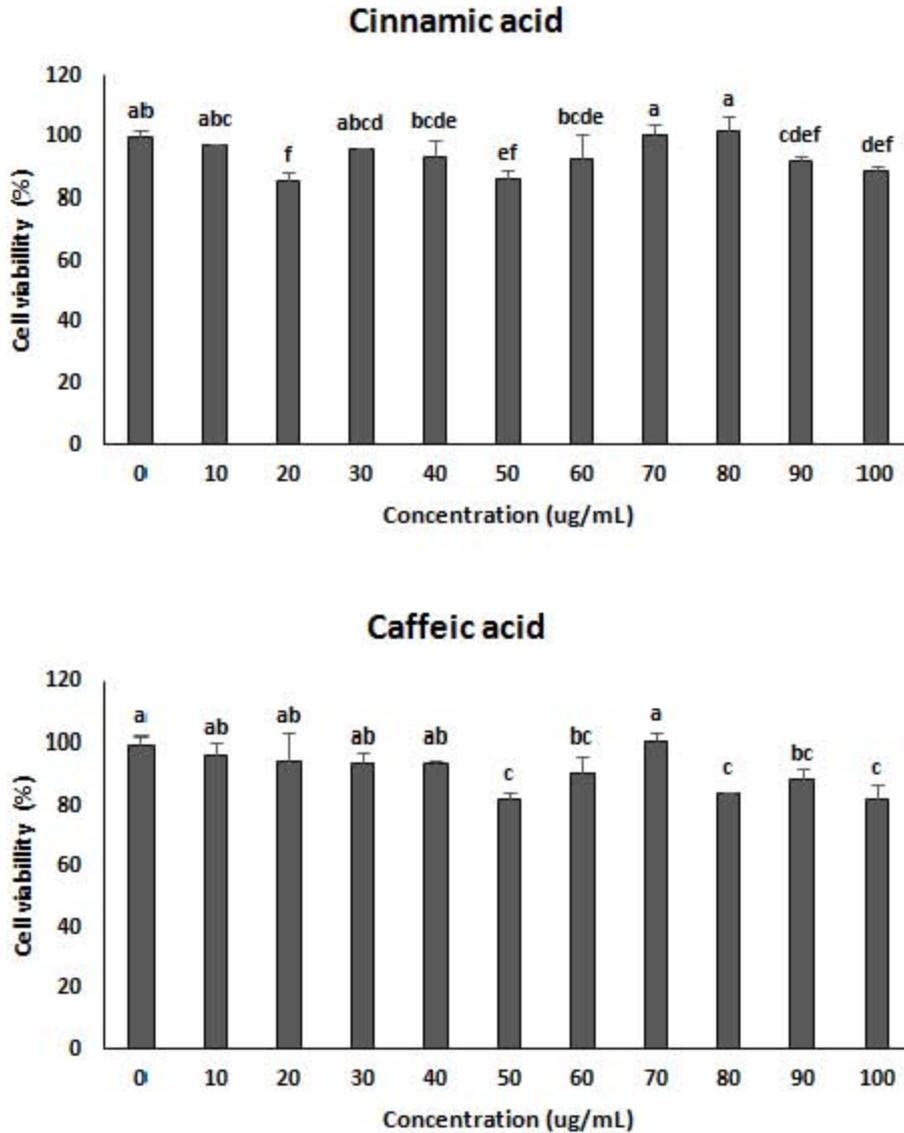
The results were presented mean  $\pm$  SD at least three independent experiments, each performed in triplicate (n=3). Differences were considered statistically significant at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test.



**Fig. 5-13. Viability of HepG2 cell following 24 h of treatment with different concentrations of Isorhamnetin.**

The results were presented mean  $\pm$  SD at least three independent experiments, each performed in triplicate (n=3). Differences were considered statistically significant at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test.

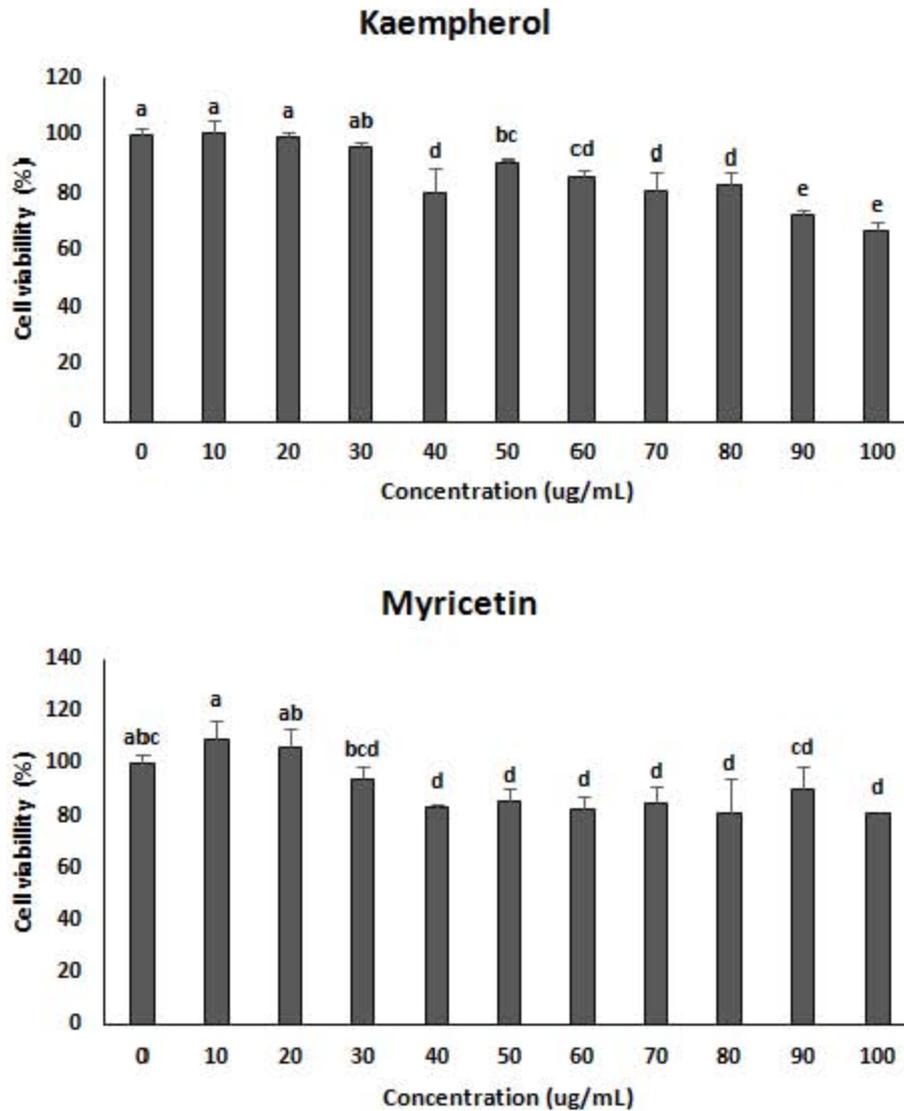
Cinnamic acid와 caffeic acid는 40  $\mu\text{g/mL}$  이상의 농도에서 생존율이 통계적으로 유의적인 차이를 보이지는 않았으나, 아무것도 처리하지 않은 농도에 대비하여 85% 이하로 감소되었다. 따라서 cinnamic acid와 caffeic acid는 0-30  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 안전한 농도로 관찰되었다(Fig. 5-14).



**Fig. 5-14. Viability of HepG2 cell following 24 h of treatment with different concentrations of Cinnamic acid and Caffeic acid.**

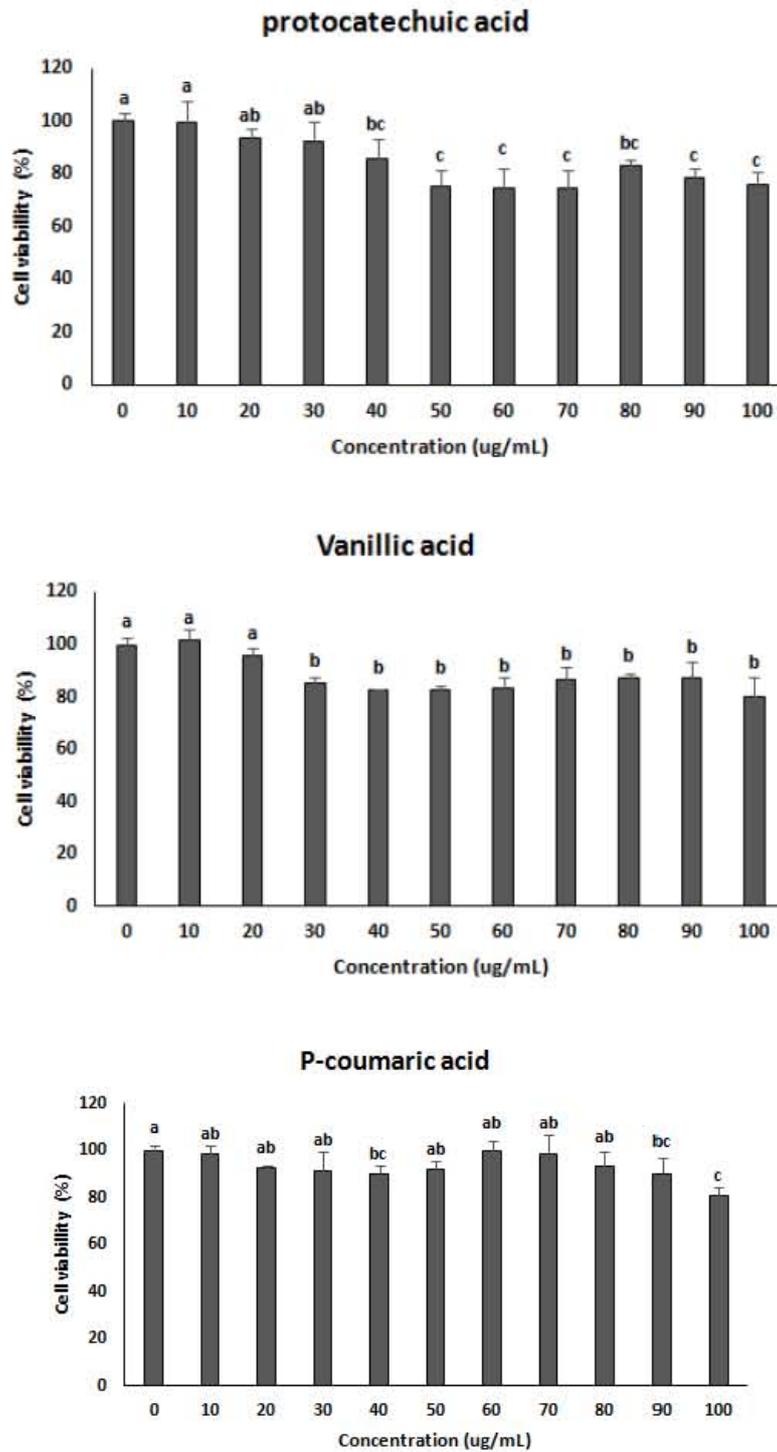
The results were presented mean  $\pm$  SD at least three independent experiments, each performed in triplicate (n=3). Differences were considered statistically significant at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test.

그리고 Kaempferol, myricetin, protocatechuic acid, vanillic acid, p-coumaric acid는 30  $\mu\text{g/mL}$  이상의 농도에서 생존율이 통계적으로 유의적인 차이를 보이지는 않았으나, 아무것도 처리하지 않은 농도에 대비하여 85% 이하로 감소되었다. 따라서 kampherol, myricetin, protocatechuic acid, vanillic acid, p-coumaric acid는 0-20  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 안전한 농도로 관찰되었다(Fig. 5-15, 5-16).



**Fig. 5-15. Viability of HepG2 cell following 24 h of treatment with different concentrations of Kampherol and Myricetin.**

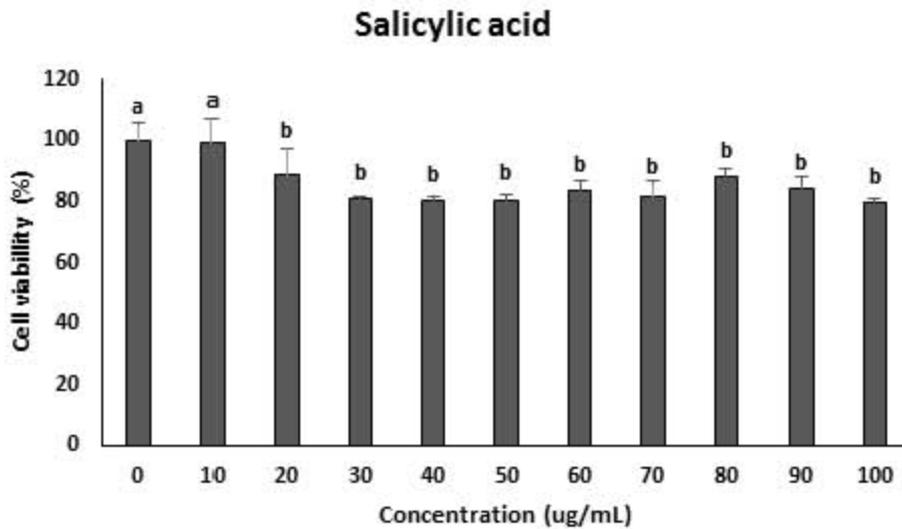
The results were presented mean  $\pm$  SD at least three independent experiments, each performed in triplicate (n=3). Differences were considered statistically significant at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test.



**Fig. 5-16. Viability of HepG2 cell following 24 h of treatment with different concentrations of Protocatechuic acid, Vanillic acid, and P-coumaric acid.**

The results were presented mean  $\pm$  SD at least three independent experiments, each performed in triplicate (n=3). Differences were considered statistically significant at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test.

또한 salicylic acid는 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  이상의 농도에서 생존율이 통계적으로 유의적인 차이를 보여, 0-10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  의 농도에서 안전한 농도로 관찰되었다(Fig. 5-17).



**Fig. 5-17. Viability of HepG2 cell following 24 h of treatment with different concentrations of Salicylic acid.**

The results were presented mean  $\pm$  SD at least three independent experiments, each performed in triplicate (n=3). Differences were considered statistically significant at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test.

#### 다. 요약

○ 본 실험은 각 성분들의 안전한 농도 범위를 살펴보고자 각 성분들을 0-100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 세포에 처리하여 세포 독성 시험을 진행하였다.

○ Chrysin과 Quercetin은 0-100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 세포 독성이 나타나지 않았고, Isorhamnetin은 0-80  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 세포 독성이 나타나지 않았다. Cinnamin acid와 Caffeic acid는 0-30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 세포 독성이 나타나지 않았고, kampherol, myricetin, protocatechuic acid, vanillic acid, p-coumaric acid는 0-20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 안전한 농도로 관찰되었다. Salicylic acid는 0-10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  의 농도에서 안전한 농도로 관찰 되었다.

### 3. 효능 및 안전성 결론

○ 본 연구에서 비타민나무의 열매와 잎의 항산화 활성을 측정한 결과, 열매에 비교하여 잎에서 모든 항산화 효능이 훨씬 뛰어났음을 관찰하였고 특히 경기 지역의 추출물 및 열수 추출물에서 산화적 스트레스에 의해 감소된 항산화 효소 활성을 증가시키는 능력이 뛰어났음을 확인하였다.

○ 따라서 비타민나무 잎 추출물을 사용하여 안정성을 제시하고자 면역 독성평가를 실시하였고, 단회경구투여 독성시험, 복귀돌연변이 시험을 GLP 기관에 의뢰하여 실시하였다.

○ 비타민나무 잎 추출물 500 mg/kg body weight의 식이투여가 T/B 세포 증식능을 억제시켰고, cytokine과 NK세포 활성 역시 억제하여 정산군과 유의적인 차이를 보이지 않음을 확인하였다. 결과적으로 비타민나무 추출물이 면역 독성 및 알러지에 영향을 미치지 않아 안정성을 입증할 수 있었다.

○ 앞선 결과들을 토대로 하여 비타민나무 추출물의 섭취가 스트레스에 어떠한 영향을 미치는지 알아보려고 임상시험을 통해 육체적/정신적 스트레스 지표 변화를 확인한 결과, 고농도로 섭취한 그룹에서 섭취 전(0주)에 비해 섭취 후(4주) 스트레스 지표가 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다.

○ 비타민나무 추출물을 성분 분석하여 나온 물질들의 안정성을 평가하기 위해 HepG2 세포에 0-100 µg/mL의 농도로 처리하여 생존율을 관찰하였다. 그 결과, 몇몇의 물질에서는 고농도(80-100 µg/mL)에서도 높은 생존율을 보였으나, 대부분의 물질에서는 저농도에서 세포 독성이 관찰되었다. 따라서 추출물이 아닌 단일 물질로 섭취할 시에는 고용량이 아닌 저용량을 투여하여도 효과가 나타날 수 있다는 것을 암시하기도 한다.

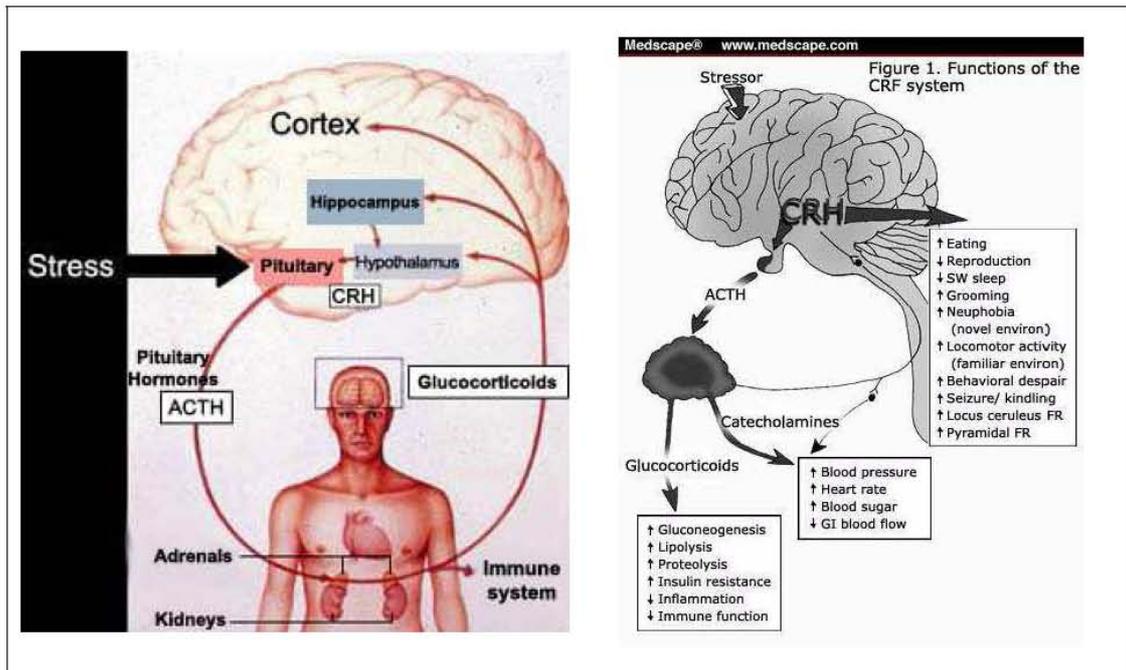
○ 따라서 비타민나무 추출물에는 항산화능이 뛰어날 뿐만 아니라 면역 독성 및 알러지에 도 안전하며, 육체적/정신적 피로개선에 도움이 되는 기능성 식품의 소재로 활용이 가능할 것으로 보여 진다.

## 제 6 절. 비타민나무의 정신적 향피로 기능성 및 활성기전 규명 (협동기관 : 천연자원연구원 김선오)

### 1. 서론

현대사회에서는 육체적 스트레스 외에도 정신적 스트레스 또한 만병의 근원이라 불릴 정도로 다양한 질병의 원인이 되며, 특히 뇌기능 향상 욕구와 더불어 사회적 부담 1위 질병인 치매 등과 같은 신경계 질환에 미치는 영향이 크다. 이는 고령화 사회에 매우 심각한 질병으로 의약적 치료보다 건강식품을 통한 예방이 요구되는 바이다. 스트레스는 항상성과 기관의 균형이 파괴되었을 때 나타나는 심리적, 신체적 변화로, 스트레스를 받는 동안 항상성을 유지하기 위해 여러 기관에서 이에 대처하는 특이적인 반응들이 활성화된다.

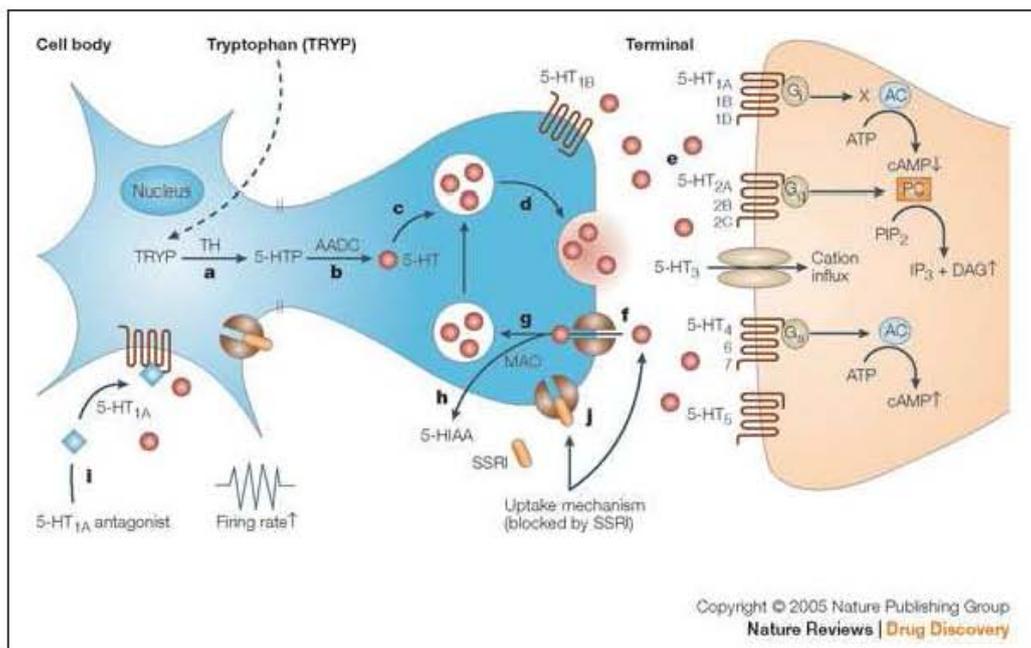
가장 일반적인 생리적인 반응으로 시상하부-뇌하수체-부신피질 축(hypothalamus-pituitary-adrenal gland ; HPA axis)에 의해 조절되며, 스트레스가 주어지면 시상하부에서 부신피질 자극 호르몬 방출호르몬(Corticotropin releasing hormon, CRH)이 생성되어 뇌하수체전엽을 자극, 부신피질자극호르몬(adrenocorticotrophic hormon, ACTH)을 방출하고, 이는 부신피질에 분비되어 부신의 cortisol 등 glucocorticoid의 혈액 중으로의 분비를 증가시켜, 신체 각 기관으로 전달된다. glucocorticoid는 스트레스에 대해 반응하여 각종 물질 대사, 면역 활성화, 실혈관계 활성화 및 뇌기능 등 다양한 생리적 적응 반응을 유도하는 스트레스 호르몬으로 알려져 있다.



그리고 glucocorticoid가 만성스트레스에 의하여 혈중농도가 높아지고, 장기간 노출되면 기억과 학습을 담당하는 해마의 위축 및 손상뿐만 아니라, 신경계와 연관된 다양한 정신적 질병(불안증, 우울증, 정신장애 및 수면장애) 또한 발생할 수 있다.

스트레스와 정신적 질환은 서로 많은 연관성을 가지고 있으며, 최근 별개로 연구되고 있던

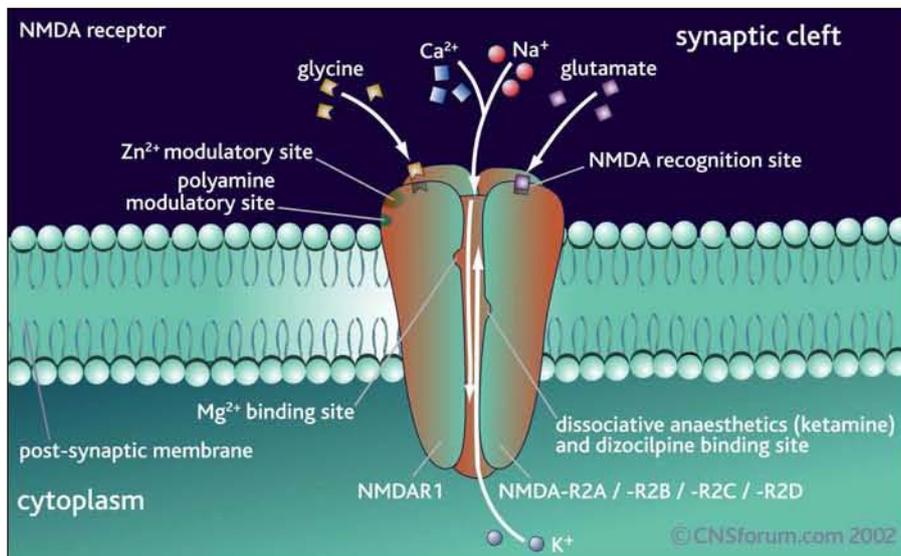
HPA axis과 세로토닌은 만성스트레스 상태에서 상호작용한다는 새로운 관점이 제시되고 있다. 각 시스템의 중추적 부위인 실방핵(paraventricular nucleus)과 해마(hippocampus)는 뇌의 변연계에 해당하며, 이는 각성, 수면, 식욕, 감정뿐만 아니라 기억 및 인지능력과 관련이 있다. 세로토닌(serotonin, 5-hydroxytryptamine, 5-HT)은 뇌 중추영역에서 다양한 작용을 하는 신경전달물질의 일종으로, 중뇌 봉선핵(dorsal raphe nuclei)에서 합성되며, 시상하부에서 선조체와 미상핵(caudate nucleus)을 지나 대뇌를 거쳐 해마로 전달되어 뇌 전체에 분포한다. 세로토닌 수용체는 크게 7군 14종으로 분류된다(5-HT<sub>1-7</sub>). Cyclic adenosine monophosphate (cAMP) 신호전달경로와 neurotrophic factor 신호전달경로가 알려져 있으며, 체온, 혈압, 내분비활동, 감정, 중독, 학습, 식욕, 성욕, 움직임, 구토, 통증 등 다양한 생리적 기능이 조절되는 것으로 알려져 있다.



cAMP 이차 전령계는 활성 인자와 억제 인자들의 복잡한 상호작용에 의해 조절되고 있는데 5-HT<sub>4,5A,6,7</sub> 수용체는 cAMP 경로를 활성화시키고, 5-HT<sub>1A,1B,1D,1E</sub>는 억제한다. 신경전달물질이 해당 수용체와 결합하면 G 단백질을 경유하여 adenylyl cyclase (AC)를 활성화시키고, AC는 adenosine triphosphate (ATP)에서 cAMP의 생성을 증가시키고, cAMP는 다시 cAMP-dependent protein kinase (PKA)를 활성화시킨다. PKA는 수용체, 이온 통로(ion channel), G 단백질, 효소, 전사인자(transcriptional factor)를 포함한 특별한 단백질의 인산화를 통해 세포 기능을 조절한다.

NMDA 수용체와 스트레스는 많은 연관을 가지고 있으며, 특히 해마에서 기억과 많은 연관을 가지고 있다. NMDA 수용체의 활성화는 AMPA 수용체의 활성화를 유도하여, 신경세포의 spine 증가, 신경전달의 활성화 등 장기기억에 많은 영향을 주는 것으로 알려져 있다. NMDA 수용체는 도파민 D1 수용체와 직접적인 상호작용을 하면서 상호작용의 결과에 따라 세포의 사멸을 조절하거나, 정상적인 세포 사이의 통신을 유도하는 기능을 한다. 이는 D1 수용체와

NMDA 수용체 사이에 일어나는 상호작용에 따라 세포의 사멸이 조절된다는 것을 의미하는 동시에, NMDA 수용체가 세포의 사멸에 직접적으로 관여한다는 것을 의미한다. 더욱이 NMDA 수용체가 D1 수용체와 상호작용할 때는 세포의 사멸과 세포 사이의 신호전달 조절기능이 서로 다른 기작을 통해 독립적으로 진행된다. 다시 말해 세포의 사멸과 세포 사이의 신호전달 기능이 다른 하나의 기능에는 영향을 미치지 않고, 서로 다른 기능만을 선택적으로 조절하면서 진행된다. 이를 바꾸어 말하면, NMDA가 관여하는 세포 사멸 기능을 줄일 수 있는 방법만 개발되면, 뇌세포의 사멸을 막을 수 있다는 말이 된다. 이 때문에 뇌졸중, 정신분열증, 골다공증, 간질, 치매 등 각종 질환을 치료하기 위한 일환으로 NMDA 수용체에 대한 다양한 연구가 이루어져 왔다. 예를 들어, 술을 마신 뒤 기억이 나지 않는 현상, 곧 '블랙 아웃' 현상도 알코올이 뇌에 작용해 NMDA수용체의 활동을 차단하기 때문에 일어난다는 것이 학계의 정설이다. NMDA 활동이 차단되면, 뇌의 신경세포 사이에서 신호를 전달하는 매개 역할을 하는 글루탐산염도 활동을 멈추기 때문이라는 것이다. 따라서 NMDA 수용체를 활성화하거나, NMDA가 매개하는 세포의 사멸만 줄일 수 있다면, NMDA 수용체의 활성이 비정상적인 상태를 보이는 정신분열증 등 각종 질병을 치료할 수 있는 길이 열리게 되는 것이다.



그리고 신체 내 산소에 의하여 유래되는 superoxide, hydroxy peroxy alkoxyl, hydroperoxy radical, nitric oxide 등과 같은 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)은 호흡 과정이나 세포 대사과정에서 자연스럽게 생성되며 여러 가지 세포 반응을 조절하는 역할을 한다. 하지만 과도한 스트레스, 흡연, 음주 등 여러 가지 원인으로 인하여 과도하게 생성된 활성산소들은 노화는 물론, 알츠하이머, 파킨슨 증후군 등과 같은 퇴행성 뇌질환을 일으키는 원인으로 알려져 있다. Heme oxygenase (HO)는 세포의 항산화 시스템에 중요한 구성요소로서 HO 유도체중 하나인 HO-1은 세포내의 heme을 분해하여 일산화탄소, 철, biliverdin을 만든다. 분해된 생성물인 일산화탄소, 철, biliverdin과 HO-1 그 자체적으로 세포손상 및 사멸의 억제, 항염증 및 항산화 작용을 하는 것으로 알려져 있으며, 다양한 질병의 타겟으로 주목을 받고 있다. 특히

최근에는 HO-1과 그 부산물들이 항산화 작용을 통하여 산화적 스트레스에 의한 뇌 세포 손상을 억제 한다는 많은 연구가 보고되고 있다.

이에 본 연구는 비타민나무를 활용한 멘탈케어 기능성분 및 활성기전을 탐색하고자 1차적으로 비타민나무의 지역별, 부위별, 그리고 용매별 시료를 제조 및 수득하여 *in vivo* 상에서의 실험에 앞서 *in vitro* screening assay tool들을 활용하여 가장 높은 활성을 보이는 시료를 선택하고자 하였다.

수행 연구로서 비타민나무 시료를 이용하여 스트레스 호르몬인 glucocorticoid에 의한 신경 세포 보호효과를 확인 및 활성을 비교 실험 하였으며, 세로토닌 수용체의 활성측정을 위하여 시료의 세로토닌 수용체를 통한 cAMP의 조절을 확인하고자 하였다. NMDA 수용체를 통한  $Ca^{2+}$  유입 억제 효과를 관찰하고, 신경세포에서의 HO-1 활성 조절을 확인하였다. 그리고 선택 시료로 *in vivo* assay 를 수행하여 전임상 단계에서의 활성을 검증하고 그 생리활성 물질을 탐색함으로써 본 연구는 일련의 실험을 통하여 궁극적으로 안전성을 확보할 수 있는 멘탈케어 보호용 저분자성 소재를 개발하여 기능성 식품으로써 그 성과를 얻고자 한다.

## 2. 방법 및 결과

### 가. 비타민나무 부위 및 지역별 활성 비교실험을 통한 최종시료 선정

#### (1) 실험방법

#### (가) Glucocorticoid 유도 뇌신경세포 손상 모델에서의 비타민나무의 보호효과 비교 및 탐색

- ① 비타민나무의 부위, 지역, 용매별 추출물의 사용 세포주의 최대안전범위 설정
  - 각 시료를 대상으로 MTT를 이용한 cell cytotoxicity를 측정하였다. SH-SY5Y cell (neuroblastoma, human dopaminergic neuronal cell)을 1% antimicotics/antibiotics와 10% FBS를 함유한 RPMI-1640 배지에서 배양하고 96-well plate에 세포수가  $10^4$ - $10^6$  cell/ml가 되도록 seeding 한 후 24시간 지난 후에 각각의 시료를 농도별로 처리하였다. 시료 처리 24시간 후, MTT test로 세포 생존율을 측정하였다.
- ② Glucocorticoid 유도 뇌신경세포 손상 모델에서의 비타민나무의 보호효과 비교 및 탐색
  - 실험 세포주(SHSY-5Y cell line)를 96well microplate에  $2.5 \times 10^5$  cell/well 수준으로 분주하여 24시간 후 배양액을 새로 교체하고 1mM 콜티코스테론(Corticosterone)을 첨가하여 세포독성을 유발시킨 후, 각 실험시료를 농도별로 첨가하여 24시간 배양 시켰다. 배양이 끝난 세포의 생존율은 MTT assay를 이용하여 측정하였다.

#### (나) 뇌신경세포 세로토닌 수용체 활성 조절 (cAMP) 모델에서의 비타민나무의 보호효과 비교 및 탐색

- ① 비타민나무의 부위, 지역, 용매별 추출물의 사용 세포주의 최대안전범위 설정

- 각 시료를 대상으로 MTT를 이용한 cell cytotoxicity를 측정하였다. 세포주는 human serotonin 5-HT6 receptor gene 발현된 stably Human astrocytoma 1321N1 cells를 이용하였고, 세포를 24시간 배양 후 상등액 배지를 제거하고 phosphodiesterase inhibitors IBMX (0.5 mM) 와 Ro 20-1724 (0.1 mM)를 포함한 PBS 로 배지 교체 후 시료를 농도별로 처리한 뒤, 24시간 후, MTT test로 세포 생존율을 측정하였다.

② 뇌신경세포 세로토닌 수용체 활성 조절 (cAMP) 모델에서의 비타민나무의 보호효과 비교 및 탐색

- stably Human astrocytoma 1321N1 cells를 이용하였고, 세포를 24시간 배양 후 상등액 배지를 제거하고 phosphodiesterase inhibitors IBMX (0.5 mM) 와 Ro 20-1724 (0.1 mM)를 포함한 PBS 로 배지 교체 후 각 시료와 serotonin (5-HT) 100uM를 15분 동안 동시 처리후 lysis한 시료를 R&D Systems cAMP Assay kit 실험 방법에 따라 활성 측정하였다.

(다) 과잉신경세포 흥분에 의한 신경 손상 *in vitro* 모델에서의 비타민나무의 보호효과 비교 및 탐색

① 비타민나무의 부위, 지역, 용매별 추출물의 사용 세포주의 최대안전범위 설정

- 임신만삭의 SD rat에서 태아를 꺼낸 후, 단독하여 뇌를 분리하고 현미경을 이용하여 해마를 분리하고 poly-L-lysine이 코팅된 48 well에 세포를 배양하였다. 배양 4일째 되는 날 배지의 일부를 glutamate가 없는 배지로 바꿔주고 배양 7일째 되는 날 시료를 농도별로 처리한 뒤, 24시간 후 MTT test로 세포 생존율을 측정하였다

② 과잉신경세포 흥분에 의한 신경 손상 *in vitro* 모델에서의 비타민나무의 보호효과 비교 및 탐색

- 임신만삭의 SD rat에서 태아를 꺼낸 후, 단독하여 뇌를 분리하고 현미경을 이용하여 해마를 분리하고 poly-L-lysine이 코팅된 슬라이드에 세포를 배양하였다. 배양 4일째 되는 날 배지의 일부를 glutamate가 없는 배지로 바꿔주고 배양 7일째 되는 날 실험을 수행하였다. 슬라이드를 magnesium free HEPES buffer로 2회 washing 후 Fura-2, AM (1 $\mu$ M)을 처리한다(1시간, 실온). Magnesium이 들어있는 HEPES buffer로 2회 washing 후 magnesium free HEPES buffer를 채워 30분 간 실온에서 보관하였다. 슬라이드를 조각내어 일부를 옮겨 340/380nm 빛을 이용해 세포내 칼슘 양을 측정하고 magnesium free HEPES buffer를 5분간 흘려주고 NMDA(100 $\mu$ M)를 10초간 흘려준 값을 control로 사용하고 antagonist인 D-AP5(250 $\mu$ M)를 1분간 흘려주고 NMDA (100 $\mu$ M)와 D-AP5 또는 시료를 동시에 10초 흘려주어 억제되는지 확인한 후, 다시 magnesium free HEPES buffer를 5분간 흘려주고 NMDA(100 $\mu$ M)를 10초간 흘려주어(2번~3번) 회복되는지를 확인한 후 실

험에 이용하였다.

## (라) 뇌신경세포 heme oxygenase-1 활성 조절 *in vitro* 모델에서의 비타민나무의 보호 효과 비교 및 탐색

### ① 뇌신경세포 heme oxygenase-1 활성 조절 *in vitro* 모델에서의 비타민나무의 보호효과 비교 및 탐색

- 임신만삭의 SD rat에서 태아를 꺼낸 후, 단두하여 뇌를 분리하고 현미경을 이용하여 해마를 분리하고 poly-L-lysine이 코팅된 HTS용 96 well에 세포를 배양하였다. 배양 4일째 되는 날 배지의 일부를 glutamate가 없는 배지로 바꿔주고 배양 7일째 되는 날 실험을 수행하였다. 각각의 시료를 농도별로 처리한 후, 시료 처리 후 4시간 뒤에 100  $\mu$ M CuSO<sub>4</sub>를 24hr 처리하여 독성을 유발하였으며, 24 hr 후, culture media를 제거하고 fixation buffer로 상온에서 15분 고정하였다. Wash buffer로 2회 washing 후, detergent인 triton X-100이 첨가된 permeabilization buffer에서 상온에서 15분 처리 하였다. permeabilization buffer를 제거하고 2회 washing 후, 1% FBS가 함유된 blocking buffer에서 15분 처리한 후, 1시간동안 1차 HO-1 antibody를 상온에서 1시간동안 반응 시켰다. 이후, Hoechst와 dylight 549를 30분간 처리 후, HTS를 이용하여 측정하였다.

## (2) 실험결과

### (가) Glucocorticoid 유도 뇌신경세포 손상 모델에서의 비타민나무의 보호효과 비교 및 탐색

#### ① 비타민나무의 부위, 지역, 용매별 추출물의 사용 세포주의 최대안전범위 설정

- Glucocorticoid 유도 뇌신경세포 손상 모델에서의 비타민나무의 보호효과 비교 및 탐색 실험에 앞서 각 시료의 cytotoxicity를 측정하여 최대안전 범위를 설정하였다. 사용 세포주는 SH-SY5Y 세포로서 각 시료의 농도를 10, 30, 100, 그리고 300 ug/mL로 설정하여 세포 독성 실험을 수행 하였으며, 모든 시료에서 10, 30, 100 ug/ml 농도에서는 control (0 ug/mL)군과 비교하여 유의적인 차이가 발견되지 않았다. 하지만 300 ug/mL 농도에서부터 control (0 ug/mL)군과 비교하여 세포 생존도가 감소하였으며, 유의적 차이를 확인할 수 있었다. 본 실험의 결과로 100 ug/mL 농도 내에서 생리활성 실험을 수행 하였으며, 설정 농도로는 10 ug/mL과 30 ug/mL으로 설정 하였다 (Fig. 6-1, 6-2).

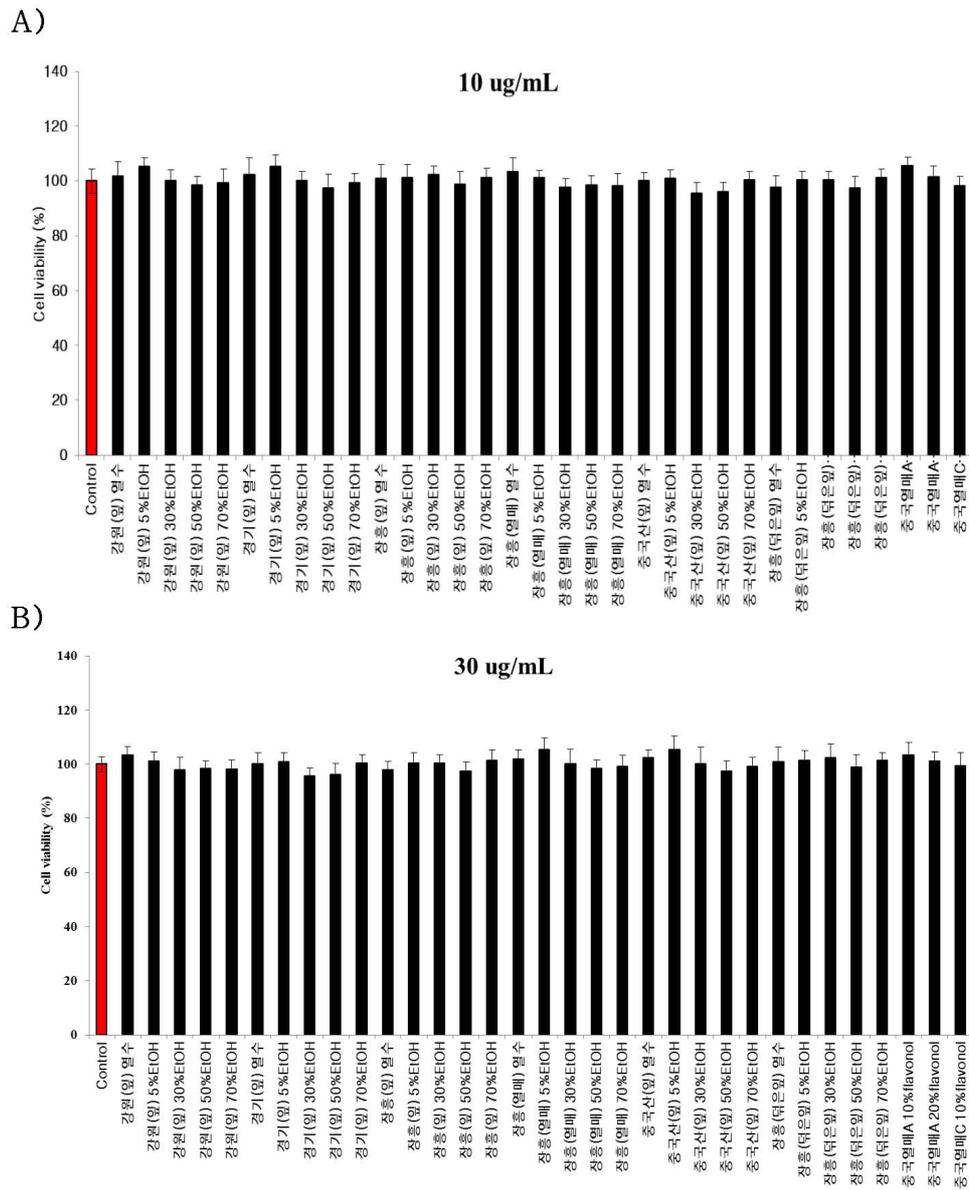
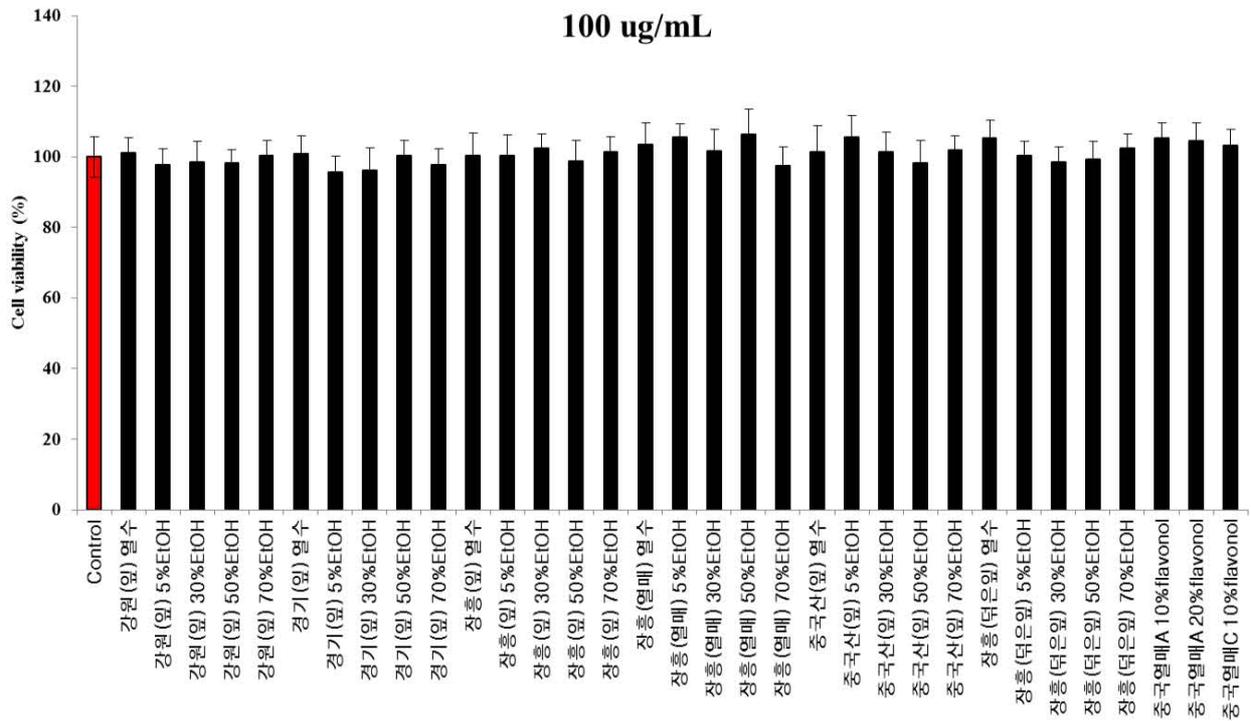


Fig. 6-1. Cytotoxicity of extracts from *Hippophae rhamnoides* on SH-SY5Y cells. (10, 30 ug/ml). The columns represent mean  $\pm$  SD, \*  $p < 0.05$  vs the Control group.

A)



B)

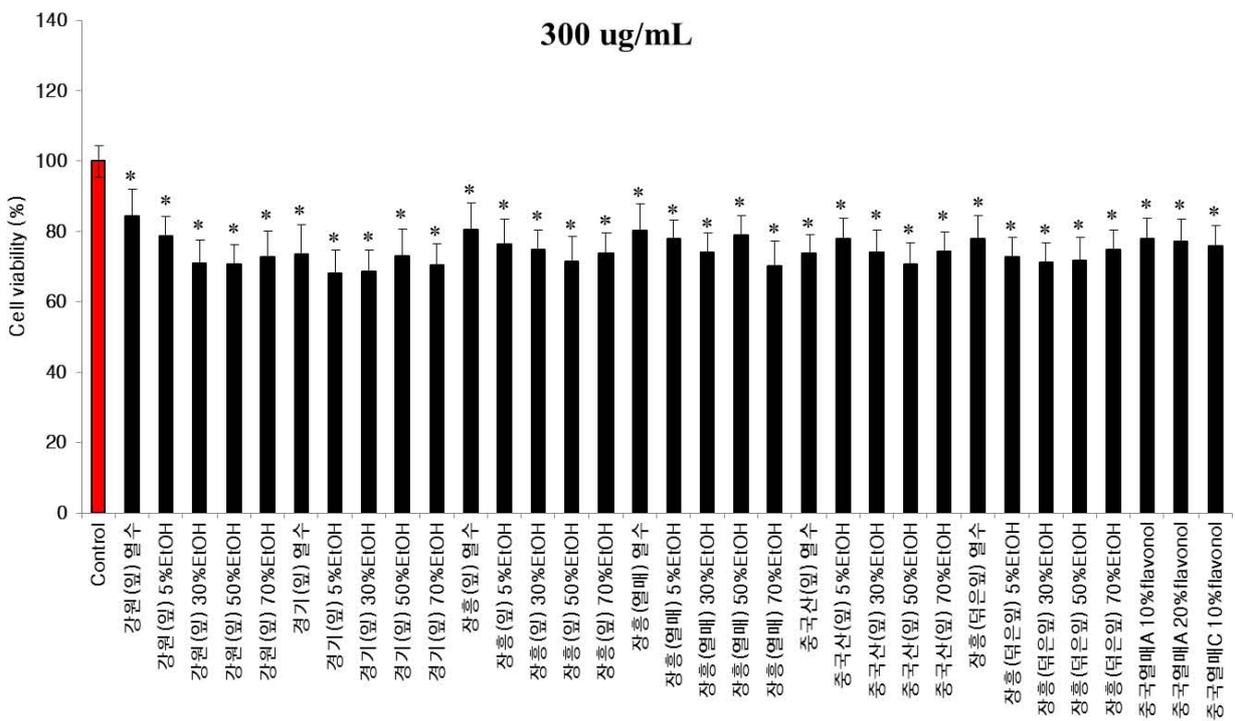


Fig. 6-2. Cytotoxicity of extracts from *Hippophae rhamnoides* on SH-SY5Y cells. (100, 300 ug/mL). The columns represent mean  $\pm$  SD, \*  $p < 0.05$  vs the Control group.

② Glucocorticoid 유도 뇌신경세포 손상 모델에서의 비타민나무의 보호효과 비교 및 탐색 실험 - 실험에 앞서 설정한 최대 안전범위인 100 ug/mL 농도 이내에서, 저농도 10 ug/mL, 고농도 30 ug/mL 농도에서 실험을 수행 하였다. Fig. 6-3. A에서 보는 바와 같이, 저농도 10 ug/mL 처리 실험에서는 corticosterone을 24시간 동안 처리하자 무처리군인 Control 군과 대비하여 세포 생존도가  $56.62 \pm 6.21\%$ 로 유의적으로 크게 감소함을 확인 하였다 ( $P < 0.001$ ). 하지만 corticosterone과 함께, 각 시료들을 처리 하였을 때, 강원(잎) 열수 추출물 ( $98.92 \pm 15.31\%$ )과 경기(잎) 열수 추출물 ( $120.88 \pm 11.94\%$ )이 세포생존도가 유의적으로 가장 크게 증가한 것을 확인하였다 ( $P < 0.001$ ). 그리고 강원(잎) 5% 에탄올 추출물과 경기(잎) 5, 30, 그리고 50% 에탄올 추출물 군에서 각각  $89.53\% (\pm 11.52\%)$ ,  $103.14\% (\pm 4.40\%)$ ,  $101.30\% (\pm 7.21\%)$ ,  $105.95\% (\pm 6.14\%)$ 로 세포 생존도가 유의적으로 증가 하였다 ( $P > 0.01$ ). 또한 강원(잎) 30 ( $101.30 \pm 7.21\%$ ), 50 ( $105.95 \pm 6.14\%$ ), 70% ( $66.89 \pm 15.84\%$ ) 에탄올 추출물과 전남 장흥(잎) 5% ( $75.64 \pm 12.22\%$ ), 30% ( $80.12 \pm 8.74\%$ ) 에탄올 추출물군, 그리고 중국산(잎) 열수 추출물( $78.12 \pm 6.42\%$ )과 5% 에탄올 추출물군 ( $76.92 \pm 9.12\%$ )에서도 세포 생존도가 유의적으로 corticosterone군과 대비하여 증가 한 것을 확인하였다. 그리고 고농도인 30 ug/mL 처리 실험에서도 (Fig. 6-3. B), 강원(잎) 열수 ( $101.79 \pm 11.17\%$ )와 5% 에탄올 ( $91.44 \pm 11.60\%$ ) 추출물군과 경기(잎) 열수 ( $110.21 \pm 10.93\%$ ), 5% ( $99.43 \pm 12.71\%$ ), 30% ( $85.42 \pm 7.38\%$ ), 그리고 50% ( $80.45 \pm 16.67\%$ ) 추출물에서 세포생존도가 유의적으로 가장 크게 증가한 것을 확인하였다 ( $P < 0.001$ ). 그리고 강원(잎) 30, 50, 70% 에탄올 추출물과 전남 장흥(잎) 5%와 30% 에탄올 추출물과 중국산(잎) 열수 추출물과 5% 에탄올 추출물군에서 각각  $84.74\% (\pm 14.99\%)$ ,  $77.61\% (\pm 9.86\%)$ ,  $83.70\% (\pm 18.64\%)$ ,  $84.21\% (\pm 6.35\%)$ ,  $64.94\% (\pm 6.12\%)$ ,  $75.12\% (\pm 11.12\%)$ , 그리고  $73.68\% (\pm 15.13\%)$ 로 세포 생존도가 유의적으로 증가 하였다 ( $P > 0.01$ ). 또한 중국산(잎) 30% 에탄올 추출물 ( $57.55 \pm 15.88\%$ )과 전남 장흥(뒤은잎) 열수 추출물 ( $69.34 \pm 7.07\%$ )에서도 세포 생존도가 유의적으로 corticosterone군과 대비하여 증가 한 것을 확인하였다.

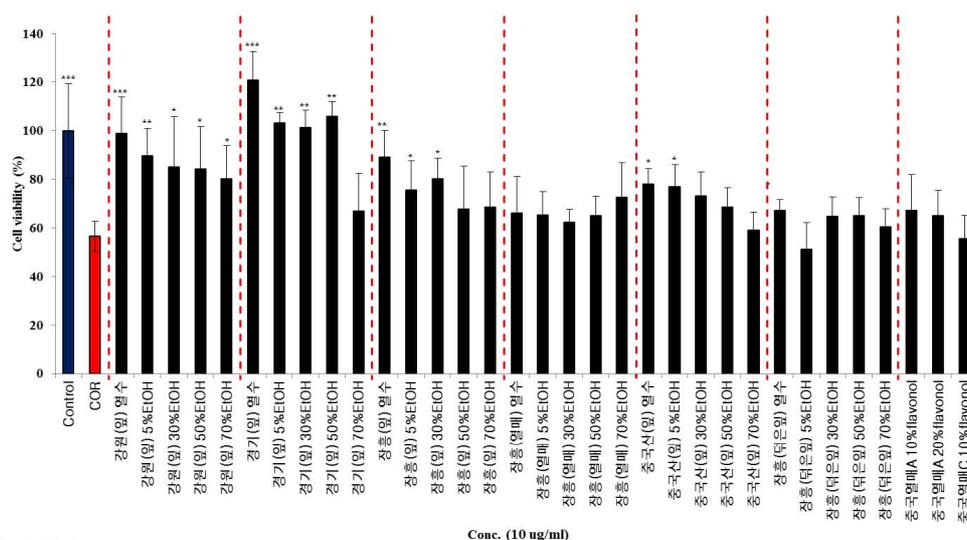


Fig. 6-3. Protective effects of extracts from *Hippophae rhamnoides* against corticosterone-induced toxicity on SH-SY5Y cells. The columns represent mean  $\pm$  SD, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs the COR group.

(나) 뇌신경세포 세로토닌 수용체 활성 조절 (cAMP) 모델에서의 비타민나무의 보호효과 비교 및 탐색

① 비타민나무의 부위, 지역, 용매별 추출물의 사용 세포주의 최대안전범위 설정

- 뇌신경세포 세로토닌 수용체 활성 조절 (cAMP) 모델에서의 비타민나무의 보호효과 비교 및 탐색 실험에 앞서 각 시료의 cytotoxicity를 측정하여 최대안전 범위를 설정하였다. 사용 세포주는 human serotonin 5-HT6 receptor gene 발현된 stably human astrocytoma 1321N1 세포로서 각 시료의 농도를 10, 50, 100, 그리고 300 ug/mL로 설정하여 세포독성 실험을 수행 하였으며, 모든 시료에서 10, 50, 100 ug/ml 농도에서는 control (0 ug/mL)군과 비교하여 유의적인 차이가 발견되지 않았다. 하지만 300 ug/mL 농도에서부터 control (0 ug/mL)군과 비교하여 강원(잎) 열수, 5% 에탄올 추출물과 경기(잎) 열수 추출물, 전남 장흥(잎) 열수, 5% 에탄올 추출물, 전남 장흥(열매) 열수추출물, 그리고 중국산(잎) 추출물, 전남 장흥(뒤은잎) 추출물을 제외하고 모든 다른 시료군에서 세포 생존도가 감소하였으며, 유의적 차이를 확인할 수 있었다. 본 실험의 결과로 100 ug/mL 농도 내에서 생리활성 실험을 수행 하였으며, 설정 농도로는 30 ug/mL 농도에서 뇌신경세포 세로토닌 수용체 활성 조절 (cAMP) 모델에서의 비타민나무의 보호효과 비교 및 탐색 실험을 수행 하였다 (Fig. 6-4, 6-5).

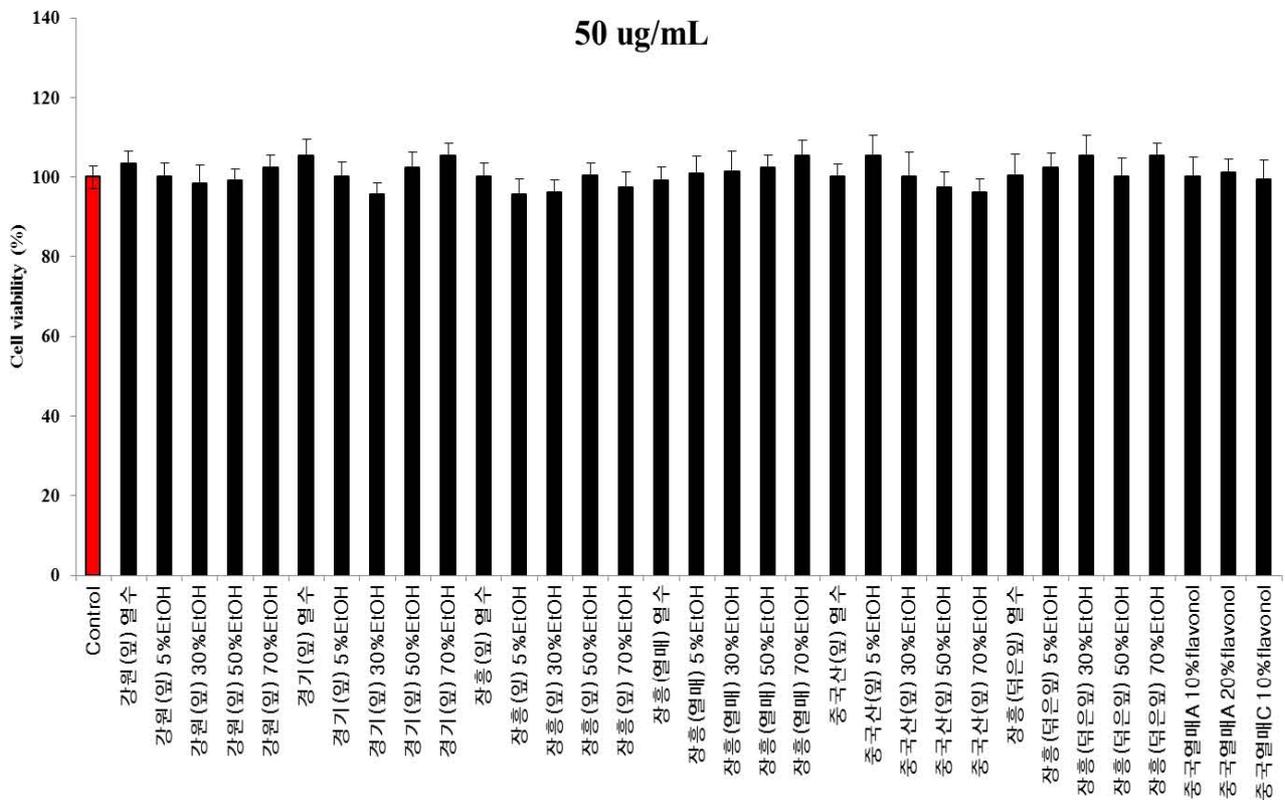


Fig. 6-4. Cytotoxicity of extracts from *Hippophae rhamnoides* on stably Human astrocytoma 1321N1 cells. (50 ug/ml). The columns represent mean  $\pm$  SD, \*  $p < 0.05$  vs the Control group.

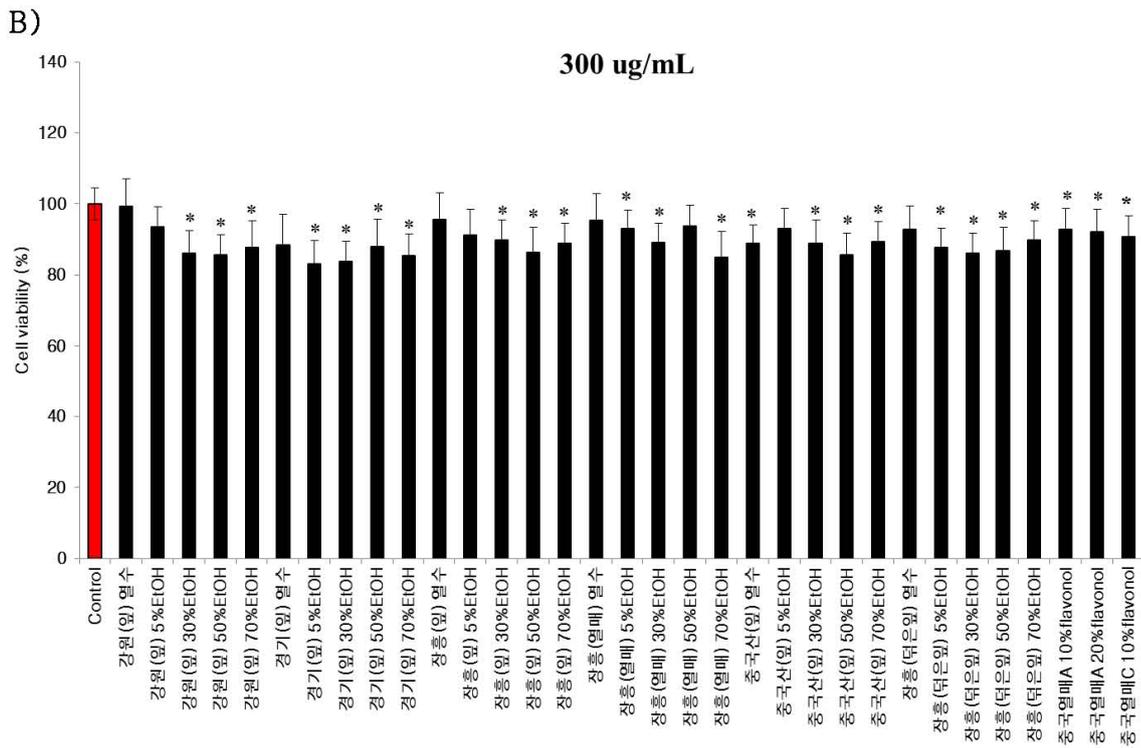
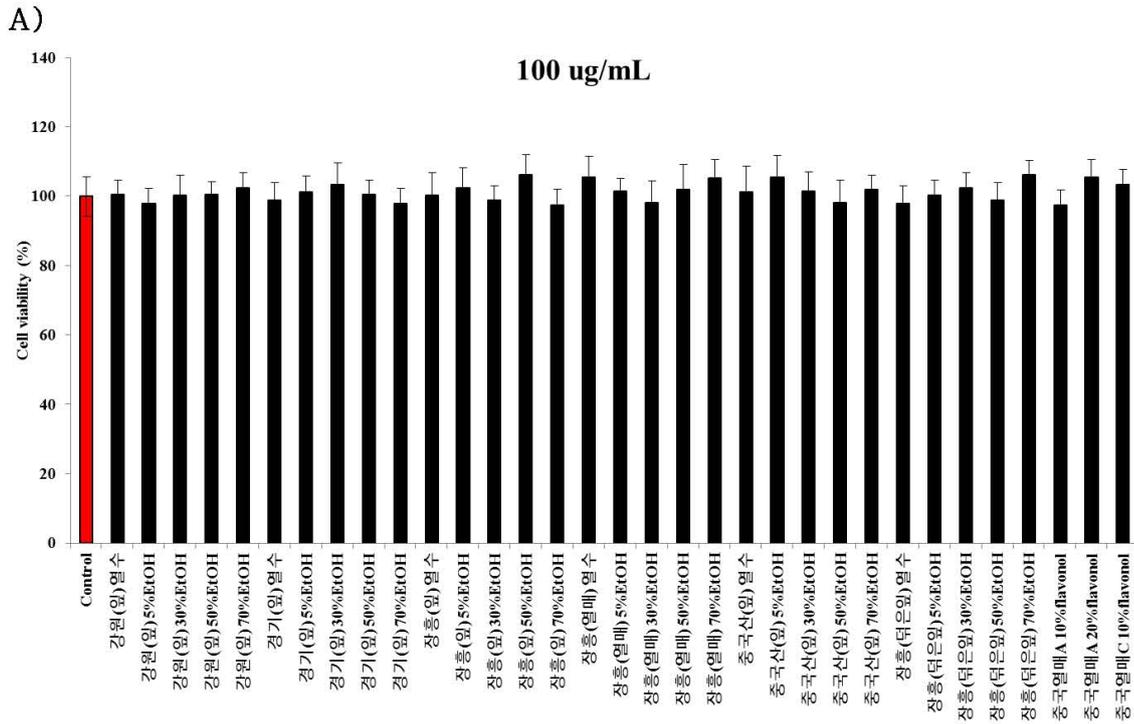


Fig. 6-5. Cytotoxicity of extracts from *Hippophae rhamnoides* on stably Human astrocytoma 1321N1 cells. (100, 300 ug/ml). The columns represent mean  $\pm$  SD, \*  $p < 0.05$  vs the Control group.

② 뇌신경세포 세로토닌 수용체 활성 조절 (cAMP) 모델에서의 비타민나무의 보호효과 비교 및 탐색

– 실험에 앞서 설정한 최대 안전범위인 100 ug/mL 농도 이내에서 설정한 30 ug/mL 농도에서 본 실험을 수행 하였다. Fig. 6-6에서 보는 바와 같이, 5HT(serotonin)만을 처리 하였을 때, cAMP의 발현 정도를 100이라 하고, 시료를 같이 처리 하였을 때, cAMP의 발현정도를 측정하였다. 비타민나무 시료들은 5HT4 수용체에 있어 serotonin과 agonist 효과 보다는 antagonist의 경향을 뚜렷하게 보였으며, 강원(잎) 열수, 5, 30, 50, 그리고 70% 에탄올 추출물에서 각각 65.12% ( $\pm$  10.51%), 60.43% ( $\pm$  9.03%), 49.61% ( $\pm$  8.34%), 62.58% ( $\pm$  8.25%), 그리고 44.07% ( $\pm$  10.52%)의 cAMP 발현 억제능을 보였으며, 또한 경기(잎) 열수, 5, 30, 50, 그리고 70% 에탄올 추출물에서도 각각 65.25% ( $\pm$  10.21%), 60.12% ( $\pm$  15.62%), 60.45% ( $\pm$  10.96%), 50.97% ( $\pm$  12.86%), 그리고 65.45% ( $\pm$  10.52%)의 cAMP 발현 억제능을 보였다 ( $P < 0.001$ ). 전남 장흥(잎) 열수, 30, 50, 70% 에탄올 추출물과 전남 장흥(열매) 30, 50, 70% 에탄올 추출물, 그리고 전남 장흥(떡은잎) 50% 에탄올 추출물과 중국열매 추출물에서도 cAMP 발현 억제능을 확인 할 수 있었다 ( $P < 0.001$ ).

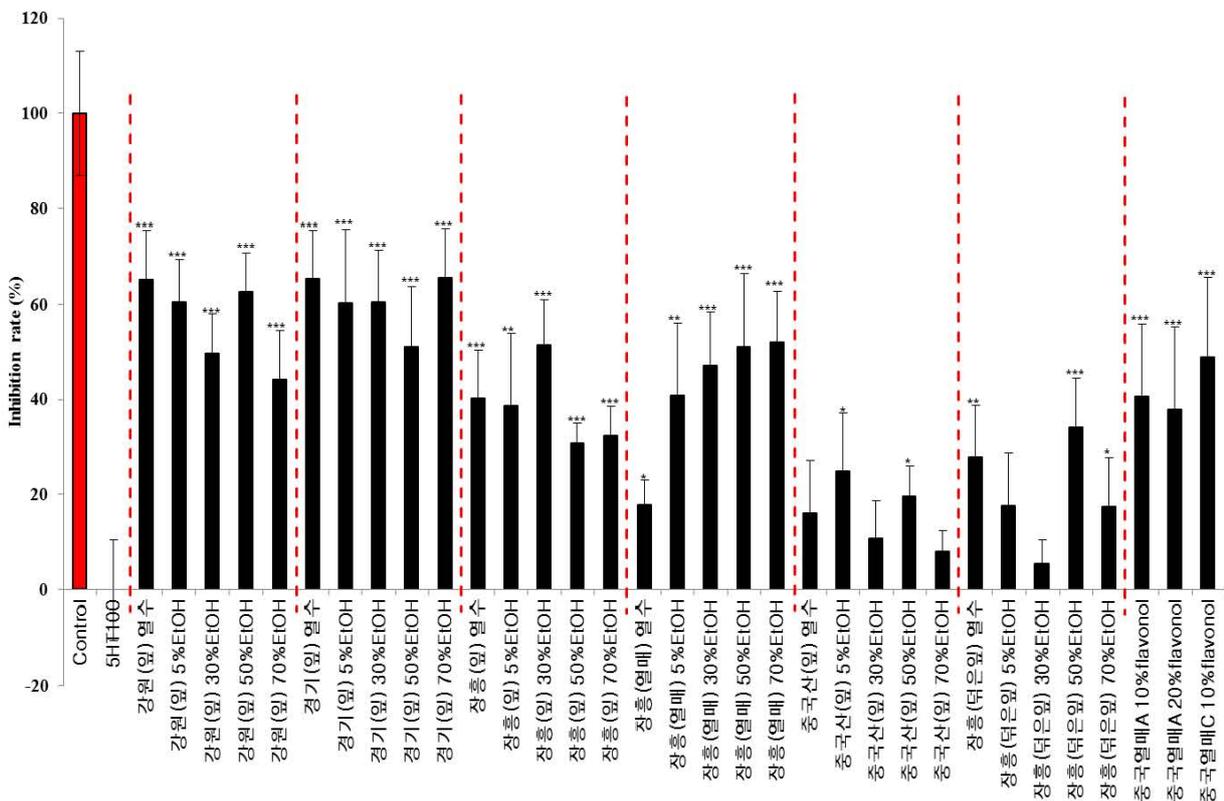


Fig. 6-6. inhibitory effects of extracts from *Hippophae rhamnoides* on 5HT-induced cAMP express in human astrocytoma 1321N1 cells. The columns represent mean  $\pm$  SD, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs the 5HT100 group.

(다) 과잉신경세포 흥분에 의한 신경 손상 *in vitro* 모델에서의 비타민나무의 보호효과 비교 및 탐색

① 비타민나무의 부위, 지역, 용매별 추출물의 사용 세포주의 최대안전범위 설정

- 사용 세포주는 Primary culture - hippocampus cell로서 각 시료의 농도를 10, 30, 100, 그리고 300 ug/mL로 설정하여 세포독성 실험을 수행 하였으며, 모든 시료에서 10, 50, 100 ug/ml 농도에서는 control (0 ug/mL)군과 비교하여 유의적인 차이가 발견되지 않았다. 하지만 300 ug/mL 농도에서부터 control (0 ug/mL)군과 비교하여 강원(잎) 5, 30, 70% 에탄올 추출물과 전남 장흥(잎) 열수, 5, 30, 50% 에탄올 추출물, 전남 장흥(열매) 30, 70% 에탄올 추출물, 그리고 중국산(잎) 30, 70% 에탄올 추출물, 중국산 열수, 30, 70% 에탄올 추출물 그리고 전남 장흥(뒤은잎) 열수추출물 5, 30, 50% 에탄올 추출물에서 세포 생존도가 유의적으로 감소하였음을 확인할 수 있었다. 본 실험의 결과로 100 ug/mL 농도 내에서 생리활성 실험을 수행 하였으며, 설정 농도로는 30 ug/mL 농도에서 과잉신경 세포 흥분에 의한 신경 손상 *in vitro* 모델에서의 비타민나무의 보호효과 비교 및 탐색 실험을 수행 하였다 (Fig. 6-7, 6-8).

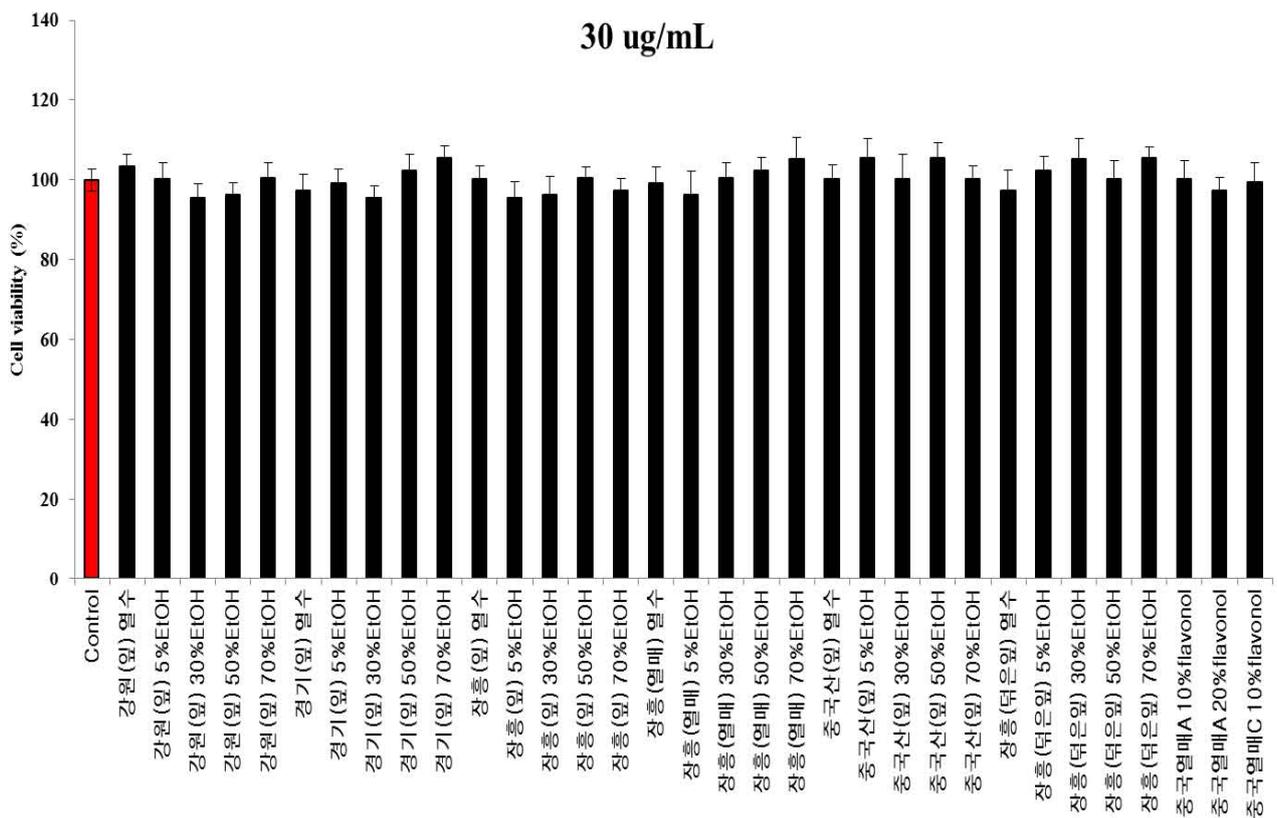


Fig. 6-7. Cytotoxicity of extracts from *Hippophae rhamnoides* on primary hippocampal neuron cells. (30 ug/ml). The columns represent mean  $\pm$  SD, \*  $p < 0.05$  vs the Control group.



② 과잉신경세포 흥분에 의한 신경 손상 *in vitro* 모델에서의 비타민나무의 보호효과 비교 및 탐색 (80% 진행 중)

- 실험에 앞서 설정한 최대 안전범위인 100 ug/mL 농도 이내에서 설정한 30 ug/mL 농도에 서 본 실험을 수행 하였다. Fig. 6-9에서 보는 바와 같이, NMDA를 처리하면  $Ca^{2+}$ 이 유입되며, antagonist drug인 D-AP5를 처리 하고 NMDA를 처리 하였을 때는  $Ca^{2+}$ 의 유입이 100% 억제됨을 확인한 후, 본 실험을 진행하였다. 감원(잎) 열수, 5, 30, 50, 70% 에탄올 추출물은 각각  $43.12 \pm 8.32\%$ ,  $39.71 \pm 7.93\%$ ,  $43.61 \pm 9.60\%$ ,  $37.70 \pm 9.60\%$ ,  $58.22 \pm 7.81\%$ 로 NMDA 수용체를 통한  $Ca^{2+}$  유입 억제능을 보였다 ( $P < 0.001$ ). 그리고 정기(잎) 열수, 5, 30, 50, 70% 에탄올 추출물 또한, 각각  $48.12 \pm 11.33\%$ ,  $72.71 \pm 8.56\%$ ,  $39.09 \pm 10.64\%$ ,  $42.49 \pm 10.95\%$ ,  $59.38 \pm 9.23\%$ 로  $Ca^{2+}$  유입 억제능을 보였다 ( $P < 0.001$ ). 또한 전남 장흥(잎) 열수, 5, 30, 50, 70% 에탄올 추출물 또한, 각각  $54.51 \pm 8.68\%$ ,  $53.43 \pm 8.68\%$ ,  $53.43 \pm 10.99\%$ ,  $40.74 \pm 5.23\%$ ,  $42.47 \pm 10.11\%$ 의  $Ca^{2+}$  유입 억제능을 확인하였다 ( $P < 0.001$ ). 중국산(잎) 50% 에탄올 추출물과 전남 장흥(뽕은잎) 5% 에탄올 추출물 또한 각각  $45.52 \pm 10.35\%$ ,  $48.86 \pm 6.67\%$ 의 억제능을 보였으며 ( $P < 0.001$ ), 중국산(잎) 30% 에탄올 추출물과 중국산 5% 에탄올 추출물, 전남 장흥(뽕은잎) 열수 추출물 모두 각각  $36.72 \pm 9.42\%$  ( $P < 0.01$ ),  $21.45 \pm 9.73\%$ ,  $25.61 \pm 9.82\%$  ( $P < 0.05$ )의 억제능을 확인하였다 (Fig. 6-10, 6-11, 6-12, 6-13, 6-14, 6-15).

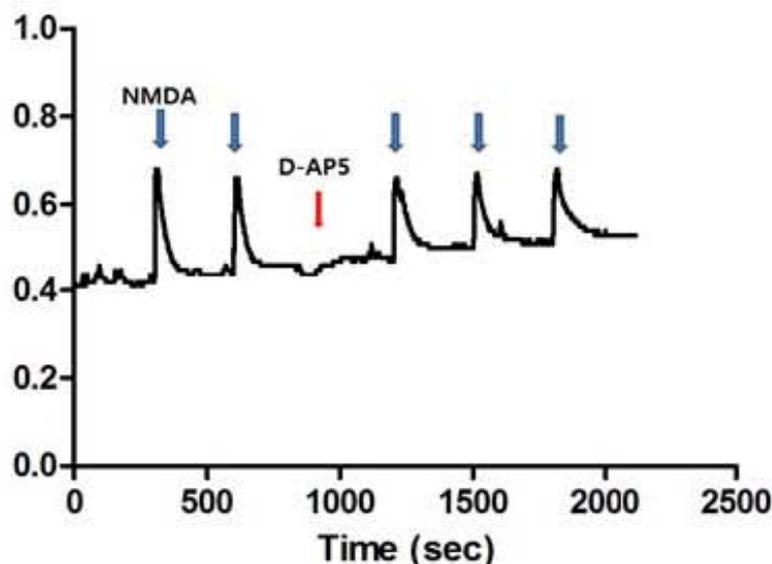
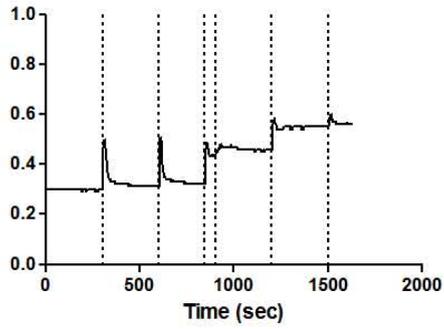
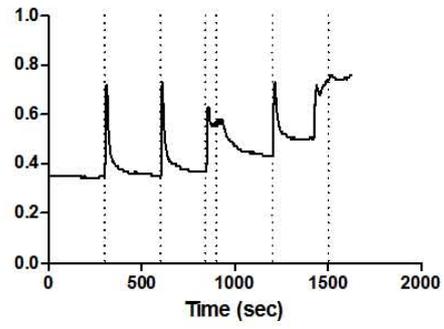


Fig. 6-9. inhibitory effects of D-AP5 against NMDA-induced  $Ca^{2+}$  influx on primary hippocampal neuron cells.

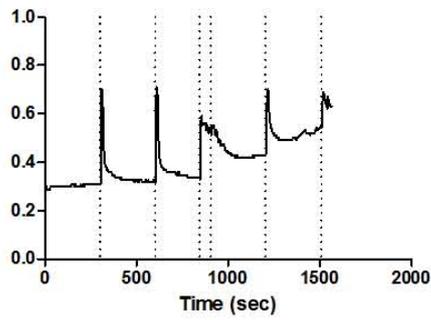
13.06.07 DIV-8 비타민류 강원 잎 열수 30 (38)



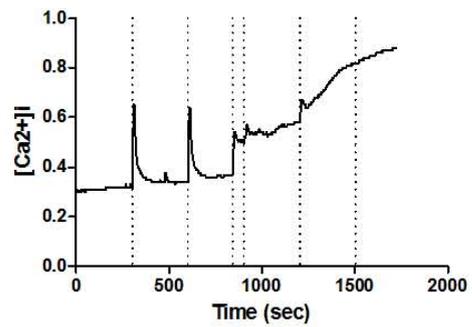
13.06.07 DIV-7 비타민류 강원 잎 5% 30 (27)



13.06.07 DIV-7 비타민류 강원 잎 30% 30 (58)



13.06.07 DIV-7 비타민류 강원 잎 50% 30 (5)



13.06.07 DIV-7 비타민류 강원 잎 70% 30 (1)

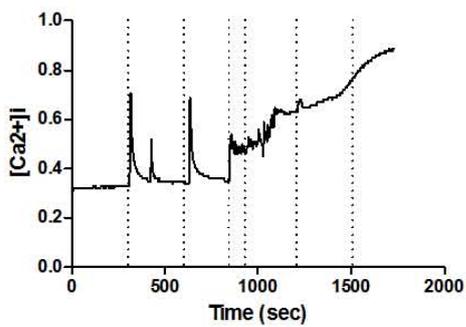


Fig. 6-10. inhibitory effects of extracts from *Hippophae rhamnoides* against NMDA-induced  $Ca^{2+}$  influx on primary hippocampal neuron cells (Kang-won do, leaves).

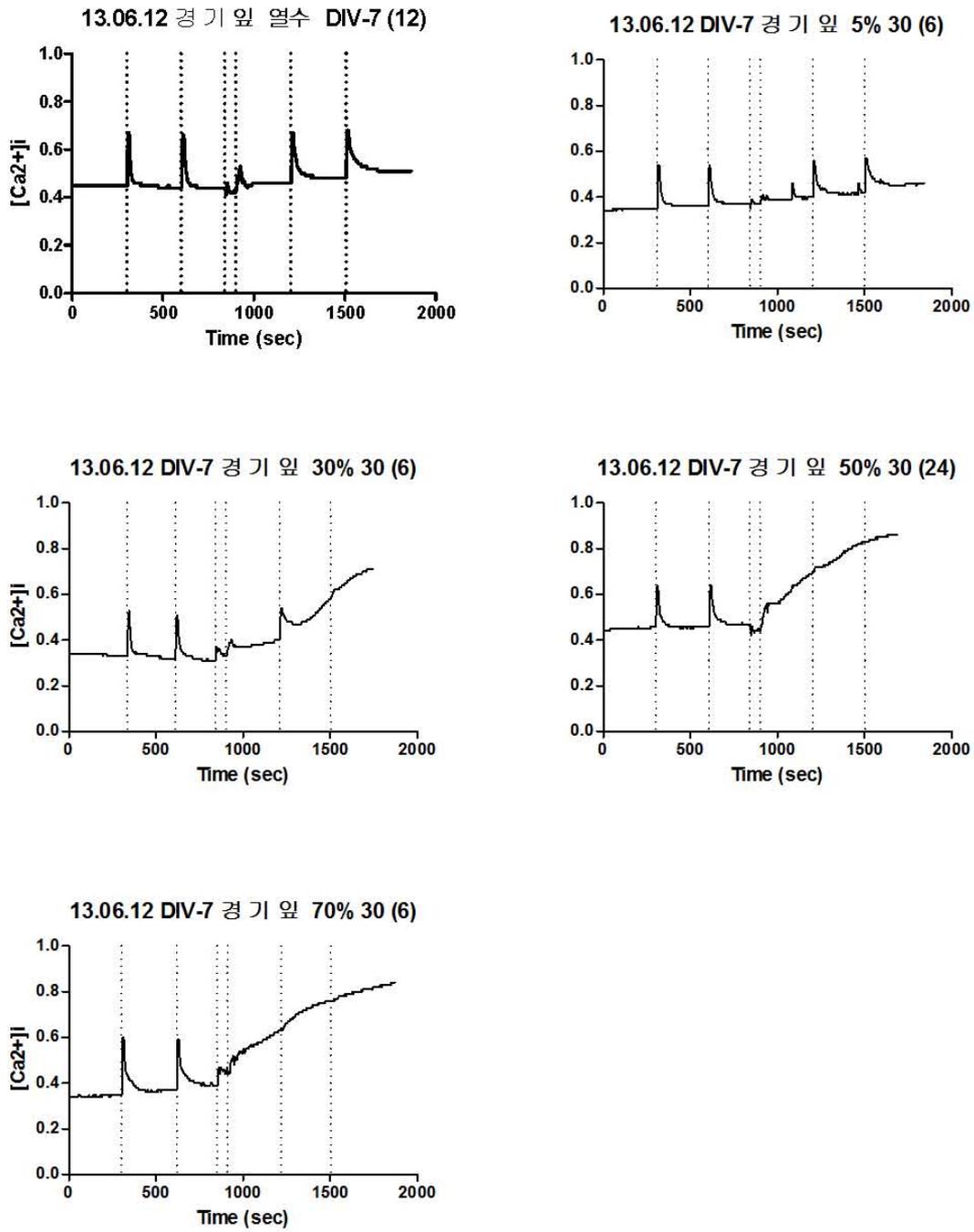


Fig. 6-11. inhibitory effects of extracts from *Hippophae rhamnoides* against NMDA-induced  $\text{Ca}^{2+}$  influx on primary hippocampal neuron cells (Kyung ki, leaves).

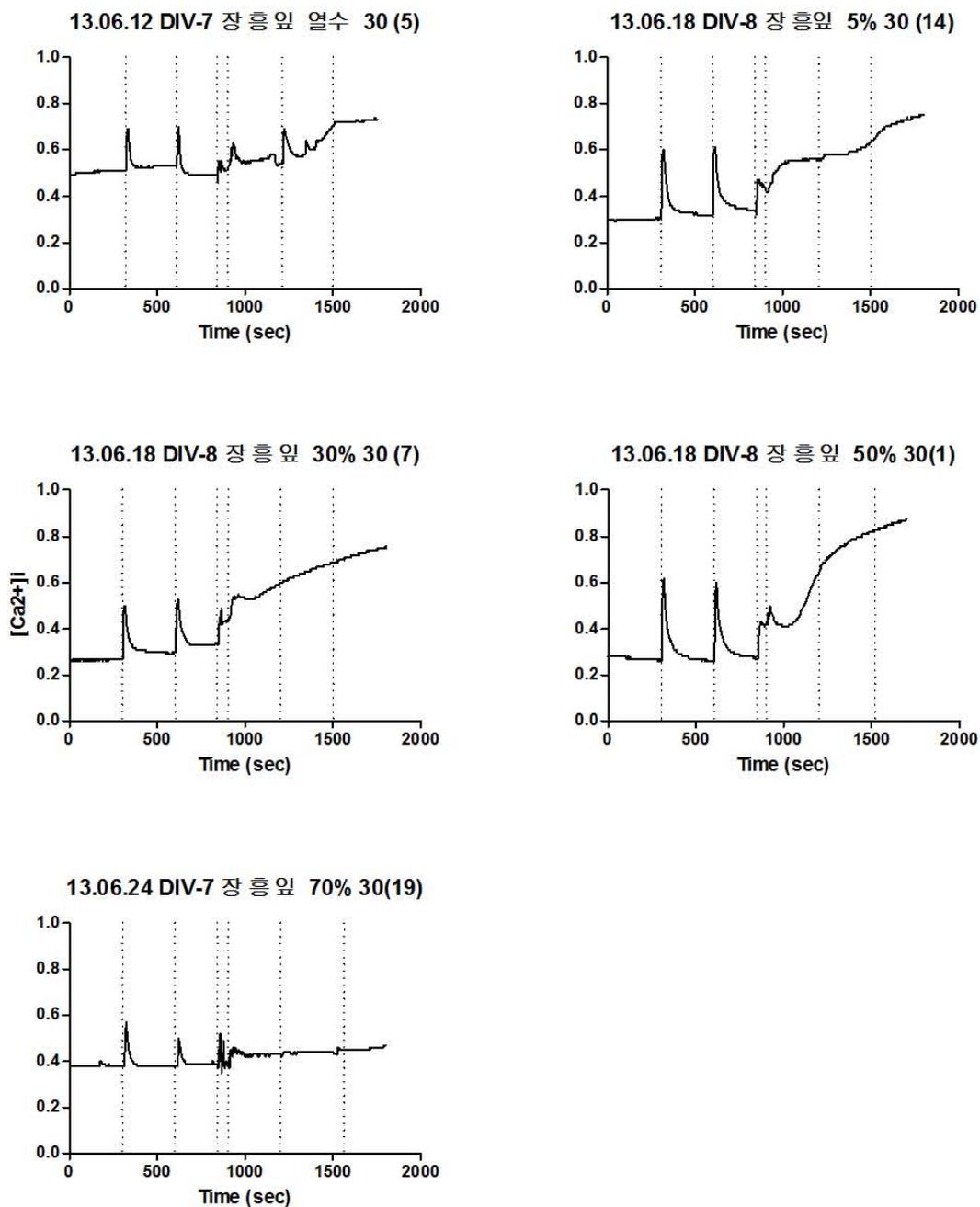


Fig. 6-12 inhibitory effects of extracts from *Hippophae rhamnoides* against NMDA-induced  $\text{Ca}^{2+}$  influx on primary hippocampal neuron cells (Jang-heung, leaves).

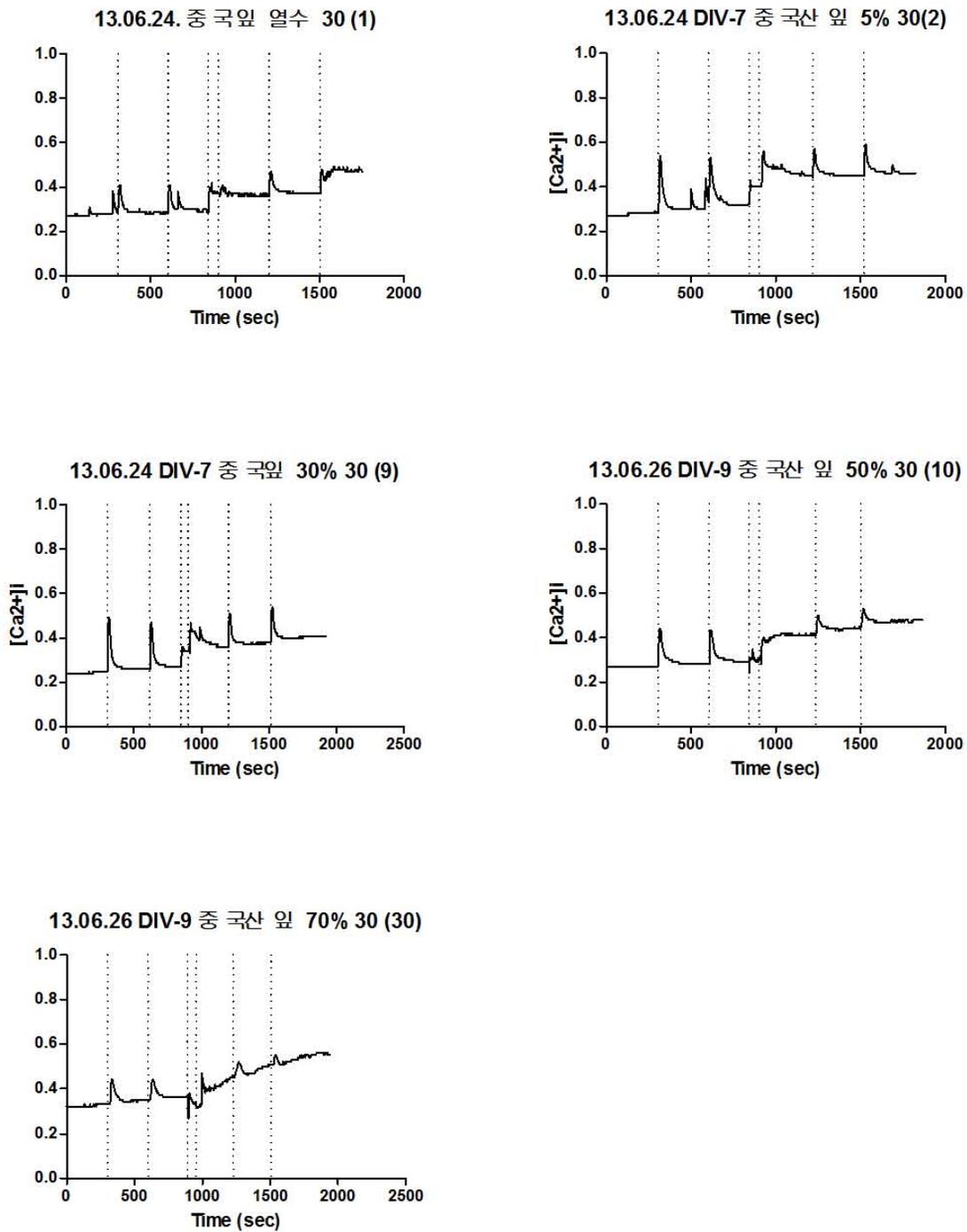


Fig. 6-13 inhibitory effects of extracts from *Hippophae rhamnoides* against NMDA-induced  $Ca^{2+}$  influx on primary hippocampal neuron cells.

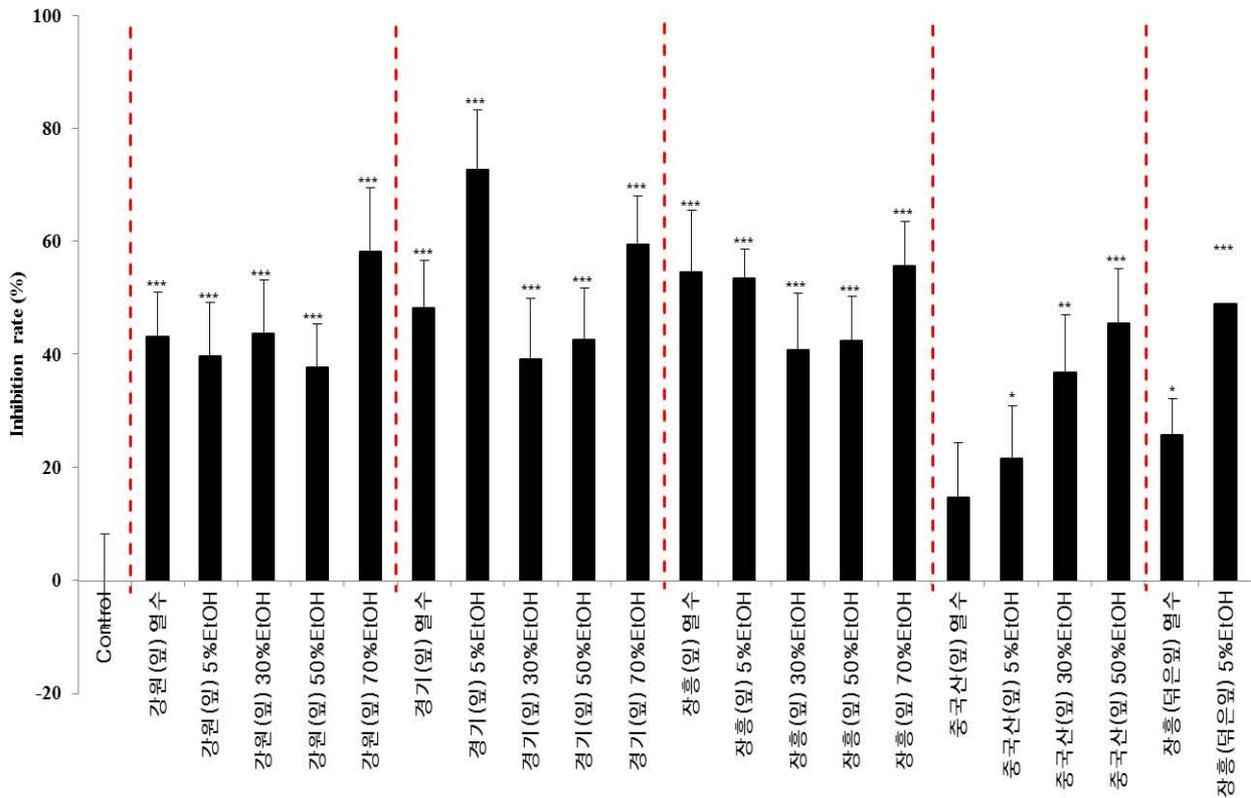


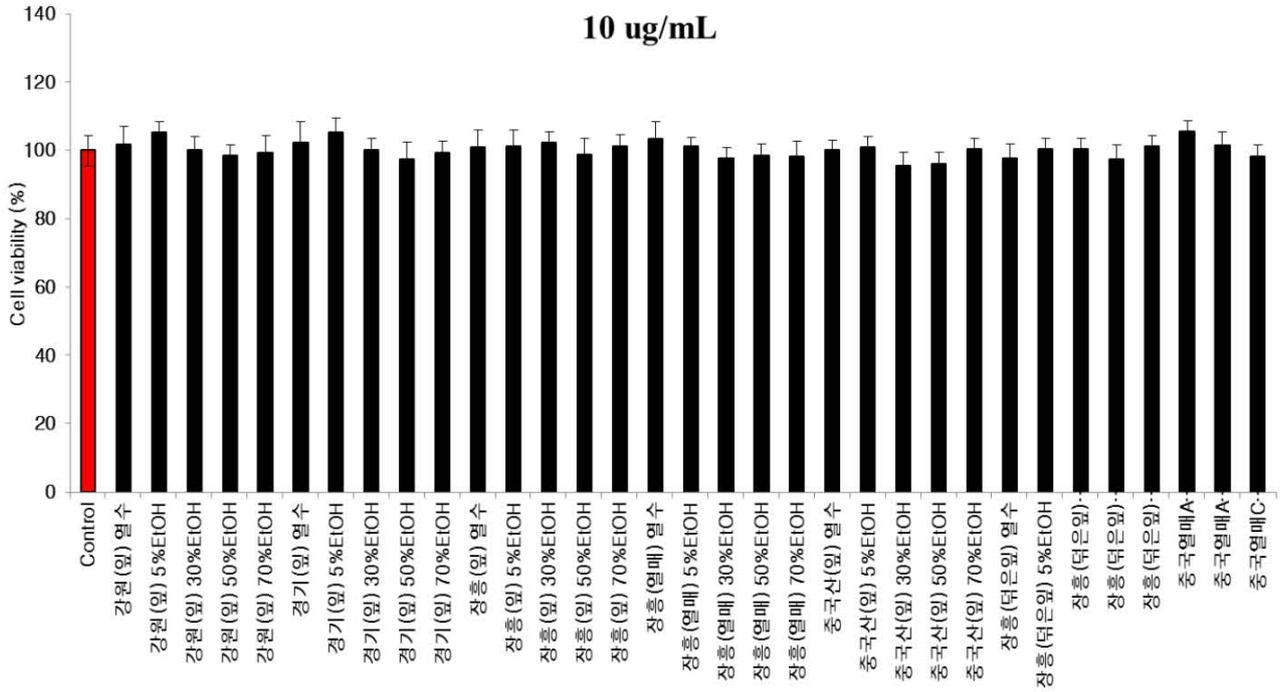
Fig. 6-14 inhibitory effects of extracts from *Hippophae rhamnoides* against NMDA-induced  $Ca^{2+}$  influx on primary hippocampal neuron cells. The columns represent mean  $\pm$  SD, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs the Control group.

(라) 뇌신경세포 heme oxygenase-1 활성 조절 *in vitro* 모델에서의 비타민나무의 보호효과 비교 및 탐색

① 비타민나무의 부위, 지역, 용매별 추출물의 사용 세포주의 최대안전범위 설정

- 사용 세포주는 Primary culture - cortex neuron cell로서 각 시료의 농도를 10, 30, 100, 그리고 300 ug/mL로 설정하여 세포독성 실험을 수행 하였으며, 모든 시료에서 10, 50, 100 ug/ml 농도에서는 control (0 ug/mL)군과 비교하여 유의적인 차이가 발견되지 않았다. 하지만 300 ug/mL 농도에서부터 control (0 ug/mL)군과 비교하여 강원(잎) 70% 에탄올 추출물, 경기(잎) 열수, 30% 에탄올 추출물, 전남 장흥(열매) 30% 에탄올 추출물, 전남 장흥(떡은잎) 열수 추출물을 제외하고 모든 실험군에서 control군과 비교하여 유의적으로 세포 생존도가 감소하는 것을 확인 하였다 (Fig. 6-15, 6-16).

A)



B)

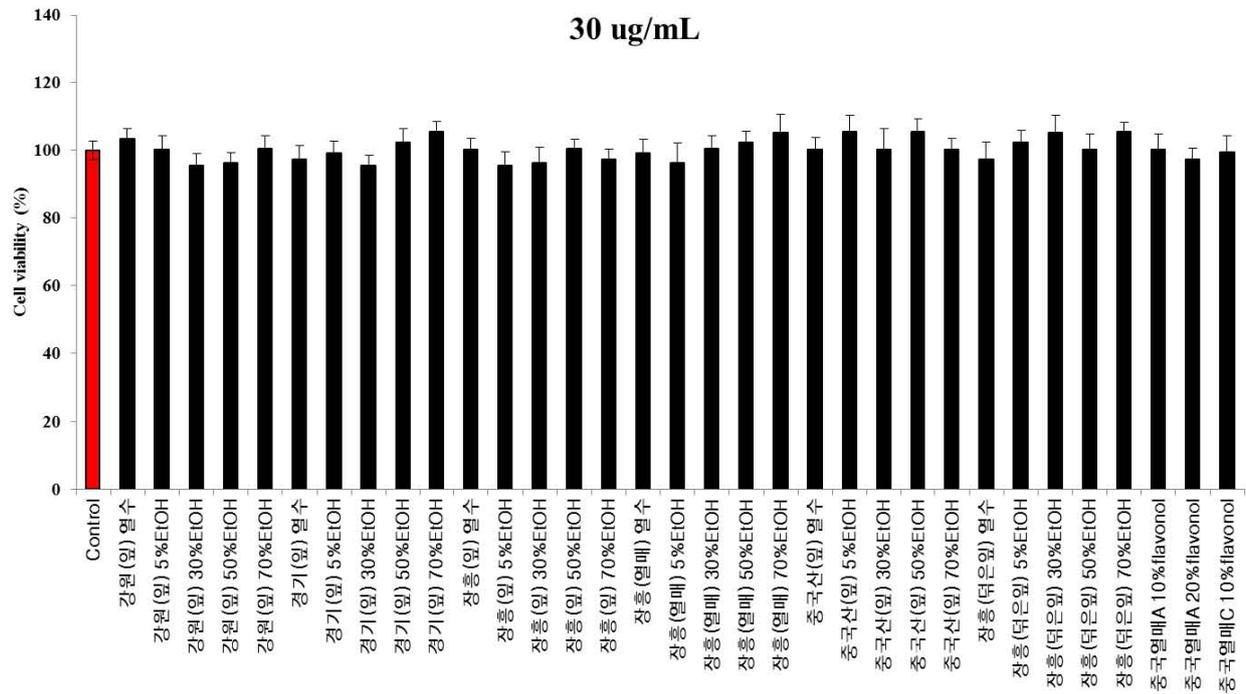
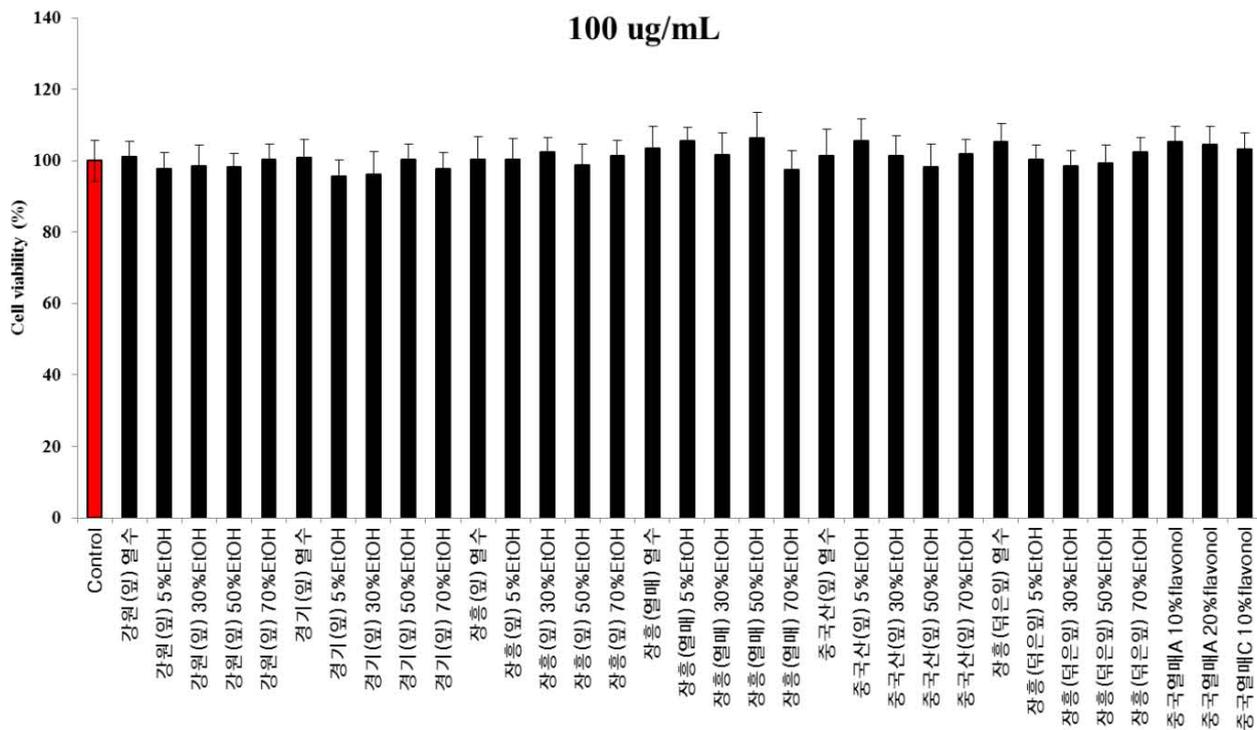


Fig. 6-15. Cytotoxicity of extracts from *Hippophae rhamnoides* on primary cortex neuron cells. (10, 30 ug/ml). The columns represent mean  $\pm$  SD, \*  $p < 0.05$  vs the Control group.

A)



B)

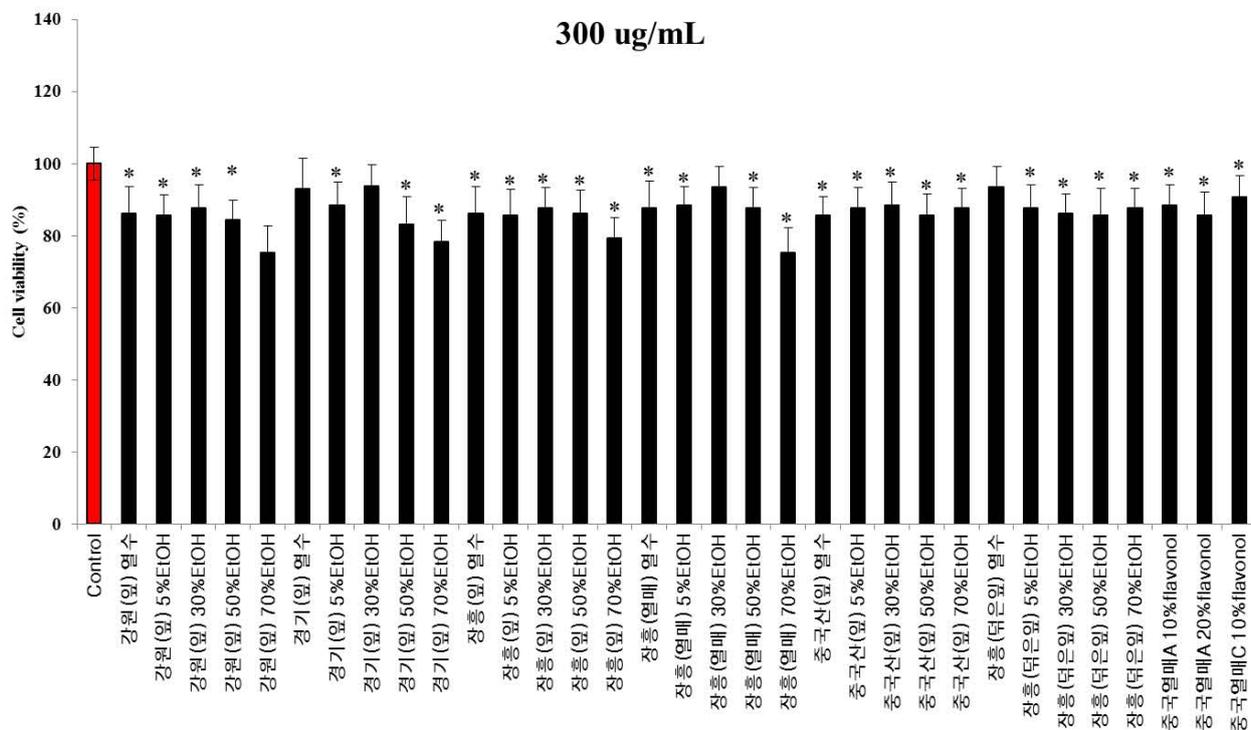


Fig. 6-16. Cytotoxicity of extracts from *Hippophae rhamnoides* on primary cortex neuron cells. (100, 300 ug/ml). The columns represent mean  $\pm$  SD, \*  $p < 0.05$  vs the Control group.

② 뇌신경세포 heme oxygenase-1 활성 조절 *in vitro* 모델에서의 비타민나무의 보호효과 비교 및 탐색

- 실험에 앞서 설정한 최대 안전범위인 100 ug/mL 농도 이내에서 설정한 30 ug/mL 농도에서 본 실험을 수행 하였다. Fig. 6-17에서와 같이, CuSO4를 처리하자 HO-1 활성이 무처리군인 control군에 비해 유의적으로 33.45% 증가함을 확인 하였다. 하지만 강원(잎) 열수, 5% 에탄올 추출물과 경기(잎) 열수, 5, 30% 에탄올 추출물, 그리고 중국산 (잎) 열수 추출물과 중국산(잎) 5% 에탄올 추출물에서 각각, 80.45 ± 3.14%, 84.34 ± 3.48%, 80.45 ± 3.51%, 83.21 ± 4.52%, 86.35 ± 3.12%, 88.43 ± 3.11%로 HO-1 활성이 유의적으로 감소하였다 (P<0.001). 그리고, 경기(잎) 50% 에탄올 추출물과 전남 장흥(잎) 열수, 5, 30%에탄올 추출물에서 각각, 87.51 ± 3.55%, 87.85 ± 3.94%, 87.95 ± 3.42%, 88.52 ± 3.55%로 HO-1 활성이 감소 하였다 (P<0.01). 강원(잎) 30% 에탄올 추출물 (86.32 ± 3.31%)과 경기(잎) 70% 에탄올 추출물(89.31 ± 4.31%), 전남 장흥(잎) 50% 에탄올 추출물, 전남 장흥(열매) 열수, 5% 에탄올 추출물에서도 HO-1 활성이 유의적으로 감소하였다 (P<0.05).

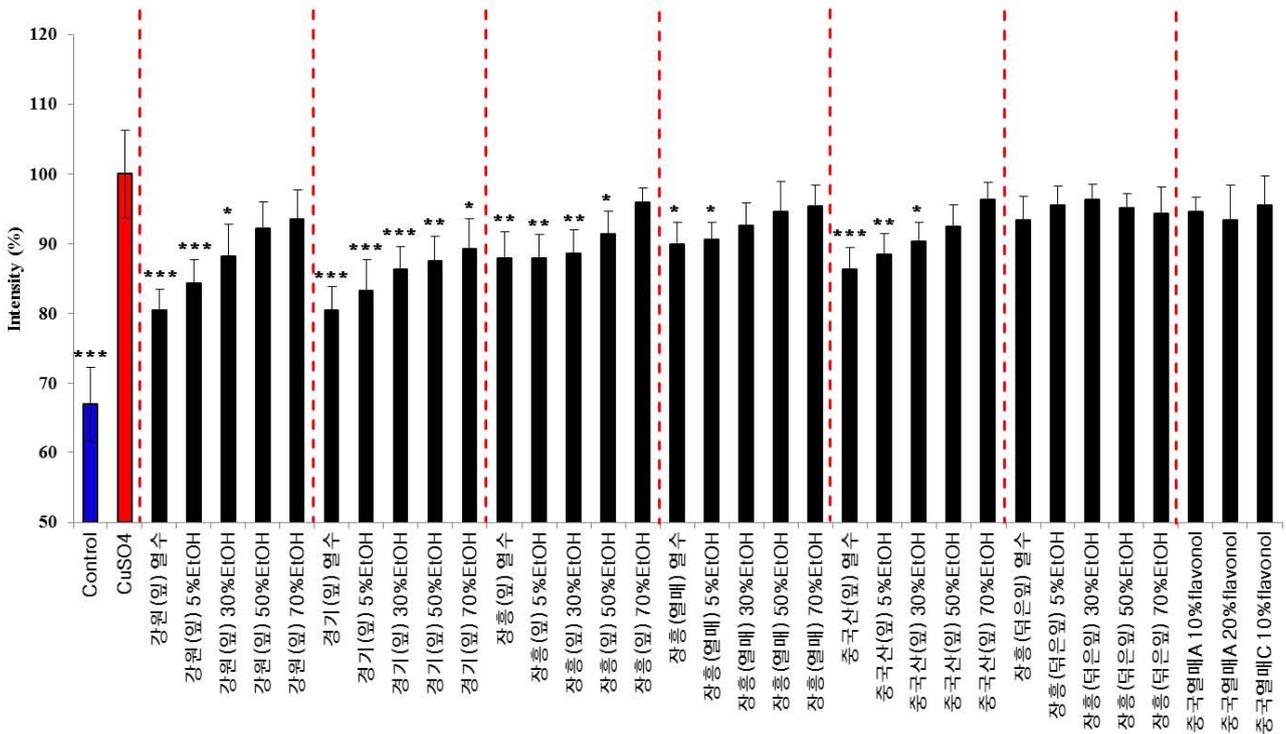


Fig. 6-17 inhibitory effects of extracts from *Hippophae rhamnoides* against CuSO4-induced HO-1 express on primary cortex neuron cells. The columns represent mean ± SD, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs the Control group.

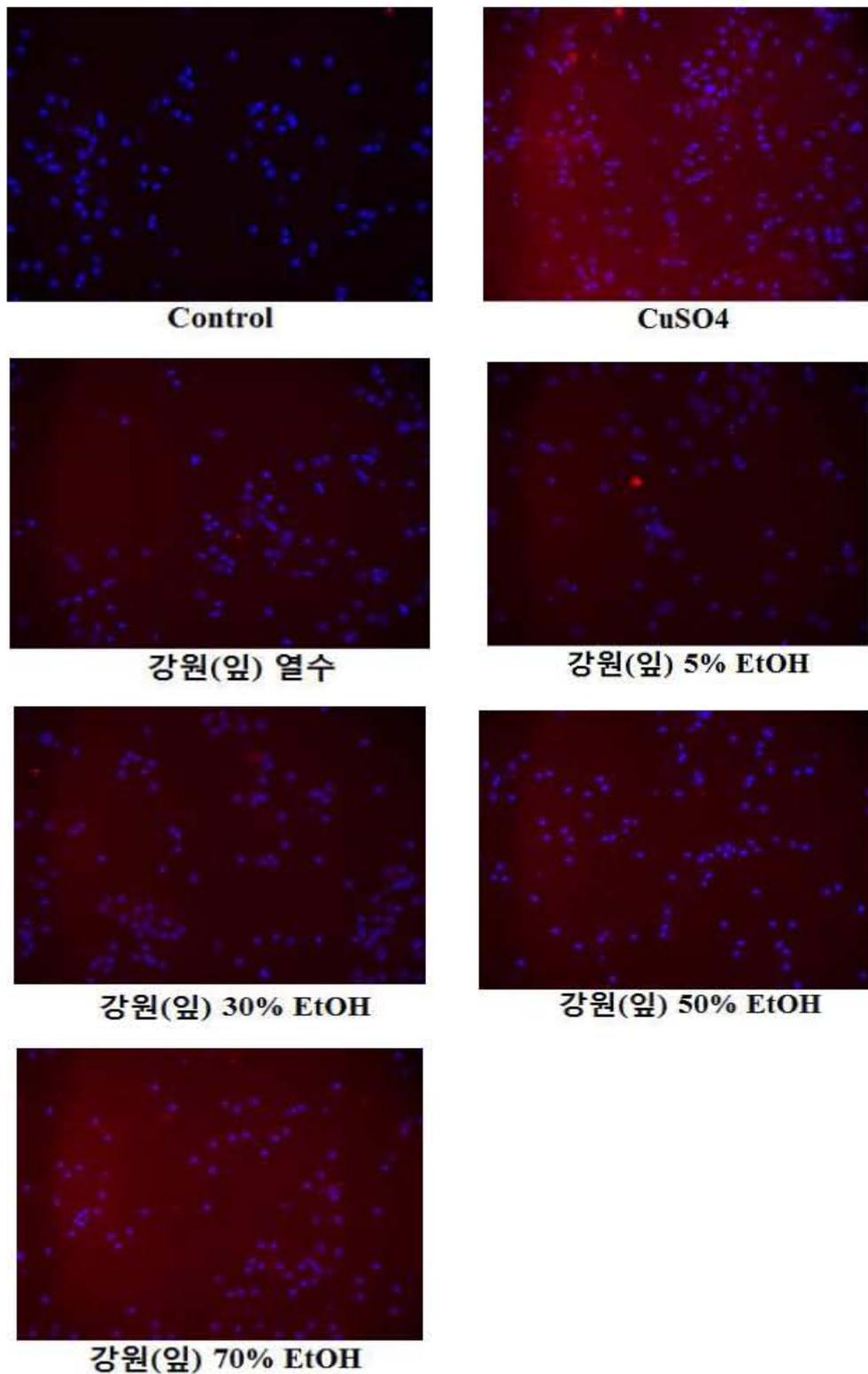


Fig. 6-18. inhibitory effects of extracts from *Hippophae rhamnoides* against CuSO<sub>4</sub>-induced HO-1 express on primary cortex neuron cells (Kang-won leaves). the columns represent mean  $\pm$  SD, \* $p$  < 0.05, \*\* $p$  < 0.01, \*\*\* $p$  < 0.001 vs the Control group.

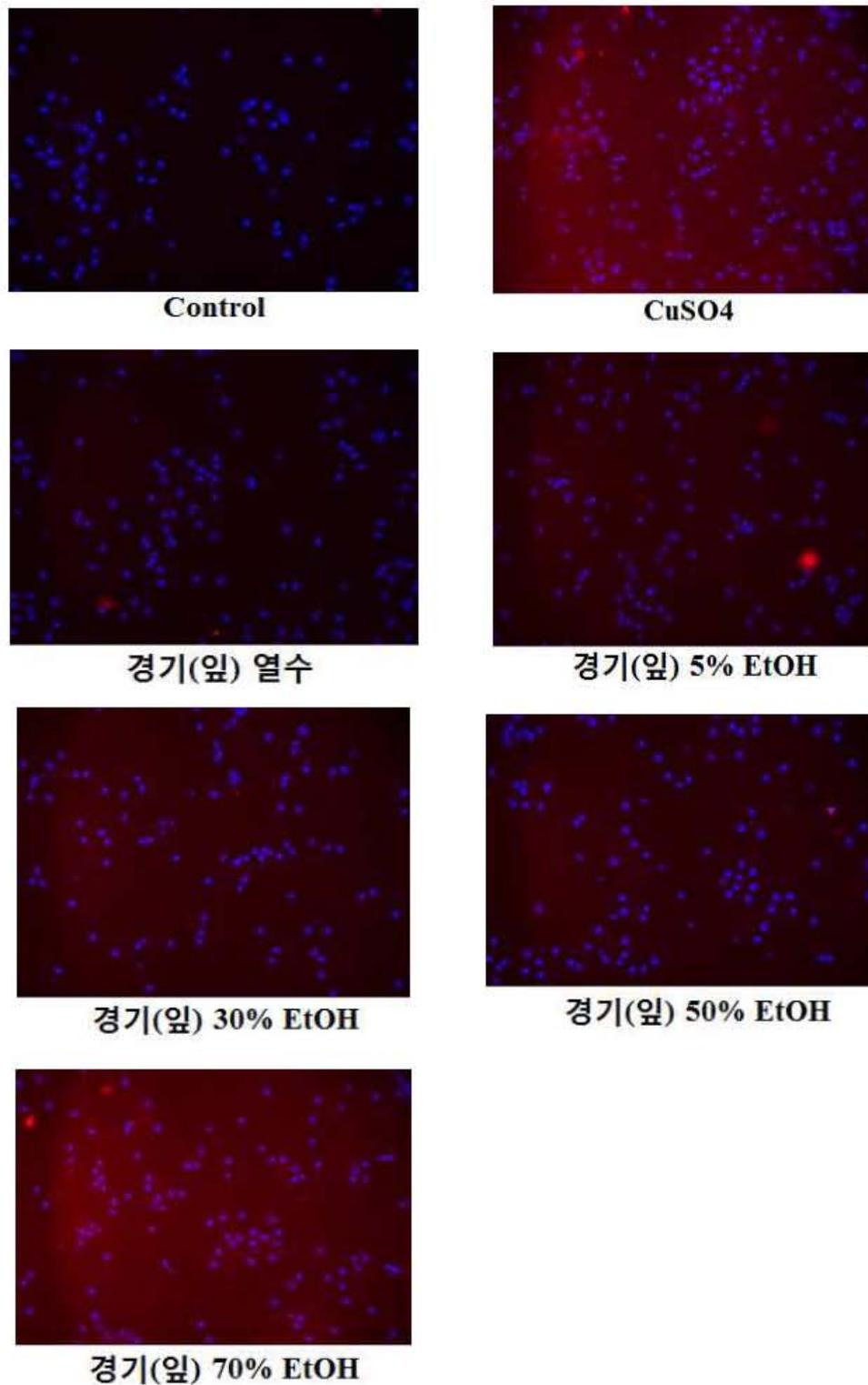


Fig. 6-19. inhibitory effects of extracts from *Hippophae rhamnoides* against CuSO<sub>4</sub>-induced HO-1 express on primary cortex neuron cells (Kyung-Ki leaves). the columns represent mean  $\pm$  SD, \* $p$  < 0.05, \*\* $p$  < 0.01, \*\*\* $p$  < 0.001 vs the Control group.

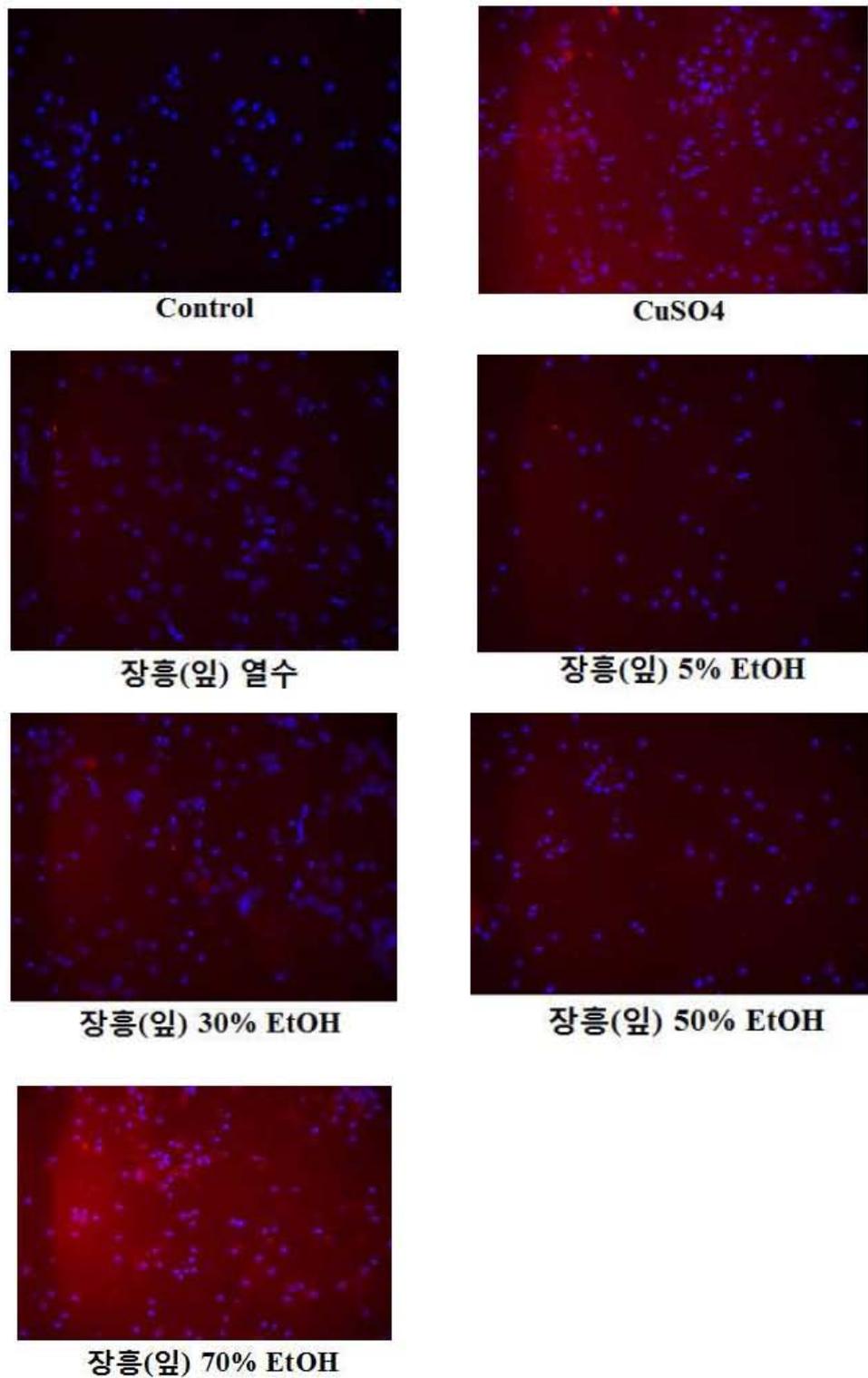


Fig. 6-20. inhibitory effects of extracts from *Hippophae rhamnoides* against CuSO<sub>4</sub>-induced HO-1 express on primary cortex neuron cells (Jang-heung leaves). the columns represent mean  $\pm$  SD, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs the Control group.

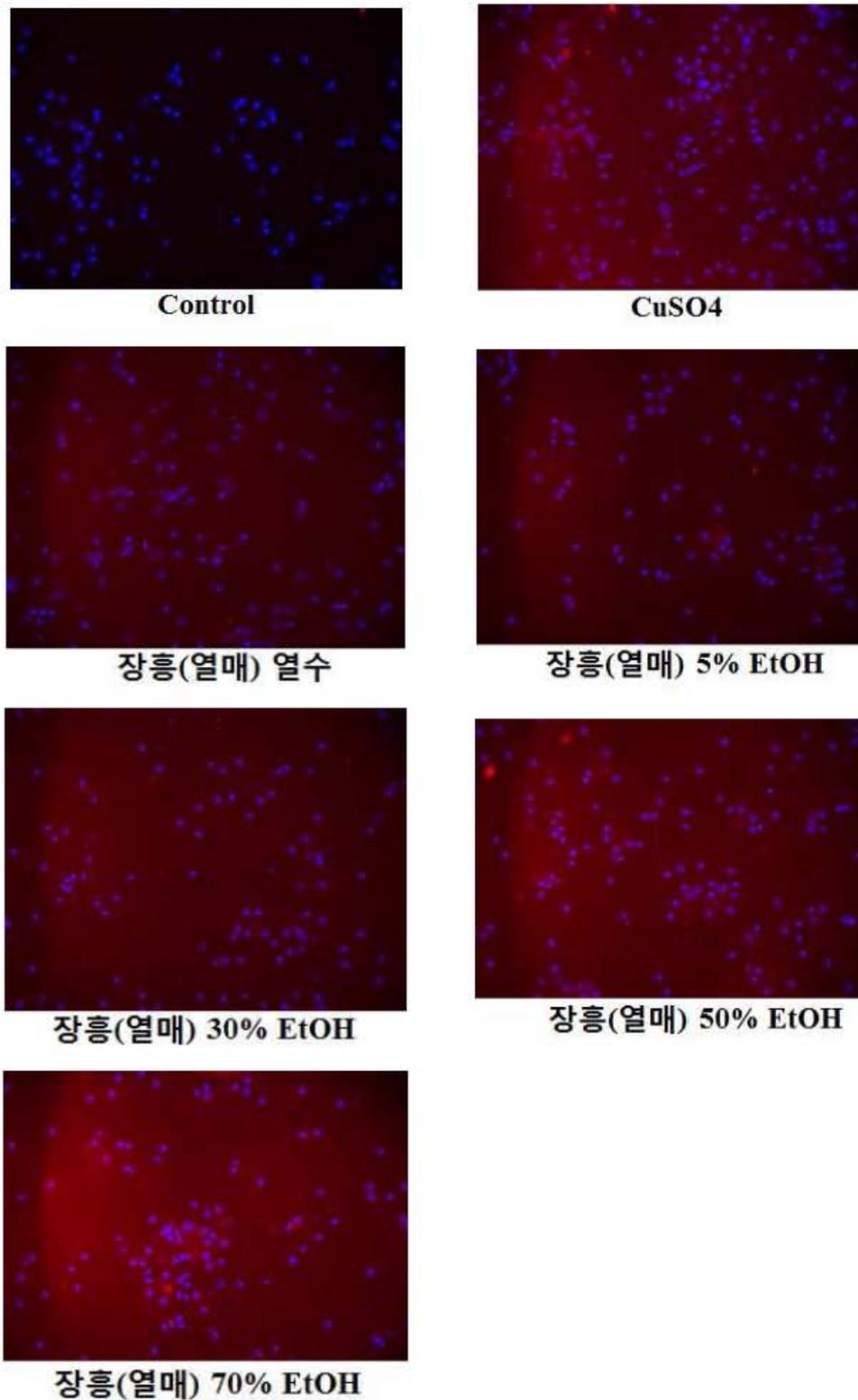


Fig. 6-21. inhibitory effects of extracts from *Hippophae rhamnoides* against CuSO<sub>4</sub>-induced HO-1 express on primary cortex neuron cells (Jang-heung fruits). the columns represent mean  $\pm$  SD, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs the Control group.

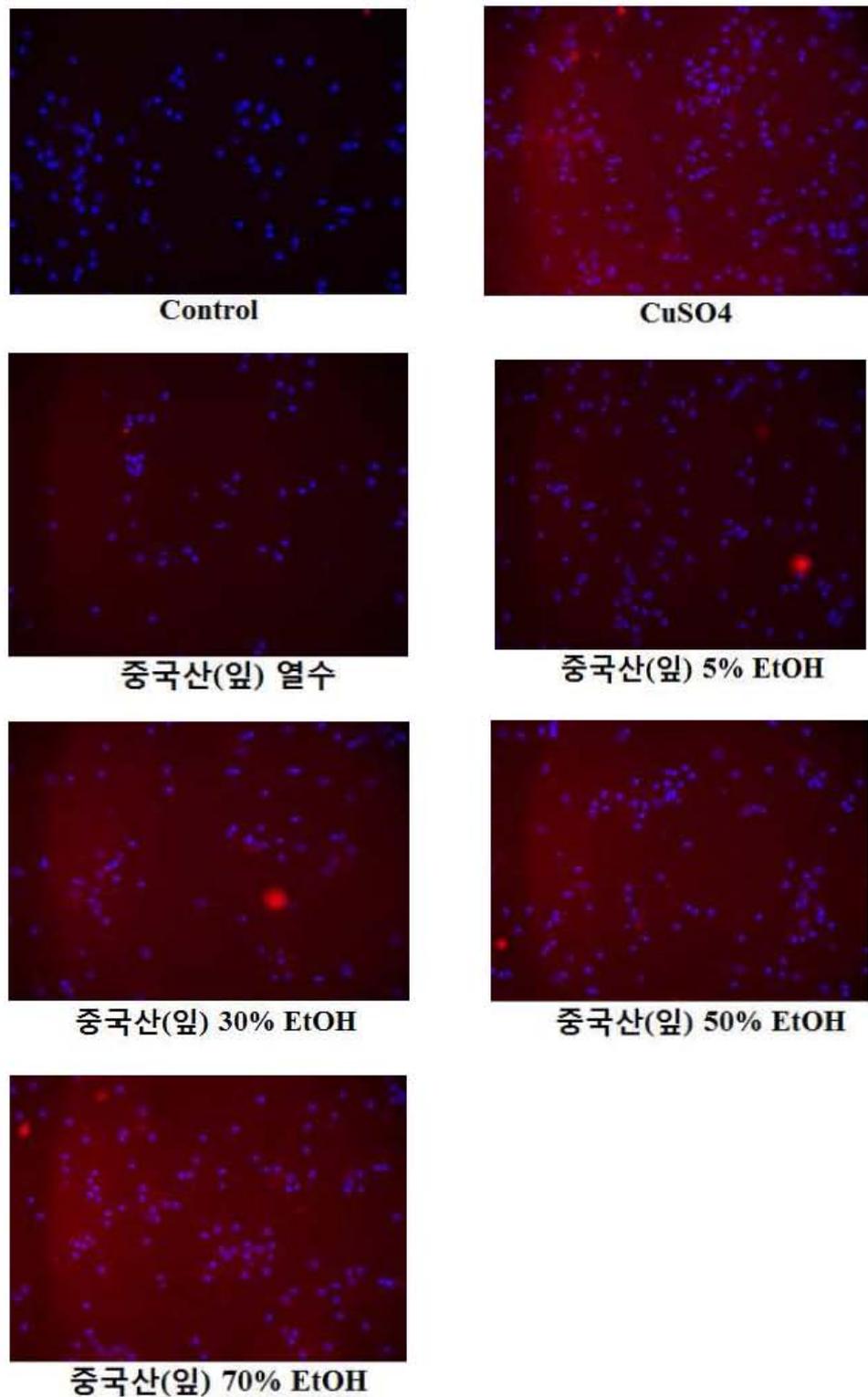


Fig. 6-22. inhibitory effects of extracts from *Hippophae rhamnoides* against CuSO<sub>4</sub>-induced HO-1 express on primary cortex neuron cells (China, leaves). the columns represent mean  $\pm$  SD, \* $p$  < 0.05, \*\* $p$  < 0.01, \*\*\* $p$  < 0.001 vs the Control group.

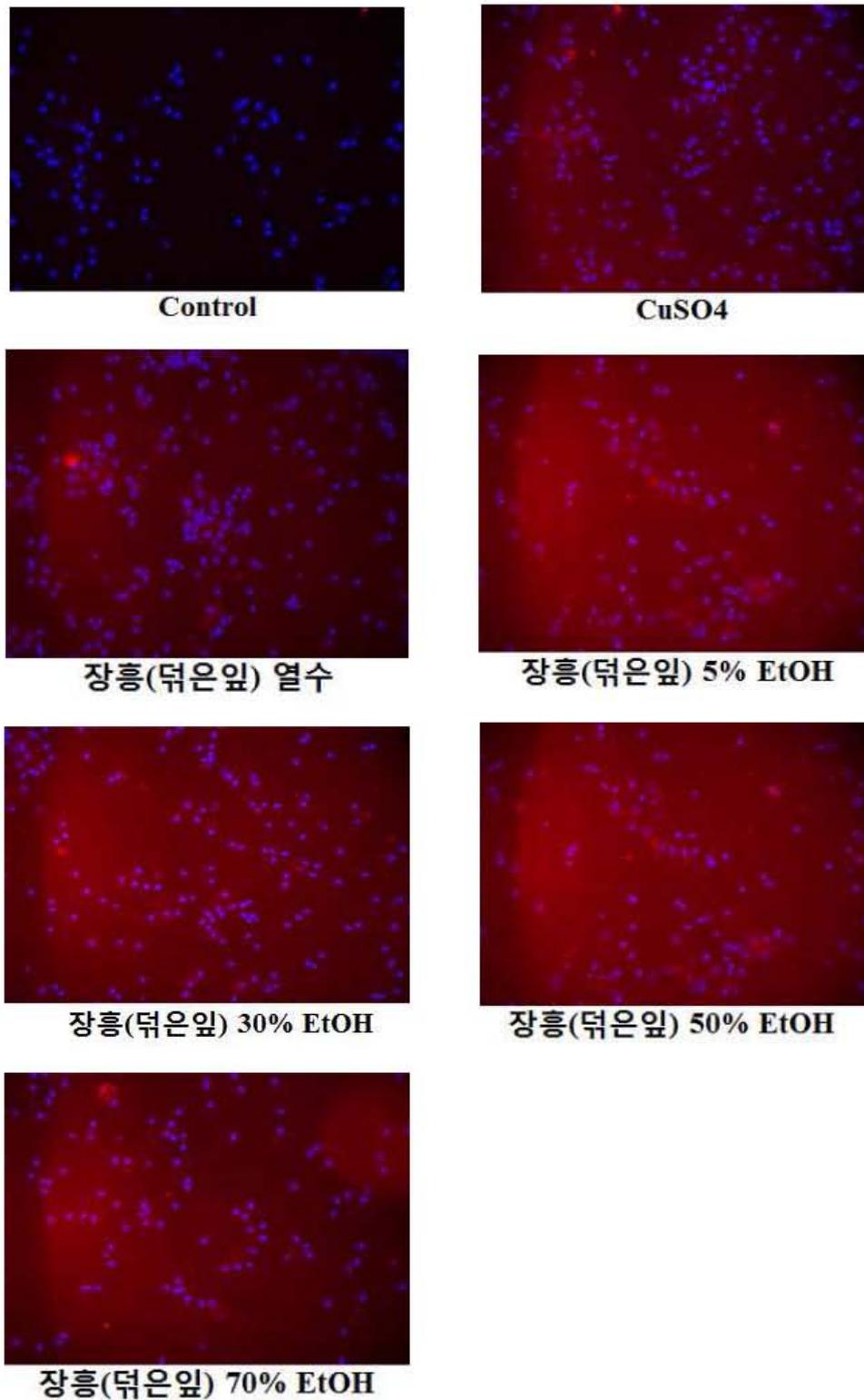


Fig. 6-23. inhibitory effects of extracts from *Hippophae rhamnoides* against CuSO<sub>4</sub>-induced HO-1 express on primary cortex neuron cells (Jang-heung, heated leaves). the columns represent mean  $\pm$  SD, \* $p$  < 0.05, \*\* $p$  < 0.01, \*\*\* $p$  < 0.001 vs the Control group.

## 나. 비타민나무(잎) 열수 추출물의 SD-rat을 이용한 독성평가

### (1) 실험방법

#### (가) 비타민나무(잎) 열수 추출물의 SD-rat을 이용한 단회 투여 독성평가

##### ① 시료

- SD rat을 이용한 단회투여 및 반복투여 독성평가를 위해 비타민나무 잎(강원) 열수추출물을 사용하였다. 이는 강원(잎)의 생리활성이 in vitro screening에서 비교적 높게 측정되었으며 통상적으로 같은 품종의 동일한 시료로서 생리활성이 강할수록 독성 또한 높게 나타나는 경우가 많은 것으로 알려져 있어 지역별 소재 중 in vitro 결과가 가장 높게 나타난 강원(잎) 추출분말을 시료로 사용하였다. 기능성의 경우 지역별 편차를 확인하기 위하여 지역별 또는 국가별 효능평가를 실시하고 있으나, 안전성(독성)의 경우 식품 및 건강기능식품에서의 경우 학명으로 관리하고 있어 지역별 편차를 확인하는 것은 예상 등의 문제로 어려움이 있어, 비타민나무 잎의 독성실험은 강원 잎 추출물을 사용하여 실시하였다.

##### ② 실험동물

- 6주령의 SD-rat (male)을 구입한 후 6일 동안 동물사육실의 환경 하에서 검역 및 순화시키면서 일반 건강상태를 관찰한 후, 건강한 개체를 선별하여 시험에 사용하였다. 개체 식별은 유성매직을 이용하여 각 개체번호 꼬리에 표시하며, 사육상자는 시험번호, 시험물질명, 시험항목, 입수일, 순화기간, 군분리일, 시험기간, 성/동물번호 및 시험책임자를 기재한 개체식별카드를 부착하여 식별하였다. 순화기간 중 이상이 발생한 개체와 정상적으로 체중이 증가하지 않은 개체를 제외한 후, 각 군간 평균체중 및 표준편차가 균일하도록 군분리를 실시하였다.

##### ③ 사육환경

- 본 시험의 환경은 온도 ( $22 \pm 3$ ) °C, 상대습도 ( $50 \pm 20$ ) %, 환기횟수 (10 ~ 15) 회/시간, 조명주기 12시간 (8:00 ~ 20:00), 조도 (150 ~ 300) Lux의 사육환경으로 설정된 동물사육실에서 사료와 음용수를 급여하여 사육하며, 순화 및 시험기간 동안 격리 사육을 실시하였다.

##### ④ 시험군의 구성

Group	시험물질	Dose (mg/kg B.W.)	Sex	No. of animal
Control	Saline	0	Male	1001~1005
500	비타민나무(잎) 열수 추출물	500	Male	2001~2005
1000	비타민나무(잎) 열수 추출물	1000	Male	3001~3005
2000	비타민나무(잎) 열수 추출물	2000	Male	4001~4005

⑤ 시험물질 투여

- 순화 및 군분리 후 시험물질을 시험기간 동안 각 농도별로 단회 경구투여 하였으며 투여 후, 14일 동안 개체의 상태를 관찰하였다.

⑥ 일반증상 관찰

- 전 개체에 대하여 매일 1회 이상, 투여후 14일 동안 일반증상관찰을 실시하였다.

⑦ 체중변화

- 체중은 입수시, 군분리시, 시험물질투여 후 14일 동안 4일에 1회 측정하였다.

⑧ 변 상태 변화 확인

- 변은 시험물질 투여 중 계속 관찰 하였으며, 이상 유무를 확인하였다.

⑨ 조직의 외관 상태와 무게 변화

- 조직의 무게는 해부 후 간과 비장, 신장의 무게를 측정하였다.

⑩ 혈청에서의 AST 및 ALT 측정

- 해부 후, 혈청에서의 AST 및 ALT 값을 생화학분석기 (DRI-CHEM 4000i, Fuji, Japan)를 이용하여 측정하였다.

⑪ 통계처리

- 본 시험에서는 체중데이터에 대한 분산의 동질성을 비교하기 위하여 SPSS 통계프로그램(ver 10.1)을 이용하여 F 검정을 실시하였고, 분산의 동질성이 인정되어 student t test 를 실시하였다.

(나) 비타민 나무(잎) 열수 추출물의 SD-rat을 이용한 14일 반복 투여 독성 평가

① 실험동물

- 6주령의 SD-rat (male)을 구입한 후 6일 동안 동물사육실의 환경 하에서 검역 및 순화시키면서 일반 건강상태를 관찰한 후, 건강한 개체를 선별하여 시험에 사용하였다. 개체 식별은 유성매직을 이용하여 각 개체번호 꼬리에 표시하며, 사육상자는 시험번호, 시험물질명, 시험항목, 입수일, 순화기간, 군분리일, 시험기간, 성/동물번호 및 시험책임자를 기재한 개체식별카드를 부착하여 식별하였다. 순화기간 중 이상이 발생한 개체와 정상적으로 체중이 증가하지 않은 개체를 제외한 후, 각 군간 평균체중 및 표준편차가 균일하도록 군분리를 실시하였다.

② 사육환경

- 본 시험의 환경은 온도 (22 ± 3) °C, 상대습도 (50 ± 20) %, 환기횟수 (10 ~ 15) 회/시간, 조명주기 12시간 (8:00 ~ 20:00), 조도 (150 ~ 300) Lux의 사육환경으로 설정된 동물사육실에서 사료와 음용수를 급여하여 사육하며, 순화 및 시험기간 동안 격리 사육을 실시하였다.

③ 시험군의 구성

Group	시험물질	Dose (mg/kg B.W.)	Sex	No. of animal
Control	Saline	0	Male	1001~1005
200	비타민나무(잎) 열수 추출물	200	Male	2001~2005
500	비타민나무(잎) 열수 추출물	500	Male	3001~3005

③ 시험물질 투여

- 순화 및 군분리 후 시험물질을 시험기간 동안 각 농도별로 14일 동안 1일, 1회 투여 하였다.

④ 일반증상 관찰

- 전 개체에 대하여 매일 1회 이상, 투여후 14일 동안 일반증상관찰을 실시하였다.

⑤ 체중변화

- 체중은 입수시, 군분리시, 시험물질투여 후 14일 동안 4일에 1회 측정하였다.

⑥ 변 상태 변화 확인

- 변은 시험물질 투여 중 계속 관찰 하였으며, 이상 유무를 확인하였다.

⑦ 조직의 외관 상태와 무게 변화

- 조직의 무게는 해부 후 간과 비장, 신장의 무게를 측정하였다.

⑧ 혈청에서의 AST 및 ALT 측정

- 해부 후, 혈청에서의 AST 및 ALT 값을 생화학분석기 (DRI-CHEM 4000i, Fuji, Japan)를 이용하여 측정하였다.

⑨ 통계처리

- 본 시험에서는 체중데이터에 대한 분산의 동질성을 비교하기 위하여 SPSS 통계프로그램(ver 10.1)을 이용하여 F 검정을 실시하였고, 분산의 동질성이 인정되어 student t test를 실시하였다.

## (2) 실험결과

### (가) 비타민 나무(잎) 열수 추출물의 SD-rat을 이용한 단회 투여 독성 평가

#### ① 사망률 및 일반 증상

- 시험 기간 동안 시험물질 투여에 따른 이상증상이나 이상행동을 관찰한 결과, 투여와 관련된 행동적 이상 및 사망한 개체는 없었다.

#### ② 체중변화

- 시험 기간 동안 각 시험군 간의 체중증가량을 무처리군(control) 과의 유의검정을 실시 해 본 결과, 각 군과 control군과의 체중 증가량에 대한 유의적 차이는 없었다 (Table 6-1).

#### ③ 변 상대 변화

- 시험 기간 동안 실험동물의 변의 상태를 무처리군(control)과 비교 관찰한 결과, 시험 기간 동안 모두 정상 변을 배설하였다.

#### ④ 조직의 외관 상태와 무게 변화

- 해부 후 모든 군의 간과 비장 및 신장을 적출하여 무게를 측정하였다. 무처리군(control)과 비교하여 유의검정을 실시하여 무게의 차이를 비교한 결과, 시료군의 모든 장기 무게에서 유의적 차이를 확인할 수 없었다. 그리고 전 개체에서 외관상의 이상 소견은 관찰 할 수 없었다 (Table 6-2, Fig. 6-24, 6-25, 6-26).

#### ⑤ 혈청 AST 및 ALT 측정

- 해부 후 혈액에서 혈청을 분리하여 AST 및 ALT값을 측정하였다. 무처리군(control)과 비교하여 시료군 모두 유의적 차이는 없었다 (Fig. 6-27, 6-28).

### (나) 비타민 나무(잎) 열수 추출물의 SD-rat을 이용한 14일 반복 투여 독성 평가

#### ① 사망률 및 일반 증상

- 시험 기간 동안 시험물질 투여에 따른 이상증상이나 이상행동을 관찰한 결과, 투여와 관련된 행동적 이상 및 사망한 개체는 없었다.

#### ② 체중변화

- 시험 기간 동안 각 시험군 간의 체중증가량을 무처리군(control) 과의 유의검정을 실시 해 본 결과, 각 군과 control군과의 체중 증가량에 대한 유의적 차이는 없었다 (Table 6-3).

#### ③ 변 상대 변화

- 시험 기간 동안 실험동물의 변의 상태를 무처리군(control)과 비교 관찰한 결과, 시험 기간 동안 모두 정상 변을 배설하였다.

#### ④ 조직의 외관 상태와 무게 변화

- 해부 후 모든 군의 간과 비장 및 신장을 적출하여 무게를 측정하였다. 무처리군(control)과 비교하여 유의검정을 실시하여 무게의 차이를 비교한 결과, 시료군의 모든 장기 무게에서 유의적 차이를 확인할 수 없었다. 그리고 전 개체에서 외관상의 이상 소견은 관찰 할 수 없었다 (Table 6-4, Fig. 6-29, 6-30, 6-31).

#### ⑤ 혈청 AST 및 ALT 측정

- 해부 후 혈액에서 혈청을 분리하여 AST 및 ALT값을 측정하였다. 무처리군(control)과 비교하여 시료군 모두 유의적 차이는 없었다 (Fig. 6-32, 6-33).

Table 6–1. Body weight in rats treated orally extracts from *Hippophae rhamnoides*

group	individual	Body weights (g)				Survival rate (%)
		1 day	5 day	9 day	14 day	
<b>Cont</b>	1001	302.65	315.48	330.34	341.36	100
	1002	320.75	338.04	365.25	388.24	
	1003	317.03	325.42	346.23	364.44	
	1004	300.78	318.41	332.53	348.20	
	1005	313.33	333.14	359.08	373.19	
	aver	310.91	326.10	346.69	363.09	
	SD	8.82	9.55	15.54	18.91	
<b>500</b>	2001	302.76	310.69	330.45	355.84	100
	2002	321.08	338.37	365.58	388.57	
	2003	322.80	331.19	352.00	370.21	
	2004	300.67	309.21	332.42	348.09	
	2005	313.20	333.01	358.95	373.06	
	aver	312.10	324.49	347.88	367.15	
	SD	10.18	13.55	15.78	15.77	
<b>1000</b>	3001	314.46	323.17	354.03	370.53	100
	3002	327.01	343.29	360.48	373.78	
	3003	308.30	317.33	336.64	349.67	
	3004	309.82	320.34	339.59	356.67	
	3005	294.13	305.18	310.78	318.53	
	aver	310.74	321.86	340.30	353.84	
	SD	11.85	13.80	19.24	22.07	
<b>2000</b>	4001	312.60	329.69	342.65	355.96	100
	4002	311.42	321.25	329.48	351.48	
	4003	308.19	323.12	317.53	342.10	
	4004	315.46	312.70	338.94	342.30	
	4005	298.37	332.85	345.52	323.42	
	aver	309.21	323.922	332.15	347.96	
	SD	6.60	9.85	11.21	6.90	

The values shown are the mean latency  $\pm$  S.D; \*  $P < 0.05$ , significantly different from the Control–group, #  $P < 0.05$ , Statistical significance was tested with the unpaired Student's  $t$ -test.

Table 6–2. Tissues weight in rats treated orally extracts from *Hippophae rhamnoides*

group	individual	Tissue weights (g/100g)		
		Liver	Spleen	Kidney
Cont	1001	3.63	0.21	0.77
	1002	3.71	0.27	0.80
	1003	3.92	0.23	0.75
	1004	3.58	0.25	0.74
	1005	4.08	0.26	0.73
	aver	3.79	0.25	0.76
	SD	0.21	0.03	0.03
500	2001	3.60	0.17	0.74
	2002	3.68	0.24	0.80
	2003	4.10	0.20	0.74
	2004	3.55	0.22	0.74
	2005	4.05	0.23	0.73
	aver	3.80	0.21	0.75
	SD	0.26	0.03	0.03
1000	3001	3.68	0.20	0.75
	3002	3.86	0.28	0.68
	3003	3.99	0.22	0.70
	3004	3.88	0.20	0.75
	3005	3.77	0.22	0.67
	aver	3.84	0.23	0.71
	SD	0.12	0.03	0.04
2000	4001	3.90	0.26	0.78
	4002	3.91	0.21	0.74
	4003	3.90	0.28	0.73
	4004	4.18	0.28	0.80
	4005	3.95	0.27	0.76
	aver	3.97	0.26	0.76
	SD	0.14	0.04	0.03

The values shown are the mean latency  $\pm$  S.D; \*  $P < 0.05$ , significantly different from the Control–group. #  $P < 0.05$ , Statistical significance was tested with the unpaired Student's  $t$ -test.

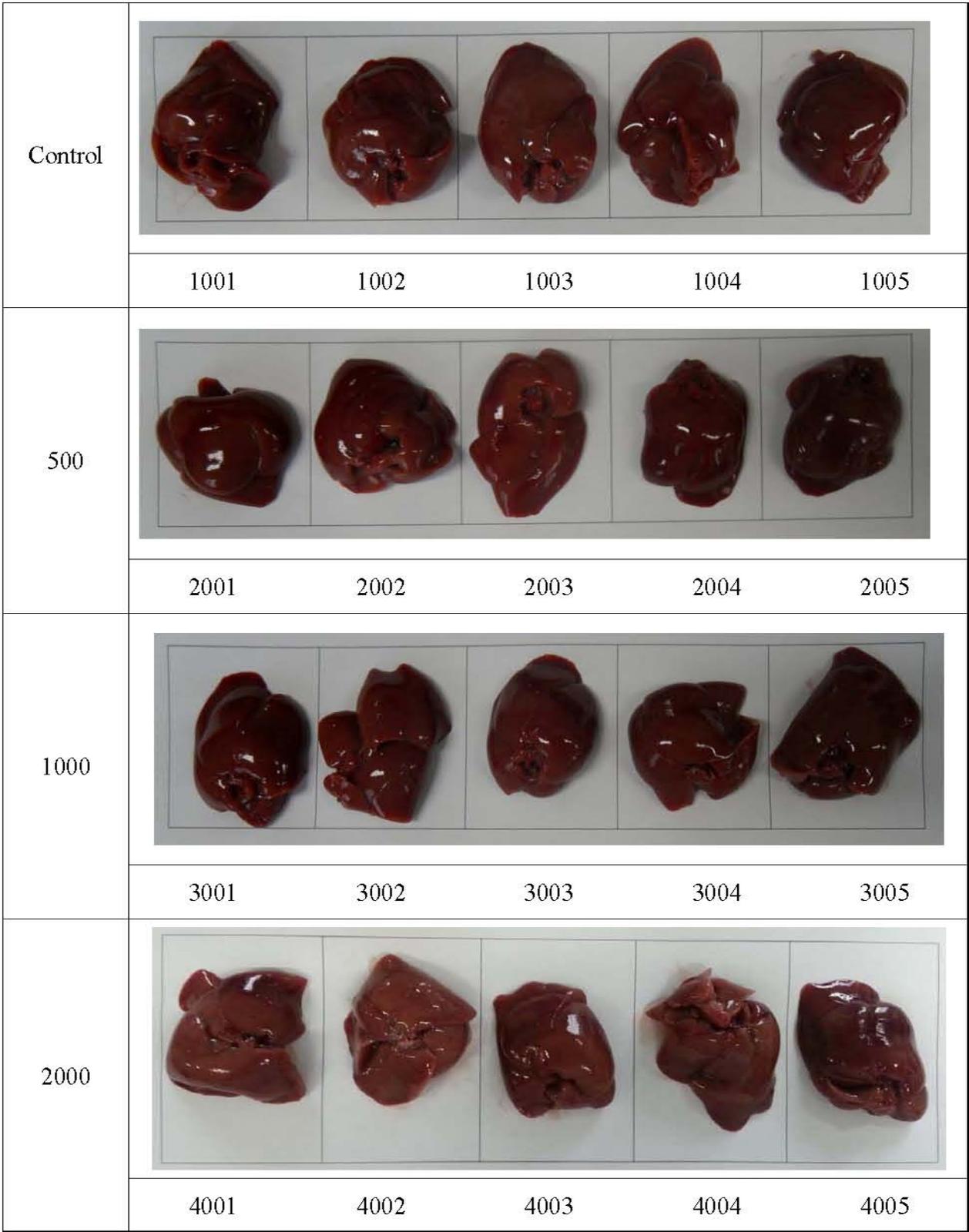


Fig. 6-24. Appearance of liver in rats treated orally extracts from *Hippophae rhamnoides*

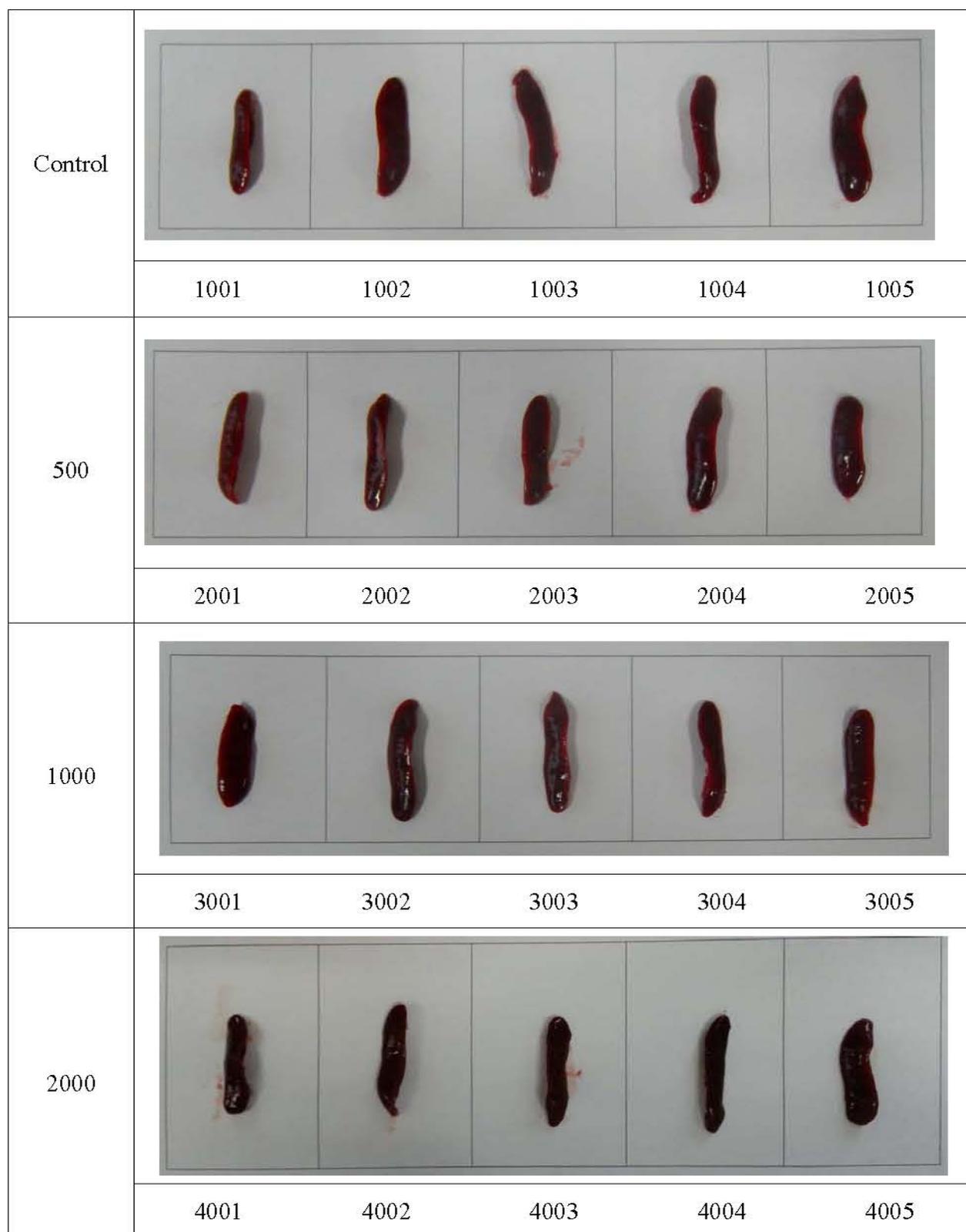


Fig. 6-25. Appearance of spleen in rats treated orally extracts from *Hippophae rhamnoides*

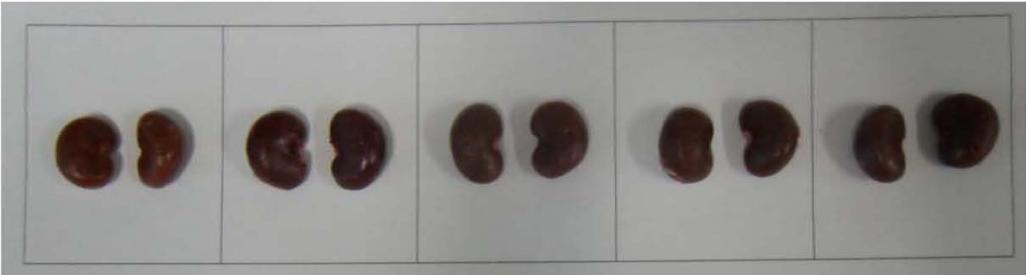
Control					
	1001	1002	1003	1004	1005
500					
	2001	2002	2003	2004	2005
1000					
	3001	3002	3003	3004	3005
2000					
	4001	4002	4003	4004	4005

Fig. 6–26. Appearance of kidney in rats treated orally extracts from *Hippophae rhamnoides*

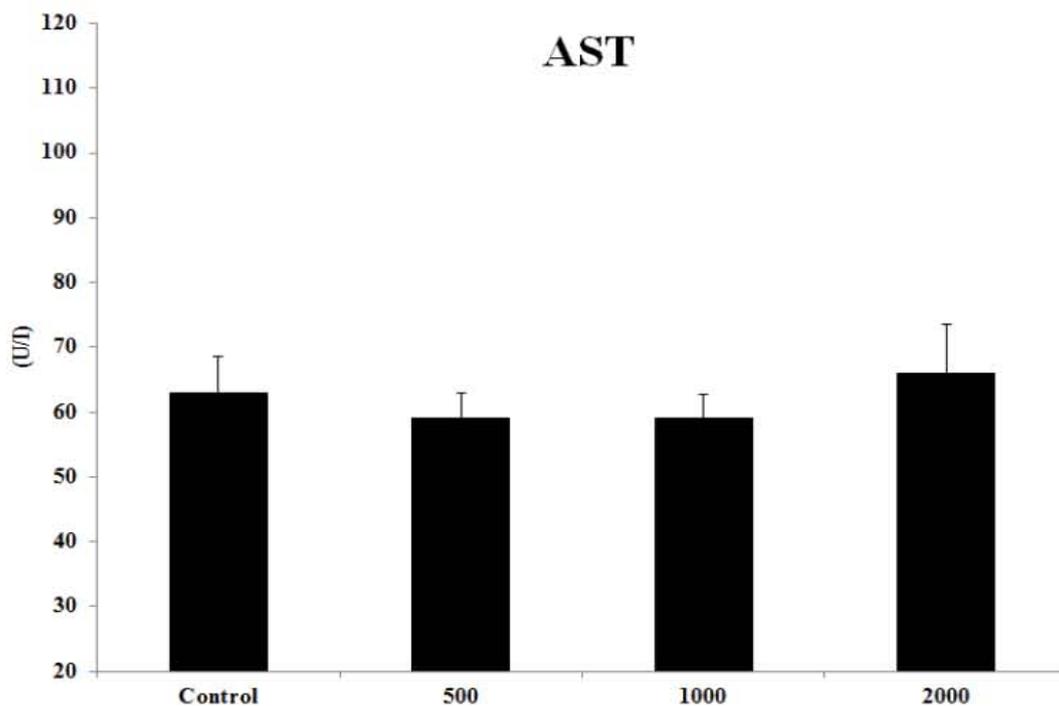


Fig. 6-27. Serum aspartate aminotransferase in rats treated orally extracts from *Hippophae rhamnoides* The values shown are the mean latency  $\pm$  S.D; \*  $P < 0.05$ , significantly different from the Control-group. Statistical significance was tested with the unpaired Student's  $t$ -test.

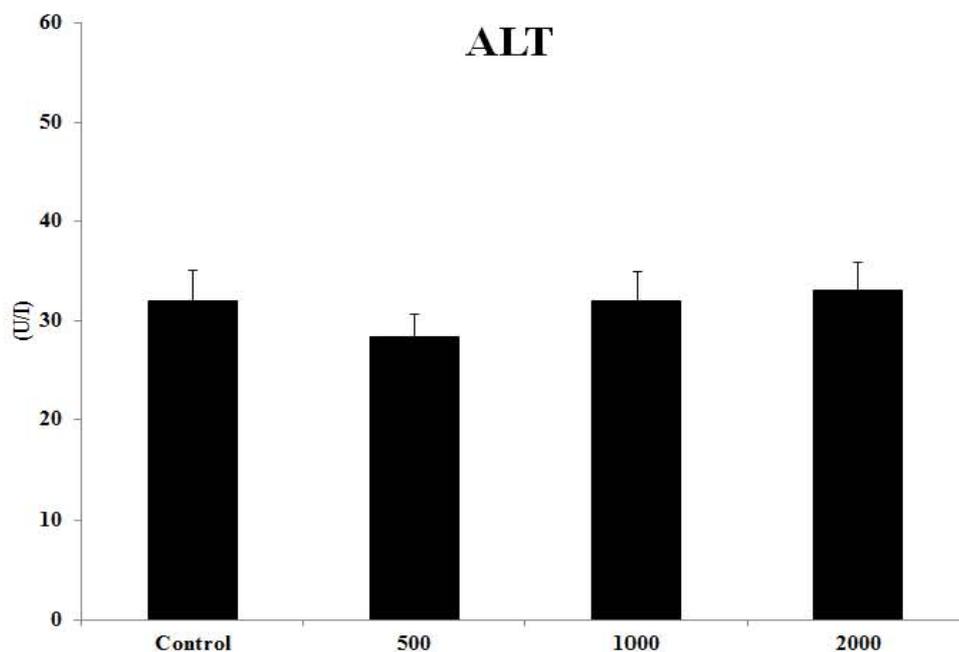


Fig. 6-28. Serum alanine aminotransferase in rats treated orally extracts from *Hippophae rhamnoides* The values shown are the mean latency  $\pm$  S.D; \*  $P < 0.05$ , significantly different from the Control-group. Statistical significance was tested with the unpaired Student's  $t$ -test.

Table 6–3. Body weight in rats treated orally extracts from *Hippophae rhamnoides*

group	individual	Body weights (g)				Survival rate (%)
		1 day	5 day	9 day	14 day	
Cont	1001	243.53	264.91	286.28	298.34	100
	1002	244.53	263.53	282.52	300.31	
	1003	247.65	267.20	286.74	293.75	
	1004	247.51	269.06	290.60	305.69	
	1005	241.73	262.68	283.62	296.75	
	aver	244.99	265.47	285.95	298.97	
	SD	2.57	2.63	3.14	4.46	
200	2001	234.76	255.61	276.45	282.24	100
	2002	241.64	262.63	283.62	296.75	
	2003	271.14	296.19	321.23	339.63	
	2004	225.84	253.68	281.52	292.31	
	2005	248.54	275.56	302.58	338.48	
	aver	244.38	268.73	293.08	309.88	
	SD	17.16	17.58	18.59	27.15	
500	3001	235.89	256.18	277.22	283.37	100
	3002	242.77	263.20	284.39	297.88	
	3003	272.27	296.76	322.00	340.76	
	3004	226.97	254.25	282.29	293.44	
	3005	249.67	276.13	303.35	339.61	
	aver	245.51	269.30	293.85	311.01	
	SD	17.16	17.58	18.59	27.15	

The values shown are the mean latency  $\pm$  S.D; \*  $P < 0.05$ , significantly different from the Control–group. Statistical significance was tested with the unpaired Student’s  $t$ -test.

Table 6-4. Tissues weight in rats treated orally extracts from *Hippophae rhamnoides*

group	individual	Tissue weights (g/100g)		
		Liver	Spleen	Kidney
Cont	1001	4.21	0.24	0.86
	1002	4.04	0.24	0.80
	1003	4.51	0.22	0.79
	1004	4.20	0.22	0.76
	1005	3.99	0.25	0.74
	aver	4.19	0.24	0.79
	SD	0.20	0.01	0.05
200	2001	3.57	0.27	0.75
	2002	4.47	0.25	0.79
	2003	4.17	0.26	0.76
	2004	4.02	0.23	0.90
	2005	4.33	0.22	0.75
	aver	4.11	0.25	0.79
	SD	0.35	0.02	0.06
500	3001	3.56	0.24	0.71
	3002	4.45	0.26	0.73
	3003	4.16	0.27	0.74
	3004	4.01	0.23	0.91
	3005	4.33	0.21	0.75
	aver	4.10	0.24	0.77
	SD	0.35	0.02	0.09

The values shown are the mean latency  $\pm$  S.D; \*  $P < 0.05$ , significantly different from the cont-group. Statistical significance was tested with the unpaired Student's  $t$ -test.

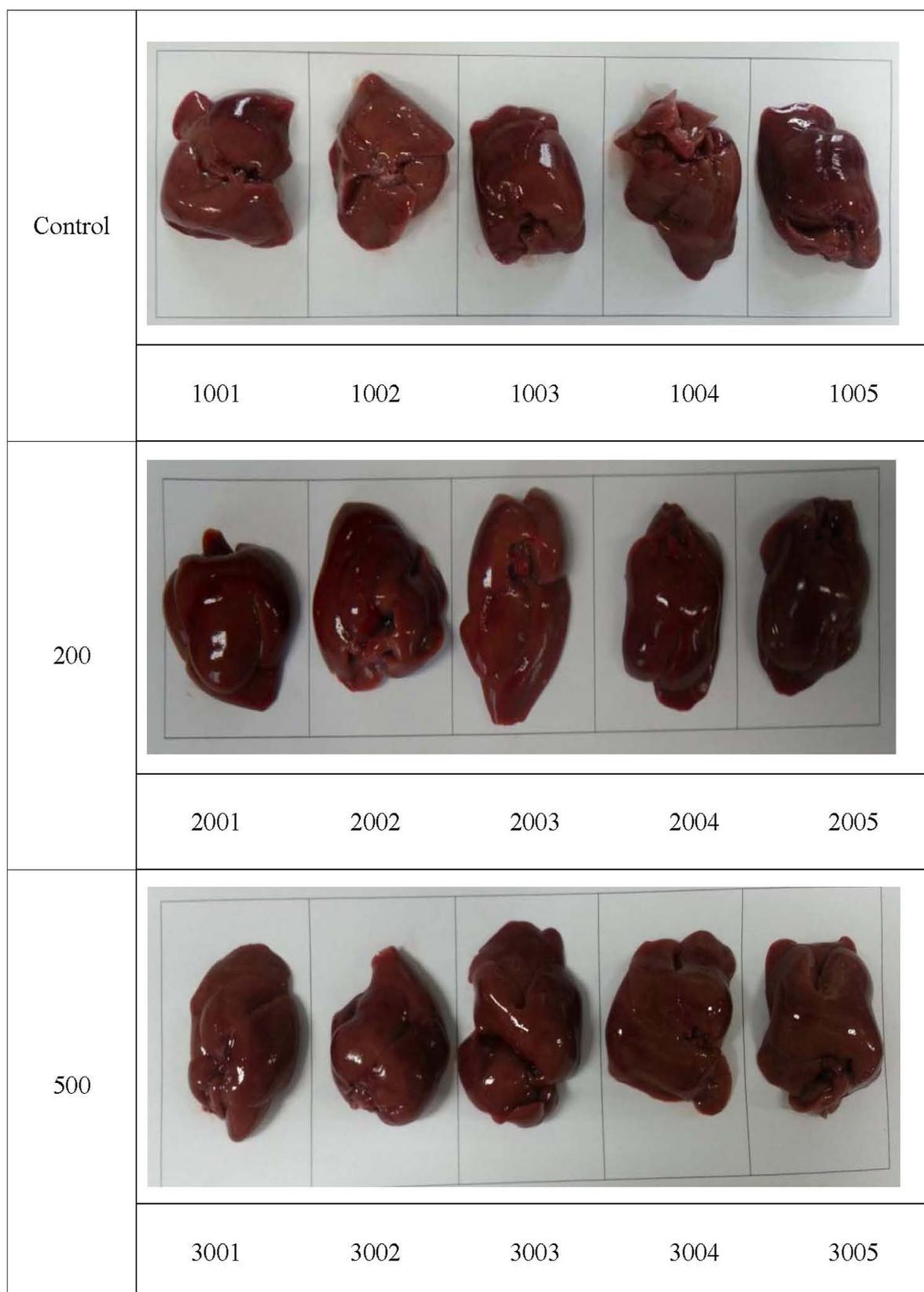


Fig. 6-29. Appearance of liver in rats treated orally extracts from *Hippophae rhamnoides*

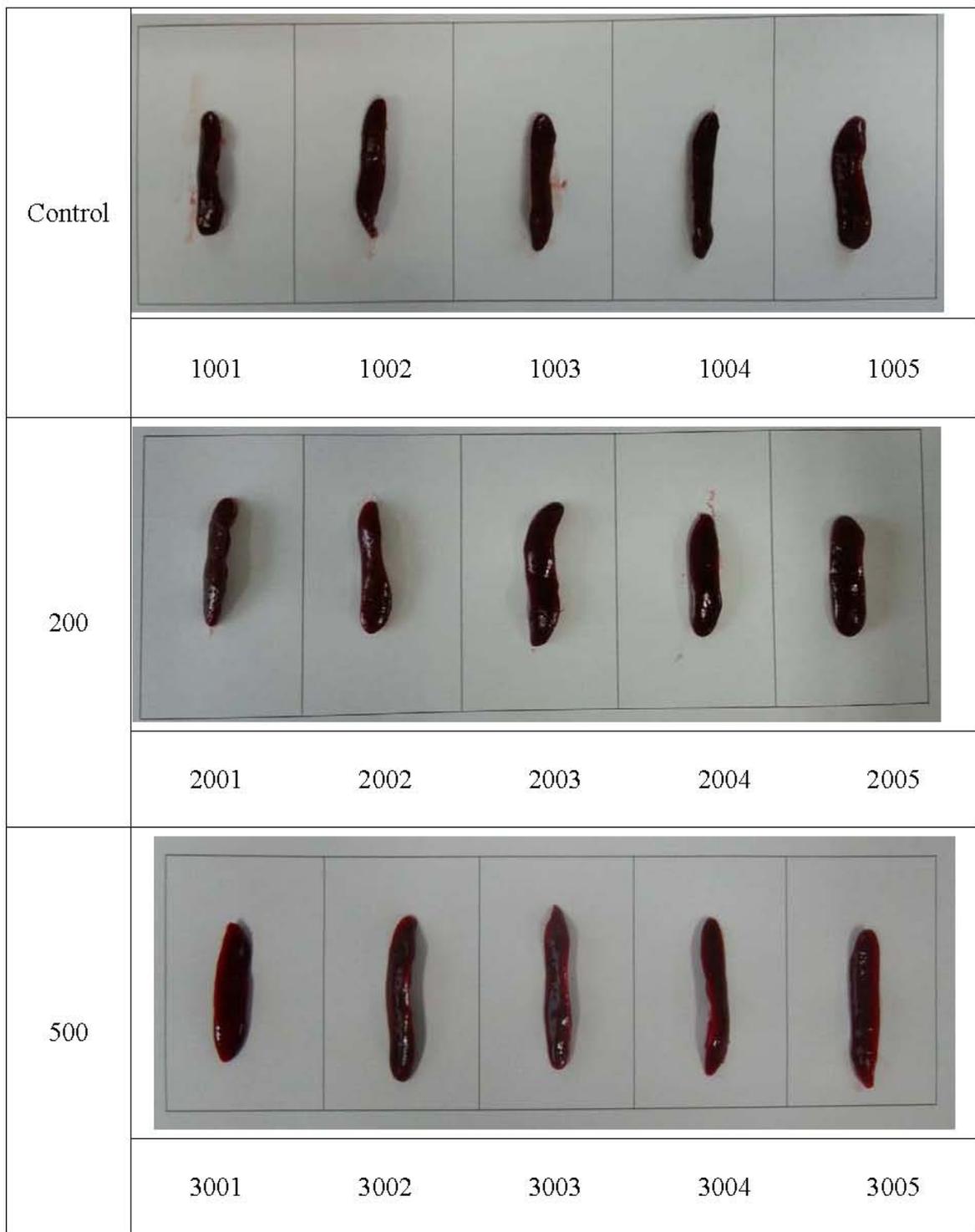


Fig. 6-30. Appearance of spleen in rats treated orally extracts from *Hippophae rhamnoides*

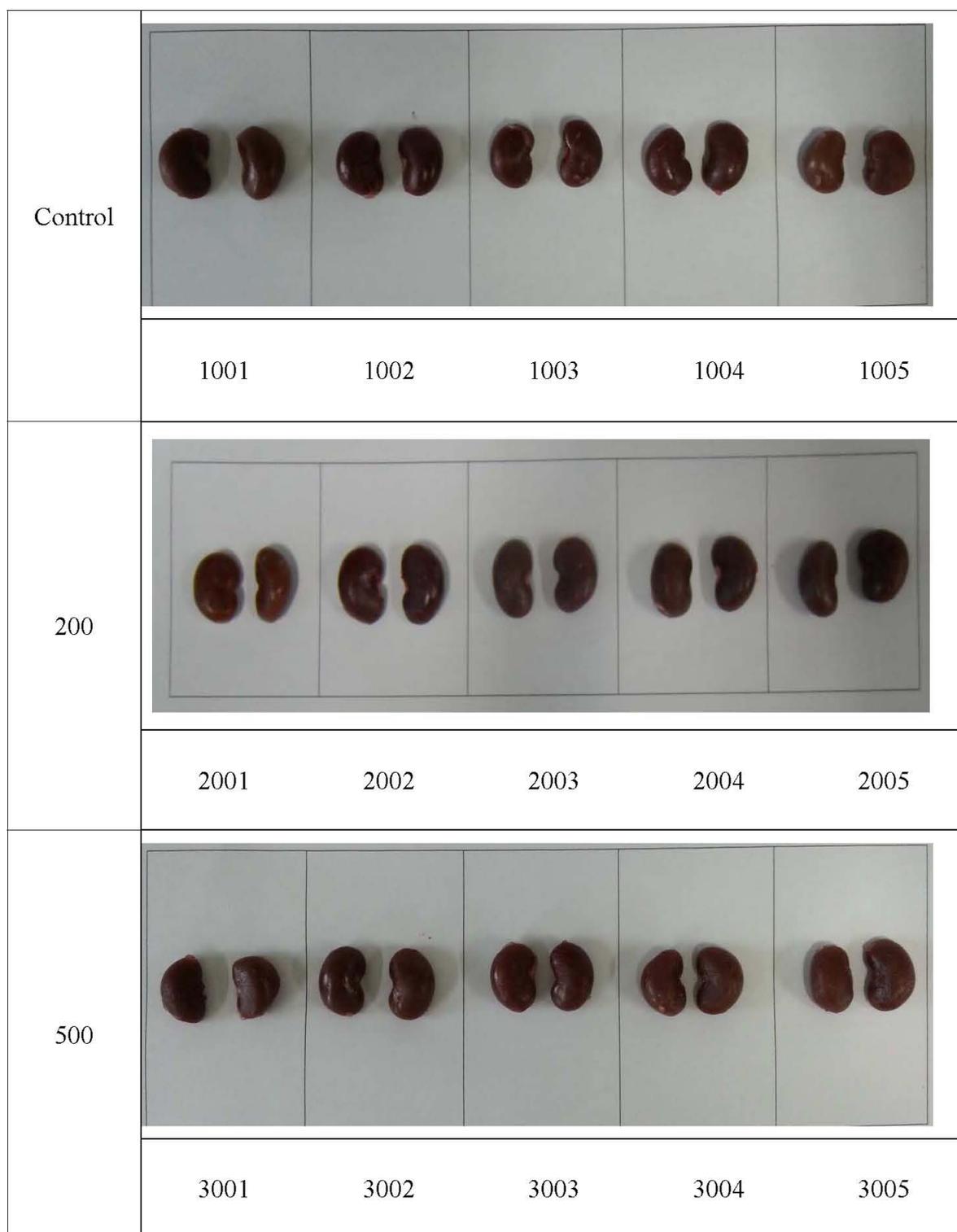


Fig. 6-31. Appearance of kidney in rats treated orally extracts from *Hippophae rhamnoides*

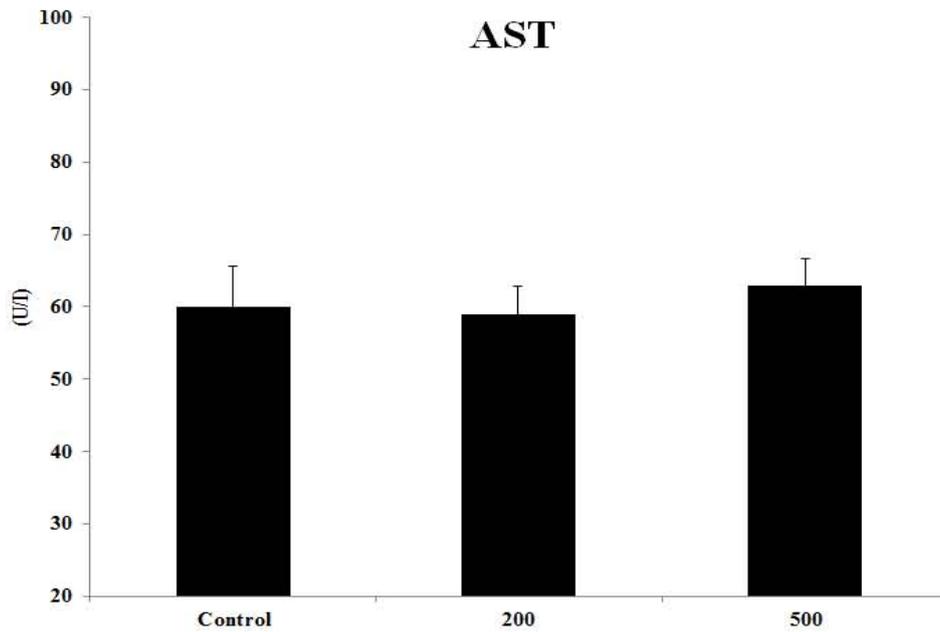


Fig. 6-32. Serum aspartate aminotransferase in rats treated orally extracts from *Hippophae rhamnoides* The values shown are the mean latency  $\pm$  S.D; \*  $P < 0.05$ , significantly different from the Control-group. Statistical significance was tested with the unpaired Student's  $t$ -test.

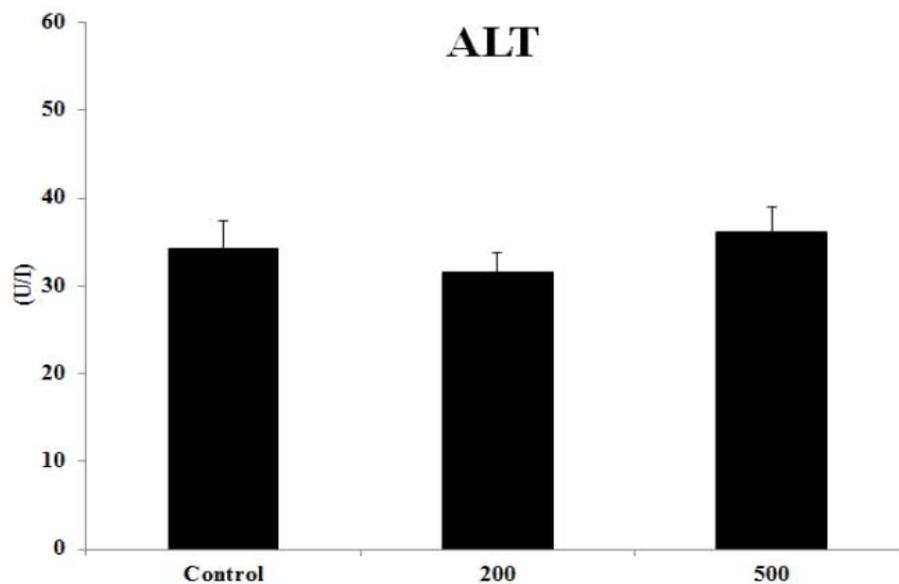


Fig. 6-33. Serum alanine aminotransferase in rats treated orally extracts from *Hippophae rhamnoides* The values shown are the mean latency  $\pm$  S.D; \*  $P < 0.05$ , significantly different from the Control-group. Statistical significance was tested with the unpaired Student's  $t$ -test.

다. *in vivo* 비타민나무 열수 추출물의 정신적 피로활성 평가

(1) 실험방법

(가) Electric Foot Shock model을 이용한 비타민나무 열수 추출물의 정신적 피로활성 평가

① 실험동물

- 5주령의 ICR 마우스 (male)을 구입한 후 6일 동안 동물사육실의 환경 하에서 검역 및 순화시키면서 일반 건강상태를 관찰한 후, 건강한 개체를 선별하여 시험에 사용하였다. 개체식별은 유성매직을 이용하여 각 개체번호 꼬리에 표시하며, 사육상자는 시험번호, 시험물 질명, 시험항목, 입수일, 순화기간, 군분리일, 시험기간, 성/동물번호 및 시험책임자를 기재 한 개체식별카드를 부착하여 식별하였다. 순화기간 중 이상이 발생한 개체와 정상적으로 체중이 증가하지 않은 개체를 제외한 후, 각 군간 평균체중 및 표준편차가 균일하도록 군 분리를 실시하였다.

② 사육환경

- 본 시험의 환경은 온도 ( $22 \pm 3$ ) °C, 상대습도 ( $50 \pm 20$ ) %, 환기횟수 (10 ~ 15) 회/시간, 조명주기 12시간 (8:00 ~ 20:00), 조도 (150 ~ 300) Lux의 사육환경으로 설정 된 동물사육실에서 사료와 음용수를 급여하여 사육하며, 순화 및 시험기간 동안 격리 사육 을 실시하였다.

③ 시험군의 구성

Group	시험물질	Dose (mg/kg B.W.)	Sex	No. of animal
Nomal	Saline	0	Male	1001~1010
Control	Saline	0	Male	2001~2010
Diazepam	Diazepam (I.P.)	2	Male	3001~3010
Teanin	Teanin	4	Male	4001~4010
Low	비타민나무(잎) 열수 추출물	50	Male	5001~5010
middle	비타민나무(잎) 열수 추출물	150	Male	6001~6010
High	비타민나무(잎) 열수 추출물	300	Male	7001~7010

③ 시험물질 투여

- 순화 및 군분리 후 시험물질을 시험기간 동안 각 농도별로 매일 동일시간에 경구투여 하였으며, 대조군은 동일 부피의 saline을 투여하였다.

④ 일반증상 관찰

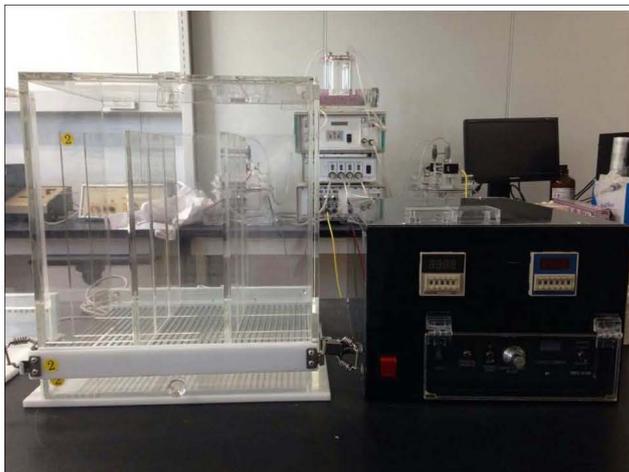
- 전 개체에 대하여 매일 1회 이상, 시험물질투여 후 15일 동안 일반증상관찰을 실시하였다.

⑤ 체중변화

- 체중은 입수시, 군분리시, 시험물질투여 후 15일 동안 5일에 1회 측정하였다.

⑦ Electric Foot Shock model

- 실험동물에 스트레스를 유도하는 방법으로 electric foot shock 방법을 이용하였다. 시험물질 투여 종료 후 electric foot shock을 30분간 5초 간격으로 1초간 0.6 mA의 전기 충격을 가하여 스트레스를 유도한 후 마우스를 부검, 혈액 및 뇌를 적출하였다.



⑨ 부검

- 실험 마지막 날 경구 투여 후 3시간 전에 식이를 제거하고 에테르 마취하에 해부를 하였다. 각각의 mouse에서 대퇴근, 비복근을 채취하였고, 대정맥에서 혈액을 채취하여 3,000 rpm에서 원심분리 후 혈청만 분리하였다. 조직은 액체질소에 즉시 보관하여 실험에 이용하였다.

⑩ 혈액 및 뇌 조직 이용한 생화학적 분석

- 부검 후 적출한 뇌 조직은 질소가스로 냉각시켜 막자사발을 이용해 powder 형태로 만들어 -70°C에 보관하며 사용하였으며 Dopamine (Dopamine ELISA Kit, Abnova Corp., Cat# KA1887, Taipei City, Taiwan), Norepinephrine (Norepinephrine ELISA Kit, Abnova Corp., Cat# KA1891, Taipei City, Taiwan), Serotonin (Serotonin ELISA Kit, Abnova Corp., Cat# KA1894, Taipei City, Taiwan), Corticosterone (Corticosterone ELISA Ki, Abnova Corp., Cat# KA0468, Taipei City, Taiwan)은 각각의 kit를 사용하여 제조사에서 제공한 실험방법에 따라 분석 하였다.

## (2) 실험결과

### (가) Electric Foot Shock model을 이용한 비타민나무 열수 추출물의 정신적 피로활성 평가

#### ① 사망률 및 일반 증상

- 시험 기간 동안 시험물질 투여에 따른 이상증상이나 이상행동을 관찰한 결과, 투여와 관련된 행동적 이상 및 사망한 개체는 없었다.

#### ② 체중변화

- 시험 기간 동안 각 시험군 간의 체중증가량을 무처리군(control) 과의 유의검정을 실시 해 본 결과, 각 군과 control군과의 체중 증가량에 대한 유의적 차이는 없었다.

#### ③ Electric Foot Shock 후, serum에서의 dopamine 함량 변화

- Electric Foot Shock로 정신적 스트레스를 가한 후, 비타민나무열 열수 추출물이 혈중 dopamine 수준에 미치는 영향을 측정하였다. 혈중 dopamine 수치는 스트레스 자극 전과 후에 유의적 차이가 없었으며, 양성대조군인 DZP와 theanin의 경우에도 별다른 변화를 확인 할 수 없었다. 시료인 비타민나무열 열수 추출물을 투여한 군 모두 유의적 변화가 없었다.

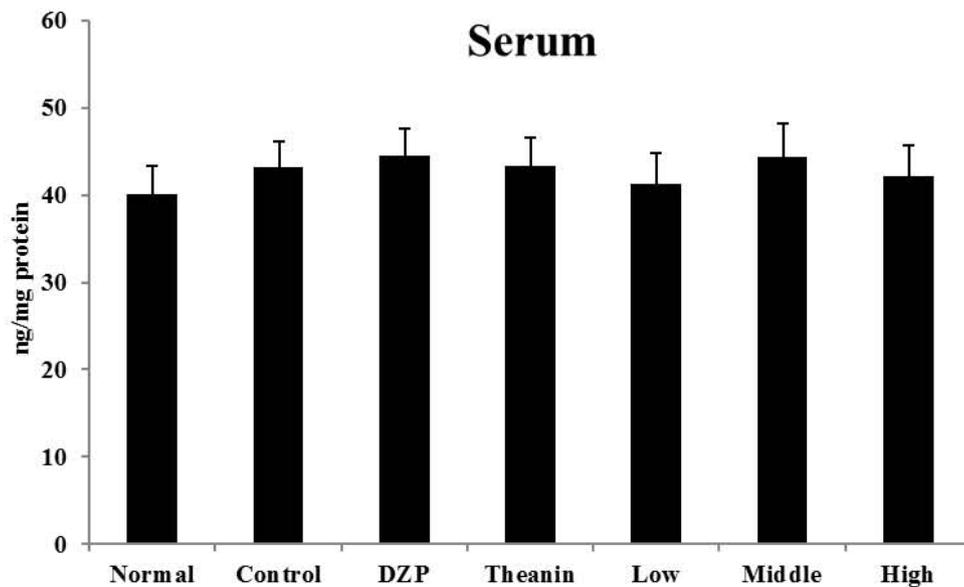


Fig 6-34. Effects of Water extracts *Hippophae rhamnoides* L. on dopamine levels in serum. Data are expressed as the mean latencies  $\pm$  S.D. (n = 10). \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*  $P < 0.05$  vs control. Normal: non-treated group, Control: electric foot shock + saline administered group. DZP: electric foot shock + 2 mg/kg diazepam (i.p.), Theanin: electric foot shock + 4 mg/kg theanin, Low: electric foot shock + 50 mg/kg water extract of *Hippophae rhamnoides* L. leaf, Middle: electric foot shock + 150 mg/kg water extract of *Hippophae rhamnoides* L. leaf, High: electric foot shock + 300 mg/kg water extract of *Hippophae rhamnoides* L. leaf

④ Electric Foot Shock 후, whole brain에서의 dopamine 함량 변화

– Electric Foot Shock로 정신적 스트레스를 가한 후, 비타민나무잎 열수 추출물이 뇌에서의 dopamine 수준에 미치는 영향을 측정하였다. 30분 동안의 전기자극만을 준 control군 ( $86.72 \pm 5.21$  ng/mg protein)의 경우 뇌에서의 dopamine 수치가 스트레스 자극을 주지 않은 무처리군 ( $51.32 \pm 3.15$  ng/mg protein)과 비교하여 유의적으로 크게 증가한 것을 확인 하였다. 그리고 시료인 비타민나무 열수 추출물을 농도별로 처리 하였을 때, Low, Middle, High 군에서 각각,  $80.41 \pm 3.42$ ,  $77.43 \pm 3.94$ ,  $71.42 \pm 3.41$  ng/mg protein으로 농도 의존적으로 dopamine 수치가 감소하는 것을 확인하였다. 양성대조군인 DZP ( $63.52 \pm 4.72$  ng/mg protein)와 theanine ( $73.31 \pm 5.15$  ng/mg protein)의 경우에도 증가된 dopamine 수치가 유의적으로 감소한 것을 확인하였다. 스트레스에 의해 증가된 dopamine 수준은 비타민나무 열수 추출물에 의해 유의적으로 감소하였다.

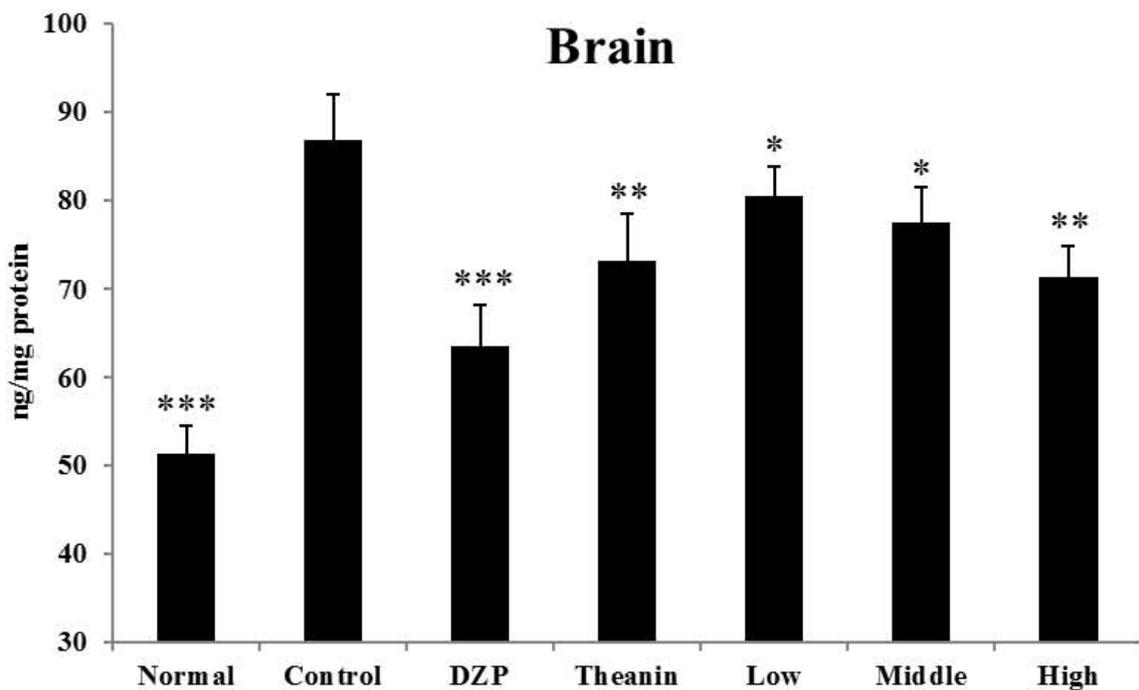
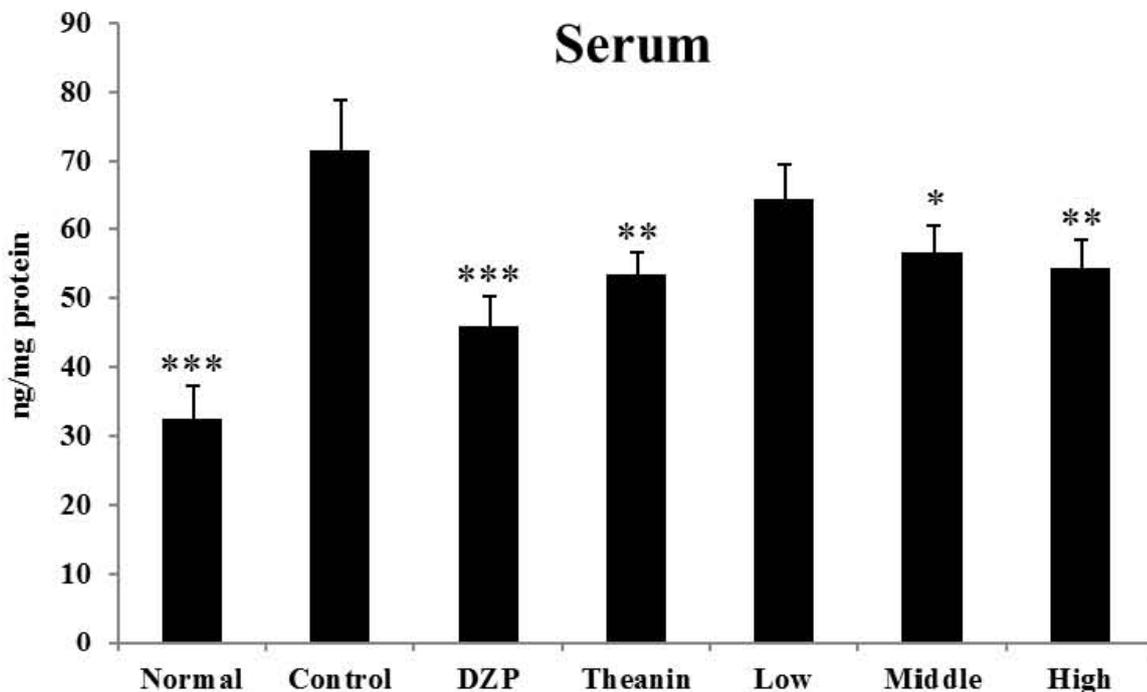


Fig 6-35. Effects of Water extracts *Hippophae rhamnoides* L. on dopamine levels in whole brain. Data are expressed as the mean latencies  $\pm$  S.D. ( $n = 10$ ). \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*  $P < 0.05$  vs control. Normal: non-treated group, Control: electric foot shock + saline administered group. DZP: electric foot shock + 2 mg/kg diazepam (i.p.), Theanin: electric foot shock + 4 mg/kg theanin, Low: electric foot shock + 50 mg/kg water extract of *Hippophae rhamnoides* L. leaf, Middle: electric foot shock + 150 mg/kg water extract of *Hippophae rhamnoides* L. leaf, High: electric foot shock + 300 mg/kg water extract of *Hippophae rhamnoides* L. leaf

⑤ Electric Foot Shock 후, serum에서의 noradrenalin 함량 변화

- Electric Foot Shock로 정신적 스트레스를 가한 후, 비타민나무잎 열수 추출물이 serum에서의 noradrenalin 수준에 미치는 영향을 측정하였다. 30분 동안의 전기자극만을 준 control군 ( $71.52 \pm 7.32$  ng/mg protein)의 경우 혈중에서의 noradrenalin 수치가 스트레스 자극을 주지 않은 무처리군 ( $32.51 \pm 4.74$  ng/mg protein)과 비교하여 유의적으로 크게 증가한 것을 확인 하였다. 그리고 시료인 비타민나무 열수 추출물을 농도별로 처리 하였을 때, Middle, High 군에서 각각,  $56.41 \pm 3.94$ ,  $54.17 \pm 4.12$  ng/mg protein으로 농도 의존적으로 noradrenalin 수치가 감소하는 것을 확인하였다. 양성대조군인 DZP ( $45.73 \pm 4.32$  ng/mg protein)와 theanine ( $53.35 \pm 3.24$  ng/mg protein)의 경우에도 증가된 noradrenalin 수치가 유의적으로 감소한 것을 확인하였다. 스트레스에 의해 증가된 noradrenalin 수준은 비타민나무 열수 추출물에 의해 유의적으로 감소하였다.



**Fig 6-36.** Effects of Water extracts *Hippophae rhamnoides* L. on noradrenalin levels in serum. Data are expressed as the mean latencies  $\pm$  S.D. (n = 10). \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*  $P < 0.05$  vs control. Normal: non-treated group, Control: electric foot shock + saline administered group. DZP: electric foot shock + 2 mg/kg diazepam (i.p.), Theanin: electric foot shock + 4 mg/kg theanin, Low: electric foot shock + 50 mg/kg water extract of *Hippophae rhamnoides* L. leaf, Middle: electric foot shock + 150 mg/kg water extract of *Hippophae rhamnoides* L. leaf, High: electric foot shock + 300 mg/kg water extract of *Hippophae rhamnoides* L. leaf

⑥ Electric Foot Shock 후, whole brain에서의 noradrenalin 함량 변화

– Electric Foot Shock로 정신적 스트레스를 가한 후, 비타민나무잎 열수 추출물이 whole brain 에서의 noradrenalin 수준에 미치는 영향을 측정하였다. 30분 동안의 전기자극만을 준 control군 ( $105.11 \pm 7.52$  ng/mg protein)의 경우 뇌에서의 noradrenalin 수치가 스트레스 자극을 주지 않은 무처리군 ( $31.47 \pm 3.15$  ng/mg protein)과 비교하여 유의적으로 크게 증가한 것을 확인 하였다. 그리고 시료인 비타민나무 열수 추출물을 농도별로 처리 하였을 때, Low, Middle, High 군에서 각각,  $87.43 \pm 5.15$ ,  $88.13 \pm 3.94$ ,  $78.32 \pm 4.51$  ng/mg protein으로 농도 의존적으로 noradrenalin 수치가 감소하는 것을 확인하였다. 양성 대조군인 DZP ( $62.72 \pm 6.14$  ng/mg protein)와 theanine ( $81.12 \pm 5.15$  ng/mg protein)의 경우에도 증가된 noradrenalin 수치가 유의적으로 감소한 것을 확인하였다. 스트레스에 의해 증가된 noradrenalin 수준은 비타민나무 열수 추출물에 의해 유의적으로 감소하였다.

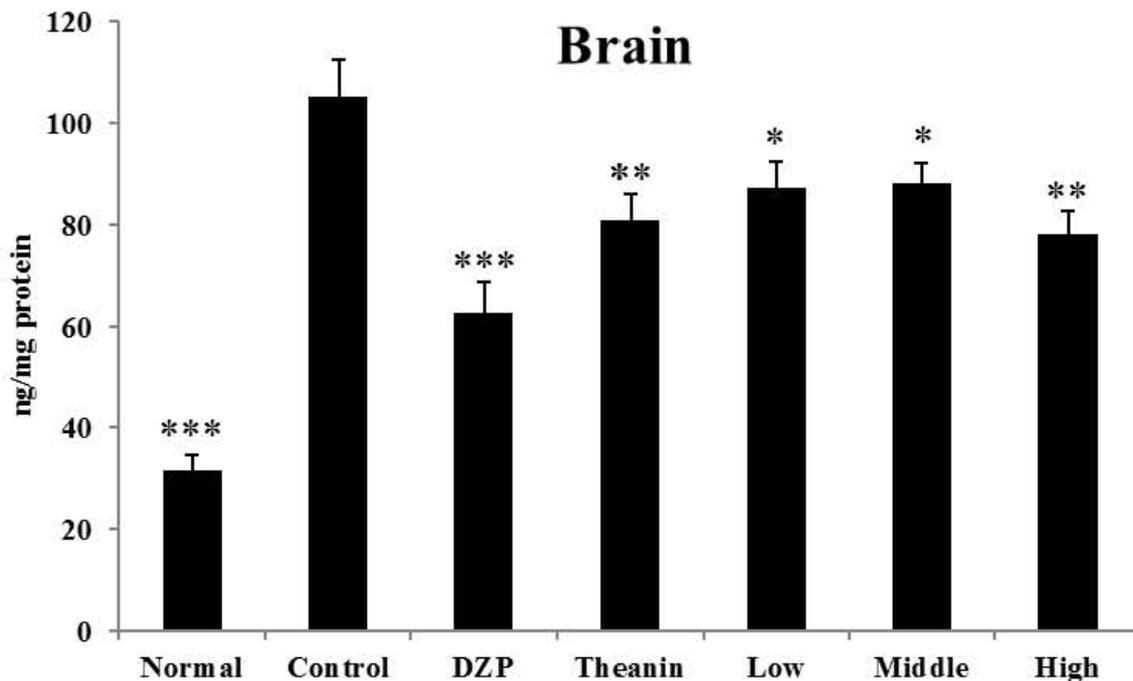


Fig 6-37. Effects of Water extracts *Hippophae rhamnoides* L. on noradrenalin levels in whole brain. Data are expressed as the mean latencies  $\pm$  S.D. (n = 10). \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*  $P < 0.05$  vs control. Normal: non-treated group, Control: electric foot shock + saline administered group. DZP: electric foot shock + 2 mg/kg diazepam (i.p.), Theanin: electric foot shock + 4 mg/kg theanine, Low: electric foot shock + 50 mg/kg water extract of *Hippophae rhamnoides* L. leaf, Middle: electric foot shock + 150 mg/kg water extract of *Hippophae rhamnoides* L. leaf, High: electric foot shock + 300 mg/kg water extract of *Hippophae rhamnoides* L. leaf

⑦ Electric Foot Shock 후, serum에서의 5-HT 함량 변화

- Electric Foot Shock로 정신적 스트레스를 가한 후, 비타민나무잎 열수 추출물이 serum에서의 5-HT 수준에 미치는 영향을 측정하였다. 30분 동안의 전기자극만을 준 control군 ( $10.33 \pm 2.46$  ng/mg protein)의 경우 뇌에서의 5-HT 수치가 스트레스 자극을 주지 않은 무처리군 ( $21.31 \pm 2.11$  ng/mg protein)과 비교하여 유의적으로 크게 감소한 것을 확인하였다. 그리고 시료인 비타민나무 열수 추출물을 농도별로 처리 하였을 때, High 군에서  $17.12 \pm 3.14$  ng/mg protein으로 5-HT 수치가 유의적으로 증가 하는 것을 확인하였다. 양성대조군인 DZP ( $28.43 \pm 3.31$  ng/mg protein)와 theanine ( $16.64 \pm 2.14$  ng/mg protein)의 경우에도 감소한 5-HT 수치가 유의적으로 증가한 것을 확인하였다. 스트레스에 의해 감소한 5-HT 수준은 비타민나무 열수 추출물에 의해 유의적으로 다시 증가하였다.

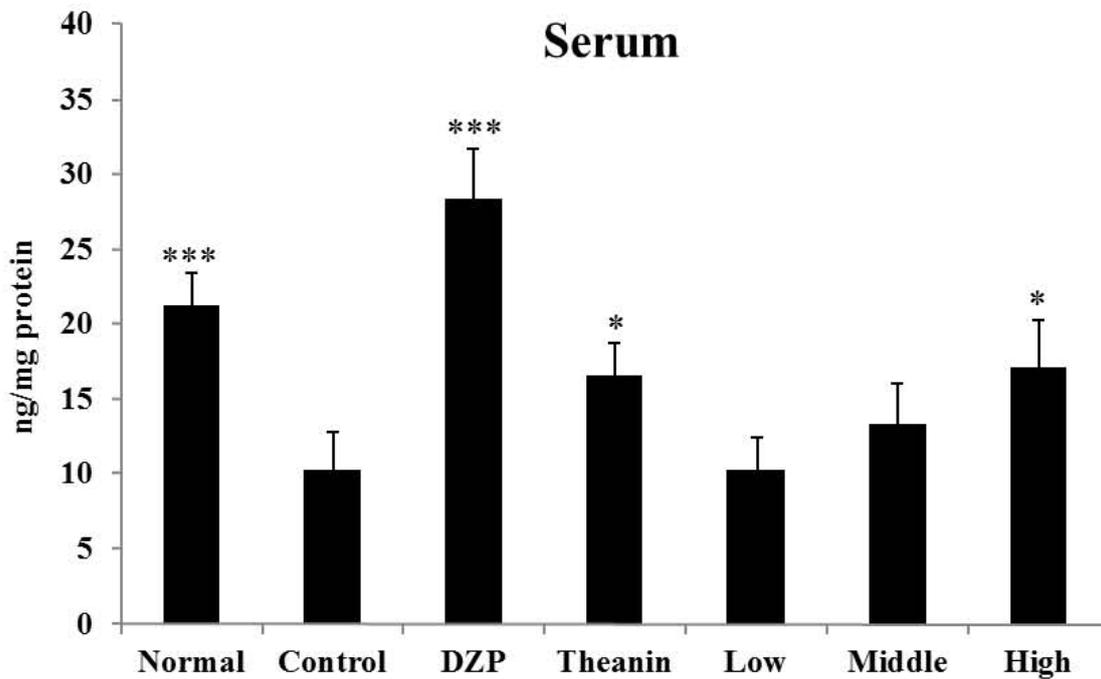


Fig 6-38. Effects of Water extracts *Hippophae rhamnoides* L. on 5-HT levels in serum. Data are expressed as the mean latencies  $\pm$  S.D. (n = 10). \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*  $P < 0.05$  vs control. Normal: non-treated group, Control: electric foot shock + saline administered group. DZP: electric foot shock + 2 mg/kg diazepam (i.p.), Theanin: electric foot shock + 4 mg/kg theanin, Low: electric foot shock + 50 mg/kg water extract of *Hippophae rhamnoides* L. leaf, Middle: electric foot shock + 150 mg/kg water extract of *Hippophae rhamnoides* L. leaf, High: electric foot shock + 300 mg/kg water extract of *Hippophae rhamnoides* L. leaf

㉔ Electric Foot Shock 후, whole brain에서의 5-HT 함량 변화

- Electric Foot Shock로 정신적 스트레스를 가한 후, 비타민나무잎 열수 추출물이 whole brain 에서의 5-HT 수준에 미치는 영향을 측정하였다. 30분 동안의 전기자극만을 준 control군 ( $14.43 \pm 5.21$  ng/mg protein)의 경우 뇌에서의 5-HT 수치가 스트레스 자극을 주지 않은 무처리군 ( $34.42 \pm 3.15$  ng/mg protein)과 비교하여 유의적으로 크게 감소한 것을 확인 하였다. 그리고 시료인 비타민나무 열수 추출물을 농도별로 처리 하였을 때, 각각 Middle, High 군에서  $23.35 \pm 3.94$ ,  $32.35 \pm 3.41$  ng/mg protein으로 5-HT 수치가 유의적으로 증가 하는 것을 확인하였다. 양성대조군인 DZP ( $42.36 \pm 4.72$  ng/mg protein)와 theanine ( $28.42 \pm 3.36$  ng/mg protein)의 경우에도 감소한 5-HT 수치가 유의적으로 증가한 것을 확인하였다. 특히 DZP의 경우, 무처리군 수준으로 5-HT 함량이 크게 증가 하였으며, 스트레스에 의해 감소한 5-HT 수준은 비타민나무 열수 추출물에 의해 유의적으로 다시 증가하였다.

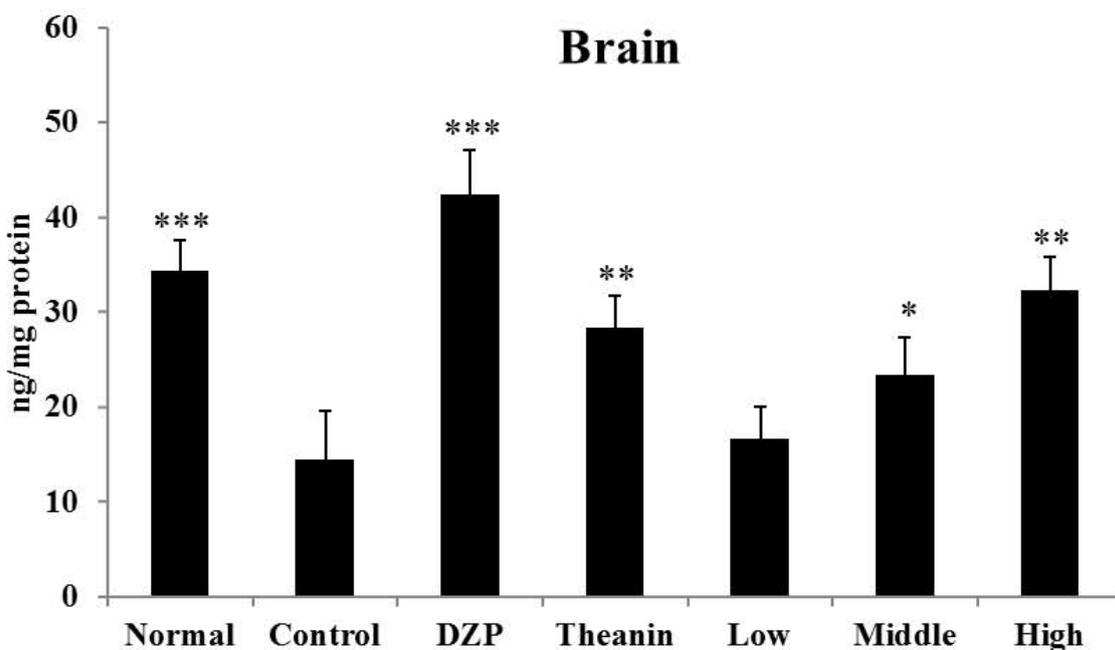


Fig 6-39. Effects of Water extracts *Hippophae rhamnoides* L. on 5-HT levels in whole brain. Data are expressed as the mean latencies  $\pm$  S.D. (n = 10). \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*  $P < 0.05$  vs control. Normal: non-treated group, Control: electric foot shock + saline administered group. DZP: electric foot shock + 2 mg/kg diazepam (i.p.), Theanin: electric foot shock + 4 mg/kg theanine, Low: electric foot shock + 50 mg/kg water extract of *Hippophae rhamnoides* L. leaf, Middle: electric foot shock + 150 mg/kg water extract of *Hippophae rhamnoides* L. leaf, High: electric foot shock + 300 mg/kg water extract of *Hippophae rhamnoides* L. leaf

㉑ Electric Foot Shock 후, serum에서의 corticosterone 함량 변화

- Electric Foot Shock로 정신적 스트레스를 가한 후, 비타민나무잎 열수 추출물이 serum에서의 corticosterone 수준에 미치는 영향을 측정하였다. 30분 동안의 전기자극만을 준 control군 ( $32.25 \pm 2.89$  ng/mg protein)의 경우 뇌에서의 corticosterone 수치가 스트레스 자극을 주지 않은 무처리군 ( $9.51 \pm 3.15$  ng/mg protein)과 비교하여 유의적으로 크게 증가한 것을 확인 하였다. 그리고 시료인 비타민나무 열수 추출물을 농도별로 처리 하였을 때, Middle, High 군에서 각각,  $24.73 \pm 3.94$ ,  $24.43 \pm 3.41$  ng/mg protein으로 corticosterone 수치가 유의적으로 감소 하는 것을 확인하였다. 양성대조군인 DZP ( $13.36 \pm 2.35$  ng/mg protein)와 theanine ( $21.14 \pm 3.24$  ng/mg protein)의 경우에도 증가한 corticosterone 수치가 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다. 스트레스에 의해 감소한 corticosterone 수준은 비타민나무 열수 추출물에 의해 유의적으로 감소하였다.

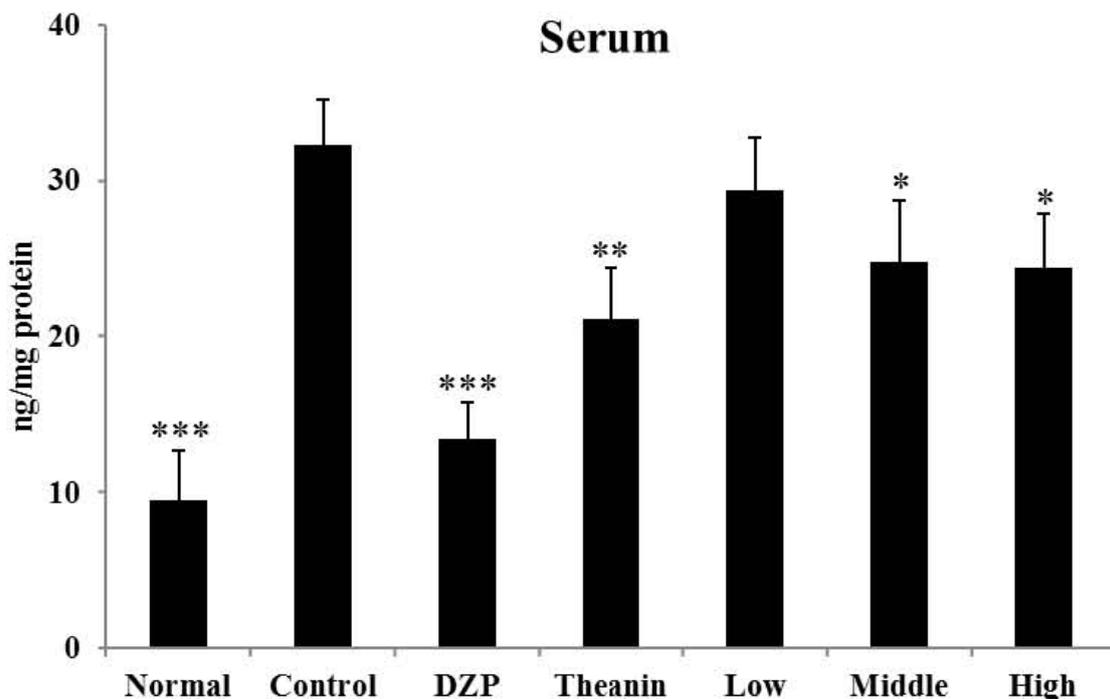


Fig 6-40. Effects of Water extracts *Hippophae rhamnoides* L. on corticosterone levels in serum. Data are expressed as the mean latencies  $\pm$  S.D. (n = 10). \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*  $P < 0.05$  vs control. Normal: non-treated group, Control: electric foot shock + saline administered group, DZP: electric foot shock + 2 mg/kg diazepam (i.p.), Theanin: electric foot shock + 4 mg/kg theanin, Low: electric foot shock + 50 mg/kg water extract of *Hippophae rhamnoides* L. leaf, Middle: electric foot shock + 150 mg/kg water extract of *Hippophae rhamnoides* L. leaf, High: electric foot shock + 300 mg/kg water extract of *Hippophae rhamnoides* L. leaf

⑩ Electric Foot Shock 후, whole brain 에서의 corticosterone 함량 변화

- Electric Foot Shock로 정신적 스트레스를 가한 후, 비타민나무잎 열수 추출물이 whole brain 에서의 corticosterone 수준에 미치는 영향을 측정하였다. 30분 동안의 전기자극만을 준 control군 ( $1562 \pm 140.32$  ng/mg protein)의 경우 뇌에서의 corticosterone 수치가 스트레스 자극을 주지 않은 무처리군 ( $154.35 \pm 35.36$  ng/mg protein)과 비교하여 유의적으로 크게 증가한 것을 확인 하였다. 그리고 시료인 비타민나무 열수 추출물을 농도별로 처리 하였을 때, Low, Middle, High 군에서 각각,  $1251.36 \pm 84.42$ ,  $1152.36 \pm 84.35$ ,  $1095.45 \pm 79.64$  ng/mg protein으로 corticosterone 수치가 유의적으로 감소 하는 것을 확인하였다. 양성대조군인 DZP ( $625.32 \pm 105.35$  ng/mg protein)와 theanine ( $984.43 \pm 94.35$  ng/mg protein)의 경우에도 증가한 corticosterone 수치가 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다. 스트레스에 의해 감소한 corticosterone 수준은 비타민나무 열수 추출물에 의해 유의적으로 감소하였다.

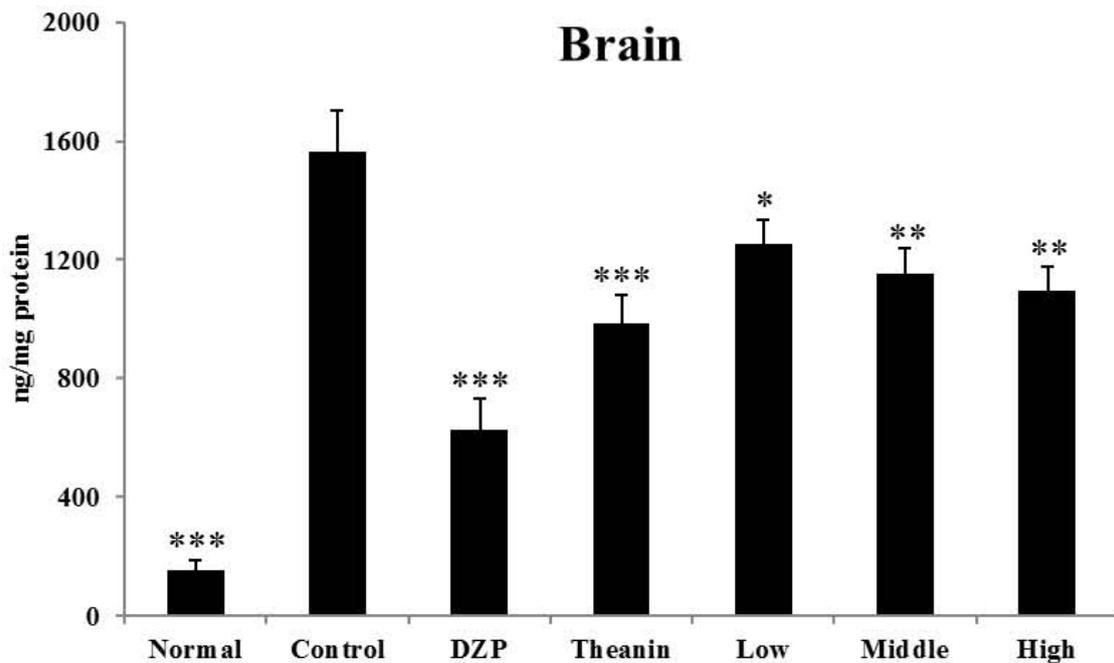


Fig 6-41. Effects of Water extracts *Hippophae rhamnoides* L. on corticosterone levels in whole brain. Data are expressed as the mean latencies  $\pm$  S.D. (n = 10). \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*  $P < 0.05$  vs control. Normal: non-treated group, Control: electric foot shock + saline administered group. DZP: electric foot shock + 2 mg/kg diazepam (i.p.), Theanin: electric foot shock + 4 mg/kg theanin, Low: electric foot shock + 50 mg/kg water extract of *Hippophae rhamnoides* L. leaf, Middle: electric foot shock + 150 mg/kg water extract of *Hippophae rhamnoides* L. leaf, High: electric foot shock + 300 mg/kg water extract of *Hippophae rhamnoides* L. leaf

## 라. 비타민나무 열수 추출물의 생리활성 물질 탐색

### (1) 실험방법 및 결과

#### (가) HPLC를 활용한 비타민나무 잎 열수추출물 최적 분리 profiling

① 비타민 나무 열수 추출물의 성분의 최적 분리를 위한 HPLC 조건은 표 6-5.에 요약되어 있다. HPLC 분석에서 컬럼은 ZORBAX Eclipse XDB-C18(4.6 mm×250 mm, 5 μm, Agilent, USA)을 사용하였고, UV/VIS 검출기를 가진 Waters 2695 HPLC System (Waters Co., USA)을 사용하였다. 이동상 용매의 유속은 1.0 mL/min으로 분석을 실시하였으며, 컬럼 온도는 40℃로 유지하였다. 또한 UV는 254 nm, 375 nm 파장에서 측정하였으며 시료 주입량은 10 μL이다.

표 6-5. HPLC 분석조건

Item	Condition
HPLC system	Waters 2695 (USA)
Column	ZORBAX Eclipse XDB-C18 (4.6 mm×250 mm, 5 μm, Agilent, USA)
Flow rate	1.0 mL/min
Detector	UV 254 nm, 375 nm
Column temperature	40℃
Injection volume	10 μL

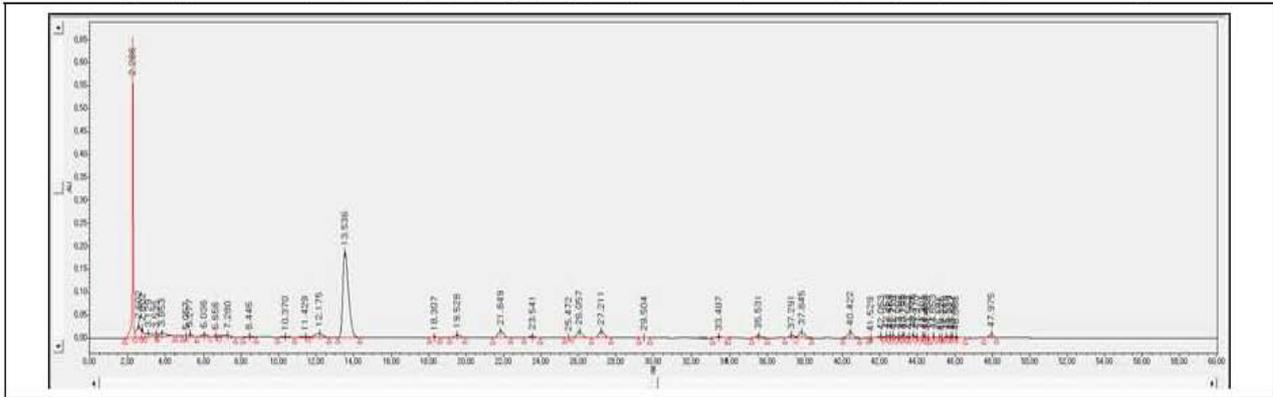
② HPLC 분석 시 이동상 용매 A는 100% MeOH, B는 0.1 % formic acid가 사용되었으며, 이동상 용매의 gradient 조건은 아래 표와 같이 MeOH의 농도를 35%에서 38분 동안 50%까지 올려가며 초기 성분 분리를 시도하였으며, 40분 동안 초기 용매 조건에서 B용매를 100% 까지 올려 성분 분리를 시도 하였다.

표 6-6. 최초 이동상 용매의 농도 설정

Time(min)	Solvent A	Solvent B
	(MeOH)	(0.1 % formic acid)
0	35	65
8	35	65
38	50	50
40	0	100
50	35	65
51	35	65
55	35	65

③ 초기 이동상 용매를 위 표와 같이 설정한 이유는, 역상컬럼에서 상대적으로 극성인 물의 농도를 높게 하여 비타민 나무 잎 성분 중 극성이 높은 것부터 순차적으로 검출되게 하기 위함인데, 38분에 극성인 0.1% formic acid의 농도를 100%로 높게 하여 컬럼 내에 머무르고 있는 극성 성분들을 마지막으로 검출하기 위함이다.

[그림 6-42. 비타민나무잎 열수추출물 크로마토그램 (머무름시간 0~60분)]



④ 비타민나무 잎 열수 추출물의 경우 극성성분인 물에 의해 추출되었기 때문에 극성물질 성분이 비극성물질 성분보다 더 높은 농도로 추출이 되었을 것으로 판단되며 위 표. 1-A 를 보면 야관문 성분들이 0분에서 40분 사이에 90%이상 나타나고 있음을 알 수 있다.

⑤ 머무름 시간이 30분전에 비타민 나무 성분의 90%이상 나타나는 것은, 물의 농도가 65%이고, MeOH의 농도가 35%의 의미를 갖는데, MeOH의 농도가 약 40%의 농도까지에서 비타민 나무 성분이 모두 검출될 수 있다는 결과를 얻었다.

⑥ 비타민 나무 잎 성분의 머무름 시간이 0분에서 38분 시간대에 머무름 시간을 갖는 성분의 peak가 잘 분리 되어 나와 비타민 나무 최적 분리 조건의 이동상 용매의 농도 설정의 위 표2와 같이 하기로 하였다.

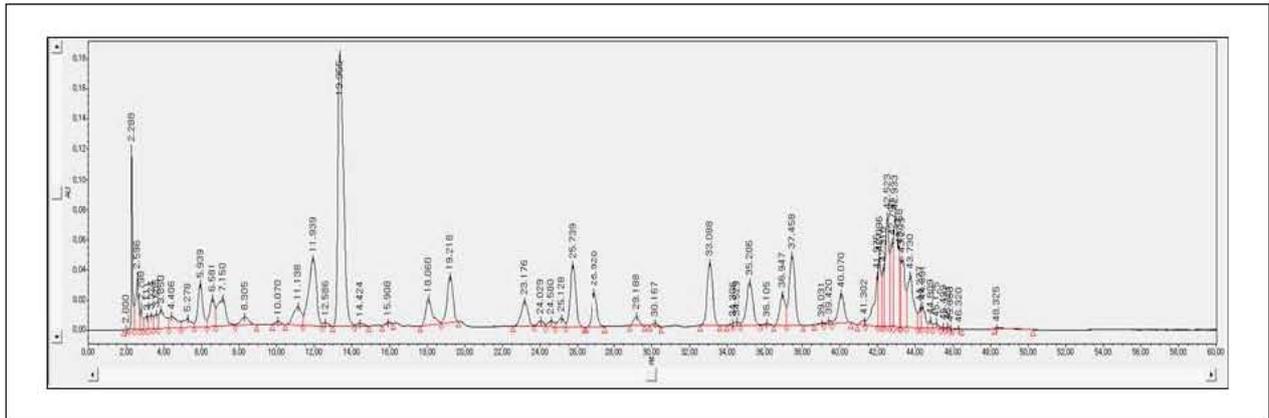
⑦ 그림 6-42에서 보는 바와 같이 초기 비타민 나무 성분들의 농도가 낮게 나타나 위 성분들의 함량을 좀 더 높게 용출 되는 전 처리 방법을 찾아 진행하였다.

⑧ 비타민 나무 성분들의 함량을 좀 더 높게 용출 되게 하기 위해 전처리 방법을 다음과 같이 진행하였다.

- 회석용액 (에탄올 : 물 : 염산 = 50 : 20 : 8, v/v/v) 200 mL 메스실린더에 에탄올 100 mL를 넣은 후 증류수 40 mL를 넣고, 조심스럽게 HCl 16 mL를 넣는다
- 비타민 나무 열수 추출물을 약 300 mg을 칭량하여 50 mL 메스플라스크에 취한 후 10 mL 회석 용액을 가한다.
- 50 °C 수용상에서 1시간 동안 sonication 한다.
- 위의 sonication한 메스플라스크를 표선까지 메탄올로 맞춘다.
- 위의 시험용액을 0.45 μm 멤브레인 필터로 여과하여 시험용액으로 한다.

⑨ 최적 분리를 위한 이동상 용액의 농도를 위 표 2.과 같이 설정하여 위와 같이 전 처리 하여 측정 한 비타민나무의 크로마토그램을 위 그림 2-A와 같이 얻을 수 있었는데, 머무름 시간이 약 3분에서 10분과 30분에서 40분 사이에 90 %이상의 성분 피크가 나타나고 있음을 알 수 있다.

[그림 6-43. 비타민나무잎 열수추출물 크로마토그램 (머무름시간 0~60분)]



○ 그림 6-43의 비타민 나무 크로마토그램을 보면 머무름 시간(Retention time)이 0에서 50분 사이에 비타민 나무 성분에 해당하는 피크들이 나타나고 있음을 확인하였는데, 표 6-6.과 같은 Gradient 조건으로 설정할 경우 비타민 나무의 극성 및 비극성 성분들이 위와 같은 분석 조건에서 최적 분리 되어 나타남을 알 수 있었으며, 비타민 나무 최적 분리 Profiling 결과는 표 6-6.과 같은 설정 조건을 확립하였다.

(나) LC-MS-MS를 이용한 비타민 나무잎 열수추출물 생리활성 후보물질 탐색

① 비타민 나무의 후보 지표성분을 탐색하기 위해서 비타민 나무 열수 동결건조물을 LC-MS-MS를 이용하여 최적 분리 후 정성분석을 수행하였는데, 아래 표 3.은 LC-MS-MS의 기기 설정 및 분석 조건들이고, 표 6-7.는 비타민 나무 성분들이 Screening 위한 이동상 용매 조건을 나타내고 있다.

표 6-7. LC-MS-MS 기기 설정 및 분석 조건

Item	Condition
HPLC system	Agilent 6550 Q-TOF
Column	Agilent SB-Aq C18 (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm, Agilent, USA)
Flow rate	0.5 mL/min
Detector	QTOF : +AND - ESI mode
Column temperature	40℃
Injection volume	1 μL
<ul style="list-style-type: none"> <li>• ESI Source parameter</li> <li>• Mass range: 100 – 1000 m/z</li> <li>• ESI polarity: positive and negative ion mode</li> <li>• Scan rate: 4 spectra/sec.</li> <li>• Gas temp: 225 C</li> <li>• Gas flow: 13 L/min</li> <li>• Nebulizer: 35 si</li> <li>• Sheath gas temp.: 350C</li> <li>• Sheath gas flow: 11 L/min</li> <li>• Cap. Voltage: 4000v</li> <li>• Fragmentor: 175v</li> <li>• Skimmer: 65v</li> <li>• Octopole RF: 750 v</li> </ul>	

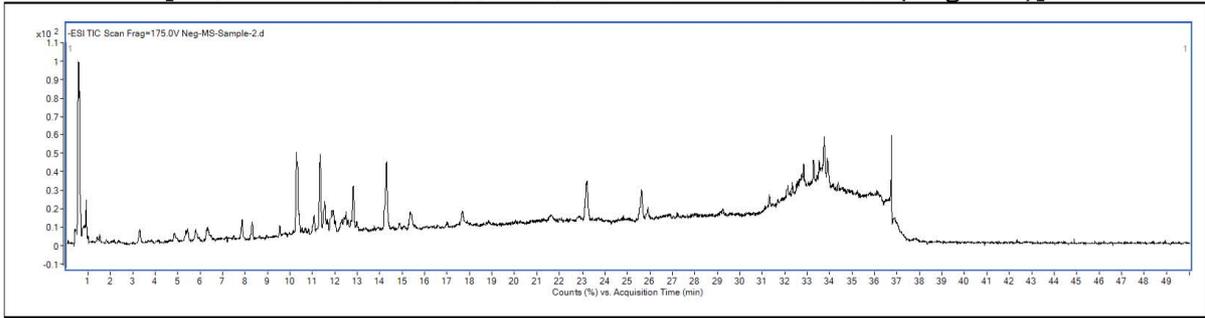
② LC-MS-MS 분석시 이동상 용매 A는 100% ACN, B는 100% Water가 사용되었으며, 이동상 용매의 gradient 조건은 아래 표와 같이 ACN의 농도를 10%에서 90%까지 약 3분에서 9분 동안 농도를 올려가며 초기 성분 분리를 시도하였다.

표 6-8. 이동상 용매의 농도 설정

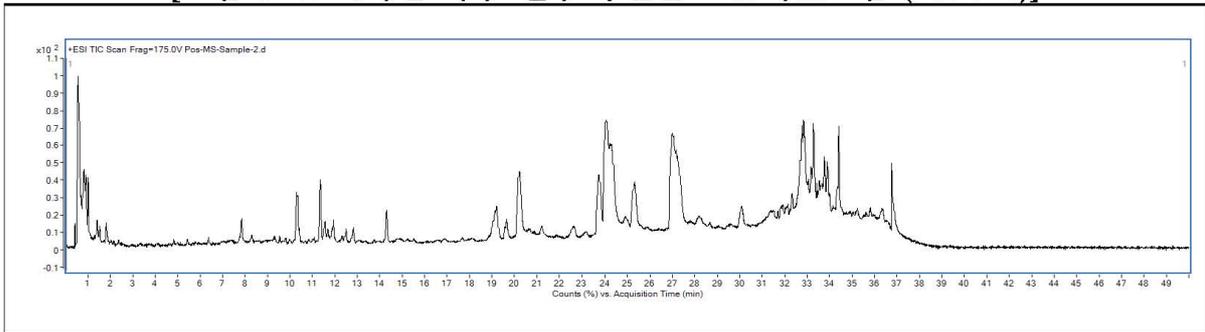
Time(min)	Solvent A (ACN)	Solvent B (Water)
2.00	2	98
30.00	50	50
33.00	90	10
36.00	90	10
36.10	2	98
40.00	2	98

③ 아래 그림 6-44는 LC-MS-MS로 측정된 비타민 나무 열수 추출물 크로마토그램이며 ESI (Electro spray ionization)의 Negative 및 Positive mode의 2가지 크로마토그램을 보여주고 있다.

[그림 6-44. 비타민 나무 열수 추출물 크로마토그램 (Negative)]



[그림 6-45. 비타민 나무 열수 추출물 크로마토그램 (Positive)]



④ 그림 6-44와 6-45는 비타민 나무 열수 잎 추출물의 Negative 이온 모드 및 Positive 이온 모드의 크로마토그램을 보여주고 있는데, 측정되어진 성분은 수소 이온을 포함하여 양이온화 되어있는 것과, 수소 이온이 떨어져 나가 음이온화 되어있을 때의 성분들의 크로마토그램의 차이를 확인할 수 있었다.

⑤ 비타민 나무 잎 열수 추출물의 Negative 및 Positive 이온의 크로마토그램의 경우 Positive 이온의 크로마토그램이 Negative 이온의 크로마토그램에 비해 더 많은 성분들의 피크가 탐색되었고, 전체적으로 Sensitivity는 낮은 결과를 나타내었다.

⑥ 비타민 나무 열수 잎 추출물 경우 극성 성분 및 비극성 성분들까지 많은 성분들이 탐색되어졌음을 알 수 있고, 열수 추출물의 경우 극성 성분에 비해 비극성성분의 탐색 비율이 낮음을 알 수 있는데, 열수로 추출된 성분들이 극성 성분들로 이루어져 있기 때문으로 판단 되었다.

⑦ 머무름 시간(Retention time)이 30분 이후의 성분들의 경우 이동상 용매로 사용된 아세트나이트릴 및 물만 흘러보낸 크로마토그램과 정확히 일치하여, 그 머무름 시간에 나타난 피크들의 경우 이동상 용매 피크임을 확인하였다.

⑧ 그림 6-44의 비타민 나무 잎 열수 추출물 크로마토그램에서 보는 바와 같이 다수의 극성 및 비극성 성분들이 피크가 나타나고 있기 때문에 많은 천연성분들이 존재하고 있음을 알 수 있고 이와 같은 성분들은 원료 및 제조과정, 제품의 표준화 확립에 비타민 나무 잎 열수 추출물 지표성분들로 설정할 수 있을 것으로 사료되어진다.

⑨ 아래 표 6-9은 LC-MS-MS를 이용하여 비타민 나무 잎 추출물을 측정된 크로마토그램들의 성분들을 확인하기 위해서 질량분석 크로마토그램을 분석하여 확립한 후보 지표성분들을 나타내었는데, Matrix effect의 영향을 작게 받는 물질을 이와 같은 비타민 나무 잎 열수 추출물 후보 지표성분들의 함량, 화학적 특징, 분석의 용의성 등을 검토하여 최종 지표성분을 설정할 것임.

⑩ Chrysin, Isorhamnetin, Quercetin, kaemperol, Myricetin, Protocatechuic acid,  $\rho$ -hydrobenzoic acid, vaillin acid, Salicylic acid,  $\rho$ -coumaric acid, cinnamic acid, caffeic acid 등 flavonol 및 simple phenol 등의 물질이 성분이 나타났다.

표 6-9. 비타민 나무 열수 잎 추출물의 후보 지표성분

	후보 지표성분 명	질량 (m/z)	Formula	Score
1	Chrysin	254.24	C15 H10 O4	99.96
2	Isorhamnetin	316.26	C16 H12 O7	99.91
3	Quercetin	302.236	C15 H10 O7	99.84
4	Kaemperol	286.23	C15 H10 O6	99.78
5	Myricetin	318.24	C7 H6 O4	99.74
6	Protocatechuic acid	154.12	C7 H6 O4	99.73
7	$\rho$ -hydrobenzoic acid	138.12	C7 H6 O3	99.57
8	Vanillin acid	168.14	C8 H8 O4	99.09
9	Salicylic acid	138.12	C7 H8 O3	98.52
10	$\rho$ -Coumaric acid	164.16	C9 H8 O3	97.62
11	Cinnamic acid	148.15	C9 H8 O2	91.94
12	Caffeic acid	180.16	C9 H8 O4	87.84

⑪ 비타민 나무 잎 열수 추출물 중 HPLC profiling 및 MS-MS data를 비교 분석 하여 선택되어진 Quercetin, Isorhamnetin, kaempferol 3가지 후보 지표성분들의 분석법 Validation을 확립하기 위해 표준용액 제조를 통한 검정선 확립, 확립된 검정선의 견고성을 검증하는 실험 및 원료와 제조공정 중 지표성분 함량 모니터링 등, 확정된 지표성분의 Robustness 연구가 필요할 것으로 판단 되어진다.

(다) 생리활성 최종후보 물질인 kaempferol과 isorhamnetin의 표준용액 머무름 시간과 크로마토그램 비교

▷isorhamnetin

① 지표성분 표준시료는 비타민 나무 잎 열수 추출물을 전처리 한 후과 같이 각각의 표준시료 10 mg을 100 % MeOH으로 10 mL-volumetric flask에 증용한 후 0.45 μM membrane filter로 여과시켜 HPLC 분석을 위한 시료를 준비 하였다. 제조된 표준원료는 -70 °C에서 냉동보관 함.

② Isorhamnetin, Kaempferol 표준용액 1000 ppm의 stock solution을 이용하여 순차적으로 100 ppm, 50 ppm, 25 ppm, 10 ppm으로 조제한 뒤 비타민 나무 열수 추출물 시험용액과 동일한 HPLC 조건으로 분석함. 지표성분 분석은 Isorhamnetin, Kaempferol 순으로 분석을 실시 함.

③ 아래 그림 6-46, Isorhamnetin 표준용액의 농도별 머무름 시간을 비교한 크로마토그램이다. (A)는 정성분석을 위한 표준용액 크로마토그램이고, (B)는 정량분석을 위한 Isorhamnetin 표준용액의 크로마토그램과 비타민나무 열수 추출물의 크로마토그램 을 보여주고 있다.

④ 그림 6-46, (A)에서 Isorhamnetin의 retention time은 40.073분대로 (B)와 동일한 sepectrum을 보여주고 있으며, 표준용액 크로마토그램과 비타민나무 열수추출물 크로마토그램 (B)에서는 retention time의 일치와 표준물질 농도가 이에서 보여주는 바와 같이 일정한 반복성 및 Isorhamnetin 표준물질과 비타민 나무 열수 추출물 피크의 머무름 시간과 정확한 일치 나타내고 있다.

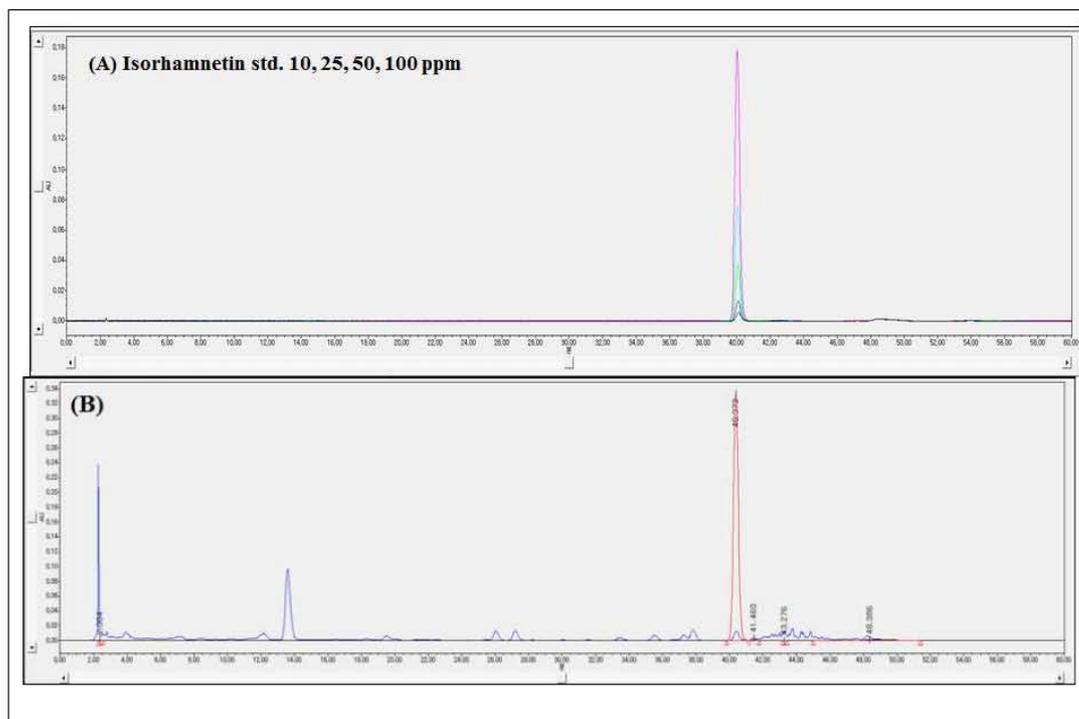
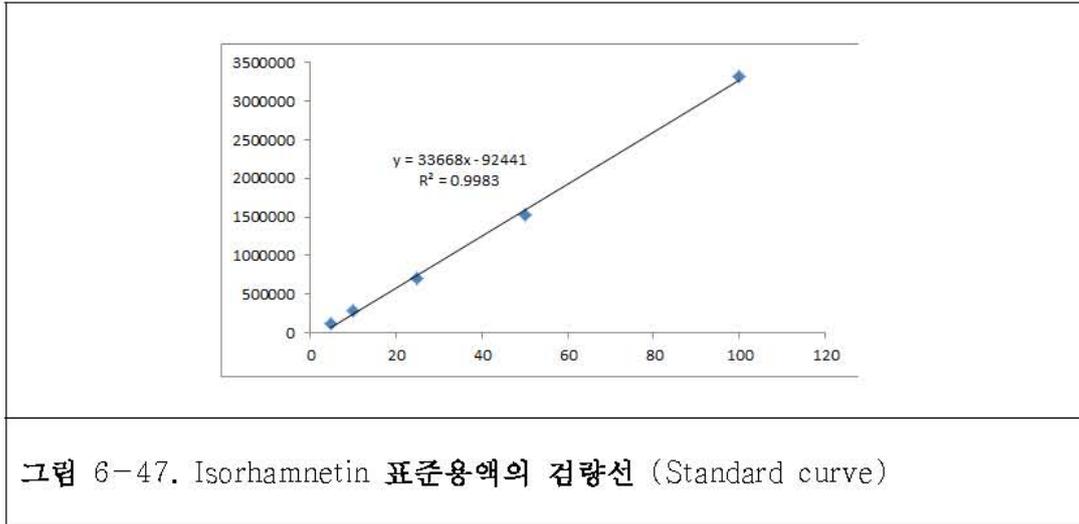


그림 6-46. Isorhamnetin 표준용액 10, 25, 50, 100 ppm (A) 비타민나무 잎 열수 추출물 및 Isorhamnetin (B) 크로마토그램의 머무름 시간 비교

⑤ 검량선(Standard curve) 작성을 위해 표준물질의 Purity값인 97%으로 보정한 뒤 10 ppm, 25 ppm, 50 ppm, 100 ppm의 4point로 회석하여 분석하였다. Isorhamnetin의 함량을 구하기 위하여 표준용액의 크로마토그램으로부터 얻은 peak의 농도별 면적(area)에 대하여 검량선을 작성하였다. 검량선 대한 결과는  $y=33668x-92441$ ,  $R^2=0.9983$ 으로 좋은 선형성을 보였으며 그래프는 아래 그림과 같다. 이는 Isorhamnetin 표준용액이 농도별로 정확하게 회석되었음을 나타내준다.



⑥ 비타민나무 열수 추출물의 Isorhamnetin 함량 계산을 하기 위해, 계산식은 아래와 같다

[계산]

$$\text{Isorhamnetin content (ug}\cdot\text{g}^{-1}) = S \times (A \times B) / \text{Sample(g)} \times 100$$

A : 시험용액의 전량 (mL)

B : 시료용액의 회석배수

S : 시험용액중의 Isorhamnetin의 농도 (ug/mL)

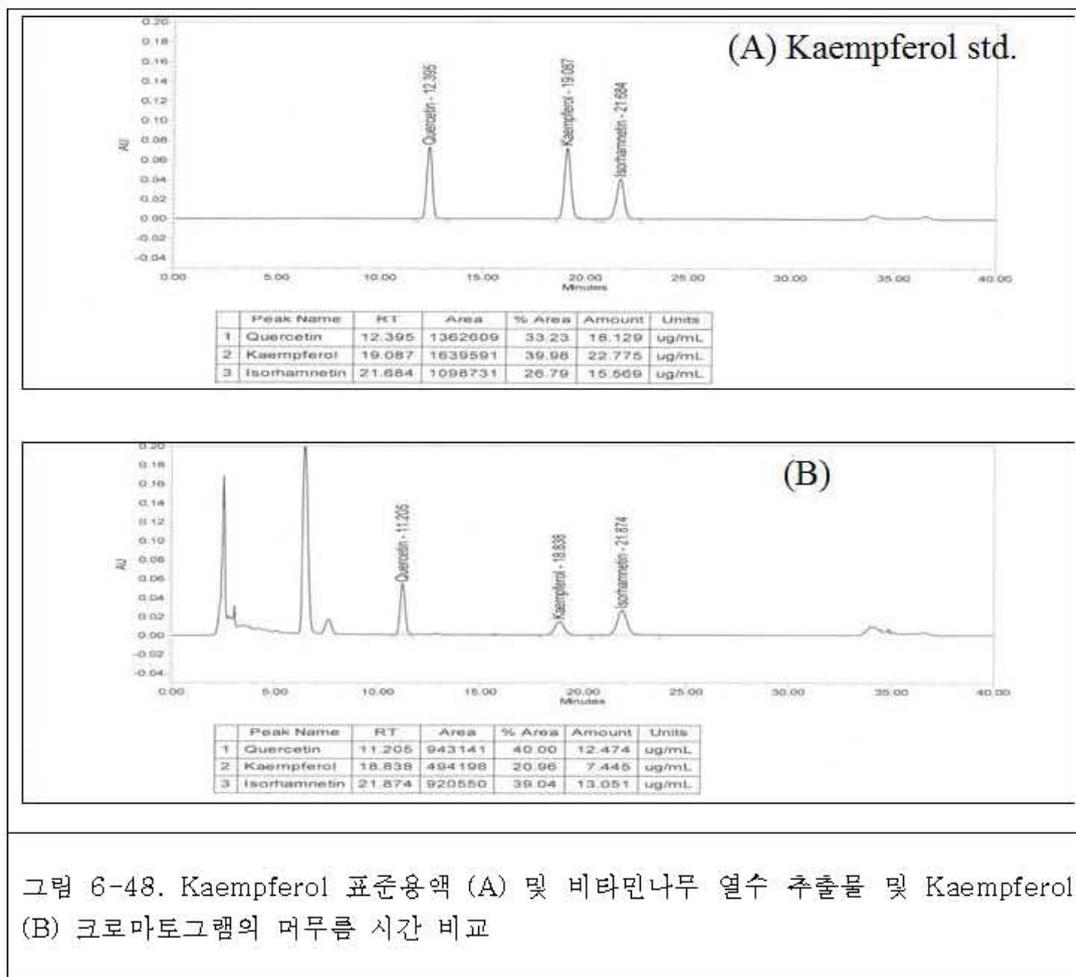
⑦ 위 계산식을 이용하여 비타민나무 열수추출물의 Isorhamnetin 함량 계산 결과 아래와 같다.

실험방법	실험결과 (Isorhamnetin, 단위 mg/g)			평균 (mg/g)
	1 Lot	2 Lot	3 Lot	
비타민나무 추출물	0.613	0.678	0.630	0.640

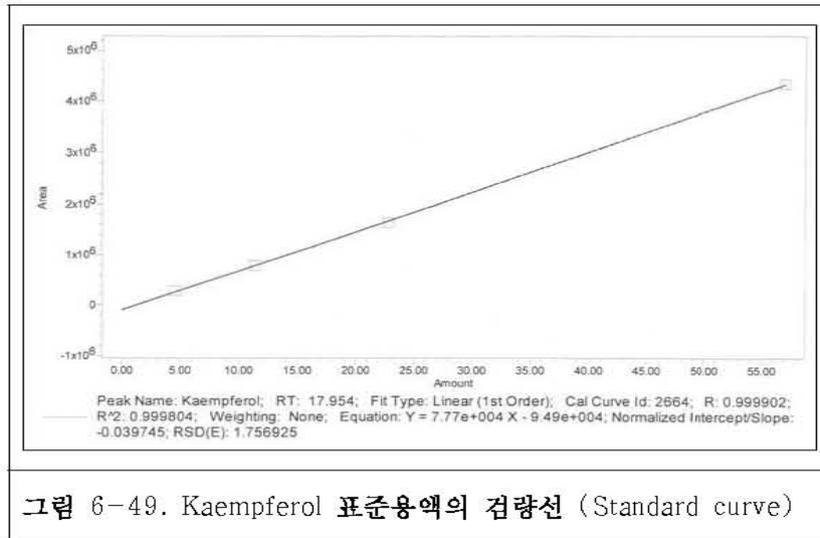
▷Kaempferol

① 아래 그림 6-48, Kaempferol 표준용액의 농도별 머무름 시간을 비교한 크로마토그램이다. (A)는 정성분석을 위한 표준용액 크로마토그램이고, (B)는 정량분석을 위한 비타민 나무 열수 추출물의 크로마토그램 을 보여주고 있다.

② 그림 6-48, (A)에서 Kaempferol의 retention time은 19.087분대로 (B)와 동일한 sepectrum을 보여주고 있으며, 표준용액 크로마토그램과 비타민나무 열수추출물 크로마토그램 (B)에서는 retention time의 일치와 표준물질 농도가 이에서 보여주는 바와 같이 일정한 반복성 및 Kaempferol 표준물질과 비타민 나무 열수 추출물 피크의 머무름 시간이 비슷하게 나타내고 있다. 아래의 그림에서 표준물질과 열수 추출물의 머무름 시간이 조금 차이가 나는 것은 열수 추출물의 다른 피크의 영향으로 약간의 차이나 나는 것 같다.



③ 검량선(Standard curve) 작성을 위해 표준물질의 Purity값인 97%으로 보정한 뒤 5 ppm, 10 ppm, 20 ppm, 50 ppm의 4point로 희석하여 분석하였다. Kaempferol의 함량을 구하기 위하여 표준용액의 크로마토그램으로부터 얻은 peak의 농도별 면적(area)에 대하여 검량선을 작성하였다. 검량선 대한 결과는  $y=40670x-178291$ ,  $R^2=0.9991$ 으로 좋은 선형성을 보였으며 그래프는 아래 그림과 같다. 이는 Kaempferol 표준용액이 농도별로 정확하게 희석되었음을 나타내준다.



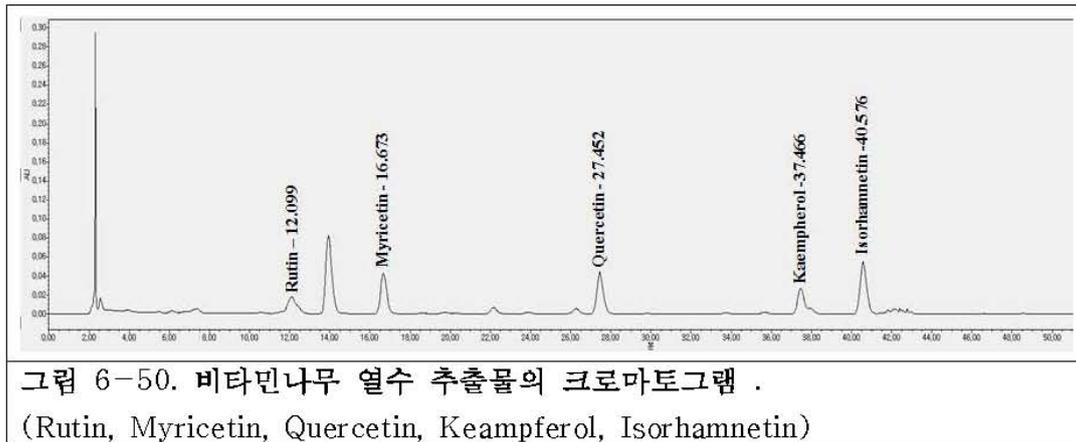
⑤ 위 계산식을 이용하여 비타민 나무 Kaempferol 함량 계산 결과 아래와 같다.

실험방법	실험결과 (Kaempferol, 단위 mg/g)			평균 (mg/g)
	1 Lot	2 Lot	3 Lot	
비타민나무 추출물	2.730	2.722	2.723	2.725

⑤ 외에도 추가적 비타민나무잎 열수추출물의 생리활성 후보물질인 Rutin, Myricetin을 확인하기 위해 전 처리 방법을 다음과 같이 HPLC 진행하였다.

- 희석용액 (에탄올 : 물 : 염산 = 50 : 20 : 8, v/v/v) 200 mL 메스실린더에 에탄올 100 mL를 넣은 후 증류수 40 mL를 넣고, 조심스럽게 HCl 16 mL를 넣는다.
- 비타민 나무 열수 추출물을 약 300 mg을 칭량하여 50 mL 메스플라스크에 취한 후 10 mL 희석 용액을 가한다.
- 50 °C 수용상에서 1시간 동안 sonication 한다.
- 위의 sonication한 메스플라스크를 표선까지 메탄올로 맞춘다.
- 위의 시험용액을 0.45 μm 멤브레인 필터로 여과하여 시험용액으로 한다.

⑥ 아래 그림은 6-50, Rutin 및 Myricetin의 성분 피크를 retention time 12.099, 16.673 분대에 확인 할 수 있었다. 비타민나무 열수 추출물의 크로마토그램에서 Rutin, Myricetin, Quercetin, Kaempferol, Isorhamnetin의 성분피크를 보여주고 있다.



## 마. 비타민나무 생리활성 물질 및 활성기작 규명

### (1) 실험방법

#### (가) Glucocorticoid 유도 뇌신경세포 손상 모델에서의 비타민나무 단일물질의 보호효과 비교 및 탐색

##### ① 비타민나무 생리활성 단일물질의 사용 세포주 최대안전범위 설정

- 각 시료를 대상으로 MTT를 이용한 cell cytotoxicity를 측정하였다. SH-SY5Y cell (neuroblastoma, human dopaminergic neuronal cell)을 1% antimicrobics/antibiotics와 10% FBS를 함유한 RPMI-1640 배지에서 배양하고 96-well plate에 세포수가  $10^4$ - $10^6$  cell/ml가 되도록 seeding 한 후 24시간 지난 후에 각각의 시료를 농도별로 처리하였다. 시료 처리 24시간 후, MTT test로 세포 생존율을 측정하였다.

##### ② Glucocorticoid 유도 뇌신경세포 손상 모델에서의 비타민나무 단일물질의 보호효과 비교 및 탐색

- 실험 세포주(SHSY-5Y cell line)를 96well microplate에  $2.5 \times 10^5$  cell/well 수준으로 분주하여 24시간 후 배양액을 새로 교체하고 1 mM 콜티코스테론(Corticosterone)을 첨가하여 세포독성을 유발시킨 후, 각 실험시료를 농도별로 첨가하여 24시간 배양 시켰다. 배양이 끝난 세포의 생존율은 MTT assay를 이용하여 측정하였다.

#### (나) 뇌신경세포 세로토닌 수용체 활성 조절 (cAMP) 모델에서의 비타민나무 단일물질의 보호효과 비교 및 탐색

##### ① 비타민나무 생리활성 단일물질의 사용 세포주의 최대안전범위 설정

- 각 시료를 대상으로 MTT를 이용한 cell cytotoxicity를 측정하였다. 세포주는 human serotonin 5-HT6 receptor gene 발현된 stably Human astrocytoma 1321N1 cells를 이용하였고, 세포를 24시간 배양 후 상등액 배지를 제거하고 phosphodiesterase inhibitors

IBMX (0.5 mM) 와 Ro 20-1724 (0.1 mM)를 포함한 PBS 로 배지 교체 후 시료를 농도 별로 처리한 뒤, 24시간 후, MTT test로 세포 생존율을 측정하였다.

② 뇌신경세포 세로토닌 수용체 활성 조절 (cAMP) 모델에서의 비타민나무 생리활성 단일물질의 보호효과 비교 및 탐색

- stably Human astrocytoma 1321N1 cells를 이용하였고, 세포를 24시간 배양 후 상등액 배지를 제거하고 phosphodiesterase inhibitors IBMX (0.5 mM) 와 Ro 20-1724 (0.1 mM)를 포함한 PBS 로 배지 교체 후 각 시료와 serotonin (5-HT) 100 $\mu$ M를 15분 동안 동시 처리후 lysis한 시료를 R&D Systems cAMP Assay kit 실험 방법에 따라 활성 측정하였다.

(다) 과잉신경세포 흥분에 의한 신경 손상 *in vitro* 모델에서의 비타민나무 단일물질의 보호효과 비교 및 탐색

① 비타민나무의 부위, 지역, 용매별 추출물의 사용 세포주의 최대안전범위 설정

- 임신만삭의 SD rat에서 태아를 꺼낸 후, 단두하여 뇌를 분리하고 현미경을 이용하여 해마를 분리하고 poly-L-lysine이 코팅된 48 well에 세포를 배양하였다. 배양 4일째 되는 날 배지의 일부를 glutamate가 없는 배지로 바꿔주고 배양 7일째 되는 날 시료를 농도별로 처리한 뒤, 24시간 후 MTT test로 세포 생존율을 측정하였다

② 과잉신경세포 흥분에 의한 신경 손상 *in vitro* 모델에서의 비타민나무의 보호효과 비교 및 탐색

- 임신만삭의 SD rat에서 태아를 꺼낸 후, 단두하여 뇌를 분리하고 현미경을 이용하여 해마를 분리하고 poly-L-lysine이 코팅된 슬라이드에 세포를 배양하였다. 배양 4일째 되는 날 배지의 일부를 glutamate가 없는 배지로 바꿔주고 배양 7일째 되는 날 실험을 수행하였다. 슬라이드를 magnesium free HEPES buffer로 2회 washing 후 Fura-2, AM (1 $\mu$ M)을 처리한다(1시간, 실온). Magnesium이 들어있는 HEPES buffer로 2회 washing 후 magnesium free HEPES buffer를 채워 30분 간 실온에서 보관하였다. 슬라이드를 조각내어 일부를 옮겨 340/380nm 빛을 이용해 세포내 칼슘 양을 측정하고 magnesium free HEPES buffer를 5분간 흘려주고 NMDA(100 $\mu$ M)를 10초간 흘려준 값을 control로 사용하고 antagonist인 D-AP5(250 $\mu$ M)를 1분간 흘려주고 NMDA (100 $\mu$ M)와 D-AP5 또는 시료를 동시에 10초 흘려주어 억제되는지 확인한 후, 다시 magnesium free HEPES buffer를 5분간 흘려주고 NMDA(100 $\mu$ M)를 10초간 흘려주어(2번~3번) 회복되는지를 확인한 후 실험에 이용하였다.

(라) Electric Foot Shock model을 이용한 생리활성 물질의 정신적 피로활성 평가

① 실험동물

- 5주령의 ICR 마우스 (male)을 구입한 후 6일 동안 동물사육실의 환경 하에서 검역 및 순화시키면서 일반 건강상태를 관찰한 후, 건강한 개체를 선별하여 시험에 사용하였다. 개체식별은 유성매직을 이용하여 각 개체번호 꼬리에 표시하며, 사육상자는 시험번호, 시험물질명, 시험항목, 입수일, 순화기간, 군분리일, 시험기간, 성/동물번호 및 시험책임자를 기재한 개체식별카드를 부착하여 식별하였다. 순화기간 중 이상이 발생한 개체와 정상적으로 체중이 증가하지 않은 개체를 제외한 후, 각 군간 평균체중 및 표준편차가 균일하도록 군분리를 실시하였다.

② 사육환경

- 본 시험의 환경은 온도 (22 ± 3) °C, 상대습도 (50 ± 20) %, 환기횟수 (10 ~ 15) 회/시간, 조명주기 12시간 (8:00 ~ 20:00), 조도 (150 ~ 300) Lux의 사육환경으로 설정된 동물사육실에서 사료와 음용수를 급여하여 사육하며, 순화 및 시험기간 동안 격리 사육을 실시하였다.

③ 시험군의 구성

Group	시험물질	Dose (mg/kg B.W.)	Sex	No. of animal
Nomal	Saline	0	Male	1001~1010
Control	Saline	0	Male	2001~2010
Diazepam	Diazepam (I.P.)	2	Male	3001~3010
Teanin	Teanin	4	Male	4001~4010
HR-100	비타민나무(잎) 열수 추출물	100	Male	5001~5010
HR-200	비타민나무(잎) 열수 추출물	300	Male	6001~6010
KP-10	Kaempferol	10	Male	7001~7010
KP-50	Kaempferol	50	Male	8001~8010

③ 시험물질 투여

- 순화 및 군분리 후 시험물질을 시험기간 동안 각 농도별로 매일 동일시간에 경구투여 하였으며, 대조군은 동일 부피의 saline을 투여하였다.

④ 일반증상 관찰

- 전 개체에 대하여 매일 1회 이상, 시험물질투여 후 15일 동안 일반증상관찰을 실시하였다.

⑤ 체중변화

- 체중은 입수시, 군분리시, 시험물질투여 후 15일 동안 5일에 1회 측정하였다.

⑦ Electric Foot Shock model

- 실험동물에 스트레스를 유도하는 방법으로서 electric foot shock 방법을 이용하였다. 시험물질 투여 종료 후 electric foot shock을 30분간 5초 간격으로 1초간 0.6 mA의 전기 충격을 가하여 스트레스를 유도한 후 마우스를 부검, 혈액 및 뇌를 적출하였다.

⑨ 부검

- 실험 마지막 날 경구 투여 후 3시간 전에 식이를 제거하고 에테르 마취하에 해부를 하였다. 각각의 mouse에서 대퇴근, 비복근을 채취하였고, 대정맥에서 혈액을 채취하여 3,000 rpm에서 원심분리 후 혈청만 분리하였다. 조직은 액체질소에 즉시 보관하여 실험에 이용하였다.

⑩ 혈액 및 뇌 조직 이용한 생화학적 분석

- 부검 후 적출한 뇌 조직은 질소가스로 냉각시켜 막자사발을 이용해 powder 형태로 만들어 -70°C에 보관하며 사용하였으며 Dopamine (Dopamine ELISA Kit, Abnova Corp., Cat# KA1887, Taipei City, Taiwan), Norepinephrine (Norepinephrine ELISA Kit, Abnova Corp., Cat# KA1891, Taipei City, Taiwan), Serotonin (Serotonin ELISA Kit, Abnova Corp., Cat# KA1894, Taipei City, Taiwan), Corticosterone (Corticosterone ELISA Ki, Abnova Corp., Cat# KA0468, Taipei City, Taiwan)은 각각의 kit를 사용하여 제조사에서 제공한 실험방법에 따라 분석 하였다.

(2) 실험결과

(가) Glucocorticoid 유도 뇌신경세포 손상 모델에서의 비타민나무 단일물질들의 보호효과 비교

① Glucocorticoid 유도 뇌신경세포 손상 모델에서의 비타민나무 단일물질들(chrysin, isorhamnetin, quercetin, kaempferol, myricetin, protocatechuic acid, p-hydroxybenzoic acid, vanillic acid, salicylic acid, p-coumaric acid, cinnamic acid, caffeic acid)의 보호효과 비교

- 실험에 앞서 설정한 최대 안전범위인 50 uM 농도에서 본 실험을 수행 하였다. Fig. 6-51에서 보는 바와 같이, corticosterone을 24시간 동안 처리하자 무처리군인 Control 군과 대비하여 세포 생존도가  $54.31 \pm 6.20\%$ 로 유의적으로 크게 감소함을 확인 하였다 ( $P < 0.001$ ). 하지만 corticosterone과 함께, 각 시료들을 처리 하였을 때, chrysin, isorhamnetin, quercetin, kaempferol, myricetin, protocatechuic acid, p-hydroxybenzoic acid, vanillic acid, salicylic acid, p-coumaric acid, cinnamic acid, 그리고 caffeic acid 모두 세포생존도가 유의적으로 증가한 것을 확인하였다. 그 중에서도 kaempferol의 경우,  $83.33 \pm 5.81\%$  로서 가장 높은 보호효과를 보였으며, quercetin ( $75.14 \pm 5.03\%$ ), myricetin ( $76.32 \pm 6.11\%$ ), p-hydroxybenzoic acid ( $75.04 \pm 5.31\%$ ), p-coumaric acid ( $74.44 \pm 7.01\%$ ), cinnamic acid ( $73.31 \pm 6.11\%$ ), caffeic acid ( $74.43 \pm 5.48\%$ ) 또한 동등한 보호효과를 보였다. 그 다음으로 chrysin, protocatechuic acid, vanillic acid, 그리고 salicylic acid 순으로 보호효과 활성을 확인하였다.

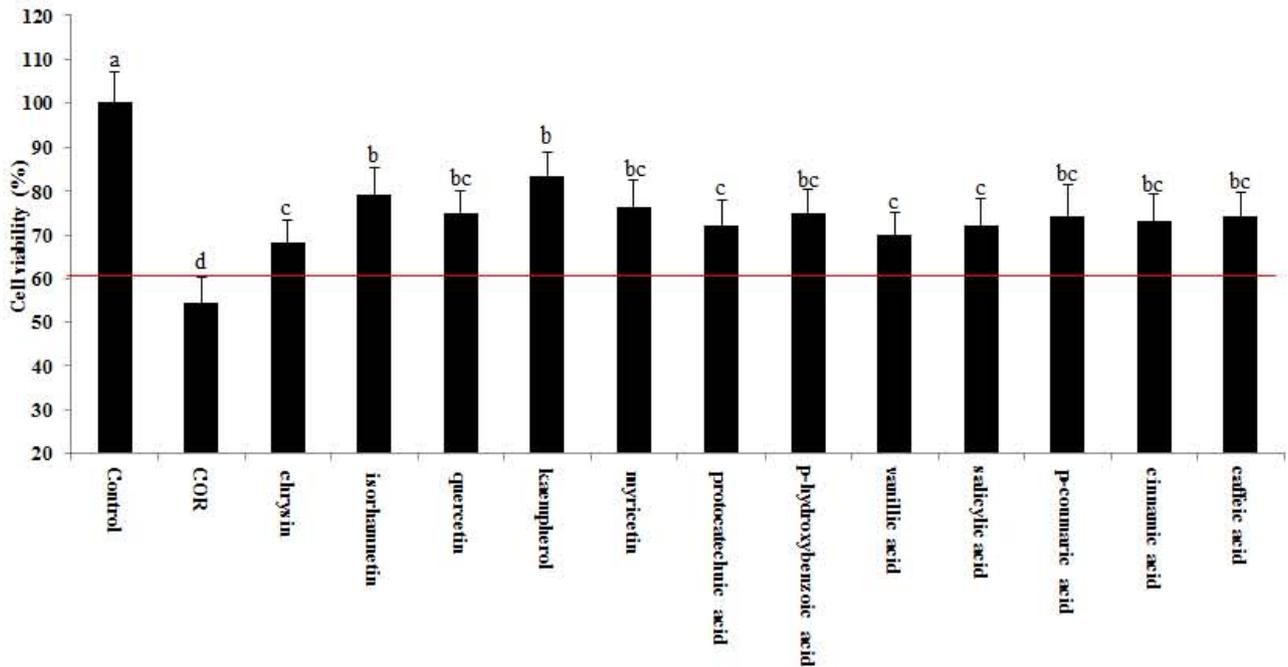


Fig. 6-51. Protective effects of compounds from *Hippophae rhamnoides* against corticosterone-induced toxicity on SH-SY5Y cells. The different letters above bars are significant different basec ANOVA at  $p < 0.05$ . Data expressed as means  $\pm$  SD.

(나) 뇌신경세포 세로토닌 수용체 활성 조절 (cAMP) 모델에서의 비타민나무 단일물질들의 보호효과 비교 및 탐색

② 뇌신경세포 세로토닌 수용체 활성 조절 (cAMP) 모델에서의 비타민나무 단일물질들 (chrysin, isorhamnetin, quercetin, kaempferol, myricetin, protocatechuic acid, p-hydroxybenzoic acid, vanillic acid, salicylic acid, p-coumaric acid, cinnamic acid, caffeic acid)의 보호효과 비교

- 실험에 앞서 설정한 최대 안전범위인 50  $\mu$ M 농도에서 본 실험을 수행 하였다. Fig. 6-52에서 보는 바와 같이, 5HT(serotonin)만을 처리 하였을 때, cAMP의 발현 정도를 0 이라 하고, 시료를 같이 처리 하였을 때, cAMP의 발현정도 (억제율)를 측정하였다. 비타민 나무 단일물질들(chrysin, isorhamnetin, quercetin, kaempferol, myricetin, protocatechuic acid, p-hydroxybenzoic acid, vanillic acid, salicylic acid, p-coumaric acid, cinnamic acid, caffeic acid)은 5HT6 수용체에 있어 serotonin과 agonist 효과 보다는 antagonist의 경향을 뚜렷하게 보였으며, 그 중에서도 kaempferol의 경우,  $70.66 \pm 6.12\%$  로서 가장 높은 억제효과를 보였으며, chrysin ( $60.12 \pm 5.03\%$ ), isorhamnetin ( $76.32 \pm 3.12\%$ ), myricetin ( $63.33 \pm 4.03\%$ ), caffeic acid ( $62.31 \pm 5.40\%$ ) 또한 동등한 보호효과를 보였다. 그 다음으로 quercetin ( $58.03 \pm 4.06\%$ ) 순으로 5HT6 수용체에 있어 antagonist 활성을 확인하였다.

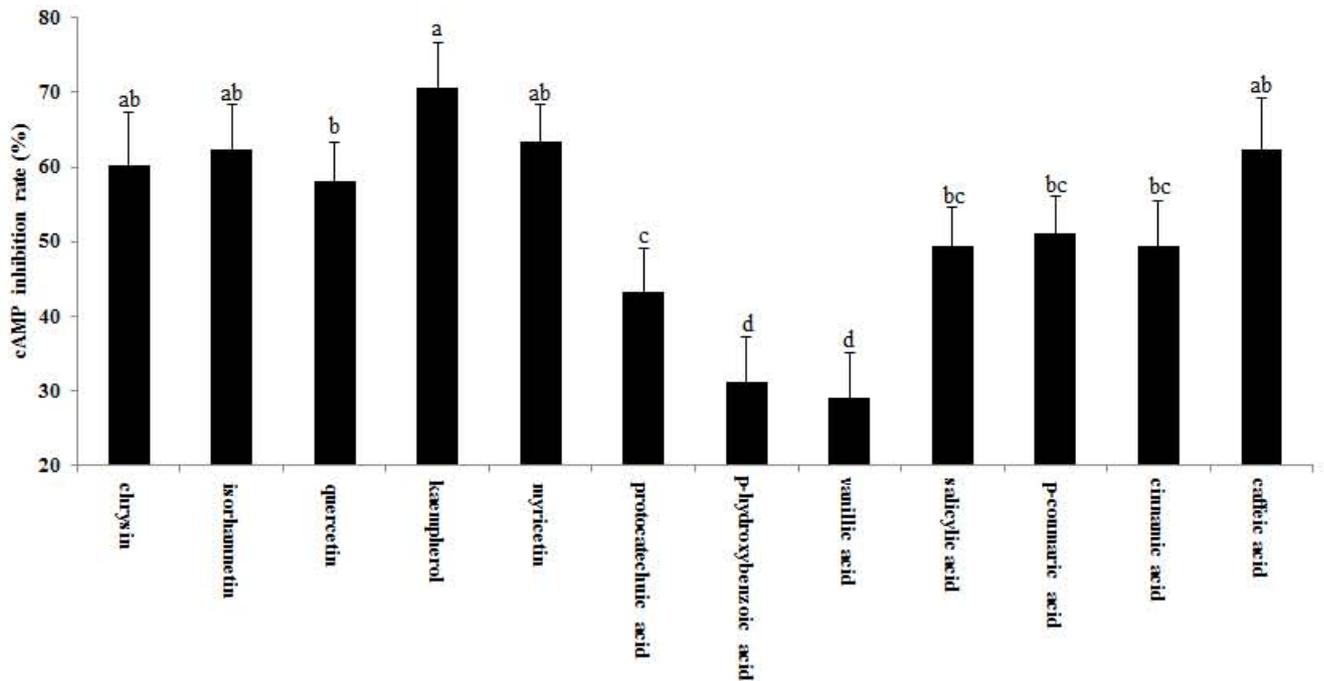


Fig. 6-52. inhibitory effects of compounds from *Hippophae rhamnoides* on 5HT-induced cAMP express in human astrocytoma 1321N1 cells. The different letters above bars are significant different based ANOVA at  $p < 0.05$ . Data expressed as means  $\pm$  SD.

**(다) 과잉신경세포 흥분에 의한 신경 손상 *in vitro* 모델에서의 비타민나무 단일물질들의 보호효과 비교 및 탐색**

① 과잉신경세포 흥분에 의한 신경 손상 *in vitro* 모델에서의 비타민나무 단일물질들 (chrysin, isorhamnetin, quercetin, kaempferol, myricetin, protocatechuic acid, p-hydroxybenzoic acid, vanillic acid, salicylic acid, p-coumaric acid, cinnamic acid, caffeic acid)의 보호효과 비교

- 실험에 앞서 설정한 최대 안전범위인 50  $\mu$ M 농도에서 본 실험을 수행 하였다. NMDA를 처리하였을 때,  $Ca^{2+}$ 이 유입되며 antagonist drug인 D-AP5를 처리 하고 NMDA를 처리 하였을 때는  $Ca^{2+}$ 의 유입이 100% 억제됨을 확인한 후, 본 실험을 진행하였다. NMDA와 함께 각 시료들을 처리 하였을 때, chrysin, isorhamnetin, quercetin, kaempferol, myricetin, protocatechuic acid, p-hydroxybenzoic acid, vanillic acid, salicylic acid, p-coumaric acid, cinnamic acid, 그리고 caffeic acid 모두  $Ca^{2+}$  유입 억제능을 보였다. 그 중에서도 kaempferol의 경우,  $59.42 \pm 5.81\%$  로서 가장 높은  $Ca^{2+}$  유입 억제능을 보였으며, 그 다음으로 isorhamnetin ( $46.32 \pm 3.15\%$ ), caffeic acid ( $47.77 \pm 5.48\%$ ) 순으로  $Ca^{2+}$  유입 억제능을확인하였다.

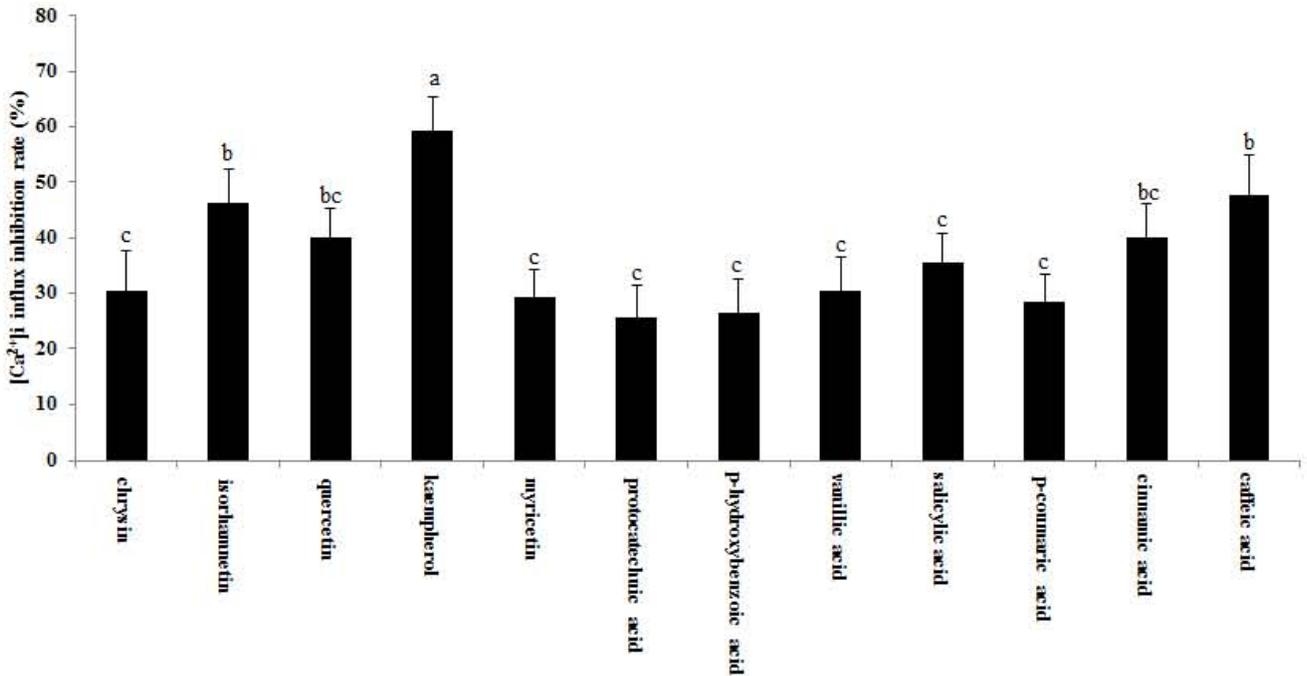


Fig. 6-53. inhibitory effects of compounds from *Hippophae rhamnoides* against NMDA-induced Ca<sup>2+</sup> influx on primary hippocampal neuron cells. The different letters above bars are significant different basec ANOVA at  $p < 0.05$ . Data expressed as means  $\pm$  SD.

#### (라) Electric Foot Shock model을 이용한 비타민나무 열수 추출물과 kaempferol의 정신적 피로활성 평가

##### ① Electric Foot Shock 후, 우울증 지표 행동변화 평가

– Electric Foot Shock로 정신적 스트레스를 가한 후, 비타민나무열 열수 추출물과 활성물질 kaempferol이 행동변화에 미치는 영향을 측정하였다. 스트레스 처리 후 ( $47.42 \pm 4.21$  sec), 실험동물은 극심한 스트레스 유발로 수중에서의 수영 부동자세인 immobility time이 유의적으로 크게 증가하였으며 ( $p < 0.001$ ), 시료처리군인 HR-100 ( $39.44 \pm 3.42$  sec,  $p < 0.05$ ), HR-300 ( $31.15 \pm 3.41$  sec,  $p < 0.01$ ), KP-10 ( $34.42 \pm 2.89$  sec,  $p < 0.01$ ) 그리고 KP-50군 ( $26.46 \pm 2.84$  sec,  $p < 0.001$ )의 경우 스트레스군인 control군과 비교하여 유의적으로 immobility time이 감소한 것을 확인하였다. 그리고 HR-300군과 KP-50군의 경우 기인정소제인 L-theanine ( $37.33 \pm 3.24$  sec)과 비교하여 유의적으로 immobility time이 감소한 것을 확인하였다 (Fig. 6-54). 그리고 반대지표로서 수중에서 살고자 하는 의욕이 내포되어 있는 행동 지표인 climbing time의 경우 감소하였던 스트레스군에 비해 시료처리군인 HR-100 ( $21.33 \pm 3.94$  sec,  $p < 0.05$ ), HR-300 ( $25.47 \pm 3.41$  sec,  $p < 0.01$ ), KP-10 ( $26.31 \pm 3.94$  sec,  $p < 0.01$ ) 그리고 KP-50군 ( $30.14 \pm 3.41$  sec,  $p < 0.001$ )의 경우 유의적으로 climbing time이 증가한 것을 확인하였다. 또한 KP-50군의 경우 기인정소제인 L-theanine ( $25.61 \pm 3.24$  sec,  $p < 0.05$ ) 과 비교하여 유의적으로 climbing time이 증가하였다 (Fig. 6-55).

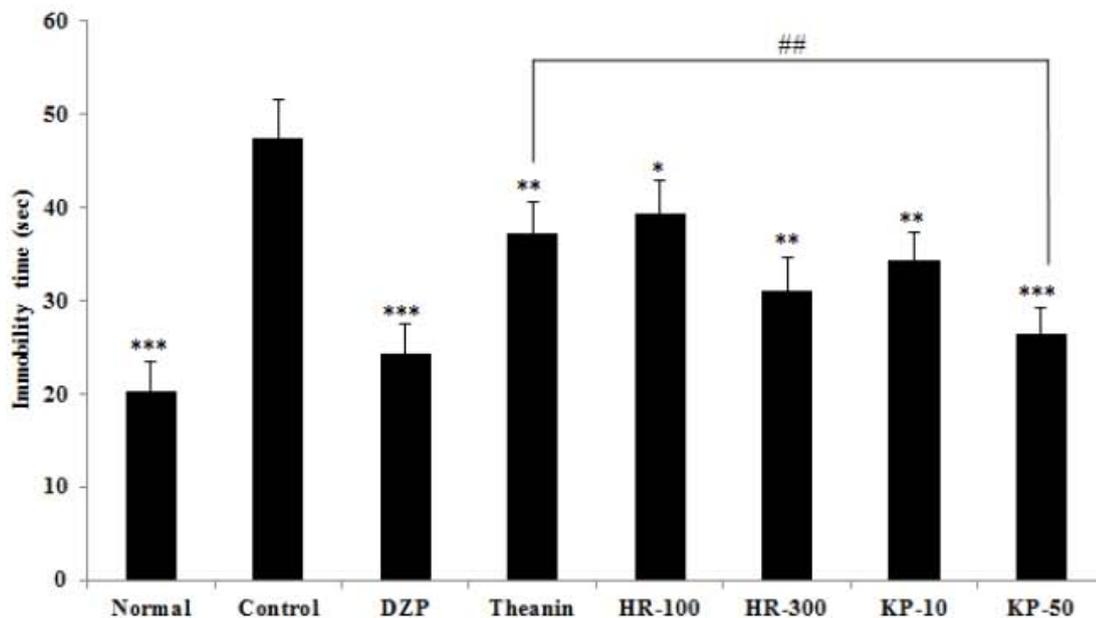


Fig 6-54. Effects of water extract and kaempferol from *Hippophae rhamnoides* L. on immobility time in forced swimming test.

The data express the mean latency  $\pm$  S.D. \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*  $P < 0.05$ , significantly different from the control group. #  $P < 0.05$ , significantly different from the L-theanine group. Statistical significance was tested with an unpaired Student's  $t$ -test.

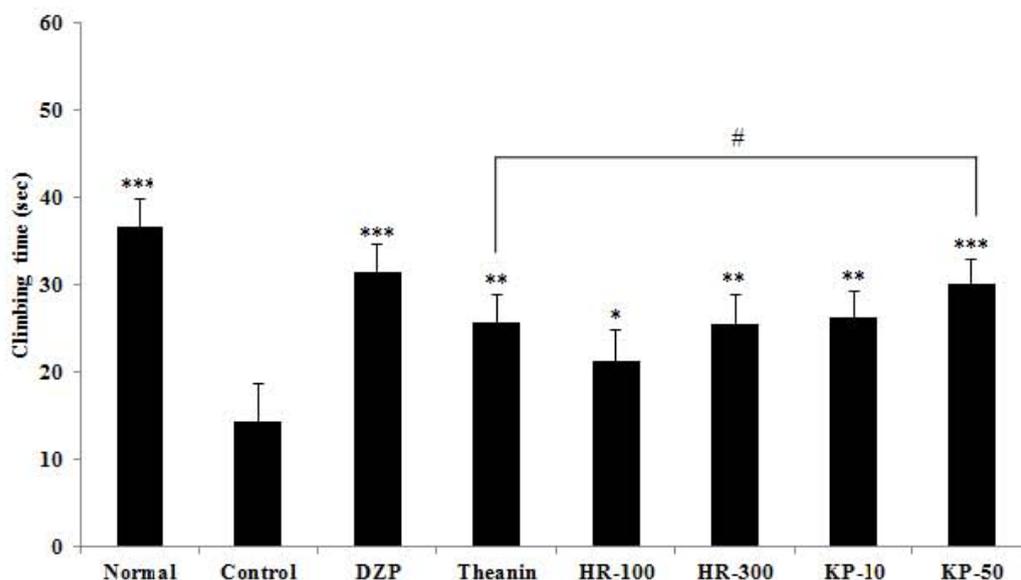


Fig 6-55. Effects of water extract and kaempferol from *Hippophae rhamnoides* L. on climbing time in forced swimming test.

The data express the mean latency  $\pm$  S.D. \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*  $P < 0.05$ , significantly different from the control group. #  $P < 0.05$ , significantly different from the L-theanine group. Statistical significance was tested with an unpaired Student's  $t$ -test.

① Electric Foot Shock 후, serum과 brain (hippocampus) 에서의 모노아민류 (dopamine, 5-HT, 그리고 Norepinephrine) 함량 변화 평가

- Electric Foot Shock로 정신적 스트레스를 가한 후, 비타민나무잎 열수 추출물과 활성물질 keampherol이 Serum과 brain (hippocampus) 에서의 모노아민류 (dopamine, 5-HT, 그리고 Norepinephrine) 함량 변화에 미치는 영향을 평가하였다. 스트레스 유발 후, serum에서의 5-HT 함량은  $10.33 \pm 2.46$  ng/mg protein으로서 무처리군 ( $21.31 \pm 2.11$  ng/mg protein)과 비교하여 유의적으로 감소하였으며, HR-300군 ( $17.12 \pm 3.14$  ng/mg protein)과 KP-10 ( $19.14 \pm 4.12$  ng/mg protein), KP-50군 ( $24.12 \pm 3.12$  ng/mg protein)에서 유의적으로 감소하였던 5-HT 함량이 증가한 것을 확인하였다. 또한 뇌내 해마에서의 함량 또한 감소하였던 5-HT 함량 ( $14.43 \pm 4.13$  ng/mg protein)이 HR-100 ( $23.35 \pm 3.94$  ng/mg protein), HR-300 ( $32.35 \pm 4.05$  ng/mg protein), KP-10 ( $36.31 \pm 3.89$  ng/mg protein), 그리고 KP-50군 ( $41.35 \pm 4.05$  ng/mg protein)에서 유의적으로 증가한 것을 확인하였다.

또한 dopamine의 serum내 함량으로서, 모든 실험군에서 각군의 유의적인 변화를 확인 할 수 없었으며, 뇌내 해마에서의 함량은 스트레스 처리 후 ( $86.72 \pm 5.21$  ng/mg protein), 무처리군 ( $51.32 \pm 3.15$  ng/mg protein)과 비교하여 유의적으로 증가한 것을 확인하였다. 그리고 증가하였던 dopamine 함량은 HR-100 ( $77.43 \pm 3.94$  ng/mg protein), HR-300 ( $71.42 \pm 3.41$  ng/mg protein), KP-10 ( $65.35 \pm 3.41$  ng/mg protein), 그리고 KP-50군 ( $57.42 \pm 3.41$  ng/mg protein)에서 유의적으로 다시 감소한 것을 확인하였다.

그리고 norepinephrine의 serum내 함량은 스트레스 처리 후 ( $71.52 \pm 7.32$  ng/mg protein), 유의적으로 무처리군 ( $30.42 \pm 4.72$  ng/mg protein)과 비교하여 증가하는 것을 확인하였으며, 각 시료 처리군인 HR-100 ( $56.41 \pm 3.94$  ng/mg protein), HR-300 ( $54.17 \pm 4.12$  ng/mg protein), KP-10 ( $50.25 \pm 3.62$  ng/mg protein), 그리고 KP-50군 ( $56.29 \pm 4.05$  ng/mg protein)에서 유의적으로 다시 감소한 것을 확인하였다. 그리고 뇌내 해마에서도 마찬가지로 증가한 norepinephrine 함량 ( $105.11 \pm 7.52$  ng/mg protein)이 HR-100 ( $88.13 \pm 3.97$  ng/mg protein), HR-300 ( $78.32 \pm 4.50$  ng/mg protein), KP-10 ( $75.29 \pm 3.64$  ng/mg protein), KP-50 ( $66.32 \pm 4.15$  ng/mg protein)군에서 유의적으로 감소한 것을 확인하였다.

**Table. 6–10.** The effects of aqueous extract and kaempferol from *Hippophae rhamnoides* L. on monoamines levels of stressed mice.

<b>Monoamins</b>	<b>group</b>	<b>Serum</b>		<b>Hippocampus</b>	
<b>5-HT</b> (ng/mgprotein)	Normal	21.31 ± 2.11	*** ##	34.42 ± 3.15	*** ##
	Control	10.33 ± 2.46	#	14.43 ± 4.13	
	DZP	28.43 ± 3.31	*** ##	42.36 ± 4.72	*** ##
	L-theanine	16.64 ± 2.14	*	33.36 ± 4.15	*
	HR-100	13.36 ± 2.73		23.35 ± 3.94	*
	HR-300	17.12 ± 3.14	*	32.35 ± 4.05	** #
	KP-10	19.14 ± 4.12	*	36.31 ± 3.89	** #
	KP-50	24.12 ± 3.12	** #	41.35 ± 4.05	*** ##
<b>DP</b> (ng/mgprotein)	Normal	40.15 ± 3.15		51.32 ± 3.15	*** ###
	Control	43.25 ± 2.89		86.72 ± 5.21	#
	DZP	44.51 ± 3.14		59.43 ± 4.72	*** ##
	L-theanine	43.32 ± 3.25		76.64 ± 5.15	*
	HR-100	44.32 ± 3.94		77.43 ± 3.94	*
	HR-300	42.24 ± 3.41		71.42 ± 3.41	** #
	KP-10	42.32 ± 4.51		65.35 ± 3.41	*** ##
	KP-50	43.35 ± 3.45		57.42 ± 3.41	*** ##
<b>NE</b> (ng/mgprotein)	Normal	30.42 ± 4.72	*** ###	31.47 ± 3.15	*** ##
	Control	71.52 ± 7.32	#	105.11 ± 7.52	
	DZP	42.12 ± 4.32	*** ##	62.72 ± 6.14	*** ##
	L-theanine	60.72 ± 3.24	**	81.12 ± 5.15	**
	HR-100	56.41 ± 3.94	*	88.13 ± 3.97	*
	HR-300	54.17 ± 4.12	** #	78.32 ± 4.50	**
	KP-10	50.25 ± 3.62	*** ##	75.29 ± 3.64	**
	KP-50	46.29 ± 4.05	*** ##	66.32 ± 4.15	** ##

The data express the mean latency ± S.D. \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*  $P < 0.05$ , significantly different from the control group. ###  $P < 0.001$ , ##  $P < 0.01$ , #  $P < 0.05$ , significantly different from the L-theanine group. Statistical significance was tested with an unpaired Student's  $t$ -test.

### 3. 고찰 및 결론

본 연구는 식용 가능한 비타민나무의 열매와 잎을 활용하고, 또한 다양한 기능성 연구를 통해 여러 기능성을 갖고 있는 비타민나무 소재를 활용하여 육체적/정신적 스트레스 해소를 위한 멘탈케어 건강기능식품 소재를 개발을 목표로 진행 되었으며, 1차년도 연구 목표로는 주관 기관으로부터 전달받은 비타민 나무 열매와 잎 추출 시료들을 *in vitro* 모델과 HTS 활성검색을 통해 가장 강한 활성을 보이는 건강기능 식품 산업화 가능 소재를 선정 및 확보하는데 있다. 실험 시료로서 지역별로는 강원도, 경기도, 전라남도 장흥군, 수입산(중국)에서 확보 하였으며, 부위별로 잎(전지역), 열매(전남 장흥군), 뒤편, 그리고 추출용매로는 열수와 5%, 30%, 50%, 70% 에탄올을 사용하여 수득하였다. 최종적으로 멘탈케어에 있어 비타민나무의 가장 높은 활성을 가지는 시료 선정을 위해 다각적인 접근을 통한 *in vitro* 수준에서의 검색 tool을 사용 하였으며, 총 4개의 실험 모델을 사용하였다. 첫 번째로는 멘탈케어에 있어 가장 중요하게 대두되고 있는 stress 호르몬에 대한 보호효과 검색 *in vitro* 모델, 그리고 소위 행복 호르몬이라고 알려진 serotonin 관련 조절 활성 *in vitro* 모델, 기억과 감정조절에 있어 핵심적 역할로 알려진 NMDA (N-Methyl-D-aspartic acid) 수용체 조절 활성 *in vitro* 모델과 마지막으로, 신체 내/외부 유해물질과 ROS (reactive oxygen species)에 대항하는 HO-1 (heme oxygenase-1) 조절 활성 *in vitro* 모델을 사용하여 본 실험을 진행하였다.

glucocorticoid는 뇌의 기억중추에서 활성화되면서 기억력을 저하시키는 스트레스 호르몬으로 뇌에서 스트레스가 느껴지거나 스트레스가 예상되면 시상하부에 의해 CRH (부신피질자극 호르몬 방출호르몬)이 분비된다. 이 호르몬들은 시상하부의 전방 뇌하수체를 잇는 국소적인 순환계로 들어가 전방 뇌하수체를 통해 ACTH (부신피질자극호르몬)가 분비되도록 하고, ACTH는 전신의 순환계로 들어가 부신의 당질코르티코이드 분비를 촉발한다. glucocorticoid는 스트레스에 대해 반응하여 각종 물질 대사, 면역 활성, 심혈관계 활성 및 뇌기능 등 감정과 같은 다양한 생리적 적응 반응을 유도하는 스트레스 호르몬으로 알려져 있다. 본 연구에서는 glucocorticoid 계열의 corticosterone을 처리하여 독성을 유발하고 비타민나무 시료를 처리하여 이에 대한 보호효과를 측정 하였다. 실험 결과, 지역별로는 다른 지역에 비해 강원도와 경기도에서 가장 높은 보호활성을 보였으며, 추출용매 별로는 유기용매인 에탄올 추출물보다 열수 추출물에서 더 강한 보호효과를 보였다. 전남 장흥지역 잎 추출물에서 또한 열수 추출물에서 가장 강한 활성을 보였으며, 전남 장흥지역 잎과 열매를 비교하는 부위별 비교에서는 열매보다는 잎에서 활성을 확인 할 수 있었다. 그리고 중국산 잎에서도 활성을 확인 할 수 있었으며 앞서와 같이, 유기용매인 에탄올 추출물 보다는 열수 추출물에서 강한 활성을 보였다.

세로토닌 (serotonin, 5-hydroxytryptamine, 5-HT)은 호르몬 계열은 아니지만, "happiness hormone"이라고 알려진, 뇌 중추영역에서 감정조절에 있어 주요 역할을 하는 신경전달물질의 일종으로, 중뇌 봉선핵 (dorsal raphe nuclei)에서 합성되며, 시상하부에서 선조체와 미상핵 (caudate nucleus)을 지나 대뇌를 거쳐 해마로 전달되어 뇌 전체에 분포한다. 세로토닌 수용

체는 크게 7군 14종으로 분류된다 (5-HT<sub>1~7</sub>). Cyclic adenosine monophosphate (cAMP) 신호전달경로와 neurotrophic factor 신호전달경로가 알려져 있다. cAMP 이차 전령계는 활성화 인자과 억제 인자들의 복잡한 상호작용에 의해 조절되고 있는데 5-HT<sub>4,5A,6,7</sub> 수용체는 cAMP 경로를 활성화시키고, 5-HT<sub>1A,1B,1D,1E</sub>는 억제한다. 신경전달물질이 해당 수용체와 결합하면 G 단백질을 경유하여 adenylyl cyclase (AC)를 활성화시키고, AC는 adenosine triphosphate (ATP)에서 cAMP의 생성을 증가시키고, cAMP는 다시 cAMP-dependent protein kinase (PKA)를 활성화시킨다. PKA는 수용체, 이온 통로(ion channel), G 단백질, 효소, 전사인자(transcriptional factor)를 포함한 특별한 단백질의 인산화를 통해 세포 기능을 조절한다. 본 연구에서는 세포주로서 human serotonin 5-HT<sub>6</sub> receptor gene 발현된 stably Human astrocytoma 1321N1 cells를 사용하였으며, serotonin 수용체 중에서도 5-HT<sub>6</sub> 수용체를 주 target으로 실험을 진행 하였다. 5-HT<sub>6</sub> 수용체는 여타의 serotonin 수용체인 5-HT<sub>4,5A,6,7</sub>와 마찬가지로 serotonin이 수용체에 결합하면 cAMP의 발현이 증가하여 감정조절에 있어 긍정적인 효과를 보이기도 하지만, 특이하게도 5-HT<sub>6</sub> 수용체에 있어 실험 대상 물질이 억제기능인, antagonist 역할을 하더라도 인지능력이나 감정조절에 있어 개선 및 치료 효과가 있다고 학계에 알려져 있다. 실제로 본 실험에 사용된 세포주에 serotonin을 처리하면 cAMP의 발현이 크게 증가 하는 것을 확인 할 수 있었다. 하지만 비타민나무 시료들을 serotonin과 동시 처리 하였을 때, cAMP의 발현이 크게 감소하는 강력한 억제능, 즉 antagonist 활성을 확인하였다. 앞선 실험인 glucocorticoid 매개 스트레스 호르몬 모델 실험 결과와 마찬가지로 강원도와 경기도에서 강한 억제능을 보였으며, 추출물별로도 유기용매인 에탄올 추출물 보다는 열수 추출물에서 강한 활성을 확인할 수 있었다. 하지만 전남 장흥 지역의 잎과 열매를 비교 하였을 때, 잎 보다는 열매에서 수용성 추출보다는 유기용매인 에탄올 추출에서 활성이 강해지는 것을 확인 하였다.

NMDA 수용체와 스트레스는 많은 연관을 가지고 있으며, 특히 해마에서 기억과 많은 연관을 가지고 있다. NMDA 수용체는 도파민 D1 수용체와 직접적인 상호작용을 하면서 상호작용의 결과에 따라 세포의 사멸을 조절하거나, 정상적인 세포 사이의 통신을 유도하는 기능을 한다. 그리고 NMDA 수용체는 대표적인 Ca<sup>2+</sup> 채널로서, NMDA 수용체를 통한 Ca<sup>2+</sup>의 유입은 뉴런 세포의 신호전달과 apoptosis의 주요 매개체로 알려져 있다. 그리고 D1 수용체와 NMDA 수용체 사이에 일어나는 상호작용에 따라 세포의 사멸이 조절된다는 것을 의미하는 동시에, NMDA 수용체가 세포의 사멸에 직접적으로 관여하며, 더욱이 NMDA 수용체가 D1 수용체와 상호작용할 때는 세포의 사멸과 세포 사이의 신호전달 조절기능이 서로 다른 기작을 통해 독립적으로 진행된다. 다시 말해 세포의 사멸과 세포 사이의 신호전달 기능이 다른 하나의 기능에는 영향을 미치지 않고, 서로 다른 기능만을 선택적으로 조절하면서 진행된다. 이를 바꾸어 말하면, NMDA가 관여하는 세포 사멸 기능을 줄일 수 있는 방법만 개발되면, 뇌세포의 사멸을 막을 수 있다는 말이 되며, 감정조절, 뇌졸중, 정신분열증, 골다공증, 간질, 치매 등 각종 질환을 치료하기 위한 일환으로 NMDA 수용체에 대한 다양한 연구가 진행되고 있다. 본 연구

에서 NMDA 수용체 조절 기능을 확인하기 위해  $Ca^{2+}$  유입 정도를 측정 하였으며, 실제로 NMDA 대표 antagonist인 D-AP5를 처리함으로써  $Ca^{2+}$  유입이 억제됨을 확인하여 NMDA 수용체 target 모델인 본 실험의 정상 가동 유무를 확인 한 뒤, 실험을 진행하였다. 본 실험에서 실제로 비타민나무 시료들을 처리 하였을 때, 강력한 NMDA 수용체 매개  $Ca^{2+}$  유입 억제 능을 보였으며, 거의 모든 시료에서 40% 이상의 억제 활성을 확인 하였다. 본 실험에서는 지역별로 강원, 경기, 전남 장흥 지역의 시료에서 비슷한 활성 정도를 보였으며, 용매별 결과로는 뚜렷하게 수용성 추출물이나 에탄올 추출물에서 활성이 높다고 할 순 없었지만, 다른 앞서, 세 실험에 비해서는 유기용매인 에탄올 추출물에서 활성이 높게 측정 되었다.

Heme oxygenase (HO)는 세포의 항산화 시스템에 중요한 구성요소로서 HO 유도체중 하나인 HO-1은 세포내의 heme을 분해하여 일산화탄소, 철, biliverdin을 만든다. 분해된 생성물인 일산화탄소, 철, biliverdin과 HO-1 그 자체적으로 세포손상 및 사멸의 억제, 항염증 및 항산화 작용을 하는 것으로 알려져 있으며, 다양한 질병의 타겟으로 주목을 받고 있다. 그리고 신체 내 산소에 의하여 유래되는 superoxide, hydroxy peroxy alkoxyl, hydroperoxy radical, nitric oxide등과 같은 활성산소종 (reactive oxygen species, ROS)은 호흡 과정이나 세포 대사과정에서 자연스럽게 생성되며 여러 가지 세포 반응을 조절하는 역할을 한다. 하지만 과도한 스트레스, 흡연, 음주 등 여러 가지 원인으로 인하여 과도하게 생성된 활성산소들은 노화는 물론, 알츠하이머, 파킨슨 증후군 등과 같은 퇴행성 뇌질환을 일으키는 원인으로 알려져 있다. 특히 최근에는 HO-1과 그 부산물들이 항산화 작용을 통하여 산화적 스트레스에 의한 뇌 세포 손상을 억제 한다는 많은 연구가 보고되고 있다. 본 연구에서는  $CuSO_4$ 를 처리하여 생성되는 ROS에 대항하여 HO-1의 발현 및 활성을 유도하고, 비타민나무 시료를 처리하여 증가된 HO-1 활성을 감소시키는 조절 활성을 측정하였다. HO-1의 활성은 신체 내 유해물질이나 ROS에 대항하여 발현되지만, HO-1의 동일한 역할로서 효소의 임무를 분담하거나 system이 정상으로 회복 되는 과정에서 증가된 HO-1의 활성 및 발현은 다시 감소하게 된다. 본 실험에서 비타민나무 시료를 처리 하였을 때 앞선 실험에서와 비슷한 경향으로서 다른 지역에 비해 강원도, 경기도, 전남 장흥군에서 강한 조절 활성을 보였다. 추출물에서도 유기용매인 에탄올 추출물에서 보다 수용성인 열수 추출물에서 더욱 강한 활성을 보였으며, 강원, 경기, 전남 장흥, 중국산에서 뚜렷한 경향을 보였다. 정리하자면, 앞서 수행한 4가지 *in vitro* 모델에서의 가장 강한 활성을 보이는 용매로는 열수 추출물이었으며, 지역별로는 (산업을 위한 시장조사를 거쳐) 강원 그리고 부위는 잎으로 특정되었다.

선택된 시료를 이용하여, 전임상 단계에서 (실험동물) 생리활성을 평가하였다. 본 실험에서는 전기쇼크를 통해 실험동물에 극심한 스트레스를 줌으로서 정신적 스트레스에 대한 시료의 효과를 탐색 하였는데, 실제로 전기쇼크를 준 스트레스 대조군의 경우 무처리군과 비교하여 유의적으로 그 수준이 크게 증가하는 것을 확인하였으며, 시료인 비타민나무 잎 열수 추출물을 처리하였을 때, corticosterone 수치가 감소하는 것을 확인하였다. 또한 비타민 잎 열수추출물의 앞서 설명한 5-HT의 변화에 미치는 영향을 평가한 결과, 실제로 전기쇼크를 준 스트레스

대조군의 경우 무처리군과 비교하여 유의적으로 그 수준이 크게 감소하는 것을 확인하였으며, 시료인 비타민나무잎 열수 추출물을 처리하였을 때, 5-HT의 수치가 유의적으로 증가하는 것을 확인하였다. Dopamine은 카테콜아민 (catecholamine)에 속하는 신경전달물질 (neurotransmitter) 중 하나로서, 아미노산의 하나인 타이로신으로부터 시작하여 L-dopa를 거쳐 dopamine으로 합성된다. 그 후 dopamine에 OH기가 하나 추가되어 노에피네프린 (norepinephrine), 에피네프린으로 합성될 수 있다. dopamine은 혈압조절, 중뇌에서의 정교한 운동조절 등에 필요한 신경전달물질이자 호르몬이며 가장 널리 알려진 기능으로는 쾌감·즐거움 등에 관련된 신호를 전달하여 인간에게 행복감을 느끼게 한다. 만약 dopamine의 분비가 비정상적으로 낮으면 제대로 움직이지도 못하며 감정표현도 잘 하지 못하는 파킨슨병에 걸리게 되며, 분비가 과다하면 환각 등을 보는 조현증 (정신분열증)에 걸릴 수 있다. 본 실험에서는 전기쇼크를 준 스트레스 대조군의 경우 무처리군과 비교하여 유의적으로 뇌에서 그 수준이 크게 증가하는 것을 확인하였으며, 시료인 비타민나무잎 열수 추출물을 처리하였을 때, dopamine의 수치가 유의적으로 감소 하는 것을 확인하였다.

Norepinephrine은 교감신경계에서 신경전달물질로 작용하기도 하며 호르몬으로도 작용하는 물질로서 부신수질에서 생성된다. 기본적으로 교감신경계를 자극하는 기능을 가졌기 때문에 분비되면 집중력 증가, 혈류량 증가, 대사활동 증가 등의 효과가 있다. norepinephrine에서 메틸기 하나가 빠진 유사한 구조로 기능 역시 비슷하지만, 노르에피네프린은 에피네프린에 비해 전신의 말초혈관을 수축시켜 혈압을 크게 상승시키지만 에너지대사나 심장에 대한 작용은 훨씬 약하다. 스트레스 호르몬으로서 집중력과 반응 행동을 담당하는 뇌의 영역에 작용하여, 심박동 수를 증가시키고 혈당을 올리며, 골격근으로의 혈류량을 증가시킨다. 주의력 결핍 및 과잉 행동장애, 우울증, 저혈압에 사용되기도 한다. 본 실험에서는 전기쇼크를 준 스트레스 대조군의 경우 무처리군과 비교하여 유의적으로 뇌에서 그 수준이 크게 증가하는 것을 확인하였으며, 시료인 비타민나무 잎 열수 추출물을 처리하였을 때, norepinephrine의 수치가 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다. 결과적으로 비타민나무 잎 열수 추출물의 투여는 증가한 dopamine, corticosterone, noradrenalin의 수준을 감소시키며, 감소한 5-HT의 수준을 증가시킴으로 신체내 스트레스 지표에 해당하는 4개의 호르몬 및 신경전달물질을 회복하는 것을 확인 할 수 있었다.

그리고 최종 단계로서, 비타민나무 잎 열수 추출물의 생리활성 물질을 탐색 및 규명하기 위해 LC-MSMS를 활용한 프로파일링을 수행하였다. 21여개의 단일 성분들이 탐색 되었지만 함량과 구조적 생리활성 가능성을 안배하여 최종 11가지의 후보물질 (chrysin, isorhamnetin, quercetin, kaempherol, myricetin, protocatechuic acid, p-hydroxybenzoic acid, vanillic acid, salicylic acid, p-coumaric acid, cinnamic acid, caffeic acid)을 선정하였다. 11가지의 단일성분을 이용하여 총 3가지 (corticosterone 보호효과 screening 모델, 5-HT6 매개 cAMP 활성화 screening 모델, NMDA 매개  $Ca^{2+}$  유입 억제능 활성화 screening 모델)의 in vitro screening 들을 수행하였으며, 그 결과로 kaempherol, isorhamnetin, myricetin 등이 높은 활성을 보였으나 세포 안전성평가의 종합적 결과 검토를 통해, 가장 높은 활성을 보이며 비교적 안전성이 확보된 kaempherol로 최종 선정하여 전임상 수준에서의 생리활성 평가 및 기작규명

을 수행하였다.

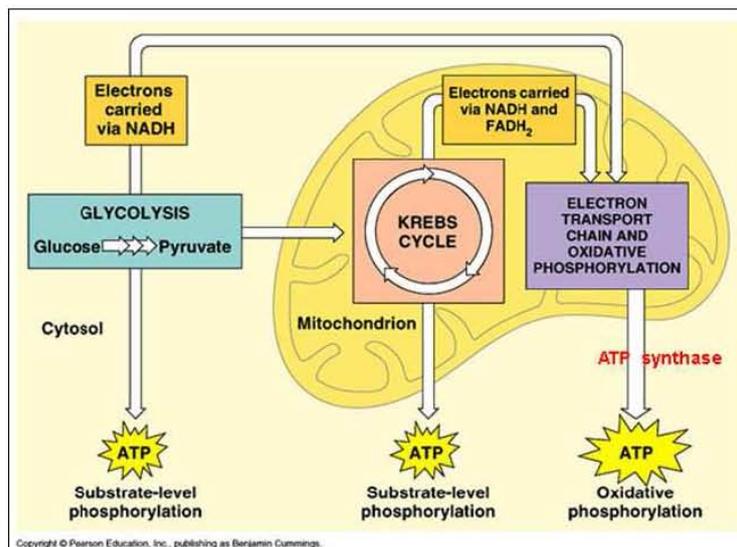
비타민잎 열수추출물과 선택된 단일물질 (kaempherol)을 이용하여 전임상 단계에서 생리활성 평가 및 기작규명을 수행하였다. 마찬가지로, 전기쇼크를 통해 실험동물에 극심한 스트레스를 줌으로서 정신적 스트레스에 대한 시료의 효과를 탐색 하였는데, 실제로 전기쇼크를 준 스트레스 대조군의 경우 무처리군과 비교하여 행동학적 우울증 지표가 유의적으로 그 수준이 크게 증가하는 것을 확인하였으며, 시료인 비타민나무 잎 열수 추출물과 kaempherol을 처리하였을 때, 고정 상태인 immobility time과 생존행동인 climbing time이 회복되는 확인하였다. 또한 비타민잎 열수추출물과 kaempherol이 신체 내 5-HT의 변화에 미치는 영향을 평가한 결과, 실제로 전기쇼크를 준 스트레스 대조군의 경우 무처리군과 비교하여 유의적으로 그 수준이 크게 감소하는 것을 확인하였으며, 시료인 비타민나무 잎 열수 추출물과 kaempherol을 처리하였을 때, 5-HT의 수치가 유의적으로 증가하는 것을 확인하였다. Dopamine 함량 변화를 측정된 결과, 전기쇼크를 준 스트레스 대조군의 경우 무처리군과 비교하여 유의적으로 뇌에서 그 수준이 크게 증가하는 것을 확인하였으며, 시료인 비타민나무 잎 열수 추출물과 kaempherol을 처리하였을 때, dopamine의 수치가 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다. Norepinephrine 함량 또한, 전기쇼크를 준 스트레스 대조군의 경우 무처리군과 비교하여 유의적으로 뇌에서 그 수준이 크게 증가하는 것을 확인하였으며, 시료인 비타민나무 잎 열수 추출물과 kaempherol을 처리하였을 때, norepinephrine의 수치가 유의적으로 감소 하는 것을 확인하였다. 결과적으로 kaempherol의 투여는 증가한 dopamine, corticosterone, noradrenalin의 수준을 감소시키며, 감소한 5-HT의 수준을 증가시킴으로 신체 내 스트레스 지표에 해당하는 4개의 호르몬 및 신경전달물질을 회복하는 것을 확인 할 수 있었다.

최종적으로 위 결과들을 정리하여 보면, 비타민나무 잎 열수 추출물과 해당 추출물에 함유된 kaempherol은 신경세포의 NMDAr에 대한 antagonistic 효과와 5-HT 수용체 sub family 중 5-HT6 수용체에 antagonistic 효과를 가지는 것을 확인했으며, 정신적 스트레스의 지표에 해당하는 호르몬과 신경전달물질인 corticosterone 및 dopamin, noradrenalin, 5-HT의 수준을 회복함으로써 정신적 스트레스에 대한 효과를 확인하였다. 연구를 통해 비타민나무는 멘탈케어 보호용 저분자성 소재로서 충분한 잠재 효과가 있음을 확인 할 수 있으며, 진행되는 사업 및 연구를 통해, 궁극적으로 안전성을 확보할 수 있는 멘탈케어 보호용 저분자성 소재를 개발하여 기능성 식품으로써 그 성과를 얻고자 한다.

## 제 7 절. 비타민나무의 육체적 항피로 기능성 및 활성기전 규명 (협동기관 : 천연자원연구원 김선오)

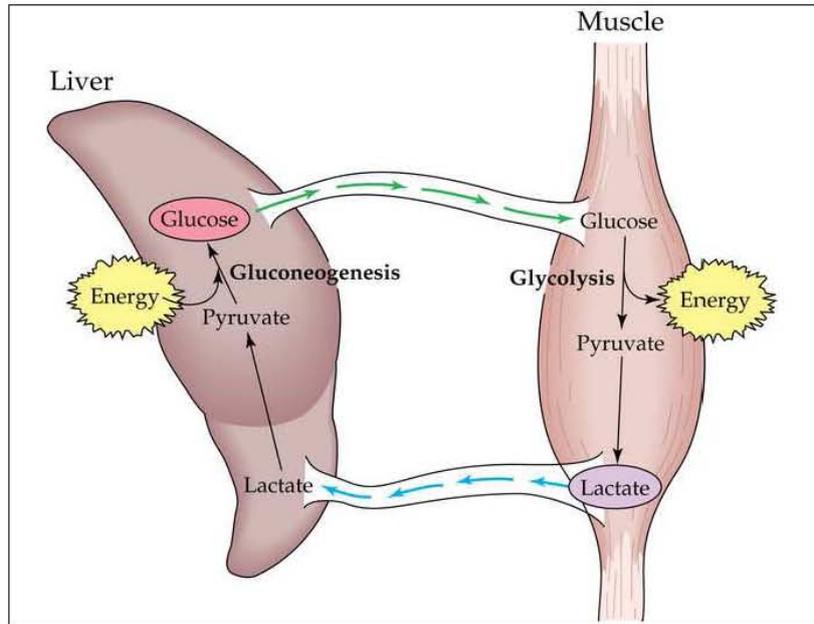
### 1. 서론

피로의 사전적인 정의는 신체적 또는 정신적인 노력으로 발생하는 lassitude 또는 weariness 를 의미하는 것으로 지속적인 활동이나 자극 후 세포, 근육, 기관의 힘이나 민감도가 일시적으로 감퇴된 상태이다. 그 중 근육의 피로현상이란 근 수축을 유지해야 할 힘의 감소현상, 또는 근, 신경계통의 운동수행능력의 저하 현상으로 정의된다. 이러한 근육의 피로현상은 단기간 고강도 운동부하시 무효소성 대사과정에 의해 체내에 젖산이 축적되면서 일시적인 근육의 피로현상과 함께 pH의 감소를 동반하며 근 수축 작용의 저하를 가져오고, 세포의 활성도를 증가시켜 효소의 활동이 억제되는 등의 현상이 나타난다. 생체가 육체적, 정신적 스트레스를 받게 되어 피로한 상태가 되면 뇌하수체-부신계 (HPA)의 기능이 항진되고 스트레스 관련 호르몬들이 분비될 뿐 아니라, 다음에 가해질지도 모르는 스트레스를 대비하기 위하여 생체 내 에너지 대사를 증진시키므로 산소 소모량이 증가하는데 육체적인 스트레스를 받는 경우, 근육의 에너지 대사 요구량에 따라 더욱 가중된 산소 소모가 일어난다. 세포가 에너지를 얻기 위해서는 포도당 대사를 하여 ATP를 생성하게 되는데 호기성 조건에서 포도당은 ①해당과정 : 포도당이 피루브산으로 분해되는 EMP (Embden-Meyerhof-Parnas) 경로, ②TCA (tricarboxylic acid) 회로 : 피루브산을 CO<sub>2</sub>와 NADH<sub>2</sub> 및 FADH<sub>2</sub>로 전환하는 과정, ③전자전달체인 : NADH<sub>2</sub>로부터 전자를 수용체에 전달함으로써 ATP를 생성시키는 호흡과정을 통해 CO<sub>2</sub>로 산화되며, 이때 포도당 1몰이 산화되면 6몰의 CO<sub>2</sub>가 생성되며 전자전달계의 과정을 거치면서 38몰의 ATP가 생성된다.



근육의 기본적인 에너지원은 glucose이다. Glucose는 혐기적 조건하의 골격근에서 유일한 에너지원이며 각종 조직에서 TCA 회로의 중간체를 유지하는데 이용된다. 혈액에서 공급되기도 하지만 근육 내 저장된 glycogen을 활용하기도 한다. 인체의 근육에는 수축에 필요한 에너지 자원으로 글리코젠 (glycogen)이 저장되어 있으며, 계속적으로 근육을 사용하면 저장되어 있던

글리코젠이 감소되고 대신 대사 작용으로 생긴 젖산과 같은 부산물과 노폐물이 축적된다. 이것이 바로 피로 물질 (lactate)로 피로 증상을 나타나게 하는 원인이 된다.



운동 중에 포도당이 젖산으로 변환되고, 젖산이 간으로 이동하여 포도당 신생 과정을 통해 다시 근육에 공급되는 일련의 대사 과정을 코리 회로 (Cori cycle)라 하는데 포유동물에서 당 신생은 주로 간과 신장에서 일어나지만 주된 장소는 간이다. 당신생은 각 조직에서의 대사물질을 간으로 운반하여 이것을 당신생과정을 통해 glucose로 재생하고 다시 조직으로 공급하는데 생리적 의의가 있다. 간과 다른 조직사이에는 glucose를 주고 그 대사생산물을 받는 다음 그림과 같은 회로가 존재한다. 젖산은 적혈구와 근육에서 코리회로를 이용하여 운반된다. 근육의 단백질 분해로 나온 amino acid 가 alanine 형태로 근육을 빠져나와 간으로 이동되고, 간에서는 alanine에서 urea를 제거한 후 pyruvate로 전환시켜 glucose를 생성하는 과정을 알라닌 회로 (Alanine cycle)이라고 한다. 젖산은 그 자체가 피로의 원인은 아니지만, 젖산이 축적되면 수소이온 농도가 증가하게 되고, 세포질내에서 pH가 정상수준 (근육 ; pH 7.0, 동맥혈 ; pH 7.4) 이하로 떨어지게 된다. 이로 인해 대사성 산성증 (metabolic acidosis)을 초래하여 근피로가 발생하게 된다. 대사성 산성증은 장시간 지구성 운동시 산소공급 불충분, 지방산에서 아세틸 CoA 생성 항진, 케톤체 등의 강산 생성, 중탄산염 이온 감소, 산-염기 평형 혼란, 혈중 pH 저하, 혈장 탄산수소 농도와 이산화탄소의 부분적인 압력, 체액이 모두 감소된다. 육체적인 피로를 해소하기 위하여 체내 피로물질의 축적을 억제하기 위한 제품이나 운동수행능력 향상에 초점을 맞춘 기능성 제품시장이 활성화되고 있으나 스테로이드, 카페인, 탄산수소나트륨 및 구연산나트륨 등과 같은 화합물을 포함하는 제품은 일정량 이상 복용하면 운동수행능력을 현저히 증가시킬 수 있는 반면 상기 약물은 치명적인 부작용을 수반하여 궁극적으로 건강을 해치게 되는 위험이 있다. 따라서, 최근에는 식물 추출물과 같이 안전성이 보장된 천연물을 이용한 피로개선 및 운동수행능력 향상용 제품 개발 연구가 활발히 진행되고 있다. 따라서 본 연구는 육체적 스트레스에 의해 변화하는 생리적 요인을 측정하기 위해 한계수영모

텔을 이용하여 항피로 효과를 확인하고, 비타민나무 잎 열수추출물과 생리활성 물질의 항피로 관련 기능성 식품으로써의 가능성을 타진하였다.

## 2. 방법 및 결과

### 가. *in vivo* 비타민나무 잎 열수 추출물의 정신적 피로활성 평가

#### (1) 실험방법

##### (가) 유속 pool을 활용한 비타민나무잎 열수 추출물의 육체적 피로 *in vivo* 평가

##### ① 실험동물

- 5주령의 ICR 마우스 (male)을 구입한 후 6일 동안 동물사육실의 환경 하에서 검역 및 순화시키면서 일반 건강상태를 관찰한 후, 건강한 개체를 선별하여 시험에 사용하였다. 개체식별은 유성매직을 이용하여 각 개체번호 꼬리에 표시하며, 사육상자는 시험번호, 시험물질명, 시험항목, 입수일, 순화기간, 군분리일, 시험기간, 성/동물번호 및 시험책임자를 기재한 개체식별카드를 부착하여 식별하였다. 순화기간 중 이상이 발생한 개체와 정상적으로 체중이 증가하지 않은 개체를 제외한 후, 각 군간 평균체중 및 표준편차가 균일하도록 군분리를 실시하였다.

##### ② 사육환경

- 본 시험의 환경은 온도 ( $22 \pm 3$ ) °C, 상대습도 ( $50 \pm 20$ ) %, 환기횟수 (10 ~ 15) 회/시간, 조명주기 12시간 (8:00 ~ 20:00), 조도 (150 ~ 300) Lux의 사육환경으로 설정된 동물사육실에서 사료와 음용수를 급여하여 사육하며, 순화 및 시험기간 동안 격리 사육을 실시하였다.

##### ③ 시험군의 구성

Group	시험물질	Dose (mg/kg B.W.)	Sex	No. of animal
Nomal	Saline	0	Male	1001~1010
Control	Saline	0	Male	2001~2010
Taurine	Taurine	100	Male	3001~3010
Low	비타민나무(잎) 열수 추출물	100	Male	4001~4010
High	비타민나무(잎) 열수 추출물	300	Male	5001~5010

③ 시험물질 투여

- 순화 및 군분리 후 시험물질을 시험기간 동안 각 농도별로 매일 동일시간에 경구투여 하였으며, 대조군은 동일 부피의 saline을 투여하였다.

④ 일반증상 관찰

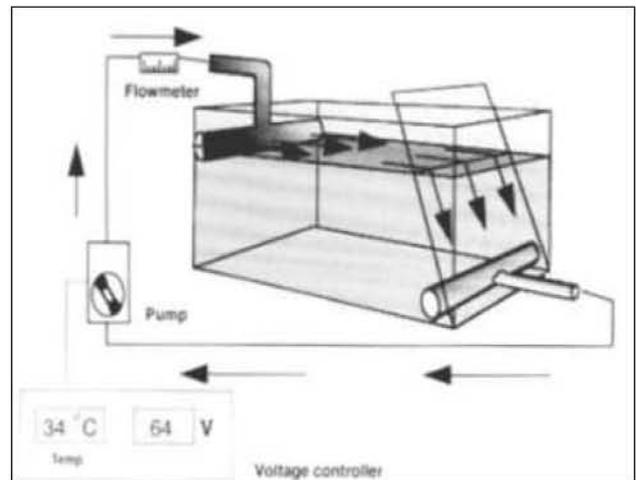
- 전 개체에 대하여 매일 1회 이상, 시험물질투여 후 15일 동안 일반증상관찰을 실시하였다.

⑤ 체중변화

- 체중은 입수시, 군분리시, 시험물질투여 후 15일 동안 5일에 1회 측정하였다.

⑦ 운동능력 평가를 위한 유속 pool 운동장치

- 지구적 운동능력을 평가하기 위하여 이용된 수영 수조 (Swimming pool)는 아크릴로 제작되었으며 (90×45×45cm) 운동능력 측정 시에는 높이 35cm까지 물을 채운 후 mouse의 수온을 34°C로 유지하여 실험하였다. 운동부하는 물 표면의 유속으로 조절하였으며, 표면유속은 전압조절기가 연결되어 있는 pump와 water flowmeter (type F45500, Blue white Co, Westminster, CA, USA)를 이용하여 물의 순환을 통해 조절하였다.



⑧ 지구적 운동 능력 측정

- 본 실험 시작하기 전 수영에 적응시키기 위하여 1번의 적응 수영을 하게한 후 (7L/min, 15min), 평균 유영 시간이 모든 군에서 일정하도록 군분리를 실시하였다. 마우스는 운동실험 3시간 전부터 금식시키고, 운동 시행 2시간 전 시료를 경구 투여하였다. 모든 유영운동 능력 측정시간은 오후 1시부터 5시까지 실시하며, 지구적 운동 능력의 측정은 한계치 수영, 즉 마우스가 물 표면으로 7초간 올라오지 못하는 점을 한계점으로 하여 마우스 수영 시작 시점부터 한계점까지의 총시간을 측정하였다

⑨ 운동 중 혈중 젖산 (Lactate) 및 혈당 (Blood glucose) 측정

- 한계유영운동 동안의 꼬리 정맥혈을 가지고 젖산과 혈당을 측정하였다. 혈당과 젖산은 한계유영운동 전, 운동 15분 후, 한계치 운동 직후에 꼬리 정맥혈을 회수하여 젖산

(Lactate Pro LT-1710, ARKRAY, Kyoto, Japan) 및 혈당 측정기 (SD CodeFree, SD, Gyeonggi, Korea)를 이용하여 측정하였다.

⑨ 부검

- 실험 마지막 날 경구 투여 후 3시간 전에 식이를 제거하고 에테르 마취하에 해부를 하였다. 각각의 mouse에서 대퇴근, 비복근을 채취하였고, 대정맥에서 혈액을 채취하여 3,000 rpm에서 원심분리 후 혈청만 분리하였다. 조직은 액체질소에 즉시 보관하여 실험에 이용하였다.

⑩ 근육, 간 조직 중의 글리코겐 측정

- 부검 후 적출한 근육과 간 조직은 질소가스로 냉각시켜 막자사발을 이용해 powder 형태로 만들어 -70°C에 보관하며 사용하였다. 글리코겐 측정은 Glycogen Assay Kit (Bio Vision, Inc., Cat# K646-100, Mountain View, CA 94043)를 사용하여 측정하였다.

⑪ 혈청 내 LDH 측정

- 혈액을 채취한 후 혈청을 분리하여 LDH 효소 활성평가는 Lactate Dehydrogenase Activity Assay Kit (Bio Vision, Inc., Cat# K726-500, Mountain View, CA 94043)를 사용하여 측정하였다.

⑫ 혈청 내 BUN, GLU 및 CK 측정

- 혈액을 채취한 후 혈청을 분리하여 BUN과 GLU는 자동혈액분석기(FUJIFILM, DRI-CHEM 4000i, Tokyo, Japan)를 이용하여 측정하였고 CK는 Creatine Kinase Activity Colorimetric Assay Kit (Bio Vision, Inc., Cat# K777-100, Mountain View, CA 94043)를 사용하여 측정하였다.

⑬ 혈청 내 SDH 및 Citrate synthase 측정

- 혈액을 채취한 후 혈청을 분리하여 Succinate Dehydrogenase Activity Colorimetric Assay Kit (Bio Vision, Inc., Cat# K660-100, Mountain View, CA 94043)와 Citrate Synthase Activity Colorimetric Assay Kit (Bio Vision, Inc., Cat# K318-100, Mountain View, CA 94043)을 이용하여 측정하였다.

⑭ 혈청 내 Cortisol 및 Hexokinase activity 측정

- 혈액을 채취한 후 혈청을 분리하여 혈액 내 스트레스와 관련이 높은 인자인 cortisol 함량은 Cortisol Salivary Immunoassay Kit (ELISA/EIA, Bio Vision, Inc., Cat# 1-3002, Mountain View, CA 94043)를 이용하였으며, Hexokinase activity은 Hexokinase Colorimetric Assay Kit (Bio Vision, Inc., Cat# K789-100, Mountain View, CA 94043)를 이용하여 측정하였다.

⑮ 통계처리

- 본 시험에서는 체중데이터에 대한 분산의 동질성을 비교하기 위하여 SPSS 통계프로그램(ver 10.1)을 이용하여 F 검정을 실시하였고, 분산의 동질성이 인정되어 student t test를 실시하였다.

## (2) 실험결과

### (가) 유속 pool을 활용한 비타민나무 열수 추출물의 육체적 피로 in vivo 평가

#### ① 사망률 및 일반 증상

- 시험 기간 동안 시험물질 투여에 따른 이상증상이나 이상행동을 관찰한 결과, 투여와 관련된 행동적 이상 및 사망한 개체는 없었다.

#### ② 체중변화

- 시험 기간 동안 각 시험군 간의 체중증가량을 무처리군 (control) 과의 유의검정을 실시 해 본 결과, 각 군과 control군과의 체중 증가량에 대한 유의적 차이는 없었다 (data not shown).

#### ③ 지구적 운동 능력 측정

- 지구적 운동능력을 평가하기 위하여 무산소성 역치 이하의 운동 강도인 유속 7L/min의 운동 강도 하에서 운동을 시작시켜 유영 한계치까지의 운동시간을 측정 측정 한 결과는 Fig. 7-1과 같다. 운동시간을 측정한 결과 운동대조군 (Control군)  $50.78 \pm 6.10$  min, 양성 대조군인 taurine  $58.90 \pm 11.52$  min, Low군  $56.89 \pm 11.31$  min, High군  $65.69 \pm 17.67$  min 으로 양성대조군인 taurine군 ( $p < 0.01$ )과 비타민나무 잎 열수 추출물을 처리한 Low ( $p < 0.05$ ), High ( $p < 0.01$ )군 모두에서 유의적인 차이를 확인 할 수 있었다.

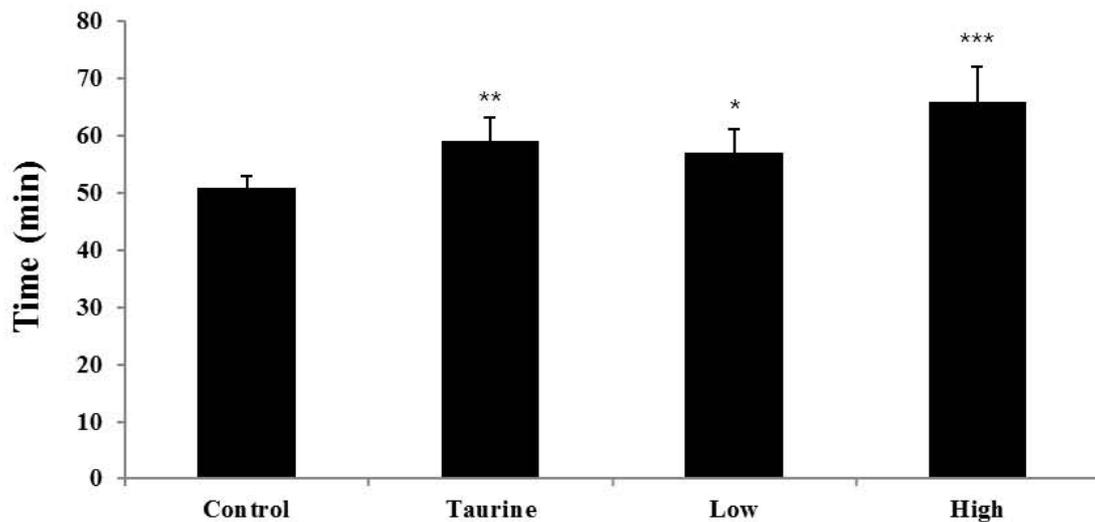


Fig 7-1. Endurance exercise capacities of Water extracts *Hippophae rhamnoides* L. in experimental mice. Data are expressed as the mean latencies  $\pm$  S.D. (n = 10). \*\*\* P < 0.001, \*\* P < 0.01, \* P < 0.05 vs control. Normal: non-treated group, Control: forced swimming + saline administered group. Taurine: forced swimming + 100 mg/kg taurine, Low: forced swimming + 100 mg/kg water extract of *Hippophae rhamnoides* L. leaf, High: forced swimming + 300 mg/kg water extract of *Hippophae rhamnoides* L. leaf.

④ 운동 중 혈중 젖산 (Lactate) 측정

- 젖산 (lactate)은 피루브산이 환원되어 생성된 혐기성 해당 반응의 종말대사체로 운동 중 혈액에서의 그 농도가 증가하게 되고, 이 젖산이 증가하여 체내에 피로를 유발시킨다. Fig. 7-2는 day 3일에 운동 전, 운동 15분 후, 운동 한계시간 직후의 혈액 내 젖산과 glucose의 수준을 측정하였다. 운동 전 젖산 수치는 운동대조군  $2.02 \pm 0.72$  mg/dl, taurine군  $3.51 \pm 0.51$  mg/dl, low군  $2.05 \pm 0.60$  mg/dl, high군  $2.53 \pm 0.79$  mg/dl으로 유의적 차이가 나타나지 않았으나, 운동 15분 경과 후 측정 결과 운동대조군  $7.75 \pm 1.43$  mg/dl, taurine군  $6.05 \pm 2.33$  mg/dl, low군  $5.75 \pm 3.56$  mg/dl, high군  $3.88 \pm 1.91$  mg/dl으로 high군에서 유의적 차이를 나타내었고( $p < 0.01$ ). 한계수영 직후 측정 결과 운동대조군 ( $11.85 \pm 7.35$  mg/dl)에 비해 비타민나무 잎 열수추출물 300 mg/kg b.w. 처리한 high군 ( $8.49 \pm 4.20$  mg/dl)에서 유의적으로 젖산 수치가 낮게 측정 되었다( $p < 0.05$ ).

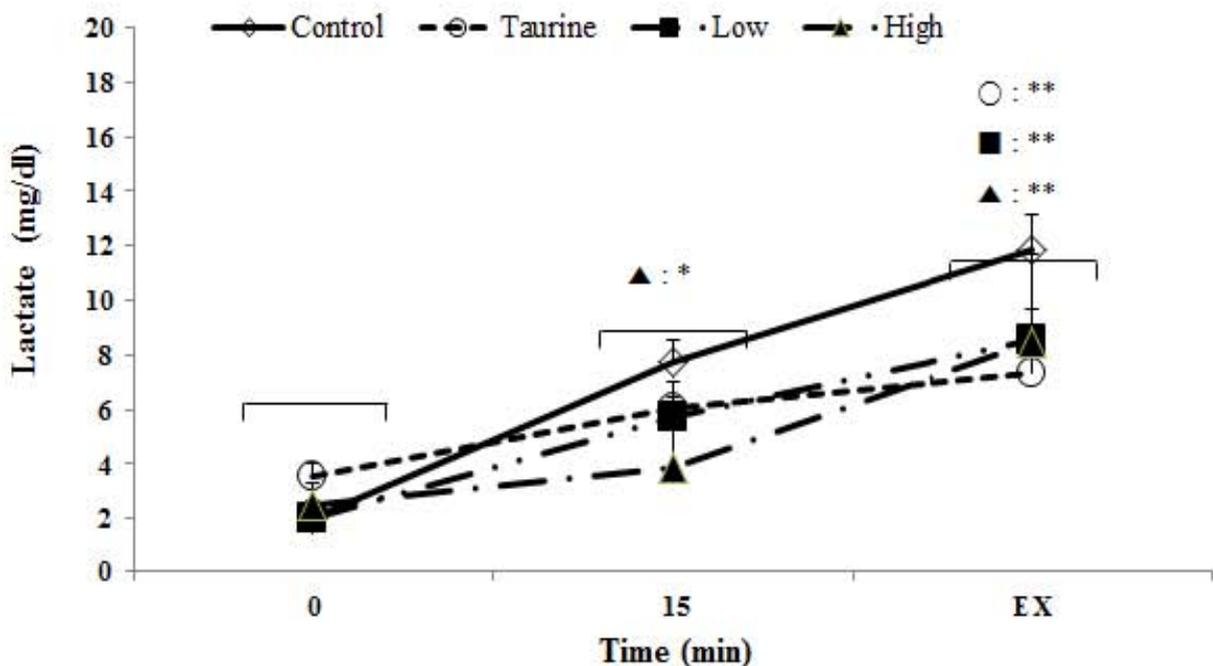


Fig. 7-2. Effects of water extracts from *Hippophae rhamnoides* L. on lactate levels in forced swimming experimental mice.

Data are expressed as the mean latencies  $\pm$  S.D. ( $n = 10$ ). \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*  $P < 0.05$  vs control. Normal: non-treated group. Control: forced swimming + saline administered group. Taurine: forced swimming + 100 mg/kg taurine. Low: forced swimming + 100 mg/kg water extract of *Hippophae rhamnoides* L. leaf. High: forced swimming + 300 mg/kg water extract of *Hippophae rhamnoides* L. leaf.

⑤ 운동 중 혈중 혈당 (Blood glucose) 측정

- 안정시 근육은 유리 지방산을 주 에너지원으로 사용하나, 운동이 시작되면 포도당을 주로 이용한다. 따라서 운동 중인 근육은 근육 내에 존재하는 당원의 분해를 통해 생산된 포도당과 혈중 포도당을 필요한 에너지원으로 사용한다. 따라서 운동 시에는 혈중 glucose 양이 줄어들게 되는데 한계시점에서 감소되는 glucose의 수준은 운동시간이 길어질수록 근육에서 더 많은 glucose를 소모하게 되고, 결과적으로 간과 근육에 있는 글리코겐이 glucose로 활발히 분해된다. 실험 결과, glucose는 한계시점에서 운동대조군 ( $103.50 \pm 12.45$  mg/dl)에 비해 taurine군 ( $141.25 \pm 15.54$  mg/dl,  $p < 0.05$ ), low군 ( $136.75 \pm 38.22$  mg/dl,  $p < 0.05$ ), high군 ( $166.75 \pm 14.91$  mg/dl,  $p < 0.01$ ) 에서 유의적으로 높은 경향을 보였는데, 이는 샘플 투여군이 대조군에 비해 운동 시 에너지원으로 glucose보다 다른 에너지원을 이용했다는 것을 추정할 수 있다.

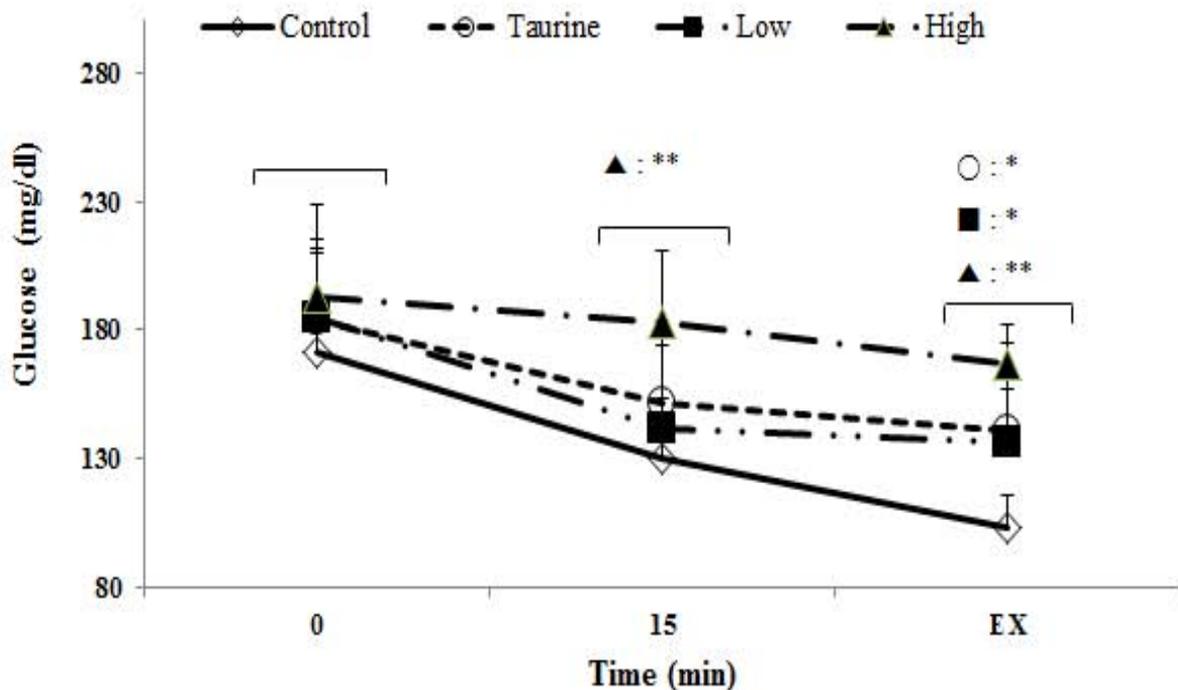


Fig. 7-3. Effects of water extracts from *Hippophae rhamnoides* L. on blood glucose levels in forced swimming experimental mice.

Data are expressed as the mean latencies  $\pm$  S.D. ( $n = 10$ ). \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*  $P < 0.05$  vs control. Normal: non-treated group, Control: forced swimming + saline administered group. Taurine: forced swimming + 100 mg/kg taurine, Low: forced swimming + 100 mg/kg water extract of *Hippophae rhamnoides* L. leaf, High: forced swimming + 300 mg/kg water extract of *Hippophae rhamnoides* L. leaf.

㉔ 근육 조직 중의 글리코겐 측정

- 유영 한계치까지의 운동 후 팔진 직후 곧바로 근육을 채취하여 유영운동 부하에 의해 유발된 피로에 대하여 근육 조직의 glycogen 농도를 관찰한 결과는 다음과 같다. 비운동군 (Normal군)은  $3.57 \pm 0.82$  mg/g으로 운동대조군 (Control군)  $2.15 \pm 0.42$  mg/g에 비해 높은 글리코겐 함량을 나타내었고, 양성대조군 (taurine군)  $2.32 \pm 0.84$  mg/g은 유의적인 차이를 나타내지 않았지만 low군 ( $2.81 \pm 0.57$  mg/g,  $p < 0.05$ )과 high군 ( $3.09 \pm 0.31$  mg/g,  $p < 0.01$ )은 control군에 비해 유의적으로 글리코겐 함량이 높게 측정되었다. 이는 lactate 함량과 연관지어 근육내 pH값의 회복으로 에너지 대사의 향상을 시사함으로써 상대적으로 신체내 글리코겐 소모를 줄임으로 결과효과로 인한 글리코겐의 함량의 증가를 예상 할 수 있다.

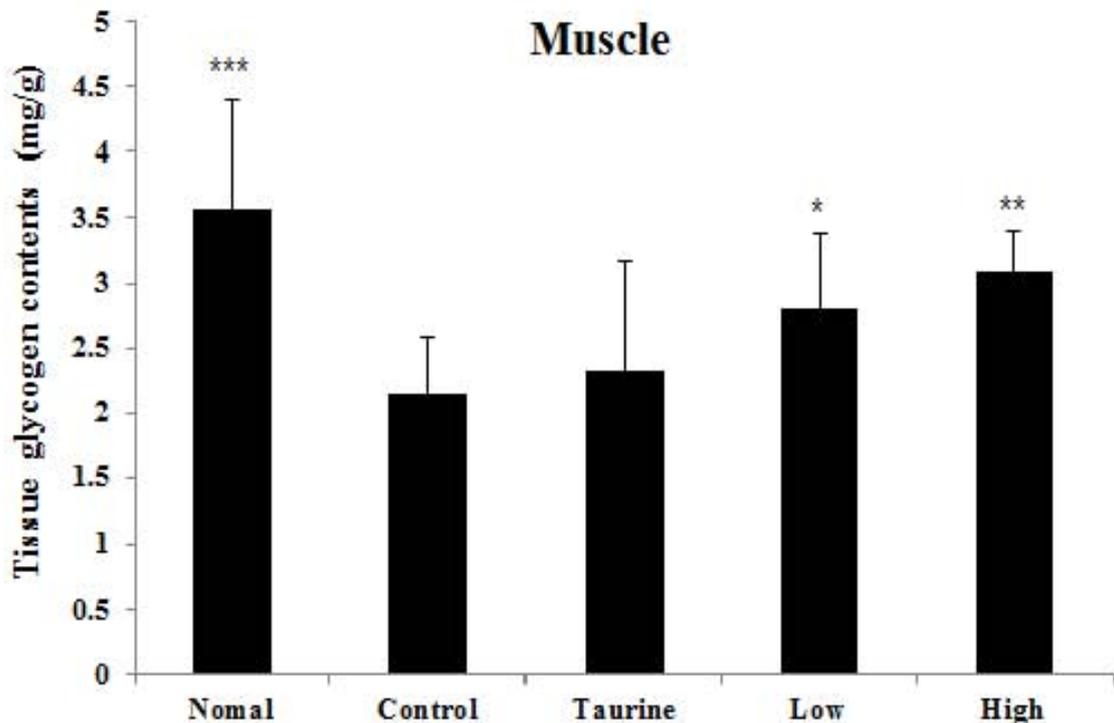


Fig. 7-4. Effects of water extracts from *Hippophae rhamnoides* L. on muscle glycogen contents in forced swimming experimental mice.

Data are expressed as the mean latencies  $\pm$  S.D. (n = 10). \*\*\* P < 0.001, \*\* P < 0.01, \* P < 0.05 vs control. Normal: non-treated group. Control: forced swimming + saline administered group. Taurine: forced swimming + 100 mg/kg taurine. Low: forced swimming + 100 mg/kg water extract of *Hippophae rhamnoides* L. leaf. High: forced swimming + 300 mg/kg water extract of *Hippophae rhamnoides* L. leaf.

⑦ 간 조직 중의 글리코겐 측정

- 근육 조직과 같은 방법으로 간 조직의 glycogen 농도를 관찰한 결과, 근육 조직에서와 비슷한 경향을 나타내었다. 비운동군 (Normal군)은  $7.73 \pm 0.20$  mg/g으로 운동대조군 (Control군)  $5.96 \pm 0.45$  mg/g에 비해 높은 글리코겐 함량을 나타내었고, 양성대조군 (taurine군)  $7.20 \pm 0.97$  mg/g은 유의적인 차이를 나타내지 않았지만 low군 ( $7.96 \pm 0.55$  mg/g)과 high군 ( $8.11 \pm 0.54$  mg/g)은 control군에 비해 유의적으로 글리코겐 함량이 높게 측정되었다 ( $p < 0.05$ ). 이는 근육내 글리코겐 함량과 마찬가지로 근육내 pH값의 회복으로 에너지 대사의 향상을 통해서 상대적으로 지방조직 내에 글리코겐 소모를 줄임으로 절약 효과로 인한 글리코겐의 함량의 증가를 예상 할 수 있다.

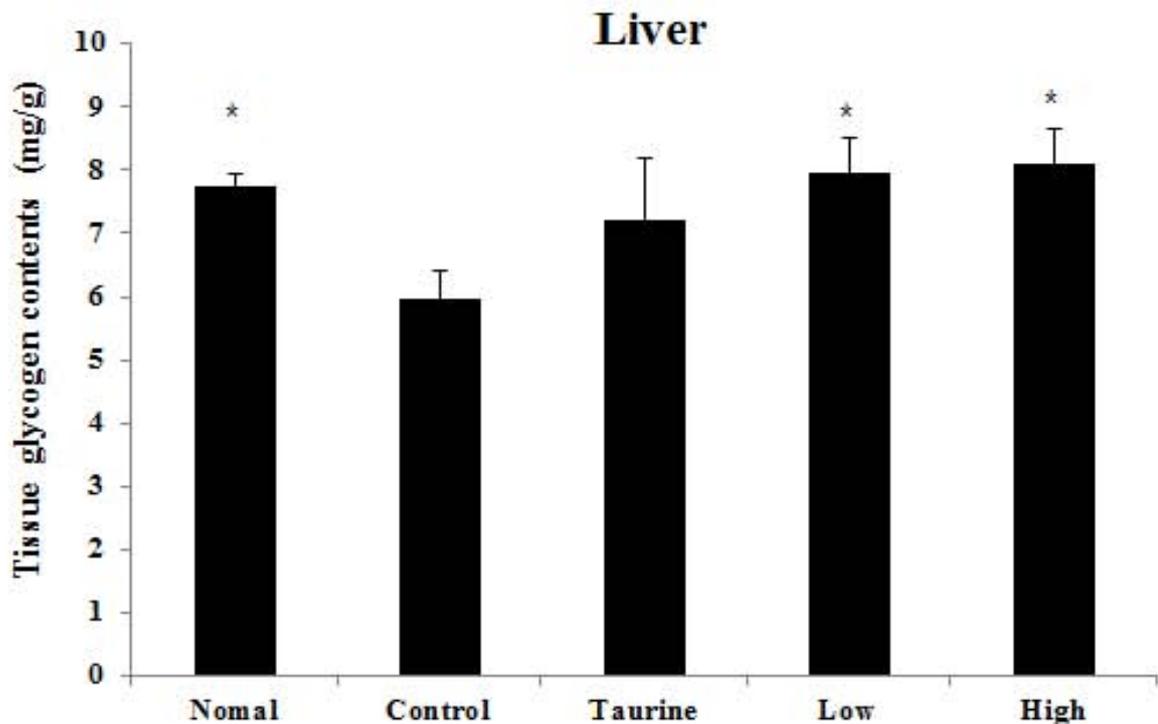


Fig. 7-5. Effects of water extracts from *Hippophae rhamnoides* L. on liver glycogen contents in forced swimming experimental mice.

Data are expressed as the mean latencies  $\pm$  S.D. (n = 10). \*\*\* P < 0.001, \*\* P < 0.01, \* P < 0.05 vs control. Normal: non-treated group. Control: forced swimming + saline administered group. Taurine: forced swimming + 100 mg/kg taurine. Low: forced swimming + 100 mg/kg water extract of *Hippophae rhamnoides* L. leaf. High: forced swimming + 300 mg/kg water extract of *Hippophae rhamnoides* L. leaf.

㉔ 근육 및 혈청 내 LDH (lactate dehydrogenase) 측정

- 운동중의 LDH 증가는 근 활동 중 근세포에서 젖산의 형성과 전환을 조절하여 근 손상의 지표가 된다. 배부 직후 곧바로 채취한 근육과 혈액에서 분리한 serum으로 LDH activity를 측정 한 결과, 근육 내 LDH 농도는 비운동군  $17.09 \pm 3.48$  mU/ml 운동대조군  $16.77 \pm 3.53$  mU/ml, taurine군  $17.07 \pm 4.66$  mU/ml, low군  $17.49 \pm 5.37$  mU/ml, high군  $17.61 \pm 2.27$  mU/ml 으로 운동군과 비운동군 사이에 유의적인 차이를 찾을 수 없었으나, serum내에 LDH 농도는 비운동군  $18.40 \pm 1.42$  mU/ml, 운동대조군  $24.14 \pm 1.44$  mU/ml, taurine군  $24.00 \pm 1.90$  mU/ml, low군  $21.99 \pm 2.19$  mU/ml, high군  $20.04 \pm 1.74$  mU/ml 으로 운동군에 비해 비운동군의 LDH 효소 활성이 유의적으로 낮게 측정 되었고( $p < 0.01$ ), low군 ( $p < 0.05$ )과 high군 ( $p < 0.01$ )에서 모두 운동군에 비해 낮은 LDH 효소 활성을 나타내었다.

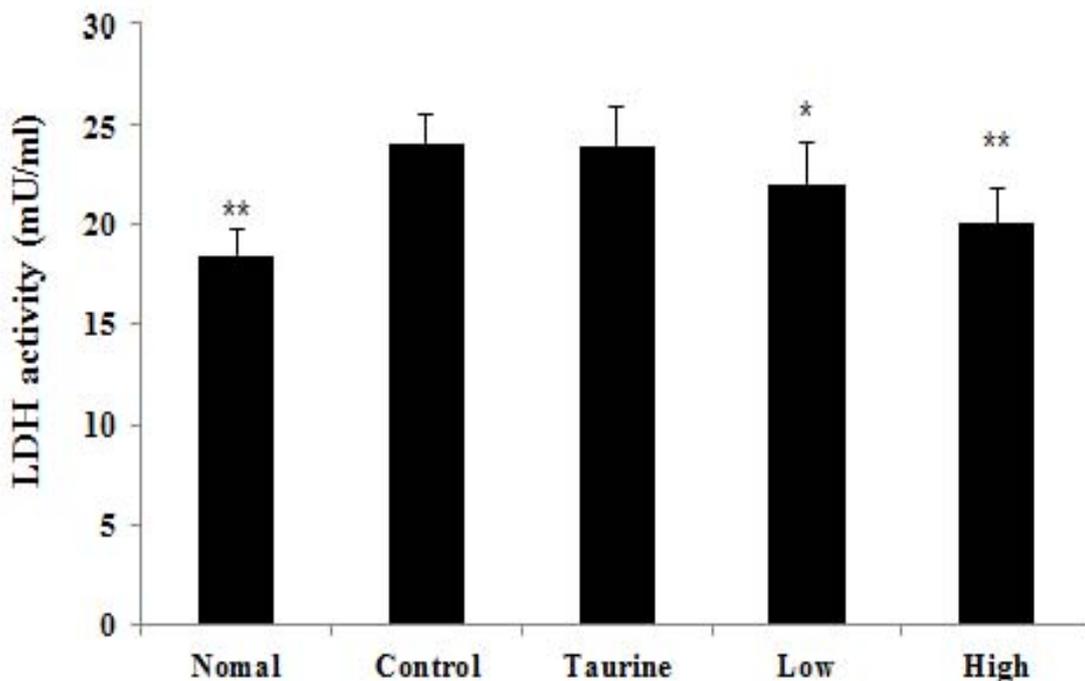


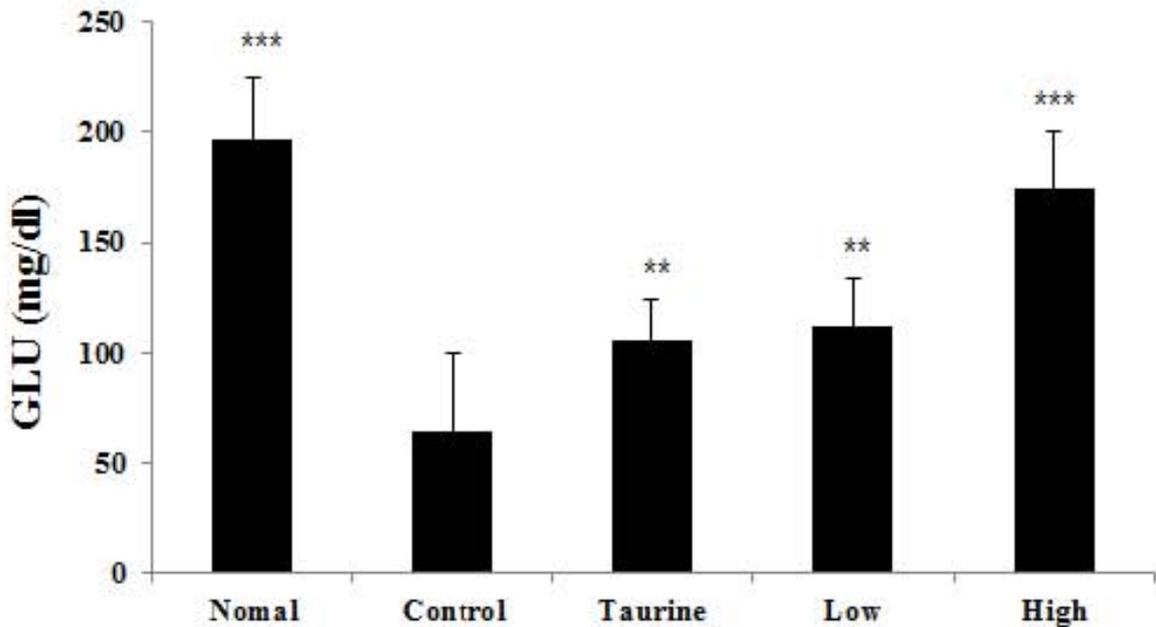
Fig. 7-6. Effects of water extracts from *Hippophae rhamnoides* L. on lactate dehydrogenase activities in forced swimming experimental mice.

Data are expressed as the mean latencies  $\pm$  S.D. (n = 10). \*\*\* P < 0.001, \*\* P < 0.01, \* P < 0.05 vs control. Normal: non-treated group. Control: forced swimming + saline administered group. Taurine: forced swimming + 100 mg/kg taurine. Low: forced swimming + 100 mg/kg water extract of *Hippophae rhamnoides* L. leaf. High: forced swimming + 300 mg/kg water extract of *Hippophae rhamnoides* L. leaf.

㉔ GLU, BUN 및 CK 측정

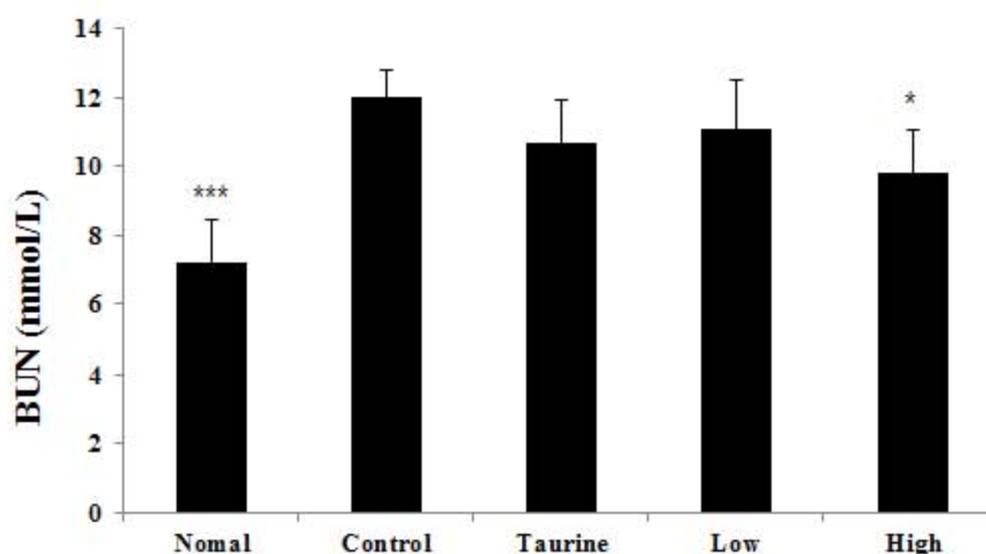
- Glucose(GLU)는 운동의 에너지원으로, 계속되는 운동시간과 근육에 저장되어 있는 glycogen이 glucose으로 전환되어 혈액 중으로 공급되며 필요한 에너지로 이용되며, 강제 수영과 같은 심한 운동을 할 경우 체내의 glucose 함량은 현저히 감소하게 된다. 본 실험에서 혈청 내 glucose (GLU) 측정 결과, 비운동군 197.25±27.19 mg/dl, 운동대조군 64.17±7.70 mg/dl, taurine군 106.00±18.22 mg/dl, low군 112.17±21.57 mg/dl, high군 174.20±25.92 mg/dl으로 비운동군에 비해 모든 운동군에서 전체적으로 glucose 수치가 감소하였으며, control군에 비해 모든 taurine군 ( $p < 0.01$ ), low군 ( $p < 0.01$ ), high군 ( $p < 0.001$ )에서 혈청 내 glucose 수치가 증가되는 경향을 나타내었다. BUN (Blood Urea Nitrogen) 측정 결과 비운동군 7.22±1.23 mmol/L, 운동대조군 12.00±0.78 mmol/L, taurine군 10.68±1.25 mmol/L, ow군 11.11±1.41 mmol/L, high군 9.83±1.23 mmol/L으로 비운동군에 운동군에서 모두 증가하는 경향을 나타내었으며 control군에 비해 high군에서 유의적으로 감소하였다 ( $p < 0.05$ ). Creatine kinase (CK)는 크레아틴 인산화 효소로 크레아틴과 ATP에 의하여 크레아틴인산을 생성하는 반응을 촉매하는 효소이다. 근육에 많고, 근 수축시 ATP의 소비를 보충하기 위해서 크레아틴 인산으로부터 ATP를 생성하여 공급한다. CK 측정결과 비운동군 0.19±0.02 (U/L), 운동대조군 0.23±0.02 (U/L), taurine군 0.23±0.03 (U/L), low군 0.23±0.03 (U/L), high군 0.20±0.02 (U/L)으로 비운동군에 비해 운동군에서 모두 증가하는 경향을 보였으나 군간의 유의적인 차이는 나타나지 않았다.

A)

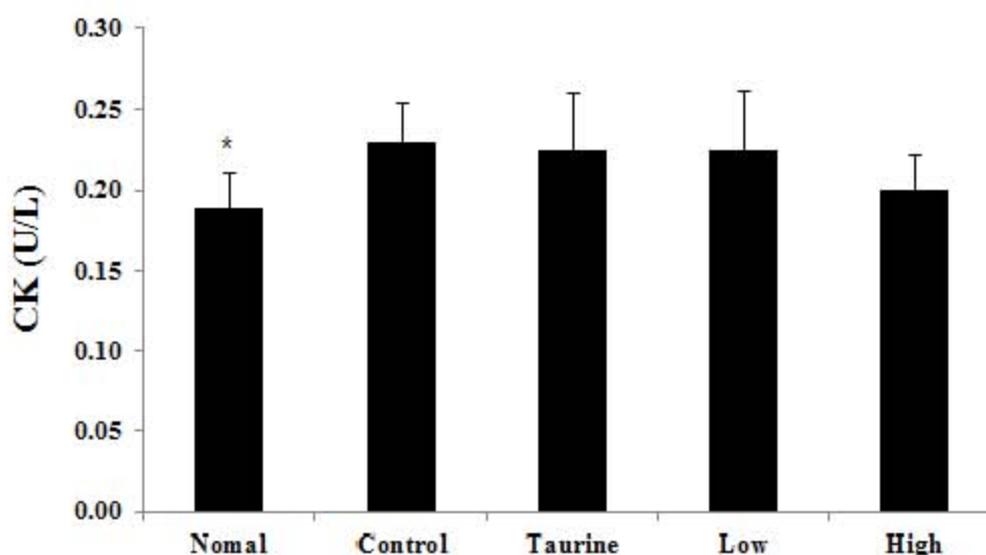


continued.

B)



C)



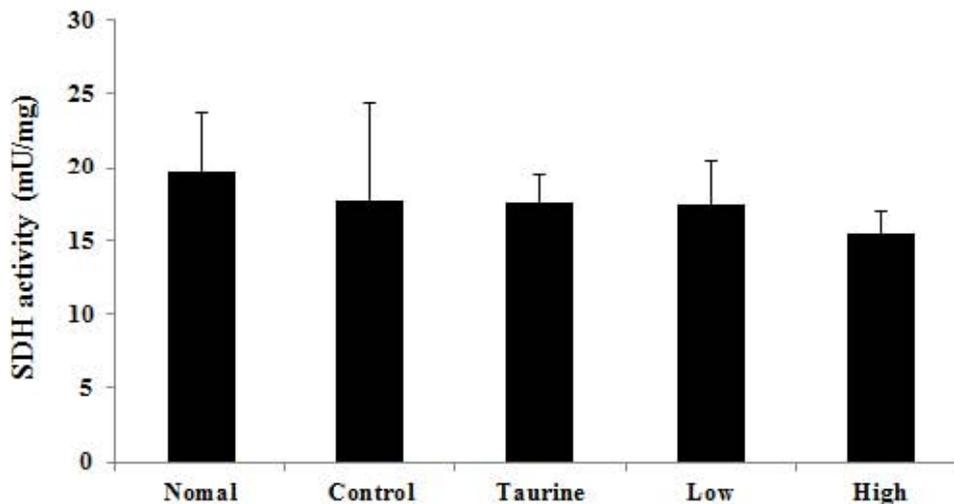
**Fig. 7-7.** Effects of water extracts from *Hippophae rhamnoides* L. on serum biomarkers in forced swimming experimental mice.

A) glucose contents in serum, B) blood urea nitrogen (BUN) contents, C) creatine kinase activities. Data are expressed as the mean latencies  $\pm$  S.D. (n = 10). \*\*\* P < 0.001, \*\* P < 0.01, \* P < 0.05 vs control. Normal: non-treated group, Control: forced swimming + saline administered group. Taurine: forced swimming + 100 mg/kg taurine, Low: forced swimming + 100 mg/kg water extract of *Hippophae rhamnoides* L. leaf, High: forced swimming + 300 mg/kg water extract of *Hippophae rhamnoides* L. leaf.

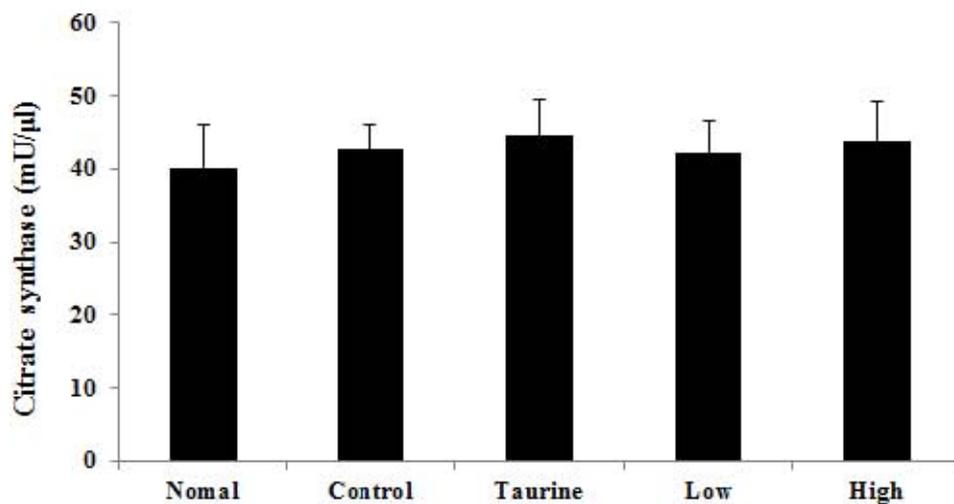
㉔ 근육 내 SDH, Citrate synthase 및 Hexokinase activity 측정

- SDH (Succinate dehydrogenase)는 succinate를 fumarate로 탈수소화하는 효소로 일반적으로 유산소성 운동에 의해 증가하는 것으로 알려져 있다. 본 실험에서 측정 결과 비운동군  $19.64 \pm 4.09$  mU/mg, 운동대조군  $17.65 \pm 6.68$  mU/mg, taurine군  $17.56 \pm 1.92$  mU/mg, low군  $17.38 \pm 3.04$  mU/mg, high군  $15.49 \pm 1.49$  mU/mg으로 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 근육 내 Citrate synthase 측정 결과 비운동군  $39.94 \pm 5.89$  mU/ $\mu$ l, 운동대조군  $42.62 \pm 3.22$  mU/ $\mu$ l, taurine군  $44.54 \pm 5.03$  mU/ $\mu$ l, low군  $42.24 \pm 4.29$  mU/ $\mu$ l, high군  $43.80 \pm 5.38$  mU/ $\mu$ l으로 유의적인 차이를 찾을 수 없었다. 해당과정에서 glucose를 인산화하는 효소로 포도당을 분해하여 pyruvate와 APT생성에 관여하는 효소인 Hexokinase의 활성을 측정 한 결과 비운동군  $0.84 \pm 0.31$  mU/ml, 운동대조군  $0.80 \pm 0.33$  mU/ml, taurine군  $0.75 \pm 0.19$  mU/ml, low군  $0.86 \pm 0.36$  mU/ml, high군  $0.73 \pm 0.11$  mU/ml 으로 군 간의 유의적인 차이를 찾을 수 없었다.

A)



B)



C

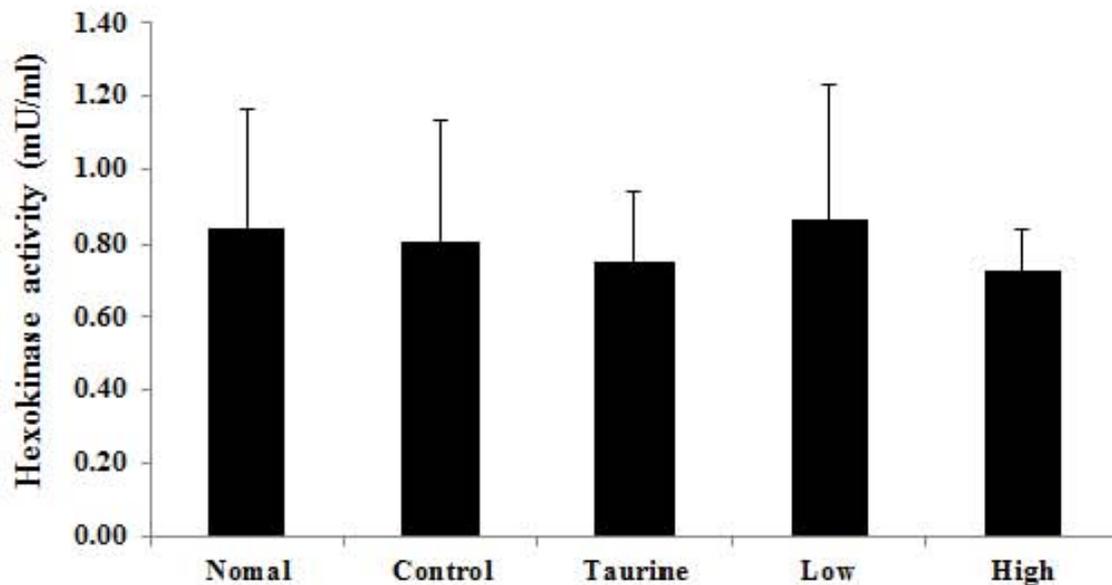


Fig. 7-8. Effects of water extracts from *Hippophae rhamnoides* L. on serum biomarkers in forced swimming experimental mice.

A) Succinate dehydrogenase activities. B) Citrate synthase activities. C) Hexokinase activities. Data are expressed as the mean latencies  $\pm$  S.D. (n = 10). \*\*\* P < 0.001, \*\* P < 0.01, \* P < 0.05 vs control. Normal: non-treated group. Control: forced swimming + saline administered group. Taurine: forced swimming + 100 mg/kg taurine. Low: forced swimming + 100 mg/kg water extract of *Hippophae rhamnoides* L. leaf. High: forced swimming + 300 mg/kg water extract of *Hippophae rhamnoides* L. leaf.

## 나. 비타민나무 육체적 항피로 생리활성 물질 및 활성기작 규명

### (1) 실험방법

#### (가) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 유도 근육세포 손상 모델에서의 비타민나무 단일물질의 보호효과 비교 및 탐색

##### ① 비타민나무 생리활성 단일물질의 사용 세포주 최대안전범위 설정

- 각 시료를 대상으로 MTT를 이용한 cell cytotoxicity를 측정하였다. L6 cell (myoblast, rat skeletal muscle cell)을 1% antimicrobics/antibiotics와 10% FBS를 함유한 DMEM 배지에서 배양하고 96-well plate에 세포수가 10<sup>4</sup>-10<sup>6</sup> cell/ml가 되도록 seeding 한 후 24시간 지난 후에 각각의 시료를 농도별로 처리하였다. 시료 처리 24시간 후, MTT test로 세포 생존율을 측정하였다.

##### ② H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 유도 근육세포 손상 모델에서의 비타민나무 단일물질의 보호효과 비교 및 탐색

- 실험 세포주 (L6 cell line)를 96well microplate에 2.5x10<sup>5</sup> cell/well 수준으로 분주하여 24시간 후 배양액을 새로 교체하고 100 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 첨가하여 세포독성을 유발시킨 후, 각 실험시료를 농도별로 첨가하여 24시간 배양 시켰다. 배양이 끝난 세포의 생존율은 MTT assay를 이용하여 측정하였다.

#### (나) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 유도 근육세포 손상 모델에서의 비타민나무 단일물질의 세포내 ROS 소거능 효과 비교 및 탐색

##### ① H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 유도 근육세포 손상 모델에서의 비타민나무 단일물질의 세포내 ROS 소거능 효과 비교 및 탐색

- DCF-DA는 세포막을 통해 확산되며 reactive oxygen species (ROS)가 존재할 경우에는 매우 빠르게 형광을 띤 DCF로 되며, 이런 DCF의 형광 세기는 ROS의 생성 지표로 이용되고 있다. L6 cell을 24 well plate에 5 × 10<sup>4</sup> cells을 seeding 하여 24시간 배양한 후 3% FBS를 함유한 배지에 10, 20, 30, 40µg/mL 의 단삼 추출물을 24시간 동안 처리하였다. 그 후 세포 생존률에 영향을 미치지 않는 농도인 100 mM 알코올을 2시간 처리한 뒤, 30 µM DCF-DA를 37°C에서 30분간 처리하고 485 nm 여기파장 및 585 nm의 방출파장에서 microplate 형광측정기를 사용하여 DCF 형성을 측정하였다.

### (2) 실험결과

#### (가) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 유도 근육세포 손상 모델에서의 비타민나무 단일물질의 보호효과 비교 및 탐색

##### ① 비타민나무 생리활성 단일물질의 사용 세포주 최대안전범위

- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 유도 근육세포 손상 모델에서의 비타민나무 단일물질 (chrysin, isorhamnetin, quercetin, kaempferol, myricetin, protocatechuic acid, p-hydroxybenzoic acid, vanillic acid, salicylic acid, p-coumaric acid, cinnamic acid, caffeic acid)의 보호효과 비교 및 탐색에 앞서 각 시료의 cytotoxicity를 측정하여 최대안전 범위를 설정하였다. L6 cell (myoblast, rat skeletal muscle cell)을 이용하여 각 시료의 농도를 50 그리고 100 µM 농도로 설정하여 세포독성 실험을 수행하였으며, 50 µM 농도에서는 모든시료에서 세포 생존도에 유의적 변화는 없었다. 하지만 100 µM 농도에서 myricetin (94.43 ± 4.21%), protocatechuic acid (92.33 ± 4.33%), p-hydroxybenzoic acid (93.35 ± 4.05%),

cinnamic acid ( $95.12 \pm 4.13\%$ )에서 무처리군과 비교하여 유의적으로 세포 생존도가 감소하였음을 확인하였다. 본 실험의 결과로 50 uM 농도 내에서 생리활성 실험을 수행 하였다.

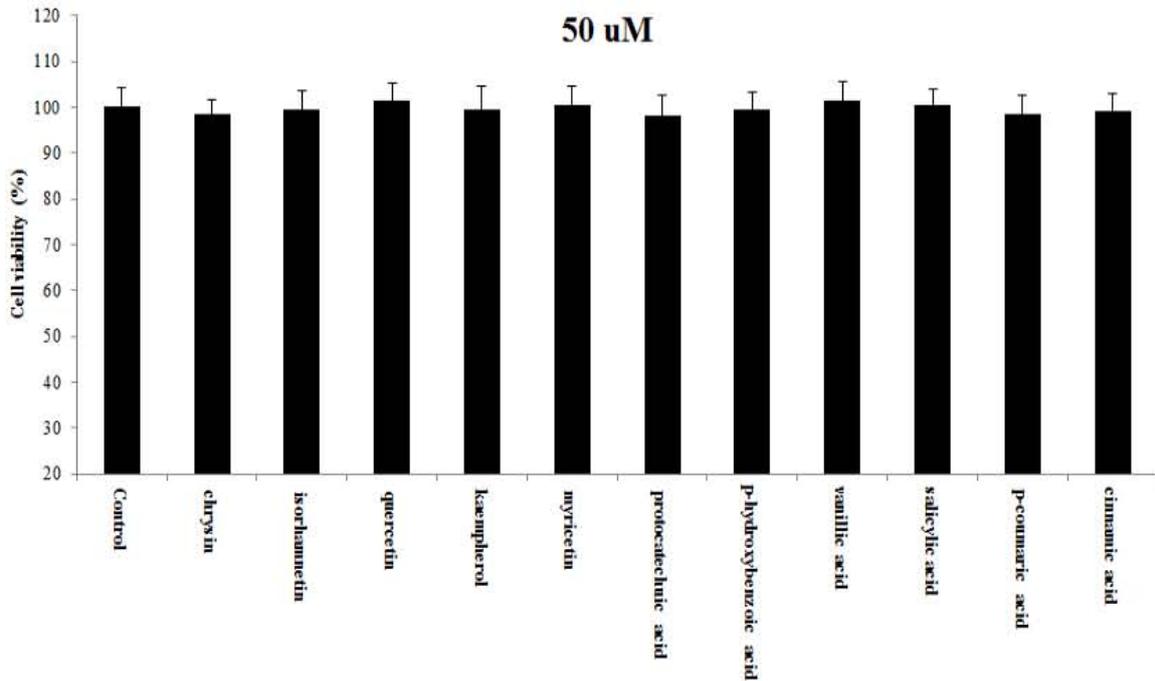


Fig. 7-9. Cytotoxicity of compounds from *Hippophae rhamnoides* on L6 cells (50 uM). The columns represent mean  $\pm$  SD, \* $p < 0.05$  vs the Control group.

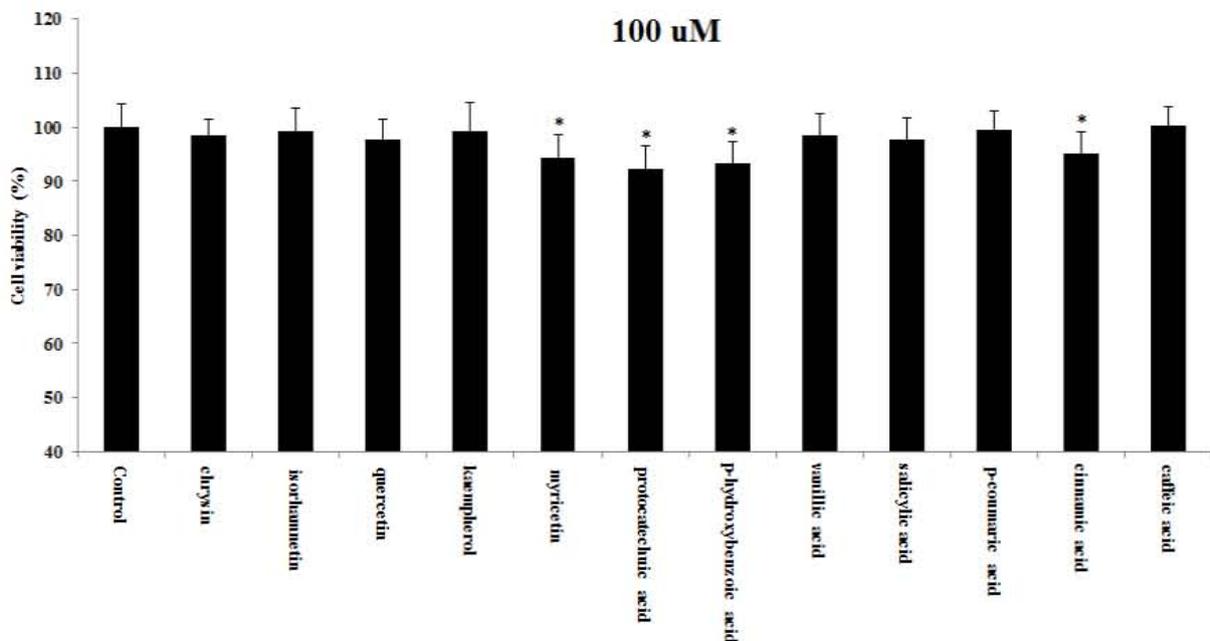


Fig. 7-10. Cytotoxicity of compounds from *Hippophae rhamnoides* on L6 cells (50 uM). The columns represent mean  $\pm$  SD, \* $p < 0.05$  vs the Control group.

② H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 유도 근육세포 손상 모델에서의 비타민나무 단일물질의 보호효과 비교 및 탐색

- 실험에 앞서 설정한 최대 안전범위인 50 uM 농도에서 실험을 수행하였다. Fig. 7-11에서 보는 바와 같이, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 24시간 동안 처리하자 무처리군인 Control 군과 대비하여 세포 생존도가 61.32 ± 4.32%로 유의적으로 크게 감소함을 확인 하였다 (P<0.001). 하지만 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 함께, 각 비타민나무 단일물질 (chrysin, isorhamnetin, quercetin, kaempferol, myricetin, protocatechuic acid, p-hydroxybenzoic acid, vanillic acid, salicylic acid, p-coumaric acid, cinnamic acid, caffeic acid)을 처리 하였을 때, isorhamnetin (86.33 ± 4.31%)의 세포생존도가 유의적으로 가장 크게 증가한 것을 확인하였으며, 그리고 p-coumaric acid (79.65 ± 3.64%)도 동일한 보호효과를 보였다.

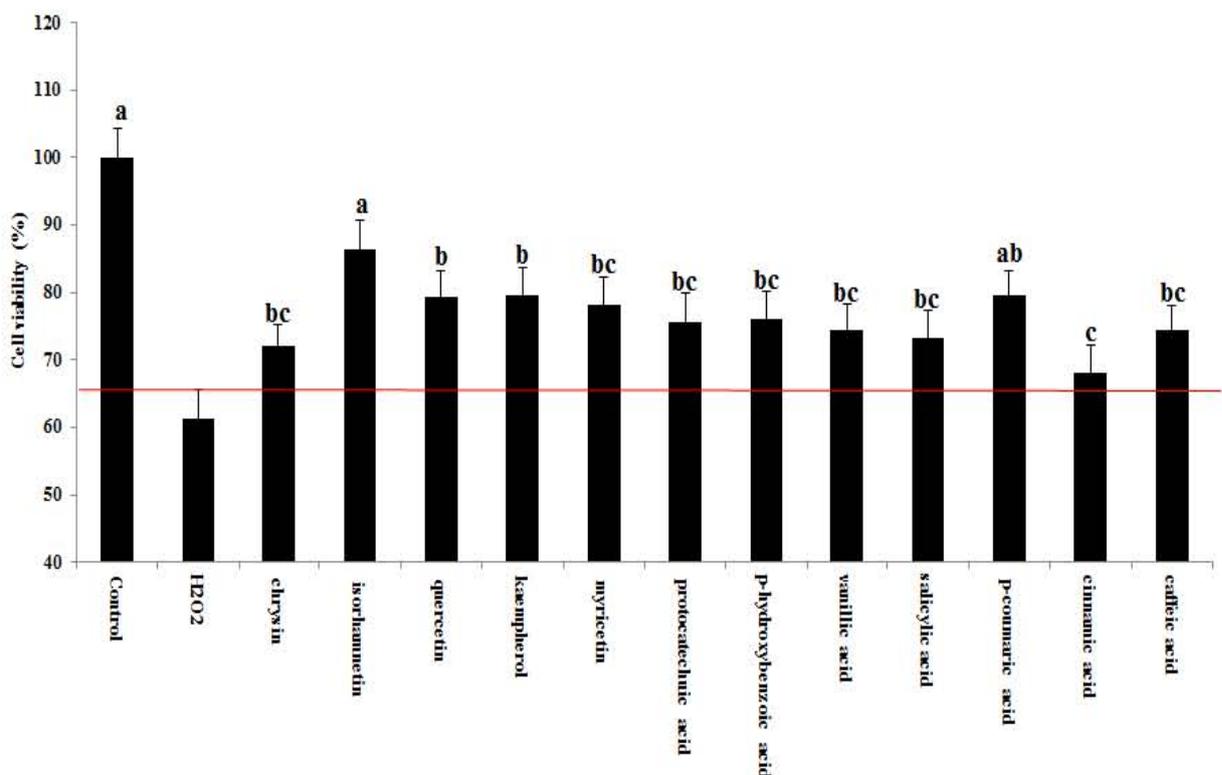


Fig. 7-11. Protective effects of compounds from *Hippophae rhamnoides* against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced toxicity on L6 cells. The different letters above bars are significant different based ANOVA at  $p < 0.05$ . Data expressed as means ± SD.

(나) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 유도 근육세포 손상 모델에서의 비타민나무 단일물질의 세포내 ROS 소거능 효과 비교 및 탐색

① H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 유도 근육세포 손상 모델에서의 비타민나무 단일물질의 세포내 ROS 소거능 효과 비교 및 탐색

- DCF-DA는 세포막을 통해 확산되며 reactive oxygen species (ROS)가 존재할 경우에는 매우 빠르게 형광을 띤 DCF로 되며, 이런 DCF의 형광 세기는 ROS의 생성 지표로 이용되고 있다. L6 세포에 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리하자 세포내 ROS 생성이 증가하여 fluorescence unit이 유의적으로 크게 증가하였으며 (19642 ± 1052 fluorescence unit), 각 비타민나무 단일물질 (chrysin, isorhamnetin, quercetin, kaempferol, myricetin, protocatechuic acid, p-hydroxy benzoic acid, vanillic acid, salicylic acid, p-coumaric acid, cinnamic acid, caffeic acid)을 동일 농도로 처리 하였을 때, 세포내 ROS 수준이 유의적으로 모두 감소하였다. 그 중에서도 isorhamnetin 처리군 (12844 ± 1032 fluorescence unit)에서 가장 유의적으로 높은 세포내 ROS 소거능을 확인 할 수 있었다.

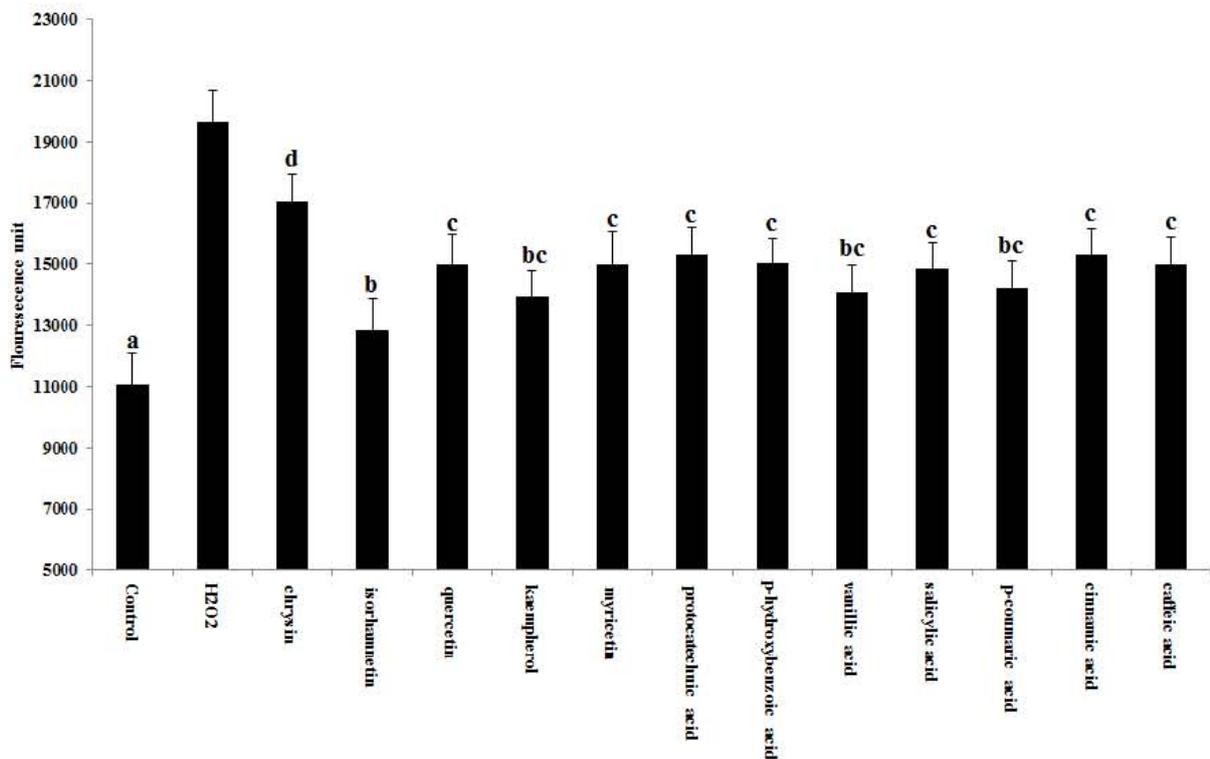


Fig. 7-12. Scavenging effects of compounds from *Hippophae rhamnoides* against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced intracellular ROS level on L6 cells. The different letters above bars are significant different based ANOVA at  $p < 0.05$ . Data expressed as means ± SD.

(다) 유속 pool을 활용한 비타민나무 열수 추출물과 isorhamnetin의 육체적 피로활성 평가

(1) 실험방법

① 실험동물

- 5주령의 ICR 마우스 (male)을 구입한 후 6일 동안 동물사육실의 환경 하에서 검역 및 순화시키면서 일반 건강상태를 관찰한 후, 건강한 개체를 선별하여 시험에 사용하였다. 개체식별은 유성매직을 이용하여 각 개체번호 꼬리에 표시하며, 사육상자는 시험번호, 시험물질명, 시험항목, 입수일, 순화기간, 군분리일, 시험기간, 성/동물번호 및 시험책임자를 기재한 개체식별카드를 부착하여 식별하였다. 순화기간 중 이상이 발생한 개체와 정상적으로 체중이 증가하지 않은 개체를 제외한 후, 각 군간 평균체중 및 표준편차가 균일하도록 군분리를 실시하였다.

② 사육환경

- 본 시험의 환경은 온도 ( $22 \pm 3$ ) °C, 상대습도 ( $50 \pm 20$ ) %, 환기횟수 (10 ~ 15) 회/시간, 조명주기 12시간 (8:00 ~ 20:00), 조도 (150 ~ 300) Lux의 사육환경으로 설정된 동물사육실에서 사료와 음용수를 급여하여 사육하며, 순화 및 시험기간 동안 격리 사육을 실시하였다.

③ 시험군의 구성

Group	시험물질	Dose (mg/kg B.W.)	Sex	No. of animal
Control	Saline	0	Male	1001~1010
Nomal	Saline	0	Male	2001~2010
Taurine	Taurine	1000	Male	3001~3010
HRW-100	비타민나무(잎) 열수 추출물	100	Male	4001~4010
HRW-300	비타민나무(잎) 열수 추출물	300	Male	5001~5010
IR-10	isorhamnetin	10	Male	6001~6010
IR-50	isorhamnetin	50	Male	7001~7010

③ 시험물질 투여

- 순화 및 군분리 후 시험물질을 시험기간 동안 각 농도별로 매일 동일시간에 경구투여 하였으며, 대조군은 동일 부피의 saline을 투여하였다.

④ 일반증상 관찰

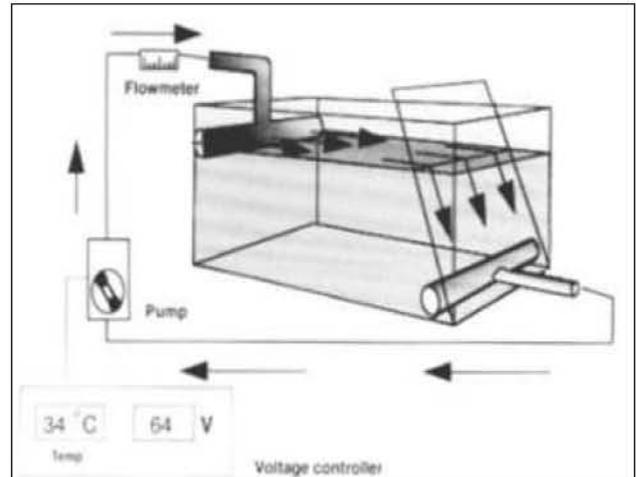
- 전 개체에 대하여 매일 1회 이상, 시험물질투여 후 15일 동안 일반증상관찰을 실시하였다.

⑤ 체중변화

- 체중은 시험물질투여 후 15일 동안 5일에 1회 측정하였다.

⑦ 운동능력 평가를 위한 유속 pool 운동장치

- 지구적 운동능력을 평가하기 위하여 이용된 수영 수조 (Swimming pool)는 아크릴로 제작되었으며 (90×45×45cm) 운동능력 측정 시에는 높이 35cm까지 물을 채운 후 mouse의 수온을 34℃로 유지하여 실험하였다. 운동부하는 물 표면의 유속으로 조절하였으며, 표면유속은 전압조절기가 연결되어 있는 pump와 water flowmeter (type F45500, Blue white Co, Westminster, CA, USA)를 이용하여 물의 순환을 통해 조절하였다.



⑧ 지구적 운동 능력 측정

- 본 실험 시작하기 전 수영에 적응시키기 위하여 1번의 적응 수영을 하게한 후 (7L/min, 15min), 평균 유영 시간이 모든 군에서 일정하도록 균분리를 실시하였다. 마우스는 운동실험 3시간 전부터 금식시키고, 운동 시행 2시간 전 시료를 경구 투여하였다. 모든 유영운동 능력 측정시각은 오후 1시부터 5시까지 실시하며, 지구적 운동 능력의 측정은 한계치 수영, 즉 마우스가 물 표면으로 7초간 올라오지 못하는 점을 한계점으로 하여 마우스 수영 시작 시점부터 한계점까지의 총시간을 측정하였다

⑨ 운동 중 혈중 젖산 (Lactate) 및 혈당 (Blood glucose) 측정

- 한계유영운동 동안의 꼬리 정맥혈을 가지고 젖산을 측정하였다.젖산은 한계유영운동 전, 운동 15분 후, 한계치 운동 직후에 꼬리 정맥혈을 회수하여 젖산측정기 (Lactate Pro LT-1710, ARKRAY, Kyoto, Japan)를 이용하여 측정하였다.

⑨ 부검

- 실험 마지막 날 경구 투여 후 3시간 전에 식이를 제거하고 에테르 마취하에 해부를 하였다. 각각의 mouse에서 대퇴근, 비복근을 채취하였고, 대정맥에서 혈액을 채취하여 3,000 rpm에서 원심분리 후 혈청만 분리하였다. 조직은 액체질소에 즉시 보관하여 실험에 이용하였다.

⑩ 근육, 간 조직 중의 글리코겐 측정

- 부검 후 적출한 근육과 간 조직은 질소가스로 냉각시켜 막자사발을 이용해 powder 형태로 만들어 -70℃에 보관하며 사용하였다. 글리코겐 측정은 Glycogen Assay Kit (Bio Vision, Inc., Cat# K646-100, Mountain View, CA 94043)를 사용하여 측정하였다.

⑪ 혈청 내 LDH 측정

- 혈액을 채취한 후 혈청을 분리하여 LDH 효소 활성평가는 Lactate Dehydrogenase Activity Assay Kit (Bio Vision, Inc., Cat# K726-500, Mountain View, CA 94043)를 사용하여 측정하였다.

⑫ 혈청 내 BUN, GLU 및 CK 측정

- 혈액을 채취한 후 혈청을 분리하여 BUN과 GLU는 자동혈액분석기(FUJIFILM, DRI-CHEM 4000i, Tokyo, Japan)를 이용하여 측정하였고 CK는 Creatine Kinase Activity Colorimetric Assay Kit (Bio Vision, Inc., Cat# K777-100, Mountain View, CA 94043)를 사용하여 측정하였다.

⑬ 혈청 내 항산화 효소 활성 측정

- 동물을 희생시켜 뇌를 적출하여 해마부위를 분리한 후, 무게의 10배의 D-PBS를 넣어 균질화한 다음 13,000 rpm으로 15분간 원심분리한 후 상층액을 -70℃에 보관하여 사용하였음. BSA(bovine serum albumine)를 표준곡선으로 사용하여 Bradford의 분석방법을 이용하여 단백질 정량을 실시한 후 superoxide dismutase, catalase, glutathione-s-transferase, glutathione reductase, glutathione peroxidase의 활성 및 reduced glutathione 함량을 측정하는데 이용하였다.

- SOD 활성은 SOD assay kit-WST(Dojindo, Kumamoto,Japan)를 이용하여 지시대로 측정하였다. 96-well plate에 혈청을 넣고 WST-1 (2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, mono-sodium salt)과 xanthine oxidase working solution을 첨가한 다음 37℃에서 20분간 배양한 후 microplate reader(Molecular Devices, Menlo Park, CA, USA)를 이용하여 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

- CAT 활성도는 50 mM phosphate buffer (pH 7.0), 15 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 용액과 1 mg protein 의 시료를 넣은 후 240 nm에서 3분간 변화되는 흡광도를 측정하여 직선으로 나타나는 최초 60초 동안의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 감소량을 활성도로 나타내었다. 효소의 활성도는 1 mg의 단

백질이 1분 동안에 1  $\mu\text{M}$ 의  $\text{H}_2\text{O}_2$ 를 분해시키는 효소의 양을 1 unit로 하였다.

- GPX 활성도는 1 mM EDTA를 함유한 100 mM phosphate buffer (pH 7.0), 3 mM GSH, 0.45 mM NADPH, 20 mM glutathione reductase 0.72 U와 1 mg protein 시료를 넣고 37°C에서 5분간 방치한 다음 4 mM cumene hydroperoxide를 첨가한 후 반응을 개시하여 340 nm에서 3분 동안 변화되는 흡광도를 측정하였다.

- GR 활성은 Smith 등의 spectrophotometric method로 분석하였다. 96 well plat를 준비하고, 세포 lysate 10  $\mu\text{L}$ 에 100 mM Potassium phosphate buffer 30  $\mu\text{L}$ , 3 mM DTNB 50  $\mu\text{L}$ , 2 mM oxidized glutathione 100  $\mu\text{L}$ 를 혼합한 후 2 mM NADPH를 10  $\mu\text{L}$  첨가하여 효소반응을 유도하고 5분간 412 nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다. 효소활성은 U/mg protein으로 계산하였다.

- GSH 함량은 Griffith 등의 spectrophotometric method로 분석하였다. 96 well plate를 준비하고, 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0) 7.54 mL, 6 unit glutathione reductase 228  $\mu\text{L}$ , 3 mM DTNB 228  $\mu\text{L}$ 를 혼합하여 기질액을 준비하였다. 세포 lysate 10  $\mu\text{L}$ 에 준비한 기질액 150  $\mu\text{L}$ 를 잘 혼합한 후 50 mM NADPH 50  $\mu\text{L}$ 를 첨가하여 반응을 유도하고 5분간 412 nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다. 각 군의 GSH량은 GSH 표준곡선으로 계산하여  $\mu\text{moles/mg protein}$ 으로 나타내었다.

#### ⑮ 통계처리

- 본 시험에서는 체중데이터에 대한 분산의 동질성을 비교하기 위하여 SPSS 통계프로그램(ver 10.1)을 이용하여 F 검정을 실시하였고, 분산의 동질성이 인정되어 student t test를 실시하였다.

## (2) 실험결과

### (가) 유속 pool을 활용한 비타민나무 열수 추출물의 육체적 피로 in vivo 평가

#### ① 사망률 및 일반 증상

- 시험 기간 동안 시험물질 투여에 따른 이상증상이나 이상행동을 관찰한 결과, 투여와 관련된 행동적 이상 및 사망한 개체는 없었다.

#### ② 체중변화

- 시험 기간 동안 각 시험군 간의 체중증가량을 무처리군 (control) 과의 유의검정을 실시 해 본 결과, 각 군과 control군과의 체중 증가량에 대한 유의적 차이는 없었다 (data not shown).

#### ③ 지구적 운동 능력 측정

- 지구적 운동능력을 평가하기 위하여 무산소성 역치 이하의 운동 강도인 유속 7L/min의 운동 강도 하에서 운동을 시작시켜 유명 한계치까지의 운동시간을 측정 측정된 결과는 Fig. 7-13.과 같다. 운동시간을 측정한 결과 운동대조군인 Control에서는  $50.78 \pm 3.14$  min, 양성대조군인 Taurine군은  $58.90 \pm 4.07$  min, HRW-100군  $56.89 \pm 4.07$  min, HRW-300군  $58.03 \pm 4.05$  min, IR-10군  $59.04 \pm 4.32$  min, IR-50군  $61.01 \pm 2.54$  min으로 양성대조군인 taurine군 ( $p < 0.01$ )과 비타민나무잎 열수 추출물을 처리한 HRW-100군 ( $p < 0.05$ ), HRW-300군 ( $p < 0.01$ )에서 유의적인 차이를 확인 할 수 있었고, isorhamnetin을 처리한 IR-10군 ( $p < 0.01$ )과 IR-50군 ( $p < 0.001$ )에서 역시 유의적인 차이를 나타내었다.

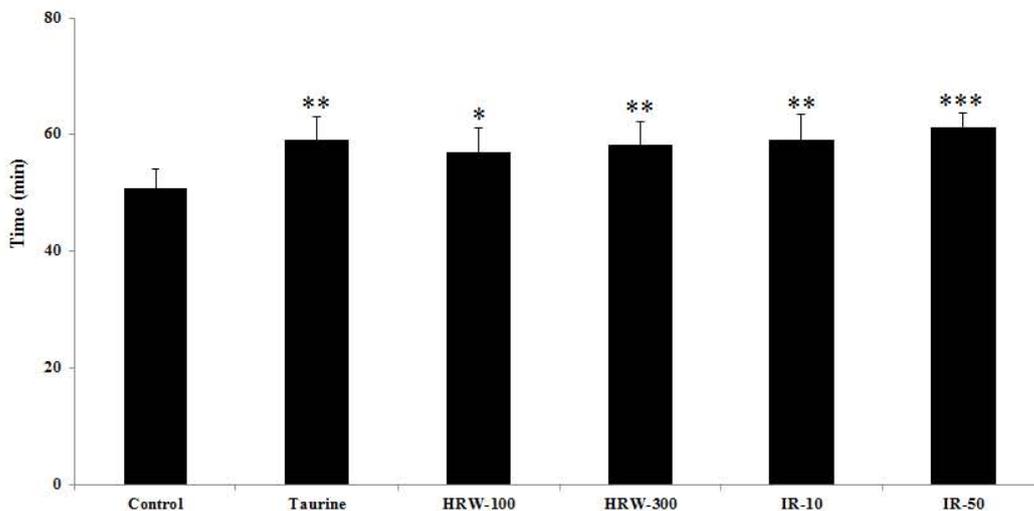


Fig 7-13. Endurance exercise capacities of Water extracts *Hippophae rhamnoides* L. and isorhamnetin in experimental mice. Data are expressed as the mean latencies  $\pm$  S.D. (n = 10). \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*  $P < 0.05$  vs control. Control: forced swimming + saline administered group. Taurine: forced swimming + 100 mg/kg taurine, HRW-100: forced swimming + 100 mg/kg water extract of *Hippophae rhamnoides* L. leaf, HRW-300: forced swimming + 300 mg/kg water extract of *Hippophae rhamnoides* L. leaf, IR-10: forced swimming + 10 mg/kg isorhamnetin, IR-50: forced swimming + 50 mg/kg isorhamnetin.

#### ④ 운동 중 혈중 젖산 (Lactate) 측정

- 젖산 (lactate)은 피루브산이 환원되어 생성된 혐기성 해당 반응의 종말대사체로 운동 중 체액에서의 그 농도가 증가하게 되고, 이 젖산이 증가하여 체내에 피로를 유발시킨다. Fig. 7-14는 운동 전, 운동 15분 후, 운동 한계시간 직후의 혈액 내 젖산의 수준을 측정하였다. 운동 전 젖산 수치는 Control군  $2.87 \pm 1.17$  mg/dl, Taurine군  $3.51 \pm 0.51$  mg/dl, HRW-100군  $3.14 \pm 0.96$  mg/dl, HRW-300군  $2.83 \pm 0.78$  mg/dl, IR-10군  $2.35 \pm 0.68$  mg/dl, IR-50군  $2.84 \pm 0.98$  mg/dl으로 유의적 차이가 나타나지 않았으나, 운동 15분 경과 후 측정 결과는 운동대조군  $6.51 \pm 1.47$  mg/dl, taurine군  $6.05 \pm 1.00$  mg/dl, HRW-100군  $3.98 \pm 1.23$  mg/dl, HRW-300군  $3.45 \pm 0.95$  mg/dl, IR-10군  $3.51 \pm 0.84$  mg/dl, IR-50군  $3.21 \pm 0.81$  mg/dl으로 비타민나무 잎 열수 추출물을 먹인 군과 isorhamnetin을 먹인 모든 그룹에서 유의적인 차이를 나타내었고( $p < 0.01$ ), 한계수영 직후 측정 결과 Control군  $16.64 \pm 1.47$  mg/dl, Taurine군  $15.42 \pm 0.58$  mg/dl, HRW-100군  $14.10 \pm 1.80$  mg/dl, HRW-300군  $13.12 \pm 3.26$  mg/dl, IR-10군  $13.35 \pm 0.83$  mg/dl, IR-50군  $12.05 \pm 0.82$  mg/dl으로 HRW-300군, IR-10군, IR-50군에서 유의적으로 젖산 수치가 낮게 측정되었다( $p < 0.05$ ).

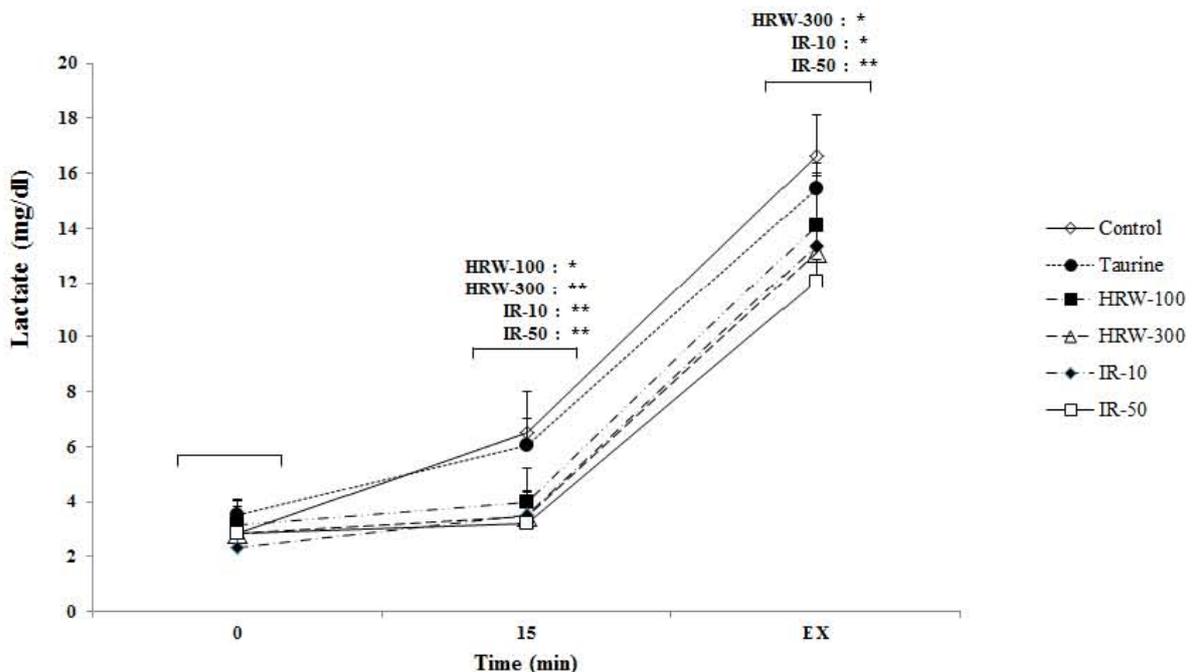


Fig. 7-14. Effects of water extracts from *Hippophae rhamnoides* L. and isorhamnetin on lactate levels in forced swimming experimental mice. Data are expressed as the mean latencies  $\pm$  S.D. (n = 10). \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*  $P < 0.05$  vs control. Control: forced swimming + saline administered group. Taurine: forced swimming + 100 mg/kg taurine, HRW-100: forced swimming + 100 mg/kg water extract of *Hippophae rhamnoides* L. leaf, HRW-300: forced swimming + 300 mg/kg water extract of *Hippophae rhamnoides* L. leaf, IR-10: forced swimming + 10 mg/kg isorhamnetin, IR-50: forced swimming + 50 mg/kg isorhamnetin.

⑤ 근육 조직 중의 글리코겐 측정

– 근육은 섭취하고 저장된 글리코겐을 연료로 하여 움직이는데, 격렬한 상황에서 지속적인 유산소 운동이 이루어지는 동안 근육에서 사용되는 에너지원의 전부라고 볼 수 있으며 근육 글리코겐의 충분한 저장과 공급 없이는 지속적이고 격렬한 운동은 불가능하다. 유명 한 계치까지의 운동 후 탈진 직후 곧바로 근육을 채취하여 유명운동 부하에 의해 유발된 피로에 대하여 근육 조직의 glycogen 농도를 관찰한 결과는 다음과 같다. 비운동군 (Normal군)은  $3.57 \pm 0.52$  mg/g으로 운동대조군 (Control군)  $2.15 \pm 0.42$  mg/g에 비해 높은 글리코겐 함량을 나타내었고, 양성대조군 (taurine군)  $2.32 \pm 0.45$  mg/g은 유의적인 차이를 나타내지 않았지만 HRW-100군 ( $2.81 \pm 0.35$  mg/g,  $p < 0.05$ )과 HRW-300군 ( $3.02 \pm 0.31$  mg/g,  $p < 0.01$ )은 taurine군에 비해 유의적으로 글리코겐 함량이 높게 측정되었으며, IR-10군 ( $3.15 \pm 0.25$  mg/g)과 IR-50군 ( $3.31 \pm 0.32$  mg/g)에서 역시 taurine군에 비해 유의적으로 글리코겐 함량이 높게 측정되었다. 이는 lactate 함량과 연관 지어 근육 내 pH값의 회복으로 에너지 대사의 향상됨으로서 상대적으로 신체 내 글리코겐 소모를 줄임으로 절약효과로 인한 글리코겐의 함량의 증가를 예상 할 수 있다.

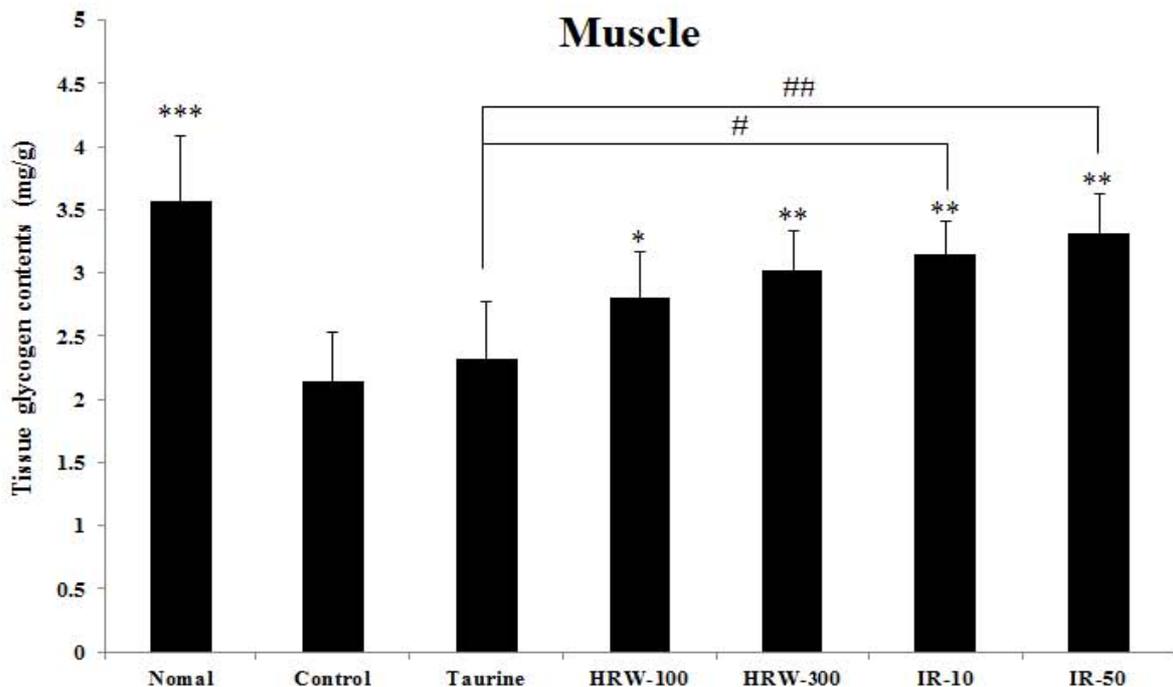


Fig. 7-15. Effects of water extracts from *Hippophae rhamnoides* L. and isorhamnetin on muscle glycogen contents in forced swimming experimental mice. Data are expressed as the mean latencies  $\pm$  S.D. (n = 10). \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*  $P < 0.05$  vs control. Control: forced swimming + saline administered group. Taurine: forced swimming + 100 mg/kg taurine, HRW-100: forced swimming + 100 mg/kg water extrat of *Hippophae rhamnoides* L. leaf, HRW-300: forced swimming + 300 mg/kg water extrat of *Hippophae rhamnoides* L. leaf, IR-10: forced swimming + 10 mg/kg isorhamnetin, IR-50: forced swimming + 50 mg/kg isorhamnetin.

⑥ 간 조직 중의 글리코겐 측정

— 근육 조직과 같은 방법으로 간 조직의 glycogen 농도를 관찰한 결과, 근육 조직에서의 비슷한 경향을 나타내었다. 비운동군 (Nomal군)은  $8.45 \pm 0.43$  mg/g으로 운동대조군 (Control군)  $6.25 \pm 0.46$  mg/g에 비해 높은 글리코겐 함량을 나타내었고, 양성대조군 (taurine군)  $7.20 \pm 0.45$  mg/g은 control군에 비해 유의적으로 높은 글리코겐 함량을 나타내었다. HRW-100군 ( $7.35 \pm 0.56$  mg/g,  $p < 0.05$ ), HRW-300군 ( $7.54 \pm 0.56$  mg/g,  $p < 0.01$ ), IR-10군 ( $7.86 \pm 0.45$  mg/g,  $p < 0.01$ ) IR-50군 ( $7.90 \pm 0.44$  mg/g,  $p < 0.01$ )에서도 control군에 비해 높은 글리코겐 함량을 나타냈으며 isorhamnetin을 먹인 그룹에서는 두 가지 농도에서 모두 타우린을 먹인 군 보다 유의적으로 높은 글리코겐 함량을 나타내었다. 이는 근육내 글리코겐 함량과 마찬가지로 근육내 pH값의 회복으로 에너지 대사의 향상됨으로서 상대적으로 지방조직 내에 글리코겐 소모를 줄임으로 절약효과로 인한 글리코겐의 함량의 증가를 예상 할 수 있다.

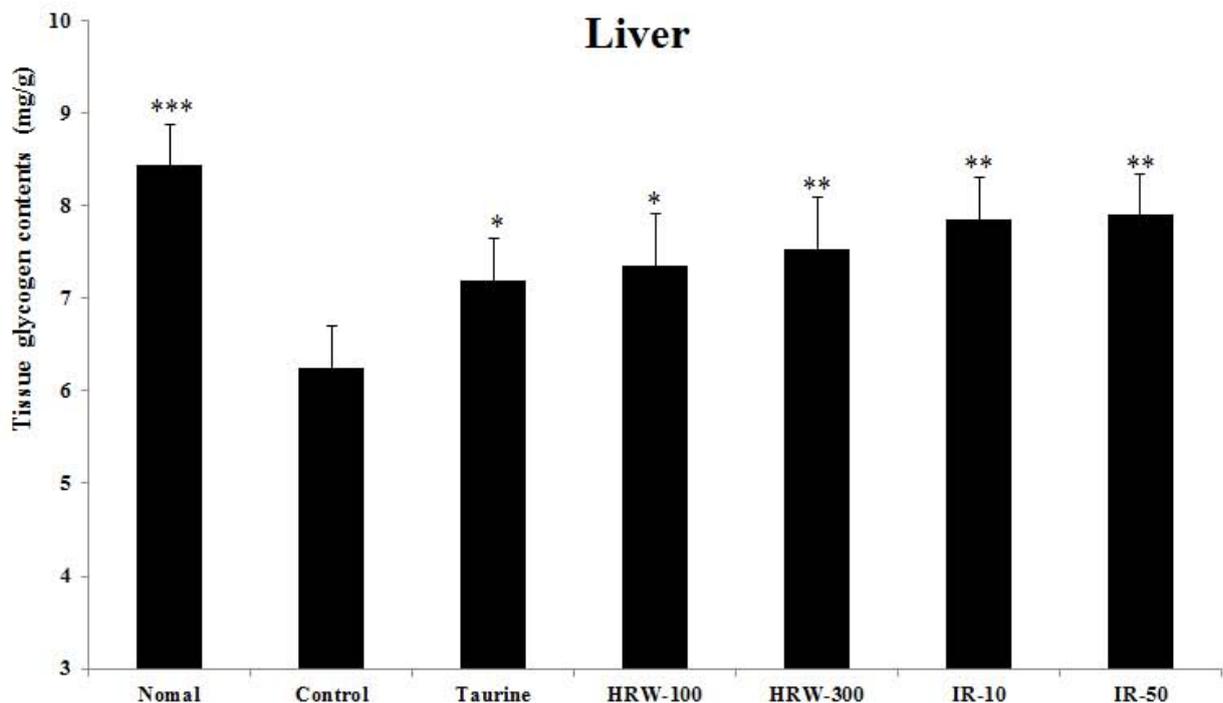


Fig. 7-16. Effects of water extracts from *Hippophae rhamnoides* L. and isorhamnetin on liver glycogen contents in forced swimming experimental mice. Data are expressed as the mean latencies  $\pm$  S.D. (n = 10). \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*  $P < 0.05$  vs control. Control: forced swimming + saline administered group. Taurine: forced swimming + 100 mg/kg taurine, HRW-100: forced swimming + 100 mg/kg water extrat of *Hippophae rhamnoides* L. leaf, HRW-300: forced swimming + 300 mg/kg water extrat of *Hippophae rhamnoides* L. leaf, IR-10: forced swimming + 10 mg/kg isorhamnetin, IR-50: forced swimming + 50 mg/kg isorhamnetin.

⑦ 근육 및 혈청 내 LDH (lactate dehydrogenase) 측정

- 운동중의 LDH 증가는 근 활동 중 근세포에서 젖산의 형성과 전환을 조절하여 근 손상의 지표가 된다. 해부 직후 곧바로 채취한 혈액에서 분리한 serum으로 LDH activity를 측정 한 결과, LDH 농도는 비운동군  $16.12 \pm 1.42$  mU/ml, 운동대조군  $25.05 \pm 1.89$  mU/ml로 운동군에 비해 비운동군의 LDH 효소 활성이 유의적으로 낮게 측정되었고 ( $p < 0.001$ ), taurine군 ( $22.51 \pm 1.90$  mU/ml)은 운동군에 비해 LDH 효소 활성이 낮아지는 경향을 나타내었으나 유의적인 차이가 나타나지 않은 반면 HRW-100군 ( $20.98 \pm 1.53$  mU/ml,  $p < 0.05$ ), HRW-300군 ( $20.04 \pm 1.75$  mU/ml,  $p < 0.01$ ), IR-10군 ( $19.01 \pm 1.35$  mU/ml,  $p < 0.01$ ), IR-50 ( $18.31 \pm 1.51$  mU/ml,  $p < 0.01$ )에서는 모두 운동군에 비해 낮은 LDH 효소 활성을 나타내었다.

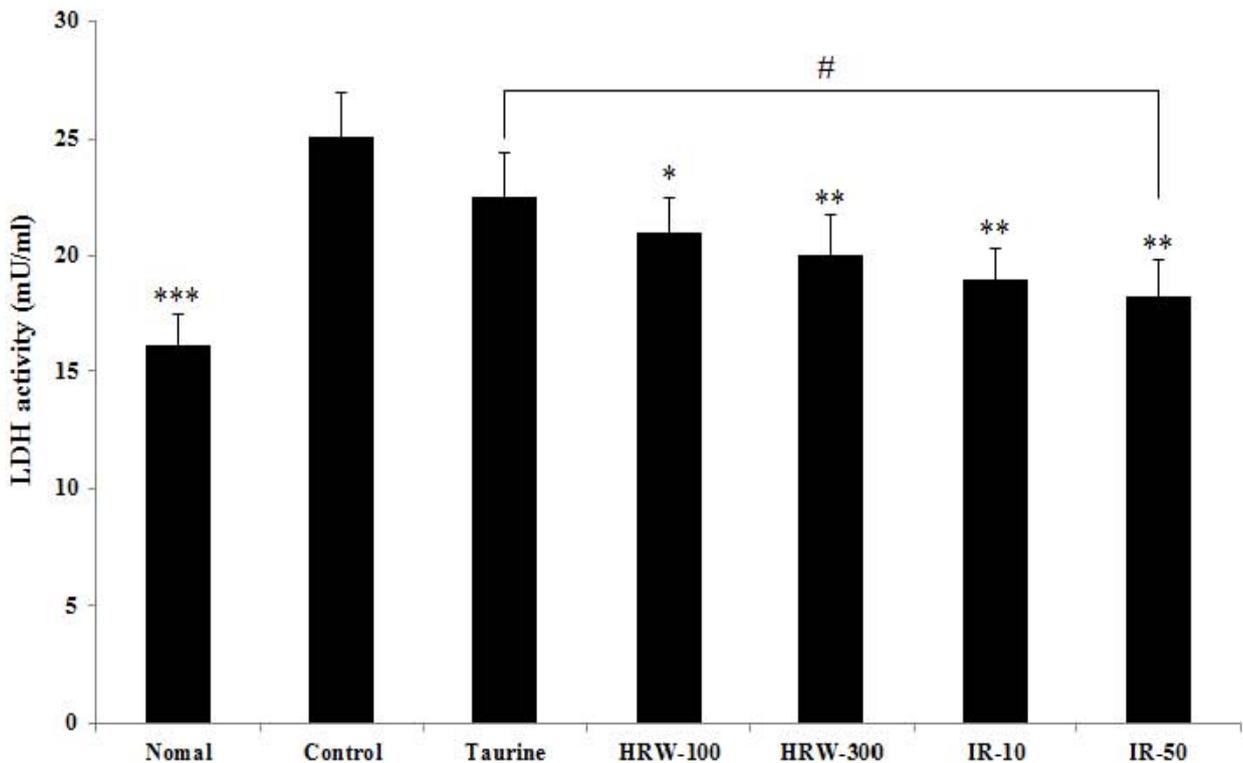


Fig. 7-17. Effects of water extracts from *Hippophae rhamnoides* L. and isorhamnetin on lactate dehydrogenase activities in forced swimming experimental mice. Data are expressed as the mean latencies  $\pm$  S.D. (n = 10). \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*  $P < 0.05$  vs control. Control: forced swimming + saline administered group. Taurine: forced swimming + 100 mg/kg taurine, HRW-100: forced swimming + 100 mg/kg water extract of *Hippophae rhamnoides* L. leaf, HRW-300: forced swimming + 300 mg/kg water extract of *Hippophae rhamnoides* L. leaf, IR-10: forced swimming + 10 mg/kg isorhamnetin, IR-50: forced swimming + 50 mg/kg isorhamnetin.

㉔ 혈중 GLU (Glucose) 측정

- Glucose(GLU)는 운동의 에너지원으로, 계속되는 운동시간과 근육에 저장되어 있는 glycogen이 glucose으로 전환되어 혈액 중으로 공급되며 필요한 에너지로 이용되며, 강제 수영과 같은 심한 운동을 할 경우 체내의 glucose 함량은 현저히 감소하게 된다. 본 실험에서 혈청 내 glucose (GLU) 측정 결과, 비운동군  $197.25 \pm 27.19$  mg/dl, 운동대조군  $64.17 \pm 36.23$  mg/dl, taurine군  $142.22 \pm 26.49$  mg/dl, HRW-100군  $128.42 \pm 21.57$  mg/dl, HRW-300군  $142.23 \pm 23.31$  mg/dl, IR-10군  $143.35 \pm 19.42$ , IR-50군  $159.94 \pm 20.31$ 으로 비운동군에 비해 모든 운동군에서 전체적으로 glucose 수치가 감소하였으며, control군에 비해 taurine군 ( $p < 0.01$ ), HRW-100군 ( $p < 0.01$ ), HRW-300군 ( $p < 0.01$ ), IR-10군 ( $p < 0.01$ )에서 혈청 내 glucose 수치가 유의적으로 증가되는 경향을 나타내었으며, 특히 IR-50군 ( $p < 0.001$ )에서는 normal군과 유의한 결과를 나타내었다.

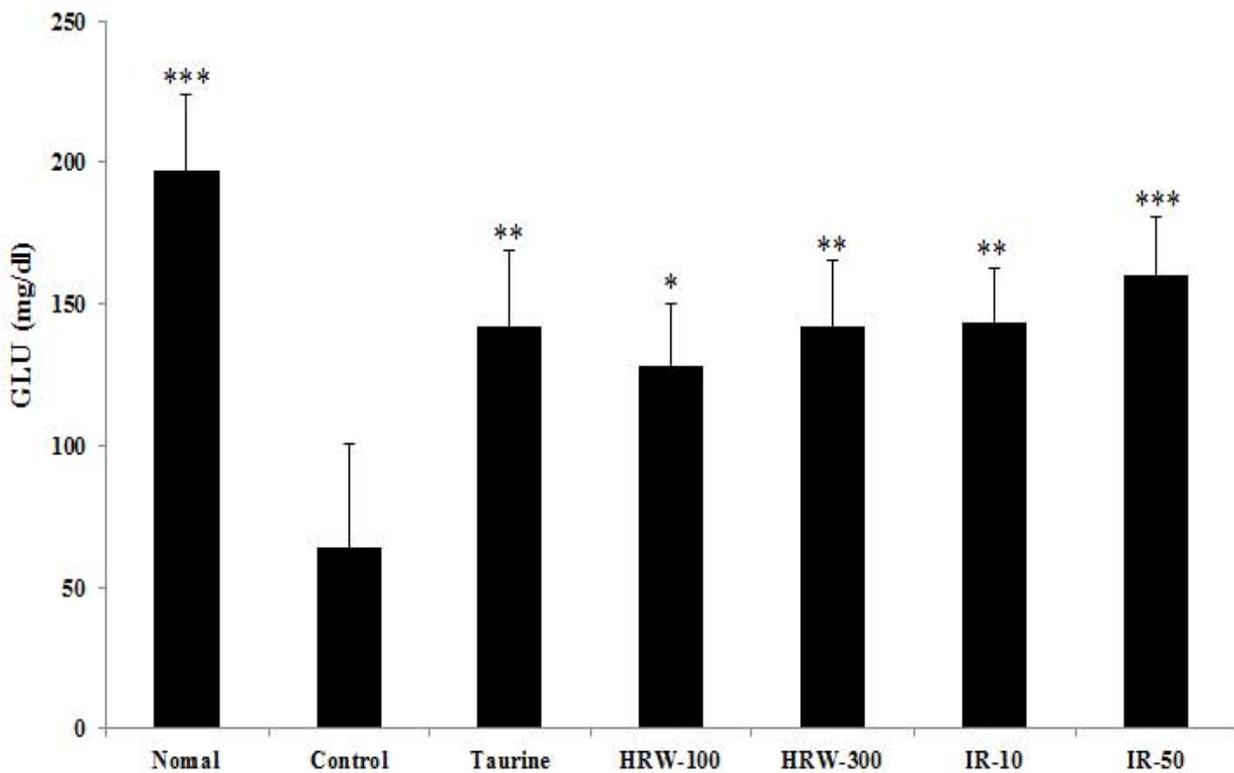


Fig. 7-18. Effects of water extracts from *Hippophae rhamnoides* L. and isorhamnetin on serum biomarkers (glucose contents) in forced swimming experimental mice. Data are expressed as the mean latencies  $\pm$  S.D. (n = 10). \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*  $P < 0.05$  vs control. Control: forced swimming + saline administered group. Taurine: forced swimming + 100 mg/kg taurine, HRW-100: forced swimming + 100 mg/kg water extrat of *Hippophae rhamnoides* L. leaf, HRW-300: forced swimming + 300 mg/kg water extrat of *Hippophae rhamnoides* L. leaf, IR-10: forced swimming + 10 mg/kg isorhamnetin, IR-50: forced swimming + 50 mg/kg isorhamnetin.

⑨ 혈중 BUN (Blood Urea Nitrogen) 측정

격렬한 운동은 신기능의 사구체 여과율을 감소시켜 크레아티닌과 단백질 대사 산물인 혈중 요소질소 (BUN, Blood Urea Nitrogen)를 증가시킨다. BUN 측정 결과 비운동군 ( $6.32 \pm 1.23$  mmol/L)에 비해 운동대조군 ( $13.15 \pm 1.12$  mmol/L)에서 증가하였으며, 모든 운동군에서 BUN수치가 증가하였으며, taurine군 ( $11.32 \pm 0.95$  mmol/L), HRW-100군 ( $11.08 \pm 1.41$  mmol/L), HRW-300군 ( $9.12 \pm 1.23$  mmol/L), IR-10군 ( $9.10 \pm 1.32$  mmol/L), IR-50군 ( $8.33 \pm 1.36$  mmol/L)으로 운동군에 비해 감소하는 경향을 나타내었으며, 특히 IR-50군은 taurine군과 비교했을 때도 유의적으로 감소한 것으로 나타났다 ( $p < 0.05$ ).

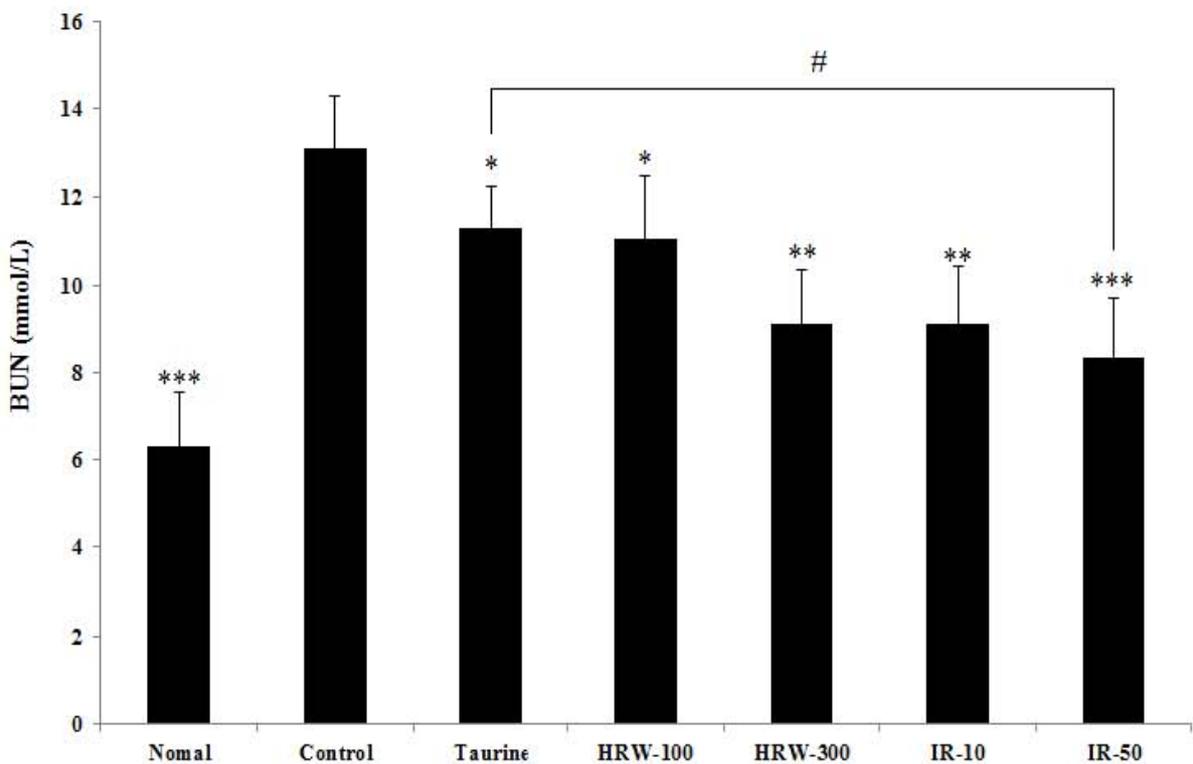


Fig. 7-19. Effects of water extracts from *Hippophae rhamnoides* L. and isorhamnetin on blood urea nitrogen (BUN) contents in forced swimming experimental mice. Data are expressed as the mean latencies  $\pm$  S.D. ( $n = 10$ ). \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*  $P < 0.05$  vs control. Control: forced swimming + saline administered group. Taurine: forced swimming + 100 mg/kg taurine, HRW-100: forced swimming + 100 mg/kg water extrat of *Hippophae rhamnoides* L. leaf, HRW-300: forced swimming + 300 mg/kg water extrat of *Hippophae rhamnoides* L. leaf, IR-10: forced swimming + 10 mg/kg isorhamnetin, IR-50: forced swimming + 50 mg/kg isorhamnetin.

⑩ 혈중 CK 측정

Creatine kinase (CK)는 크레아틴 인산화 효소로 크레아틴과 ATP에 의하여 크레아틴인산을 생성하는 반응을 촉매하는 효소이다. 근육에 많고, 근 수축시 ATP의 소비를 보충하기 위해서 크레아틴 인산으로부터 ATP를 생성하여 공급한다. CK 측정결과 비운동군  $0.19 \pm 0.02$  (U/L), 운동대조군  $0.24 \pm 0.02$  (U/L), taurine군  $0.23 \pm 0.03$  (U/L), HRW-100군  $0.24 \pm 0.04$  (U/L), HRW-300군  $0.23 \pm 0.02$  (U/L), IR-10군  $0.22 \pm 0.02$  (U/L), IR-50군  $0.21 \pm 0.03$  (U/L)으로 비운동군에 비해 운동군에서 모두 증가하는 경향을 보였으나 군간의 유의적인 차이는 나타나지 않았다.

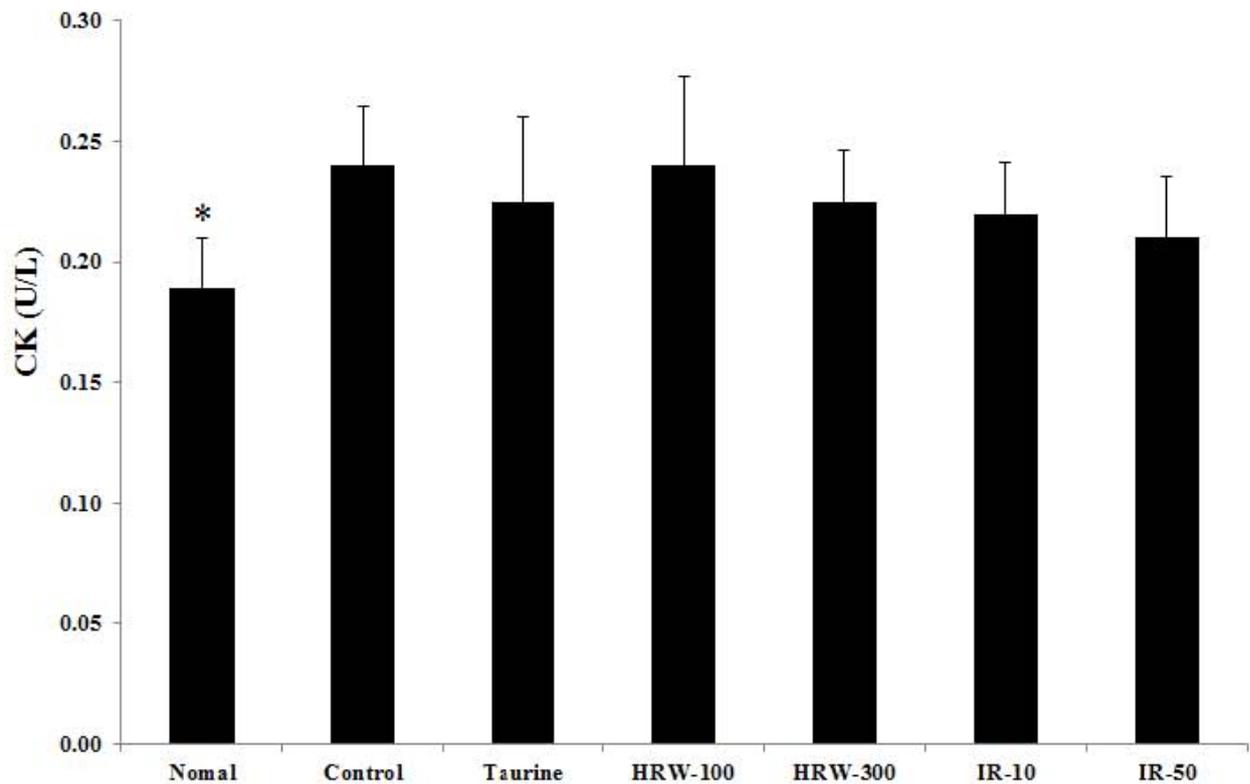


Fig. 7-20. Effects of water extracts from *Hippophae rhamnoides* L. and isorhamnetin on creatine kinase activities in forced swimming experimental mice. Data are expressed as the mean latencies  $\pm$  S.D. (n = 10). \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*  $P < 0.05$  vs control. Control: forced swimming + saline administered group. Taurine: forced swimming + 100 mg/kg taurine, HRW-100: forced swimming + 100 mg/kg water extract of *Hippophae rhamnoides* L. leaf, HRW-300: forced swimming + 300 mg/kg water extract of *Hippophae rhamnoides* L. leaf, IR-10: forced swimming + 10 mg/kg isorhamnetin, IR-50: forced swimming + 50 mg/kg isorhamnetin.

⑩ 혈청 내 항산화 효소 활성 측정

세포에는 이러한 활성산소종의 폐해로부터 세포를 방어하는 항산화 방어체계가 있는데, 그 중 대표적인 것이 superoxide dismutase(SOD), glutathione peroxidase (GPx), catalase (CAT), glutathione reductase(GR), glutathione-S-transferase (GST)와 glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) 등의 항산화 효소들이 있다. 이들은 활성산소종에 의한 연쇄 반응의 개시를 저해시키는 작용을 하는데 SOD는 과산화수소를 과산화수소로 바꾸어주고, CAT는 과산화수소를 분해함으로써 과산화수소의 작용으로부터 세포를 보호하게 된다. 또한 GPx는 GR과 함께 작용하여 과산화수소를 물과 산소로 분해시켜서 과산화수소와 환원형 glutathione 으로부터 물과 산화형 glutathione을 만들고, GR은 산화형 glutathione을 다시 환원형 glutathione으로 환원시키는 역할을 한다.

근육조직 내에서의 항산화 효소들의 활성을 측정한 결과 SOD 함량은 비 운동군에 비해 운동군 전체가 낮게 측정되었으며 운동군 (1.98±0.36 U/mg protein)에 비해 taurine (2.52±0.32 U/mg protein), HRW0300 (2.43±0.29 U/mg protein), IR-10 (2.56±0.29 U/mg protein), IR-50 (2.60±0.31 U/mg protein)군에서 유의적으로 높게 측정되었다. CAT함량은 운동군에 비해 샘플을 투여한 모든 군에서 유의적으로 증가한 것을 확인하였다. GPx함량은 운동군에 비해 샘플군에서 높은 경향을 나타내었으나 유의적인 차이를 나타내지 않았고 GR 함량 역시 군간의 유의적인 차이가 나타나지 않았다. GHS함량 측정 결과 비운동군 (2.95±0.42 umole/mg protein)에 비해 운동군 (1.98±0.36 umole/mg protein)에서 낮은 경향을 나타내었으며 샘플군에서 유의적으로 높게 측정되었다.

Table 7-1. Effects of HRW and isorhamnetin on muscular antioxidant activities

Group	SOD (U/mg protein)	CAT (U/mg protein)	GPx (U/mg protein)	GR (mU/mg protein)	GSH (umole/mg protein)
Normal	2.89±0.42**	4.45±0.24**	0.95±0.12	0.47±0.09	2.95±0.42**
Control	1.98±0.36	3.94±0.21	0.91±0.10	0.46±0.07	1.98±0.36
Taurine	2.52±0.32*	4.21±0.16*	0.98±0.09	0.48±0.06	2.49±0.32*
HRW-100	2.17±0.27	4.20±0.19*	0.97±0.11	0.48±0.09	2.48±0.29*
HRW-300	2.43±0.29*	4.26±0.26*	0.99±0.13	0.49±0.10	2.60±0.21**
IR-10	2.56±0.29**	4.32±0.20**	0.98±0.13	0.49±0.11	2.67±0.27**
IR-50	2.60±0.31** *	4.37±0.21**	0.99±0.13	0.48±0.09	2.70±0.29**

Data are expressed as the mean latencies ± S.D. (n = 10). \*\*\* P < 0.001, \*\* P < 0.01, \* P < 0.05 vs the control group. SOD, superoxide dismutase; CAT, catalase; GPx, glutathione peroxidase; GR, glutathione reductate; GSH, reduced glutathione; Statistical significance was tested using an unpaired Student's t-test.

### 3. 고찰 및 결론

본 연구는 식용 가능한 비타민나무의 열매와 잎을 활용하고, 또한 다양한 기능성 연구를 통해 여러 기능성을 갖고 있는 비타민나무 소재를 활용하여 육체적 스트레스 해소를 위한 멘탈케어 건강기능식품 소재를 개발을 목표로 진행 되었으며, 주관기관으로부터 전달받은 비타민나무 잎 열수 추출물을 여러 가지 *in vivo* 모델을 통해 시료의 생리활성을 *in vivo* 수준에서 확인하고, 나아가 생리활성 물질을 탐색하고 비타민나무의 항육체적 스트레스 생리활성 기전 규명을 위한 기본 실험을 진행하는데 있다. 실험 시료로서 1차년도에 *in vitro* screening으로 선정된 지역의 잎 부위 열수 추출물을 이용하여, 최종적으로 멘탈케어에 있어 다각적인 접근을 통한 *in vivo* 수준에서의 효능을 탐색하였다. 육체적 스트레스에 대한 개선효과를 평가하기 위해, 유속 pool을 이용한 *in vivo* 모델을 활용하였다.

피로의 사전적인 정의는 신체적 또는 정신적인 노력으로 발생하는 lassitude 또는 weariness를 의미하는 것으로 지속적인 활동이나 자극 후 세포, 근육, 기관의 힘이나 민감도가 일시적으로 감퇴된 상태를 말한다. 그 중 근육의 피로현상이란 근 수축을 유지해야 할 힘의 감소현상, 또는 근, 신경계통의 운동수행능력의 저하 현상으로 정의된다. 이러한 근육의 피로현상은 단기간 고강도 운동부하시 무효소성 대사과정에 의해 체내에 젖산이 축적되면서 일시적인 근육의 피로현상과 함께 pH의 감소를 동반하며 근 수축 작용의 저하를 가져오고, 세포의 활성도를 증가시켜 효소의 활동이 억제되는 등의 현상이 나타난다고 한다. 인체의 근육에는 수축에 필요한 에너지 자원으로 글리코겐 (glycogen)이 저장되어 있다. 계속적으로 근육을 사용하면 저장되어 있던 글리코겐이 감소되고 대신 대사 작용으로 생긴 젖산과 같은 부산물과 노폐물이 축적되며, 이것이 바로 피로 물질 (lactate)로 피로 증상을 나타나게 하는 원인이 된다.

본 실험에서 유속 pool을 활용한 육체적 피로와 관련된 biomarker를 확인한 결과, 탈진 point 까지 수영을 시킨 일반 control군에 비해 시료인 비타민나무 잎 열수 추출물을 투여한 군에서 유의적으로 수영시간이 증가한 것을 확인 할 수 있었으며, lactate의 함량이 감소한 것을 확인 할 수 있었다. 항피로 실험에서 결론값이라고 할 수 있는 두 결과를 미루어 살펴봤을 때, 본 실험에서 사용한 비타민나무 잎 열수 추출물은 항피로 인자를 가지고 있으며, 결과적으로 항피로 효과를 가지고 있다는 것을 짐작할 수 있었다. 신체 내 에너지원인 glucose의 저장형태인 glycogen을 근육과 간에서 운동 후, 부검하여 그 함량을 측정한 결과 에너지원으로서 pyruvate로 변환되어 소모되어 감소된 glycogen의 저장량이 근육과 간 모두에서 유의적으로 증가한 것을 확인하였다. 이와 연관된 LDH의 활성을 측정하였을 때, 증가한 LDH의 활성이 비타민나무 잎 열수 추출물의 투여를 통해 유의적으로 감소하였다. LDH는 혈액과 신체 내, 특히 간에 주로 많이 분포하며 '코리회로'에서의 작용으로 혐기적인 상황에서 pyruvate를 lactate로의 변환을 촉매한다. 또한 당신생작용을 통해 lactate에서 pyruvate로의 변환을 다시 촉매하기도 하지만, 한 세포에서 두 반응은 동시에 일어나지 않는다고 알려져 있다. 격렬한 운동으로 인해 근육 내 환경이 혐기적 상황으로 변환되면 pyruvate에서 lactate로의 변환을 촉매하기 위해 증가한 LDH 활성은 비타민나무 잎 열수 추출물의 투여로 감소하게 되고, 감소

한 LDH 활성으로 인해 피로물질인 lactate의 생성도 감소하게 된다. lactate의 생성 억제로 근육내 pH값이 회복됨으로서 세포의 에너지 대사 효율이 증가하게 되며, 상대적으로 glycogen의 소모를 줄임으로서 근육과 간 조직에서의 glycogen 함량을 증가시키게 되는 것으로 일련의 결과를 통해 추론 할 수 있을 것이다. 이 외에도 간 기능이 향상되어 젖산이 제거되었거나, 유산소 운동의 증진에 있어 젖산 생성이 감소되었을 가능성도 추가적으로 추정 할 수도 있겠다.

혈액요소질소(BUN, blood urea nitrogen)는 혈중 요소를 측정하는 것으로, 요소는 간에서 아미노산과 암모니아에서 생성된다. 이렇게 생성된 요소는 신장을 통해 배설되므로 이 혈액 농도가 신기능 지표로 사용될 수 있으며, 격렬한 운동 후에는 BUN 수치가 증가한다고 보고되었다. 본 실험에서도 마찬가지로 운동 대조군에서는 BUN 수치가 유의적으로 증가한 것을 확인 하였으며, 증가한 BUN의 수준이 비타민 잎 열수 추출물의 투여로 유의적으로 감소한 것을 확인 하였다. 그리고 creatine kinase는 최초 골격근에서 발견한 효소이며, 실제로는 골격근 뿐만 아니라, 뇌, 심장 조직에 주로 분포하지만, 이 외에도 다양한 조직세포에서 발견된다. creatine kinase는 에너지 대사와 관계하여 creatine의 인산화를 촉매하는 효소이며, 근육에서 creatine kinase는 근 수축 시 에너지원인 ATP의 소비를 보충하기 위해서 트레아틴인산으로부터 ATP를 생성하여 공급하고, 가역반응으로 ATP를 소비하여 ADP를 생성하는 역할을 한다. creatine kinase는 근육에 대한 물리적 손상, 수술, 격렬한 운동, 근육주사등 다양한 원인으로 발생하는 골격근 손상에서 한계치의 5배에서 6배 정도 증가하게 된다고 알려져 있다. 하지만 creatine kinase는 반감기가 24시간 밖에 안되기 때문에 신속하게 증가했다가 바로 떨어진다. 본 실험에서도 격렬한 운동으로 인해 유의적으로 creatine kinase의 수치가 증가하는 것을 확인하였지만, 시료에 의해 증가된 수치가 감소하는 것은 확인 할 수 없었다.

그리고 추가적으로 본 실험에서는 해당과정과 TCA cycle에서 반응속도결정단계로서, 아세틸 CoA와 옥살로아세트산을 축합하여 citrate를 합성하는 반응을 촉매하는 효소인 citrate synthase와 succinate의 탈수소반응에 의하여 fumaric acid 생성 반응을 촉매하는 효소로서 succinate dehydrogenase, 마지막으로 해당작용에서 6탄당을 인산화시켜 전환시키는 역할을 하는 hexokinase의 활성을 측정 하였다. 하지만 운동 전후로, 그리고 시료를 처리 하였을 때 세 효소의 변화는 확인 할 수 없었다.

비타민나무 열수추출물의 전임상 단계에서의 육체적 항스트레스 활성을 확인하고, 그 다음 단계로서 앞서 생리활성 물질 탐색을 위해 항정신적 스트레스 평가와 마찬가지로 비타민나무 잎 열수추출물에 함유 및 분리한 단일 성분들 (chrysin, isorhamnetin, quercetin, kaempferol, myricetin, protocatechuic acid, p-hydroxybenzoic acid, vanillic acid, salicylic acid, p-coumaric acid, cinnamic acid, caffeic acid)을 이용하여 in vitro 수준에서 screening 을 수행하였다. 그 결과로 isorhamnetin이 과산화수소에 대한 근육세포 보호효과와 세포내 ROS 소거능에 있어 가장 뛰어난 활성 수준을 보였으며, 타 참여기관의 세포수준에서의 독성 평가 데이터와 종합적 검토를 거쳐, 최종 생리활성 후보물질로 isorhamnetin을 선정 하였다.

비타민나무 열수추출물의 생리활성 물질 확인과 생리활성 기전을 규명하기 위해, 비타민나무 잎 열수추출물과 isorhamnetin을 이용하여 전임상 (in vivo) 수준에서 항육체적 스트레스 활성을 평가하였다. 본 실험에서 유속 pool을 활용한 육체적 피로와 관련된 biomarker를 확인한 결과, 탈진 point 까지 수영을 시킨 일반 control군에 비해 시료인 비타민나무 잎 열수 추출물

과 isorhamnetin을 투여한 군에서 유의적으로 수영시간이 증가한 것을 확인 할 수 있었으며, lactate의 함량이 감소한 것을 확인 할 수 있었다. 그리고 두 처리군에서 모두 신체 내 에너지 원인 glucose의 저장형태인 glycogen을 근육과 간에서 운동 후, 부검하여 그 함량을 측정 한 결과 에너지원으로서 pyruvate로 변환되어 소모되어 감소된 glycogen의 저장량이 근육과 간 모두에서 유의적으로 증가한 것을 확인하였다. 이와 연관된 LDH의 활성을 측정하였을 때, 증가한 LDH의 활성이 비타민나무잎 열수 추출물과 isorhamnetin의 투여를 통해 유의적으로 감소하였다. 혈액요소질소 지표인 BUN 또한, 증가한 BUN의 수준이 비타민잎 열수 추출물과 isorhamnetin의 투여로 유의적으로 감소한 것을 확인 하였다. 그리고 creatine kinase는 격렬한 운동으로 인해 유의적으로 creatine kinase의 수치가 증가하는 것을 확인하였지만, 시료에 의해 증가된 수치가 감소하는 것은 확인 할 수 없었다. 그리고 신체내 항산화 시스템으로서 효소계인 Superoxide dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutathione peroxidase (GPx), Glutathione reductase (GR), 그리고 비효소계인 Reduced glutathione (GSH)의 활성과 함량을 각각 측정 하였을 때, 과도한 운동으로 인해 해당 효소와 단백질의 활성과 함량이 감소 하였지만 비타민나무잎 열수추출물과 isorhamnetin을 투여한 실험군에서는 효소들의 활성과 GSH 효소의 환원형 함량이 회복된 것을 확인하였다.

최종적으로 위 결과들을 정리하여 보면, 비타민나무잎 열수 추출물과 해당 추출물에 함유된 isorhamnetin은 피로해진 운동능력을 향상시켰으며, 그 기작으로는 격렬한 운동에 의해 증가한 LDH의 활성이 비타민나무잎 열수 추출물과 isorhamnetin 투여를 통해 감소하게 되고, 감소한 LDH 활성으로 인해 피로물질인 lactate의 생성도 감소하게 되어, lactate의 생성 억제로 근육내 pH값이 회복됨으로서 세포의 에너지 대사 효율이 증가하게 되며 상대적으로 glycogen의 소모를 줄임으로서 근육과 간조직에서의 glycogen 함량을 증가시키게 되는 것으로 일련의 결과를 통해 추론 할 수 있을 것이다. 또한 비타민나무잎 열수 추출물과 isorhamnetin은 자체의 항산화능과 신체내 항산화 시스템을 회복함으로써 육체적 스트레스에 의한 개선효과를 보조하는 것을 확인하였다. 연구를 통해 비타민나무는 멘탈케어 및 육체적 항피로 저분자성 소재로서 충분한 잠재 효과가 있음을 확인 할 수 있으며, 진행되는 사업 및 연구를 통해, 궁극적으로 안전성을 확보할 수 있는 멘탈케어 및 항피로 저분자성 소재를 개발하여 기능성 식품으로써 그 성과를 얻고자 한다.

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제 1 절. 연구목표의 달성도

구분 (연도)	세부연구목표	평가의 착안점	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도 (2012 ~ 2013)	검색대상 비타민나 무 열매와 잎 중 HTS 활성검색을 통 하여 건강기능식품 산업화 가능 소재 확보 : 2종 확보	HTS 활성검 색 bio-marker 선정 및 소재 2종 확보 여부	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Glucocorticoid 유도 뇌신경세포 손 상 모델에서의 비타민나무의 보호효과 비교 및 탐색 완료</li> <li>- 뇌신경세포 세로토닌 수용체 활성 조절 (cAMP) 모델에서의 비타민나무의 보호효과 비교 및 탐색 완료</li> <li>- 과잉신경세포 흥분에 의한 신경 손 상 <i>in vitro</i> 모델에서의 비타민나무의 보호효과 비교 및 탐색 완료</li> <li>- 뇌신경세포 heme oxygenase-1 활성 조절 <i>in vitro</i> 모델에서의 비타민나무 의 보호효과 비교 및 탐색 완료</li> <li>- HTS bio-marker 선정 완료 및 평 가를 통하여 정신적 스트레스 소재 1 종 및 육체적 스트레스 소재 1종 선 정 완료</li> </ul>
	선정 소재의 생산지 별(국내외) 자원의 <i>in vitro</i> (안전성, 기 능성)평가 및 영양 평가를 통한 원료 표준화	국내 및 해외 소재의 평가 여부	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 비타민나무 잎/열매 생산지인 강원, 경기, 전남 및 중국 등 소재 확보 및 추출물 확보</li> <li>- 안전성 및 기능성 평가를 위한 열수, 주정 5, 30, 50, 70% 추출물 확보</li> <li>- 기능성 평가를 위해 항산화 지 표인 ABTs 라디칼 소거능, DPPH 라디칼 소거능, SOD 활성, Catalase 활성, GSH-Px 활성 등 을 측정하여 활성 확인</li> </ul>
	소재 가공을 위한 추출 공정 확립	활성 및 상업 적 추출 공정 확립 여부	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 활성 및 상업성을 고려하여 열 수 추출물 선택</li> <li>- 추출공정 확립을 위해 200kg scale up 생산 완료</li> </ul>
	<i>in vitro/in vivo</i> 독 성시험을 통한 최 적시험 농도범위 결 정	독성시험을 통 한 최적 시험 농도 결정 여 부	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 비타민나무 열수 추출물의 SD-rat을 이용한 단회투여 독성 평가 완료</li> <li>- - 비타민나무 열수 추출물의 SD-rat을 이용한 14일 반복 투여 독성평가를 통한 농도 결정 완료</li> </ul>

구분 (연도)	세부연구목표	평가의 착안점	달성도 (%)	연구개발 수행내용
2차 년도 (2013 ~ 2014)	선정 소재의 안전성 전문 평가 기관을 통한 안전성 시험 인증 확보 : 2건 이 상	GLP 기관의 안전성 평가 인증 2건 여부	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- GLP 기관인 한국화학융합시험 연구원에서 갈매보리수나무 열수 추출물의 단회경구투여독성시험 완료</li> <li>- 동일 기관에서 갈매보리수나무 열수 추출물에 대한 세균을 이용한 복귀돌연변이시험 완료</li> </ul>
	비타민나무의 멘탈케어 기능성분 및 활성기전 규명	정신적/육체적 스트레스 개선 기능성분 및 활성기전 규명 여부	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 지구적 운동 스트레스 동물 실험을 통하여 비타민나무 추출물의 지구적 스트레스 개선 활성 확인 지구적 스트레스 개선 특허 출원 완료</li> <li>- 수면박탈 스트레스 동물실험을 통하여 비타민 나무 추출물의 정신적 스트레스 활성 규명 확인 정신적 스트레스 개선 특허 출원 완료</li> <li>- 비타민나무 추출물의 용매별 분획 완료</li> <li>- 추출물의 지표성분인 quercetin, kaempferol, isorhamnetin 정량 완료</li> </ul>
	비타민나무의 정신적/육체적 피로개선 기능성식품 원료 소재화	제형개발 및 임상용 시제품 생산 여부	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 액상, 과립, 환 등 시제품 개발 및 제품 안정성 평가 완료</li> <li>- 표준화된 원료를 이용한 임상시험용 시제품 개발 완료</li> </ul>

구분 (연도)	세부연구목표	평가의 착안점	달성도 (%)	연구개발 수행내용
	비타민나무 잎 추출분말의 간이임상수행 및 시제품 개발	간이임상수행 을 통한 효능 평가 및 시제 품 생산 여부	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 간이임상시험 수행을 통한 비타 민나무잎 추출물의 육체적/정신적 스트레스 개선 효과 확인 완료(섭 취량 2군 이상수행)</li> <li>- 건강기능식품 원료 개발을 위 한 원료화 공정 표준화 설정 및 시제품 1종 이상 개발 완료</li> </ul>
3차 년도 (2014 ~ 2015)	비타민나무의 육체적 /정신적 스트레스 개 선 임상 프로토콜 개 발 및 비타민나무 활 성성분 후보물질의 안전성 평가	간이임상수행 을 위한 임상 프로토콜개발 여부 및 활성 물질의 안전성 평가 여부	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 사내임상을 위한 비타민나무의 육체적/정신적 스트레스 개선 임상 프로토콜 개발 및 결과 통계분석 을 통한 인체적용시험 결과 확인 완료</li> <li>- <i>in vitro</i> 수준에서의 독성 비교 평가 실시 완료(협동기관 생리활성 비교 데이터와 조합하여 최종 생 리활성 물질 선정)</li> </ul>
	비타민나무의 항 육체적/정신적 스트레스 활성성분 및 기전규명	비타민나무 추 출물의 육체적 및 정신적 스 트레스 기전규 명 여부	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>보유하고 있는 장비(HPLC, GC, Prep-LC, MPLC, ICP, NMR)를 이 용하여 생리활성 물질 확인 완료</li> <li>- <i>in vitro</i> model을 이용한 생리활 성물질 screening 완료</li> <li>- 지구적 운동스트레스 동물모델 을 활용한 기전 규명 완료</li> <li>- 전기쇼크 모델을 활용한 기전 규명 완료</li> <li>- 강제수영 모델을 활용한 기전 규명 완료</li> </ul>

## 제 2 절. 관련분야에의 기여도

- 비타민나무 잎의 정신적/육체적 스트레스 개선 소재를 개발하여 건강기능식품 소재로 활용이 가능함에 따라 다야안 비타민나무 잎 소재 개발의 가능성을 높였음
- 비타민나무 잎의 정신적/육체적 스트레스 개선에 대한 인체적용시험이 완료될 경우 국내 개별인정형 건강기능식품 등록이 가능할 수 있는 전임상의 과학적 자료를 확보하여 개별인정형 건강기능식품 개발 가능성을 높였음
- 비타민나무를 활용한 정신적/육체적 스트레스 개선 연구를 통하여 축적된 항스트레스 및 피로회복 기전, 뇌기능강화, 수면조절 등 부가적으로 미치는 연계효과와 기전 및 효과의 정량적 방법, 퇴행성 뇌질환, 뇌손상 질환 및 신경성 통증 억제에 미치는 연계효과 등의 정량적 방법 등을 제시하여 건강기능식품 및 의약품 소재개발의 기초자료로 활용 가치가 높음.
- 비타민나무가 건강기능식품의 소재화가 진행, 가능성이 증명되어 건강기능식품의 개발을 위한 대규모의 소재 확보와 가공이 증가 할 것이며, 더불어 본 소재를 함유한 건강지향식품의 다양한 개발로 이어져 자원 소재지에서의 농산물 재배 및 농식품가공의 규모 증대에 기여함
- 비타민나무의 경우 우리나라 농산물 지역자원으로 건강기능식품으로 개발될 경우 지역적으로 농가의 신소득 및 지역 생산기업의 고부가가치화를 예상할 수 있으며, 그 기능이 과학적 근거에 의해 검증되었을 경우 global 제품으로 활용될 수 있도록 함
- 항스트레스 및 피로개선 건강기능식품의 경우 각 기업에서 현재 외국의 건강기능식품 소재를 사용한 제품을 생산하고 있으나, 본 과제결과를 활용하여 이를 대체할 소재를 이용한 제품생산에 활용될 수 있도록 함
- 비타민나무를 활용한 정신적/육체적 스트레스 개발에서 확립된 기술 및 인프라를 이용하여 다른 농산물의 소재화 연구에 활용할 수 있는 시너지 효과가 예상되며, 이를 산업화하는데 있어 시간과 노력의 단축되어 산업 발전에 기여함

# 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

## 제 1 절. 실용화·산업화 계획

### 1. 제품런칭

- 본 연구를 통해 시생산된 활력왕은 해외 수출용 제품으로 기획하여 제품을 생산함.
- 국내 전문 ORM 회사인 뉴트리바이오텍의 해외 수출 브랜드인 H'TREE 제품 중 피로회복 제품으로 런칭하여 중국, 동남아시아 등 수출할 예정임.
- 또한 뉴트리바이오텍에서는 중국 등 식품박람회에 H'TREE 홍보관을 열어 제품 홍보 및 판매 쪽지를 위해 노력하고 있으며, 본 제품도 2016년 부터는 해외 박람회에 출시될 예정임.



### 2. 직접 유통

- 주관연구기관인 (주)뉴트리플랜의 자회사인 중국유통 전문 기업인 더코렙(주)를 통해 수출
- 국내 식품·건강기능식품 시장은 경기침체에 따른 소비심리 위축으로 시장진입이 어렵고 매출 창출이 확실치 않아 내수유통보다는 **중국을 main distribution channel** 로 선정
- 중국 시장은 on-line은 T-Mall, JD mall 등의 한국관을 중심으로, off-line은 중국관광객 (요우커)를 대상으로 한 사후면세점, 중국 현지의 공항면세점, 시내면세점, 보세판매점을 trial show case로 B2C 시장에 진입할 계획이며, 이를 중심으로 B2B 도매시장을 단기간 cash-caw 시장으로 설정 함.

Online Business



Offline Business

Offline + O to O in KOREA



Offline + O to O in CHINA



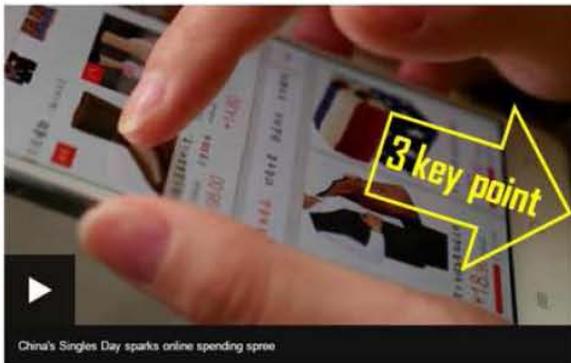
※ 중국 유통 시장 현황 및 채널 별 진입 전략

○ 온라인 유통채널



China's Alibaba breaks Singles Day record as sales surge

© 11 November 2015 Business



E-commerce giant Alibaba has broken its own record for sales on China's Singles Day, the world's biggest online shopping event.



1. Sales volume on 11/11 in 2015

- 16.5trillion won  
(91.2bn yuan; \$14.3bn; £9.4bn)

2. 60% increase from last year

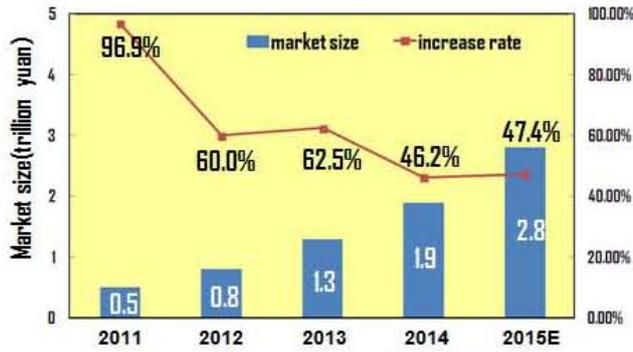
- twice black Friday

3. Very little products made in Korea

- 2015년 11월 11일 중국의 Single's day 하루동안의 T-mall(텐마오)의 매출이 16조 5천억원을 기록하여 중국의 어마어마한 소비규모를 간접적으로 예측할 수 있음.
- 2015년의 매출규모는 전년대비 60% 성장한 규모로 중국의 2015년 GDP 성장률이 6.5~7%임을 감안하면 전체산업 규모 중 특히 소비시장의 시장은 엄청난 속도로 성장하고 있음을 알수 있으며, 비슷한 시기의 서구의 쇼핑주간인 "블랙프라이데이"의 매출규모의 2배 수준이었던 점을 감안하면 중국은 이제 global No 1. 소비시장으로 성장 함.

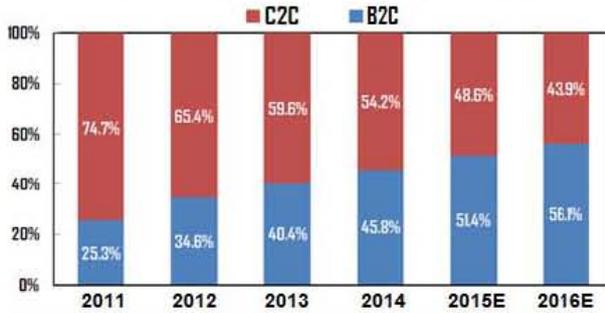


- 중국의 전자상거래 시장규모는 2015년 826조2천억원 규모이며 이중 B2B시장은 74.6%이며, 소비시장의 척도인 B2C, C2C, O2O 시장은 약 25.4% 209조9천억원 규모 임.
- 중국 전자상거래시장은 C2C 시장의 거래품 중 짝퉁제품이 상당수 거래되다보니 정품보증을 기반으로 한 B2C 시장이 주요 소비재시장으로 성장해가고 있으며, 향후 2~3년 후에는 소비재 시장의 80% 이상을 점유할 것으로 예측 됨.



Market size : online customer (B2C & C2C)  
→ Rapid growth than B2B

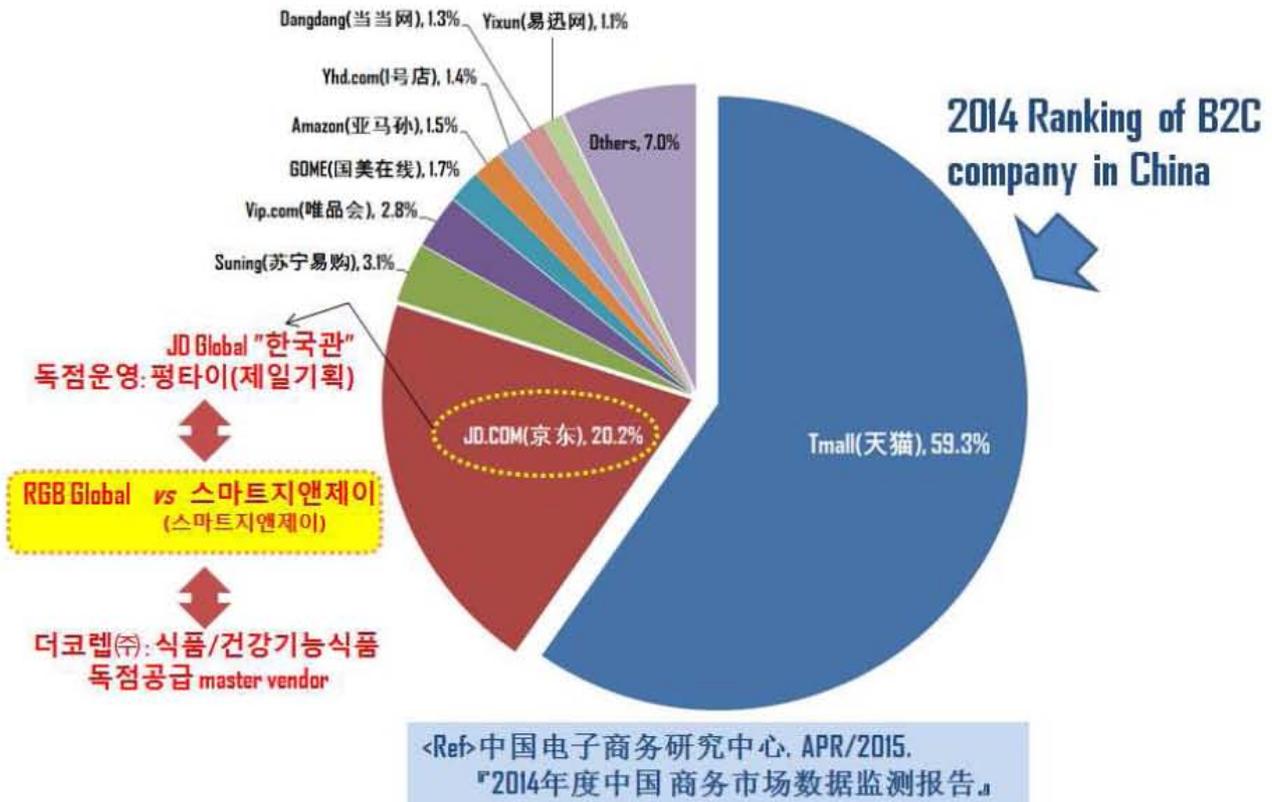
※ average growth rate of e-commerce  
- total market : about 30%  
- custom market : min. 45%  
(GDP growth rate : 6.5~7%)



B2C ↑↑  
C2C ↗



<Ref> 中国电子商务研究中心, APR/2015  
「2014年度中国商务市场数据监测报告」



○ On-line 시장 중 중국 2위기업인 "징둥글로벌"의 한국관을 통한 유통을 기반으로 T-mall, e-무역시범지역의 보세구 O2O site를 통해 판매 예정.

○ 정동글로벌의 한국관은 제일기획의 중국유통법인인 “펑타이제일기획”이 운영하고 있으며, 이곳의 식품, 건강기능식품, 화장품 1차 vendor인 “스마트지엔제이”에 더코렙(주)이 식품, 건강기능식품을 독점공급하는 계약이 체결되어 있어 본 과제의 시제품인 “활력왕”을 trial 제품으로 입점예정 임.

○오프라인 유통채널(국내/요우키 대상의 사후면세점)

- 더코렙(주)가 식품, 건강기능식품 독점 master vendor로 운영되는 RGB사후면세점을 통해 유통 예정

서울 본점 등대문

(3,447.3㎡)



인천 Tomorrow city점

(6,612㎡)



제주점

(972㎡)



서울숲 갤러리아포레 점

(24,817㎡)



강원랜드점

(2016.5 예정)



남이섬점

(2016.5 예정)



부산점

(2017.1 예정)



## 동대문점 (서울 본점)

위치 : 중구 을지로7가 105 라모도쇼핑몰 (apm place) 8,9층 (동대문역사문화공원역 사거리)



실평수

8F : 963.25㎡ (291.4 py)

9F : 1201.1㎡ (363.3 Py)

합계 : 2164.35㎡ (654.7 py)

- 2016년 3월 16일 오픈하는 “RGB동대문” 쇼핑몰을 시작으로 총 7개 요우키 전용 쇼핑몰을 메인 유통채널로 활용 예정

**MAIN COLOR**

<b>GOLD</b>	<b>WHITE</b>	<b>BLACK</b>
		
Luxury elegance	Modern background	Simple line

**GATE DESIGN**



**COLUMN DESIGN**



**CEILING DESIGN**



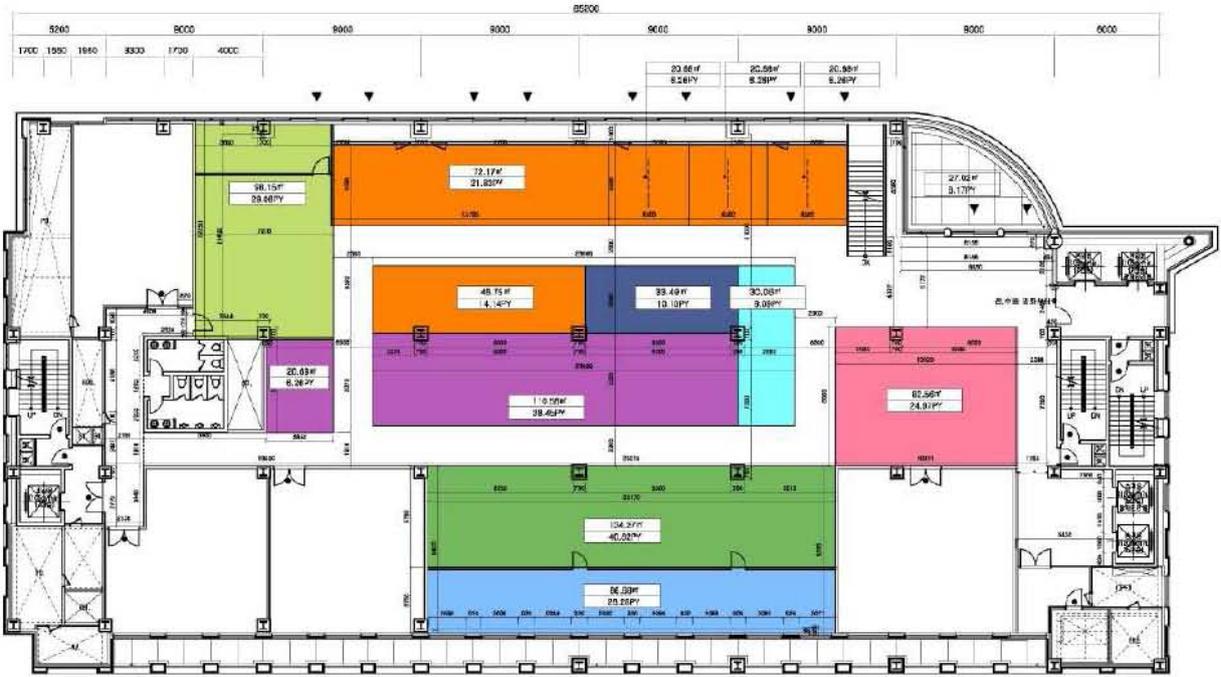
**FURNITURE DESIGN**



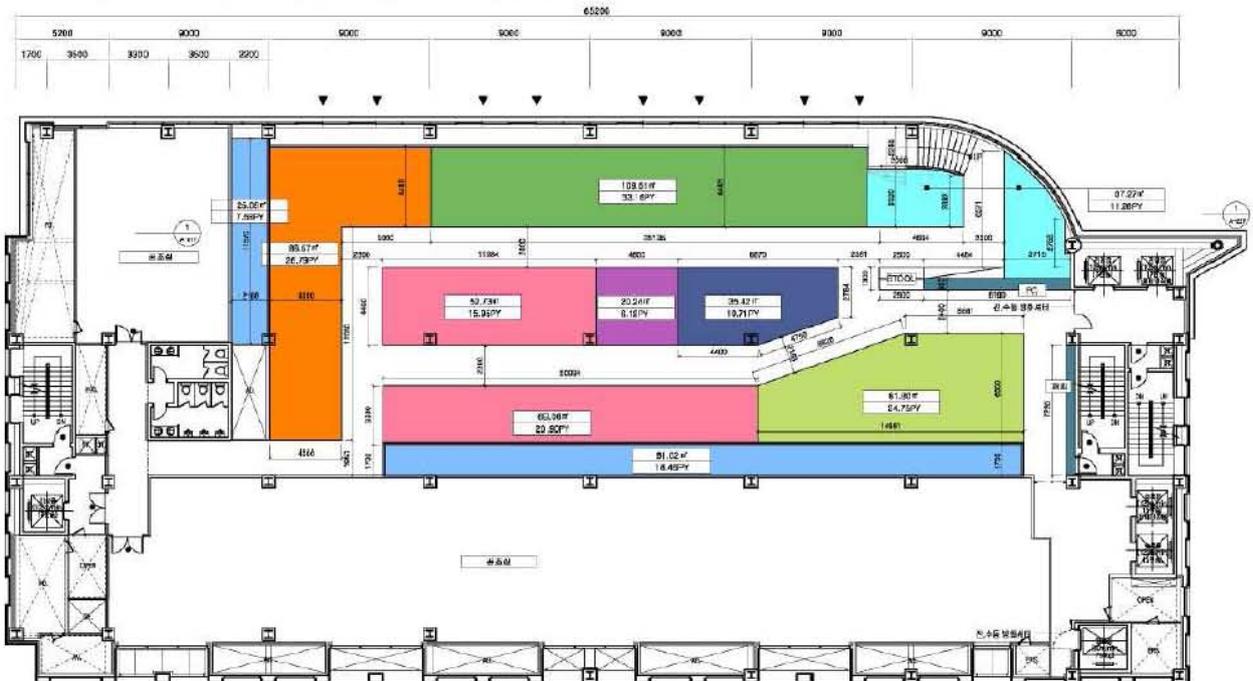
**CUSTOMER AREA**



**9F** 홈쇼핑 스튜디오를 통한 상품 홍보, 시식, 시음, Makeup show 등 다양한 형태의 상품 노출 전략  
이벤트홀의 다목적 활용으로 브랜드 MD 인큐베이팅, 특가 할인 행사 등



**8F** 명품, 아트살롱 등의 high end 급 상품의 전개로 MD Image 제고  
한류스타관, 오스트리아 관 등의 테마관으로 다양한 볼거리 제공.  
물류, EMS 등의 선택의 다양화를 통한 고객 만족도 상승



○오프라인 유통채널(중국/공항면세점, 시내면세점)

## In CHINA : 북경 보세 명품 백화 & O2O Business

### 북경 보세 명품 백화

■ 국부 유출 삼할 타개를 위한 중국 정부 정책에 따른 중국 내국인을 위한 보세 명품 백화점 & O2O

**中华人民共和国商务部**  
 Ministry of Commerce of the People's Republic of China  
**中国国际电子商务中心(公司)**  
 CHINA INTERNATIONAL ELECTRONIC COMMERCE CENTER (CO.,LTD.)  
**Trade2CN** 中国诚高网  
**国富商通信息技术发展股份有限公司**  
 CHINA B-TO-B HOLDINGS LTD.

- 신뢰성, 공정성 - 중국 정부가 선정한 사업 파트너
- 거대한 소비시장 - 인근 도시 포함 약 1억 명의 소비시장
- 사업의 확장성 - 상해, 광주, 심천, 무한 등 공항 보세 지역 사업 확장
- 사업의 안정성 - 중국 정부의 경제 정책과 방향성 일치

대형 쇼핑몰 내 한국관



시내 면세점 운영



## Off-line Shop shopping (B2C)



Luxury items shop



Household items shop

shopping  
platform  
[O2O]

2 off-line platform  
+  
2 on-line platform

## On-line Shopping (B2C)



On-line with PC (↑)  
On-line with mobile phone (↓)



○ RGB group이 중국 현지 유통 예정인 공항면세점, 시내면세점의 한국판 master vendor사인 더코렙(주)를 통해 입점 예정

## 2. 마케팅 전략

- 중국인들에게 한국 식품, 건강기능식품은 아직 잘 알려져 있지않고 특히 국내 대기업인 CJ, 롯데 등도 인지도가 높지 않은 수준 임.
- 현재까지는 국내 홍삼제품, 김, 라면, 스펙류 등이 잘 알려진 제품이며, 건강기능식품의 경우 브랜드, 제품 모두 인지도가 전무한 상태 임.
- 이에 홈쇼핑 채널을 통한 홍보, 마케팅 하여 제품 및 브랜드 인지도를 상승시킬 예정 임.
- 상기 "RGB동대문점" 에는 더코렙(주)가 운영하는 "홈쇼핑 스튜디오" 가 설치되며, 이는 국내에서 홈쇼핑 콘텐츠 제작, 유통채널은 중국 현지에서 운영하는 "한중 합작 홈쇼핑 프로젝트" 가 시행 예정 임.
- 이 홈쇼핑 채널을 통해 국내에서 제작된 홈쇼핑 영상물은 중국 1위 홈쇼핑사인 호남TV의 "Happigo" 쇼핑몰을 통해 유통될 예정 임.

## 9F 홈쇼핑 스튜디오



- 실 평수 30평 규모, 카메라 3대 설치, 스튜디오 전문 조명, 음향 설치
- 오픈 스튜디오로 쉽게 다가서고 쉽게 볼 수 있는 “고객과 함께 하는” 홈쇼핑 방송
- 실제 홈쇼핑 방송 같은 현장 방송으로 고객 호기심 유발
  - 화장품, 건강식품, 식품 등에 대한 지속적인 상품 소임을 통한 매출 상승 유도
  - 상품에 대한 신뢰도 상승, 이등 고객들 대상 시음, 시식을 통한 구매 유도
  - TV 홈쇼핑과 동일한 무대 세팅 : 매 상품별 전문 무대 세팅 + 전문 쇼호스트 + 게스트
- 주 2일 : 홈쇼핑 방송, 주 5일 : Makeup show or 식품 시음, 시식 or 방송 상품 진열
- 녹화 영상을 중국 현지로 보내 타 방송사들&홈쇼핑 방송들과 cowork. 추가적인 대량 매출 상승

○더코렙(주)의 한중합작 영상제작유통 사업제휴사인 중국 1위 영화사인 “기린영화사”를 통해 한중합작 영화, 드라마의 PPL 광고를 통해 제품 노출.

한국 인기 드라마 “카이스트” 를 토대로 각색, 현대 베이징 젊은 인텔리전트들의 삶과 우정, 고뇌를 그린 드라마 제작 - “베이징의 별난 천재들” CCTV 8채널(드라마 채널) 방영 예정  
 드라마 내 한국 상품, 보세국제에 대한 홍보 강화  
 \* 이외 여러 가지 웹드라마 등의 제작을 통한 지속적 마케팅 전개



- 더코렙(주)의 중국 엔터테인먼트 제휴사인 샤오샹그룹의 극장 채널을 통한 cinema shop 및 극장 내 영화 상영 전 광고영상을 통한 홍보 및 웨이신, 웨이보를 통한 홍보
- 샤오샹그룹은 중국 국영영화제작 및 극장사업을 운영하는 국영기업으로 호남성을 기반으로 한 중국 남부지역 영상사업 최대기업



## 제 2 절. 연구개발 성과

구분	특허		논문		기타
	출원	등록	SCI	비SCI	
목표	2	2	2		
성과	2	(2)*	1 (1)**		
달성도	100	100	100		

\* 본 특허는 출원은 2014년 10월 17일 출원되어으나 평가가 지연되어 현재 평가중이며, 곧 등록될 것으로 예상되어 목표에 달성할 것으로 사료됨.

\*\* 논문은 1편은 투고 중으로 곧 게재가 예상되어 목표에 달성할 것으로 사료됨.

### 1. 특허

출원년도	특허명	출원인	출원국	출원번호
2014	비타민나무 추출물을 유효성분으로 함유하는 정신적 스트레스, 우울증 또는 치매 치료 및 예방을 위한 조성물	주식회사 뉴트리플랜, 재단법인 천남생물산업진흥원	대한민국	10-2014-0140470
2014	비타민나무 추출물을 유효성분으로 함유하는 육체적 피로 개선 및 운동수행 능력 향상을 위한 조성물	주식회사 뉴트리플랜, 재단법인 천남생물산업진흥원	대한민국	10-2014-0140471

가. 비타민나무 추출물을 유효성분으로 함유하는 정신적 스트레스, 우울증 또는 치매 치료 및 예방을 위한 조성물 특허 통지서

출원번호통지서

관인생략

출원번호통지서

출원일자 2014.10.17  
 특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)  
 출원번호 10-2014-0140470 (접수번호 1-1-2014-0989326-28)  
 출원인 명칭 주식회사 뉴트리플랜(1-2011-038377-6) 외 1명  
 대리인 성명 신동인(9-2000-000156-1)  
 발명자 성명 강남길 이민재 정창식 김선오 배동혁 김지혜  
 발명의 명칭 비타민나무 추출물을 유효성분으로 함유하는 정신적 스트레스, 우울증 또는 치매 치료 및 예방을 위한 조성물

특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.  
 ※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [출원인코드 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.  
 ※ 특허포(patent.go.kr) 접속 > 민원서신내용포드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허·실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.  
 ※ 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr>-특허마당-PCT/마드리드  
 ※ 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12개월, 상표·디자인은 6개월 이내  
 ※ 미국특허상표청의 출원권을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 출원권이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [권리최초관하기사(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.  
 ※ 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000

<http://www.patent.go.kr/jsp/kiponet/ir/receipt/online/applNoOffAct.do>[2014-10-17 오후 10:58:44]

나. 비타민나부 추출물을 유효성분으로 함유하는 육체적 피로 개선 및 운동수행 능력 향상을 위한 조성물

출원번호통지서

관인생략

## 출원번호통지서

출원일자 2014.10.17  
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)  
출원번호 10-2014-0140471 (접수번호 1-1-2014-0989327-74)  
출원인명칭 주식회사 뉴트리플랜(1-2011-038377-6) 외 1명  
대리인성명 신동인(9-2000-000156-1)  
발명자성명 강남길 이민재 정창식 김선오 배동혁 김지혜  
발명의명칭 비타민나부 추출물을 유효성분으로 함유하는 육체적 피로 개선 및 운동수행 능력 향상을 위한 조성물

## 특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.  
※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [출원인코드 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.  
※ 특허포(patent.go.kr) 접속 > 민원서비스다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허·실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.  
※ 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr>-특허비당-PCT/마드리드  
※ 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12개월, 상표·디자인은 6개월 이내  
※ 미국특허상표청의 출원권을 기초로 우리나라에 우선권주장할원 시, 출원권이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적요약허가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.  
※ 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000

<http://www.patent.go.kr/jsp/kiponet/ir/receipt/online/applNoOffcAct.do>[2014-10-17 오후 10:59:27]

## 2. 논문

계제 연도	논문명	저자	학술지 명	Vol. (No.)	국내외 구분	SCI 구분
2015	Multi-functional anti-stress effects of standardized aqueous extracts from <i>Hippophae rhamnoides</i> L.	배동혁, 김지혜, 오둘리, 김유진, 최은진, 정명아, 이소연, 정창식, 이민재, 강남길, 이정민, 김선오	Animal Cells and Systems		국내	SCI(E)
2016	Anti-fatigue effects of isorhamnetin and aqueous extract from seabuckthorn ( <i>Hippophae rhamnoides</i> L.) leaf <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i>	김지혜, 배동혁, 오둘리, 이아름, 김유진, 최은진, 정명아, 오교녀, 나주련, 정창식, 이민재, 강남길, 이정민, 김선오	International Journal of Molecular Medicine		국외	SCI(E)

가. 논문 1. Multi-functional anti-stress effects of standardized aqueous extracts from *Hippophae rhamnoides* L.



통영학회 2016-13  
수 신 : 김선오 박사님  
제 목 : 논문게재증명서 송부

2016. 2. 17.

논문게재증명서

김선오 박사님 귀하

귀하께서 한국통합생물학회가 발간하는 *Animal Cells and Systems*에 2015년 8월 21일 부고하신 논문을 엄정한 절차에 따라 심사한 결과, *Animal Cells and Systems*에 게재 예정임을 통보해 드리는 바입니다.

- \* 접수 번호 : TACS-2015-0137
- \* 논문 제목 : Multi-functional anti-stress effects of standardized aqueous extracts from *Hippophae rhamnoides* L.
- \* 저 자 : Donghyuck Bae<sup>a</sup>, Jihye Kim<sup>a</sup>, Dool-Ri O<sup>a</sup>, Yujin Kim<sup>a</sup>, Eun-jin Cho<sup>a</sup>, Myung-A Jung<sup>a</sup>, So-Yeon Lee<sup>a</sup>, Changsik Jeong<sup>b</sup>, Minjae Lee<sup>b</sup>, Namgil Kang<sup>b</sup>, Jeongmin Lee<sup>c</sup> and Sunoh Kim<sup>a\*</sup>
- \* 소 속 : <sup>a</sup> Jeonnam Bioindustry Foundation, Jeonnam Institute of Natural Resources Research (JINR), Jeollanamdo 529-851, Korea  
<sup>b</sup> Nutriplan Co., Ltd., 29 Neunganro 266, Jori-eup, Paju, Gyeonggi-do 413-822, Korea  
<sup>c</sup> Research Institute of Clinical Nutrition, Department of Medical Nutrition, Kyung Hee University, Yongin, Korea.

위 논문은 *Animal Cells and Systems*에 게재 예정임을 증명합니다.

한국통합생물학회 회장 신

편집위원장 이명



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1 **Multi-functional anti-stress effects of standardized aqueous extracts from**  
2 ***Hippophae rhamnoides* L.**

3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

Donghyuck Bae<sup>a†</sup>, Jihye Kim<sup>a†</sup>, Dool-Ri O<sup>a</sup>, Yujin Kim<sup>a</sup>, Eun-jin Chor<sup>a</sup>, Myung-A  
Jung<sup>a</sup>, So-Yeon Lee<sup>a</sup>, Changuk Jeong<sup>b</sup>, Minjae Lee<sup>b</sup>, Namgil Kang<sup>b</sup>,  
Jeongmin Lee<sup>c</sup> and Sunoh Kim<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>*Jeonnam Bioindustry Foundation, Jeonnam Institute of Natural Resources Research (JINR),  
Jeollanamdo 529-851, Korea*

<sup>b</sup>*Nutriplan Co., Ltd., 29, Neunganro 266, Jori-eup, Paju, Gyeonggi-do 413-822, Korea*

<sup>c</sup>*Research Institute of Clinical Nutrition, Department of Medical Nutrition, Kyung Hee  
University, Yongin, Korea.*

14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

\*Send correspondence to: Sunoh Kim  
Jeonnam Bioindustry Foundation  
Jeollanamdo Institute of Natural Resources Research (JINR)  
288 Woodland-gil, Anyang-myeon, Jangheung-gun  
Jeollanamdo 529-851, Korea  
Telephone: +82 (61) 860-2610, Fax: +82 (61) 864-7105  
E-mail: [sunoh@korea.ac.kr](mailto:sunoh@korea.ac.kr)

<sup>†</sup> Donghyuck Bae and Jihye Kim contributed equally to this work

Submitted to International Journal of Molecular Medicine

Anti-fatigue effects of isorhamnetin and *Hippophae rhamnoides* L. leaf

Submitted by: Ji hye Kim, created on 28-01-2016

Type of Article: Article

Abstract

In the present study, we first investigated the anti-fatigue effects of aqueous extract (HRW) and isorhamnetin isolated from *Hippophae rhamnoides* L. leaves against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced ROS stress in L6 muscular cells and the exhaustive exercise in mice model. To screen the most potential compound for protectant against muscular ROS among various flavonoids confirmed in HRW using LC analytical system, we used in vitro cell model. When compared to cells treated with 150 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> alone, cell viability and intracellular ROS were the most recovered in the cells pretreated with isorhamnetin (IR) prior to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment. Thus, isorhamnetin was selected as the target material for the present experiments. To evaluate the endurance exercise capacity of mice, we carried out forced swimming test using adjustable-current water pool. Administration of HRW and IR improved exercise capacity and reduced lactic acid level elevated by intense exercise. Furthermore, HRW and IR-administered groups showed sparing effects of muscular and liver glycogen contents and blood glucose levels. When evaluating the indicators of fatigue status, the lactic dehydrogenase (LDH) activities and blood urea nitrogen (BUN) contents increased by exhaustive swimming were significantly reduced in HRW and IR-treated groups compared with the control group. There were not significant differences in creatine kinase (CK) level of extract treated groups compared with those of control group. Also, the administration of IR significantly protected the depletion of enzymatic-antioxidants and glutathione levels by exhaustive exercise. These results suggest that HRW and IR have an improvement effect on endurance exercise capacity, which is attributed to its ability to ameliorate oxidative stress by improving antioxidant and to recover glucose metabolism efficiency.

Authors

Name	Institute	Email Address
Ms Jihye Kim	Jeonnam Bioindustry Foundation, Jeonnam Institute of Natural Resources Research	xodnvas@naver.com
Dr Donghyuck Bee	Jeonnam Bioindustry Foundation, Jeonnam Institute of Natural Resources Research	bdhyuch@naver.com
Ms A-Reum Lee	Jeonnam Bioindustry Foundation, Jeonnam Institute of Natural Resources Research (IINRU)	
Ms Dool-Fi O	Jeonnam Bioindustry Foundation, Jeonnam Institute of Natural Resources Research (IINRU)	
Dr Eun-jin Choi	Jeonnam Bioindustry Foundation, Jeonnam Institute of Natural Resources Research (IINRU)	
Mr Changsik Jeon	Jeonnam Bioindustry Foundation, Jeonnam Institute of Natural Resources Research (IINRU)	
Ms Myung-A Jung	Jeonnam Bioindustry Foundation, Jeonnam Institute of Natural Resources Research (IINRU)	
Dr Kyonyeo Oh	Jeonnam Bioindustry Foundation, Jeonnam Institute of Natural Resources Research (IINRU)	
Ms yu jin Kim	Jeonnam Bioindustry Foundation, Jeonnam Institute of Natural Resources Research (IINRU)	
Mr Minjae Lee	Nutriplan Co., Ltd.	

### 제 3 절. 추가연구, 타연구에 활용 계획



- 비타민나무 잎추출물의 정신적/육체적 스트레스에 대한 소재탐색, 추출공정확립, 기능성 평가가 완료되어 건강지향식품으로 산업화가 완료됨
- 그러나, 건강기능식품 소재 등록을 위해서는 임상시험 완료 후 개별인정을 신청하여 개별인정형 건강기능식품으로 등록이 가능함
- 따라서, 본 연구결과를 활용하여 정식적 스트레스 완화 또는 육체적 피로회복(육체적 스트레스) 개선에 대한 인체적용시험을 진행할 수 있는 자료가 확보되어, 추가 연구를 수행할 예정임
- 추가연구에 의해 확보된 임상 결과와 본 연구결과를 활용하여 개별인정형 건강기능식품 신청하여 인정받을 수 있을 것으로 사료됨.
- 본 연구를 통해 확립된 정신적/육체적 스트레스 완화 전임상 효능평가기술을 활용하여 국내 농산물 및 특용작물의 정신적/육체적 스트레스 완화 소재 개발을 진행할 예정임

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

### 제 1절 비타민나무 효능·효과와 관련된 국제학술논문 자료

번호	학술지 제목/논문이름/년도/발표국가	주요 효능
1	UV radiation-induced skin aging in hairless mice is effectively prevented by oral intake of sea buckthorn ( <i>Hippophae rhamnoides</i> L.) fruit blend for 6 weeks through MMP suppression and increase of SOD activity. / Int J Mol Med. / 2012 / 한국	UV 자극에 의한 피부손상 보호
2	Antioxidant capacity of crude extracts containing carotenoids from the berries of various cultivars of Sea buckthorn ( <i>Hippophae rhamnoides</i> L.). / Acta Biochim Pol. / 2012 / 폴란드	항산화 효과
3	Casuarinin suppresses TARC/CCL17 and MDC/CCL22 production via blockade of NF- $\kappa$ B and STAT1 activation in HaCaT cells. / Biochem Biophys Res Commun. / 2012 / 한국	피부염증 완화
4	Effect of seabuckthorn ( <i>Hippophae rhamnoides</i> ssp. <i>sinensis</i> ) leaf extract on the swimming endurance and exhaustive exercise-induced oxidative stress of rats. / J Sci Food Agric. / 2012 / 중국	항산화 효과
5	Pentamethylquercetin improves adiponectin expression in differentiated 3T3-L1 cells via a mechanism that implicates PPAR $\gamma$ together with TNF- $\alpha$ and IL-6. / Molecules. / 2011 / 중국	비만, 대사성 질환 치료
6	Antioxidant and hepatoprotective activities of phenolic rich fraction of Seabuckthorn ( <i>Hippophae rhamnoides</i> L.) leaves. / Food Chem Toxicol. / 2011 / 인도	간손상 보호
7	Anti-visceral obesity and antioxidant effects of powdered sea buckthorn ( <i>Hippophae rhamnoides</i> L.) leaf tea in diet-induced obese mice. / Food Chem Toxicol. / 2011 / 한국	당뇨 예방 및 치료효과
8	Phytochemical analysis, antioxidant and antibacterial effects of sea buckthorn berries. / Pak J Pharm Sci. /	미생물 살균 작용

	2011 / 파키스탄	
9	Hypolipidaemic and hypoglycaemic effects of total flavonoids from seed residues of Hippophae rhamnoides L. in mice fed a high-fat diet. / J Sci Food Agric. / 2011 / 중국	비만치료, 지방 생성 억제
10	Mechanism of Wound-Healing Activity of Hippophae rhamnoides L. Leaf Extract in Experimental Burns. / Evid Based Complement Alternat Med. / 2011 / 인도	당뇨병성 합병증 괴사 치료
11	Hypoglycemic effect of aqueous extract of seabuckthorn (Hippophae rhamnoides L.) seed residues in streptozotocin-induced diabetic rats. / Phytother Res. / 2010 / 중국	당뇨 치료
12	Anti-tumor promoters phenolics and triterpenoid from Hippophae rhamnoides. / Fitoterapia. / 2009 / 일본	항암 효과
13	Safety and healing efficacy of Sea buckthorn (Hippophae rhamnoides L.) seed oil on burn wounds in rats. / Food Chem Toxicol. / 2009 / 인도	피부상처 치유
14	Hippophae rhamnoides L. and dexpanthenol-bepanthenone on blood flow after experimental skin burns in rats using <sup>133</sup> Xe clearance technique. / Hell J Nucl Med. 2009 / 터키	피부 화상 치료
15	Effect of a dietary supplement containing blueberry and sea buckthorn concentrate on antioxidant capacity in type 1 diabetic children. / Acta Physiol Hung. / 2008 / 루마니아	제1형 소아 당뇨 치료
16	Effect of seabuckthorn (Hippophae rhamnoides) leaf aqueous and ethanol extracts on avoidance learning during stressful endurance performance of rats: a dose dependent study. / Phytother Res. / 2008/ 인도	기억력 개선
17	Radioprotective properties of Hippophae rhamnoides (sea buckthorn) extract in vitro. / Int J Health Sci (Qassim).	방사선 피해에 의한 신체 손상 회복

	/ 2008 /	
18	Effect of Seabuckthorn (Hippophae rhamnoides) flavone on immune system: an in-vitro approach. / Phytother Res. / 2008 / 인도	면역 증강
19	Anti-atherogenic effects of seabuckthorn (Hippophaea rhamnoides) seed oil. / Phytomedicine. / 2007 / 인도	동맥경화 예방 및 치료
20	Inhibition of cancer cell proliferation and suppression of TNF-induced activation of NFkappaB by edible berry juice. / Anticancer Res. / 2007 / 캐나다	항암효과
21	Effects of sea buckthorn procyanidins on healing of acetic acid-induced lesions in the rat stomach. / Asia Pac J Clin Nutr. / 2007 / 중국	속쓰림, 위 손상 보호
22	Protective effects of Hippophae rhamnoides L. juice on lead-induced neurotoxicity in mice. / Biol Pharm Bull. / 2005 / 중국	학습력 증강

## 제 2절 비타민나무 주요 성분과 관련된 국제학술논문 자료

번호	학술지 제목/논문이름/년도/발표국가	주요 기능성 성분
1	Effects of solid dispersion and self-emulsifying formulations on the solubility, dissolution, permeability and pharmacokinetics of isorhamnetin, quercetin and kaempferol in total flavones of Hippophae rhamnoides L./Drug Dev Ind Pharm/ 2012/ 중국	isorhamnetin, quercetin, kaempferol
2	Vitamin E and Hippophaea rhamnoides L. extract reduce nicotine-induced oxidative stress in rat heart. / Cell Biochem Funct. / 2010 / 터키	Vitamin E(비타민 E)
3	beta-Sitosterol: Supercritical carbon dioxide extraction from sea buckthorn (Hippophae rhamnoides L.) seeds. / Int J Mol Sci. / 2010 / 체코	beta-sitosterol
4	Regioisomer compositions of vaccenic and oleic acid containing triacylglycerols in sea buckthorn (Hippophae rhamnoides) pulp oils: influence of origin and weather conditions. / J Agric Food Chem. / 2010 / 필란드	vaccenic, oleic acid
5	Vitamin C content in sea buckthorn berries (Hippophaë rhamnoides L. ssp. rhamnoides) and related products: a kinetic study on storage stability and the determination of processing effects. / J Food Sci. / 2008 / 독일	Vitamin C(비타민 C)
6	Tocopherols and tocotrienols in sea buckthorn (Hippophae rhamnoides L.) berries during ripening. / J Agric Food Chem. / 2008/ 스웨덴	Tocopherol (토코페롤)
7	Effects of processing and of storage on the stability of pantothenic acid in sea buckthorn products (Hippophaë rhamnoides L. ssp. rhamnoides) assessed by stable isotope dilution assay. / J Agric Food Chem. / 2007 / 독일	pantothenic acid

## 제 7 장 연구시설·장비 현황

\* 해당사항 없음

## 제 8 장 참고문헌

- 식약청 고시 제 2007-66호 식품의 유통기한 설정기준 및 개정고시(제2008-72호)
- 건강기능식품의 유통기간 설정 모델 연구, 2008, 식품의약품안전청
- 식품공전(2010)
- 건강기능식품 기능성 원료 인정서(제2008-55호)
- 관능검사 방법 및 응용. 김광옥, 김상숙, 성내경, 이영춘 신광출판사 1993
- Rúbia Casagrande, Sandra R. Georgettil Waldiceu A. 2006. Evaluation of Functional Stability of Quercetin as a Raw Material and in Different Topical Formulations by its Antilipoperoxidative Activity. *AAPS PharmSciTech* ; 7
- Chang-Jo Jeong and Ki-Hwan Shim, Korean J. 1999. Chemical components in leaf and fruit stalk of *Hovenia dulcis* Thunb. *Postharvest SCI. Technol.* Vol. 6. No 4. 469~471p
- Korean J. 2007. Quality characteristics and storage properties of sikhe prepared with extracts from *Hovenia dulcis* Thunb. *Food Cookery SCI*, Vol. 23. No 6. 848~857p
- Korean J. 2007. Quality characteristics of Haikseolgi made with *Hovenia dulcis*. *Food Engineering Progress* Vol. 11. No 3. 161~166p
- 2003. Stability testing of new drug substances and products. *ICH Guideline*
- 기상청 홈페이지 [www.kma.go.kr](http://www.kma.go.kr)
- Aebi H. 1984. Catalase *in vitro*. *Method Enzymol.* 105: 121-126.
- Aguilo A, Tauler , Fuentespina E, Tur JA, Cordova A, Pons A. 2005. Antioxidant response to oxidative stress induced by exhaustive exercise. *Physiol Behav.* 84:1-7.
- Alessio HM and AH Goldfrab. 1988. Lipid peroxidation and scavenging enzymes during exercise: Adaptive response of training. *J. Applied Physiol.* 64:1333-1336.
- Akerboom TP, Sies H. 1981. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol.* 77: 373-382.

- Anand T, Phani Kumar G, Pandareesh MD, Swamy MS, Khanum F, Bawa AS. 2012. Effect of bacoside extract from *Bacopa monniera* on physical fatigue induced by forced swimming. *Phytother Res.* 26:587-893.
- Baum M, Weiss M. 2001. The influence of a taurine containing drink on cardiac parameters before and after exercise measured by echocardiography. *Amino Acids.* 20: 75-82.
- Bonen A. 2000. Lactate transporters (MCT proteins) in heart and skeletal muscles. *Med. Sci. Sports Exerc.* 32:778-789.
- Beaudeux JL, Gardes-Albert M, Delattre J, Legrand A, Rousselet F, Peynet J. 1996. Resistance of lipoprotein(a) to lipid peroxidation induced by oxygenated free radicals produced by gamma radiolysis: a comparison with low-density lipoprotein. *Biochem. J.* 314: 277-284.
- Bittar PG, Charnay Y, Pellerin L, Bouras C, Magistretti PJ. 1996. Selective distribution of lactate dehydrogenase isoenzymes in neurons and astrocytes of human brain. *J Cereb Blood Flow Metab.* 16:1079-1989.
- Bradford MA. 1976. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Brooks G A. 2000. Intra- and extra-cellular lactate shuttles. *Med Sci Sports Exerc.* 32:790-799.
- Calberg T, Mannervik B. 1975. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *J. Biol. Chem.* 250: 5475-5480.
- Davies CT, White MJ. 1982. Muscle weakness following dynamic exercise in humans. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol.* 53:236-241.
- Dawson R Jr, Biasetti M, Messina S, Dominy J. 2002. The cytoprotective role of taurine in exercise-induced muscle injury. *Amino Acids.* 22:309-324.
- Ding JF, Li YY, Xu JJ, Su XR, Gao X, Yue FP. 2011. Study on effect of jellyfish collagen hydrolysate on anti-fatigue and anti-oxidation. *Food Hydrocol.* 25:1350-1353.
- Echeverry C, Blasina F, Arredondo F, Ferreira M, Abin-Carriquiry JA, Vasquez L, et al. 2004. Cytoprotection by neutral fraction of tannat red wine against oxidative stress-induced cell death. *J Agric Food Chem.* 52:7395-7399.

- Ganju L, Padwad Y, Singh R, Karan D, Chanda S, Chopra MK, Bhatnagar P, Kashyap R, Sawhney RC. 2005. Anti-inflammatory activity of seabuckthorn (*Hippophaerhamnoides*) leaves. *Int Immunopharmacol.* 5:1675-1684.
- Gao JM, Zhang AL, Zhang YS and Wang L. 1998. Advancements of flavonoids research in *Hippophae rhamnoides* L. *Hippophae.* 11: 34-40.
- Geetha S, Sai RM, Mongia SS, Singh V, Ilavazhagan G, Sawhney RC. 2003. Evaluation of antioxidant activity of leaf extract of Seabuckthorn (*Hippophaerhamnoides* L.) on chromium (VI) induced oxidative stress in albino rats. *J Ethnopharmacol.* 87:247-251.
- Hall L, Williams K, Perry AF, Frayne J, Jury JA. 1998. The majority of human glutathione peroxidase type 5 (GPX5) transcripts are incorrectly spliced: implications for the role of GPX5 in the male reproductive tract. *Biochem. J.* 333: 5-9.
- Han D. 2006. Mechanisms of Liver Injury. III. Role of glutathione redox status in liver injury. *Am. J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol.* 291: 1-7.
- Janisch KM, Williamson G, Needs P, Plumb GW. 2004. Properties of quercetin conjugates: modulation of LDL oxidation and binding to human serum albumin. *Free Radic Res.* 38:877-884.
- Jankowska R, Passowicz-Muszyńska E, Banaś T, Marcinkowska A. 1994. The influence of vitamin A on production of oxygen free radicals and activity of granulocyte catalase in patients with chronic bronchitis. *Pneumonol. Alergol. Pol.* 62: 628-633.
- Jung K, Kim IH, Han D. 2004. Effect of medicinal plant extracts on forced swimming capacity in mice. *J. Ethnopharmacol.* 93:75-81.
- Kallio H, Yang B, Peippo P. 2002. Effects of different origins and harvesting time on vitamin C, tocopherols and tocotrienols in seabuckthorn (*Hippophaerhamnoides* L.) berries. *J Agric Food Chem.* 50:6136-6142.
- Kuti JO. 2004. Antioxidant compounds from four *Opuntia* cactus pear fruit varieties. *Food Chem.* 85:527-533.
- Lapenna D, De Gioia S, Ciofani G, Bruno C, Porreca E, Pierdomenico SD, Cuccurullo F. 1998. Antioxidant properties of ticlopidine on human low density lipoprotein oxidation. *FEBS Lett.* 436: 357-360.
- Lee SM, You YH, Yoon HG, Kim KM, Park JJ, Kim SO, Ho JN, Lee, JM, Shim SI,

Jun WJ. 2011. Fatigue-Alleviating Effect on Mice of an Ethanolic Extract from *Rubuscoreanus*. *Biosci Biotechnol Biochem*. 75(2): 349-351.

- Liochev SI, Fridovich I. 2010. Mechanism of the peroxidase activity of Cu, Zn superoxide dismutase. *Free. Radic. Biol. Med*. 48: 1565-1569.
- Matsumoto K, Ishihara K, Tanaka K, Inoue K, Fushiki T. 1996. An adjustable-current swimming pool for the evaluation of endurance capacity of mice. *J Appl Physiol*. 81:1843-1849.
- McCord JM, Fridovich I. 1969. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocyte (hemocuprein). *J. Biol. Chem*. 244: 6049-6055.
- Miyazaki T, Matsuzaki Y, Ikegami T, Miyakawa S, Doy M, Tanaka N, Bouscarel B. 2004. Optimal and effective oral dose of taurine to prolong exercise performance in rat, *Amino Acids*. 27: 291-298.
- Murase T, Haramizu S, Shimotoyodome A, Tokimitsu I, Hase T. 2006. Green tea extract improves running endurance in mice by stimulating lipid utilization during exercise. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 290:1550-1556.
- Paglia DE, Valentine WJ. 1967. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med*. 70: 158-169.
- Passarella S, L de Bari, D Valenti, R Pizzuto, G. Paventil, A. Atlante. 2008. Mitochondria and L-lactate metabolism. *FENE Lett*. 582:3569-3576.
- Rochem NW, Rodger GH, Hatfield SM, Glasebrook AL. 1991. An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XT. *J. Immunol. Methods*. 142: 257-265.
- Rousi, A., 1971. The genus *Hippophae* L., a taxonomic study. *Ann. Bot*. 8, 177-227.
- Shang H, Cao S, Wang J, Zheng H, Putheti R. 2009. Glabridin from Chinese herb licorice inhibits fatigue in mice. *Afr J Tradit Complement Altern Med*. 7:17-23.
- Sid B, Verrax J, Calderon PB. 2013. Role of oxidative stress in the pathogenesis of alcohol-induced liver disease. *Free Radic. Res*. 47: 894-904.
- Sies H. 1993. Strategies of antioxidant defense. *Eur. J. Biochem*. 215: 213-219.
- Stahl W, Junghans A, de Boer B, Driomina ES, Brivida K, Sies H. 1998. Carotenoid mixtures protect multilamellar liposomes against oxidative damage: synergistic effects of lycopene and lutein. *FEBS. Lett*. 427: 305-308.
- Stait SE, Leake DS. 1996. The effects of ascorbate and dehydro ascorbate on the

oxidation of low-density lipoprotein. *Biochem. J.* 320: 373-381.

- Tanaka M, Baba Y, Kataoka Y, Kinbara N, Sagesaka Y M, Kakuda T. 2008. Effects of epigallocatechingallate in liver of an animal model of combined (physical and mental) fatigue. *Nutrition.* 24:599-603.
- Tan W, Yu KQ, Liu YY, Ouyang MZ, Yan MH, Luo R, Zhao XS. 2012. Anti-fatigue activity of polysaccharides extract from *Radix rehmanniae preparata*. *Int J Biol Macromol.* 50:59-62.
- Tang W, Zhang Y, Gao J, Ding X, Gao S, 2008. The anti-fatigue effect of 20(R)-ginsenoside Rg3 in mice by intranasally administration. *Biol Pharm Bull.* 31: 2024-2027.
- Tesch P, Sjödin B, Thorstensson A, Karlsson J. 1978. Muscle fatigue and its relation to lactate accumulation and LDH activity in man. *Acta Physiol Scand.* 103:413-20.
- Venu Prasad MP and Khanum Farhath. 2012. Antifatigue Activity of Ethanolic Extract of *Ocimum sanctum* in Rats. *J. Med. Plants.* 6:37-46
- Wang J, Li S, Fan Y, Chen Y, Liu D, Cheng H, Gao X, Zhou Y. 2010. Anti-fatigue activity of the water-soluble polysaccharides isolated from *Panax ginseng* C. A. Meyer. *J Ethnopharmacol.* 130:421-423.
- Wang L, Zhang HL, Lu R, Zhou YJ, Ma R, Lv JQ, Li XL, Chen LJ, Yao Z. 2008. The decapeptide CMS001 enhances swimming endurance in mice. *Peptides.* 29:1176-1182.
- Yan X, Murphy BT, Hammond GB, Vinson JA, Neto CC. 2002. Antioxidant activities and antitumor screening of extracts from cranberry fruit (*Vaccinium macrocarpon*). *J Agric Food Chem.* 50:5844-5849.
- Yao L, Li F. 2010. *Lyciumbarbarum* polysaccharides ameliorates physical fatigue. *Afr J Agric Res.* 5:2153-2157.
- Yatabe Y, Miyakawa S, Miyazaki T, Matsuzaki Y, Ochiai N. 2003. The effects of taurine administration in rat skeletal muscles on exercise. *J OrthopSci.* 8:415-419.
- You L, Ren J, Yang B, Regenstein J, Zhao M. 2012. Antifatigue activities of loach protein hydrolysates with different antioxidant activities. *J Agric Food Chem.* 60:12324-12331.
- You Y, Kim K, Yoon HG, Lee KW, Lee J, Chun J, Shin DH, Park J, Jun W. 2010.

Chronic effect of ferulic acid from *Pseudosasa japonica* leaves on enhancing exercise activity in mice. *Phytother Res.* 24:1508–1513

- Zhang M, Izumi I, Kagamimori S, Sokejima S, Yamagami T, Liu Z, Qi B. 2004. Role of taurine supplementation to prevent exercise-induced oxidative stress in healthy young men. *Amino Acids.* 26:203–207
- Zhang M, Izumi I, Kagamimori S, Sokejima S, Yamagami T, Liu Z, Qi B. 2004. Role of taurine supplementation to prevent exercise-induced oxidative stress in healthy young men. *Amino Acids.* 26:203–207
- Zhang Y, Wang B. 2012. Effects of polysaccharides from *Cordyceps sinensis* mycelium on physical fatigue in mice. *Bangladesh J Pharmacol.* 7:217–221.
- Zhang Y, Yao X, Bao B, Zhang Y. 2006. Anti-fatigue activity of a triterpenoid-rich extract from Chinese bamboo shavings (*Caulis bambusae in Taeniam*). *Phytother Res.* 20:872–876.

## 주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.