

최 종
연구보고서

삼백초의 동맥경화 예방 효과 및
기능성 식품개발

The development of health-benefit functional foods using *Saururus chinensis* through the study of prevention effects on atherosclerosis

연 구 기 관
경북대학교

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “삼백초의 동맥경화 예방 효과 및 기능성 식품개발에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2004 년 10 월 14 일

주관연구기관명 : 경북대학교

총괄연구책임자 : 정 신 교

연 구 원 : 박 승 우

연 구 원 : 김 영 찬

연 구 원 : 김 숙 경

연 구 원 : 김 상 목

연 구 원 : 김 준 성

위탁연구기관명 : 계명대학교

위탁연구책임자 : 이 인 선

연 구 원 : 박 정 현

연 구 원 : 이 승 욱

연 구 원 : 유 미 희

요 약 문

I. 제 목

삼백초의 동맥경화 예방효과 및 기능성 식품개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

삼백초는 변비, 당뇨병, 간장병, 암, 고혈압, 심장병, 부인병, 신장병 등 갖가지 성인병의 예방과 치료에 효과가 있으며, 특히 고혈압, 동맥경화 치료와 예방에 효과가 커서 현재 농가 재배가 확산되고 있다. 이에 재배 농가에서 단순가공으로 제조되고 있는 삼백초 이용 식품을 기능성 식품화할 수 있는 과학적이고 체계적인 연구가 필요하다. 따라서, 성인병의 발병 주 원인인 활성산소종과 이로 인한 동맥경화 예방을 목표로, 삼백초의 건강기능성 성분을 분리 및 정제하여 그 화학적 구조를 밝히고, 동물실험을 통하여 삼백초의 동맥경화 예방 효과를 구명하고, 보다 기능이 개선되고 고부가가치형의 건강기능성 제품의 개발에 목표를 두고 연구를 수행하였다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 삼백초의 동맥경화예방 기능성 식품 개발

○ 삼백초 지상부 및 지하부로부터 동맥경화예방 활성 물질을 분리하기 위하여, 조추출물을 조제하고 용매분획, SiO₂, Sephadex LH-20 칼럼크로마토그래피와 HPLC를 실시하였다. 분리 및 정제된 화합물을 NMR, MS로 분석하여 그 화학적 구조를 동정하였다.

○ 삼백초의 조추출물 및 각 분획과 분리된 성분에 대하여 동맥경화의 주 원인인, 활성산소종의 소거활성과 사람으로부터 분리한 LDL의 산화억제 활성을 검증하였다.

- 삼백초 지상부에서 quercetin-3-O- α -L-rhamnoside, kaempferol-3-O- α -L-rhamnoside, quercetin-3-O-rutinoside를 분리 및 동정하였으며 이 중 quercetin-3-O-rutinoside가 LDL 산화억제 활성이 tocopherol에 비하여 우수하였다.
- 지하부에서 Di-O-methyltetrahydrofugaicin, Saucerneol D, Machilin D를 분리 및 동정하였으며 이중 Machilin D의 LDL 산화억제 활성이 우수하였다.
- 삼백초 지상부의 동맥경화 예방 기능성 제품화를 위하여 최적추출조건을 조사한 결과, 40% 에탄올로 4시간 추출하는 것이 가장 적합한 것으로 나타났다.
- 삼백초 지상부 추출물을 활용하여 활성과 기호도가 보장된 음료제품을 개발하였다.
- 삼백초 지상부의 40% 에탄올 추출물에 대하여 기능성 제품화에 필요한 이화학적 특성 중 일반성분, 무기질, 유리당, 유기산 및 유리아미노산 함량을 조사하였다.
- 40% 에탄올 추출물의 미세캡슐화에 필요한 분무건조 조건을 확립하였고, 미세캡슐화시 cyclodextrin으로 제조된 삼백초 분말이 용해성과 색도 및 입자상태가 우수하여 기질로서 적합하였다.
- 40% 에탄올 추출물의 미세캡슐을 이용하여 삼백초의 건강기능성 캡슐, 정제를 제조하였다.

2. 삼백초의 동맥경화 예방 기능성의 생체검증

- 삼백초 40% 에탄올 추출물 투여가 고콜레스테롤 식이를 섭취한 흰쥐의 혈청 지질구성과 간장 기능 및 항산화능에 미치는 영향을 조사하였다.
- Sprague-Dawley계의 흰쥐를 정상군과 고콜레스테롤 식이군, 0.1%와 0.5% 삼백초 40% 에탄올 추출물 첨가한 군으로 나누어 8마리씩 4주간 사육하였다.

- 삼백초 추출물 투여군에서는 삼백초의 농도에 관계없이 체중의 증가가 유의적으로 감소하였으며 단위 체중 당 간장의 중량도 감소하는 경향을 보였다.
- 총 콜레스테롤의 농도는 삼백초 40% 에탄올 추출물의 투여에 따라 다소 감소하는 경향을 보였고, LDL 콜레스테롤 농도와 동맥경화 지수도 유의적으로 감소하였다.
- 삼백초 추출물 투여군의 혈장 중 AST, ALT의 활성은 감소하는 경향이었으며, SOD와 catalase의 활성은 증가하였다.
- 삼백초 40% 에탄올 추출물은 혈장 중 과산화지질의 감소 등으로 동맥경화의 예방 활성이 있는 것으로 나타났다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발 결과

1) 삼백초의 동맥경화예방 기능성 식품 개발

- 삼백초 지상부 및 지하부로부터 동맥경화예방 활성 물질을 분리하고 그 화학적 구조를 동정하였다.
- 삼백초의 지상부에서 quercetin-3-O- α -L-rhamnoside, kaempferol-3-O- α -L-rhamnoside, quercetin-3-O-rutinoside를 분리 및 동정하였으며 이 중 quercetin-3-O-rutinoside가 LDL 산화억제 활성이 tocopherol에 비하여 우수하였다.
- 지하부에서 Di-O-methyltetrahydrofurogaucin, Saucerneol D, Machilin D를 분리 및 동정하였으며 이 중 Machilin D의 LDL 산화억제 활성이 우수하였다.
- 삼백초 지상부의 동맥경화 예방 기능성 제품화시 40% 에탄올로 4시간 추출하는 것이 가장 적합한 것으로 나타났다.

- 삼백초 지상부 추출물을 활용하여 활성과 기호도가 보장된 음료제품을 개발하였다.
- 삼백초 지상부의 40% 에탄올 추출물에 대하여 일반성분, 무기질, 유리당, 유기산 및 유리아미노산 함량을 조사하였다.
- 40% 에탄올 추출물의 미세캡슐화 제조에 필요한 분무건조 조건을 확립하고, cyclodextrin을 기질로 하여 미세캡슐을 제조하였다.
- 40% 에탄올 추출물의 미세캡슐을 이용하여 삼백초의 건강기능성 캡슐, 정제를 제조하고 산업화에 필요한 공정을 확립하였다.
- 본 연구를 통하여 개발된 미세캡슐화 기술은 참여 기업 및 삼백초 재배 가공농가에 기술 이전하고자 함.

2) 삼백초의 동맥경화 예방 기능성의 생체검증

- 삼백초 40% 에탄올 추출물 투여가 고콜레스테롤 식이를 섭취한 흰쥐의 혈청 지질구성과 간장 기능 및 항산화능에 미치는 영향을 조사하였다.
- Sprague-Dawley계의 흰쥐를 정상군과 고콜레스테롤 식이군, 0.1%와 0.5% 삼백초 40% 에탄올 추출물 첨가한 군으로 나누어 8마리씩 4주간 사육하였다.
- 삼백초 추출물 투여군에서는 삼백초의 농도에 관계없이 체중의 증가가 유의적으로 감소하였으며 단위 체중 당 간장의 중량도 감소하는 경향을 보였다.
- 총 콜레스테롤의 농도는 삼백초 40% 에탄올 추출물의 투여에 따라 다소 감소하는 경향을 보였고, LDL 콜레스테롤 농도와 동맥경화 지수도 유의적으로 감소하였다.
- 삼백초 추출물 투여군의 혈장 중 AST, ALT의 활성은 감소하는 경향이었으며, SOD와 catalase의 활성은 증가하였다.

- 삼백초 40% 에탄올 추출물은 혈장 중 과산화지질의 감소 등으로 동맥경화의 예방 활성이 있는 것으로 나타났다.

2. 활용 및 건의사항

- 본 연구 결과는 삼백초 재배 농가에 이전되어 고부가가치 제품 생산으로 농가 소득 향상에 기여하게 될 것임
- 삼백초의 동맥경화 예방 활성이 생체내외의 실험에서 검증된 결과는 추후 개발제품의 건강기능성 제품화 자료로서 활용하고자 함.
- 본 연구 결과 중 일부는 국내외 학술 잡지에 게재되어 관련 학문과 기술의 개발에 이바지될 것임.
- 향후 본 연구에서 구명되지 않은 기능성 성분과 보다 다양한 기능성 제품 개발, 생체 내에서 동맥경화예방 활성의 메카니즘적인 연구가 필요함

SUMMARY

I. The subjective of the project

The development of health-benefit functional foods using *Saururus chinensis* through the study of prevention effects on atherosclerosis

II. The objective and importance of the project

The cultivation and production of *Saururus chinensis* is recently increased because of its prevention effects on the several degenerative diseases such as atherosclerosis, hyperlipidemia, diabetes and cancers. Several simple processed products like extract and powder from *Saururus chinensis* are now processed and marketed at the farm level. Therefore through the scientific study of pharmacological effects and prevention effects on the several degenerative diseases, health-benefit functional foods using *Saururus chinensis* should be developed for the high income of the farmers as well as the decrease of the social medical expenses.

This study was intended to study the atherogenic prevention effects of *Saururus chinensis*, *in viro*, *ex vivo* and *in vivo* and elucidate their active compounds. Furthermore the development of more efficient health-benefit functional foods using *Saururus chinensis* was aimed.

III. The scope and contents of the project

1. The development of anti-atherogenic functional foods using *Saururus chinensis*

○ The procedures of solvent fractionation and SiO₂ column chromatography, Sephadex LH-20 column chromatography and HPLC were executed in order to isolate and purify the active compounds from the aerial and underground parts of *Saururus chinensis*. The chemical structures were elucidated using NMR and MS analyses.

- The reactive oxygen species scavenging activities and LDL oxidation inhibition effects were examined *in vitro and ex vivo*.
- Quercetin-3-O- α -L-rhamnoside, kaempferol-3-O- α -L-rhamnoside and quercetin-3-O-rutinoside were isolated from the aerial parts of *Saururus chinensis*.
- Di-O-methyltetrahydrofuroguaiacin, Saucerneol D and Machilin D were isolated from the underground parts of *Saururus chinensis*.
- The extraction process for 4 hr using 40% ethanol was most effective for the preparation of anti-atherogenic functional foods using the aerial parts of *Saururus chinensis*.
- The extract beverage having the improved activity and taste using the aerial parts of *Saururus chinensis* was developed.
- The proximate composition and the contents of minerals, sugar, organic acid and amino acid of the 40% ethanol extract were determined.
- The microencapsulation process of the 40% ethanol extract was developed.
- The anti-atherogenic functional capsule and tablet using the 40% ethanol extract were developed.

2. The verification of anti-atherogenic effects of *Saururus chinensis* by *in vivo* experiment

- This study was performed to investigate the anti-atherogenic effect of ethanol extract from *Saururus Chinensis in vivo*.
- Normal diet-fed, high cholesterol-fed and 40% ethanol extract of *Saururus Chinensis* (STE40)-fed rats were bred for weeks.

- Weight gains decreased in STE40-fed rats.
- Food intake and food efficiency ratio were no significantly different among treatment groups.
- Plasma total and LDL cholesterol contents of STE40-fed rats were lower than other treatments.
- AST, ALT activities and lipid peroxide level were decreased, and SOD, catalase activities were progressively increased in STE40-fed rats
- The 40% ethanol extract of *Saururus Chinensis* (STE40) was verified to reveal the activity of preventing atherosclerosis based on these results.

IV. The research results and the recommendation

1. The research results

1) The development of anti-atherogenic functional foods using *Saururus chinensis*

- The several chromatography procedures were executed in order to isolate and purify the active compounds from the aerial and underground parts of *Saururus chinensis*, and the chemical structures were elucidated using NMR and MS analyses.
- The reactive oxygen species scavenging activities and LDL oxidation inhibition effects were examined *in vitro and ex vivo*.
- Quercetin-3-O- α -L-rhamnoside, kaempferol-3-O- α -L-rhamnoside and quercetin-3-O-rutinoside were isolated from the aerial parts of *Saururus chinensis*.

- Di-*O*-methyltetrahydrofuroguaiacin, Saucerneol D and Machilin D were isolated from the underground parts of *Saururus chinensis*.
- The extraction process for 4 hr using 40% ethanol was most effective for the preparation of anti-atherogenic functional foods using the aerial parts of *Saururus chinensis*.
- The extract beverage having the improved activity and taste using the aerial parts of *Saururus chinensis* was developed.
- The proximate composition and the contents of minerals, sugar, organic acid and amino acid of the 40% ethanol extract were determined.
- The microencapsulation process of the 40% ethanol extract was developed.
- The anti-atherogenic functional capsule and tablet using the 40% ethanol extract were developed.

2. The verification of anti-atherogenic effects of *Saururus chinensis* by *in vivo* experiment

- This study was performed to investigate the anti-atherogenic effect of ethanol extract from *Saururus Chinensis in vivo*.
- Normal diet-fed, high cholesterol-fed and 40% ethanol extract of *Saururus Chinensis* (STE40)-fed rats were bred for weeks.
- Weight gains decreased in STE40-fed rats.
- Food intake and food efficiency ratio were no significantly different among treatment groups.
- Plasma total and LDL cholesterol contents of STE40-fed rats were lower than other treatments.

- AST, ALT activities and lipid peroxide level were decreased, and SOD, catalase activities were progressively increased in STE40-fed rats
- The 40% ethanol extract of *Saururus Chinensis* (STE40) was verified to reveal the activity of preventing atherosclerosis based on these results.

2. The recommendation

- These results were transferred to the farm in order to produce health-benefit-functional foods using various agricultural products.
- These results on the anti-atherogenic effects ex vivo and in vivo were used for important data for the development of health-benefit functional food using *Saururus Chinensis*,
- Some results are going to submit to domestic and international journals in order to improve the related technology and academic research.
- The research of unknown active compounds of *Saururus Chinensis* is urgently needed.
- The mechanism study of pharmacological effects is also needed.

CONTENTS

Chapter 1. Outline of the project	1
Chapter 2. The domestic and international states of the technology	3
Chapter 3. The research contents and results	4
1. Introduction	4
2. The development of anti-atherogenic functional food using <i>Saururus chinensis</i>	6
1) Introduction	6
2) Material methods	7
(1) The collection and pretreatments of the sample	7
(2) The preparation of crude extracts	7
(3) Assay of anti-atherogenic effects	7
(4) The isolation, purification and identification experiments	10
(5) The optimum extraction condition	12
(6) The development of extract beverage	13
(7) Microencapsulation	16
(8) The processing of capsule and tablets	19
(9) Quality characteristics of the developed products	20
3) The research contents and results	22
(1) Anti-atherogenic effect of the aerial parts of <i>Saururus chinensis</i>	22
(2) Isolation and identification of the active compounds	25

(3) Anti-atherogenic effect of the underground parts of <i>Saururus chinensis</i>	28
(4) Anti-atherogenic effect of the underground parts of <i>Saururus chinensis</i>	32
(5) Isolation and identification of the active compounds	36
(6) The optimum extraction condition	44
(7) The development of extract beverage	48
(8) Microencapsulation	55
(9) The processing of capsule and tablets	62
(10) Quality characteristics of the developed products	67
4) Summary	71
5) Reference	73
3. The verification of anti-atherogenic effects of <i>Saururus chinensis</i> by <i>in vivo</i> experiment	86
1) Introduction	86
2) Material and methods	88
(1) Rats and diets	88
(2) Measure of weight gain and food intake	88
(3) Separation of serum and tissue collection	88
(4) Analysis of serum lipids	89
(5) Preparation of hepatic enzyme	89
(6) Glutathion activity	89
(7) Lipid peroxide activity	90
(8) Quinone reductase activity	90
(9) Glutathion S-transferase activity	90

(10) Superoxide dismutase activity	91
(11) Catalase activity	91
(12) Protein contents	91
(13) Statistical analysis	91
3) The research contents and results	93
(1) food efficiency ratio and body weight change	93
(2) Change of organ weights	94
(3) Cholesterol and triglyceride concentrations in serum	96
(4) AST, ALT activities in serum	98
(5) lipid peroxide, glutathion activities	99
(6) Hepatic enzyme activities	100
4) Summary	102
5) Reference	103
Chapter 4. The attainment and contribution	110
Chapter 5. The utilization and extension	111

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	1
제 2 장	국내외 기술개발 현황	3
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	4
제 1 절	서론	4
제 2 절	삼백초의 동맥경화 예방효과 및 기능성 제품 개발	6
1. 서설	6
2. 연구수행 방법	7
가. 시료의 수집 및 처리	7
나. 삼백초 조추출물의 조제 및 용매분획	7
다. 삼백초의 동맥경화 예방 활성 검정	7
1) In vitro 상에서의 활성산소 라디칼 소거활성 시험	7
가) Hydroxyl radical 소거활성	7
나) Superoxide anion 소거활성	8
다) Hydrogen peroxide 소거활성	8
2) 동맥경화 유발인자 Low-density lipoprotein(LDL)의 산화억제 시험	9
가) Human LDL의 분리	9
나) LDL의 산화	9
다) LDL 산화 생성물의 측정	9
라) apo B 100 fragment 측정	10
라. 동맥경화 예방 성분의 분리 및 정제, 화학적 구조 결정	10

1) 용매 분획	10
2) Column chromatography에 의한 분리	11
가) Sephadex LH-20 column chromatography	11
나) Silica gel column chromatography	11
3) Prep HPLC에 의한 분리 및 정제, 정량	11
4) Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy	11
마. 삼백초 기능성분의 효율적 추출 조건	12
1) 재료	12
2) 수율	12
3) 전자공여능 측정	12
4) 총페놀 함량	12
5) 총플라보노이드 함량	13
6) 삼백초 추출물의 플라보노이드 성분 분석	13
바. 삼백초를 이용한 음료 개발	13
1) 재료	13
2) 삼백초의 배합비율 설정실험	14
가) 원적외선 추출	14
나) 삼백초 지상부 및 지하부의 혼합비율	14
다) 수율	14
라) 전자공여능 측정	14
3) 원적외선 가열추출시간 설정 실험	15
4) 원적외선 삼백초 음료의 제조	15
가) 원적외선 추출	15
나) 음료 배합을 위한 실험계획	15
다) 배합음료의 이화학적 특성조사	15
라) 최적 배합 조건 설정	15
사. 삼백초를 이용한 미세캡슐화	16
1) 재료	16
2) 삼백초 40%에탄올 추출물의 품질 특성	17
3) 미세캡슐화	18

4) 점도	18
5) 수분함량	18
6) 용해성	19
7) 흡습성	18
8) 색도	19
9) 전자공여능 측정	19
10) 주사전자현미경 관찰	19
아. 삼백초를 이용한 캡슐 및 정제	19
1) 캡슐의 제조	19
2) 정제의 제조	20
자. 삼백초 제품의 활성 검증	20
1) 색도	20
2) 중량편차 및 봉쇄시험	20
3) 전자공여능 측정	20
4) 총페놀함량	21
5) LDL 산화 생성물의 측정(TBARS)	21
3. 연구수행 결과	22
가. 삼백초 지상부로부터 동맥경화 예방 물질 분리와 활성	22
나. 삼백초 지상부에서 분리한 활성 성분의 화학적 구조분석	25
다. SDS-PAGE에 의한 LDL apo B 100 산화 억제 활성	28
라. 삼백초 지하부로부터 동맥경화 예방 물질 분리와 활성	32
마. 삼백초 지하부에서 분리한 활성 성분의 화학적 구조분석	36
바. 삼백초 기능성분의 효율적 추출 조건	44
1) 추출용매에 따른 이화학적 특성 변화	44
2) 추출시간에 따른 이화학적 특성 변화	45
3) 삼백초 추출물의 플라보노이드 성분 분석	46
사. 삼백초를 이용한 음료 개발	48
1) 삼백초 시료의 배합비율 설정	48
2) 원적외선 추출가열시간 설정	49

3) 원적외선 추출에 의한 삼백초 음료의 최적 배합 조건 설정	50
아. 삼백초를 이용한 미세캡슐화	55
1) 삼백초 40%에탄올 추출물의 품질 특성	55
2) 삼백초의 미세캡슐화 조건에 따른 이화학적 특성 변화	58
3) 삼백초의 미세캡슐화 조건에 따른 분말입자 변화	61
자. 삼백초를 이용한 캡슐 및 정제개발	62
1) 삼백초 분무건조	62
2) 삼백초 캡슐제조	64
3) 삼백초 정제 생산	65
차. 삼백초 제품의 품질특성 및 동맥경화 예방 활성 검증	67
4. 요 약	71
5. 참 고 문 헌	73
제 3 절 삼백초 동맥경화 예방 기능성의 생체검증	86
1. 서설	86
2. 연구수행 방법	88
가. 실험동물 및 식이	88
나. 체중 증가량 및 식이 섭취량 측정	88
다. 혈장 분리 및 장기 채취	88
라. 혈장분석	89
마. 간조직의 효소원 조제	89
바. Glutathion(GSH) 함량 측정	89
사. Lipid peroxidation(LPO) 함량 측정	90
아. Quinone reductase(QR) 활성 측정	90
자. Glutathione S-transferase(GST) 활성 측정	90
차. Superoxide dismutase(SOD) 활성 측정	91

카. Catalase 활성 측정	91
타. 단백질 정량	91
파. 통계처리	91
3. 연구수행 결과	93
가. 체중증가량 및 식이효율	93
나. 장기 중량 변화	94
다. 혈장 내 지질 수준	96
라. 혈장 내 AST 및 ALT 활성 수준	98
마. 간조직에서의 lipid peroxide 및 glutathione 활성	99
바. 간조직의 항산화효소 활성	100
4. 요약	102
5. 참고문헌	103
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	110
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	111

제 1 장 연구개발과제의 개요

삼백초의 학명은 *Saururus chinensis* Baill이고 삼백초과에 속하는 다년생초로 높이가 30~90cm이고, 홀잎이며 꽃은 이삭꽃의 흰색으로 7~8월에 피며 열매는 8~9월에 맺으며 습지나 물가에 잘 자라는 식물이다. 초여름에 꽃 밑 잎 3개가 하얗게 변하므로 삼백초라고 불리며 국내는 주로 제주도, 경남, 전남 등 남부지방에 자라는 토종 자생식물로 알려져 있다. 삼백초는 고문헌 및 민간요법에서 다양한 생리적 효능을 가진 것으로 보고되고 있다. 삼백초는 현재 변비, 당뇨병, 간장병, 암, 고혈압, 심장병, 부인병, 신장병 등 갖가지 성인병의 예방과 치료에 놀랄만한 효과가 있으며, 특히 고혈압, 동맥경화 치료와 예방에 효과가 크다고 민간에 알려져 있다.

삼백초에 관한 연구는 주로 자생식물의 수집 및 재배 작물화, 재배 기술 확립, 일부 생리 활성의 검색, 부분적 이용 방법 등에 국한되어 있으며 이의 약효 성분과 생체 기능성 및 이를 이용한 기능성 제품에 관한 연구가 거의 없는 실정이다. 동맥경화는 동맥 내벽에 물리적 또는 생물학적 손상이 반복하여 가해져서 내막층이 갈라지거나 얇아져서 혈액속의 단핵구, 임파구 등이 지방분을 잡아먹는 식세포의 역할을 하여 세포질 속에 많은 기름기를 함유하게 됨과 동시에 증식인자를 분비하여 평활근세포와 결합조직세포가 증식을 일으키게 만들어서 동맥벽이 두꺼워지게 되는 것으로, 동맥경화를 일으키는 위험요인으로는 고혈압, 고지혈증, 흡연, 당뇨병, 비만, 운동부족, 스트레스 등에 의하여 유발된 유리산소 라디칼($\cdot\text{OH}$, O^{2-} , H_2O_2 , 지질과산화물 라디칼 등)이며 이들에 의한 저밀도단백질(Low Density Lipoprotein, LDL) 산화물과 macrophage의 포식이 주 원인으로 알려져 있다.

LDL의 산화는 체내의 활성산소에 의해 야기되므로 천연 항산화제에 의한 LDL의 산화방지가 동맥 경화 등의 혈관 순환계 질병 예방 및 치유에 매우 중요한 역할을 하는데, 폴리페놀, 플라보노이드, 페놀산, 안토시아닌, 비타민C, 토코페롤 등의 천연 항산화 물질이 LDL 산화를 유의적으로 억제하는 것으로 보고되어 있으며, 이러한 페놀성 화합물의 함량이 높은 녹차 추출물, 적포도주, 포도씨 및 껍질 추출물 등이 LDL의 산화를 억제하는 것으로 보고되고 있다. 이에, 성인병의 발병 주 원인인 동맥경화 예방 자생식물(삼백초)의 생체 기능 성분과 효과의 체계적, 과학적인 연구가 필요하다. 또한 현재 단순가공으로 제조되고 있는 삼백초 이용 식품

을 건강 기능이 부여, 입증된 고도 가공 식품으로 개발 및 전환이 필요한 실정이다.

국내의 사망 원인 조사에 의하면, 남자는 암(23.3%), 순환기계질환(22.8%), 사고사 (8.9%) 순이며, 여자는 순환기계질환(26.4%), 암(13%), 사고사(4.5%) 순으로 보도 (월간조선, 2001년 9월호)되었는데, 특히 국내에서 순환계 질환에 의한 사망 비율이 암에 이어서 두 번 째로서 향후 고혈압, 동맥경화, 당뇨 등의 예방을 위한 보건 기능성 식품의 수요는 폭발적일 것으로 기대된다. 이에, 현재 단순가공으로 제조되고 있는 삼백초 이용 식품을, 건강 기능이 부여, 검증된 부가가치가 높은 고도 가공 식품으로 개발하여, 고부가가치 산업화의 모델로 추진하는 연구가 필요하다. 따라서 국내에서 동맥경화 예방 효능이 뛰어난 삼백초의 기능성 성분 및 관련 질병 예방의 과학적 구명 연구는 국민의 건강한 생활과 평균수명의 연장, 국민적 의료비 절감, 관련 예산의 절감 등을 도모할 수 있는 연구이다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

전 세계적으로 성인병 예방 및 치유를 위한 보건 기능성 식품 시장은 매년 20~30% 성장하고 있으며, 건강보조식품과 기능성 식품 등의 분류에 따라 1,200억에서 450억\$로 추산되며 2002년도에 국내에서도 건강보조식품의 시장이 1조3천억 원대인 것으로 추정된다(한국건강보조식품 협회 자료, 2002.4.). 또한 일본에서는 각종 성인병 예방을 겨냥한 특정보건용 식품시장이 매년 급성장세를 보이고 있으며 2001년도의 전체시장 규모도 99년도의 2,269억엔보다 82% 늘어난 4,121억 엔대로 성장하였고, 혈압조절식품은 100억 엔으로 140%, 중성·체지방억제를 겨냥한 식품군은 152억 엔으로 182%, 그리고 충치예방 식품 등이 현저한 증가를 보이고 있다 (한국건강보조식품 협회자료, 2002.4.).

특히 국내에서 순환계 질환에 의한 사망 비율이 암에 이어서 두 번째로서 향후 고혈압, 동맥경화, 당뇨 등의 예방을 위한 보건 기능성 식품의 수요는 폭발적일 것으로 기대되고 있다.

따라서 우리나라에서도 암 및 성인병의 예방을 위한 보건 기능성 식품의 생산, 수입, 판매, 수요 등의 증대와 국가적인 의료비의 절감을 위하여 현재 건강기능성 식품의 제반 관리에 관한 입법화가 추진되어 2004년 8월부터 시장에 다양한 건강기능성식품이 출시되고 있다. 국내에서도 농림특정과제 및 수산특정과제연구를 통하여 우리 농수산물을 이용한 많은 건강기능성 식품이 연구 개발되어, 농민의 소득 증대와 국민 보건 향상, 국가적 의료비 예산 절감에 기여하고 있다.

삼백초는 변비, 당뇨병, 간장병, 암, 고혈압, 심장병, 부인병, 신장병 등 갖가지 성인병의 예방과 치료에 효과가 있으며, 특히 고혈압, 동맥경화 치료와 예방에 효과가 커서 현재 농가 재배가 확산되고 있다. 이에 단순가공으로 제조되고 있는 삼백초 식품을, 건강 기능성이 부여, 검증된 부가가치가 높은 고도 가공 식품으로 개발하여, 입법화된 건강기능성 식품의 기본적 요건을 충족하여 환경친화적 농공 병진형 고부가가치 산업화의 모델로 추진하는 연구가 필요하다.

본 연구는 건강기능 효과가 뛰어난 삼백초의 기능성 성분 및 관련 질병 예방의 과학적 구명 연구와 제품 개발을 통하여 재배 농가의 고소득을 보장하고, 국민의 건강 증진과 평균수명의 연장, 국가적 의료비 절감 등을 도모할 수 있는 중요한 연구의 하나라고 사료된다.

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 서론

삼백초(*Saururus chinensis* Baill)는 삼백초과에 속하는 다년생 초본으로 꽃이 피는 7-8월에 3-4개의 잎이 백색을 띠므로 삼백초라 일컫어 진다. 삼백초는 우리나라, 중국 및 일본 등지에 분포하며, 우리나라에서는 제주도와 남부지방에서 자생 및 재배되고 있다. 또한 삼백초는 예로부터 해독, 소종, 간염 및 황달 등의 치료에 이용되었다. 삼백초의 주성분은 quercetin, quercetrin, isoquercitrin, rutin 및 수용성 tannin 등으로 알려져 있으며, 이중 삼백초의 주성분인 quercetin, quercetrin은 flavonoid의 일종이다. Quercetin은 항균 및 항산화 효과를 나타내는 것으로 알려져 있으며, 최근에서 항암성 및 모세혈관 강화작용 등의 효과들이 알려져 있다. 식물계에 존재하는 천연 항산화제의 대부분은 flavonoid의 일종으로서, 이러한 flavonoid는 지방질의 산화, 활성산소의 소거 및 산화적 스트레스를 막는 역할을 함으로 노화방지, 암 및 심장질환 등을 예방하거나 지연하는 효과를 나타내어 오늘날 식품, 의약품, 화장품 등 많은 분야에서 활용되고 있다. 또한 최근 각종 천연물로부터 항산화성 생리활성 물질은 검색하고 분리하여 그 성분이 flavonoid 화합물임을 구명한 연구들이 각 분야에서 많이 보고되어 있다. 식물체에 존재하는 flavonoid는 항돌연변이 및 항암성을 갖는 것으로 나타났으며, 그 중 quercetin은 항돌연변이, 항암성 뿐만 아니라 동맥경화를 유발할 수 있는 인자인 lipoprotein(LDL)의 산화와 암세포 성장 억제효과도 보고되어 있다.

동맥경화를 일으키는 위험요인으로는 고혈압, 고지혈증, 흡연, 당뇨병, 비만, 운동부족, 스트레스 등에 의하여 유발된 유리산소 라디칼 ($\cdot\text{OH}$, O^{2-} , H_2O_2 , 지질과 산화물라디칼 등)이며 이들에 의한 저밀도단백질 (Low Density Lipoprotein, LDL) 산화물과 macrophage의 포식이 주원인으로 알려져 있다. LDL의 산화는 체내의 활성산소에 의해 야기되므로 천연 항산화제에 의한 LDL의 산화방지가 동맥경화 등의 혈관 순환계 질병 예방 및 치유에 매우 중요한 역할을 한다. 폴리페놀, 플라보노이드, 페놀산, 안토시아닌, 비타민 C, 토코페롤 등은 자연계 중 주로 식물체의 2차대사산물로서 존재하는 천연 항산화 물질로서, 특히 LDL의 산화를 효과적으로

로 억제하여 관련 질병을 예방할 수 있는 중요한 건강기능성 성분이다.

민간차원에서 이용되고 있는 자생식물인 삼백초의 생체 기능 성분과 건강기능 효과의 체계적, 과학적인 연구가 현재까지도 부족하며 활용제품도 재배 농가에서 소규모로 단순가공에 의하여 제조되어 유통되고 있다. 따라서 삼백초 이용 식품을 웰빙 시대에 발맞추어 건강 기능성이 부여, 입증된 건강기능성 식품으로의 연구 개발이 절실히 필요하다.

본 연구진은 이러한 사회적, 시대적 여건과 배경에 근거하여 성인병의 발병 주 원인인 활성산소종과 이로 인한 동맥경화 예방을 목표로 하여 효능이 뛰어난 삼백초의 건강기능성 성분을 분리 및 정제하여 그 화학적 구조를 밝히는 한편, 동물실험을 통하여 삼백초의 동맥경화 효과를 구명하고, 이를 바탕으로 하여 보다 효율적이고 편리하며 부가가치가 높은 삼백초를 원료로 한 건강기능성 제품의 개발에 목표를 두고 연구를 수행하였다.

제 2 절 삼백초의 동맥경화 예방효과 및 기능성 제품 개발

1. 서설

삼백초는 예로부터 여러 가지 치료효과 및 효능이 알려져 있는 식물로서, 우리나라 남부지역에서 중점적으로 재배되는 식물이다. 삼백초는 다양한 생리활성 물질들을 함유하고 있으므로 다양한 특성을 나타낸다. 삼백초의 주성분은 quercetin, quercetrin, isoquercitrin, rutin 등의 플라보노이드로서 활성산소의 소거 및 산화적 스트레스를 막는 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 동맥경화를 일으키는 위험요인으로는 고혈압, 고지혈증, 흡연, 당뇨병, 비만, 운동부족, 스트레스 등에 의하여 유발된 유리산소 라디칼 ($\cdot\text{OH}$, O^{2-} , H_2O_2 , 지질과산화물라디칼 등)이며 이들에 의한 저밀도단백질(Low Density Lipoprotein, LDL) 산화물과 macrophage의 포식이 주원인으로 알려져 있다. 산화된 LDL의 과다한 침착으로 유도된 포말세포는 죽상동맥경화의 초기병변이라고 생각되는 지방반(fatty streak)이나 섬유판(fibrous plaque)의 형성을 야기하며, 또한 산화된 LDL은 국소적인 혈관내피세포와 평활근 세포의 손상을 일으켜 죽상동맥경화의 병변으로 작용하게 된다.

폴리페놀, 플라보노이드, 페놀산, 안토시아닌, 비타민 C, 토코페롤 등의 천연 항산화 물질이 LDL 산화를 유의적으로 억제하는 것으로 보고되고 있으며, 페놀성 화합물의 함량이 높은 녹차 추출물, 적포도주, 포도씨와 껍질 추출물 등이 LDL의 산화를 억제하는 것으로 보고되고 있다. 우리나라에서도 해조류, 곰취, 엉겅퀴, 녹차, 흰민들레, 홍삼 등에 대한 LDL 산화억제 효과가 보고된 바 있다. 따라서 본 연구진은 먼저 삼백초 추출물의 활성산소종 및 LDL의 산화에 대한 효과를 조사하였고, 활성이 강한 획분으로부터 용매분획, 칼럼크로마토그래피, 분취 HPLC를 통하여 동맥예방효과가 있는 물질들을 분리하여 그 화학적 구조를 NMR, MS 등의 기기분석을 통하여 동정하였다.

한편 현재 재배농가에서 단순 가공되어 유통되고 있는 삼백초 제품을 그 효능이 입증된 건강기능성식품으로 개발하기 위하여, 삼백초의 유용성분의 추출조건을 확립하고, 미세캡슐화에 의하여 캡슐, 정제 등의 가공 식품을 개발하였다.

2. 연구수행 방법

가. 시료의 수집 및 처리

삼백초 전초를 삼부농산 소재 농원에서 수집하여 지상부와 지하부로 분리한 후 음건하여 분쇄하여 본 실험의 재료로 사용하였다.

나. 삼백초 조추출물의 조제 및 용매분획

활성 시험용 열수, 에탄올 및 60% 아세톤 추출물은 시료 일정량에 10배 가수하여 12시간씩 실온에서 2회 진탕 추출한 후 감압농축하여 건조시켰다.

다. 삼백초의 동맥경화 예방 활성 검정

1) In vitro 상에서의 활성산소 라디칼 소거활성 시험

가) Hydroxyl radical 소거활성

Hydroxyl radical 소거활성은 2-deoxyribose oxidation법으로 측정하였다. 0.1mM FeSO₄/0.1mM EDTA · 2Na 0.2mL, 10mM 2-deoxyribose 0.2mL, 10mM H₂O₂ 0.2mL를 혼합하고 최종 볼륨이 2mL가 되도록 0.1M Phosphate buffer (pH 7.4)를 가하였다. O-time의 경우 0℃에서, 대조구 및 시료 처리구는 37℃에서 4시간 반응시켰다. 4시간 반응후 2.8% TCA (trichloroacetic acid) 1mL를 가하여 반응을 종료시키고 1% TBA(thiobabituric acid)/50mM NaOH 1mL를 가하여 10 0℃에서 10분간 가열하고 급냉시킨 후 532 nm에서 흡광도를 측정하였다. Hydroxyl 라디칼의 소거능은 아래와 같이 계산하였다.

$$\text{Hydroxyl radical scavenging activity(\%)} = \left(1 - \frac{Abs - A_{bo}}{A_{bc} - A_{bo}}\right) \times 100$$

A_{bo} : Absorbance of O-time at 532 nm

A_{bc} : Absorbance of control at 532 nm

A_{bs} : Absorbance of after sample treatment at 532 nm

나) Superoxide anion 소거활성

Superoxide anion($\cdot O_2^-$) 소거활성은 Xanthine-xanthine oxidase cytochrome c 환원법으로 측정하였다. 즉, 시료 0.2mL, 50mM PBS 완충용액 (pH 7.8) 1.2mL, 1mM xanthine 0.2mL와 0.05mM cytochrome c 0.2mL를 혼합하였다. 여기에 550nm에서 분당 흡광도의 변화가 0.02가 되도록 희석한 xanthan oxidase 0.2mL를 가하여 3분간 흡광도의 변화를 측정하였다. 이때 Superoxide anion 소거능은 아래의 식으로부터 구하였다.

$$\text{Superoxide anion scavenging activity(\%)} = \left(1 - \frac{A_{bs}}{A_{bc}}\right) \times 100$$

A_{bc} : Absorbance of control at 550 nm

A_{bs} : Absorbance of after sample treatment at 550 nm

다) Hydrogen peroxide 소거활성

Hydrogen peroxide 소거활성은 Muller등의 방법에 따라 측정하였다. 시료 일정량을 에탄올에 녹인 후 20 μ L를 취하여 0.1M PBS 완충용액 (pH 5.0) 100 μ L, 0.1mM hydrogen peroxide 20 μ L와 혼합하여 96 micro well plate상에서 37 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응시켰다. 여기에 1.25mM ABTS [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoleine)-6-sulfonic acid] 30 μ L, peroxidase (1 unit/mL) 30 μ L을 가한후 37 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응을 시켰다. 반응이 끝난 microplate를 ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) reader(ELISA Processor II, Behring Co., Germany)를 사용하여 405nm에서 흡광도를 측정하였다. Hydrogen peroxide 소거활성은 다음과 같은 식으로부터 구하였다.

$$\text{Hydrogen peroxide scavenging activity(\%)} = \left(1 - \frac{A_{bs}}{A_{bc}}\right) \times 100$$

A_{bc} : Absorbance of control at 405 nm

A_{bs} : Absorbance of after sample treatment at 405 nm

2) 동맥경화 유발인자 Low-density lipoprotein(LDL)의 산화억제 시험

가) Human LDL의 분리

Human LDL은 건강한 20대 여성으로부터 채혈한 후 다음과 같은 방법으로 시행하였다. 혈액 50 mL를 4°C에서 3시간 방치한 후 3,000 rpm에서 원심분리한 후 분리된 상층 1mL에 EDTA/NaN₃/phosphate buffer (pH 7.4) 0.5mL와 NaCl/phosphate buffer (d=1.006) 2mL를 첨가하여 14°C에서 초원심분리기 (ultracentrifuger optima TLX, Beckman Co., USA)로 44,000 rpm에서 16시간 원심분리하여 VLDL을 분리하였다. VLDL을 제거하고 남은 하층 2mL에 NaBr/phosphate buffer (d=1.006) 2mL를 첨가하여 14°C에서 44,000 rpm으로 20시간 원심분리하여 LDL을 분리하였다. 분리된 LDL은 0.15M NaCl, 10mM PBS(phosphated buffered saline, pH 7.0)으로 48시간 투석하여 EDTA를 제거하였다. 분리된 LDL은 0.22 μ m membrane filter로 여과한 후 4°C에서 일주일간 보관하면서 실험에 사용하였다.

나) LDL의 산화

PBS로 희석한 LDL (0.1 mg protein/mL) 200 μ l에 10 μ M CuSO₄ 또는 5mM AAPH(2,2'-azobis[2-amidinopropane] dihydrochloride) 100 μ l, DMSO에 녹인 시료 10 μ l를 혼합하여 37°C에서 배양하여 산화를 유도하였으며, 1mM EDTA 1mL, 1mM BHT 1mL를 가하여 반응을 중지하였다.

다) LDL 산화 생성물의 측정

(가) Thiobarbituric acid reacting substance(TBARS)

LDL의 산화에 의해 생성된 산화지질의 양은 Hermann 등의 방법을 변형하여 TBARS로 측정하였다. 산화 LDL 용액에 25% TCA 1mL를 가하여, 10,000 rpm으로 원심분리하여 단백질을 침전시키고, 상등액 1 mL에 1% TBA 1mL를 가하여 100°C에서 10분간 가열한 후 532nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군에 대한 시료 첨가구의 산화 억제 활성은 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{Inhibitory effect on LDL oxidation (\%)} = \left(1 - \frac{A_{bs}}{A_{bc}}\right) \times 100$$

A_{bc} : Absorbance of control at 532 nm

A_{bs} : Absorbance of after sample treatment at 532 nm

(나) Conjugated diene 함량 측정

LDL의 산화에 의해 생성된 conjugated diene 의 측정은 Esterbau 등의 방법에 따라 측정하였다. 즉, 37°C에서 반응시킨 LDL에 클로로포름 2mL와 메탄올 1mL를 가하여 1,000rpm에서 원심분리하여 상층은 버리고 하층 2mL를 취하였다. 하층을 질소로 용매로 제거한 후 cyclohexane 1.5mL에 용해시킨 후 234nm에서 8시간 동안 경시적으로 흡광도를 측정하여 대조군과 비교하였다.

라) apo B 100 fragment 측정

산화 LDL 용액을 10% SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)에 전개 시킨 후 apo B 100의 분해를 관찰하였다. 전기영동 용매는 SDS-Tris glycine 완충용액 (0.025 M tris[hydroxymethyl]aminomethane, 0.192 M glycine, 0.1% SDS, pH 8.3)을 사용하였으며, bromophenol blue를 tracking dye로 하여 150mA로 4시간 전기영동하였다. 전기영동 후 Coomassie brilliant blue R-250 용액으로 12시간 염색하였으며, 탈색은 50% 메탄올과 10% 초산을 함유한 1차 탈색 액으로 2~4시간 탈색한 후, 7% 초산과 10% 메탄올을 함유한 2차 탈색액으로 12시간 탈색하였다.

라. 동맥경화 예방 성분의 분리 및 정제, 화학적 구조 결정

1) 용매 분획

삼백초 지상부 및 지하부로부터 항산화 물질의 추출, 분리 과정은 Fig. 1 및 Fig. 6과 같다. 건고된 조추출물을 용매극성에 따라 디에틸에테르, 에칠아세테이트, 물층으로 나누었으며 각 획분의 일정량을 감압 농축하여 활성 시험용 시료로 사용하였다.

2) Column chromatography에 의한 분리

가) Sephadex LH-20 column chromatography

삼백초 분획을 Sephadex LH-20 column (Φ 2.5×30 cm)을 장착한 MPLC (moderate pressure liquid chromatography, TrisTM model 160, ISCO Co., USA)을 이용하여 분당 1mL의 속도로 10 mL씩 분취하였다.

나) Silica gel column chromatography

Silica gel G 60을 클로로포름 / 메탄올 / 물(70 / 30 / 10, v/v/v, 하층)로 평형화를 시킨 후 open column (Φ 3.0×60 cm)에 충전하였다. 용출은 메탄올의 양을 증가시키면서 클로로포름/메탄올/물의 비율을 75/25/10 (v/v/v)에서 60/40/10 (v/v/v)로 순차적으로 분당 1.5mL의 속도로 용출시키면서 50mL씩 분취하였다.

3) Prep HPLC에 의한 분리 및 정제, 정량

칼럼으로 분취한 획분에 대하여 활성이 가장 우수한 획분을 분취용 column (Develosil ODS HG-5, Φ 20×250 mm)을 사용하여 HPLC (high performance liquid chromatograph, LC-10A, Shimadzu Co., Japan)로 분리·정제하였다. 분리된 성분은 분석용 HPLC column (Develosil ODS-5, Φ 4.6×250 mm) 및 TLC (thin layer chromatography)로 단일성분임을 확인하고 구조 동정을 하였다.

4) Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy

분리된 물질 10mg을 DMSO-d₆ 또는 methanol-d₄에 용해한 후 TMS(tetramethylsilane)를 내부표준물질로 하여 H-NMR (500 MHz)과 C-NMR (125 MHz)의 spectrum을 AMX-500 Spectrometer (Varian Unity PLUS, Varian, USA)를 사용하여 상온에서 분석하였다. 구조분석은 화학적 이동값 (ppm)을 통해 확인하였다.

마. 삼백초 기능 성분의 효율적 추출 조건

1) 재료

본 실험에 사용한 삼백초(지상부)는 삼부농산에서 2002년 5월에 생산된 것을 공급받아 사용하였다. quercetrin(Sigma Co., U.S.A) 및 quercetin(Sigma Co., U.S.A)을 표품으로 사용하였으며, 그 외 분석용으로 사용한 Methanol(J.T. Baker, U.S.A) 및 Trifluoroacetic acid(ACROS, U.S.A)은 특급을 사용하였다.

2) 수율

각 조건에서 얻어진 삼백초추출물의 총 추출수율은 추출액 10mL를 항량을 구한 수기에 취하여 105℃에서 증발 건조시켜 그 무게를 측정하여 추출수율(%)을 나타내었다.

3) 전자공여능 측정

삼백초 추출물의 DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)라디칼에 대한 소거활성은 에탄올 적정량에 시료 0.2mL와 4×10^{-4} M DPPH용액 0.8mL을 가하여 10초간 혼합하고 10분간 방치한 후 525nm에서 흡광도를 측정하여 대조구와 비교하였고, DPPH 라디칼 소거능은 아래와 같이 계산하였다.

$$\text{DPPH radical scavenging activity(\%)} = \left(1 - \frac{A_{bs}}{A_{bc}}\right) \times 100$$

A_{bc} : Absorbance of DPPH solution without sample at 525 nm

A_{bs} : Absorbance of DPPH solution with sample at 525 nm

4) 총페놀함량

총페놀 함량은 Prussian blue법으로 측정하였다. 추출한 삼백초 100 μ L에 증류수 3mL, 0.016M $K_3Fe(CN)_6$ 1mL, 0.01M $FeCl_3/0.1N$ HCl 1mL를 혼합하여 강하게 진탕한 후 실온에서 15분간 방치하고, stabilizer (H_2O : 1% gum arabic : 85% phosphoric acid=3:1:1, v/v/v) 5mL를 첨가한 후 700nm에서 흡광도를 측정하였다. 총페놀 함량은 gallic acid를 이용하여 검량곡선을 작성하고 gallic acid에 대한 당량으로 환산하였다.

5) 총플라보노이드 함량

총플라보노이드 함량은 추출한 삼백초 1mL에 diethylene glycol 10mL, 1N NaOH 1mL를 넣고 강하게 진탕한 후 37℃ 항온기에서 1시간 정치한 후 420nm에서 흡광도를 측정하였다. 총플라보노이드 함량은 naringin을 사용하여 검량곡선을 작성하고 naringin에 대한 당량으로 환산하였다.

6) 삼백초 추출물의 플라보노이드 성분 분석

삼백초 추출액의 quercetin, quercetrin함량은 10mL를 취하여 농축한 후 75% Ethanol 50mL를 첨가하여 실온에서 추출한 후, HCl로 2.5N 되게 조절하여 80℃ 항온수조에서 40분간 가수분해 한 후 0.22µm membrane filter로 여과한 후 HPLC로 분석하였으며, 조건은 Table 1과 같다.

Table 1. Conditions for operating HPLC in the analysis of quercetin and quercetrin.

Items	Conditions
Instrument	LC-10A (Shimadzu Co., Japan)
Column	ODS-HG5
Mobile phase	60% MeOH / 0.1% TFA
Flow rate	0.7mL/min
Injection volume	10µL
Wave length	UV 370 nm

바. 삼백초를 이용한 음료 개발

1) 재료

본 연구의 실험 재료인 삼백초(*Saururus chinensis* Baill)는 삼부농산에서 재배한 것으로 지상부와 지하부를 각각 1cm 내외로 절단하여 열풍 건조시킨 후은 뿌리와 잎을 사용하였다. 파우치 제조에 사용된 계피와 인삼은 대구약령시장에서 구입하여 절단(1cm ×1cm 내외)후 사용하였다.

2) 삼백초의 배합비율 설정실험

가) 원적외선 추출

원적외선 추출장치는 할로겐램프가 장착되어 원적외선 열에너지를 발생시키는 원적외선기(MEX-10000, Koryo Eng., Korea)를 사용하여 추출시간 및 온도를 조절한 후 사용하였다.

나) 삼백초 지상부 및 지하부의 혼합비율

삼백초의 지상부와 지하부의 혼합비율을 각각 5개(지상부 : 지하부 0:100, 20:80, 50:50, 80:20, 100:0) 구간으로 설정하여 추출온도는 100℃, 추출시간은 4시간 및 시료 대 용매(물)비는 1:10으로 고정하여 원적외선 추출기로 추출하였으며, 이화학적 특성을 조사하는 시료로 사용하였다.

다) 수율

각 조건에서 얻어진 삼백초추출물의 총 추출수율은 추출액 10mL를 항량을 구한 수기에 취하여 105℃에서 증발 건조시켜 그 무게를 측정하여 추출수율(%)을 나타내었다.

라) 전자공여능 측정

삼백초 추출물의 DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)라디칼에 대한 소거활성은 에탄올 적정량에 시료 0.2mL와 4×10^{-4} M DPPH용액 0.8mL을 가하여 10초간 혼합하고 10분간 방치한 후 525nm에서 흡광도를 측정하여 대조구와 비교하였고, DPPH 라디칼 소거능은 아래와 같이 계산하였다.

$$\text{DPPH radical scavenging activity(\%)} = \left(1 - \frac{A_{bs}}{A_{bc}}\right) \times 100$$

A_{bc} : Absorbance of DPPH solution without sample at 525 nm

A_{bs} : Absorbance of DPPH solution with sample at 525 nm

3) 원적외선 가열추출시간 설정 실험

삼백초 원적외선 가열추출시간 설정을 위해 추출온도를 100℃로 고정하고 추출시간을 1, 2, 3, 4, 5 시간의 5구간으로 설정하여 추출하였고, 90℃, 4시간 열수추출한 삼백초 추출액과 수율, 전자공여능 및 페놀함량의 차이를 조사하였다.

4) 원적외선 삼백초 음료의 제조

가) 원적외선 추출

삼백초(지상부 : 지하부, 80 : 20), 인삼 및 계피를 추출온도는 100℃, 추출시간은 1시간, 용매(물)비 1:10으로 고정하여 원적외선 추출기로 추출하였다.

나) 음료 배합을 위한 실험계획

삼백초 음료를 제조하기 위한 배합비 설정을 위해 중심합성계획에 의해 조건을 설정하였다. 중심합성계획법에 따라 인삼의 농도 (0, 2.5, 5.0, 7.5, 10 %) 계피의 농도 (0, 5, 10, 15, 20 %)를 -2, -1, 0, 1, 2 다섯 단계로 부화화하여 Table 2 과 같이 설계하였다.

다) 배합음료의 이화학적 특성조사

원적외선 추출한 삼백초, 인삼 및 계피를 이용하여 혼합한 음료에 대해 전자공여능 활성 및 총페놀 함량을 측정하였다.

라) 최적 배합 조건 설정

최적 배합 조건은 SAS (Statistical analysis system) program을 이용하여 설정하였다.

Table 2. Central composite design RSM computer program for the optimization of recipe conditions for effective components from *Saururus chinensis*, *Panax ginseng* and *Cinnamomum cassia* extraction content

Experiment number ¹⁾	Recipe conditions	
	<i>Panax ginseng</i> extract contents (%)	<i>Cinnamomum cassia</i> extract contents (%)
1	7.5(1)	15(1)
2	7.5(1)	5(-1)
3	2.5(-1)	15(1)
4	2.5(-1)	5(-1)
5	5(0)	10(0)
6	5(0)	10(0)
7	10(2)	10(0)
8	0(-2)	10(0)
9	5(0)	20(2)
10	5(0)	0(-2)

¹⁾ The number of experimental condition by central composite design.

사. 삼백초를 이용한 미세캡슐화

1) 재료

본 실험에 사용한 삼백초 지상부는 삼부농산에서 생산된 것을 공급받아 사용하였으며, 삼백초 지상부 중량에 40%에탄올 용액을 10배 가수하여 90℃에서 4시간 동안 추출하여 여과한 후 미세캡슐화의 시료로 사용하였다.

2) 삼백초 40%에탄올 추출물의 품질 특성

가) 무기질 조성 분석

삼백초 지상부 추출물을 농축하여 건조한 후 550℃에서 건식회화, 방냉한 후 증류수를 적시고 HCl : H₂O (1:1)용액 10mL를 가하여 용해시켰다. 이를 water bath상에서 증발건고시키고 HCl : H₂O (1:3)용액 10mL를 가하여 여과한 후 증류수 10mL로 정용하여 분석용액으로 하였다. Ca, Mg, Fe, Cu, P, Na, K, S 등은 ICP (Iris Intrepid. Thermo Elemental, UK)로 A393.366, A279.088, A259.950, A324.768, A214.914, A181.975, A589.586, A766.486에서 각각 분석하였다.

나) 유리당 조성분석

유리당 조성분석은 삼백초 40% 에탄올 용액 200mL를 환류냉각기가 부착된 heating mental에서 80℃, 2시간 반복 추출한 후 Whatman No. 2로 여과하였다. 여과액은 hexane으로 지질을 제거하고 40℃에서 진공 농축한 후 HPLC (Waters 2414, Waters, USA)분석용 사용하였다. 이때 column은 carbohydrate column(ID 3.96×300mm, Waters Co., USA)을 사용하였으며, column oven온도는 30℃, mobile phase는 85% : 15% acetonitrile : water flow rate는 2.0 mL/min, 시료주입량은 20 μ 의 조건으로 RI detector (Model 2414, Waters Co., USA)에서 검출하였다.

다) 유기산 분석

유기산 조성분석은 삼백초 40% 에탄올 용액 200mL를 환류냉각기가 부착된 heating mental에서 80℃, 2시간 반복 추출한 후 Whatman No. 2로 여과하였다. 여과액은 hexane으로 지질을 제거하고 40℃ 진공 농축 건조한 후 증류수를 5mL로 정용한 다음 Sep-pak C₁₈을 통과하여 0.45 μ m membrane filter로 여과한 후 HPLC(Waters 2695, Waters, USA)로 분석하였다. 이때 column은 Shimadzu SCR-101H(7.9×30 mm)를 사용하였으며, column 온도는 30℃, 이동상은 0.1% phosphoric acid, 유속은 0.6mL/min, 검출기는 PDA(Waters 2996, Waters, USA)로 215nm에서 분석하였다.

라) 유리아미노산 분석

유리 아미노산은 삼백초 40% 에탄올 용액 200mL를 환류냉각기가 부착된 항온수조에서 80℃, 2시간 반복추출한 후 Whatman No. 2로 여과하였다. 여과액은 hexane으로 지질을 제거하고 40℃ 진공 농축 건조 후 0.2 M Sodium citrate buffer (pH 2.2)용액 5mL로 정용하고, Sep-pak C₁₈으로 처리한 후 0.45 μm membrane filler로 재여과하여 automatic amino acid analyzer (Pharmacia Biotech Co., Model Biochrom-20, Swiss)로 분석하였다. 이때 칼럼은 Na form column(18종 분석용)으로 분석하였다.

3) 미세캡슐화

삼백초 지상부 추출물에 부용제로 cyclodextrin, arabic gum, dextrin을 각각 10%씩 첨가하여 용해시킨 후 분무건조기(B-191, Buchi, Swiss)를 이용하여 inlet temperature 180℃, aspirator 50%, flow 20%에서 분말화하였다.

4) 점도

미세캡슐화를 위한 부용제의 첨가후 용액의 점도는 점도계(viscometer, Brookfield Model, U.S.A.)를 사용하였다. 이때 Spindle은 1을 사용하였으며, 25℃, 100 rpm에서 점도를 측정하였다.

5) 수분함량

삼백초 지상부 추출물의 미세캡슐화 이후 만들어진 분말에 대한 수분함량은 적외선 수분측정기(FD-240, Kett Co., Japan)를 이용하여 105℃에서 무게 변화가 없을때 까지 건조하여 측정하였다.

6) 용해성

미세캡슐화된 삼백초 분말을 2.5g 취하여 50mL의 증류수를 넣은 원심분리관에 서 분리시키고 실온에서 30분 받치한 다음 5,000rpm에서 10분간 원심분리하였다. 상등액은 미리 항량을 구한 수분정량 수기에 넣어 고형분량을 구하여 용해성을 산출하였다.

7) 흡습성

삼백초 지상부 추출물의 미세캡슐화 이후 만들어진 분말에 대한 흡습성은 분말 1g을 취하여 온도 25℃ 및 습도 95%로 조절된 항온항습기에 3시간 방치한 뒤 흡습된 수분량을 측정하여 분말식초의 흡습정도를 측정하였다.

8) 색도

삼백초 분무건조 분말의 색도는 색차계(CR-200 Model, Minolta Co., Japan)을 이용하여 백색도, 적색도, 황색도를 측정하였으며, 이 때 사용한 표준백판의 색도는 L=97.55, a=-0.55, b=+3.06 이었다.

9) 전자공여능 측정

삼백초 추출물의 DPPH (α,α -diphenyl- β -picrylhydrazyl)라디칼에 대한 소거활성은 에탄올 적정량에 시료 0.2mL와 4×10^{-4} M DPPH용액 0.8mL을 가하여 10초간 혼합하고 10분간 방치한 후 525nm에서 흡광도를 측정하여 대조구와 비교하였고, DPPH 라디칼 소거능은 아래와 같이 계산하였다.

$$\text{DPPH radical scavenging activity(\%)} = \left(1 - \frac{A_{bs}}{A_{bc}}\right) \times 100$$

A_{bc} : Absorbance of DPPH solution without sample at 525 nm

A_{bs} : Absorbance of DPPH solution with sample at 525 nm

10) 주사전자현미경 관찰

분말의 형태를 관찰하기 위하여 주사전자 현미경(scanning electron microscopy, S-570 Model, Japan)을 이용하였다. 준비된 시료를 금으로 코팅한 후 주사전자 현미경에서 1000배와 5000배로 분말의 형태를 관찰하였다.

아. 삼백초를 이용한 캡슐 및 정제

1) 캡슐의 제조

삼백초 미세캡슐화 분말을 이용하여 공캡슐 0호 및 1호에 반자동 캡슐 제조기(Semi-automatic capsule machine, 대신기계공업, Korea)를 이용하여 삼백초 캡슐을 제조하였다.

2) 정제의 제조

삼백초 타블렛은 우선 삼백초 미세캡슐화 분말에 유당과 옥수수 전분을 혼합하여 60℃에서 24시간 건조한 다음 40 mesh의 과립을 제조한 후 스테아린마그네슘과 탈크를 혼합하여 타블렛 제조장치를 이용하여 제조하였다.

자. 삼백초 제품의 활성 검증

1) 색도

삼백초 분무건조 분말의 색도는 색차계(CR-200 Model, Minolta Co., Japan)을 이용하여 백색도, 적색도, 황색도를 측정하였으며, 이 때 사용한 표준백판의 색도는 L=97.55, a=-0.55, b=+3.06 이었다.

2) 중량편차 및 붕해시험

제조된 삼백초 캡슐과 정제 무게를 측정하여 표준 평균 무게를 구하였다. 붕해 시험은 붕해시험장치(Disintegration, J-MA Model, JISICO)를 이용하여 37℃에서 30rpm으로 조정된 후 삼백초 제품이 완전히 붕해되는 시간을 측정하였다.

3) 전자공여능 측정

삼백초 추출물의 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)라디칼에 대한 소거활성은 에탄올 적정량에 시료 0.2mL와 4×10^{-4} M DPPH용액 0.8mL을 가하여 10초간 혼합하고 10분간 방치한 후 525nm에서 흡광도를 측정하여 대조구와 비교하였고, DPPH 라디칼 소거능은 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{DPPH radical scavenging activity(\%)} = \left(1 - \frac{A_{bs}}{A_{bc}}\right) \times 100$$

A_{bc} : Absorbance of DPPH solution without sample at 525 nm

A_{bs} : Absorbance of DPPH solution with sample at 525 nm

4) 총페놀함량

총페놀 함량은 Prussian blue법으로 측정하였다. 추출한 삼백초 100 μ L에 증류수 3mL, 0.016M $K_3Fe(CN)_6$ 1mL, 0.01M $FeCl_3/0.1N$ HCl 1mL를 혼합하여 강하게 진탕한 후 실온에서 15분간 방치하고, stabilizer (H_2O : 1% gum arabic : 85% phosphoric acid=3:1:1, v/v/v) 5mL를 첨가한 후 700nm에서 흡광도를 측정하였다. 총페놀 함량은 gallic acid를 이용하여 검량곡선을 작성하고 gallic acid에 대한 당량으로 환산하였다.

5) LDL 산화 생성물의 측정(TBARS)

Human LDL은 건강한 20대 여성으로부터 채혈한 후 분리된 LDL은 0.15M NaCl, 10mM PBS(phosphated buffered saline, pH 7.0)으로 48시간 투석하여 EDTA를 제거하여 0.22 μ m membrane filter로 여과한 후 4 $^{\circ}$ C에서 일주일간 보관하면서 실험에 사용하였다. LDL의 산화는 다음과 같이 진행하였다. PBS로 희석한 LDL (0.1 mg protein/mL) 200 μ L에 10 μ M $CuSO_4$ 또는 5mM AAPH(2,2'-azobis[2-amidinopropane] dihydrochloride) 100 μ L, DMSO에 녹인 시료 10 μ L를 혼합하여 37 $^{\circ}$ C에서 배양하여 산화를 유도하였으며, 1mM EDTA 1mL, 1mM BHT 1mL를 가하여 반응을 중지하였다.

LDL의 산화에 의해 생성된 산화지질의 양은 Hermann 등의 방법을 변형하여 TBARS로 측정하였다. 산화 LDL 용액에 25% TCA 1mL를 가하여, 10,000 rpm으로 원심분리하여 단백질을 침전시키고, 상등액 1 mL에 1% TBA 1mL를 가하여 100 $^{\circ}$ C에서 10분간 가열한 후 532nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군에 대한 시료 첨가구의 산화 억제 활성은 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{Inhibitory effect on LDL oxidation (\%)} = \left(1 - \frac{A_{bs}}{A_{bc}}\right) \times 100$$

A_{bc} : Absorbance of control at 532 nm

A_{bs} : Absorbance of after sample treatment at 532 nm

3. 연구수행 결과

가. 삼백초 지상부로부터 동맥경화 예방 물질 분리와 활성

삼백초 지상부로부터 동맥경화예방 물질을 분리하기 위하여 Fig. 1과 같은 분리 공정으로 실험을 진행하였다. 먼저 삼백초 지상부를 음건하고 조쇄한 분말 250g을 chloroform으로 탈지 한 후, 60% acetone으로 2회 추출하여 조추출물을 조제하고 용매의 극성에 따라 순차적으로 diethyl ether, ethyl acetate의 순으로 분획하였다. 이들 용매 획분 중 활성이 뛰어난 ethyl acetate획분을 다시 SiO₂, Sephadex LH-20 칼럼 크로마토그래피를 행하였으며, 활성이 우수한 분획에서 분취 HPLC로 각각 3개의 단일 성분을 분리, 정제하였다.

그리고 조추출물 및 각 획분의 $\cdot\text{OH}$, H₂O₂, O₂⁻ 등의 활성산소종 소거활성 및 LDL 산화억제 활성을 측정한 결과를 Table 3에 나타내었다. DPPH radical 소거활성의 경우 60% acetone 조추출물과 ethyl acetate 획분에서 각각 92.7%, 93.4%로써 높은 활성을 보였으며 superoxide anion 소거활성은 diethyl ether, ethyl acetate에서 각각 86.88%, 73.77% 정도의 활성을 보였다. 이들 획분의 사람의 혈청에서 분리한 LDL에 대하여 산화억제 효과를 TBA 방법으로 실험해 본 결과 diethyl ether, ethyl acetate 획분에서 각각 61.8, 51.4%의 높은 활성을 보였다.

아래의 Table 3에서와 같이 삼백초 지상부의 용매 분획별 radical 소거활성을 ethyl acetate, diethyl ether, 60% acetone 조추출물, 물층의 순으로 나타내었다. 각 획분별로 LDL 산화억제효과를 실험해 본 결과 diethyl ether 획분에서 가장 높은 억제효과를 보였다.

따라서 삼백초의 60% acetone 조추출물로부터 용매분획한 획분 중 활성이 뛰어난 diethyl ether 획분 중의 항산화 성분을 분리하기 위하여 sephadex LH-20을 행한후 fr. III 로부터 분석용 HPLC column을 이용하여 2개의 주요 peak를 확인하고 이를 각각 SC 3, SC 4 로 명명하고, 분취용 HPLC 로 이 두 물질을 분리하고 정제하였다.

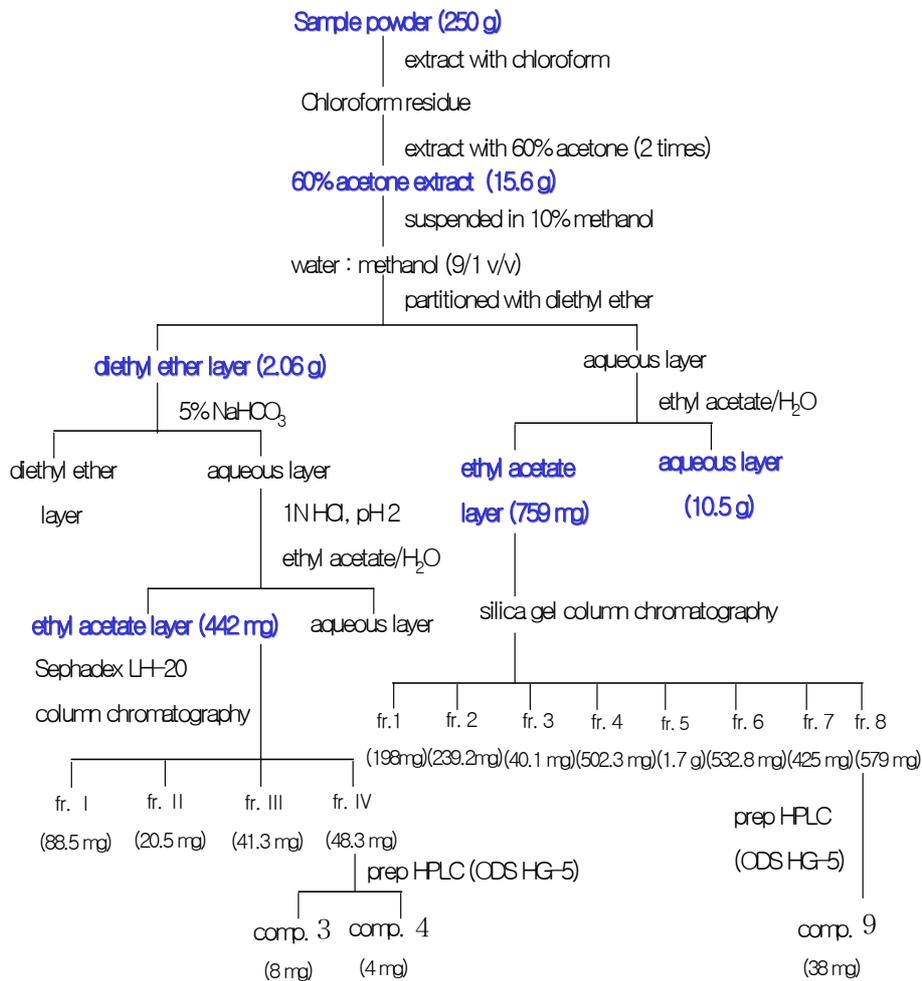


Fig. 1. Extraction, isolation and purification schemes of active compounds from the aerial parts of *Saururus chinensis*.

Table 3. Reactive oxygen radical scavenging activities and LDL oxidation inhibition effect of each solvent fraction from the aerial parts of *Saururus chinensis*.

	Scavenging activity (%)				
	DPPH	SO	H ₂ O ₂	•OH	LDL
60% acetone	92.7	4.98	90.07	76.21	55.23
diethyl ether	70.4	86.88	81.35	83.98	61.80
ethyl acetate	93.4	73.77	88.39	87.93	58.39
water	64.8	39.34	79.28	71.90	38.68
BHA	90.66	12.36	30.70	78.83	74.6

Test solution: DPPH, SO, LDL : 100 ppm, H₂O₂: 500 ppm, •OH: 1ppm

* SO: Superoxide anion radical, •OH: Hydroxyl radical, LDL : LDL oxidation by CuSO₄

또한 활성이 뛰어난 ethyl acetate 획분으로부터 silica gel column chromatography를 행하여 TLC를 통해 모두 8개의 획분으로 구분하였다. 각 획분의 reactive oxygen species 소거활성을 측정된 결과는 Table 4 과 같다. DPPH(전자공여능)활성에서 모두 90%이상의 높은 활성을 나타내었으며, fr2 및 fr7이 96%이상의 가장 높은 활성을 나타내었다. Superoxide anion radical 소거 활성에서는 fr. 8이 61.29%로 가장 높은 활성을 나타내었으며, fr. 3이 54.83%로 높은 활성을 나타내었다. H₂O₂ 소거 활성에서는 fr. 8이 43.06%의 활성으로 가장 높은 소거 활성을 나타내었으며, Hydroxyl radical 소거활성에서는 fr. 8이 78.83%의 가장 높은 활성을 나타내었으며, fr. 3이 71.42%의 높은 활성을 나타내는 것으로 나타났다. 활성산소에 대한 소거활성을 종합적으로 살펴본 결과 fr. 8 이 가장 높은 활성을 나타내는 것으로 나타났다. 이에 활성이 가장 강한 fr. 8을 HPLC로 분석한 결과 1개의 주요 peak를 확인하고 이를 SC 9로 명명하였다. 분리된 peak를 분리·정제하기 위하여 분취용 ODS 5-HG column을 이용하여 HPLC로 분취하였다.

Table 4. Reactive oxygen radical scavenging activity of silica gel column chromatography fraction of the aerial parts of *Saururus chinensis*

	Scavenging activity (%)			
	DPPH	SO	H ₂ O ₂	•OH
fr. 1	93.83	23.11	37.57	68.25
fr. 2	96.82	36.55	34.85	56.08
fr. 3	95.55	54.83	33.91	71.42
fr. 4	95.74	19.89	18.29	55.55
fr. 5	95.75	54.83	38.59	67.19
fr. 6	94.85	44.08	40.33	47.61
fr. 7	96.25	39.24	36.63	56.08
fr. 8	92.05	61.29	43.06	67.72
BHA	90.66	12.36	30.70	78.83

* Test solution: DPPH, SO, H₂O₂: 500 ppm, •OH: 1ppm

* SO: Superoxide anion radical, •OH: Hydroxyl radical, LDL : LDL oxidation by CuSO₄

나. 삼백초 지상부에서 분리한 활성 성분의 화학적 구조분석

삼백초 지상부로부터 용매분획, SiO₂ 칼럼, Sephadex LH-20칼럼 크로마토그래피와 분취 HPLC를 이용하여 분리한 화합물의 화학적 구조를 ¹H, ¹³C-NMR 및 MS로 분석하고 동정하였다.

아래의 Table 5은 분리된 SC 3, SC 4, SC 9의 ¹H, ¹³C-NMR spectrum을 나타낸 것이다. SC 3와 SC 4는 ¹H-NMR spectrum 상에서 유사한 패턴을 보였으며, 이들이 전형적인 flavonol glycoside임을 보여주고 있다. 즉 당의 anomeric proton이 5 ppm 부근, 3 ~ 4 ppm에서 당의 다른 proton 들을 추정할 수 있었다. 또한 ¹H-NMR에서 각각 0.82, 0.79 ppm에서 3H의 peak를 확인하여 당이 rhamnose임을 추정하였다. 따라서 ¹³C-NMR의 chemical shift 치를 문헌지와 비교하고, 17ppm부근에서 rhamnose의 메틸기(-CH₃)를 확인하여, 이들을 각각,

quercetin-3-O- β -L-rhamnoside, kaempferol-3-O- β -L-rhamnoside로 동정하였다. SC 9는 $^1\text{H-NMR}$ spectrum 상에서 3-4ppm 부분을 제외하고는 유사한 패턴을 보였으며, 따라서 $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼을 문헌치와 비교 분석하여, quercetin-3-O-rutinoside로 동정하였다. 이들 분리 및 정제된 화합물의 FAB-MS 분석을 실시한 결과 SC 3는 분자량이 432인 $\text{C}_{21}\text{O}_{10}\text{H}_{20}$, SC 4는 분자량이 448인 $\text{C}_{21}\text{O}_{11}\text{H}_{20}$, SC 9는 분자량이 611로서 $\text{C}_{27}\text{O}_{16}\text{H}_{31}$ 로서 NMR 분석 결과와 일치하였다. 이들 화합물의 구조식은 Fig. 2에 나타내었다.

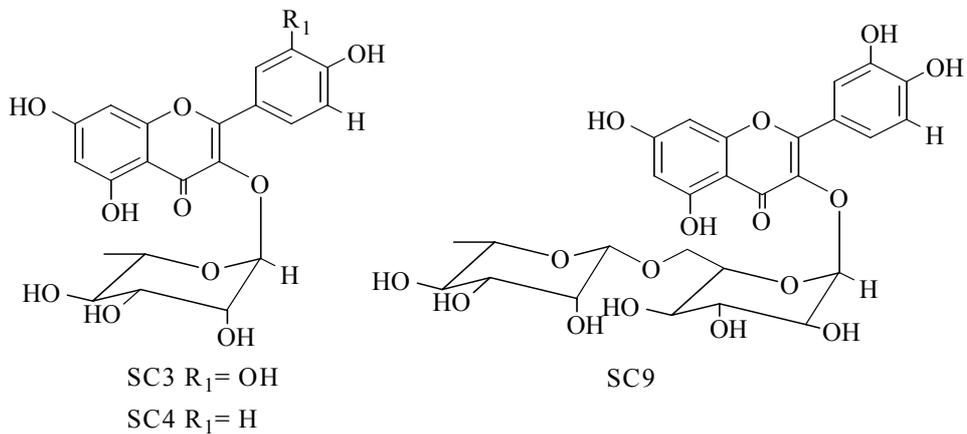


Fig. 2. The chemical structures of compounds isolated from the aerial parts of *Saururus chinensis*

Table 5. Chemical shift values of the compounds isolated from the aerial parts of *Saururus chinensis*

Position	SC3			SC4			SC9		
	¹³ C	¹ H		¹³ C	¹ H		¹³ C	¹ H	
2	156.5			159.3			158.9		
3	134.2			136.2			136.9		
4	177.7			179.7			180		
5	161.3			161.6			163.5		
6	98.7	6.2	(1H, d, J=2.0)	99.9	6.14	(1H, d, J=2.0)	100.4	6.19	(1H, s)
7	164.3			163.3			166.5		
8	93.7	6.38	(1H, d, J=1.5)	94.8	6.33	(1H, d, J=2.0)	95.2	6.37	(1H, s)
9	157.2			158.6			159.6		
10	104.04			106.0			107.5		
1'	120.7			122.7			123.3		
2'	115.6	7.3	(1H, d, J=8.0)	131.9	7.74	(2H, d, J=8.5)	116.9	7.35	(1H, s)
3'	145.2			116.6	6.9	(2H, d, J=9.0)	146.9		
4'	148.4			159.3			150.3		
5'	115.6	6.86	(1H, d, J=8.0)	116.6	6.9	(2H, d, J=9.0)	117.3	6.92	(1H, d, J=8.4)
6'	121.1	7.25	(1H, dd, J=8.4, 1.9)	131.9	7.74	(2H, d, J=8.5)	123.3	7.32	(1H, d, J=8.1)
G1	101.84	5.25	(1H, d, J=2.0)	103.5	5.29	(1H, d, J=2.0)	106.2	5.6	(1H, s)
G2	70.5	3.97	(1H, t)	72.0	3.97	(1H, dd, J=5, 2)	75.7	3.41	(1H, m)
G3	70.6	3.5	(1H, dd, J=3,3)	72.2	3.6	(1H, dd, J=9, 2)	83.2	3.4	(1H, m)
G4	71.18	3.2-3.3	(1H, t,)	73.2	3.1-3.2	(1H, t,)	71.1	3.22	(1H, t)
G5	70.07	3.2-3.3	(1H, m)	71.9	3.1-3.2	(1H, m)	78.2	3.32	(1H, m)
G6a	17.51	0.82	(3H, d, J=6.0)	17.7	0.79	3H, d, J=6.0)	62.6	3.8	(1H, d, J=9.6)
G6b								3.36	(1H, m)
G1'							100.4	4.39	(1H, s)
G2'							72.2	3.56	(1H, dd, J=1.8, 3.5)
G3'							72.4	3.48	(1H, m)
G4'							73.9	3.25	(1H, t)
G5'							71.1	3.42	(1H, m)
G6'							18.1	0.98	(3H, d, J=6.24)

다. SDS-PAGE에 의한 LDL apo B 100 산화 억제 활성

혈액 내에서 지방 운반과 대사에 깊이 관여하고 있는 지단백질 중, LDL은 밀도가 1.019~1.063, 직경이 180~280 Å으로 인지질과 apoprotein이 입자의 표면을 형성하고, 소수성의 cholesteryl ester, cholesterol, triglyceride가 안쪽의 core 부분을 이루고 있다. LDL을 구성하는 apoprotein은 98% 이상이 apoprotein B (apo B) 100이며 혈관에서 cholesterol의 조절 및 대사에 직접 관여하며 LDL-receptor에 결합할 수 있는 ligand로 작용한다. 체내에서 생성된 활성산소종에 의하여 산화된 LDL 그 수용체와 결합하지 못하게 되고 단핵세포와 macrophage에 의하여 동맥혈관에 쉽게 이행된다. 산화된 LDL의 과다한 침착으로 유도된 포말세포는 죽상동맥경화의 초기병변이라고 생각되는 지방반 (fatty streak)이나 섬유판 (fibrous plaque)의 형성을 야기시킬 수 있다. 또한 산화된 LDL은 높은 세포내 화학적 독성을 지님으로서 국소적인 혈관내피세포와 평활근 세포의 손상을 일으켜 죽상동맥경화의 병변으로 작용할 수 있다. 따라서 본 실험에서는 죽상동맥경화의 원인이 되는 LDL을 건전한 여성의 혈액으로부터 분리하고, 이들을 인위적으로 CuSO₄를 이용하여 산화시키고 분리한 화합물의 산화억제 활성을 조사하여 삼백초 지상부의 동맥경화 예방활성을 나타내고자 하였다.

먼저, Fig. 3은 LDL의 산화에 따라 형성되는 conjugated diene의 생성을 조사한 것으로 대조구에 비하여 분리한 성분 들이 tocopherol과 유사한 정도로 LDL의 산화에 따른 conjugated diene의 생성을 억제함을 볼 수 있다.

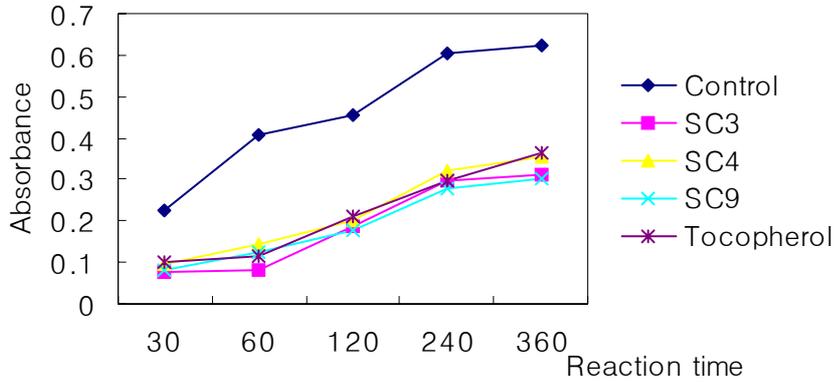


Fig. 3. Inhibition of conjugated diene formation by the isolated compounds from the the aerial parts of *Saururus chinensis*.

아래의 Table. 6은 CuSO₄ 로 LDL을 산화시 생성되는 malon dialdehyde를 TBA 방법으로 측정하여 삼백초에서 분리한 화합물 들의 LDL의 산화억제도를 조사한 것이다. 분리된 성분 들 중 SC 9와 SC 3의 억제 활성이 높게 나타났으며, 같은 농도의 α-tocopherol 보다 그 억제 활성이 높았다. SC 4는 비교적 낮은 활성을 나타내었다. 따라서 이들 플라보노이드 화합물의 항산화성을 비롯한 LDL 산화억제 활성은 B환의 OH기의 수와 위치에 따라 활성의 정도가 다르며, SC 9와 SC 3는 B환의 OH기가 각각 3', 4' 위치에 붙어있는 O-diphenol 형으로서 산화를 유발하는 Cu, Fe 등 금속이온을 킬레이팅하는 역할도 겸하므로 더욱 그 활성이 SC 4에 비하여 높게 나타난 것으로 사료된다.

Table 6. Inhibition rate of the compounds isolated from the aerial parts of *Saururus chinensis* on the formation of TBARS by CuSO₄ induced peroxidation of LDL.

Compounds	SC3	SC4	SC9	α-tocopherol
Inhibition rate (%)	58.46	24.12	67.70	40.31

LDL의 산화에 따른 단백질의 분해 정도를 관찰하기 위하여 LDL을 CuSO₄로 산화를 유도한 후 10% SDS-PAGE에 전개 시킨 후 Coomassie brilliant blue R-250으로 염색하였다. LDL의 98%를 구성하는 apolipoprotein B (apo B)는 불용성의 거대분자로 아직 정확한 1차 구조가 밝혀지지 않고 있다.

Fig. 4와 Fig. 5는 삼백초의 지상부의 조추출물, 용매분획, SiO₂칼럼 분획 및 정제하여 구조를 동정한 활성성분과 LDL을 37°C에서 4시간 반응 후 SDS-PAGE에 전개시킨 후 단백질의 분해를 관찰한 결과이다. native LDL은 apo B 단백질의 분해가 거의 일어나지 않았고, control의 경우 단백질 분해로 인하여 tailing이 관찰되었다. 먼저 조추출물과 획분 중에는 crude extract와 ethyl acetate 획분이 native LDL과 동일 선상에서 band가 뚜렷이 관찰되어 apo B 100의 산화가 억제됨을 알 수 있었다. 그리고 분리된 성분 중에는 SC 3의 quercetin-3-O-rhamnose, SC 9의 밴드가 뚜렷하여 apo-B protein의 산화를 이들 성분이 억제할 수 있는 것을 알 수 있다. 따라서 삼백초의 지상부에서 분리된 이들 성분은 LDL의 산화를 억제하여 동맥경화를 예방할 수 있는 물질로서 생각된다.

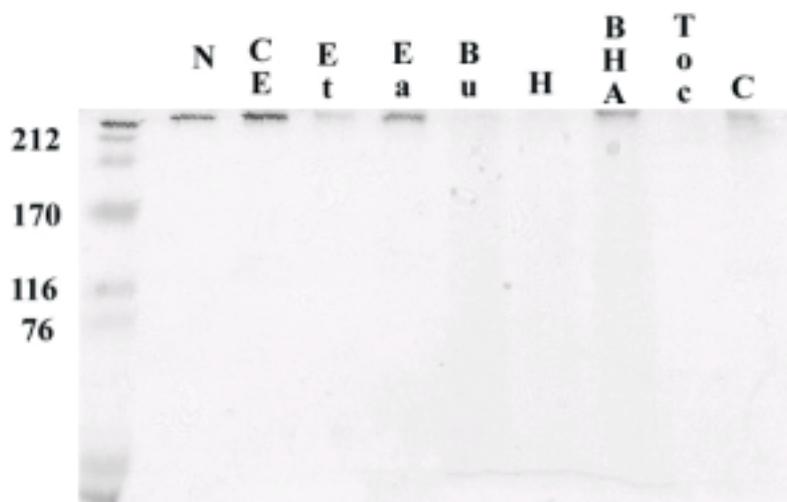


Fig. 4. Inhibition of CuSO_4 induced apo B fragmentation by the solvent fraction of *Saururus chinensis*

lane N; native LDL, lane CE; crude extract, Et: ethyl ether fraction,

Ea: ethyl acetate fraction, Bu; butanol fraction, H; H_2O fraction, Toc; α -tocopherol, C: control

Electrophoresis was carried out on a 10% SDS-polyacrylamide gel, which was stained with Coomassie brilliant blue R-250.



Fig. 5. Inhibition of CuSO_4 induced apo B fragmentation by the fraction and compounds of *Saururus chinensis*

lane N; native LDL, lane C; control, Si5; silica gel fr 5, Si8; silica gel fr. 8, SC3: quercetin-3-O-rhamnose, SC4; kaempferol-3-O-rhamnose, SC9: rutin, Toc; α -tocopherol
Electrophoresis was carried out on a 10% SDS-polyacrylamide gel, which was stained with Coomassie brilliant blue R-250.

라. 삼백초 지하부로부터 동맥경화 예방 물질 분리와 활성

삼백초 지하부로부터 활성성분의 분리는 Fig. 6과 같이 행하였다. 즉 지하부 1kg을 메탄올로 환류 추출하고, 감압농축하여 다시, n-hexane, CHCl_3 , EtOAc, BuOH, 물로 용매분획하였다. 이들 중 활성이 강한 클로로포름 분획에서 silica gel을 이용한 감압 크로마토그래피로 5 개의 획분을 분리하고 다시 SiO_2 칼럼 크로마토그래피로 디클로로메탄-클로로포름, 메탄올 용매로 15 개의 획분으로 구분하고, TLC와 활성 조사를 통하여, 3, 7, 9 획분에서 분취 HPLC로 SCR1, SCR2, SCR3, SCR4의 4개의 성분을 분리하였다.

Table. 7은 삼백초 지하부의 조추출물, 용매분획 물질의 DPPH, Superoxide anion, H₂O₂, •OH 라디칼 소거능 및 LDL 산화 억제 효과를 조사한 것이다. DPPH(전자공여능) 활성에 있어서는 CHCl₃분획 구간이 가장 높은 87.7%의 활성을 나타내었다. Superoxide anion radical 소거활성에서는 EtOAc분획 구간에서 가장 높은 활성인 99.5%를 나타내었으며, Hydroxyl radical 소거활성에서는 모든 분획구간에서 대조구인 α-tocopherol과 BHA보다 높은 활성을 나타내었다. LDL 억제 실험에서는 CHCl₃ 분획구간이 가장 높은 활성인 64.6%를 나타내었다. 활성 산소의 소거능을 종합하여 볼때, 삼백초 지하부의 분획구간 중에서 CHCl₃, EtOAc획분이 비교적 BHA, α-tocopherol과 유사한 활성을 보였으며 CHCl₃ 분획구간이 가장 좋은 활성을 나타내었다. 따라서 CHCl₃ 획분으로부터 활성물질을 분리하였다.

Table 7. Radical scavenging and LDL oxidation inhibition activities of solvent fraction from *Saururus chinensis*

Sample	Inhibition activity (%)				
	DPPH	SO	•OH	H ₂ O ₂	LDL
CHCl ₃	87.7	14.7	85.6	31.0	64.6
EtOAc	74.4	99.5	90.3	87.1	55.9
BuOH	27.5	53.6	94.9	18.6	61.6
H ₂ O	46.9	72.0	94.5	88.3	53.5
α-tocopherol	92.8	2.8	85.6	85.0	75.1
BHA	90.7	12.3	78.8	30.7	74.6

* SO: Superoxide anion radical, •OH: Hydroxyl radical, LDL : LDL oxidation by CuSO₄

* Test solution : DPPH; 100ppm, SO;100ppm, •OH: 10ppm, H₂O₂:: 500ppm, LDL;

Table. 8은 칼럼크로마토그래피 획분의 DPPH, Superoxide anion, H₂O₂, •OH 라디칼 소거능 및 LDL 산화 억제 효과를 나타낸 것이다. DPPH(전자공여능)소거 활성의 경우 VLC2가 가장 높은 78.8%의 활성을 나타내었으며, VLC1과 VLC5가 그 다음으로 높은 활성을 나타내었다. Superoxide anion radical 소거활성은

VLC1과 VLC2가 높은 활성을 나타내었다. Hydroxyl radical 소거활성은 모든 구간에서 높은 활성을 나타내었으며, LDL산화 억제 활성은 VLC2번 구간이 73.2%로 가장 높은 활성을 나타내었다.

Table 8. Radical scavenging and LDL oxidation inhibition activities of column chromatography fraction from *Saururus chinensis*

Sample	Inhibition activity (%)				
	DPPH	SO	• OH	H ₂ O ₂	LDL
VLC 1	52.6	63.0	89.8	70.2	19.7
VLC 2	78.8	55.8	89.0	97.4	73.2
VLC 3	20.1	43.1	78.4	6.2	42.4
VLC 4	18.5	29.5	97.0	13.8	32.5
VLC 5	46.9	49.8	92.4	8.2	29.3
CC 3	85.3	23.5	90.7	69.3	45.7
CC 7	89.8	78.6	94.6	89.4	78.4
CC 9	68.5	63.1	76.7	56.4	63.1
α-tocopherol	92.8	2.8	85.6	85.0	75.1
BHA	90.7	12.3	78.8	30.7	74.6

100ppm

* SO: Superoxide anion radical, •OH: Hydroxyl radical, LDL : LDL oxidation by CuSO₄

* Test solution : DPPH: 100ppm, SO:100ppm, •OH: 10ppm, H₂O₂: 500ppm, LDL: 100ppm

종합적으로 활성산소 소거활성을 측정한 결과, 감압 크로마토그래피 획분 중 VLC2가 가장 활성이 높았으며 이로부터 분리된 SiO₂ 칼럼 획분 중에는 CC3, CC7, CC9 획분을 분리하여 활성산소 소거활성을 측정한 결과 Table 8과 같았다. 가장 활성이 높았던 VLC2 분획을 이용하여 CC3, CC7, CC9 획분을 얻었으며, 이들 획분으로부터 분취 HPLC을 이용하여 SCR1, SCR2, SCR3, SCR4의 4개의 성분을 분리 및 정제하였다. 분취 HPLC을 이용하여 최종적으로 얻은 SCR1,

SCR2, SCR3, SCR4의 4개의 성분에 대한 활성산소 소거 활성을 측정한 결과 Table 9와 같은 결과를 나타내었다. DPPH(전자공여능) 소거활성에 있어서는 SCR4가 가장 높은 82.0%의 활성을 나타내었으며, SCR2가 48.2%의 활성을 나타내었다. Superoxide anion radical 소거활성의 경우 SCR2가 23.3%의 가장 높은 활성을 나타내었으며, Hydroxyl radical 소거활성은 SCR4가 가장 높은 97.5%의 활성을 나타내었으며, SCR2가 94.9%의 활성을 나타내었다. LDL산화 억제활성에 있어서는 SCR4와 SCR2가 61.5%의 활성을 나타내었다. 최종 분리된 성분 중에는 동일 농도에서 활성산소의 소거활성을 측정한 결과, SCR4의 활성이 가장 높았으며, SCR 2의 활성도 상당히 높게 나타났다.

Table 9. Radical scavenging and LDL oxidation inhibition activities of isolated compounds from *Saururus chinensis*

Sample	Inhibition activity (%)				
	DPPH	SO	•OH	H ₂ O ₂	LDL
SCR 1	4.0	10.0	54.5	71.5	12.9
SCR 2	49.2	23.3	94.9	21.5	61.5
SCR 3	3.9	20.8	63.5	12.5	28.7
SCR 4	82.0	14.8	97.5	79.6	67.5
α-tocopherol	92.8	2.8	85.6	85.0	75.1
BHA	90.7	12.3	78.8	30.7	74.6

* SO: Superoxide anion radical, •OH: Hydroxyl radical, LDL : LDL oxidation by CuSO₄

* Test solution : DPPH; 100ppm, SO;100ppm, •OH: 10ppm, H₂O₂: 500ppm, LDL; 100ppm

마. 삼백초 지하부에서 분리한 활성 성분의 화학적 구조분석

분취 HPLC을 이용하여 최종적으로 얻은 SCR1, SCR3, SCR4의 3개의 성분에 대한 구조 분석을 위해서 ¹H 과 ¹³C-NMR을 이용하여 spectrum을 조사 하였다. Fig. 8은 SCR1의 ¹H-NMR spectrum을 조사한 결과이다. SCR1의 ¹³C-NMR

spectrum을 조사한 결과는 Fig. 9에 나타내었다. 분취한 삼백초 지하부의 구조 동정을 위해 GC-MS 분석을 행하여 분자량이 372임을 확인하였다. SCR1의 GC-MS spectrum은 Fig. 10에 나타내었다. Fig. 11은 SCR3의 $^1\text{H-NMR}$ spectrum을 조사한 결과이다. SCR3의 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum을 조사한 결과는 Fig. 12에 나타내었다. 분취한 삼백초 지하부의 구조 동정을 위해 GC-MS분석을 행하여 분자량이 536임을 확인하였다. SCR3의 GC-MS spectrum은 Fig. 13에 나타내었다. Fig. 14은 SCR4의 $^1\text{H-NMR}$ spectrum을 조사한 결과이다. SCR4의 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum을 조사한 결과는 Fig. 15에 나타내었다. 분취한 삼백초 지하부의 구조 동정을 위해 GC-MS분석을 행하여 분자량이 344임을 확인하였다. SCR4의 GC-MS spectrum은 Fig. 16에 나타내었다. SCR1, SCR3, SCR4에 대한 ^1H 과 ^{13}C NMR의 chemical shift 값을 Table 10 에 종합하여 나타내었다. ^1H 과 ^{13}C NMR을 이용하여 얻은 spectrum을 이용하여 구조 분석하고 문헌과 비교하여 SCR1은 Di-O-methyltetrahydrofuriguacin, SCR3는 Saucerneol D로, SCR4은 Machilin D로 동정하였다. 이들의 구조식을 Fig. 17에 나타내었다.

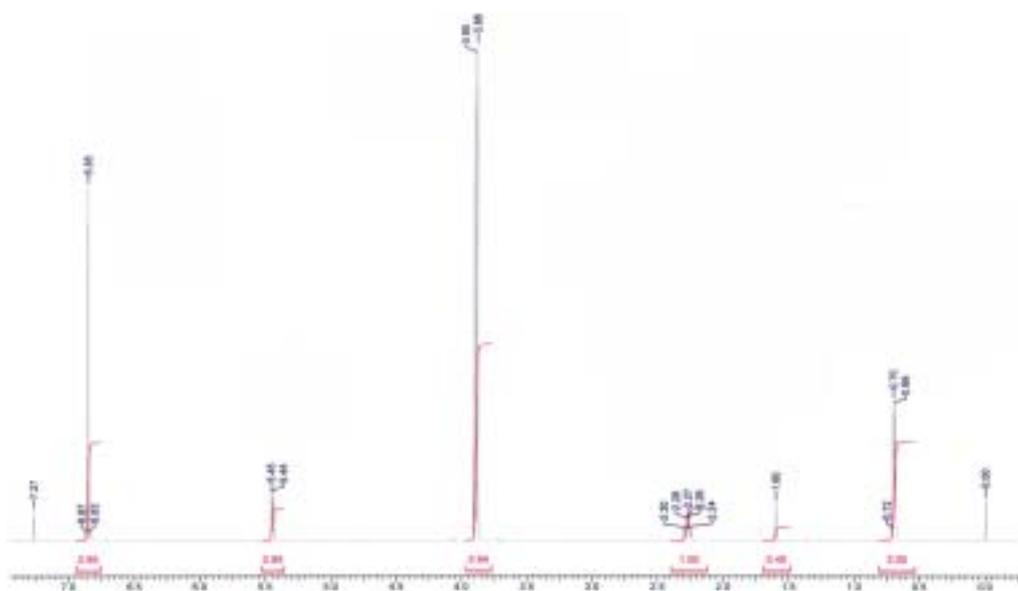


Fig. 8. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of SCR1 isolated from the underground parts of *Saururus chinensis*

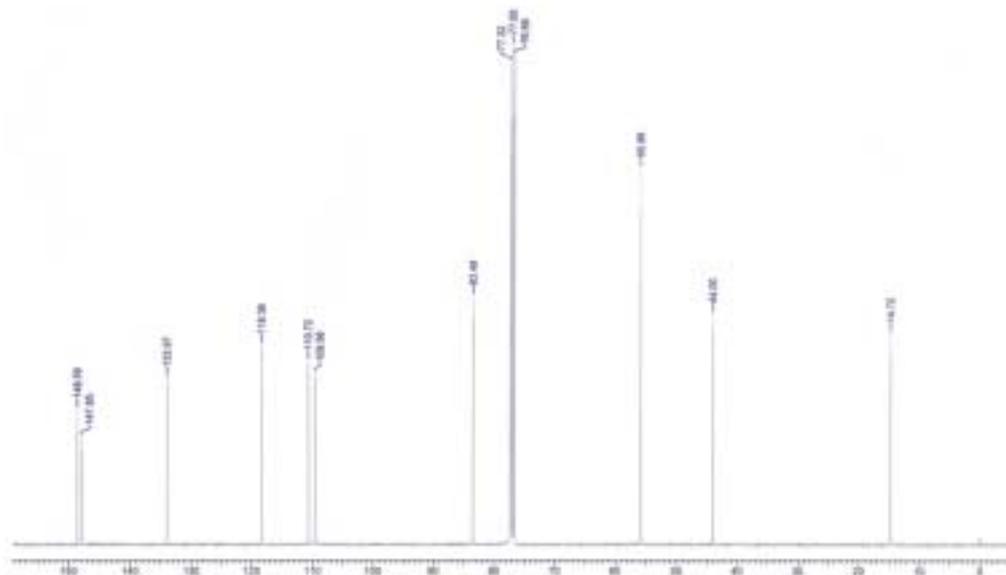


Fig. 9. ^{13}C -NMR spectrum of SCR1 isolated from the underground parts of *Saururus chinensis*

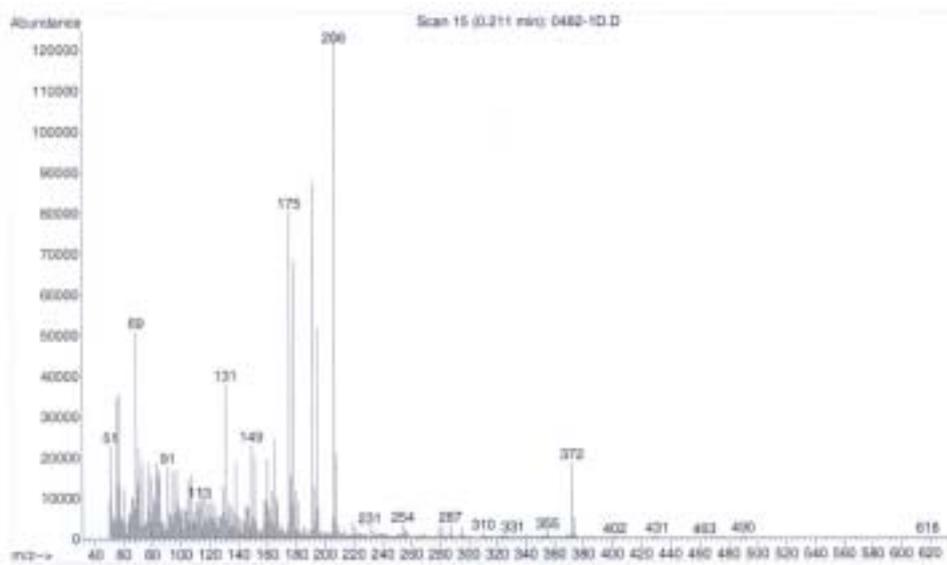


Fig. 10. GC-MS spectrum of SCR1 isolated from the underground parts of *Saururus chinensis*

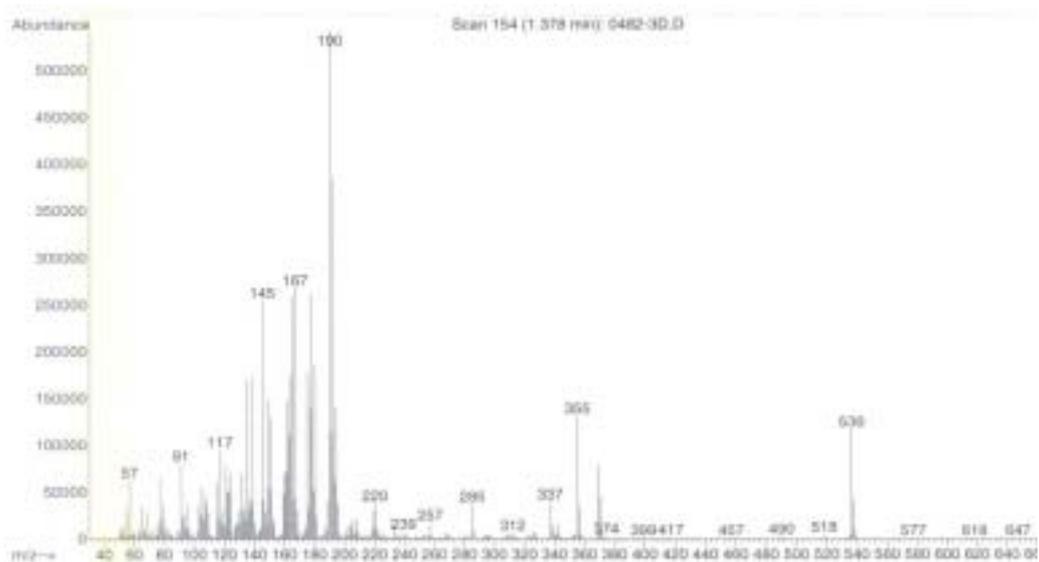


Fig. 13. GC-MS spectrum of SCR3 isolated from the underground parts of *Saururus chinensis*

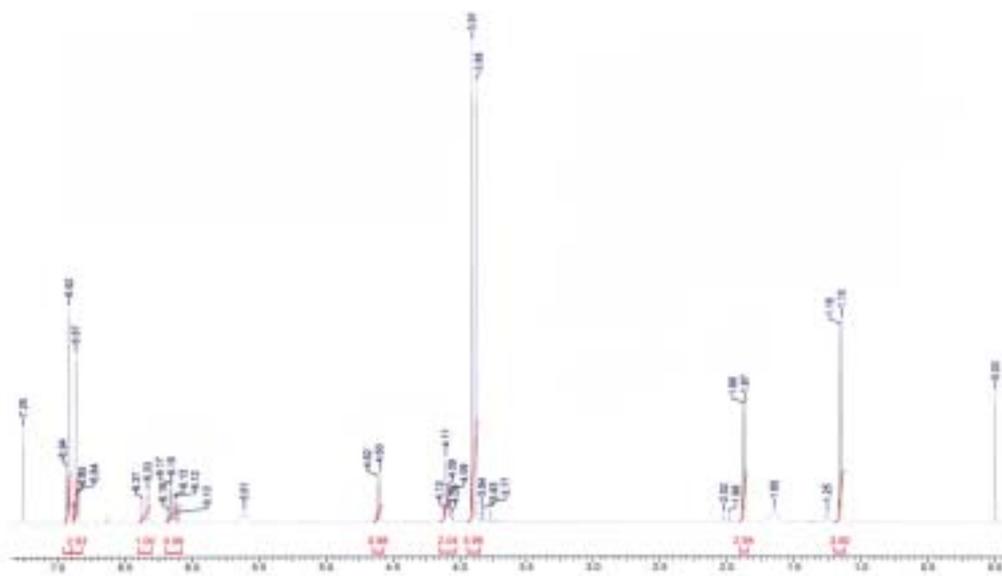


Fig. 14. ^1H -NMR spectrum of SCR4 isolated from the underground parts of *Saururus chinensis*

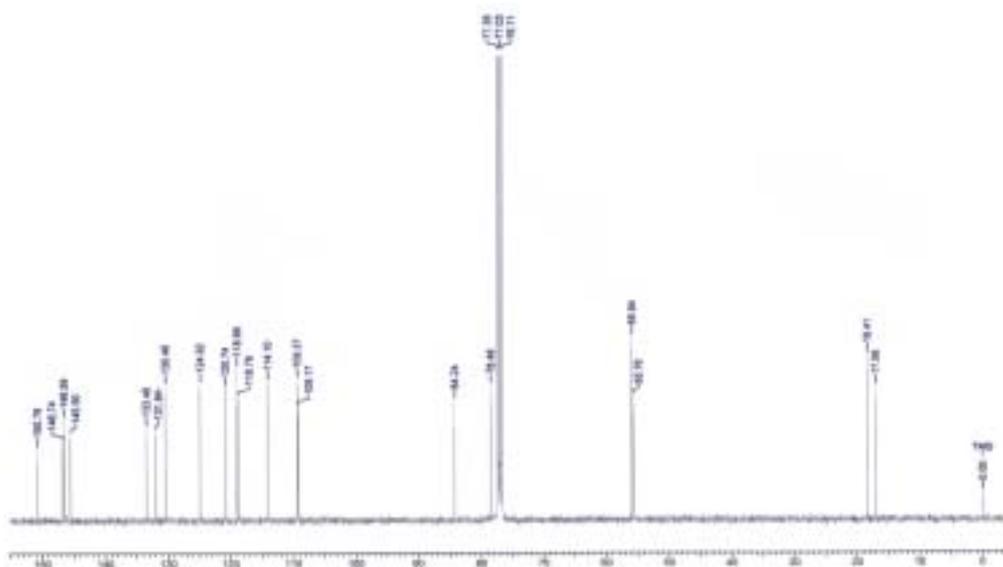


Fig. 15. ^{13}C -NMR spectrum of SCR4 isolated from the underground parts of *Saururus chinensis*

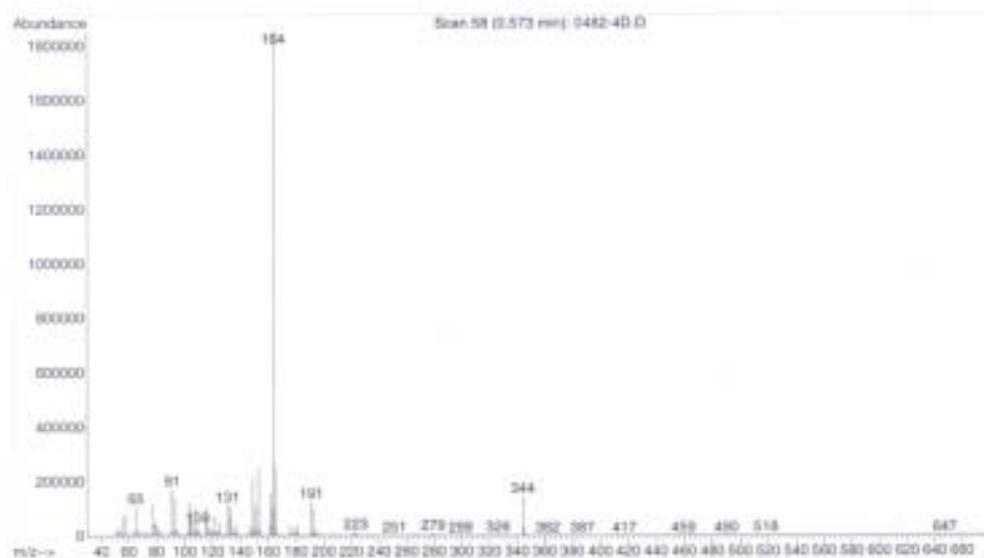


Fig. 16. GC-MS spectrum of SCR4 isolated from the underground parts of *Saururus chinensis*

Table 10. ^1H and ^{13}C NMR spectral data of sesquignano compounds isolated from underground part of *Saururus chinensis* (400/100MHz, CDCl_3)

Carbon	Data SCR1		Data SCR3		Data SCR4	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
1	-	134.0	-	135.3	-	131.94
2	-	109.6	6.81(d, 1.7)	106.9	-	109.17
3	-	148.6	-	147.5	-	146.59
4	-	147.9	-	146.4	-	145.50
5	-	110.7	6.78(d, 8.0)	107.8	-	114.10
6	-	118.4	6.76(br d, 8.0)	119.3	-	120.74
7	5.44 (d, 6.4)	83.5	5.42(d, 6.5)	83.6	4.62(d, 8.3)	78.48
8	2.24 (m)	44.0	2.26(ddq, 12.8, 6.5, 6.5)	43.9	4.09 (m)	84.24
9	0.69 (d, 6.6)	14.7	0.71(d, 6.5)	14.7	1.15 (d, 6.1)	17.06
1'	-	134.0	-	136.5	-	133.48
2'	-	109.6	6.89(d, 1.6)	110.1	-	109.37
3'	-	148.6	-	150.5	-	150.78
4'	-	147.9	-	146.4	-	146.74
5'	-	110.7	6.99(d, 8.0)	118.7	-	118.79
6'	-	118.4	6.82(dd, 8.0, 1.6)	118.7	-	118.99
7'	5.44 (d, 6.4)	83.5	5.43(d, 6.5)	83.4	6.37(d, 1.5)	130.46
8'	2.24 (m)	44.0	2.29(ddq, 12.8, 6.5, 6.5)	43.9	6.12(m)	124.92
9'	0.69 (d, 6.6)	14.7	0.71(d, 6.5)	14.7	1.87(dd, 1.5, 6.7)	18.41
1''			-	132.6		
2''			6.94(d, 1.7)	110.1		
3''			-	149.0		
4''			-	148.8		
5''			6.84(d, 8.2)	110.9		
6''			6.92(dd, 8.2, 1.7)	120.0		
7''			4.65(d, 8.3)	78.3		
8''			4.13(dq, 8.3, 6.2)	84.0		
9''			1.17(d, 6.2)	17.0		
OCH ₃	3.88	55.9			3.84 (s)	55.76
OCH ₃	3.90	55.9			3.88 (s)	55.94
OCH ₃					3.91 (s)	
3-OCH ₂ O			5.95(s)	100.8		
-4						
3'-OCH ₃			3.92(s)	55.8		
3''-OCH ₃			3.89(s)	55.8		
4'-OCH ₃			3.87(s)	55.8		

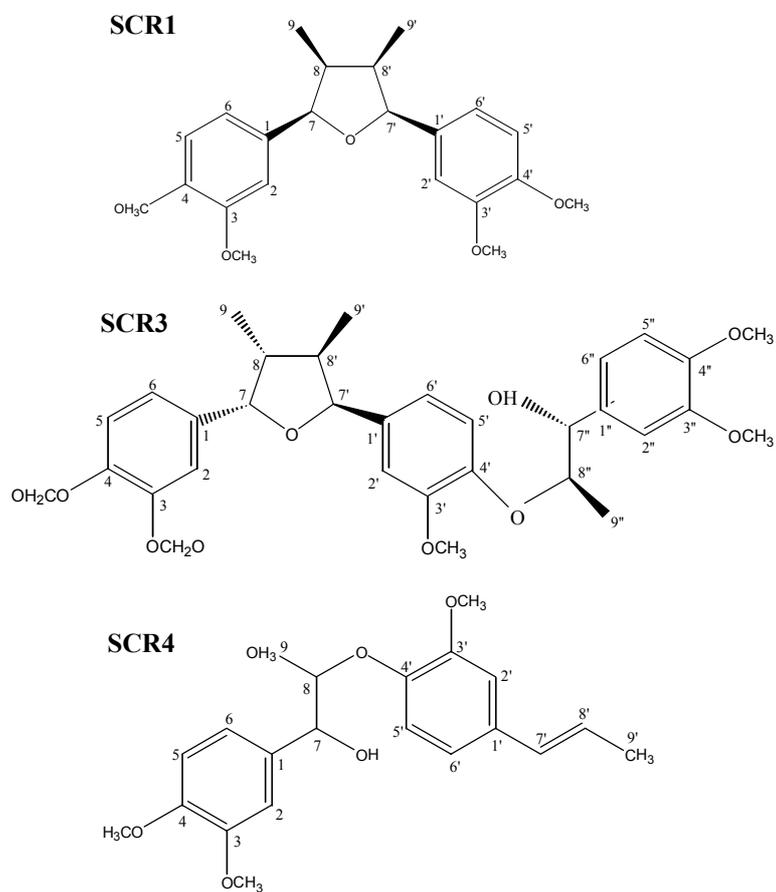


Fig. 17. Chemical structures of sesquilignan compounds isolated from underground part of *Saururus chinensis*.

바. 삼백초 기능성분의 효율적 추출 조건

1) 추출용매에 따른 이화학적 특성 변화

삼백초 지상부의 추출조건을 설정하기 위해 우선 추출용매에 따른 이화학적 특성을 실험한 결과 Table 11과 같았다. 각 조건별로 추출용매를 제조하여 환류냉각장치를 이용하여 수욕상의 온도를 90℃로 유지하면서, 추출용매에 따른 추출물을 제조하였다. 수욕에 있어서는 60% 에탄올 용매에서 가장 높은 함량을 나타내었으며 그 다음으로 40% 에탄올 농도에서 높은 총 추출수율을 나타내었다. 수욕은 40-60% 에탄올 농도에서 높은 함량을 나타내었는데, 이는 결명자, 당귀 및 복분자를 이용하여 추출조건시 수욕에 대한 결과와 유사하였다. 각 용매조건별로 추출한 삼백초 추출물에 대한 항산화 활성을 측정하기 위해 전자공여능을 실험한 결과 40% 에탄올 추출물과 60%에탄올 추출물에서 높은 활성을 나타내었으며, 80% 에탄올, 100% 에탄올, 20% 에탄올 및 물추출물 순으로 활성이 낮아지는 경향을 나타내었다. 삼백초 지상부의 각 추출물의 총 페놀함량도 전자공여능 활성과 비례하는 경향을 나타내었다. 즉, 40% 에탄올 추출물과 60%에탄올 추출물에서 높은 페놀 화합물의 함량을 나타내었으며, 80% 에탄올, 100% 에탄올, 20% 에탄올 및 물추출물 순으로 총 페놀 화합물의 함량이 낮아지는 경향을 나타내었다. 항산화능을 나타내는 전자공여능의 활성과 총페놀 함량이 비례하는 경향을 나타내었는데, 이는 Chung의 고추씨기름에 대한 다류 에탄올 추출물의 항산화효과 연구에서와 같이 일치하는 경향을 나타내었다. 총 플라보노이드 함량에 있어서는 40% 에탄올이 2.09mg/ml로 가장 높은 함량을 나타내었으며, 60%에탄올 추출물에서는 1.95mg/ml의 함량을 나타내었다. 물추출물에서 1.25mg/ml로 가장 낮은 함량을 나타내는 결과를 나타내었다. 각 추출용매의 조건에 따른 삼백초 추출물의 이화학적 활성을 살펴본 결과 40% 에탄올 추출물에서 추출하는 것이 항산화 활성을 높이면서, 총 플라보노이드 함량을 높일수 있는 추출용매조건임을 확인할 수 있었다.

Table 11. Extract volume, yield, DPPH, total phenolic compound and total flavonoid of *Saururus chinensis* extracts prepared with different extraction solvent

Ethanol Conc.(%)	Yield(%)	DPPH	Total phenolic compound(mg/ml)	Total flavonoid(mg/ml)
0	13.35	47.05	1.17	1.25
20	12.76	60.74	1.54	1.47
40	13.50	83.50	2.60	2.09
60	14.32	84.59	2.63	1.95
80	11.92	77.70	1.92	1.68
95	8.98	63.55	1.17	1.30

Extraction condition : 90°C, 8hr, 10 times volume of solvent.

2) 추출시간에 따른 이화학적 특성 변화

각 용매 조건별로 실험한 결과 40% 에탄올 추출물이 가장 활성이 높은 것으로 나타났으므로, 추출용매를 40%로 고정시킨 후에 추출시간에 따른 삼백초 추출물의 이화학적 특성을 살펴보았다 (Table. 12) 수율은 12시간 추출에서 가장 높은 총 추출수율을 나타내었으나 시간별에 따른 큰 차이는 나타내지 않았다. 이는 Yoon등이 복분자 추출조건에 따른 특성변화에서 총수율에 대한 최적예측시간이 3.99hr 이었다는 보고와는 다른 경향을 나타내었다. 전자공여능 활성에 있어서는 4시간에서 16시간까지 활성의 감소가 거의 나타나지 않았으며, 20시간 추출시 전자공여능 활성이 감소하는 경향을 나타내었다. 총페놀 함량은 추출시간이 증가할수록 조금씩 증가하는 경향을 나타내었으며, Park등의 산국을 이용하여 에탄올 추출조건을 최적화한 연구에서 총페놀함량이 15 시간에서 최적화 된 결과와는 다소 다른 경향을 나타내었다. 총 플라보노이드 함량은 4시간 추출시간에서 가장 높은 함량을 나타내었다. 삼백초 지상부의 추출시간에 따른 이화학적 특성을 조

사한 결과, 추출시간이 4시간 이상 증가할수록 항산화 활성, 수율 및 페놀 함량이 거의 증가하지 않는 것을 통해 삼백초 지상부를 추출할 때 4시간으로 추출하는 것이 가장 바람직함을 알 수 있었다.

Table 12. Extract volume, yield, DPPH, total phenolic compound and total flavonoid of *Saururus chinensis* extracts prepared with different extraction time

Extract time(hr)	Yield(%)	DPPH	Total phenolic compound(mg/ml)	Total flavonoid(mg/ml)
4	12.79	71.13	2.83	2.16
8	12.46	71.10	2.78	2.03
12	13.01	70.31	2.72	1.96
16	12.89	71.77	2.93	2.06
20	12.92	68.99	2.88	2.05
24	12.76	69.45	3.01	2.15

Extraction condition : 90°C, 40% ethanol solvent, 10 times volume of solvent

3) 삼백초 추출물의 플라보노이드 성분 분석

삼백초 지상부 추출물의 quercetin 및 quercetrin성분의 변화를 알아보기 위해 4시간 추출한 물추출물, 40% 에탄올 추출물 및 80% 에탄올 추출물에 대해 HPLC를 이용하여 함량 분석을 하였다. 삼백초 지상부를 분석한 결과 Fig. 17과 같은 결과를 나타내었다. 삼백초 지상부 물추출은 quercetrin함량이 250.38 mg/100g을 나타내었으며, quercetin함량은 805.89 mg/100g을 나타내었다. 삼백초 지상부 40% 에탄올 추출물은 quercetrin함량이 360.13 mg/100g을 나타내었으며, quercetin함량은 1379.54 mg/100g을 나타내었으며, 80% 에탄올 추출물은 quercetrin함량이 249.67 mg/100g, quercetin함량은 1060.72 mg/100g을 나타내었다.

다. 삼백초 지상부의 추출용매에 따른 quercetrin 및 quercetin 함량을 분석한 결과 40%에탄올 추출물에서 가장 높은 함량을 나타내었으며, 그 다음으로 80% 에탄올 추출물, 물추출물 순으로 나타났다. 삼백초 지상부의 추출조건을 설정하기 위해 추출용매 및 추출시간에 따른 이화학적 특성을 조사한 결과 40% 에탄올 추출물로 4시간 추출하는 것이 가장 적합한 것으로 나타났다.

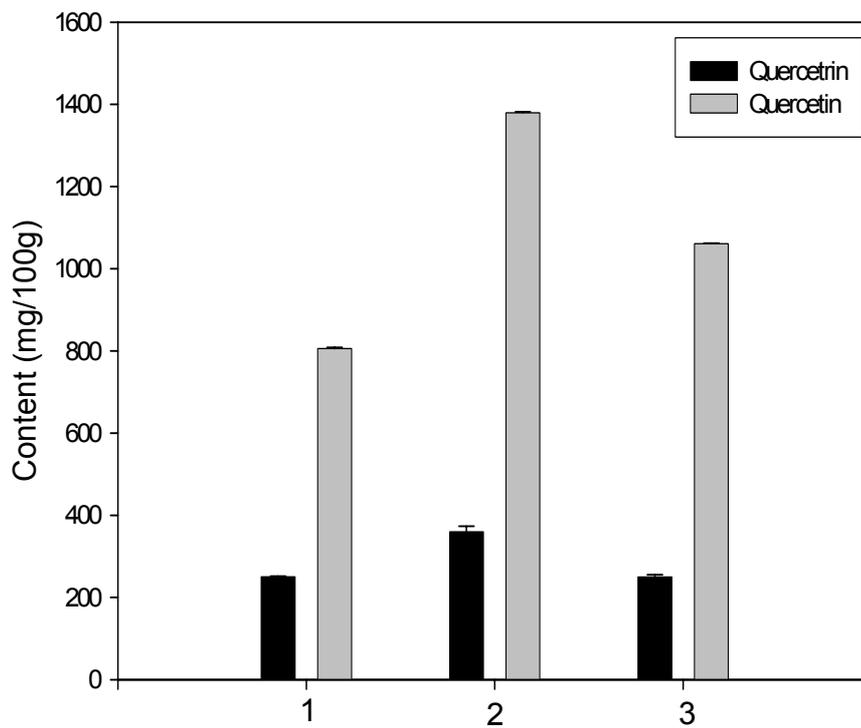


Fig.17. Contents of quercetin and quercetrin in *Saururus chinensis* extracts prepared with different extraction solvent (1: Water extract, 2: 40% EtOH extract, 3: 80% EtOH extract).

사. 삼백초를 이용한 음료 개발

1) 삼백초 시료의 배합비율 설정

삼백초의 지상부와 지하부의 혼합비율을 각각 5개 (지상부 : 지하부 0:100, 20:80, 50:50, 80:20, 100:0) 구간으로 설정하여 추출온도는 100℃, 추출시간은 4시간 및 시료 대 용매(물)비는 1:10으로 고정하여 추출한 추출물에 대하여 수율 및 전자공여능을 측정한 결과 Table 13과 같은 결과를 나타내었다. 수율에 있어서 삼백초 지상부의 함량이 증가할수록 높아지는 경향을 나타내었으며, 전자공여능 소거활성에 있어서는 지상부 : 지하부의 혼합비율이 80 : 20일 때 40.58%의 활성을, 지상부 : 지하부의 혼합비율이 100 : 0일 때 46.84%의 활성을 나타내어 높은 활성을 보였다. 삼백초의 지상부 및 지하부의 혼합비율을 설정하기 위한 실험결과 지상부의 비율이 증가 할수록 수율 및 전자공여능은 증가하는 경향을 보였으며, 지상부 : 지하부의 혼합비율이 80 : 20, 지상부 : 지하부의 혼합비율이 100 : 0 일 때 가장 좋은 활성을 나타내어, 최종 삼백초의 혼합비율은 지상부 : 지하부 80 : 20으로 결정하였다.

Table 13. Yield, DPPH and total phenolic compound of mixing ratio of *Saururus chinensis* leaf and root.

Mixing ratio (leaf : root)	Yield(%)	DPPH(%)
0 : 100	7.37	12.86
20 : 80	7.29	15.88
50 : 50	8.83	28.52
80 : 20	11.01	40.58
100 : 0	12.96	46.84

2) 원적외선 추출가열시간 설정

원적외선 추출가열시간을 1~5시간으로 추출한 삼백초 추출물과 열수로 4시간 환류냉각 추출한 추출물의 수율, 전자공여능 소거활성 및 총 페놀 함량을 측정한 결과 Table. 14와 같은 결과를 나타내었으며, 수율에 있어서는 일반열수 추출이 11.49%의 함량을 나타내었으며, 원적외선으로 1시간 추출한 것이 13.15%로 가장 높은 값을 나타내면서 열수추출과 유사한 수율을 나타내었다. 전자공여능 소거활성에 있어서는 원적외선으로 1시간 추출할 때 열수 추출보다 높은 활성인 39.05%를 나타내었다. 총페놀 함량에 있어서는 원적외선 3시간 추출이 가장 높은 함량을 나타내었다. 일반 열수를 이용하여 4시간 추출하는 것과 비교할 때 원적외선으로 1시간 추출시 빠른 시간에 열수추출 보다 좋은 이화학적 품질값을 나타내는 추출이 가능함을 알 수 있었다.

Table 14. Yield, DPPH and total phenolic compound of *Saururus chinensis* far-infrared radiation extract and heating extracts prepared with different extractiontime

		Yield (%)	DPPH radical scavenging(%)	Total phenol content (mg%)
Far-Infrared radiation extract	1	13.15	39.05	13.032
	2	12.73	45.10	14.974
	3	10.98	44.81	15.524
	4	9.42	37.08	11.817
	5	13.91	39.27	11.101
Heating extract	4	11.49	36.51	8.754

3) 원적외선 추출에 의한 삼백초 음료의 최적 배합 조건 설정

원적외선 추출시 100℃에서 1시간 추출하는 것이 효과적임을 알 수 있었으므로 삼백초 음료 제조시 삼백초 지상부:지하부의 비율을 80 : 20으로 하여 원적외선으로 100℃, 1시간 추출액을 제조하여 사용하였다. 인삼과 계피를 가지고 예비실험한 결과 관능검사에서 인삼은 0~10% 첨가구간이 좋은 평점을 나타내었으며, 계피는 0~20% 첨가구간이 좋은 평점을 나타내어 삼백초, 인삼 및 계피를 혼합한 삼백초 음료의 제조시 최적 배합 혼합율을 알아보기 위해 중심합성계획법으로 실험설계하여 실험한 결과 Table. 15와 같은 결과를 나타내었다. 전자공여능 소거활성은 80%이상의 높은 활성을 나타내었으며, 총페놀함량은 평균 15 mg%를 나타내었다. Table 15 를 통해 얻은 결과를 SAS로 통계처리한 결과 Fig. 18~ Fig. 20의 결과를 얻었다. 전자공여능 소거활성에 있어서는 계피 첨가량이 10% 이상일 때 높은 값을 나타냄을 알 수 있었으며, 총 페놀함량에 있어서는 계피의 함량이 10%정도의 범위에서 높은 값을 나타냄을 알 수 있었다. 인삼 첨가량 및 계피의 첨가량을 달리하면서 삼백초 음료를 제조한 결과 Fig. 20과 같은 최적 부분을 도출할 수 있었다. 즉, 인삼첨가량은 5-7%로 고정하고, 계피 첨가량을 10-12% 첨가할 때 높은 활성을 나타내는 삼백초 음료 추출물이 제조됨을 알 수 있었다. 최적 조건을 고려하여 원적외선으로 1시간 추출한 삼백초 (지상부 : 지하부 = 80: 20) 추출액 85%, 인삼 추출액 5%, 계피 추출액 10%를 첨가하여 삼백초 음료를 제조하였으며, 제조한 삼백초 음료는 Fig. 21와 같다.

Table 15. Experimental data on DPPH radical scavenging activity and total phenolics content of *Saururus chinensis* beverage by recipe conditions based on central composite design for response surface analysis

Experiment number ¹⁾	DPPH radical scavenging activity (%)	Total phenol content (mg%)
1	83.48	16.94
2	82.57	16.57
3	82.57	17.09
4	82.28	6.76
5	83.54	14.85
6	83.12	14.24
7	81.85	16.54
8	81.19	17.98
9	83.66	18.39
10	80.50	16.51

¹⁾ The number of experimental condition by central composite design.

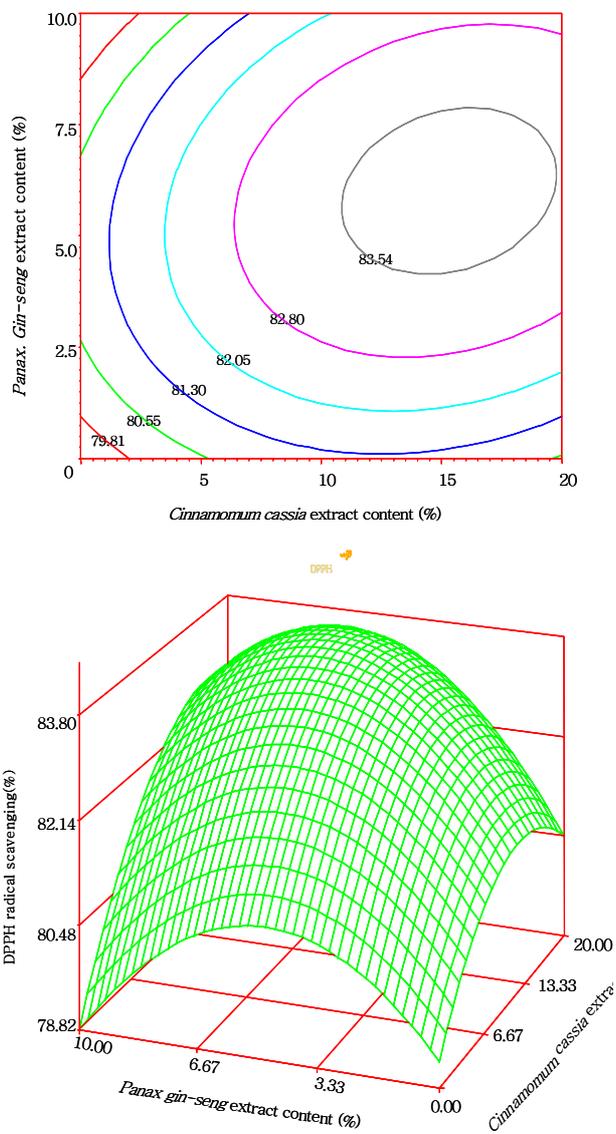


Fig. 18. Response surface and contour map for the effects of *Panax. gin-seng* extract contents and *Cinnamomum cassia* extract contents on DPPH radical scavenging activity of *Saururus chinensis* beverage.

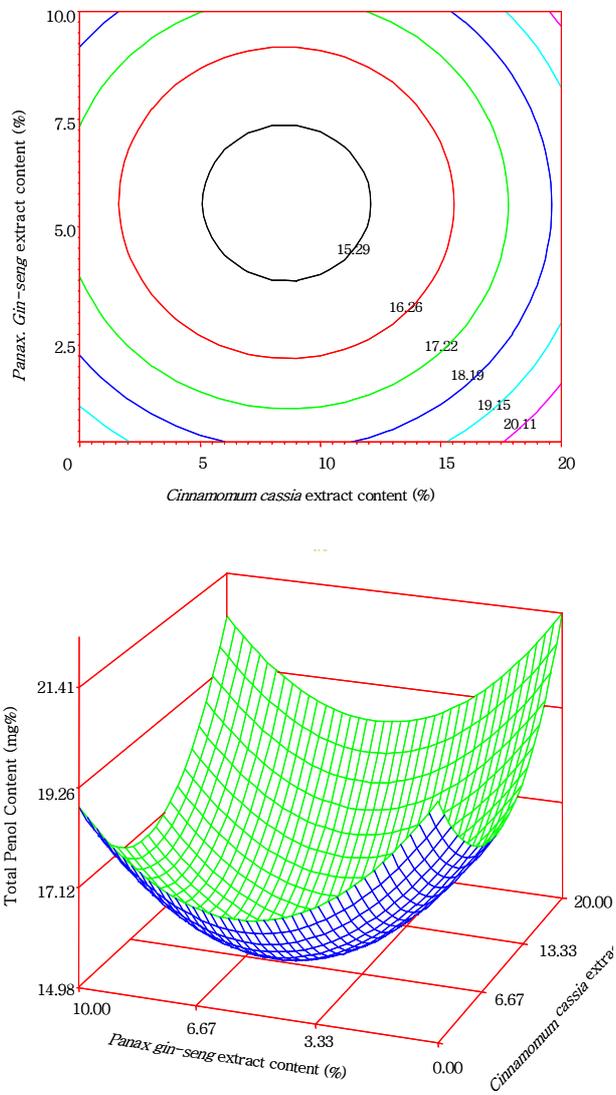


Fig. 19. Response surface and contour map for the effects of *Panax. gin-seng* extract contents and *Cinnamomum cassia* extract contents on total phenol contents of *Saururus chinensis* beverage.

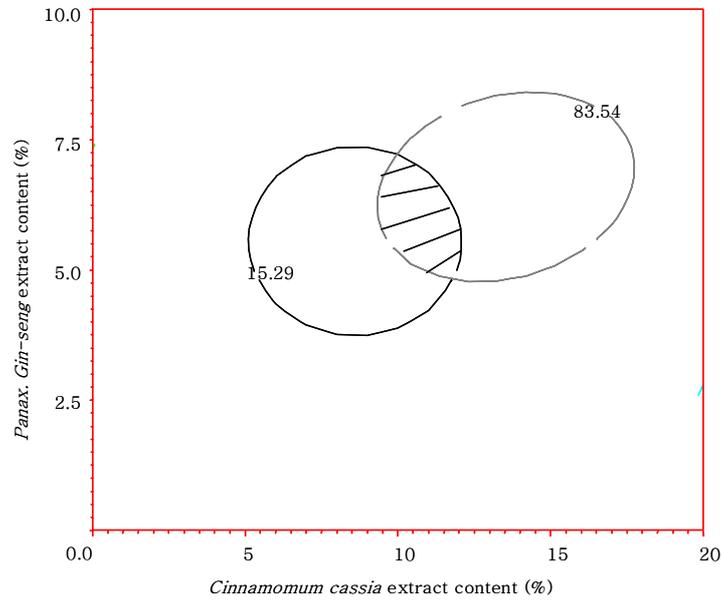


Fig. 20. Superimposed contour map of optimized condition for DPPH radical scavenging activity and total phenol content



Fig. 21. *Saururus chinensis* extract beverage

아. 삼백초를 이용한 미세캡슐화

1) 삼백초 40%에탄올 추출물의 품질 특성

최적 조건에서 추출된 삼백초 지상부의 품질 특성을 조사하기 위해 무기질, 유리당, 유기산 및 유리아미노산을 분석한 결과 Table. 16 ~ Table. 19와 같은 결과를 나타내었다. 우선 ICP를 이용하여 무기질을 분석한 결과 K의 함량이 1011.66 mg/100g로 가장 높게 나타났으며, Ca의 함량이 4.23mg/100g로 나타났다. 그 외의 무기질성분들인 Co, Cu, Fe, Mg, Mn 및 Zn은 각각 1.48mg/100g, 0.68mg/100g, 1.57mg/100g, 0.55mg/100g, 0.57mg/100g 및 0.13mg/100g으로 미량 함량을 나타내었다. 삼백초 지상부 40% 에탄올 추출물에 함유되어 있는 유리당을 분석한 결과 Table 17과 같은 결과를 나타내었다. 유리당 중 fructose의 함량이 16.98mg/100g으로 가장 높게 나타났으며, glucose의 함량이 15.88mg/100g 및 sucrose의 함량이 9.32mg/100g의 함량을 나타내었다.

Table 16. Mineral contents in 40% ethanol extract of *Saururus chinensis*
(mg/100g, dry weight)

Mineral	Ca	Co	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Zn
Content	4.23	1.48	0.68	1.57	1011.66	0.55	0.57	0.13

Table 17. Free sugar contents in 40% ethanol extract of *Saururus chinensis*
(mg/100g, dry weight)

Free sugar	Ribose	Xylose	Fructose	Glucose	Galactose	Sucrose	Maltose	Raffinose
Content	N.D ¹⁾	N.D	16.98	15.88	N.D	9.32	N.D	N.D

¹⁾ N.D. : No detect

삼백초 지상부 40% 에탄올 추출물의 유기산 함량을 HPLC를 이용하여 측정한 결과 Table 18과 같은 결과를 나타내었으며, D-malic acid가 27.97mg/100g 함량으로 가장 높은 값을 나타내었다. 그 다음으로 D-tartaric acid가 27.97mg/100g 함량으로 높은 값을 나타내었으며, citric acid가 8.39mg/100g의 함량을 나타내었다. 그 외 oxalic acid, malonic acid, succinic acid, L(+)-lactic acid 및 fumaric acid의 함량이 각각 3.06mg/100g, 1.96mg/100g, 1.51mg/100g, 1.80mg/100g 및 1.01mg/100g으로 나타났다.

삼백초 지상부 40% 에탄올 추출물의 유리 아미노산 함량을 HPLC를 이용하여 측정한 결과 Table 19와 같이 총 18종의 유리 아미노산 함량을 얻을 수 있었다. 유리 아미노산 중 Serine이 41,820 nM/100g로 가장 높은 함량을 나타내었으며, asparagine은 29050 nM/100g의 함량을 나타내었다. Valine은 14640nM/100g, proline은 13340nM/100g, isoleucine은 11390nM/100g, leucine은 10660nM/100g의 함량을 나타내었다.

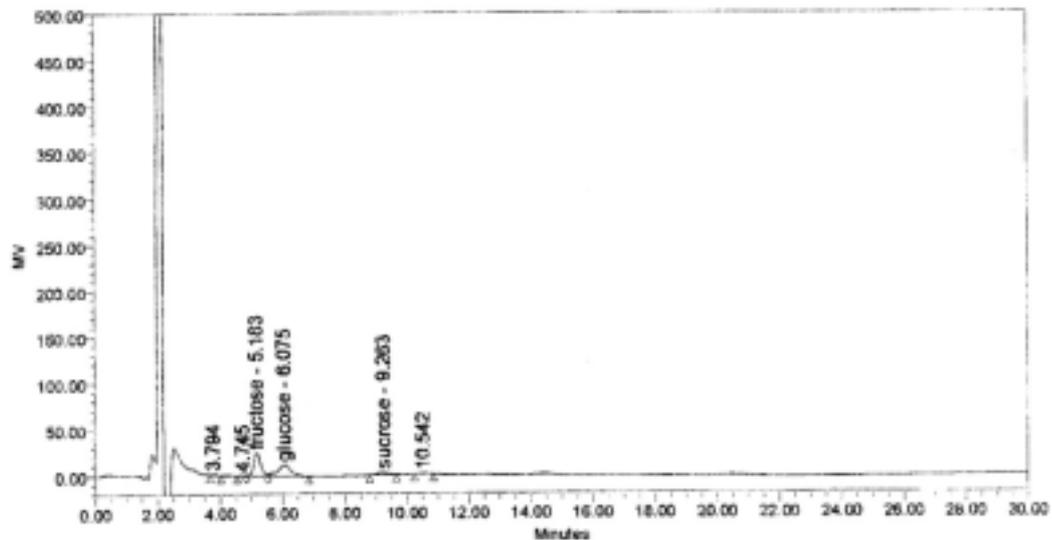


Fig. 22. HPLC chromatogram of free sugar analysis in 40% ethanol extract of *Saururus chinensis*.

Table 18. Organic acid contents in 40% ethanol extract of *Saururus chinensis*

(mg/100g, dry weight)

Organic acid	Oxalic acid	Citric acid	D-tartaric acid	D-malic acid	Manolic acid	Succinic acid	L(+)-lactic acid	Fumaric acid
Content	3.06	8.39	12.69	27.97	1.96	1.51	1.80	1.01

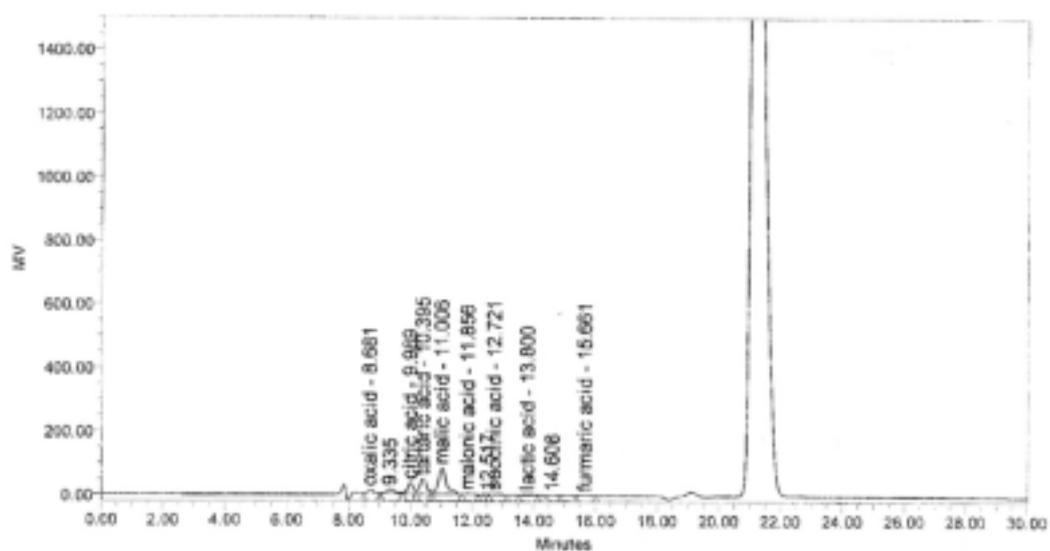


Fig. 23. HPLC chromatogram of organic acid analysis in 40% ethanol extract of *Saururus chinensis*.

Table 19. Amino acid content obtained by amino acid analyzer analysis of *Saururus chinensis* extract

(nM/100g, dry weight)

Amino acid	Asp	Thr	Ser	Glu	Pro	Gly	Ala	Cys	Val
Content	5930	7930	41820	4730	13340	3660	9700	4090	14640
Amino acid	Ileu	Leu	Tyr	Phe	His	Lys	Asn	Arg	
Content	11390	10660	2190	6520	540	430	29050	2650	

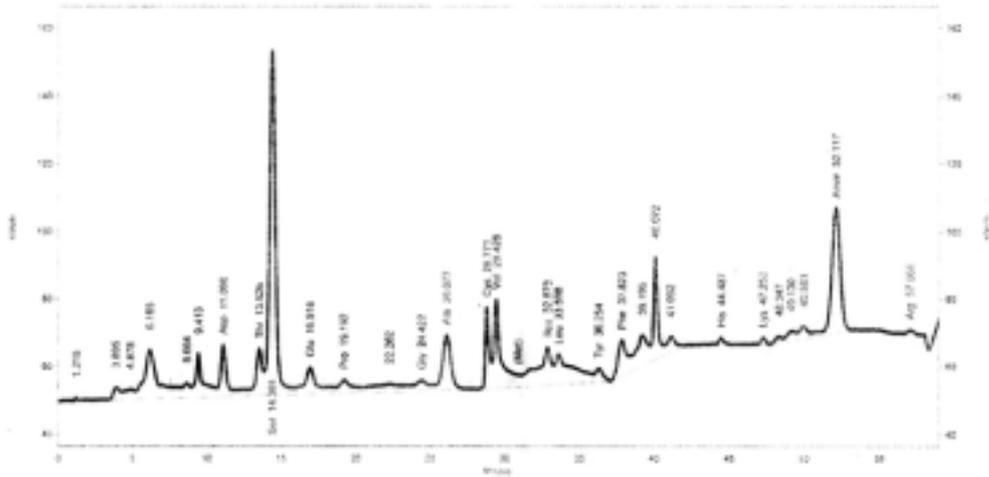


Fig. 24. Amino acid analyzer chromatogram of amino acid analysis in 40% ethanol extract of *Saururus chinensis*.

2) 삼백초의 미세캡슐화 조건에 따른 이화학적 특성 변화

삼백초 지상부의 미세캡슐화시 특성변화를 조사한 결과 Table. 20과 같은 결과를 나타내었다. 점도에 있어서는 arabic gum을 첨가하는 것이 가장 높은 값을 나타내었으며, 그 다음으로 dextrin이었다. 가장 작은 점도를 나타낸 것은 cyclodextrin이었다. 수분함량에 있어서는 dextrin으로 제조한 삼백초 분말이 3.37%로 가장 낮은 값을 나타내었으며, cyclodextrin을 첨가한 것이 5.75%로 높

은 값을 나타내었으며, arabic gum을 첨가한 것이 14.72%의 가장 높은 수분함량을 나타내었다. 제조된 분말의 용해성을 측정한 결과 모든 구간에서 95% 이상의 높은 용해성을 나타내었으며, cyclodextrin으로 제조된 삼백초 분말이 가장 높은 용해성 96.38%을 나타내었다. 수분흡습성은 dextrin으로 제조한 삼백초 분말이 가장 낮은 값인 38.66%를 나타내었으며, arabic gum이 가장 높은 46.32%를 나타내었다. 미세캡슐화된 삼백초 분말의 색도를 측정한 결과 Table. 21과 같은 결과를 나타내었다. 백색도(L값)에 있어서는 dextrin이 가장 높은 값인 74.68을 나타내었으며, 다음으로 arabic gum으로 제조한 분말이 71.11의 값을 나타내었으며, cyclodextrin으로 제조한 분말이 69.85로 가장 낮은 백색도를 나타내었다.

적색도 (a값)에 있어서는 arabic gum으로 제조한 분말이 2.62로 가장 높은 값을 나타내었으며, cyclodextrin으로 제조한 분말이 2.21의 값을 나타내었으며, dextrin으로 제조한 분말이 가장 낮은 1.58의 값을 나타내었다. 황색도 (b값)는 3가지 부용제에 따라 각각 제조된 삼백초 분말이 유사한 값을 나타내었으며, cyclodextrin으로 제조한 분말이 23.34의 값으로 가장 높은 황색도를 나타내었다. 색도 측정결과 삼백초 추출물의 색상을 가장 잘 나타내는 것을 cyclodextrin이었으며, 그 다음으로 arabic gum, dextrin을 첨가하여 제조한 삼백초 분말 순으로 나타났다. 색도에 있어 삼백초의 특성을 가장 잘 나타내는 삼백초 분말을 제조하고자 할때 부용제로서 cyclodextrin을 첨가하는 것이 가장 효과적임을 알 수 있었다.

삼백초 지상부 추출물을 이용하여 미세캡슐화 한 경우 Fig. 25와 같은 전자공여능 활성을 나타내었다. 10% cyclodextrin을 첨가하여 제조한 삼백초 분말의 경우 $79.70 \pm 2.06\%$ 의 활성을 나타내었으며, arabic gum을 첨가하여 제조한 삼백초 분말의 경우 $77.47 \pm 0.95 \%$ 의 활성을 나타내었으며, dextrin을 첨가하여 제조한 삼백초 분말의 경우 $66.98 \pm 2.33 \%$ 의 활성을 나타내었다. 각각의 조건별로 제조된 삼백초 분말의 전자공여능 활성을 측정한 결과 cyclodextrin을 첨가하여 제조한 삼백초 분말이 가장 높은 활성을 나타내는 것으로 나타났다.

Table 20. Physical properties of microcapsulated *Saururus chinensis* powders

	Viscosity	Moisture content	Solubility	Moisture sorption
A1 ¹⁾	14.0±0.10	5.75±0.25	96.38±0.77	43.97±3.26
A2	44.5±0.84	14.72±1.13	95.07±0.00	46.32±0.73
A3	15.6±0.53	3.37±0.33	95.90±0.01	38.66±4.51

¹⁾ A1; Microcapsules with 10% cyclodextrin, A2; microcapsules with 10% arabic gum, A3; microcapsules with 10% dextrin.

Table 21. Color evaluation of microcapsulated *Saururus chinensis* powders

	Color evaluation		
	L	a	b
A1 ¹⁾	69.85±0.95	2.21±0.20	23.34±0.15
A2	71.11±1.25	2.62±0.27	23.27±0.52
A3	74.68±0.59	1.58±0.14	23.12±0.35

¹⁾ The same as Table. 20

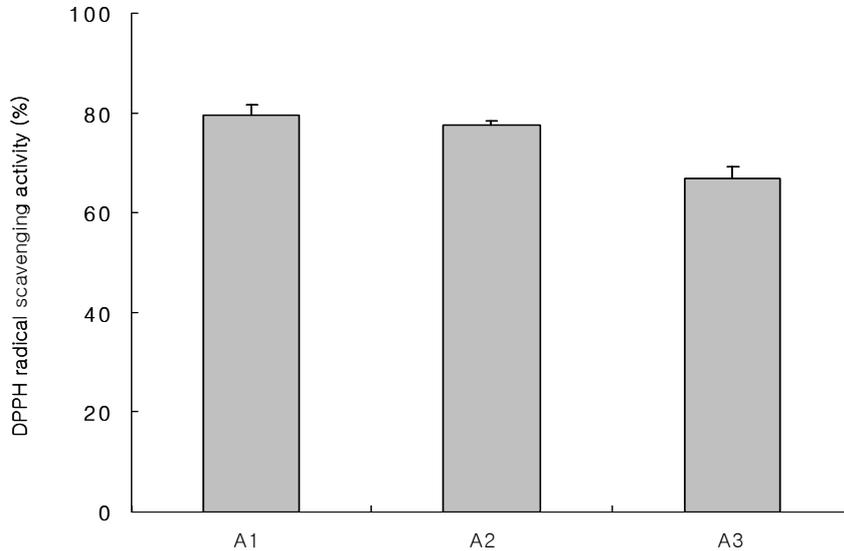


Fig. 25. DPPH radical scavenging activity of microcapsulated *Saururus chinensis* powders

A1, A2, A3 ; The same as Table. 20

3) 삼백초의 미세캡슐화 조건에 따른 분말입자 변화

삼백초 지상부 추출물의 분무건조에 따른 분말형성 상태를 조사하기 위해 주사 전자 현미경으로 분말입자를 관찰한 결과 Fig. 26과 같은 결과를 나타내었다. 10% cyclodextrin을 첨가한 경우 1000배의 배율에서 균일한 크기의 둥근 분말 입자를 나타내었으며, dextrin을 첨가한 경우가 둥근 분말의 다양한 크기와 함께 다각형의 모양을 가지는 분말 상태를 나타내었다. arabic gum을 첨가하여 삼백초 지상부를 분말화한 경우 균일한 크기의 입자를 형성하였으나 입자의 분말이 급격한 건조에 의해 응축된 형상을 나타내었다. 주사전자 현미경을 이용하여 삼백초 지상부 분말의 입자 크기 및 형태를 조사한 결과 cyclodextrin을 첨가하는 것이 가장 효율적인 형상을 나타냄을 알 수 있었다.

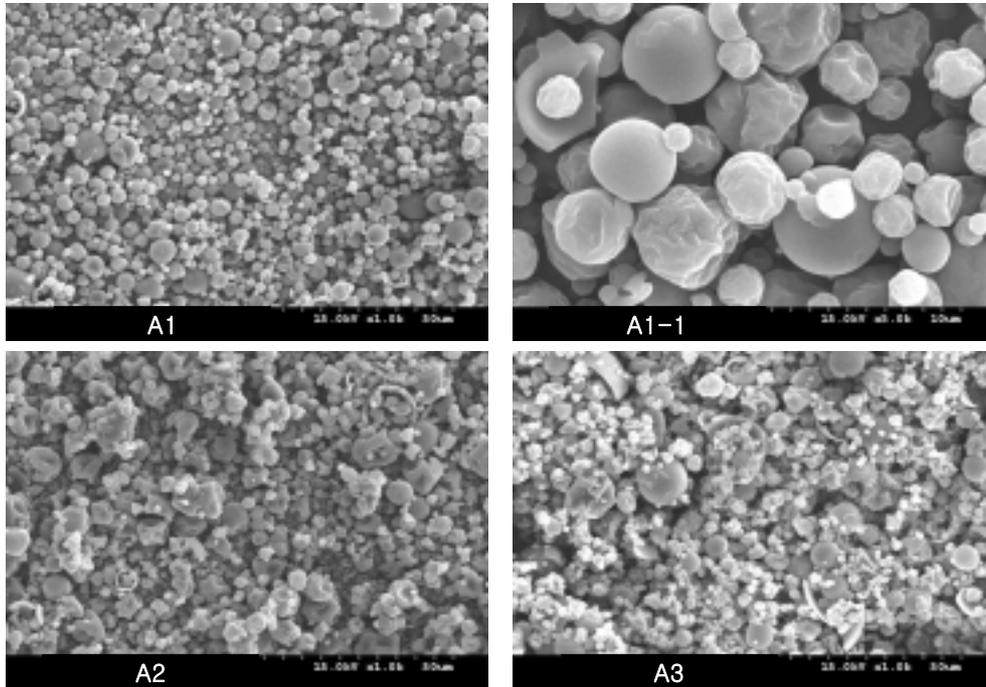


Fig. 26. Scanning electron micrographs of microcapsulated powders from the 40% ethanol extract of *Saururus chinensis*

A1, A2, A3 ; The same as Table.21, 1000

A1-1 : Microcapsules with 10% cyclodextrin, 5000

자. 삼백초를 이용한 캡슐 및 정제개발

1) 삼백초 분무건조

삼백초 지상부 40% 에탄올 추출물을 이용하여 분무건조한 결과 cyclodextrin을 이용하여 미세캡슐화하는 것이 가장 효과적이었으므로 분무건조를 다량제조하였다. 제조공정과정은 아래 도표와 같이 순차로 이루어졌다. 우선 삼백초 지상부를 40% 에탄올을 10배 가수하여 90℃에서 4시간, 추출기(대한미디어(주), Korea)를 이용하여 추출하였으며, 여과후 농축기(N-12 Model, EYELA, Japan)를 이용하여 농축한 후 부용제로 cyclodextrin을 첨가하여 분무건조기(Spray dryer, QZR-5

Model, China)를 이용하여 분무건조하였다. 삼백초 추출액의 미세캡슐화 분말의 형상 및 색상은 Fig. 27을 통해 살펴볼 수 있다.

< 분무건조 공정도 >



Fig. 27. Microencapsulation product using the 40% ethanol extract of *Saururus chinensis*

2) 삼백초 캡슐제조

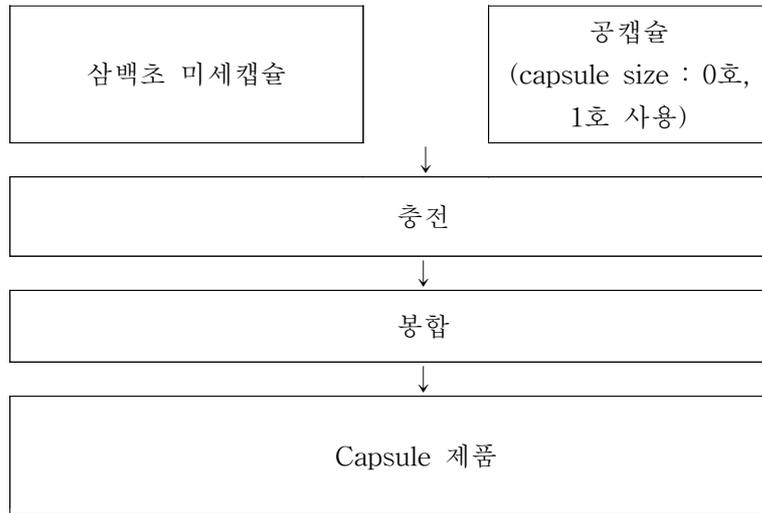
삼백초 지상부를 미세캡슐화하여 분말을 생산하였으며, 이를 가지고 캡슐에 충전하여 삼백초 캡슐을 제조하였다. 캡슐의 제조공정도는 다음 도표와 같다. 즉, 다량분무건조한 삼백초 분말을 반자동 캡슐 제조기(Semi-automatic capsule machine, 대신기계공업, Korea)에 충전한 후 공캡슐 0호 및 1호를 이용하여 캡슐 안에 삼백초 분말을 충전, 조립하는 공정을 거쳐 삼백초 캡슐을 얻었다. Fig. 28은 제조한 삼백초 캡슐을 나타낸 것으로서 왼쪽은 0호의 캡슐을 이용한 것이고 오른쪽은 1호의 캡슐을 이용해 제조한 삼백초 캡슐 제품이다.



Fig. 28. Capsule product using the 40% ethanol extract of *Saururus chinensis*

Left ; *S. chinensis* capsule No. 0, Right ; *S. chinensis* capsule No. 1

< 캡슐제조 공정도 >



3) 삼백초 정제 생산

삼백초 분말을 가지고 정제를 제조하였으며, 정제의 제조공정도는 다음도표와 같다. 우선 삼백초 지상부 추출물을 분무건조한 후 분무건조물 10g에 5% HPC (Hydroxylpropylcellulose)를 5mL, 유당 63g 및 옥수수전분 27g을 혼합한 후 60℃ 건조기에서 24시간 건조하여 과립을 형성하였다. 삼백초 지상부 분말 과립 50g에 스테아린산마그네슘 0.25g 및 탈크 0.25g을 혼합하여 타블렛 제조기를 이용하여 삼백초 정제를 제조하였으며, 제조된 삼백초 정제의 형상과 색상은 Fig. 29에 나타내었다.

< 정제제조 공정도 >

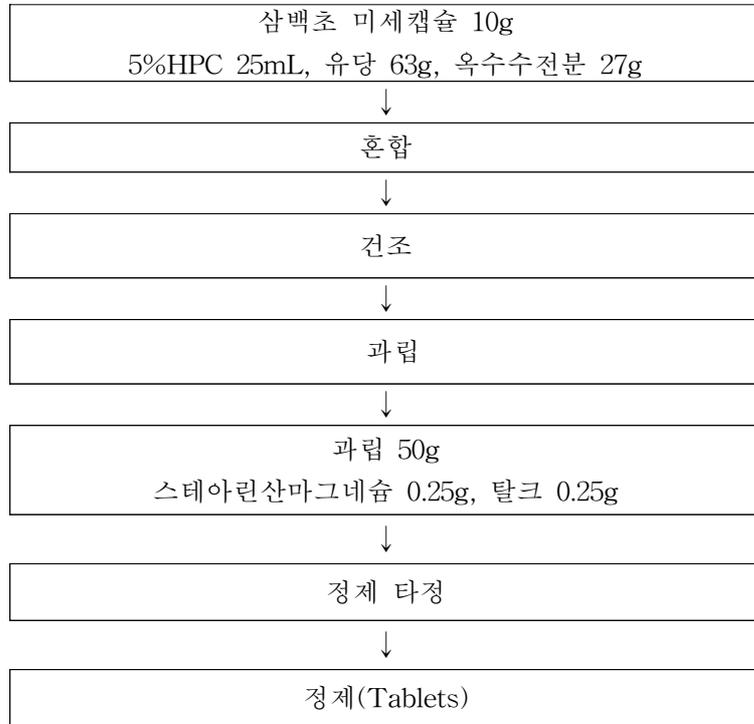


Fig. 29. Tablet product using the 40% ethanol extract of *Saururus chinensis*

차. 삼백초 제품의 품질 특성 및 동맥경화 예방 활성 검증

삼백초를 가지고 제조한 제품에 대한 색도 측정결과는 Table. 22와 같다. 삼백초 지상부를 40% 에탄올 추출하여 동결건조시킨 제품의 경우 색도 L값은 33.16 ± 1.13 의 값을 나타내었으며, a값은 2.31 ± 0.34 , b값은 6.49 ± 0.67 를 나타내었다. 삼백초 지상부를 40% 에탄올 추출한 후 cyclodextrin을 첨가하여 분무건조한 미세캡슐분말의 경우 색도 L값은 67.16 ± 0.08 , a값은 4.43 ± 0.05 , b값은 26.91 ± 0.05 를 나타내었다. 삼백초 미세캡슐화 분말을 가지고 캡슐과 정제(타블렛)을 제조한 다음 색도를 측정된 결과 캡슐은 L값 57.25 ± 3.78 , a값 3.04 ± 0.48 , b값 17.99 ± 1.25 을 나타내었으며, 정제는 L값 76.59 ± 3.71 , a값 1.28 ± 0.55 , b값 11.03 ± 0.59 을 나타내었다. 제품의 공정도가 증가할수록 백색도를 나타내는 L값은 점점 증가하는 경향을 나타내어, 제품자체가 가지는 갈색이 점점 감소하는 경향이 나타났다.

일반적으로 캡슐의 크기는 0 ~ 5호의 것이 많이 사용되며, 삼백초 캡슐제품을 위해서는 0호와 1호를 선정하여 제품을 제조하였다. 경질캡슐제는 캡슐의 몸체에 분말을 충전하여 캡을 씌워 봉합해서 제조되며, 0호의 것은 약 400 mg이 충전되는 것으로 알려져 있는데 직접 삼백초 캡슐 0호를 제조한 결과 평균중량이 318.39 ± 0.012 mg을 나타내었다. 이는 이론적인 충전중량보다 약간 낮은 값을 나타내었다. 이는 삼백초 분말이 미세한 분말입자이므로 인해 충전량이 많은 캡슐에서는 충진이 충분히 이루어지지 않았기 때문인 것으로 사료된다. 삼백초 캡슐 1호의 경우 중량편차가 299.95 ± 0.013 mg를 나타내었으며, 이론적으로 300 mg이 충전되는 수치와 비교할 때 충전율이 0호보다 높은 값을 나타내었다. 이는 캡슐 1호가 0호 보다 작은 충전량을 필요로 하기 때문인 것으로 사료된다. 삼백초 정제의 경우 중량편차가 211.96 ± 0.005 mg의 값을 나타내었다.

붕해도 시험결과 캡슐 0호는 평균 15분 41초의 붕해시간을 나타내었으며, 캡슐 1호는 평균 7분 57초의 붕해시간을 나타내었다. 타블렛의 경우 2분 24초의 붕해시간을 나타내었다. 식품공전에 제시된 캡슐의 붕해시험은 20분 안에 붕해되어야 제품으로 적합한 것으로 판정하는데 본 연구에서 제조된 삼백초 캡슐 0호 및 1호는 20분 안에 완전붕해되어 제품으로서 붕해시험에 적합한 것으로 판정되었다. 또한, 식품공전에 제시된 정제의 붕해시험은 30분 동안 붕해되는 제품을 적합한 것으로 판정하는데 본 연구에서 제조된 삼백초 정제는 30분 안에 붕해되는 결

과를 나타내었다.

Table 22. Color evaluation for several kinds of *Saururus chinensis* products

	Color evaluation		
	L	a	b
Freezing dry	33.16 ± 1.13	2.31 ± 0.34	6.49 ± 0.67
Spray dry	67.16 ± 0.08	4.43 ± 0.05	26.91 ± 0.05
Capsule	57.25 ± 3.78	3.04 ± 0.48	17.99 ± 1.25
Tablets	76.59 ± 3.71	1.28 ± 0.55	11.03 ± 0.59

Table 23. Weight variation and disintegration test for several kinds of *Saururus chinensis* products

	Capsule No. 0	Capsule No. 1	Tablets
Weight variation (mg)	318.39 ± 0.012	299.95 ± 0.013	211.96 ± 0.005
disintegration test (min : sec)	15 : 41 ± 2 : 38	7 : 57 ± 1 : 16	2 : 45 ± 58

삼백초로 제조한 제품의 전자공여능 활성을 측정한 결과 Fig. 30과 같은 결과를 나타내었다. 삼백초 지상부를 40% 에탄올 추출하여 동결건조시킨 제품의 경우 90.61 ± 2.61%이 함량을 나타내었으며, 분무건조를 통해 미세캡슐화 된 제품의 경우 67.65 ± 8.42% 함량을 나타내었다. 캡슐의 경우 58.92 ± 4.37%을 나타내었으며, 정제는 16.19 ± 0.13%을 나타내었다.

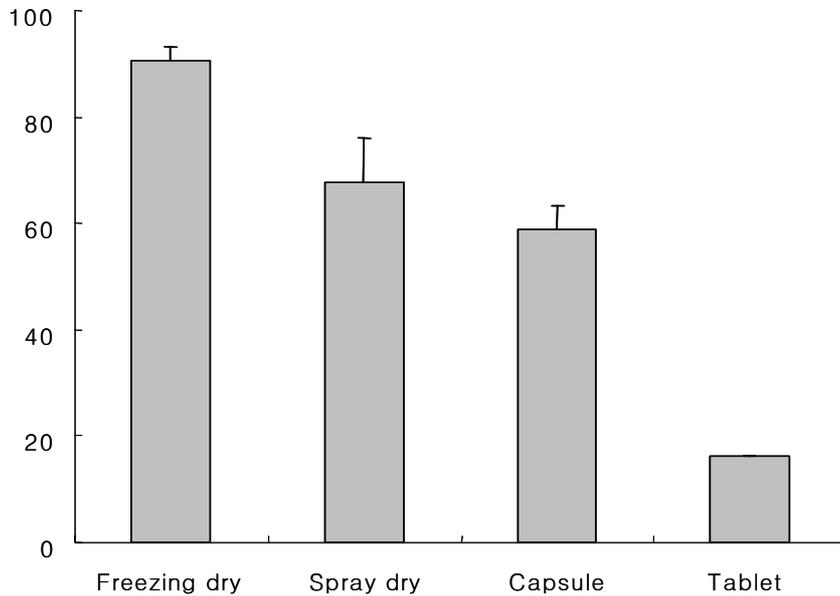


Fig. 30. DPPH radical scavenging activity for several kinds of *Saururus chinensis* products

삼백초로 제조한 제품의 총페놀 함량을 측정한 결과 Table. 24와 같은 결과를 나타내었다. 삼백초 지상부를 40%에탄올로 추출한 후 동결건조한 제품의 경우 총페놀함량이 9.25 mg%를 나타내었으며, 분무건조 제품의 경우 12.86 mg%를 나타내었다. 캡슐의 경우 6.66 mg%, 정제의 경우 0.96 mg%의 함량을 나타내었다.

Table 24. Total phenol content for several kinds of *Saururus chinensis* products

Products	Freezing dry	Spray dry	Capsule	Tablets
Content (mg%)	91.25 ± 6.77	12.86 ± 1.42	6.66 ± 0.86	0.96 ± 0.26

삼백초 제품의 LDL 산화 생성물(TBARS)을 측정한 결과 Fig. 31과 같은 결과를 나타내었다. CuSO_4 를 이용하여 LDL을 산화한 경우 동결건조제품에서는 산화억제율이 77.82%이었으며, 분무건조 제품에서는 25.52%, 캡슐은 12.76%, 정제는 2.78%를 나타내었다. AAPH(2,2'-azobis[2-amidinopropane] dihydrochloride)를 이용하여 LDL의 산화를 유도한 후 산화억제율 측정한 결과 동결건조제품은 산화억제율이 64.46%이었으며, 분무건조 제품에서는 24.79%, 캡슐은 12.06%, 정제는 8.26%를 나타내었다.

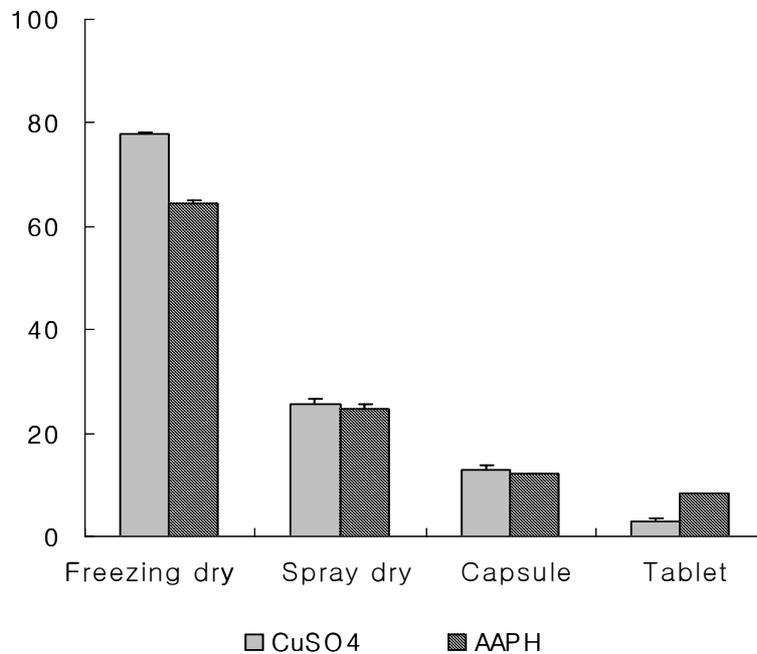


Fig. 31. LDL oxidation inhibition activities for several kinds of *Saururus chinensis* products

4. 요약

삼백초 지상부로부터 동맥경화예방 활성 물질을 분리하기 위하여, 먼저 삼백초 지상부를 음건하고 조쇄하여, 60% acetone 조추출물을 조제한 후 용매분획을 실시하였다. 용매분획 중 diethyl ether 획분이 활성산소종의 소거 활성이 우수하여 sephadex LH-20 및 분석용 HPLC column을 이용하여 2개의 주요 peak를 확인하고 분취용 HPLC로 SC 3, SC 4를 분리하고 정제하였다. 또한 활성이 뛰어난 ethyl acetate 획분으로부터 silica gel column chromatography 및 TLC를 실시하여 모두 8개의 획분으로 구분하였다. 각 획분 중 fr. 8이 가장 뛰어난 LDL 산화 억제효과를 나타내었다. 활성이 가장 강한 fr. 8을 HPLC로 분석한 결과 1개의 주요 peak를 확인하고 이를 SC 9으로 명명하고, 분취용 HPLC로 분리 및 정제하였다. 삼백초 지상부로부터 분리한 SC 3, SC 4, SC 9 성분들이 tocopherol과 유사한 정도로 LDL의 산화에 따른 conjugated diene의 생성을 억제함을 볼 수 있었다. 분리된 성분들 중 SC 9이 TBA 방법으로 측정된 LDL의 산화억제 활성이 가장 높았으며 같은 농도의 α -tocopherol 보다 높게 나타났다.

$^1\text{H-NMR}$ spectrum 및 $^{13}\text{C-NMR}$ 의 chemical shift 치와 FAB-MS 스펙트럼을 분석하여 삼백초 지상부의 SC 3, SC 4, SC 9 성분들이 각각 quercetin-3-O- α -L-rhamnoside, kaempferol-3-O- α -L-rhamnoside, quercetin-3-O-rutinoside임을 동정하였다. 삼백초 지하부로부터 용매분획, 실리카겔 크로마토그래피 및 TLC, HPLC를 이용한 분리 및 활성 조사를 통하여 SCR 1, SCR 2, SCR 3, SCR 4의 4개의 성분을 분리하였다. 활성 산소종의 소거능을 측정한 결과 SCR 4의 활성이 가장 높았다. 분리된 성분을 $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ 및 GC-MS로 분석하여, 각각 Di-O-methyltetrahydrofuroguaiacin, Saucerneol D, Machilin D로 동정하였다.

삼백초 지상부 유용성분의 최적 추출조건을 설정하고자 추출용매 및 시간 별로 제품화에 필요한 특성을 조사하였다. 최적의 추출 조건은 40% 에탄올을 사용하여 4시간 추출하는 조건이었으며, 수율, 전자공여능, 총페놀함량, 총플라보노이드 및 quercetrin 함량이 다른 추출물에 비하여 높았다. 따라서 동맥경화 예방 기능성 제품화를 위하여 삼백초 지상부를 40% 에탄올로 4시간 추출하는 것이 가장 적합한 것으로 나타났다.

삼백초 지상부의 40% 에탄올 추출물의 제품화에 필요한 이화학적 특성 중 무기질, 유리당, 유기산 및 유리아미노산 함량을 조사하였다. 무기질은 K의 함량이 1011.66 mg/100g로 가장 높게 나타났으며, Ca의 함량이 4.23mg/100g로 나타났다. 유리당은 fructose의 함량이 16.98mg/100g으로 가장 높았다. 유기산 함량은 D-malic acid가 27.97mg/100g 으로서 가장 높은 값을 나타내었다. 유리 아미노산 중 serine, asparagine이 각각 41,820 nM/100g, 29050 nM/100g 로서 높은 함량을 나타내었다.

삼백초 지상부를 원적외선에 의한 가열 추출 조건을 열수추출과 비교하여 조사한 결과 비교적 단시간인 1시간에 유사한 품질의 추출물을 얻을 수 있었다. 따라서 원적외선 가열 추출로 계피와 인삼을 혼합하여 항산화성이 향상된 제품의 제조 실험에서, 인삼 5%, 계피 10%, 삼백초 원적외선 추출물 85%를 혼합하여 음료로 제조하는 것이 가장 효과적임을 알 수 있었다.

삼백초 지상부의 40% 에탄올 추출물을 미세캡슐화에 필요한 분무건조 조건을 확립하였고, 미세캡슐화시 cyclodextrin으로 제조된 삼백초 분말이 용해성과 색도가 우수하여 기질로서 적합하였다. 또한 주사전자 현미경으로 미세캡슐 입자를 관찰한 결과 cyclodextrin 첨가한 것이 입자가 균일하고 구형에 가까운 이상적인 형태를 나타내었다.

삼백초 지상부를 분무건조한 후 반자동 캡슐 제조기를 통해 삼백초 캡슐을 제조하였으며, 전분, 스테아린산마그네슘 및 탈크를 혼합하여 삼백초 타블렛을 제조하였다. 제품의 제조공정 단계가 증가할수록 백색도를 나타내는 L값은 점점 증가하였다. 붕해도 시험결과 캡슐과 타블렛은 식품공전의 붕해도 시험에 있어 적합한 붕해 시간을 나타내어 제품으로 적합하였다. 삼백초로 제조한 제품의 전자공여능 활성을 측정된 결과 삼백초 지상부를 40% 에탄올 추출하여 동결건조시킨 제품의 경우 $90.61 \pm 2.61\%$ 이 함량을 나타내었으며, 분무건조를 통해 미세캡슐화된 제품의 경우 $67.65 \pm 8.42\%$ 함량을 나타내었다. 캡슐의 경우 $58.92 \pm 4.37\%$ 을 나타내었으며, 정제는 $16.19 \pm 0.13\%$ 을 나타내었다. LDL 산화 억제효과는 캡슐은 12.76%, 정제는 2.78%를 나타내었다.

5. 참고 문헌

1. Lee, S.T., Lee, Y.H., Choi, Y.J., Lee, Y.H., Cho, J.S. and Heo, J.S. Yield and bioactive component on different compost amounts and cultural methods of *Saururus chinensis* Baill. Korean J. Medicinal Crop Sci. 9: 220-224 (2001)
2. Lee, S.T., Park, J.M., Lee, H.K., Kim, M.B., Cho, J.S. and Heo, J.S. Component comparison in different growth stages and organs of *Saururus chinensis* Baill. Korean J. Medicinal Crop Sci. 8: 312-318 (2000)
3. Kim, B.H. and Song, W.S. The dyeability and antimicrobial activity of *Saururus chinensis*(I). J Korean Home economics 38: 1-9 (2000)
4. Lim, D.K., Choi, U. and Shin, D.H. Antioxidantive activity of ethanol extract from Korean medicinal plants. Korean J. Food Sci. Technol. 28: 83-89 (1996)
5. Park, S.S., Yu, K.H. and Min, T.J. Antioxidant activities of extracts from fruiting bodies of mushrooms. The Korean Journal of mycology 26: 69-77 (1998)
6. Lee, J.M., Son, E.S., Oh, S.S. and Han, D.S. Contents of total flavonoid and biological activities of edible plants. Korean J. Dietary Culture 16: 504-514 (2001)
7. Kim, N.M., Ko, S.R., Choi, K.J. and Kim, W.J. Effect of some factors on extraction of effectual components in cinnamon extract. J. Korean Agric. Chem. Soc. 36: 17-22 (1993)

8. Park, N.Y., Lee, G.D., Jeong, Y.J. and Kwon, J. H. Optimization of extraction conditions for physicochemical properties of ethanol extract from *Chrysanthemum boreale*. J. Korean Sci. Food Sci. Nutr. 27: 585-590 (1998)
9. Park, U.Y., Kim, Y.M., Kim, S.H. and Chang, D.S. Investigation of optimum extracting condition and antimicrobial activity of the extract from the root bark of *Morus alba*. J. Fd Hyg. Safety 10: 139-145 (1995)
10. Kwon, J.H., Belanger, J.M.R. and Pare, J.R.J. Optimization of microwave assisted extraction (MAP) for ginseng components by response surface methodology. J. Agric. Food Chem. 51: 1807-1810 (2003)
11. Blois, M.S. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. Nature 181: 1199-1201 (1958)
12. Graham, H.D. Modified prussian blue assay for total phenolic compound. J. Agric. Food Chem., 40: 801-807 (1992)
13. Kim, M.Y. Isolation and identification of antioxidative flavonol compounds from Korean garlic by-products. thesis for a doctor degree Kyungpook national university (2000)
14. Wang, S.P. and Huang, K.J. Determination of flavonoids by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. Journal of chromatography 1032: 273-279 (2004)
15. Kim, J.M., Kim, H.T. and Hwang, S.M. Instant tea preparation from *Cassia tora* seed. Korean J Food Sci Technol 22: 241-247 (1990)

16. Lee, S.Y., Shin, S.R., Kim, K.S. and Kwon, J.H. Establishment of extraction conditions for effective components from *Angelica giga* Nakai using microwave-assisted process. J Korean Soc Food Sci Nutr 29: 442-447 (2000)
17. Yoon, S.R., Jeong, Y.J., Lee, G.D. and Kwon, J.H. Changes in phenolic compounds properties of Rubi fructus extract depending on extraction conditions. J Korean Soc Food Sci Nutr 32: 338-345 (2003)
18. Chung, H.J. Antioxidative effect of ethanolic extracts of some tea materials on red pepper seed oil. J Korean Soc Food Sci Nutr 28: 1316-1320 (1999)
19. Park, N.Y., Lee, G.D., Jeong, Y.J. and Kwon, J.H. Optimization of extraction conditions for physicochemical properties of ethanol extracts from *Chrysanthemum boreale*. J Korean Soc Food Sci Nutr 27: 585-590 (1998)
20. Stein, J.H., Keevil, J.G., Donald, D.A., Aeschlimann, S. and Folts, J.D. : Purple grape juice improves endothelial function and reduces the susceptibility of LDL cholesterol to oxidation in patients with coronary artery disease. Circulation, 100, 1050-1055, 1999
21. Luc, G and Fruchart, J.C. : Oxidation of lipoproteins and atherosclerosis. Am. J. Clin. Nutr., 53, 206-210, 1991
22. Hanfang, Z., Yuzhou, Y. and Urs, P.S. : Structural requirements for the binding of modified proteins to the scavenger receptor of macrophages. J. Biol. Chem., 268, 5535-5542, 1993

23. Chang, S., Tan, C., Frankel, E.N. and Barrett, D.M. : Low-density lipoprotein antioxidant activity of phenolic compounds and polyphenol oxidase activity in selected clingstone peach cultivars. *Food Chem. J. Agric.*, 48, 147-151, 2000
24. Chalas, J., Claise, C., Edeas, M., Messaoudi, C., Vergnes, L., Abella, A. and Lindenbaum, A. : Effect of ethyl esterification of phenolic acids on low-density lipoprotein oxidation. *Biomed Pharmacother*, 55, 54-60, 2001
25. O'reilly, J.D., Tom, A.B., Sanders, H. and Wiseman, H. : Flavonoids protect against oxidative damage to LDL in vitro : Use in selection of a flavonoid rich diet and relevance to LDL oxidation resistance ex vivo?. *Free Rad. Res.* 33, 419-426, 2000
26. Gracia, M.T.S., Heinonen, M. and Frankel, E.N. : Anthocyanins as antioxidants on human low-density lipoprotein and lecithine-liposome systems. *Food Chem. J. Agric.*, 45, 3362-3367, 1997
27. Teissedre, P.S. and Waterhouse, A.L. : Inhibition of oxidation of human low-density lipoproteins by phenolic substances in different essential oils varieties. *Food Chem. J. Agric.*, 48, 3801-3805, 2000
28. Pearson, D.A., Frankel, E.N., Aeschbach, R. and German, J.B. : Inhibition of endothelial cell mediated low-density lipoprotein oxidation by green tea extracts. *Food Chem. J. Agric.*, 46, 1445-1449, 1998
29. Yoshida, H., Ishikawa, T., Hosoi, H., Suzukawa, M., Ayaori, M., Hisada, T., Sawada, S., Yonemura, A., Higashi, K., Ito, T., Nakajima, K., Yamashita, T., Tomiyasu, K., Nishiwaki, N., Ohsuzu, F. and Nakamura, H. : Inhibitory effect of tea flavonoids on the ability of cells to oxidized low density

- lipoprotein. *Biochemical Pharmacology*, 58, 1695-1703, 1999
30. Golde, P.H.M., Sloots, L.M., Vermeulen, W.P., Wielders, J.P.M., Harta, H.C., Bouma, B.N. and Wiel, A. : The role of alcohol in the anti low density lipoprotein oxidation activity of red wine. *Atherosclerosis*, 147, 365-370, 1999
31. Mazur, A., Bayle, D. Claudine, L., Rock, E. and Rayssiguier, Y. : Inhibitory effect of procyanidin-rich extract on LDL oxidation in vitro. *Atherosclerosis*, 45, 421-422, 1999
32. Iio, M., Moriyama, A., Matsumoto, Y., Takai, N. and Fukumoto, M. : Inhibition of xanthine oxidase by flavonoids. *Agric. Biol. Chem.*, 49, 2173-2182, 1985
33. Muller, H.E. : Detection of hydrogen peroxide produced by microorganism on ABTS-peroxidase medium. *Zentralbl Bakteriol. Mikrobiol. Hyg.*, 259, 151-158, 1985
34. Chung, S.K., Osawa, T., and Kawakishi, S. Hydroxyl Radical-scavenging effect of spices and scavengers from Brown Mustard (*Brassica nigra*). *Biosci. Biotech. Biochem.*, 61, 118-124, 1997
35. Luo, G.M., Qi, D.H., Zheng, Y.g., Mu, Y., Yan, G.L., Yang, T.Y. and Shen, J.C. : ESR studies on reaction of saccharide with the free radicals generated from the xanthine oxidase/hypoxanthine system containing iron. *FEBS Letters*, 492, 29-32, 2001
36. Calliste, C.A., Trouilla, P., Allais, D.P., Simon, A. and Duroux, J.L. : Free radical scavenging activities measured by electron spin resonance spectroscopy and B16 cell antiproliferative behaviors of seven plants. *J. Agric.*

Food Chem., 49, 3321-3327, 2001

37. Hermann, E., Martina, D.R., Georg, W.S. and Gunther, J. : Biochemical, structural functional properties of oxidized low-density lipoprotein. Chemical Research in Toxicology, 3, 236-254, 1990

38. Esterbau, H., Striegl, G., Puhl, H. and Rothender, M. : Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein. Free Radical Res. Commun., 6, 67-75, 1989

39. Esterbauer, H. and Cheeseman, K.H. : Determination of aldehydic lipid peroxidation product : malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. Method in Enzymology, 186, 407-421, 1990

40. An D.S., Woo K.L., Lee D.S. : Processing of powdered jujube juice by spray drying, J. Korean Soc Food Sci Nutr. 26(1). 81-86 (1997)

41. Hwang S.H., Jeong Y.J., Youn K.S. : Optimization of spray drying process for manufacturing dried vinegar using response surface methodology, Korean Journal of Food Preservation 9(2) 194~199 (2002)

42. Kang Y.C., Choi K.K., Kim K.H., Kim H.K. : Microencapsulation of aster scaber and aster glehni by spray drying, Korean Journal of Food Preservation 9(2) 212~220 (2002)

43. Lee S.W., Choi H.G., Park J.H., Kim C.K. : Preparation and evaluation of dry alcohol containing red ginseng extract. J. Ginseng Res. 24(1) 23-28 (2000)

44. Lee. S.J., Kwon Y.A., Mok C.H., Park J.H. : Interfacial properties of spray-dried Omija. Food Engineering Progress 4(1) 51~54 (2000)

45. Lee. S.C., Rhim C.H., Lee S.C. : Characteristics of spray dried polysaccharides for Microencapsulation, Korean J. Food Sci. Technol. 29(6) 1322~1326 (1997)
46. Myung-Hwan Kim : Effect of soluble starch pretreatment and storage condition on caking degree and moisture sorption of powdered onion, J. Korean Soc. Food Nutr. 20(3), 272~275 (1991)
47. Kim I.H., Seo J.B., Kim Y.J. : Preparation and characterization of polyurethane microcapsules containing functional Oil. Polymer(korea) 26(3) 400~409 (2002)
48. Lim S.B., Jwa M.K. : Microencapsulation of anchovy oil using chitosan, Food Engineering Progress. 3(2) 69~73 (1999)
49. Kim H.J., Park C.C., Kim H.D. : A study of antibacterial and aromatic fibers using microencapsulation of antibiotics and perfume, Journal of the Korean Society of Clothing and Textiles 20(3) 512~518 (1996)
50. C. Thies :Encyclopedia of polymer Science and Engineering, Wuley-interscience, New York, 9, 724 (1989)
51. Kim H.R., Song W.S. : The production of microcapsules containing fragrant material, Journal of the korean Society of Clothing and Textiles 26(5) 684-690(2002)
52. Park S.J., Kim S.H., Lee.J.R., Lee H.B., Hong S.K. : Preparation and characterization of Biodegradable Poly Microcapsules containing erythromycin by Emulsion solvent evaporation technique, Polymer(korean) 26(3)

356~334(2002)

53. Park Y.H., Baek N.J., Kim Y.J. : Preparation and characterization of microcapsules containing perfume oil, Journal of the Korean Fiber Society 38(11) 696-705 (2001)

54. Choi K.Y., Min K.S., Chang T.H. : Microencapsulation of pesticides by interfacial polymerization : 2. Polyamide microcapsules containing water-soluble drug, Polymer(korean) 15 548-555(1991)

55. Lee S.W., Park J.H., Kim C.K. : Preparation and evaluation of dry alcohol containing red ginseng extract, J. Ginseng Res. 24(1) 23-28(2000)

56. B.L. Zeller, F.Z. Saleeb and R.D. Ludescher : Trends in development of porous carbohydrate food ingredients for use in flavor encapsulation, Trends in Food Science & Technology 9 389-394 (1999)

57. Cho Y.H., Shin D.S., Park J.Y. : A study on wall materials for flavor encapsulation, Korean J. Food Sci. Technol 31(6) 1563-1569(1999)

58. M. Kieran Keogh, Brendan T. O'Kennedy : Milk fat microencapsulation using whey proteins, International Dairy Journal 9 657-663 (1999)

59. L.L. Diosady, J.O. Alberti, M.G. Venkatesh Mannar : Microencapsulation for iodine stability in salad in salt fortified with ferrous fumarate and potassium iodide, Food Research International 35 635-642 (2002)

60. Elisabetta Esposito, Franco Cervellati, Enea Menegatti, Rita Cortesi : Spray dried eudragit microparticles as encapsulation devices for vitamin C, International Journal of Pharmaceutics 242, 329-334 (2002)

61. Proctor, P.H.: Free radicals and human disease. In Miquel. J.A.T. Quintannilha. H. Weber(ed.) Handbook of free radicals and antioxidants in medicine. Vol. I, CRC Press Boca Raton. Florida. p. 17 (1992)
62. Zwart, L.L., Meerman, J.H.N., Commandeur, N.M., and Verneulen, N.P.E.: Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *free radical Biology & medicine*, 26, 202-226 (1999)
63. Nakayama, T., Niimi, T., Osawa, T. and Kawkishi, S.: The protective role of polyphenols in cytotoxicity of hydrogen peroxide. *Mutat. Res.*, 281, 77-80 (1992)
64. Bergendi, L., Benes, L., Durackova, Z. and Ferencik, M.: Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life science*, 65, 1864-1874 (1999)
65. McCord, J. M. and Fridovich, I. : Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein(hemocuprein). *J. Biol. Chem.*, 244, 6049-6055 (1969)
66. Lodivici, M., Guglielmi, F., Meoni, M. and Dolara, P.: Effect of natural phenolic acids on DNA oxidation in vitro. *Food and Chemical Toxicology*, 39, 1205-1210
67. Meydani, S.N., Wu, D., Santos, M.S. and Hay다, M.: Antioxidants and immune response in aged persons: overview of present evidence. *Am. J. Clin. Nutr.*, 62, 14625-14765 (1995)
68. Blois, M.S.: Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature*, 181: 1199-1201 (1958)

69. Iio, M., Moriyama, A., Matsumoto, Y., Takai, N. and Fukumto, M.: Inhibition of xanthine oxidase by flavonoids. *Agric. Biol. Chem.*, 49, 2173-2182 (1985)
70. Muller, H.E.: Detection of hydrogen peroxide produced by microorganism on ABTS-peroxidase medium. *Zentralbl Bakteriol. Mikrobio. Hyg.*, 259, 151-158 (1985)
71. Chung, S.K., Osawa, T., and Kawakishi, S.: Hydroxyl Radical-scavenging effect of spices and scavengers from Brown Mustard (*Brassica nigra*). *Biosci. Biotech. Biochem.*, 61, 118-124 (1997)
72. Luo, G.M., Qi, D.H., Zheng, Y.g., Mu, Y., Yan, G.L., Yang, T.Y. and Shen, J.C.: ESR studies on reaction of saccharide with the free radicals generated from the xanthine oxidase/hypoxanthine system containing iron. *FEBS Letters*, 492, 29-32 (2001)
- 73 . Calliste, C.A., Trouilla, P., Allais, D.P., Simon, A. and Duroux, J.L.: Free radical scavenging activities measured by electron spin resonance spectroscopy and B16 cell antiproliferative behaviors of seven plants. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 3321-3327 (2001)
74. Kang, M.Y.: Protective role of sesame lignans against oxidative stress. PhD. Thesis, Nagoya Univ., Japan (1999)
75. Hermann, E. Martina, D.R., Georg, W.S. and Gunther, J.: Biochemical, structural functional properties of oxidized low-density lipoprotein. *Chemical Research in Toxicology*, 3, 236-254 (1990)
76. Esterbau, H., Striegl, G., Puhl, H. and Rothender, M.: Continuous

monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein. Free Radical Res. Commun., 6. 67-75 (1989)

77. Esterbauer, H. and Cheeseman, K.H.: Determination of aldehydic lipid peroxidation product : malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. Method in Enzymology, 186, 407-421 (1990)

78. Laemmli, U.K.: Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227, 680-685 (1970)

79. AOAC : Official method of analysis. 15th., Association of Official Analytical Chemist, p770, Washington D.C. (1990)

80. AOAC : Official method of analysis. 15th., Association of Official Analytical Chemist, p70, Washington D.C. (1990)

81. Hwang, B. Y., Lee, J.H., Nam, J.B. Hong, Y.S. and Lee, J.J. : Lignans from Saururus chinensis inhibiting the transcription factor NF- κ B, Phytochemistry 64 765-771 (2003)

82. Sung, S.H., Hun, M.S. and Kim, Y.C. : New tetrahydrofuran-type sesquilignans of Saururus chinensis root. Chem. Pharm. Bull 49(9) 1192-1194 (2001)

83. Niwa, Y., Komu, T. : Far infrared ray from platinum electromagnetic wave fiber activitie leukocyte function and inhibits lipid peroxidation. *Japanese J. Inflamm.* 11: 135-146(1991)

84. Niwa Y, Miyachi Y, Ishimoto K, Konho T. : Why are natural plant medicinal products effective in some patients and not in others with the same

disease? *Planta Med.* 57: 299-303(1991)

85. Kim, H.S. and Park, J.H. : A study on application of FIR to the braun tube and influence of braun tube FIR-radiation type to a living organism(1). *J. Korean Inst. Illum. Electr. Install. Eng.* 9: 30-36(1995)

86. Kim, H.S., Park, J.H., Rho, H.M. and Chee, C.K. : A study on application of FIR to the braun tube and influence of braun tube of FIR-radiation type to a liveing organism(2). *J. Korean Inst. Illum. Electr. Install. Eng.* 9: 111-116(1995)

87. Oh, G.J., Bae, C.I., Kim, H.J., Park, S.K., Cho, E.W., Han, W.S., Chung, S.G. : Studies on the cytotoxic constituent of Saururus Chinensis (Lour.) Bail. *J Pharm Soc Korea.* 41: 704-708(1997)

88. Niwa Y, Kanoh T, Negishi M. : Activation of antioxidant activity in natural medicinal products by heating, brewing and liphilization. *A new drug delivery system. Drugs Exptl Clin Res.* 14: 361-372(1998)

89. Lee, I.S. : Effect of water extract from Saururus Chinensis(Lour.) Bail water extracts on the cancer cells and antioxidative activity in cytotoxicity. *Korean J Postharvest Sci Technol* 8: 231-216(2001)

90. Ji, C.K. : The characteristics of far infrared radiation, *J. Korean Inst. Illum. Electr. Install. Eng.* 15:4-13(2001)

91. Park, S.H. : Modern experimental design. Minyoungsa, Seoul. Korea (1991)
p.547

92. Lee, G.D., Kim, H.G., Kim, J.G. and Kwon, J.H. : Optimization for the

preparation conditions of instant rice gruel using oyster mushroom and brown rice. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 29(4), 737-744 (1997)

93. Kim, M.B., Lee, G.D., Jeong, Y.J., Lee, M.H., Lee, S.T. and Kwon, J.H. : Prediction of extraction conditions for the optimized organoleptic quality of *Eucommia ulmoides* leaf-tea. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 27(5), 914-919 (1998)

제 3 절 삼백초 동맥경화 예방 기능성의 생체검증

1. 서설

현재 식생활의 서구화로 에너지의 과잉 및 지질 섭취량이 증가되면서 비만환자나 고혈압, 뇌혈관질환, 동맥경화증 등의 심혈관계 환자의 수가 급증함에 따라 콜레스테롤 및 포화지방산이 많이 함유된 식품섭취를 제한하고 각종 섬유소와 불포화지방산 등이 많이 함유된 식품을 권장하고 있는 추세이다. 즉 단백질과 지방이 풍부한 동물성 식품과 설탕, 식염을 함유한 가공식품의 과다섭취로 인해 체내 콜레스테롤과 중성지방의 축적이 많아져 성인병의 발병 가능성이 높다는 보고에 따라 체내 콜레스테롤치를 저하시키기 위한 새로운 자연건강식품의 개발에 대한 관심도가 높아지고 있는 실정이다. 또한 경제 성장에 따른 식생활 양식의 변화로 동물성 식품 섭취 증가에 의한 순환기계 질환이 늘어나고 있으며, 그 중에서도 동맥경화증은 대표적인 질병으로 매년 증가하는 추세이므로 국민 보건상 큰 문제가 되고 있다. 동맥경화증 및 관상동맥성 심장질환에 관계되는 직접 인자는 콜레스테롤, 중성지방, 지단백, 혈장 thromoboxane B₂ 혈장과 혈소판 지질의 지방산 분포와 응집 등이며 간접적으로는 흡연, 당뇨, 비만, 과음, 카페인 음료 및 스트레스 등이 있다. 일반적으로 야채, 식물유, 어유 및 식물성단백질 등은 항콜레스테롤 효과가 있다고 알려져 있으며, 항콜레스테롤 인자로서는 식물섬유, 아미노산조성, 클로로필 a, 사포닌, 식물성 스테롤 및 다불포화지방산 등을 들 수 있다. 식이 다불포화지방산은 혈청 콜레스테롤, 중성지질 및 LDL-콜레스테롤 농도를 저하시켜 고지혈증 및 심장순환기계 질환을 예방한다고 알려져 있는데 이는 다불포화지방산이 간장에서 지방산의 합성을 억제, 장관내에서 콜레스테롤 흡수를 저해, 조직 세포로부터 콜레스테롤의 제거와 분변으로의 담즙산 배설을 증가시키기 때문이다.

한편, 삼백초(*Saururus Chinensis* (Lour.) Bail)는 삼백초과에 속하며 천성초(天性草) 또는 즈채라 불리는 다년생 초본이다. 삼백초의 전초는 각기(脚氣), 황달(黃疸), 임탁(淋濁), 대하(貸下), 옹종(擁腫), 수종(水腫), 적취(積聚) 등을 치료하고 또한 급 만성 요도염, 전립선염, 방광염, 임질, 이질을 치료하는 효과가 있다고 알려져 있다. 이러한 삼백초에 관한 연구로는 성분에 관한 연구 및 황색포도

상구균, 장티푸스균의 성장을 억제한다는 보고가 있으며, 항암 및 항산화 효과 등이 보고되어 있다. 이에 본 연구에서는 먼저 삼백초의 지상부 및 지하부 별에 따른 동맥경화증 억제 예방 및 치료효과 검증을 *in vivo assay*를 통한 동물모델 검색계로 확인하고자, Sprague-Dawley 계 웅성 rat를 이용하여 지방과 콜레스테롤을 투여하여 동맥경화를 유도한 다음 삼백초 추출물을 처리하여 체중 및 장기 무게 변화, 혈장 조직 내 지질 성분 분석, 간장 조직의 항산화 효소계의 검사 등을 실시하였다. 따라서 본 연구에서는 삼백초를 이용하여 동맥경화증의 예방 및 치료 효과를 검증함으로써, 고부가가치가 있으며 약리 효과가 뛰어난 건강기능 식품의 개발에 의한 농가의 소득 증대와 함께 국민 건강 증진에 도움을 주고자 한다.

2. 연구수행 방법

가. 실험동물 및 식이

실험동물은 체중 80~100 g의 4주령 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 온도 $21\pm 2^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $55\pm 10\%$ 를 유지하고 밤과 낮의 길이를 12시간씩 인공조명으로 조절하여 사육하였으며 사료와 물은 충분히 공급하였다. 일주일간 적응시킨 후 난괴법(randomized complete block design)에 의해 I군(정상군), II군(삼백초 40% 에탄올 추출물 0.5%첨가 식이군), III군(1% 고콜레스테롤 식이군), IV군(1% 고콜레스테롤 식이에 삼백초40% 에탄올 추출물 1%를 첨가한 군), V군(1% 고콜레스테롤 식이에 삼백초40% 에탄올 추출물 0.5%를 첨가한 군)으로 나누어 각 군마다 8마리씩 4주간 사육하였다(Table 1). 본 실험에 사용한 삼백초는 삼백초 지상부를 40% 에탄올로 4시간 동안 환류 냉각 추출하여 얻은 엑기스를 동결 건조하여 분말형태로 사용하였다.

나. 체중 증가량 및 식이 섭취량 측정

실험동물의 체중은 3일 간격으로 일정시간에 측정하였으며, 식이섭취량은 오전 10시에 매일 측정한 후 급여량에서 잔량을 감하여 계산하였다. 식이효율(food efficiency ratio; FER)은 4주간의 체중 증가량을 같은 기간의 식이 섭취량으로 나누어 산출하였다.

다. 혈장 분리 및 장기 채취

혈액은 4주간의 실험식이 급여 후 12시간 절식시키고 ether로 마취시킨 동물로부터 채취하였다. Heparin 처리가 된 주사기로 복부 대동맥에서 혈액을 채취한 후 실온에서 30분간 방치한 후 4°C , 3000 rpm에서 20분간 원심분리 하여 혈장을 분리한 후 각 성분분석에 사용하였다. 채혈 후 간, 신장 및 비장을 적출하고, 즉시 생리식염수로 혈액을 제거한 다음 각각의 무게를 측정하고, 체중 100 g당 장기무게로 환산하였다.

라. 혈장분석

혈장의 total cholesterol, HDL-cholesterol 및 triglyceride는 효소법에 의한 kit (아산제약, 한국)를 사용하여 흡광도를 측정하였으며, AST (Aspartate aminotransferase), ALT (Alanine aminotransferase)활성은 auto dry chemistry analyzer(SPOTCHEM™ SP-4410, ARKRAY, Inc., Japan)을 사용하여 측정하였다.

마. 간조직의 효소원 조제

간은 생리식염수로 관류시켜 조직내 혈액을 제거한 후 적출하였으며, 여지로 남은 기타 이물질을 제거하여 간조직 1 g당 4배량의 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.5)를 가하여 빙냉하에서 glass teflon homogenizer로 마쇄하였고 이 마쇄액을 homogenate 분획으로 하였으며 지질과산화(LPO) 및 GSH 함량 측정에 사용하였다. Homogenate 분획은 600 ×g에서 10분간 원심분리한 후 그 상등액을 10,000 ×g에서 20분간 원심 분리하여 그 침전물에 일정량의 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.5)를 가하고 현탁시켜 mitochondria 분획으로 하였다. 위의 상등액을 다시 105,000 ×g에서 1시간 초원심 분리하여 얻은 상등액을 cytosol 분획으로 하여 QR, GST, SOD 활성의 측정에 그리고 mitochondria 분획은 catalase 활성의 측정에 효소원으로 각각 사용하였다.

바. Glutathion(GSH) 함량 측정

간 조직내 GSH의 함량은 Ellman의 방법에 준하여 측정하였다. 간조직 homogenate 0.2 ml에 증류수 0.3 ml와 4% sulfosalicylic acid 0.5 ml를 가하여 약하게 섞어준 후 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 그 상등액 0.3 ml에 disulfide reagent [0.1 mM 5, 5'-dithiobis in 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 8.0)] 2.7 ml를 넣고 실온에서 20분간 반응시킨 후 412 nm에서 흡광도를 측정하였고 산화형 GSH의 표준검량선에 준하여 그 양을 산출하였다. GSH 함량은 간조직 1 g당 μmole 로 나타내었다.

사. Lipid peroxidation(LPO) 함량 측정

간 조직내 LPO 함량은 Ohkawa의 방법에 준하여 측정하였다. 간조직 homogenate 0.2 ml에 증류수 1.3 ml와 20% trichloroacetic acid에 녹인 1 mM FeSO₄ 용액 0.5 ml 및 0.8% thiobarbituric acid 1 ml를 첨가하여 최종 반응액이 3 ml가 되게 한 후 95°C에서 1시간 반응시킨 다음 실온에서 냉각시켰다. 여기에 n-butanol 5 ml를 가하여 1,000 g에서 10분간 원심분리 한 후 n-butanol층을 취하여 532 nm에서 흡광도를 측정하였고 malondialdehyde의 표준검량선에 준하여 그 양을 산출하였다. LPO 함량은 간 조직 1 g당 생성된 malondialdehyde nmol로 나타내었다.

아. Quinone reductase(QR) 활성 측정

간 cytosol 분획내 QR의 활성은 Benson 등의 방법에 준하여 측정하였다. 측정 방법은 0.07% bovine serum albumin, 0.01% Tween 20, 5 uM flavin adenine dinucleotide(FAD), 0.2 mM β-NADH 및 0 또는 10 uM dicumarol을 함유하는 2.9 ml의 25 mM Tris-HCl(pH 7.4)에 0.1 ml의 cytosol 분획을 첨가한 후 10 μl의 40 uM 2,6-dichloroindophenol(DCPIP)을 가하여 25°C에서 1분간 반응시켰다. 600 nm에서 흡광도를 측정한 다음 DCPIP의 몰 흡광계수인 21/mM/cm를 이용하여 QR의 저해제인 dicumarol이 존재하지 않을 때의 흡광도와 dicumarol 존재하의 흡광도의 차이로 활성도를 산출하였으며, 활성도는 1분간 1mg의 cytosol 단백질이 환원시킨 DCPIP의 양을 nmole로 표시하였다.

자. Glutathione S-transferase(GST) 활성 측정

간 cytosol 분획내 GST의 활성은 Habig 등의 방법에 준하여 1 mM glutathion(reduced form)을 함유하는 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 6.5) 일정량에 cytosol 분획 0.1 ml를 가하여 25°C에서 5분간 preincubation 시켰다. 여기에 absolute ethanol에 녹인 0.12 M 1-chloro-2,4-dinitrobenzene(CDNB) 25 μl를 첨가하여 최종 반응액이 3.0 ml가 되게 한 후 25°C에서 10분간 반응시켰다. 반응 종료 후 생성된 glutathion-2,4-dinitrobenzene conjugate를 340 nm에서 흡광도를 측정한 다음 CDNB의 몰 흡광계수인 9.6/mM/cm를 이용하여 활성을 산출하였으며, 활성도는 1분간 1 mg cytosol 단백질이 생성한

2,4-dinitrobenzene-glutathion의 양을 nmole로 표시하였다.

차. Superoxide dismutase(SOD) 활성 측정

간 cytosol 분획내 SOD의 활성은 Martin 등의 방법에 준하여 측정하였다. 먼저 cytosol 분획 1ml당 0.4 ml의 ethanol과 chloroform의 혼합용액(5:3, v/v)을 섞어 vortex하고 4°C의 10,000 rpm에서 30분간 원심분리 한 후 상등액을 SOD 측정용 조효소액으로 하였다. 0.1 mM EDTA를 함유하는 50 mM potassium phosphate buffer(pH 7.5) 일정량에 효소액 10 μ l를 가하고 25°C에서 5분간 preincubation 시킨 후 5 mM hematoxylin 60 μ l를 첨가하여 최종 반응액이 3.0 ml가 되게 한 다음 25°C에서 4분간 반응시켰다. 반응 종료 후 생성된 hematein을 560 nm에서 흡광도를 측정하여 활성을 산출하였으며, 활성 단위는 hematoxylin의 자동산화를 50% 억제하는 정도를 1 unit로 나타내었다.

카. Catalase 활성 측정

간 mitochondria 분획내 catalase의 활성은 Aebi의 방법에 준하여 측정하였다. 50 mM potassium phosphate buffer(pH 7.0) 1.9 ml에 1 ml의 10 mM H₂O₂와 mitochondria 분획 0.1 ml를 첨가하여 25°C에서 1분간 반응시켰다. 반응종료 후 흡광도를 측정하고 H₂O₂의 몰 흡광계수인 0.0041/mM/cm를 이용하여 활성을 산출하였으며, 활성 단위는 1분간 1 mg의 단백질이 분해하는 H₂O₂의 양을 μ mole로 표시하였다.

타. 단백질 정량

단백질 함량은 binchinoninic acid solution protein kit을 이용하여 bovine serum albumin 표준단백질 용액의 표준곡선으로부터 각 간 분획에 대한 단백질 함량으로 계산하였다.

파. 통계처리

실험결과는 SAS program을 이용하여 분산 분석한 후 유의차가 있는 항목에 대해서는 Duncan's multiple range test로 P<0.05 수준에서 시료간의 유의차를 검정하였다.

Table 1. Experimental design of animals

Groups	Diet
I	Basal diet
II	Basal diet + 0.5% CSE40 ¹⁾
III	High fat diet ²⁾
IV	High fat diet + 0.1% CSE40
V	High fat diet + 0.5% CSE40

1) 40% ethanol extract from *Saururus Chinensis* (Lour.) Bail

2) High fat included 10% of lard, 1% of cholesterol and 0.25% of sodium cholate in the diet

3. 연구수행 내용 및 결과

가. 체중증가량 및 식이효율

4주간 실험 사육한 각 군의 체중증가량, 식이섭취량, 식이효율은 Table 2와 같다. 1% 고콜레스테롤 식이군(Ⅲ군)은 정상군(I 군)에 비해 50 g 이상 증가하여 동맥경화의 위험인자 중 하나인 비만이 유도되었음을 확인하였다. 또한 일반 식이에 삼백초40% 에탄올 추출물 0.5%첨가 식이군(Ⅱ군)은 약간의 체중증가가 있었으며, 1% 고콜레스테롤 식이에 삼백초40% 에탄올 추출물을 첨가한 군(Ⅳ, Ⅴ군)은 삼백초의 농도에 관계없이 삼백초 0.1%와 0.5% 모두에서 체중의 증가가 감소하는 경향을 보였다.

식이섭취량은 삼백초 추출물의 투여에 따른 유의적인 차이는 없었으며, 식이효율은 정상군에 비해 고콜레스테롤 식이군에서 약간 높은 경향을 보였으나 유의적인 차이는 아니었다.

Table 2. Body weight, food intake, food efficiency ratio (FER) of rats fed experimental diet for 4 weeks

Groups ¹⁾	Body weight change (g/4weeks)	Food intake (g/day)	FER ³⁾
I	193.75±8.75 ^{2)b}	30.32±2.29 ^d	24.13±1.23 ^d
Ⅱ	208.83±17.59 ^b	29.71±4.16 ^{cd}	26.22±1.67 ^{cd}
Ⅲ	250.17±28.99 ^a	29.62±2.13 ^{bc}	31.76±2.23 ^{bc}
Ⅳ	200.00±9.88 ^b	26.69±2.45 ^{ab}	28.82±2.34 ^{ab}
V	204.00±18.78 ^b	28.22±4.67 ^a	27.56±1.78 ^a

1) The same as Table 1.

2) Values are expressed as mean±S.E.M.

3) FER: Body weight gain(g/4 weeks)/food intake(g/4 weeks)×100

4) Different superscripts in the same column indicate significant differences between groups at P<0.05 by Duncan's multiple comparison test.



(I)

(II)

Fig. 1. Sprague-Dawley rat picture

I : High fat diet+0.5% Ethanol extract II: High fat diet

나. 장기 중량 변화

단위 체중당 각종 장기 중량은 Table 3과 같다. 간장의 중량은 정상군에 비해 고콜레스테롤식이군에서 증가하는 경향을 보였으며, 삼백초 추출물의 투여에 따라 약간씩 감소하는 경향을 보였다. 이는 고지방 섭취로 인해 간장이 비대해지고, 동맥 내에 지질이 축적되어 관상순환의 이상으로 야기된 것으로 생각된다. 한편 신장과 비장의 중량은 각 군들 간에 큰 차이를 보이지 않았다. 식이군에 따른 장기의 외부적 변화를 Fig. 2 ~ Fig. 4에 나타내었다. 간장에 있어서는 Fig. 2에서 알수 있듯이 I군(정상군)과 II군(삼백초40% 에탄올 추출물 0.5%첨가 식이군)은 정상적인 붉은색의 색상과 간장의 크기를 보이는 반면, III군(1% 고콜레스테롤 식이군)은 고지방 섭취로 인해 색상이 지방의 색에 가까우며 크기도 비대한 것으로 나타났다. IV군(1% 고콜레스테롤 식이에 삼백초40% 에탄올 추출물 1%를 첨가한 군), V군(1% 고콜레스테롤 식이에 삼백초40% 에탄올 추출물 0.5%를 첨가한 군)에 있어서는 고지방 섭취로 인한 지방 간장의 형태를 나타내

지만 정상식이군에 가까운 크기 및 색상을 나타내고 있다. 이를 통해 고지방식군에 있어 삼백초 40% 에탄올 추출물이 지방 축적을 억제함을 알 수 있었다.

Table 3. The liver, kidney and spleen weight of rats fed experimental diet for 4 weeks

Groups ¹⁾	Liver		Kidney ³⁾		Spleen	
	Weight(g)	g/100 g(BW)	Weight(g)	g/100 g(BW)	Weight(g)	g/100 g(BW)
I	11.98±1.52 ^{2)d}	3.08±0.29 ^d	1.36±0.15 ^{ab}	0.70±0.06 ^a	0.70±0.12 ^b	0.18±0.03 ^b
II	15.51±2.95 ^c	3.80±0.69 ^c	1.40±0.30 ^{ab}	0.69±0.14 ^a	0.75±0.17 ^b	0.19±0.04 ^b
III	24.55±2.47 ^b	5.58±1.04 ^a	1.53±0.17 ^a	0.70±0.12 ^a	0.96±0.19 ^a	0.21±0.05 ^a
IV	21.96±3.16 ^{ab}	5.52±0.77 ^{ab}	1.28±0.10 ^b	0.65±0.07 ^a	0.80±0.27 ^{ab}	0.21±0.07 ^{ab}
V	19.02±1.77 ^a	4.74±0.60 ^b	1.48±0.17 ^{ab}	0.74±0.09 ^a	0.71±0.10 ^b	0.18±0.02 ^b

1) The same as table 1.

2) The same as table 2..

3) Mean of two kidneys.

4) The same as table 2.



(I)

(II)

(III)

(IV)

(V)

Fig. 2. The liver shape of rats fed experimental diet for 4 weeks

I : Basal diet, II: Basal diet+0.5% Ethanol extract, III: High fat diet, IV: High fat diet+0.1% Ethanol extract, V: High fat diet+0.5% Ethanol extract



(I) (II) (III) (IV) (V)

Fig. 3. The kidney shape of rats fed experimental diet for 4 weeks

I : Basal diet, II : Basal diet+0.5% Ethanol extract, III: High fat diet, IV: High fat diet+0.1% Ethanol extract, V: High fat diet+0.5% Ethanol extract



(I) (II) (III) (IV) (V)

Fig. 4. The spleen shape of rats fed experimental diet for 4 weeks

I : Basal diet, II : Basal diet+0.5% Ethanol extract, III: High fat diet, IV: High fat diet+0.1% Ethanol extract, V: High fat diet+0.5% Ethanol extract

다. 혈장 내 지질 수준

만성적인 고콜레스테롤혈증은 많은 역학 및 기초학적 연구에서 동맥경화증의 발병에 중요한 요인으로 받아들여지며, 특히 혈중 LDL 콜레스테롤의 감소가 관동맥질환의 병변의 퇴축과 임상적 호전을 야기시킬 수 있다고 알려져 있다. 고콜레스테롤 식이를 급여한 흰쥐의 total cholesterol, Triglyceride 및 HDL, LDL cholesterol, 동맥경화지수는 Table 4와 같다. 총 콜레스테롤의 농도는 정상군에 비해 고콜레스테롤 식이군에서 높았으며, 삼백초 추출물의 투여에 따라 약간씩

감소하는 경향을 보였다.

또한 중성지질의 경우, 정상군에 비해 다른 모든 실험군에서 낮게 나타났으며, 고콜레스테롤 식이군에서 가장 낮은 반면, 삼백초 40% 에탄올 추출물 0.5% 첨가군에서 약간 증가하는 경향을 보였다. 혈청 중 중성지질의 농도 저하작용은 모세혈관벽에 존재하는 lipoprotein lipase가 chylomicron과 very low density lipoprotein(VLDL)의 분해를 촉매하기 때문에 일어난다.

HDL-cholesterol 농도는 정상군에 비해서 고콜레스테롤 식이군에서 약간 감소하는 경향을 나타냈고, 고콜레스테롤 식이군에서 삼백초40% 에탄올 추출물을 투여한 군은 농도별로 약간 증가하는 경향을 나타냈다. LDL-cholesterol은 정상군에 비해 고콜레스테롤 식이군에서 3배 이상 증가하였으며, 삼백초 추출물의 투여에 따라 농도 의존적으로 감소하는 경향을 보였다. LDL-cholesterol은 혈중 콜레스테롤의 주된 운반형이며 동맥혈관벽에 콜레스테롤을 축적시켜 동맥경화를 촉진시키므로 혈장 LDL-cholesterol 농도와 심장 순환기계 질환의 발생과는 밀접한 상관관계가 있다. 또한 동맥경화 지수는 정상군에 비해 고콜레스테롤 식이군에서 높게 나타났으며, 삼백초 추출물의 투여에 따라 감소하는 경향을 나타냈는데, 이는 삼백초에 함유되어 있는 quercetin의 영향인 것으로 추정된다.

Table 4. Plasma lipid profile in rats fed experimental diet for 4 weeks

Groups ¹⁾	Total cholesterol (mg/dL)	Triglyceride (mg/dL)	HDL- cholesterol (mg/dL)	LDL- cholesterol ³⁾ (mg/dL)	AI ⁴⁾
I	54.21±11.13 ^c	62.09±12.94 ^{2)a}	26.26±6.76 ^{bc}	15.53±3.54 ^c	1.17±0.20 ^b
II	47.37±7.70 ^c	46.06±4.44 ^b	28.99±3.53 ^c	9.17±4.67 ^c	0.72±0.06 ^b
III	81.62±9.44 ^a	41.98±8.77 ^b	25.98±5.34 ^a	47.24±6.73 ^a	2.96±0.78 ^a
IV	74.74±5.90 ^a	49.63±6.18 ^{ab}	29.09±3.53 ^a	35.72±5.29 ^{ab}	1.61±0.33 ^b
V	65.29±9.98 ^{ab}	54.90±9.86 ^{ab}	31.59±8.76 ^{ab}	22.72±3.58 ^{bc}	1.26±0.36 ^b

1) The same as table 1.

2) The same as table 2.

3) LDL-cholesterol: Total cholesterol-(HDL-cholesterol+TG/5)

4) The same as table 2.

5) AI(Atherogenic Index): (Total cholesterol-HDL cholesterol)/HDL cholesterol

라. 혈장 내 AST 및 ALT 활성 수준

혈장 중 AST, ALT의 활성을 측정한 결과는 Table 5와 같다. AST와 ALT는 생체내 아미노산을 형성하는 역할을 하는 효소로서 여러 장기세포에 존재하지만 그 중 간에 가장 많은 양이 존재하며, 약물이나 외부적 스트레스에 의해 간조직이 손상을 받으면 혈액중 이들 효소들의 활성이 증가하게 된다. 따라서 혈중 AST와 ALT의 활성 측정은 간기능을 살펴보는 하나의 지표가 된다.

AST 활성은 정상군에 비해 고콜레스테롤 식이군에서 약간의 증가를 보였으나, 삼백초 추출물 투여군에서 점차적으로 감소하는 경향을 보여 삼백초 첨가군은 고콜레스테롤 대조군에 비해 간기능의 향상을 가져온 것으로 나타났다. ALT 활성은 고콜레스테롤 식이군들 사이에 유의적인 차이는 보이지 않았지만 AST 활성과 같이 고콜레스테롤 대조군에서 약간 증가하였으나, 삼백초 투여군에서는 조금씩 감소하는 경향을 보였다.

Table 5. Plasma levels of AST, ALT in rats fed experimental diet for 4 weeks

Groups ¹⁾	AST (IU/L)	ALT (IU/L)
I	170.48±12.86 ^{2)b}	32.06±4.11 ^b
II	171.45±11.42 ^b	31.22±3.01 ^b
III	188.52±16.70 ^a	35.63±6.15 ^a
IV	181.68±13.37 ^{ab}	34.14±4.34 ^{ab}
V	168.82±6.22 ^b	32.98±2.97 ^{ab}

- 1) The same as table 1.
- 2) The same as table 2.
- 3) The same as table 2.

마. 간 조직에서의 lipid peroxide 및 glutathione 활성

간 조직에서 free radical에 의한 간 손상의 지표로 가장 많이 이용되는 물질인 lipid peroxidase(LPO) 및 항산화제로 알려진 glutathione(GSH)의 함량을 조사한 결과는 Table 6과 같은 결과를 얻었다. 정상군에 비해서 고콜레스테롤을 투여한 군에서는 GSH의 함량이 감소하는 경향을 보였는데 이는 산화적 손상으로 발생한 지질과산화물과 GSH가 결합하는데 사용되어 낮아진 것으로 생각되며, 이는 간조직 내 지질과산화물 형성을 낮추는데 긍정적인 영향을 미친 것으로 보여진다. GSH의 고콜레스테롤군과 삼백초 추출물 투여군 사이의 함량 변화는 없었으나, LPO 함량에서는 0.5% 삼백초 추출물을 투여한 군에서 유의성 있게 감소하였다. 삼백초 투여는 간 손상의 정도와 직결되는 지질과산화물의 함량을 대조군에 비해 유의적으로 낮춤으로써 각종 간장해로부터 간 기능을 보호하고 개선시킬 수 있을 것으로 생각된다.

Table 6. The hepatic glutathione(GSH) and lipid peroxidation(LPO) levels in fasted rats

Groups ¹⁾	GSH ²⁾	LPO ⁴⁾
I	4.62±0.76 ^{3)a}	9.58±2.82 ^c
II	3.18±0.81 ^b	8.83±1.77 ^c
III	0.82±0.08 ^c	14.84±5.21 ^a
IV	0.83±0.29 ^c	11.36±1.44 ^b
V	0.93±0.20 ^c	10.91±2.98 ^c

1) The same as table 1.

2) umol/1 g of liver

3) The same as table 2.

4) The same as table 2.

5) nmols malondialdehyde/1 g of liver

바. 간 조직의 항산화효소 활성

oxygen free radical을 소거하여 항산화작용을 나타내는 유리기 해독계에 관여하는 QR, GST 및 SOD와 Catalase 활성을 나타낸 결과는 Table 7과 같다. 항산화계와 관련하여 해독 및 간보호 역할을 담당하는 효소인 QR의 활성을 측정된 결과 삼백초 추출물 투여군에서 약간의 증가를 보이기는 했지만, 유의적인 차이는 없었다. GST 활성은 고콜레스테롤군에서 유의적으로 증가하였고, 삼백초 추출물은 농도에 관계없이 유의적인 감소를 보였다. SOD의 활성은 정상군에 비해 삼백초 추출물 투여군 및 고콜레스테롤 식이군에서 증가하였으며, 특히 고콜레스테롤 식이와 0.5% 삼백초 추출물 투여군에서 유의적인 증가를 보였다. 또한 catalase의 활성은 고콜레스테롤 식이군에서 감소하였으나, 삼백초 추출물을 투여한 군에서는 그 활성이 증가하였으며, 정상식이에 삼백초 추출물을 투여한 군에서는 catalase의 함량이 크게 증가되었음을 알 수 있었다. 모든 고콜레스테롤 식이군의 GST 및 SOD 효소의 활성 증가는 free radical의 생성이 증가됨으로써 생리적 적응 현상에 따른 이들 효소의 합성유도로 여겨지며, 삼백초의 투여에 따라 GST 활성은 GSH와 지질과산화물의 결합을 촉진시키는데 사용되어 낮아진 것으로 생각되고, 삼백초 추출물의 급여에 따라 SOD와 catalase의 활성은 더욱 증가된 것으로 생각된다.

Table 7. The hepatic cytosolic quinone reductase(QR), glutathion S-transferase(GST), superoxide dismutase(SOD), activities and mitochondrial catalase activity in fasted rats

Groups ¹⁾	QR ²⁾	GST ⁴⁾	SOD ⁵⁾	Catalase ⁶⁾
I	409.76±87.03 ^{3)a}	421.27±50.77 ^b	7.75±2.89 ^b	3.85±0.44 ^{ab}
II	500.49±37.32 ^a	469.91±68.74 ^{ab}	10.51±1.70 ^{ab}	5.28±0.82 ^a
III	447.96±89.34 ^a	567.98±60.15 ^a	14.88±3.00 ^a	3.32±0.98 ^b
IV	464.31±83.86 ^a	461.43±72.59 ^{ab}	19.54±8.07 ^{ab}	3.76±0.57 ^{ab}
V	479.06±79.32 ^a	469.37±82.24 ^{ab}	20.49±6.89 ^{ab}	4.38±0.98 ^{ab}

1) The same as table 1.

2) nmols 2,6-dichloroindophenol reduced/min/mg protein

3) The same as table 2.

4) nmols 1-chloro-2,4-dinitrobenzene reduced/min/mg protein

5) units.mg protein(50% inhibition of autooxidation of hematoxylin)

6) umols H₂O₂ reduced/min/mg protein

7) The same as table 2.

4. 요약

삼백초 40% 에탄올 추출물 투여가 고콜레스테롤 식이를 섭취한 흰쥐의 혈청지질구성과 간장 기능 및 항산화능에 미치는 영향을 조사하였다. Sprague-Dawley 계의 흰쥐를 I 군(정상군), II 군(0.5% 삼백초 40% 에탄올 추출물 첨가 식이군), III 군(1% 고콜레스테롤 식이군), IV 군(1% 고콜레스테롤 식이에 0.1% 삼백초 40% 에탄올 추출물 첨가한 군), V 군(1% 고콜레스테롤 식이에 0.5% 삼백초 40% 에탄올 추출물 첨가한 군)으로 나누어 각 군마다 8마리씩 4주간 사육하였다. 실험 종료일의 체중은 고콜레스테롤 식이급여로 모두가 정상군보다 높은 수치를 보였으나, 삼백초 추출물 투여군에서는 삼백초의 농도에 관계없이 체중의 증가가 유의적으로 감소하였다. 식이섭취량 및 효율은 각 처리군 간에 유의한 차이를 나타내지 않았다. 단위 체중 당 간장의 중량은 정상군에 비해 고콜레스테롤 식이군에서 증가하는 경향을 보였으며, 삼백초 추출물의 투여에 따라 감소하는 경향을 보였으나, 신장과 비장의 중량은 각 군들 간에 유의성은 없었다. 총 콜레스테롤의 농도는 정상군에 비해 고콜레스테롤 식이군에서 높았으며, 삼백초 40% 에탄올 추출물의 투여에 따라 다소 감소하는 경향을 보였고, 동맥경화와 밀접한 상관관계가 있는 LDL 콜레스테롤 농도와 동맥경화 지수는 삼백초 40% 에탄올 추출물 투여군에서 유의적으로 감소하였다. 혈장 중 AST, ALT의 활성은 고콜레스테롤 식이군에서 증가하였고, 0.5% 삼백초 투여군에서 감소하는 경향을 보였다. 삼백초의 급여로 지질과산화물은 유의적으로 감소하였고, 유리기 해독계에 관여하는 SOD와 catalase의 활성은 더욱 증가되었는데 이는 삼백초에 함유되어 있는 quercetin의 작용으로 조직 내 항산화계 효소에 영향을 끼친 것으로 판단되었다.

이상의 결과에서, 삼백초 40% 에탄올 추출물은 혈액과 조직에서 동맥경화의 병인인 지질과 과산화지질의 농도를 낮추는 것으로 나타났으며, 이러한 작용을 나타내는 약리활성 물질의 확인과 기전을 밝히기 위해서 좀 더 심도있는 연구가 수반되어야 할 것이다.

5. 참고문헌

1. Choi. J.H., Kim. D.W., Kim. J.H., Kim. D.I., and Kim. C.M. Effect of Brown Algae (*Undaria pinnatifida*)-Noodle on Lipid Metabolism in Serum of SD-Rat. J. Korean Fish. Soc. 32(1):42~45 (1999)
2. Kim. H.S., Kim. Y.G., and Kim. G.J. Effect of Soybean Curd Refuse Supplementatoin on Lipid Composition Serum in High Fat Fed Rats. J. Agrl. Tech. & Dev. Inst. 3: 1~9 (1999)
3. Chung. C.K., Ham S.S., Lee S.Y., Oh D.H., Choi S.Y., Kang I.J., and Nam S.M. Effests of *Houttyunia cordata* Ethanol Extracts on Serum lipids and Antioxdant Enzymes in Rats Fed High Fat Diet. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 28(1):205~211 (1999)
4. Jung G.T., Ju. I.O., Choi J.S., and Hong J.S. The Antioxidantive, Antimicrobial and Nitrite Scavenging Effects of *Schizandra chinensis* RUPRECHT(Omija) Seed. Korean J. Food Sci Tehenol. 32(4): 928~935 (2000)
5. Kim H.O., and Lee Y.S. Prevent Mechanisms of β -Glucan on the Experimental Atherosclerosis in Rats. The Journal of Applied Pharmacology. 1:109-120 (1993)
6. Lee Y.W., Roh W.S., Kim J.G., and Kim P.G. Effects of *Aloe vera* in the Cholesterol and Vitamin D₂ - induced Atherosclerosis in Rats. J Fd Hyg. Safety 11(4):243~259 (1996)
7. T. Yokota, T. Hattori, K. Hasegawa and k. Watanabe. The Effect of Antioxidant-containing Fraction from Fermented Soybean food on Atherosclerosis Development in cholesterol-fed Rabbits. Lebensm.-Wiss.

u.-Technol. 29: 751~755 (1996)

8. Myron I. Cybulsky, Kaeko Iiyama, Hongmei Li, Suning Zhu, Mian Chen, Motoi Iiyama, Vanessa Davis, Jose-Carlos Gutierrez -Raos, Philip W. Connelly, and David S. Milstone. A Major Role for VCAM-1, But not ICAM-1, in Early Atherosclerosis. *J. Clin. Invest.* 107: 1255~1262 (2001)

9. Thomas P. Johnston, Lien B. Nguyen, Waihei A. Chu, Sarah Shefer. Porency of Select Statin Drugs in A New Mouse Model of Hyperlipidemia And Atherosclerosis. *International Journal of Pharmaceutics.* 229: 75~86 (2001)

10. M. ail, K. K. Al-Qattan, F. Al-Enezi, R. M. A. Khanafer, T. Mustafa. Effect of Allicin From Galic Powder on Serum Lipids And Blood Preesure in Rats Fed With a High Cholesterol Diet. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids.* 62(4): 253~256 (2000)

11. Hanna Leontowicz, Shela Gorinstein, Antonin Jojek, Maria Leontowicz, Milan Ciz, Robert Soliva-Fortuny, Yong-Seo Park, Soon-Teck Jung, Simon Trakhtenberg, Olga Martin-Belloso. Comparative Content of Some Bioactive Compounds in Apple, Peaches And Pears And Their Influence on Lipids And Antioxidant Capacity in Rats. *Journal of Nutritional Biochemistry.* 13:603~610 (2002)

12. Bae. J.H. Effect of *Saururus chinensis* Baill on Lipid Metabolism Against TCDD Damage. *J. Fd Hyg. Safety.* 18(3):166~170 (2003)

13. Lee. Y.J., Shin. D.H., Jang. Y.S. and Shin. J.I. Antioxidative Effects of Fractions From Sequential Ethanol Extracts of *Houttuynia cordata*, *Potrulacaceae* And Sesame Cake. *J. Korean Soc. Food Nutr.* 25:283 (1993)

14. Workoff. A.W., Ketly. J.N., and Waggoner. J.G. Hepatic Accumulation and Intracellular Binding of Conjugated Bilirubin. *J. Clin. Invest.* 61:142 (1978)

15. Prohaska. J.P. and Ganther. H.E. Glutathion peroxidase Actiyities of Glutathion-S-S\Transferase Purified From Rat Liver. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 76:487 (1977)

16. Kang. J.O. and Kim. K.S. The Effect of Dry Edible Leaves Feeding on Serum Lipids of Hypercholesterolemic Rats. *J. Korean Soc. Food Nutr.* 24:502 (1995)

17. Shon. Y. S. Studies on Hyperlipidemia in Korean(1) Hyperlipidemia in Normal And Hypertensive Person. *J. Korean Medical Asso.* 18:354 (1975)

18. Vahouny, G. V., T. Roy., L.L Gallo., J.A. Story., D. Kritchevsky. *Am. J. Clin. Nutr.* 33:2182 (1980)

19. Rudle, L.L., M.D., Morris. Determination of Cholesterol Using α -phthalaldehyde. *J. Lipid Res.* 14:364~366 (1973)

20. Lowry, O.H., Roseborough. N.L., Farr. L.A., and Randall. R.J. Protein Measurement With The Folin-Phenol Reagent. *J. Biol.hem.* 193:265~275 (1951)

21. Choi. J.H., Kim. J.I., Kim. D.W., and Oh. D.H. Effect of Alginic Acid-added Yoghurt on Inhibitor of obesity And Physiological Action of Rats. *Kor.j. Gerontol.* 3(2):123~128 (1993)

22. Choi. J.H., Kim. D.W., Moon. Y.S., Kim. J.I., Lee. D.S., and Pyeun. J.H. Feeding Effect of Dietary Fiber-added Instant Noodle on Biological Action of Rats. *Kor. J. Gerontol.* 5(2):88~92 (1995)

23. Kim. J.I., Kim. I.S., Moon. Y.S., and Choi. J.H. Effect of Brown Algae Component on Lipid Metabolism in Obese Rats Induce By A High Fat Diet. *Kor. j. Gerontol.* 3(1):33~38 (1993)
24. Anderson. J.W. and Chen. W.L. Plant Fiber, Carbohydrate and Lipid Metabolism. *Am. Clin. Nurt.* 32:346~363 (1979)
25. Anderson. J.W. Physiological And Metabolic Effect of Dietary Fiber. *Fed. Proc.* 44:2902~2909 (1985)
26. Anistchow. N. and Chalатов. S. Ueber Experimentelle Cholesterinstetase Und Die Bedeutung Fur Die Entstehung Einiger Pathdogischer Prozesse, *Zebtrable. Allg. pathol.* 24:1~9 (1913)
27. Avogaro. P., Bittolo. B.G., Cazzolate. G. and Quincy. G.B. Are Apolipoproteins Better Discriminators Than Lipids For Atherosclerosis? *Lancet* 1:901~903 (1979)
28. Bridges. S.R., Anderson. J.W., Deakins. D.A., Dillon. D.W., and Wood. C.L. Oat Bran Increases Serum Acetate of hypercholesterolemic men. *Am. J. Clin. Nutr.* 56:455~459 (1992)
29. Dietschy. J.M. and Wilson. J.D. Regulation of Cholesterol Metabolism. *N. Engl. J. Med.* 282:1128~1138, 1241~1249 (1970)
30. Goldstein. J.L. and Brown. M.S. The Low-density Lipoprotein Pathway And Its Relation To Atherosclerosis. *Annu.Rev. Biochem.* 46:897~930 (1977)

31. Hamsten. A. Apolipoprotein, Dyslipoproteinaemia And Premature Coronary Heart Disease. *Acta. Med. Scand.* 223:389~403 (1988)
32. Holman. R.L., McGill, Jr. H.C., Strong. J.P., and Geer. J.C. Technics For Studying Atherosclerotic Lesions. *Lab. Invest.* 7:42~47 (1958)
33. Perinkulam. R.D., Palaninathan. V. Protective Effects of Certoparin Sodium, A Low Molecular Weight Heparin Derivative, in Experimental Atherosclerosis. *Clinica Chimica Acta* 339:105-114 (2004)
34. Robert, S. R. Stains in Atherosclerosis: Lipid-lowering Agents With Antioxidant Capabilities. *Atherosclerosis xxx* 1-13 (2003)
35. M.R. Safari., N. Sheikh. Effects of flavonoids on the sysceptibility if low-density lipoprotein to oxidative modification. Prostaglandin, Leukotriens and essential Fatty acids. 69:73-77 (2003)
36. Lee. S.M., Kim. S.S., Oh. M.S., Kim. E.S., and Koh. K.H. Antioxidant Effect of Quercetin with Rice Bran Oil in High Cholesterol-Fed Rats. *Food Sci. Biotechnol.* 11(5):490-493 (2002)
37. T. Hayek., B. Fuhrman., J. Vaya., M. Rosenblat., P. Belinky., R. Coleman., A. Elis., and M. Aviram. Redused Progression of Atherosclerosis in Apolipoprotein E-Deficient Mice Following Consumption of Red Wine, or Its Polyphenols Quercetin or Catechin, Is Associated With Reduced Susceptibility of LDL to Oxidation and Aggregation. *Arteriosclerosi. Thrombosis, and Vascular Biology.* 17:2744-2752 (1997)
38. Lee. S.T., Lee. Y.H., Choi. Y.J., Shon. G.M. Comparison of Quercetin Soluble Tannin in *Houttuynia cordata* THUNB. according to Growth Stages

and Plant Parts. J.Korean Medicinal Crop Sci. 10(1):12-16 (2002)

39. Antonio M. Gotto, JR, MD, DPHIL, FACC. Antioxidants, Statins, and Atherosclerosis. J.American college of Cardiology Foudation Published by Elsevier Science Inc. (2003)

40. Ann. M., Benson, Markus, J., Hunkeler, and Paul. T. Increase of NAD(P)H:quinone reductase by dietary antioxidants: Possible role in protection against carcinogenesis and toxicity. J. Proc Natl. Acad. Sci. USA. 77(9):5216-5220 (1980)

41. William H. Hanbig, Michael J. Pabst, and William, B.J. Glutathione S-Transferases. J. Biological Chemistry. 249(22):7130-7139 (1974)

42. Akinyanju, P. and J. Yudkin. Effect of coffee and tea on serum lipids in the rats. Nature. 214:426 (1967)

43. kimura, M., and Y. Hiromi. Interaction in the antibacterial activity of flavonoid from *Sophora japonica* L. to propionibacterium. J.Yakugaku Zasshi. 104:340-346 (1984)

44. Matsuzaki. T.K. and Y. Hara. Antioxidant activity of tea leaf catechins. J. Nippon Nogeikaku kaishi. 59:129 (1985)

45. Veckenstedt. A. and R. Pusztai. Mechanism of antiviral action of quercetin against cardiovirus infection in mice. J. Antiviral Res. 1:249-261 (1981)

46. Kim, S. K., Lee, S. C., Min, G. G., Lee, S. P., and Choi, B. S. Effect of organic matter applicants on essential oil contents and composition in *Anthriscus sylvestylis* Hoffm. J. Korea Medical crop Sci. 6(1):21~27(1984)
47. Skousen, M. B. Aloe vera handbook. Aloe vera research insitute. 35~37(1979)
48. Lee, Y.J., Shin, D.H., Chang. Y.S. and Kang, W.S. Antioxidantive effect of *Rhus Javanica Linne* extract by various solvents. J. Korea Food Sci.Technol. 25:677~682 (1993)
49. Jeong E.J. Antioxidative And Nitrite Scavening Effect of Solvent Extract From Gyrophora Esculenta. J. Korean Food Nutr. 11:426-430 (1998)
50. Seo. K.I., Lee. S.W., and Yang. K.H. Antimicrobial and antioxidantive activities of corni frustus extracts. J Korea Postharvest Sci. Technol. 6:99~103 (1999)

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

◦ 각종 성인병을 비롯한 순환기 계통 질환에 약효가 있어 현재 점차적으로 재배가 증가하고 있는 삼백초의 동맥경화 예방 기능성 성분의 분리, 동정과 건강기능성 제품 개발 연구를 수행하였다.

◦ 동맥경화 예방 기능성 성분으로는 지상부에서 quercetin-3-O- α -L-rhamnoside, kaempferol-3-O- α -L-rhamnoside, quercetin-3-O-rutinoside의 3종의 플라보노이드를 분리동정하였고, 지하부에서 Di-O-methyltetrahydrofuruigai, Saucerneol D, Machilin D, 3종의 sesquilignan을 분리하고 화학적 구조를 동정하였다.

◦ 이들 성분의 효율적 추출공정을 확립하여 이를 근거로 하여 40% 에탄올 추출물을 제조하고, cyclodextrin을 기질로 하여 미세캡슐화하여 캡슐 및 정제 제품을 개발하고 이들의 산업적 제조 공정 및 조건을 확립하고, 개발 제품의 기능성 및 물리적 특성을 조사하였다.

◦ 또한 동물실험으로 고지방 식이군에 대한 삼백초 40% 에탄올 추출물 투여효과를 조사하여, 혈장지질 개선 및 항산화효소계 활성화에 미치는 효과를 조사하여 동맥경화 예방 효과를 생체 검증하였다.

◦ 따라서 본 연구 계획 시 기대한 연구 목표를 십분 달성하였다고 사료된다.

◦ 본 연구는 삼백초 재배 농가 소득 양양과 국민 보건 증진에 기여하고, 국가적 의료비 절감 등의 부수적 효과를 기대할 수 있다.

◦ 건강기능성 식품에 관한 법률이 제정되고, 시행령, 기능성시험법 등의 규정이 제정되어, 향후 국내에서도 연구 개발이 가속화되는 시점에서 본 연구는 이러한 건강기능성 식품 개발 연구의 선행적 연구로서 활용될 것으로 기대된다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

- 본 연구를 통하여 개발된 미세캡슐화 기술은 참여 기업 및 삼백초 재배 가공 농가에 기술 이전하고자 함.
- 삼백초의 동맥경화 예방 활성이 생체내외의 실험에서 검증된 결과는 추후 개발제품의 건강기능성 제품화 자료로서 활용하고자 함.
- 본 연구 결과 중 일부는 국내외 학술 잡지에 게재되어 관련 학문과 기술의 개발에 이바지될 것임.
- 향후 본 연구에서 구명되지 않은 기능성 성분과 보다 다양한 기능성 제품 개발, 생체 내에서 동맥경화예방 활성의 메카니즘적인 연구가 필요함

주 의

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