

최종보고서

## 한약제중에서 우유 아레르기를 치료하는 성분의 정제·분리

한약제중에서 우유단백질의 Allergenicity를 억제하는 물질의 분리

연구기관

전북대학교 농과대학 축산학과

농림수산부

1995-1

농림부 자료실
등록번호: 5882
등록일: 2001년 5월 24일
비고:

## 최종(연차) 연구보고서

1995년도 현장에로기술사업에 의하여 완료된(개발중인) 한약제중에서  
우유 아레르기를 치료하는 성분의 정제·분리에 관한 연구의 최종(연차)  
보고서를 별첨과 같이 제출합니다.

첨부 : 1. 최종(연차) 보고서 3부

2. 자체평가 의견서 1부

1995. 12. 15.

주관연구기관 : 전북대학교

총괄연구책임자 : 이 부 응

주관연구기관장 : 전북대학교 총장 직인



농림수산부장관 귀하

# 제 출 문

농림수산부장관 귀하

본 보고서는 “한약제중에서 우유 아레르기를 치료하는 성분의 정제·분리”과제 (세부과제 “한약제중에서 우유 아레르기를 치료하는 유효성분의 정제”에 관한 연구)의 최종보고서를 제출합니다.

1995. 12. 15.

주관연구기관명 : 전북대학교

총괄연구책임자 : 이 부 응

연 구 원 : 최 순 호

# 요 약 문

## I. 제목

한약제중에서 우유 알레르기를 치료하는 성분의 정제·분리에 관한 연구

## II. 연구개발의 목적 및 중요성

국내에서는 UR 농산물 시장 완전 개방이라는 국면에 접어들어 따라 외국에는 없는 신제품들이 개발되어야 국내에서 외국 제품과 경쟁력이 있어 국내 유가공 산업이 생존할 수 있다고 보여진다. 신제품의 개발 방향은 저 알레르기(hypoallergenic) 단백질이 개발되어야 하는데 저 알레르기 단백질을 개발하는 방법 중에 하나로 항알레르기 인자를 첨가하는 방법을 생각할 수 있다. 왜냐하면 단백질의 구조를 변화시켜 알레르기를 감소시키는 것은 한도가 있기 때문이다. 여기에서 우리는 다음과 같은 점에 착안할 필요가 있다. 즉, 한의학에서 알레르기를 치료하는 청열(淸熱)제들이 있음을 보아야 한다. 연구 책임자는 일본 신슈 대학에서 습득한 기술과 한약제중 항 알레르기 성분 검색을 복합하여 연구 테마를 전하게 되었다. 국내에서도 신약 개발이 국가를 명제하여 과기처와 보건 복지부가 많은 연구를 장려하고 있으나, 항 알레르기제 검색에서는 아직 방대한 연구가 진행되었지 않고 몇 사람이 수행 중에 있는 정도이다. 또 아시아에서는 일본과 중국이 생약에서의 유효 성분 정제에 많은 노력을 투자해서 일부분에서 성과를 나타내고 있을 뿐만 아니라 유럽에서 불란서 독일에 생약학파가 증설되고 이태리와 폴란드에는 생약 연구소가 있어 그 연구가 활발히 진행되고 있다. 미국에는 NAPRALERT(Natural Products Alert)라고 하여 Illinois 대학에서는 천연물 화학 연구 정보를 제공하는 Data Base가 구축되었는데 이것은 세계 보건 기구와 미국 암연구소가 지원하였다. 특히 폴란드에서는 중약 대전에서 유명한 처방의 ext를 유럽에 수출하고 있을 정도이다. 이는 말할 것도 없이 신약과는 달리 생약의 장점 때문일 것이다. 지금 현재의 상황은 한의학적 생약 외에 치료 방법에 관해서는 우리가 앞서지만 성분의 분리, 동정 기술 및 합성에는 유럽보다 열세라고 할 수 있다. 지금까지 이러한 상황하에서 우리의 연구 방향이 국가적으로 천연물 연구 개발에 노력을 총 집중할 필요가 있다고 결론 내려진다. 지금까지는 천연물 화학은 주로 한의학, 약학, 화학 분야에 있는 일부 사람들만이 연구하였는데 생약 자체가 대부분 대개 식물로써 농학의 제배에 속해 있다는 것을 주시할 필요가 있다. 국가적으로 농학 자체가 농산물 시장 완전 개방이라는 국면을 맞이하여 존폐라는 위기까지도 생각할 수 있는 이즈음에 우리는 천연물에서 신물질(약) 개발에 주안점을 주어야 할 필요가 있다고 본다.

천연물에서 신약(생리 활성 물질)의 개발은 다른 전자, 중공업보다 투자비가 적게 들고 회전과 회수가 빠르고 성공율도 높은 장점이 있다. 다시 말해서 일정한 신약이 개발되면 유희시간이나 소득이 낮은 밭을 이용 다량 제배하여 영기서 추출 분리한 물질을 약제화하여 국내는 물론 수출을 함으로써 UR 시장 개방에 농업 전 분야에 걸쳐 적극적 대처를 하는 것이다. 제품 다양으로 낙농업의 수지 개선으로 낙농 산업이 안정되고 일반 작물을 제배하던 농가들이 약초를 제배함으로써 소득이 증대되어 제배 농가를 보호할 수 있다.

### Ⅲ. 연구 개발 내용 및 범위

본 연구가 성공되면 수출 증대, 기술 이전, 신약 개발의 국제적인 우위등 그 파급효과 등을 기대할 수 있고, 이 연구의 특성은 아레르기를 일으키지 않는 유제품을 개발하여 단기적으로 UR의 낙농 시장 개방에도 대응하여 낙농가를 보호하고 유제품 생산 공장 현장에서의 문제점을 개선, 약초 제배 농가의 수익 증대, 장기적으로는 부가가치가 높은 약제의 산업화를 목적으로 한다. 신(생)약의 개발은 정부가 주도하는 중점 추진 개발이므로 본 연구는 농민(업)의 보호와 첨단 기술개발(의약)의 양면을 가지고 있는 시위에 적합한 주제이다. 아레르기에 관한 질병이 원인이 규명된 이래 아직도 치료 예방약이 개발되고 있지 않고 있기 때문에 우유의 소비도 부분적으로 제한되는 것으로 사료된다. 우유의 성분을 아레르기가 덜 일어나도록(hypoallergenic)하는 가공학적, 생화학적 방법을 동원한다 해도 단백질 구조상 해결책에 한계가 있다. 다시 말해서 식품 자체의 처리만으로는 allergy를 100%억제가 불가능하므로 억제 인자를 외부에서 유제품에 첨가하여 아레르기가 적은 유제품을 개발하는 것은 두가지 장점이 있다. 우선 약제 개발까지는 장기간이 소요되므로 연구 초기에 얻을 수 있는 결과를 이용하여 신제품을 개발하는 것이다. 다시 말해서 연구 초기에 확인된 유효 성분의 조정제물(粗整製物)을 유제품에 첨가하여 아레르기를 억제하는 유제품을 개발하여 UR 낙농 시장 개방에 대응하여 (왜냐하면 외국에는 이런 제품이 없기 때문) 국내 낙농가들을 보호하고 장기적으로는 생약의 약제 산업화를 시도하는 것이다. 이 방법은 약제 산업 이용의 다면화에 기여할 수 있다. 배경에서도 논급한 바와 같이 전통 한의학 원리와 이론에 의하면 청혈제들이 아레르기 증상에 처방되므로 이들이 allergy를 억제하는 인자들을 함유할 수 있는 가능성은 확실하다. 천연물에서 분리한 생리 활성 물질은 화학적으로 새로운 물질보다 안전성에 큰 이점이 있다는 것을 인식할 필요가 있다. 정제 방법에 문제만 없으며, 이 연구는 기술적으로 성공 가능성이 상당히 높다고 할 수 있다.

또 중요한 것은 이용되는 기술상 큰 난점이 없기 때문에 정제의 선진국 전문가들에게 약간의 조언만 받으면 우리의 수준으로 충분히 수행될 수 있다는 것이다.

정확히 예측하기는 어렵지만 20종의 한약제 중 여러 종류의 인자가 확인되어 그 중에서는 면역 치료에 중요한 역할을 하는 성분이나 예방이 가능한 성분도 개발될 가능성이 있어 이 주제는 아주 중요하다고 보여진다. 외국 교수의 자문 받을 수 있는 기관은 다음과 같다. 일본 신슈대학교 농대 축산학과 大元 容 교수, 불란서 Nancy-1 대학 응용 생화학 연구실 Linden교수, 이태리 Roma대학교 천인물 화학 연구 소장 Piancatelli교수, 오스트리아 Wien대학교 생약학 연구소 Kubelda 교수, 스웨덴 Pharmacia 社 실험실장등,

외국에는 없는 알레르기가 없는 유제품이 개발됨으로 UR 시장 개방 후에도 우유 생산 낙농가, 유가공 산업체 및 그 관련 산업체들이 보호되어 국가 산업의 균형을 유지, 식량 안보 차원에서 후세에게 농업을 물려줄 수 있고 한약제들 중에서 알레르기를 치료도 하고 예방도 할 수 있는(별로 혹은 동시에) 약제가 개발된다면 경제적 파급효과는 지대할 뿐 아니라 투자에 대한 수익성이 어떤 산업보다 높고 어떤 약제보다 수익성이 높다고 할 수 있다. (투자 효율성) 그야말로 값싼 약초로부터 부가가치가 높은 약제가 개발되는 것이다. 국내 수요는 물론 국제 시장에 소요량(국제 물질 특허)을 환산한다면 외화 획득의 잠재력은 상상하기 어려울 정도로 막대하다고 할 수 있다.

유제품이 다양화되어 국민들이 다양한 종류의 유제품 선택 가능성이 높아져 생활 수준의 향상을 가져오고 아울러 영양 증진의 효과와 치료 예방제의 생산으로 질병을 감소시킴으로써 국민 보건 경제에 기여하는 바 크다고 할 수 있다.

#### IV. 연구 개발 결과 및 활용에 대한 건의

본 연구에서 Data base(NAPRALERT) 통한 문헌 정보 수집과 유효 성분 선행 연구 조사를 완료하였고 유효 성분을 효과적으로 추출하는 방법 정립, 300종의 한약제 PCA검색, 300종중 약 40종이 알레르기 억제 한약을 검색, 잠정적으로 알레르기 억제 효과가 다양한 in vivo(Active Anaphylaxis, Anaphylatic Sock Score, 조직화 검사) 방법으로 알레르기 억제 효과가 인정되었다. 또 식품중 대표적 알레르기성 식품(우유, 계란, 계육, 밀)의 항혈청 제조, 조추출물의 일반 성분 분석, 유효 성분이 인정된 약제와 추출물과 우유 반응(가공 목적), 관능 검사(가공 목적), 가열 안전성(가공 목적), 정제를 위한 분리 조작 체계(LC, HPLC, TLC, GC, 전기 영동)를 정립하였다.

지금 상태에서는 각 세부 과제가 부분적으로 진행되어 확고한 방안을 내기는 어렵지만 본 연구를 계속적으로 진행한다면 확실한 방안이 나올 것으로 기대되고 계획서에서 밝힌 데로의 활용 방안(유가공 공장에서 개발 제품 생산 유도, 약초 재배 지도 촉진(농촌진흥청), 임상 실험(제약회사가 병원협의를), 제약화 유도, 국제 물질 특허출원, 신물질의 국제적 홍보, 신물질 개발을 위한 장비 구입에 정부 보조 건의, 학술지 발표, 분자 구조의 완전한 구조 결정 착수, 다른 물질 검색, 분리 정제에도 활용할 수 있도록 응용 방법 모색)이 나올 것으로 예상된다.

## SUMMARY

### (영문 요약문)

The presence of antiallergenicity was screened among the medicinal herbs by use of the passive cutaneous anaphylaxis(PCA).

Strongly inhibiting herb samples indicated faint color spot in PCA test all allergenicity which were 10 herbs such as Eucommiae Cortex, Holotrichia, Psoraliae Semen, Cynorii Caulis, Corni Fructus, Taraxaci Herbs, Lycii cortex Radicis, Lycii Fructus, Selaginelliae Folium, Prunellae Herba and moderate inhibited samples were 12 herbs including Aconiti Tuber, Chelidonii Herba, Bilyae Orientalisfolium, Filicis Rhizoma, Ligustri Fructus praeparatus, Briddleiae Flos, Anemarrhenae Rhizoma, Atractylodis Macrocephalae rhizoma among the 114 medicinal herbs.

The selected antiallergic herbs Taraxaci Herba and Lycii cortex Radicis were effective to prevent anaphylaxis shock in the active anaphylaxis test. As compared with the control group, there are no anaphylactic shock in the herb-extract feeding group when milk and egg was administered orally during 4 weeks.

(Key words : Milk, Egg, Allergenicity, Passive cutaneous anaphylaxis, Antiallergic herbs)

# 목 차

## 제 1 장 서론

### 제 1 절 연구개발의 목적과 범위

## 제 2 장 실험방법 및 결과

### 제 1 절 실험재료

### 제 2 절 실험동물

### 제 3 절 실험재료의 분석

### 제 4 절 Allergenicity 감소방법

### 제 5 절 Allergenicity 측정방법

### 제 6 절 소화율 측정실험

### 제 7 절 전기영동

### 제 8 절 한약제의 추출액 제조

### 제 9 조 조직검사

### 제 10 절 조추출액의 관능검사

### 제 11 절 가열안전성 실험

### 제 12 절 추출물 - 우유 반응검사

### 제 13 절 한의어과



# 제 1 장 서 론

## 제 1 절 연구개발의 목적과 범위

인류의 생존과 번영 및 문화발달에 커다란 기여를 했으며 우리나라에서도 19세기 후반부터 낙농이 시작된 이래 (김 등, 1991) 우유소비량은 해를 거듭할수록 증가하고 있는 추세이다(한국공업협회, 1990). 우유는 그 영양가가 높음으로 인공영양아에게 모유대용품으로 널리 이용되고 있다. 우유는 달걀, 대두와 함께 식품알레르기를 유발하는 3대 주원인 식품의 하나로 우유 알레르기의 빈도는 보조자마다 차이가 있지만 영·유아의 1-3%라고 알려져 있으며 대부분 인공영양을 시작한지 한달이나 두달 내에 나타나게 된다(Gerrard 등, 1973). 달걀도 강한 항원성으로 여러 가지 알레르기 질환을 일으키는 요인이 된다. 달걀의 알레르기 반응은 일찍이 1912년 Schloss에 의해 보고되었다. 달걀에 대한 알레르기도 성인보다 유·소아기에 많고 습진, 두드러기, 천식 및 위장장애의 원인이 될 수 있으며 흔히 우유 알레르기와 잘 동반되어 나타난다(Langeland, 1978, 박 등, 1986)

Allergy란 항원 항체반응의 결과 생체에 병적현상을 가져오는 것을 의미하는데(김재식, 1988) Allergy란 말은 1906년 Clemens Von Pirquet가 "Allergie"라는 논문에서 외부물질에 대한 과민반응을 의미한다고 처음으로 기술한 이래 이에 대한 연구와 보고가 계속되어 왔다.

Allergy 증상은 신체 어느 부위에서도 나타날 수 있으며(Kjellman과 Johnansson, 1976), 가장 흔한 부위는 소화기계, 피부 및 호흡기(Cant, 1985)로 주로 영유아기에 많이 나타난다. 어린시기에는 소화능력의 부족과 미성숙한 장 점막의 기능으로 항원성 거대분자의 흡수가 증대되어 항체 생성세포에 도달하게 되어(Walker와 Isselbacher, 1974) Immunoglobulin E(IgE)의 생성을 불러일으켜 유아를 감작(sensitization)시키게 되고, 다시 항원에 노출될 경우 allergen과 immune complex를 만들어 mast cell의 탈과립으로 인한 histidine, serotonin, heparin 등 chemical mediator를 분비하여(DANNAEUS, 1977) 혈관투과성의 항진, 평활근 수축, 점액분비 항진 등으로 호흡곤란, 위장장애, 두드러기, 기관지천식 등의 allergy증상을 일으킨다고 한다(Goldstein과Heiner, 1970, Bachman, 1957).

미국에서는 1967년 2,000명의 어린이에 대한 조사에서 6.6%가 식품 알레르기가 있다고 하였으며(Arbeiter, 1967) Cohen 등에 의하면 1984년 전인구의 17%가 증가한다고 한다. 우리나라에서도 김 등(1988)은 국민학교 저학년층을 상대로한 조사에서 알레르기 질환의 빈도가 30.2%라고 했으며, 신 등(1990)의 국민학교 전학년층을 대상으로 조사한 결과에서는 31.2%가 식품 알레르기를 가지고 있는 것으로 나타났다.

식품 알레르기는 주로 유, 소아에게 나타나서 성인이 되면서 경미해지는 것이 보통이나 최근에는 성인까지 계속되는 예, 또는 성인이 되어서 처음으로 나타나는 예도 보고되고 있다(박 등, 1986, 신 등, 1982, Jessberger, 1991). Paganelli 등 (1986)은 79세의 할머니에게서도 우유 알레르기가 발생했다고 보고한 바 있다.

이러한 식품 알레르기의 치료 및 방지는 항 알레르기 약제의 투여와 원인이 되는 식품을 제거하는 식이를 급여하는 방법밖에 없다(Sparks, 1985). 실제로 Matthew 등은 (1977) 만성 습진과 기관지천식에서 식품 allergen을 제거하여 증세를 완화시켰다고 보고되었으며, 영아기에 식품 allergen을 미리 제거하는 것이 allergy질환이 생기는 것을 지연시켰다는 보고도 있다(Glaser와 Johnstone, 1953, Sarrinen 등, 1979, Juto 등, 1978). 그러나 원인식품을 제거하는 경우 성장기의 유아나 allergy환자에게는 식품의 종류, 양, 모두에 제한을 하여야 하므로 환자는 물론 가족에게 까지 영향을 미치며 특히 색생활에서 자주 대하게 되는 우유와 달걀을 전혀 섭취하지 않는다는 것은 영양상 문제가 된다.

항알레르기 약제로는 1887년 일본에서 epedrin(1976))을 분리하여 천식치료제로 사용하고 있으며 각종 알레르기의 예방치료제로 Na cromoglycate의 효과가 연구되었다. Kimata등(1990)은 in vitro에서 Na cromoglycate가 인간의 B-lymphocyte에 의해 생산되는 immunoglobulin의 억제효과가 있다고 보고하였고, Businco등(1983)과 Falth-Magnussom 등(1986)은 소아에게 Na cromoglycate를 투여하여 장내투과 및 예방효과를 연구하였다. Adolpson 등(1990)은 소아에게 Cl-959(5-methoxy-3-1-methylene)-N-IH-tetrazol(b)-thiophene-2-carboxamide를 새로운 항알레르기 인자로 합성하여 그 효과를 연구하였다. Yamamura 등 (1991)은 새로이 합성된 SN-408(salmeterol hydroxynaphtholate)을 이용하여 Guinea pig에서 Passive cutaneous anaphylaxis와 histamine의 분비를 연구하였다.

본 연구는 대표적인 allergy성 식품인 달걀과 우유의 allergy를 억제하는 방법을 강구하고자 우리나라의 전통의학인 한방에서 청혈제로 쓰이는 약제들이 알레르기 질환의 대증요법으로 쓰이는 것에 착안하여 114종의 한약제중에서 알레르기를 억제하는 약제를 검색하였다.

## 제 2 장 실험방법 및 결과

### 1. 실험재료

#### 1) 우유

본 실험에 사용한 원유는 전북대학교 농과대학 부속목장에서 건강한 Holstein 종 젖소에서 채유하여 원심분리하여 탈지한 다음 사용하였다.

#### (1) 실험 재료의 일반 성분

본 연구에서 사용한 원료 우유의 일반 성분을 분석한 결과는 Table 1과 같다. 원유는 수분이 85.83%이고 회분이 0.83%, 지방이 3.40%, 단백질이 3.23%, 탄수화물이 5.47%이었다.

Table 1. Analysis of approximate composition of raw materials

(unit : %)

	Moisture	Ash	Lipid	Protein	Carbohydrate
Milk	85.83	0.83	3.40	3.23	5.47

#### 2) 한약재

한약재는 본초학에 따른 분류법에 의하여 분류하여 한약방에서 구입하였으며 본 실험에서는 淸熱燥濕藥 11가지, 補血養陰藥 26가지, 淸熱京血藥 7가지, 收斂血管藥 12가지, 收斂精氣藥 8가지, 淸血降火藥 11가지, 淸熱解毒藥 6가지, 알레르기약 4가지, 補養藥 29가지 등 모두 114종의 한약재를 사용하여 본 실험을 시행하였다.

\* 淸熱燥濕藥 : 관중(Filicis Rhizoma), 용담초(Gentianae Scabrae Radix), 백선피(Dictamni Radix), 고삼(Sophorae Radix), 연교(Forsythiae Fructus), 황백(Phellodendri Cortex), 인진(Artemisiae Capillaris Herba), 황연(Coptidis Rhizoma), 진피(Fraxini Cortex), 호황연(Picrorrhizae Rhizoma), 황금(Scutellariae Radix)

- \* 補血養陰藥 : 아교(Gelatina Nigre), 토사자(Cuscutae Semen), 생지황(Raw Rehmanniae Radix), 석곡(Dendrobii Herba), 백자인(Thujae Semen), 헤삼(Sticopus Japonicus Selenka), 상실(Mori Fructus), 구기자(Lycii Fructus), 연자(Nelumbo Semen), 당삼(Codonopsis Radix), 당귀(Angelicae gigantis Radix), 복분자(Rubi Fructus), 하수오(Polygoni Multiflori Radix), 구갑(Testudinis Capapax), 산수유(Corni Fructus), 황정(Polygonati falcati Rhizoma), 백작약(Paeoniae Radix), 사삼(Adenophorae Radix), 저실자(Broussonetiae Fructus), 맥문동(Liriopsis Tuber), 별갑(Amydae Carapax), 여정실(Ligustri Fructus), 산약(Dioscoreae Radix), 천문동(Asparagi Radix), 감인(Euryale feroxi Semen), 용안육(Longanae Arillus)
  
- \* 清熱京血藥 : 지골피(Lycii Cortex Radicis), 대계(Cirsii Herba), 백모근(Imperatae Rhizoma), 백합(Lilii Bulbus), 백미(Cynanchi Atrati Radix), 목단피(Moutan Cortex Radieis), 현삼(Scrophulariae Radix)
  
- \* 收斂血管藥 : 삼칠근(Pseudoginseng Radix), 해피초(Os Sepiae), 백두옹(Pursatillae Radix), 오매(Mume Fructus Praeparatus), 지유(Sanguisorbae Radix), 저근백피(Ailanthi Cortex Radicis), 괴화(Sophorae Flos), 조연초(Ecliptae Orientalis Folium), 적석지(Bolus Rubra), 측백엽(Biotae Orientalis Folium), 백급(Bletillae Tuber), 백반(Alumen)
  
- \* 收斂精氣藥 : 왕불유행(Melandrii Herba), 권백(Selaginelliae Filium), 제조(Holotrichia), 자연동(Native Copper), 호박(Succinum), 자단향(Sabina Semen), 자초(Lithospermi Radix), 도인(Persicae Semen)
  
- \* 清血降火藥 : 지모(Anemarrhenae Rhizoma), 석결명(Haliotidis Concha), 상백피(Mori Cortex), 밀몽화(Buddleiae Flos), 조구등(Rhynchophylla Ramulus), 청상자(Celosiae Herba), 대자석(Ocherum Ramulus), 하고초(Prunellae Herba), 치자(Gardeniae Fructus), 석고(Cypsum Fibrosum), 천화분(Trichosanthes Radix)

- \* 清熱解毒藥 : 백굴채(*Chelidonii Herba*), 금은화(*Lonicerae Flos*), 백합(*Ampelopsitis Radix*), 산두근(*Menispermi Radix*), 산자고(*Santsigu Tuber*), 포공영(*TAraxaci Herba*)
- \* 알레르기약 : 사상자(*Torilis Fructus*), 선퇴(*Attactylodis Rhizoma*), 백질여(*Bombycorpus Rhizoma*), 선이화(*Inulae Flos*)
- \* 補 養 藥 : 함계(*Gecko Gecko*), 황기(*Astragali Radix*), 구척(*Cibotii Rhizoma*), 두충(*Eucommiae Cortex*), 익지인(*Amomi Amari Fructus*), 녹각상(*Cervi Cornu Parvum*), 호로파(*Trigonellae Semen*), 녹각(*Cervi Cornu*), 해구신(*Otariae Testis et Penis*), 양기석(*Actionlitum*), 골쇄보(*Drynariae Rhizome*), 원잠아(*Bombyx*), 비자(*Allii Semen*), 부자(*Aconiti Tuber*), 석유황(*Sulfur*), 인삼(*Ginseng Radix*), 보골지(*Psoraliae Semen*), 감초(*Glycyrrhizae Radix*), 쇠양(*Cynomorii Caulis*), 육종용(*Boshniakiae Herba*), 석종유(*Stalactitum*), 파극천(*Morindae Radix*), 선모(*Curculiginis Rhizoma*), 백출(*Atrctylodis Macrocephalae Rhizoma*), 운모(*Mica*), 음양곽(*Epimedii Herba*), 대조(*Zizyphi Inermis Fructus*), 계피(*Ciniamomi Cortex*), 호도(*Jugalandis Semen*)

## 2. 실험동물

한일 양토장에서 구입한 New zealand white 종의 체중 2.3kg의 토끼와 250-300g의 Guinea pig와 6-8주 된 250-350g의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐와 20-30g의 mouse를 고형 사료(화성사료 주식회사)와 풀로 사육하여 본 실험에 사용하였다.

## 3. 실험재료의 분석

### 1) 일반 성분 분석

#### (1) 수분

시료 약 2g을 평량하여 건조법에 의하여 135℃에서 2시간 건조시켜 함량을 구하여 정량하였다.

## (2) 회분

시료 약 1g을 예비 탄화시킨 후 550°C의 전기 회화로에서 5시간 탄화시킨 후 함량을 구하였다.

## (3) 조지방

시료 약 5g을 건조시킨 후 Soxhlet 장치에서 16시간 추출하여 정량하였다.

## (4) 조단백질

시료 약 0.1g을 kjeldhal flask에서 분해시킨후 semi-microkjeldhal 증류 장치에서 증류하여 N량을 구한다음 6.38을 곱하여 단백질로 환산하였다.

## (5) 당질

상기 네가지 성분을 구한후 差引法으로 계산하였다.

## 2) 조성 아미노산 정량

질소 정량에 의하여 시료를 1ml중 1ml의 질소를 함유하도록 희석하여 21ml의 가수분해 병에 넣고 12N HCl 1ml를 가하여 진공상태에서 봉한 후 110°C에서 24시간 가수분해한 후 증발 건조시켜 amino산 자동분석기(LKB 4150 Alpha, Sweden)에서 분석 정량하였다.

## 4. Allergenicity 감소방법

### 1) 물리적 처리

#### (1) 열처리

원유를 autoclave에서 120°C 로 10, 20, 30, 40, 60분 가열한 후 냉각시켰다.

## (2) 자외선 처리

원유를 청결한 유리판 위에 얇게 입인 후 밀폐된 공간에서 물에 적신 filter paper를 놓아두어 습도를 조정하면서 자외선등(15 watt)을 10cm거리에서 40분간 처리하였다.

## (3) Microwave처리

원유를 비금속 용기에 100ml를 넣어서 전자 레인지에서 30분간 가열한 후 시료로 사용하였으며 전자렌지의 내부온도는 65℃로 하였다.

## 2) 물리적 처리에 의한 allergenicity의 변화

단백질의 가수분해는 효소, 산, 알칼리에 의해서 일어난다. 그러나 본 연구에서는 그 이외의 처리인 자외선, microwave의 반사후에 일반적인 삼염화식초산에 의한 단백질 정량을 실시하여 물리적 처리 및 효소처리 후 12% 삼염화식초산의 가용성 질소를 정량하므로 단백질의 변성도를 가수분해율로 표시하였다. 이것은 일부 물리적 처리에서는 가수분해보다 변성에 의한 침전성의 변화 적도라고 보아야하며 단백질분해나 물리적 처리등에 의하여 유도된 단백질변화 척도가 PCA inhibition과 상관관계가 있을 것으로 보여진다.

본 실험에 사용한 우유는 원유이다. 여러 문헌에서 나타난 바와 같이 대부분의 연구에서는 casein과 유청단백질을 분리하여 사용하였다. 이것은 정제 단백질의 allergenicity의 변화를 추적하는데는 유익하나 실제 공학적 적용가능성은 적다. 우선 비용의 문제도 생각해야하므로 전유로부터 출발하여 감소되는 allergenicity를 추적하는 것이 공학적, 면역학적 타당성이 크다고 사료되어 원유를 사용하여 실험하였다.

열처리의 온도는 120℃에서 행하였다. 그 이유는 우유 단백질인 casein의 변성온도가 120℃ 이상이고 유청단백질의 변성온도는 55℃ 부근이므로 우유 전체의 열에 의한 변성은 120℃ 이상이 되어야 하기 때문이다. 그러나 실험실 규모로 120℃로 효과적으로 가열할 수 있는 방법이 없기 때문에 autoclave에서 120℃를 기준으로 하여 시간을 변화시켰다.

Table 2은 원유에 가열 및 자외선, microwave 등의 물리적 처리가 가수분해율과 PCA inhibition에 미치는 효과를 나타낸 것이다. 가열에 의한 가수분해율은 5.24%~21.82%로 열처리 시간이 길어짐에 따라 증가하였다. 고온에서의 가열은 우유 등의 단백질의 NPN을 증가시킨다. 따라서 가수분해율의 증가는 allergenicity의 저하를 나타낸다고 생각된다. 위의 시료들에 대한 PCA inhibition은 NPN증가에 따라 증가하였는데 이 결과는 casein과 유청단백질의 결과에서와 잘 일치한다.

본 연구에서는 hypoallergenicity의 평가를 PCA inhibition과 anaphylactic shock model을 이용하였기 때문에 radioallergosorbent test (RAST)나 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)보다 유의성이 크다고 본다. 왜냐하면 ELISA는 단지 해당 혈청(동물, 사람)과 단백질의 면역성 반응성을 나타내므로 반응성이 곧 allergenicity를 의미하지는 않기 때문이다. 그러므로 앞으로의 연구에서도 PCA나 anaphylactic shock model이 적용되어 hypoallergy protein개발에 이용되어야 한다고 생각된다.

UV의 조사에서는 52.32%의 저해율을 보였고 microwave에서는 11.25%의 저해율을 나타내었다. 자외선이 균세포의 변성을 유도하기 때문이다. 한편 80년대 이후 microwave에 의한 전자 레인지의 개발로 보급이 증가되고 있으나 과산화물의 생성이나 2차 방사선의 유해의 가능성만 제시되었을 뿐 두 가지 물질과가 allergenicity에 미치는 영향은 전혀 보고된 바 없다. UV와 microwave의 allergenicity에 대한 영향에 관해서는 아직 보고된 바 없으나 UV가 단백질을 변성시켜 NPN을 유리시키고 allergenicity를 감소시키는 것으로 사료된다.

Table 2. Reduction of allergenicity to physical treatments in milk

Treatment	Degree of hydrolysis(%)	PCA inhibition(%)	Anaphylactic shock score
Autoclaving			
120°C, 10min	5.24	12.32	++
20min	8.01	28.70	++
40min	14.70	29.38	++
60min	21.82	56.20	++
Ultraviolet, 40min	37.62	53.20	+
Microwave 65°C, 30min	24.48	10.75	+

Anaphylactic reaction을 관찰하기 위하여 mouse에게 우유를 10일간 급여하여 oral 면역시킨 다음 물리적 처리를 가한 우유를 단백질이 1% 되도록 생리식염수에 희석하여 꼬리정맥에 주사한 후 30분간 관찰한 결과 Table 3에서 보는 바와 같이 가열처리한 우유에 있어서는 모두 ++의 score를 나타내었다. 가열시간에 관계없이 모두 호흡곤란, 경련 등을 일으켰다. 또한 ultraviolet과 microwane로 처리한 우유에서는 약한 반응을 일으켜 + score를 나타내었다.

### 3) 화학적 처리

#### (1) 효소처리



단백질을 가수분해시키는 단백분해 효소는 낙농 공업에서 이용하는 시판 Neutrase와 Alcalase(Novo社, Denmark)를 사용하였다. 효소의 농도는 기질의 0.1%를 첨가하고 반응 온도는 45℃로, pH는 7.0으로 조정하였고 반응시간은 10, 30, 60, 120, 180, 240분으로 하였다.

(2) 효소처리에 의한 allergenicity의 변화

원유에 시판 단백 분해효소인 Alcalase와 Neutrase를 기질의 0.1% 첨가하여 pH 7과 45℃에서 10, 30, 60, 120, 180, 240분간 반응시켜 가수분해시킨 후의 가수분해율과 PCA inhibition의 결과를 Tabel 5에 나타내었다. 가수분해율은 Neutrase에 의해서 51.99~85.92% 였으며 Alcalase에 의해서는 33.20~77.32%를 나타내었다. PCA inhibition은 Neutrase가 68.72~100%, Alcalase가 55.38~100%로 나타나 효소에 의한 가수분해가 PCA inhibition 효과를 증대시키는 것으로 나타났으며 반응시간이 길수록 가수분해율과 PCA inhibition의 percent가 큰 것을 나타냈다.

Anaphylactic reaction도 가열처리보다 약한 반응을 일으켜서 anaphylactic shock로 죽은 mouse는 어느군에서도 없었으며 Alcalase로 180분간 처리한 우유를 주사한 mouse군에서는 전혀 반응을 일으키지 않았다. +반응을 일으킨 군이 ++ 반응을 일으킨 군보다 많아서 효소에 의한 처리가 항원성 거대분자의 분해를 일으켜 allergenicity가 감소되는 것으로 사료된다.

Table 3. Reduction of allergenicity according to enzyme treatments in milk

Enzyme treatment		Degree of hydrolysis(%)	PCA inhibition(%)	Anaphylactic shock score
Neutrase	10min	51.88	68.72	+
	30min	45.96	72.36	++
	60min	67.38	99.23	++
	120min	78.82	100.00	++
	180min	82.28	100.00	+
	240min	85.92	100.00	+
Alcalase	10min	33.21	55.38	+
	30min	47.46	63.21	+
	60min	49.47	62.78	+
	120min	57.96	90.32	++
	180min	73.02	98.85	0
	240min	78.32	100.00	+

### (3) 축합인산염 처리 및 가열

사용된 축합인산염(polyphosphate)은 Na penta polyphosphate (Rhône-poulenc社, France)로 시료에 중량으로 0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 % 되게 첨가한 후 120°C의 autoclave에서 가열처리 (10, 20, 40, 60분) 하였다.

### (4) 축합 인산염 처리에 의한 allergenicity의 변화

우유에 0.1~2.0%의 penta poly phosphate를 첨가한 후에 가수분해율과 PCA inhibition 정도를 정량한 결과는 Table 4과 같다. 가수분해율은 1.63~9.28%로 poly phosphate의 첨가에 따라 영향을 받지 않는 것을 나타냈다. 이에 반하여 PCA inhibition 은 polyphosphate의 %가 높아짐에 따라 증가하였다. 이는 우유에서 polyphosphate 처리에서 용해도가 증가하고 Ca이 유리되는 peptization의 효과와 같은 현상이라고 보여진다. Polyphosphate의 사용시 인체에의 유해성은 전혀 없다고 생각된다. Polyphosphate가 만약 혈액중에 존재한다면 polyphosphate Ca이 형성되어 Ca대사를 방해하나 polyphosphate는 이미 가열중 거의 가수분해 되고 남아있다 하더라도 위산의 pH에서 완전히 가수분해 된다. 식품에 첨가된 polyphosphate와 식품중에 함유된 polyphosphate의 대사 경로는 다른 것으로 알려져 있다.

Table 4. Effect of polyphosphate treatments in milk

Concentration of polyphosphate(%)	Degree of hydrolysis(%)	PCA inhibition(%)	Anaphylactic shock score	
Milk	0.1	8.73	26.39	++
	0.5	7.40	31.43	+
	1.0	6.57	87.61	+
	1.5	4.83	93.72	+
	2.0	6.49	100.00	+

Polyphosphate를 처리하여 가열한 우유를 항원으로 하여 anaphylactic reaction을 관찰한 결과를 보면 Table 7에 나타난 바와 같이 polyphosphate의 양이 증가할수록 약한 반응을 나타내어 PCA inhibition의 결과와 일치함을 나타내었다.

## 5. Allergenicity 측정방법

### 1) 가수분해율(degree of hydrolysis)의 측정

Allergenicity의 감소 처리를 한 단백질들의 가수분해율은 시료와 동량의 24% 삼염화 식초산 처리를하여 단백질을 침전시킨 후 여과하여 여액에서 총질소를 정량한 후 총질소(NT)중 비단백테 질소(NPN)의 비율(%)로 하였다.

### 2) PCA(passive cutaneous anaphylaxis) inhibition 실험

#### (1) 항혈청 제조

##### i. 우유단백질의 항혈청제조

신선한 원유를 질소증류장치를 사용하여 질소정량한 후 단백질이 5mg/ml가 되도록 0.85% 생리 식염수에 희석한 것 1ml와 동량의 Complete Freund's Adjuvant를 첨가하여 유화시킨 후 2.3kg의 토끼의 양 뒷발 대퇴부 근육에 1ml씩 주사하였다. 7일 간격으로 10회 행하고 4주 후부터 각각 주사하기 전날에 귀정맥에서 부분 채혈하여 immuno diffusion을 실시하여 항체가 생긴 것을 확인한다. 최종 주사일로부터 1주일 후에 전부 채혈하여 희석법에 의하여 PCA 역가를 구하였다.

##### ii. 계란단백질의 항혈청제조

신선한 달걀을 균질기에서 잘 섞은 후 원료 난액을 단백질 농도가 5mg/ml가 되도록 조정한 후 동량의 Complete Freund's Adjuvant 유화액을 만든 후 위와 같은 방법으로 토끼에 면역시켜 채혈하였다. 7일 간격으로 10회 행하고 4주 후부터 각각 주사하기 전날에 귀정맥에서 부분 채혈하여 immuno diffusion을 실시하여 항체가 생긴 것을 확인하였다.

채혈한 혈액을 37℃에서 1시간, 4℃에서 하루밤 방치한 후 원심분리(4℃, 3,000 rpm, 30분)하여 혈청을 얻었다.

##### iii. 닭고기의 항혈청제조

신선한 닭의 흉근을 균질기에서 잘 섞은 후 원료 흉근을 단백질 농도가 5mg/ml가 되도록 조정한 후 동량의 Complete Freund's Adjuvant 유화액을 만든 후 위와 같은 방법으로 토끼에 면역시켜 채혈하였다.

7일 간격으로 10회 행하고 4주 후부터 각각 주사하기 전날에 귀정맥에서 부분 채혈하여 immuno diffusion을 실시하여 항체가 생긴 것을 확인하였다.

#### iv. 밀의 항혈청제조

밀을 균질기에서 잘 섞은 후 원료 밀을 단백질 농도가 5mg/ml가 되도록 조정후 동량의 Complete Freund's Adjuvant 유화액을 만든 후 위와 같은 방법으로 토끼에 면역시켜 채혈하였다. 7일 간격으로 10회 행하고 4주 후부터 각각 주사하기 전날에 귀정맥에서 부분 채혈하여 immuno diffusion을 실시하여 항체가 생긴 것을 확인하였다.

#### v. casein과 유청단백질의 항혈청제조

##### i) casein의 분리

원유 200ml를 4℃에서 3,000rpm으로 30분간 원심분리 한 후 유지방을 걷어내고 탈지면 위에 부어서 지방을 제거하였다. pH meter에서 pH 4.6이 되도록 10% HCl용액으로 적정하여 curd가 생기면 원심분리(4℃, 3,000rpm, 30 min)하여 casein과 유청을 분리하였다. Casein을 증류수로 3-4회 씻어낸후 다시 원심분리하여 원래 원유양의 2/3정도의 증류수를 가해 10% NaOH로 pH 6.7로 맞추었다.

##### ii) 유청단백질의 ultratiltration

Whey 층을 membrane(Spectrum medical industries, INC) M. W 20,000을 사용하여 ultrafiltration (Amicon, USA)하여 20,000 이하의 분자량으로 분리하였다.

##### iii) 항혈청의 제조

Casein과 유청단백질을 각각 동량의 Complete Freund's Adjuvant(CytRx Corporation) 40ul와 유화시켜 토끼와 rat에게서 항혈청을 얻었다.

## (2) PCA (passive cutaneous anaphylaxis) inhibition 실험

약 250-300g의 건강한 Guinea pig 등에 200배로 희석한 상기 혈청 0.1ml를 주사하고 4시간 후 저 allergy처리된 항원단백질 0.5ml(단백질 5mg/ml)와 PBS(phosphate buffer saline) 완충용액에 용해시킨 1% Evan's blue 0.5ml를 혼합하여 정맥에 주사였다. 30분 후 희생시켜 반점의 blue spot를 Katatama법으로(122) 색소를 침출시킨 후 control의 흡광도와 비교하였다. 색소의 침출은 색소가 나타난 피부조각에 1N KOH를 1ml 가하여 37°C에서 하룻밤(12시간) 두었다가 0.6N H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> acetone (5:13)의 mixture 9ml를 가한 후 수초동안 심하게 흔들어 3,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상정액을 spectrophotometer(CECIL 343, Grating Spectrophotometer) 620nm에서 흡광도를 측정하였다.

## 3) Anaphylactic shock score

Mouse 5마리를 한군으로하여 원료 우유와 달걀을 10일간 무제한 급여한 후 10일 후 꼬리 정맥에 저 allergy 처리된 항원을 주사하여 anaphylactic shock를 30분간 관찰 한 후 다음과 같이 4단계로 분류하여 평가였다.

- 0 : 변화없음
- + : 약한 anaphylactic reaction으로 온몸을 떨며 괴로워하다 회복
- ++ : 온몸의 경련과 호흡곤란 등으로 눈을 감고 괴로워함
- +++ : 강한 anaphylactic shock 로 신음하다 즉시 사망

## 6. 소화율 측정실험

단백질의 열처리는 소화에 영향을 미치므로 in vitro 단백질 소화에서 소화율 측정을 1차 pepsin과 2차 pancreatin소화를 행하는 Mauron등의 방법을 사용하였다. 1% 단백질이 되는 시료에 5ml의 pepsin용액(20mg pepsin/0.2N HCl 100ml)을 잘 혼합한 후 37°C의 incubator에서 4시간 소화시킨 후 5ml의 0.2N NaOH를 가하였다. 그다음에 미생물 증식 억제를 위하여 0.04%의 merthiolate와 55.33mg%의 pancreatin이 들어있는 0.05M Phosphate 완충용액(pH 8)을 제조하여 5ml 가한 다음 24시간 소화시켜서 동량의 24% 삼염화 식초산을 가하여 단백질을 침전시킨 후 여액에서 질소를 정량하여 non proteic nitrogen(NPN)을 구하여 total nitrogen중 NPN9%)을 구하였다.

우유의 allergenicity 를 감소시키기 위한 물리적 처리나 polyphosphate 첨가나 소화에 어떻게 영향을 미치는가를 알아보기 위해 소화율 실험을 행한 결과는 Table 5와 같다.

Tabel 5에서 보는 바와 같이 우유의 소화율은 63.82~83.19%로 대조군(89.35%)에 비해 소화율이 감소했으며 열처리시 가열시간이 길어짐에 따라 소화율도 감소되었다. Ultraviolet과 microwave 반사시에는 각각 77.61%, 64.96%의 소화율을 나타내었다. Polyphosphate 첨가시에는 첨가량이 많이짐에 따라 소화율이 증가하여 polyphosphate에 의한 소화율의 저하가 일어나지 않았음을 보여주었다. 따라서 polyphosphate의 첨가는 우유의 소화율을 감소시키지 않으면서 allergenicity를 저하시키는 것으로 나타났다.

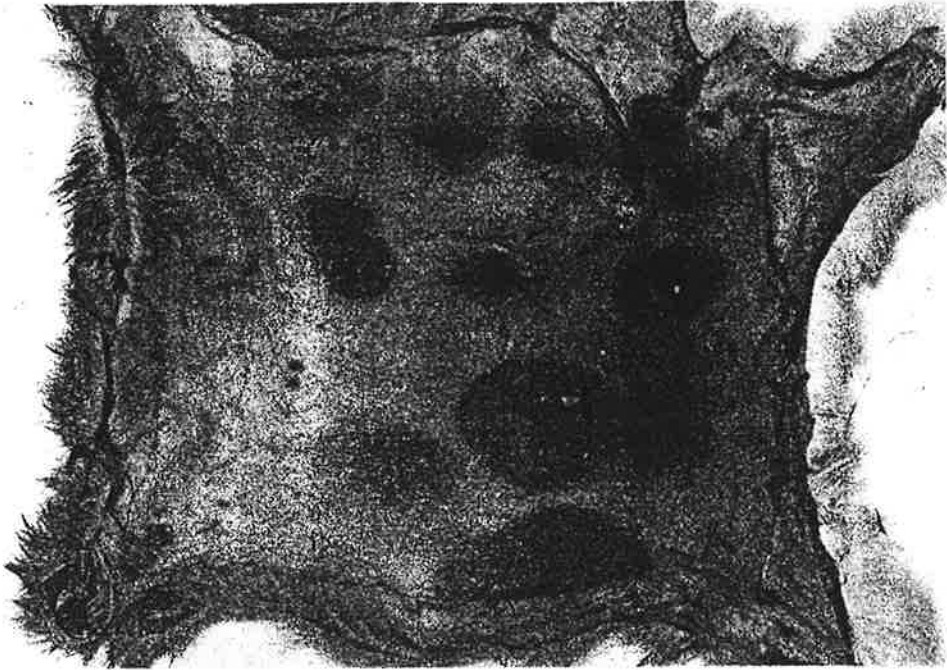
Table 5. In vitro protein digestibility according to various treatments

Treatment	Milk(%)
Control	89.35
Autoclaving, 120°C, 10min	83.19
20min	78.04
30min	75.29
40min	72.60
60min	66.80
Ultraviolet, 40min	77.61
Microwave, 65°C, 30min	64.96
Poloyphosphate(60min) 0.1%	63.82
0.5%	65.72
1.0%	71.49
1.5%	75.85
2.0%	72.44

### 7. 전기영동(electrophoresis)

원유는 각각 물리적 처리 및 polyphosphate 처리를 한 후에 casein과 유청을 분리하였다. 유청은 그대로 사용하였으며 casein은 10ml 6N 요소 용액에 단백질이 약 1% 되게 용해시킨 후 여기에 2방울의 mercaptoethanol을 떨어뜨렸다. 이 시료 100ul를 7% polyacrylamide gel(Tris-glycine, urea 완충용액, pH 8.6)에 loading한 후 전기영동장치에서 1시간 전기영동하였다. 전기영동 후 gel을 Blue Coomassie로 염색하고 탈색 후 gel을 gel dryer에서 건조시켜서 촬영하였다.

Fig.1는 원유를 각종 농도의 poluphosphate로 처리하였을 때의 유청단백질의 전기영동상이다. Control에 비하여 0.1%-2%의 polyphosphate를 첨가하여 10분간 가열한 유청단백질의 대부분은 변성하여 소실되었다. Poiyphosphate를 첨가하지 않은 원유의 10분간 가열은 전기영동도가 변화된 band를 확인할 수 있었으나 20분간 가열에서는 완전히 소실되어 전기영동상이 PCA inhibition과 정량적 관계를 갖지 않는 것으로 사료된다.

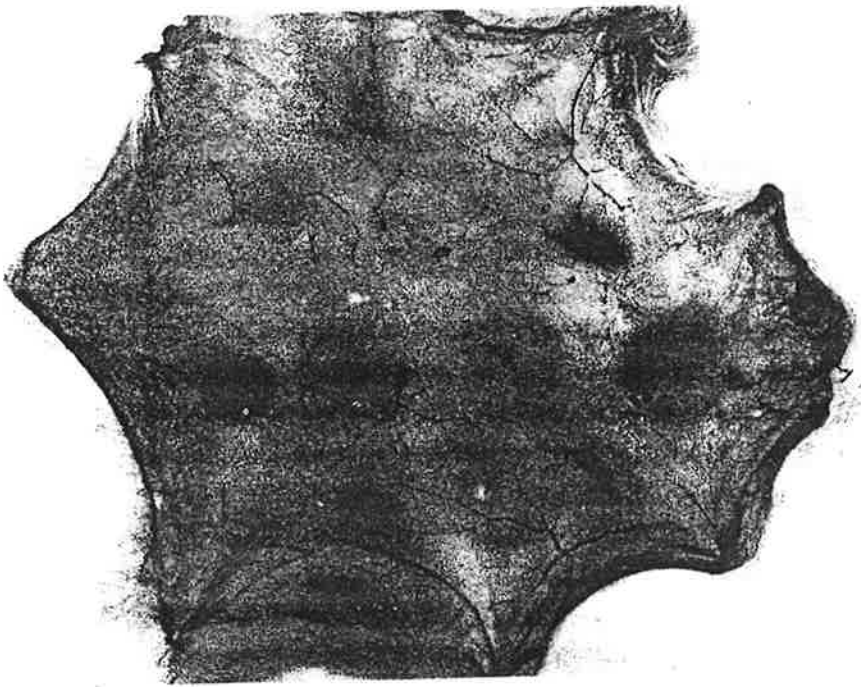


Eucommiae Lili Fraxini Longanae  
Cortex Bulbus Cortex Arillus

Testudinis Holotrichia Alumen  
Caparax

Psoraliae Semen control, Gentianae  
Scabrae  
Radix

Succinum



Mori Cortex  
Moutan Cortex Radicis  
Ampelopsitis Radix  
Cynomorii Caulis  
Torilis Frictus  
Soutellariae Radix  
control  
Aconiti Tuber  
Lithospermi Radix  
Astragali Radix  
Amydae Carapax  
Chelidonii Herba  
Biotae  
Orientalis folium



Fig.2에서 보는 바와 같이 A 사와 B사의 우유는 유청 단백질이 거의 변성되었다. 모든 band들이 소실된 것으로 미루어 보아 과도한 가열처리에 의한 것으로 사료된다. A사와 C사는 2개의 band가 비슷한 위치에서 비슷한 양상을 보였고 B사의 우유는 중간 영역에서 희미한 2개의 band를 나타내었다.

#### (1) Liquid chromatography

방향성물질을 분리하기 위하여 Silica gel chromatography를 실시하였다. 20cm X 5cm의 column에 silica gel을 채우고 fenan계 물질들을 ether로 용출하였다. 각 fraction은 10ml씩 취하고 TLC plate상에서 fraction을 5% H<sub>2</sub>O로 발색시켜 spat를 확인하였다.

#### (2) Thin Layer Chromatography

Silica gel plate (MERK, 20×20cm)에서 시료를 spat 한후 각종용매 acetone, ether, Butanol, Chloroform등의 전개 용매에서 전개한후 용매를 바꾸어 2차전개를 실시 하였다.

### 8. 한약재의 항알레르기성 인자의 검색

#### 1) 한약재의 추출액 제조

114종의 한약재를 10g씩 평량하여 증류수 30ml에 넣은 후 뚜껑을 잘 막고 boiling water bath상에서 3시간(85℃) 침출한 후 여과하여 PCA inhibition 실험에 사용하였고, 표준엑스와 표준분획제조법에 의한 용매추출도 병행하였다.

#### (1) 표준엑스제조법

생체 및 시험관내에서 생리활성을 검색하기 위해서는 가능한 한 검체로부터 모든 화합물들이 추출될 수 있는 추출방법을 채택하는 것이 좋다. 일반적으로 식물성분들은 80% 메탄올 용액에서 그 용해도가 가장 높다.

##### (1.1) 방법

식물(생약)재료를 추출에 적합하도록 절단 또는 분쇄한 것 일정량을 평량한다.

다음에 식물재료를 삼각후라스크 또는 추출병에 넣고 시료가 잠기도록 80% 메탄올을 가하고 환류냉각기를 장치하여 수욕상에서 3시간 동안 2회 추출한 후 온시 여과한다. 그여과액을 합하여 회전농축기를 사용하여 감압건조시킨 후 무게를 계산한다.(일반적으로 이 엑스의 수율은 시료 중량의 10~20% 범위에 속하는 것이 보통이다.)

\* 반드시 시료와 엑스의 중량을 평정할것.

\* 동물생약(예, 녹용등)은 증류수로 메탄올 대신에 추출할 경우도 있음.

(1.2) 추출엑스를 사용하여 생리활성 실험을 행하고 생리활성이 나타나는 경우 표준분획제조 방법에 따라 이 엑스 시료를 분획한다.

(1.3) 80% 메탄올엑스에서 활성이 나타나지 않을 경우 따로 동일시료에 증류수를 가하여 1.1.의 방법에 준하여 수욕상에서 2시간씩 2회 반복 추출하여 (이 때 환류 냉각장치는 사용하지 않아도 좋다.) 얻은 추출액을 온시 여과하여 감압 농축하여 총용량을 줄인 다음 이를 동결건조시켜 얻은 엑스를 생리활성 실험재료로 사용한다.

## (2) 표준분획 제조법

1:1의 방법에 따라 얻은 메탄올엑스(또는 물엑스) 일정량 (평량할것 : 예, 10g)에 증류수를 가하여 (20배 이상) 현탁시킨 후 분획여두(500ml 용량 기준)에 넣고 증류수와 동량의  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 를 가하여 진탕하여 방치하여 분획시킨다.  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (분획시 하층부분)을 따로 취한 후 수층의 다시 동량의  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 를 가하여 같은 방법으로 분획한다. (마지막  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 층을 농축했을 때 엑스의 양이 거의 없을때까지 또는  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 층이 거의 무색일 때 까지 분획한다. 통상 3회 정도)

이들  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 층을 합하여 농축건조(50°C 이하)하여  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 분획으로 한다. 수층은 감압 농축한 후 동결건조하여  $\text{H}_2\text{O}$ 분획으로 한다. (각 건조분획을 평량할것) 여기서 얻은  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 분획과  $\text{H}_2\text{O}$ 분획을 각각 생리활성 실험의 검체로 사용한다. 분획할 때  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 층과 물층 사이에 중간층이 생성될 때는 이 중간층은 수층과 합하여 농축 건조한다.

## (3) 용매추출

### (1) 건조물(분말)

攪電率이 적은 액체부터 순차적으로 추출한다.

그러면 식물재료에 들어있는 유기화합물중에서 비극성물질에서 부터 차차 극성이 큰 원자단(예, OH, COOH)를 가진 물질순으로 추출되어 나온다. 석유Ether, Et<sub>2</sub>O, CHCl<sub>3</sub>, MeOH, H<sub>2</sub>O등의 유기용매를 사용한다.

- a. 석유Ether : 지방, 납, 수지, 정유, chrdrophyH 경우에 따라 배당체 alkalaed일부도 추출
- b. Et<sub>2</sub>O : 석유에 난용성인 alkalaid배당체, 수지, 식물색소, tanin
- c. CHCl<sub>2</sub> : 주로 탄성 gum같은 물질을 추출
- d. alchole : geqronin, 당, 배당체 유기산, tanin, alkalaid
- e. H<sub>2</sub>O : tanin 배당체, 점액, 단백질 염유, 한성분에 완전분리가 안되고 양도 다를경우 사용

## 2) 액체분리추출(상분리)

석유Ether로 탈지한 재료에 EtOH온침 감압농축 후 물을 가한 후(물에 난용성인 배당체 또는 saponin침전)색출물이 있으면 여과하고, 이핵을 Et<sub>2</sub>Oeh 또는 CHCl<sub>2</sub>로 추출하면 극성이 적은 물질이 이행된다. 수층을 BuOH 또는 EtoAc로 충분히 추출하고 감압농축하면 극성이 큰 배당체 또는 saponin이 색출된다.

## 3) Stass Otto추출법

Alkalid추출법은 주석산 산성에서 EtOH로 온침, 여과하고 수층을 감압농축한다. 이때 수지물질, chlorphyH등을 색출할때에는 여별하고 더 증발농축한다. 농축액에 우수EtOH을 가하고 불순물이 있으면 여별하고 이를 다시 증발건조하고 이에 가급적 소량의물을 가하여 용해한다. 여기에는 염유기산, 배당체, 고미질, alkalaid가 용출할 가능성이 있다. 이 수용액을 Et<sub>2</sub>O로 추출하면 배당체 유기반응이 Et<sub>2</sub>O로 이행한다. 산성수용액은 KOH를 가하여 강알카리성으로한 후(이때 대부분의 alkalaid는 색출한다.) CHCl<sub>3</sub>로 추출하면 alkalaid가 CHCl<sub>3</sub>로 이행한다. 이 KOH알카리성수침액에 NH<sub>4</sub>Cl를 가하여 NH<sub>3</sub>성으로 한 다음 CHCl<sub>3</sub>으로 추출하면 phero성 OH를 갖고있는 alkalaid가 이행된다.

## 4) 납염침전법

일반적으로 산성물질인 유기물질은 난용성인 납염이 되며 OH기, CHO, CO기가 있는 물질은 납화합물과 착염을 이루는 경향이 있어 이 성질을 이용한 추출분리법이다.

재료를 석유Ether로 처리하여 유분을 제거한 후 EtOH 또는 H<sub>2</sub>O로 충분히 추출하여 추출액에 초산납용액을 침전이 더이상 색출하지 않을때까지 가한다. 이때 tanin, 산성saponin, 유기산, 단백질 침액이 침전으로 떨어진다. 이것을 여과후 이 용액에 염기성 초산납용액을 가하면 중성 saponin배당체 침전으로 떨어진다. 각 침전물은 물에 현탁한 다음 H<sub>2</sub>g를 도입하여 Pb를 제거한 후 CO<sub>2</sub>를 도입시켜 과잉의 H<sub>2</sub>g를 없애고 증발농축한다. Pbs는 흡착력이 커서 여러성분을 흡착하게 되므로 주의를 요한다. 이와같이 추출하여 얻은 농축물은 방치하면 결정이 생성될 수 있다. 이때 여과후 우선 chromatogrphy법으로 단일물질인가를 검사한다. 단일물질의 경우 재결정에 의하여 정제하고 이화학적 성분을 조사한다. 그러나 대부분의 경우 얻을수 없을 뿐만 아니라 결정성이 있다하더라도 몇개의성분의혼합물인 때가 많다.

## 2) PCA(Passive cutaneous anaphylaxis) inhibition 실험

토끼의 항혈청을 micropipet을 사용하여 1ug을 test tube에 넣고 한약제 추출액 199ug을 첨가한 용액 0.1ml를 300g정도의 Guinea pig 등부위에 주사하였다. 대조군은 항혈청 1ug과 PBS(phosphate butter saline) 199ug을 섞어서 0.1ml 주사하였다. 4시간후 항원(원유) 0.5ml(단백질 5mg/ml)와 1% Evan's blue 용액 0.5ml를 혼합하여 정맥 주사하였다. 30분후 희생시켜서 피하에 나타난 spot의 직경을 대조군과 비교하였다. 5mm이내를 ±, 5-10mm를 +, 10-15mm를 ++, 15-20mm를 +++, 20mm이상을 ++++로 등급화하였다.

## 3) 한약제 추출액에 대한 PCA inhibition 실험

한약제 중의 항알레르기 인자의 검색을 위하여 항혈청 1ug(200배 희석한 것)과 한약제 추출액 199ug을 섞은 것 0.1ml와 우유와 달걀의 단백질(5mg/ml)합량을 조정한 항원 0.5ml와 1% Evan'blue 0.5ml로 Guinea pig를 이용한 passive cutaneous anaphylaxis inhibition 실험 결과를 각 한약제별로 Fig.3-4, Table 6-14에 나타내었다.

Table 6. Effects of 9 kinds of herbs including Eucommiae Cortex on PCA inhibition in guinea pig with milk

Herbs	No.of animals	Size of spot(mm)	Grade
Eucommiae Cortex	5	2.67±2.05*	±**
Lilii Bulbus	3	13.67±1.25	++
Fracini Cortex	3	11.33±1.25	++
Longanae Arillus	3	15.67±0.48	+++
Testudinis Capasrax	3	14.67±1.25	++
Holotrichia	5	0.67±0.94	±
Alumen	3	13.67±1.25	++
Psoraliae Semen	4	3.67±2.89	±
Gentianae Scabrae Radix	3	14.67±1.25	++
Succinum	3	16.33±1.25	+++

\* : Mean±S.D

\*\* : ± 5mm이하  
 + 5-10mm  
 ++ 10-15mm  
 +++ 15-20mm  
 ++++ 20mm이상

Table 7. Effects of 11 kinds of herbs including Cynomorii Caulis on PCA inhibition in guinea pig with milk

Herbs	No.of animals	Size of spot(mm)	Grade
Cynomorii Caulis	5	2.83±2.46*	±**
Aconiti Tuber	4	5.15±1.87	+
Cheliconii Herba	3	6.83±3.32	+
Mori Cortex	3	18.50±2.27	+++
Soutellariae Radix	3	15.83±2.27	+++
Lithospermi Radix	3	13.50±1.87	++
Astragali Radix	3	11.17±2.39	++
Ampelopsitis Radix	3	17.17±1.84	+++
Torilis Frictus	3	16.00±1.78	+++
Amydae Carapax	3	19.83±1.93	+++
Moutan Cortex Radicis	3	12.17±2.66	++
Biotae Orientalis folium	5	7.83±1.43	+

\* : Mean±S.D

\*\* : ± 5mm이내  
 + 5-10mm  
 ++ 10-15mm  
 +++ 15-20mm  
 ++++ 20mm이상

Table 8. Effects of 13 kinds of herbs including Cynanchi Atrati Radix on PCA inhibition in guinea pig with milk

Herbs	No.of animals	Size of spot(mm)	Greade
Cynanchi Atrati Radix	3	16.67±1.65*	+++**
Cervi Cornu	3	15.50±0.71	+++
Codonopsitis Radix	3	12.50±1.47	++
Ginseng Radix	3	12.67±0.62	++
Haliotidis Concha	3	13.38±1.18	++
Taraxaci Herba	4	2.83±2.09	±
Paeoniae Radix	3	16.17±1.03	+++
Morindae Radix	3	19.50±1.87	+++
Lycii Fructus	5	3.10±0.82	±
Lonicerae Flos	4	5.17±3.97	+
Gecko Gecko	3	17.83±1.03	+++
Cibotii Rhizoma	3	16.50±0.71	+++
Sticopus Japonicus selenka	3	17.50±1.47	+++
Bolus Rubra	3	18.83±0.62	+++

\* : Mean±S.D

\*\* : ± 5mm이하

+ 5-10mm

++ 10-15mm

+++ 15-20mm

++++ 20mm이상

Table 9. Effects of 12 kinds of herbs including Otarise Testis et penic on PCA inhibition in guinea pig with milk

Herbs	No.of animals	Size of spot(mm)	Greade
Otarise Testis et penis	3	11.67±2.09*	++**
Raw Rehanniae Radix	3	13.67±1.84	++
Cuscutae Semen	3	15.50±0.71	+++
Artemisiae apillaris Herba	3	16.50±1.47	+++
Trocpsamtjes Radox	5	13.18±7.88	++
Carapax Radix	3	11.67±1.31	++
Melandrii Herba	3	12.33±1.65	++
Sophorae flos	3	17.50±1.08	+++
Inulae flos	3	15.83±1.43	+++
Dictamni Radix	3	19.83±0.62	+++
Pursatillae Radix	3	13.83±0.62	++
Pseudoginseng Radix	3	17.83±1.87	+++
Allii Semen	3	12.17±1.84	++

\* : Mean±S.D

\*\* : ± 5mm이하  
 + 5-10mm  
 ++ 10-15mm  
 +++ 15-20mm  
 ++++ 20mm이상



Table 10. Effects of 9 kinds of herbs including Forsythiae Fructus on PCA inhibition in guinea pig with milk

Herbs	No.of animals	Size of spot(mm)	Grade
Forsythiae Fructus	3	20.00±1.22 <sup>x</sup>	++++ <sup>**</sup>
Sabina chinesis Antoine	3	19.50±0.71	+++
Persicae Semen	3	16.50±1.47	+++
Bletillae Tuber	3	18.67±0.62	+++
Bombyx	3	14.33±1.31	++
Lycii cortex Radicis	3	3.17±2.32	±
Mica	3	19.17±1.03	+++
Fillicis Rhizoma	4	7.10±1.78	+
Actionolitum	3	19.17±2.32	+++
Santsigu Tuber	3	12.33±1.31	++

\* : Mean±S.D

\*\* : ± 5mm이내

+ 5-10mm

++ 10-15mm

+++ 15-20mm

++++ 20mm이상

Table 11. Effects of 15 kinds of herbs including Ligustri Fructus on PCA inhibition in guinea pig with milk

Herbs	No.of animals	Size of spot(mm)	Grade
Ligustri Fructus	3	6.17±2.32	+**
Bombycis Corpus	3	17.50±1.47	+++
Dendrobii Herba	3	17.83±1.93	+++
Glycyrrhizae Radix	3	20.17±1.03	++++
Native Copper	3	17.50±2.27	+++
Selaginelliage Folium	5	4.00±2.94	±
Amomi Amari Fructus	4	8.17±3.32	+
Ocherum Rubrum	3	12.50±1.47	++
Ciniainomi Cortex	3	19.17±1.84	+++
Drynariae Rhizoma	3	10.83±1.31	++
Cervi Cornu Parvum	3	17.17±1.84	+++
Atratylodis Rhizome	3	12.50±2.12	++
Menispermi Radix	3	20.17±1.03	++++
Jugalandis Semen	3	12.83±2.25	++
Prunllae Herba	4	4.83±1.93	±
Corni Fructus	4	3.50±1.22	±

\* : Mean±S.D

\*\* : ± 5mm이하  
 + 5-10mm  
 ++ 10-15mm  
 +++ 15-20mm  
 ++++ 20mm이상

Table 12. Effects of 17 kinds of herbs including Cirsii Herba on PCA inhibition in guinea pig with milk

Herbs	No.of animals	Size of spot(mm)	Greade
Cirsii Herba	3	18.00±1.63*	+++**
Adenophorae Radix	3	17.00±1.63	+++
Polygonati falcati Rhizoma	3	16.67±1.70	+++
Sophorae Radix	4	7.67±4.02	+
Curculiginis Rhizoma	3	12.23±2.05	++
Broussonetiae Radix	3	20.67±2.05	++++
Sulfur	3	20.00±2.16	++++
Ailanthi cortex Radicis	3	17.00±1.63	+++
Nelumbo Semen	3	18.33±2.62	+++
Rhynchophylla Ramulusi	4	5.10±2.94	+
Mune Fructus praeparatus	3	5.33±2.87	+
Boshniakiae Herba	3	18.33±1.25	+++
Atractylodis	3	7.67±2.05	+
Mori Fructus	3	20.33±1.25	++++
Stalactitum	3	13.00±2.16	++
Thujae Semen	3	15.33±1.89	+++
Buddleae Flos	3	8.33±1.70	+
Anemarrhenae Rhizoma	3	9.50±0.40	+

\* : Mean±S.D

\*\* : ± 5mm이내

+ 5-10mm

++ 10-15mm

+++ 15-20mm

++++ 20mm이상

Table 13. Effects of 12 kinds of herbs including Trigonellae Semen on PCA inhibition in guinea pig with milk

Herbs	No.of animals	Size of spot(mm)	Grade
Trigonellae Semen	3	17.67±2.05*	+++**
Coptidis Rhizoma	3	19.67±1.69	+++
Rubi Fructus	3	19.67±2.05	+++
Angelicae giantis Radix	3	17.00±1.63	+++
Celosiae Semen	3	16.67±2.05	+++
Gardeniae Fructus	3	15.33±1.69	+++
Gelatina Nigra	3	13.67±2.50	++
Ecliptae Herba	3	15.67±2.05	+++
Cypsum fibrosum	3	16.67±1.25	+++
Epimedii Herba	3	16.00±1.63	+++
Zizyphi inermis Fructus	3	14.00±2.16	++
Sanguisorbae Radix	3	13.00±2.36	++
Polygoni Multiflori Radix	3	16.00±2.16	+++

\* : Mean±S.D

\*\* : ± 5mm이내  
 + 5-10mm  
 ++ 10-15mm  
 +++ 15-20mm  
 ++++ 20mm이상

Table 14. Effects of 7 kinds of herbs including Liriopsis Tuber on PCA inhibition in guinea pig with milk

Herbs	No.of animals	Size of spot(mm)	Greade
Liriopsis Tuber	3	16.67±2.62*	+++**
Phellodendri Cortex	3	18.00±2.17	+++
Picrorhizae Rhizoma	3	19.33±2.49	+++
Impertatae Rhizoma	3	17.33±2.05	+++
Scrophulariae Racix	3	17.33±2.05	+++
Dioscorene Radix	3	18.00±1.63	+++
Asparahgi Radix	3	18.67±1.69	+++
Euryale feroxi Semen	3	17.33±2.05	+++

\* : Mean±S.D /

\*\* : ± 5mm이내  
 + 5-10mm  
 ++ 10-15mm  
 +++ 15-20mm  
 ++++ 20mm이상

PCA test에 있어서 마취, stress 등이 반응을 감소시키거나 나타나지 않게 하는 경향이 있다는 보고로 본 실험에 사용한 Guinea pig는 마취하지 않았으며 같은 한약제 추출액에 대하여 3-5마리의 Guinea pig에게 동시에 시행하였다.

Fig 3과 Table 6에 나타난 것과 같이 두충외에 9가지 한약제를 사용한 PCA inhibition 실험에서 호박과 용만옥을 제외하고는 allergenicity를 저해하는 것으로 나타났다.

항원 항체반응의 결과인 spot의 직경의 크기로 allergenicity를 판단하였다. 제조(0.67±0.94), 보골지(3.67±2.89), 두충(2.67±2.05)은 저해효과가 큰 것으로 나타났으며 진피, 백합, 백반, 구기자, 구갑, 용담초 등도 inhibition activity가 있는 것으로 나타났다.

Fig. 4와 Table 7에는 12종의 한약제의 PCA inhibition 결과를 나타내었다. control에 비해 모두 옅은색의 spot를 나타내 반응이 약함을 알 수 있었다. 쇠양, 부자, 백굴채, 생백피 등은 검붉은색의 circle을 나타내었고 Evan's blue의 색은 찾아볼 수 없었다. 자초, 황기, 배험, 사상자, 별갑, 목단피 등은 옅은 색을 띄워 항원 항체 반응의 약함을 알 수 있었다.

Table 8에서는 14가지의 한약제중 포공영(0.83±0.09), 구기자(3.1±0.82)가 PCA inhibition activity가 가장 큰 것으로 나타났다.



해구신의 12가지 한약재의 실험 결과(Table 16)에서는 ±등급인 5mm이하의 저해 효과를 가진 것은 없었고 ++반응을 보인 것이 해구신, 생지황, 해폐초, 왕불유행, 백두옹, 구자 등이었다. Table 17에서는 연교 외 9가지 한약재의 실험결과로 지골피(3.17±2.32)의 저해효과가 가장 큰 것으로 나타났다. 여정실외 15가지 한약재의 실험결과 (Table 18)에서는 권백(4.00±2.94), 하고초(4.8±1.93), 산수유(3.5±1.22)의 저해효과가 가장 컸으며 익지인(8.17±3.32), 여정실(6.17±2.32)도 allergenicity를 저해하는 것으로 나타났다. Table 19에는 대계의 17가지 한약재의 PCA 저해 실험 결과로 조구등(5.1±2.94), 오매(5.37±2.87), 고삼(7.67±4.03), 밀몽화(8.37±1.70), 지모(9.5±0.4)가 allergenicity를 저해하는 것으로 나타났다. 호로피외 12가지 한약재와 맥문동의 7가지 한약재에 대한 PCA 저해 실험 결과 (Table 13, 14)에서는 전반적으로 allergenicity를 저해하는 한약재가 드문 것으로 나타났다.

## 2) 항알레르기 인자의 검색

실험에 사용한 114종의 한약재중 PCA inhibition 실험에서 저해효과가 있는 것을 골라서 Table 15와 같이 분류하였다.

±등급(5mm 이내)이 두충, 제조, 보골지, 권백, 하고초, 쇠양, 포공영, 구기자, 지골피, 산수유 등으로 10가지였고, +등급(5-10mm)이 부자, 측백염, 백굴채, 관중, 여정실, 익지인, 고삼, 조구등, 오매, 밀몽화, 지모, 백출 등의로 12가지 이었으며 ++등급(10-15mm)이 천피, 구갑, 백반, 용담초, 자초, 황기, 목단피, 인삼, 당삼, 금은화, 해구신, 생지황, 천화분, 해폐초, 왕불유행, 구자, 백두옹, 산자고, 호도, 선퇴, 골쇄보, 대자석, 선모, 석종유, 아교, 지유, 대조등으로 27가지 였다. 그 이상은 allergenicity를 저해하는 효과가 적은 것으로 간주하였다.

Table 15. Screening of herbs having antiallergic factor by grade of PCA inhibition

Grade	Herbs	No.of herbs	Percent(%)
±	Eucommiae Cortex, Holotrichin, Psoraliae Semen, Cynomorii Caulis, Lycii Fructus, Taraxaci Herba, Prunellae Herba, Corni Fructus	10	8.8
+	Aconiti Tuber, Chelidonii Hreba, Bioyae Orientalisfolium, Filicis Rhizoma, Ligustri Fructus, Amori Amari Fructus, Sophorae Radix, Rhynchophylla Ramulusi, Mune Fructus praeparatus, Buddleiae Flos, Anemarrhenae Rhizoma, Atractylodis Macrocephalae Rhizoma	12	10.5
++	Fraxini Cortex, Testudinis Caparax, Alumen, Gentiane Scabrae Radix, Lithospermi Radix, Astragali Radix, Mputan Cortex Radicis, Ginseng Radix, Codopsitis Radix, Lonicerae Flos, Otarise Testis et penis, Raw Rehmanniae Radix, Tricosanthes Radix, Os Sepiae, Melandrii Herba, Allii Semen, Pursatillae Radix, Santsigu Tuber, Jugalandis Semen, Atractylodis Rhizoma, Dry Nariae Rhizoma, Ocherum Rubrum, Curculiginis Rhizoma, Sanguisorbae Radix, Zizyphi Inermis Frutus, Gelatina Nigra, Stalactitum	27	23.7

### 3) Active anaphylaxis에 의한 항알레르기 인자를 가진 한약제의 효과

Guinea pig는 우유의 경구 투여에 의해서도 우유단백질에 쉽게 감작되어 anaphylaxis 증상을 나타내는 것으로 알려져 있다. Table 23에서 보는 바와 같이 우유를 경구 투여했을 때 투여 5일째에 경련, 호흡장애 등의 anaphylaxis 증상을 띠며 사망했다.



그러나, 본 연구에서 항알레르기 작용이 있는 것으로 밝혀진 표공영과 지골피의 추출액을 먼저 먹인 후 항원을 투여한 group에서는 한 마리도 anaphylaxis shock를 일으키지 않았다.

Table 16. Anaphylaxis in guinea pig fed milk and water extract from herbs for 4 weeks

Group	Sample fed	Anaphylaxis (No. of animals)
A	Milk	4/5
B	Milk + Taraxaci Herba	0/5

#### 4) 항 알레르기 작용을 가진 한약재의 역가

PCA inhibition 실험결과 저해효과가 큰 것으로 나타난 ±등급인 10가지의 한약재 중에서 가장 inhibition 작용이 큰 것으로 나타난 제조, 포공영, 두충, 지골피에 대하여 PCA inhibition 실험을 통하여 역가를 산출한 결과를 Table 24에 나타내었다. 항체에 첨가하는 각 한약재의 추출액을 5,10, 20, 40, 60, 100, 1,000 배로 희석하여 Guinea pig 등에 주사하고 4시간 후 항원과 색소를 정맥 주사하여 spot가 나타나지 않는 희석배수의 역수로 나타내었다. 역가가 가장 높은 것은 포공영으로 75이었고 그다음이 두충(50), 지골피(47), 제조(40)의 순이었다.

Table 17. Titre of antiallergic factor in herbs by PCA inhibition test

Herbs	Holotrichin	Taraxaci Herbs	Lycii Cortex Radicis	Eucommiae Cortex
Minimal dilution titre	40	7	47	50

#### 3) 한약재 역가

Allergenicity를 저하시키는 것으로 나타난 제조와 포공영, 두충, 지골피에 대하여 Guinea pig를 이용한 PCA inhibition test를 통해 역가를 산출하였다. 항체를 한약재 추출액으로 희석시 5, 10, 20, 40, 60, 100, 1,000배 희석한 후 PCA inhibition test를 행하여 blue spot가 완전히 나타나지 않는 희석배수의 역수로 표시하였다.

9. 조직검사

Guinea Pig의 피부를 채취하여 10% formalin에 24시간 고정한 후 수돗물로 조직내 formalin을 제거하였다. Formalin이 제거된 조직을 alcohol을 이용하여 탈수시킨 후 paraffin 포매하였다. 포매된 조직을 5um두께로 절편하였으며 hermatoeosin 염색을 실시하여 조직학적 변화를 관찰하였다.

10. 조추출물의 관능검사

위 실험에 사용된 한약제를 100명의 성인 남,여를 대상으로 맛과 향등을 검사하였다. 관능검사의 목적은 검색된 시료로 음료개발 목적으로 약제의 추출물을 기호성을 조사하였다. 조사하는 방법은 다양한 연령층에서 실시하여야 하나 보건음료로 약제의 용도를 생각하여 유년과 노년층은 제외하고 성인남녀 100명으로 하였다. 설문지의 예는 Table 18과 같다.

Table 18. 성인남·녀 100명을 대상으로 조사한 관능검사

한 약 제	기 호 성		
	좋다	그저그렇다	나쁘다
익 지 인	○		
부 자	○		
보 골 지	○		
쇄 양			○
측 백 엽		○	
권 백			○
하 고 초	○		
제 조	○		
밀 몽 화			○
포 공 영		○	
두 충	○		
산 수 유	○		
지 골 피		○	
오 매	○		
구 기 자	○		

그리하여 익지인, 부자, 보골지, 하고초, 제조, 두충, 산수유, 오매, 구기자등의약제들의 기호성이 우수하여 추출물로 음료를 개발할수 있고 측백엽, 포공영, 지골피등의 약제들도 감미료 등을 첨가하면 가능하다고 보여진다.

### 11. 가열안전성 실험

추출한 우유와 반응하여 침전의 유무 Chelatee 유무, 정량

Ample에 우유와 추출한 한약제를 넣어 oil bath를 사용하여 80℃, 100℃, 120℃에서 우유의 안전성을 검사하였다.

열안전성은 추출물을 가공목적으로 사용시 가열에 대한 안전성을 평가하여 직접가공온도를 판정하기 하기위한 것이다. 추출물은 10ml를 pyrex관(20ml)용기에 넣고 화염상에서 봉합한뒤 온도가 100℃(10 : 120℃-130℃로 조절된 Oil bath에 10분간 가열한 뒤 즉시 냉각시켜 원심분리(1000rm, 10분)하여 침전형성 유무로 판정하였다.

Ample에 우유와 추출한 한약제를 넣어 oil bath를 사용하여 80℃, 100℃, 120℃에서 우유의 안전성을 검사하였다. 위의 실험에 의하여 100℃에서 대부분의 약제들이 안정한 것으로 나타났다.

Table 19. 한약제에 대한 열 안전성 검사

약 제	침 전 의 유 무		
	100℃	120℃	130℃
익지인	안정	안정	안정
부자	안정	안정	안정
보골지	안정	불안정	불안정
쇠양	안정	안정	불안정
측백엽	안정	안정	안정
권백	안정	불안정	불안정
하고초	안정	불안정	불안정
제조	안정	불안정	불안정
밀몽화	안정	안정	안정
포공영	안정	안정	안정
두충	안정	안정	안정
산수유	안정	불안정	불안정
지골피	안정	안정	불안정
오메	안정	불안정	불안정
구기자	안정	안정	안정

Table 19에서와 같이 보골지, 쇠양, 권백, 하고초, 제조, 산수유, 지골피, 오메들이 불안정했고 익지인, 부자, 측백엽, 밀몽화, 포공영, 두충, 구기자들은 130℃까지 안정하였다.

## 12. 추출물 우유 반응검사

Process Cheese, 발효유의 안정성 검사(PCA), 추출한 우유와 반응하여 침전의 유무 Chelatee 유무, 정량

micell의 안정성 : 45,000rpm에서 Ca 정량

casine의 침전성 : 45,000rpm에서 침전되는 casine의 정량

casine rennet 응고성

추출물 우유반응검사도 가공목적상 적합성 유무를 판정하기 위하여 우유와 추출물을 반응시켜 침전형성 유무, Rennet 응고성, 유산균 발효역가를 판정하였다. 시유 50ml와 추출물 5ml를 혼합한 후 10분간 방치 원심분리(1000rpm,10분)한후 잔사 형성 유무를 관찰하였다. 본 연구에서 저allergy 한약제 22종 중 오메만이 침전이 되었을 뿐 다른 약제들은 안전성을 보였다.

### (1) 효소응고 반응

우유가 rennet와 효소 반응시 응고시간을 관찰함으로써 우유가 추출물과 반응하여 micell의 변화가 있는지 유무를 판정할수 있다. 시유에 100ml 10g의  $\text{CaCl}_2$  를 첨가한 후 50ml 시유에 5ml의 추출물을 넣은후 Contral과 동일한 조건에서 정상 rennet 역가에서 응고시간을 관찰하였다.

## 13. 한외여과 (Ultrafiltration, UF)

분자량별로 10만에서 1000까지 분획하였다. 분자량을 3단계(3만 이상, 3-1만, 1만 이하) 분획을 실시하였다. 물 fraction을 큰 분자량순으로 여과한 후 PCA등을 실시하였다.

## 주 의

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