

GOVP1199913875

664
L293A

최 중
연구보고서

천연물로부터 고기능성 항산화 물질의 탐색 및
그 이용

Screening and utility of high quality antioxidant
from natural products

연구기관

건국대학교

충남대학교

우석대학교

농 립 부

제 출 문

농 립 부 장관 귀하

본 보고서를 “천연물로부터 고 기능성 항산화 물질의 탐색 및 그 이용” 과제의 최종 보고서로 제출합니다.

1998. 12.

주관 연구기관 : 건국대학교

총괄 연구책임자 : 박동기

위탁연구기관 : 충남대학교

위탁연구책임자 : 오만진

위탁연구기관 : 전주 우석대학교

위탁연구책임자 : 정문웅

요 약 문

I. 제목

천연물로부터 고 기능성 항산화 물질의 탐색 및 그 이용

II. 연구개발의 목적 및 중요성

1. 연구개발의 목적

식품의 저장 및 유통기간 중 변질은 물리 화학적 혹은 생물학적 작용에 의해서 일어난다. 생물학적 변화중 가장 큰 요인은 미생물에 의한 부패 변질로서 이들은 전체식품 변질의 주된 원인이 되고 있다. 그러나 미생물이 증식 할 수 없는 조건의 식품들, 예를 들면 건조식품, 냉장, 냉동식품, 저수분 식품들의 변질은 주로 물리화학적 변화에 그 원인이 있다고 본다. 함량에 차이는 있지만 모든 식품에 들어있는 유지의 산패가 가장 초점의 대상이 되고 있다. 특히 유지 함량이 높은 식품의 저장 수명은 유지의 산패 정도가 바로 그 척도가 되고 있으며, 이들이 보존기간 연장을 위해서 각종 산화억제 수단이 동원되고 있다.

식품에 있어서 항산화제는 “산화에 의해서 일어나는 변질, 산패, 혹은 변색을 지연시켜 식품을 보존하기 위하여 사용하는 물질” 이라고 미국의 FDA는 정의 하고 있어 조금은 광범위한 의미를 갖고 있으나 좁은 의미로는 유지의 산화억제 작용을 하는 것으로 일컫고 있다.

따라서 본 연구자들은 식품의 저장 안정성을 향상시키고, active

oxygen에 의해서 유발되는 각종 질병을 예방 및 개선시키기 위해서

- ① 천연물(생약)로부터 항산화 활성이 뛰어난 새로운 항산화 물질의 개발하여 *in vivo* 및 *in vitro*에서 활용할 수 있는 방안을 모색하고,
- ② 식품가공 및 유통기간중 고온에서 antioxidant의 기능을 발휘하는 high temperature antioxidant를 개발한다.
- ③ 식품의 저장 및 유통기간 중 빛에 의해 유발되는 photooxidation을 예방하는 photooxidation antioxidant의 개발에 주안점을 두고 본 연구를 수행한다.

2. 연구 개발의 중요성

가. 기술적 측면

- (1) 식품의 저장 안정성 증진을 위한 방안 강구
- (2) 극미량의 산패취 원인물질 분리, 정량에 대한 새로운 분석 방법 개발의 필연성
- (3) 고온에서 항산화력을 발휘하는 물질의 검색 및 빛에 의해 일어나는 oxidation을 억제시키는 방안을 모색하는 것은 식품의 저장 안정성을 향상시키는데 매우 중요하다.
- (4) 광산화를 억제할 수 있는 새로운 첨가제의 개발이 절실히 요구된다.

나. 경제 사회적 측면

- (1) 새로운 항산화제의 개발이야 말로 식품산업발전에 기여할 뿐만 아니라 국제 경쟁력 재고에도 크게 이바지 할 것이다.

- (2) 천연물(생약재)로부터 항산화 활성이 높은 항산화물질의 검색이야말로 식품관련산업 뿐만 아니라 화장품, 의약품 산업에 크게 기여할 것이다.
- (3) 신 물질이 확인되어 생체내의 과산화물질 생성억제에 기여할 경우 active oxygen에 의해 발병되는 노화, 동맥경화, 당뇨, 파킨슨 병 등 각종 질병을 예방 및 개선 하는데 기여 할 것이다. 따라서 천연물로부터 항산화력의 활성이 높은 항산화 물질의 검색이 절실히 요구된다.

다. 사회적 측면

- (1) 식품의 저장 안정성을 향상시킴으로써 식품의 변질로 부터 야기되는 국민 건강복지증진에 크게 기여할 것이다.
- (2) 식 생활이 윤택해지면서 발병되는 각종 혈관계 질환의 예방 및 개선에 도움을 줌으로서 개개인의 의료비 절감은 물론 국민 건강 증진에 크게 기여할 것이다.

III. 연구 개발 내용 및 범위

1. 식품 및 생체중의 산화 생성물 hydroperoxide의 분석

가. 식품 및 생체 시료로부터 산화 생성물 분석

나. 천연물로부터 항산화 물질의 추출

2. 황금으로부터 Radical scavenger로서의 항산화 물질 분리 및 항산화 활성 측정

가. 황금으로부터 분리된 각 성분의 Liposome에 있어서 항산화 활성 측정

나. 쥐의 간 microsome에 대한 ganhuangene의 항산화 활성 측정

다. 생체내에서의 ganhaungene의 항산화 효과

라. Ganhaungene의 LDL의 산화에 미치는 영향

마. LDL의 산화적 수식에 있어 Ganhaungene의 활성 측정

3. 화피로부터 Radical Scavenger로서의 항산화 물질 분리 및 항산화 활성 측정

가. 화피1과 화피2의 분리

나. liposome 상에서의 항산화 활성 측정

4. 노관초로부터 Radical scavenger로서의 항산화 물질 분리 및 항산화 활성 측정

가. ethyl acetate층으로부터 물질 분리

나. 분리 물질에 대한 항산화 활성 측정

다. 노관초로부터 노관초1과 노관초2의 분리

5. 정공등으로부터 정공등1의 분리

6. 천연물로부터 항산화 물질 대량생산

7. 화피 추출물의 당노 억제 작용 검토

8. 극 고온 가열 조건에서 유지의 산화를 억제하는 물질의 탐색 및 개발

- 가. 유지의 불검화물의 고온 가열 억제 효과 검토
- 나. 생약 및 농산물 추출물의 극한 고온에서의 항산화력 검토
- 다. 정향의 메탄올 추출물의 장기 가열 시험
- 라. 정향 메탄올 용매별 분획물의 가열 산화 억제 효과 검토
- 마. 정향으로부터 gallic acid 분리
- 바. Gallic acid의 가열 산화 시험

9. 고 광도 광산화 조건에서 유지의 산화를 억제한 물질의 탐색 및 개발

- 가. 각종 생약제로부터 광산화 억제력 시험
- 나. 황련의 용매 추출 분획에 따른 광산화 억제력 시험
- 다. 황련의 부탄올 분획에 대한 광산화 억제력 시험
- 라. 황련 부탄올 분획으로부터 Cop1, Cop2, Cop3, Cop4의 분리
- 마. Berberin에 대한 광산화 억제력 시험

IV. 적요

1. 식품 및 생체중의 산화 생성물 hydroperoxide의 분석

- ① 식품 및 생체중의 극미량으로 존재하는 hydroperoxide를 pico mol 이하에서 검출할 수 있는 방법이 강구되어 질병의 진단 및 식품의 산화 안정성을 활립할 수 있는 방안이 강구되어 식품의 보존성 향상에 활용할 수 있을 것이다.
- ② 천연물로부터 저온에서 추출효율을 높일수 있는 방법이 개발되었다. (Ultrasonication 및 pH조절방법) 성분의 변화를 최소화시킴으로써 식품의 품질을 향상시킬 수 있는 제품 개발에 활용할 수 있다.
- ③ 항산화 활성 측정법 개발을 통해서 천연물로부터 항산화 물질을

screening하는데 활용할 수 있을 것이다.

2. 황금으로부터 항산화 활성물질 검색

황금으로부터 항산화력이 뛰어난 ganhaungenine을 발견하였다. 이 물질은 항산화력이 뛰어나기 때문에 식품 및 의약품으로 활용할 가치가 충분하다.

3. 화피로부터 항산화물질의 검색

화피 추출물로부터 항산화력이 뛰어난 물질을 검색한 결과 화피1 이라고 명명한

3-(3,4-dihydroxyphenyl)-4-[[3,4,5-trihydroxymethyl-tetrahydro-2H-pyran-2-yl]oxy]-2,5,7-chromanetriol과 화피2로 명명한 3-(3-hydroxy-4-[[2,3,4-trihydroxy-5-(hydroxymethyl)cyclohexyl]oxy]-2,5,7-chromanetriol)을 검출하였다. 이들 두 물질 역시 항산화력이 뛰어나기 때문에 식품, 의약품 및 화장품 등에 활용할 수 있다.

4. 정공등으로부터 항산화 물질의 검색

정공등으로부터 gallic acid유도체인 2,6-dihydroxy-4-[(4-hydroxyphenyl)peroxy]benzoic acid를 검출하였다.

이 물질은 항산화력이 뛰어나 식품, 화장품, 의약품의 첨가제로 활용할 수 있다.

5. 천연물로부터 항산화물 대량생산

항산화물질을 대량으로 생산하는 방법의 고안으로 이를 산업적으

로 활용할수 있을 것으로 본다.

6. 정향으로부터 극한 고온 가열에서 작용하는 항산화 물질의 검색

정향으로부터 극한 고온에서 유지의 항산화 작용을 나타내는 gallic acid를 밝혀냈다. 이를 유지식품의 제조에 활용할 수 있다.

7. 황련으로부터 항산화 물질의 탐색

황련으로부터 항산화력이 뛰어난 coptisine, jatrorrhizine, Berberine, Magnoflorine등을 검출해 냈다. 이들 중 Berberine이 모델식품 에멀전에서 광산화 억제 효과가 뛰어난 것을 밝혀냈다. 이는 식품의 광산화 억제제로서 활용성이 기대된다.

Summary

I. Title

The Screening of High Functional Antioxidative Compounds
and Their Utilization

II. The purpose and importance of research

1. The purpose of research

Change in quality is occurred by chemical, physical or biological actions during the storage or circulation of foodstuffs. The biggest cause of a biological change is a rotting deterioration by a microorganism which is the main cause of deterioration of whole foodstuffs. However, it seems that chemico-physical change results in the deterioration of food under condition that microorganism can not survive, such as dried, cold, freezed or low moisture content foodstuffs. Although there is a difference in content, the acidification of oil contained in all foodstuffs has been focused. Especially, for foodstuffs with high oil content, the extent of oil acidification determines the storage life of foods, and therefore several means of oxidation suppression are used for the extension of storage time.

The U.S. FDA defines antioxidants for foodstuffs as "compounds used for preservation of foods by delaying the

deterioration, acidification and discoloration caused by oxidation" in a broad meaning, but it means the suppressant action for oil oxidation in a narrow sense.

Thus, for the improvement of the storage safety in foodstuffs and the prevention/improvement of several diseases induced from active oxygen, this research has following goals:

- ① Screening of new antioxidants showing high activity from natural products (herbal medicines) and searching for applications to *in vivo/ in vitro*.
- ② The development of high temperature antioxidants functioning at high temperature during the food processing and circulation.
- ③ The development of antioxidant protecting foodstuffs from photooxidation caused by light during the storage and circulation.

2. The importance of research

1) Technical aspects

- (1) Searching for means to improve the storage safety of foodstuffs.
- (2) Development of new analytical methods for the separation and determination of acidification materials.
- (3) It is very important for the improvement of the storage safety in foodstuffs that screening of antioxidants showing an antioxidative function at high temperature and method development protecting foodstuffs from light.
- (4) The development of a new additive suppressing photooxidation is

highly required.

2) Economical aspects

- (1) The development of new antioxidants will make a great contribution to international competitive power as well as the growth of food industry.
- (2) The screening of highly antioxidative compounds from natural products (herbal medicines) will greatly contribute to not only food industry but also cosmetic and medical industry.
- (3) If a new compound is confirmed and it serves the suppressant power for the hydroperoxides formation *in vivo*, it will contribute to the prevention/betterment of several diseases induced from active oxygen such as arteriosclerosis, diabetes, Parkinson disease and even aging. Thus, the screening of antioxidants showing a high antioxidative activity from natural products is highly required.

3) Social aspects

- (1) With the improvement of storage safety in foodstuffs, we can greatly contribute to public health by preventing problems caused from the deterioration of foodstuffs.
- (2) With the prevention/betterment of various kinds of blood vessel diseases induced from a comfortable dietary life, we can greatly contribute to public health as well as the medical care expense.

III. Contents and Scope of Research

1. The analysis of oxidation product (hydroperoxide) in foodstuffs and *in vivo*.
 - ① The analysis of oxidation product in foodstuffs and *in vivo* samples.
 - ② Screening of antioxidants from natural products.

2. The separation of antioxidant as a radical scavenger from *Scutellaria baicalensis* and the measurement of antioxidant activity.
 - ① the measurement of antioxidant activity for each compounds separated from *Scutellaria baicalensis* in liposome.
 - ② the measurement of antioxidant activity of ganhuangene in rat liver microsome.
 - ③ The antioxidative effect of ganhuangene *in vivo*.
 - ④ The effect of ganhuangene on LDL oxidation.
 - ⑤ The measurement of ganhuangene activity in the oxidative modification of LDL.

3. The separation of antioxidants as a radical scavenger from *Betula platyphylla* and the measurement of antioxidant activity.
 - ① The separation of *Betula platyphylla*-1 and *Betula platyphylla*-2
 - ② The measurement of antioxidant activity in liposome.

4. The separation of antioxidants as a radical scavenger from *Geranium wilfordi* and the measurement of antioxidant activity.

① The separation of materials from ethyl acetate layer.

② The measurement of antioxidant activity for separated materials.

③ The separation of *Geranium wilfordi*-1 and *Geranium wilfordi*-2.

5. The separation of *Sorbus commixta*-1 from *Sorbus commixta*.

6. The mass production of antioxidants from natural products.

7. The investigation of diabetes suppression activity for *Betula platyphylla* extract.

8. Screening and development of oil oxidation suppressing materials under the condition of extremely high temperature and heating.

① Investigation on the suppression effect of unsaponifiable materials of oil against high temperature-heating oxidation.

② Investigation on the antioxidative effect of natural products and agricultural products under the extremely high temperature condition.

③ The long-term heating test of methanol extract of *Eugenia caryophyllata*.

④ The investigation of a heating oxidation suppression for each solvent fraction of *Eugenia caryophyllata*.

- ⑤ The separation of gallic acid from *Eugenia caryophyllata*.
- ⑥ The heating oxidation test of gallic acid.

9. The development/screening of oil oxidation suppression materials in the condition of photooxidation by the intense light intensity.

- ① The test of photooxidation suppression power for various kinds of a herbal medicine.
- ② The test of photooxidation suppression power for each solvent fraction of *Coptis japonica*.
- ③ The test of photooxidation suppression power for n-Butyl alcohol fraction of *Coptis japonica*.
- ④ The separation of Cop1, Cop2, Cop3 and Cop4 from n-Butyl alcohol fraction of *Coptis japonica*.
- ⑤ The test of photooxidation suppression power for Berberin.

IV. Outline

1. The analysis of an oxidation product (hydroperoxide) in foodstuffs and *in vivo*.

- ① Through the development of analytical method to detect trace amount of hydroperoxide (pico mol level) present in foodstuffs, several ways of diagnosis of disease and the oxidation safety of food can be studied, and they can be used to improve preservation of foodstuffs.

- ② Ultrasonication and pH control method developed by us may enhance the extraction efficiency under the low temperature condition. With this method, we can minimize ingredient change, and therefore improve the quality of foodstuffs.
- ③ Using the method development of an antioxidant activity measurement, we can easily screen antioxidants from natural products.

2. The screening of antioxidants from *Scutellaria baicalensis*.

We found ganhaungenine showing a strong antioxidant activity from *Scutellaria baicalensis*. Since the compound has an excellent antioxidative activity, it can be used as an additive of food, and medical supplies.

3. The screening of antioxidants from *Betula platyphylla*.

As a result of screening of good antioxidants from *Betula platyphylla* extract, we gained two compounds, 3-(3,4-dihydroxyphenyl)-4{[3,4,5-trihydroxymethyl-tetrahydro-2H-pyran-2yl]oxy}-2,5,7-chromanetriol) named as hwapi-1 and 3-(3-hydroxy-4-[[2,3,4-trihydroxy-5-(hydroxymethyl)cyclohexyl]oxy]-2,5,7-chromanetriol) named as hwapi-2. Since these materials show a good antioxidative activity, we can utilize these as an additive of food, cosmetic and medical supplies.

4. The screening of antioxidant from *Sorbus commixta*.

Gallic acid derivatives, 2,6-dihydroxy-4-[(4-hydroph enol)peroxy] benzoic acid, were separated from *Sorbus commixta*. Since this material has a good antioxidative activity, we can apply this as an additive of food, cosmetic and medical supplies.

5. The mass production of antioxidants from natural products.

Development of technique to produce antioxidants in large quantities can be utilized in the industry.

6. The screening of antioxidant working in the condition of an extremely high temperature and heating from *Eugenia caryophyllata*.

From *Eugenia caryophyllata*, we separated gallic acid as antioxidant for oil which works in the condition of an extremely high temperature and heating. This can be used in the manufacture of oilic food.

7. The screening of antioxidants from *Coptis japonica*.

Several antioxidants (coptisine, jatrorriczhine, Berberine, Magnoflorine, and so on) representing a good activity were separated from *Scutellaria baicalensis*. Among them, Berberine showed the strongest activity for the photooxidation suppression in the model food emulsion. Application to the photooxidation suppressor for foodstuffs can be expected.

C O N T E N T S

Chapter 1. Purpose and significance

Section 1 Background

Section 2 Necssity

Chapter 2. Research Contents and Scope

Section 1 Research contents

Section 2 materials and method

Chapter 3. Results

Section 1 Analysis of hydroperoxides from food and biomaterials

Section 2 Screen of antioxidant from scutellaria baicalensis

Section 3 Screening of actioxidant from betula platyphylla

Section 4 Screening of actioxidant from Geranium wilfordii maxim

Secrion 5 Screening of antioxidant from Sorbus Commixta hedlura

Section 6 Ness product of antioxidant from natural product

Section 7 Screening at antioxidant for the edible oil on the high temperature

Section 8 Screening of antioxidant for photooxidation

Chater 4. Conclution and proposed application

목 차

제 1 장 연구개발의 목적 및 중요성

- 제 1 절 연구개발 배경
- 제 2 절 연구개발 필요성

제 2 장 연구개발 내용 및 범위

- 제 1 절 연구 개발 내용
- 제 2 절 연구 개발 방법

제 3 장 연구개발 결과

- 제 1 절 식품 및 생체중의 산화 생성물 hydroperoxide의 분석
- 제 2 절 황금으로부터 Radical scavenger로서의 항산화 물질 분리 및 항산화 활성 측정
- 제 3 절 화피로부터 Radical scavenger로서 항산화 물질의 분리 및 항산화 활성 측정
- 제 4 절 노관초로부터 Radical scavenger로서 항산화 물질의 분리 및 항산화 활성 측정
- 제 5 절 화피로부터 화피1과 화피2분리
- 제 6 절 노관초로부터 노관초1 및 노관초2의 분리
- 제 7 절 정공등으로부터 항산화 물질 정공등1의 분리

제 8 절 천연물로부터 항산화 물질 대량생산

제 9 절 CL-HPLC를 이용한 흡연 Rat에 있어서 과산화지질 생성에
관한 ANtioxidant의 효과

제 10 절 화피 추출물의 당뇨 억제 작용

제 11 절 극 고온 가열조건에서 유지의 산화를 억제하는 물질의 탐색
및 개발

제 12 절 고광도 광산화 조건에서 유지의 산화를 억제하는 물질의 탐색
및 개발

제 4 장 적요

제 1 장 연구개발의 목적 및 중요성

제 1 절 연구개발의 배경

식품의 저장 및 유통기간 중 변질은 물리 화학적 혹은 생물학적 작용에 의해서 일어난다. 생물학적 변화중 가장 큰 요인은 미생물에 의한 부패 변질로서 이들은 전체식품 변질의 주된 원인이 되고 있다. 그러나 미생물이 증식할 수 없는 조건의 식품들, 예를 들면 건조식품, 냉장, 냉동식품, 저수분 식품들의 변질은 주로 물리화학적 변화에 그 원인이 있다고 본다. 함량에 차이는 있지만 모든 식품에 들어 있는 유지의 산패가 가장 초점의 대상이 되고 있다. 특히 유지함량이 높은 식품의 저장 수명은 유지의 산패 정도가 바로 그 척도가 되고 있으며, 이들의 보존기간 연장을 위해서 각종 산화억제 수단이 동원되고 있다.

한편 생활수준의 향상과 더불어 식생활 패턴 역시 커다란 변화를 가져왔다. 풍요한 나라가 될수록 지방으로부터 섭취되는 에너지의 함량이 증가하게 된다. 미국의 경우 1907년 지방의 에너지 비가 33%이던 것이 1977년에는 무려 42%로 상승하고 있다. 우리나라 역시 1965년 6.2%에서 1992년에는 22.8%로 급증하였으며, 이는 향후 더욱 급증할 것으로 전망된다. 이와 같은 고지방식 에너지 섭취는 동맥경화등을 비롯한 성인병을 유발시킨다. 최근 섭취된 지방질이 생체내에서 과산화 반응을 일으켜 동맥경화증을 비롯한 각종 질환을 유발한다고 보고 있으며, 이에 대한 예방 및 개선 수단으로서 항산화제에 대한 인식이 고조되고 있다.

식품에 있어서 항산화제는 “산화에 의해서 일어나는 변질, 산패, 혹은 변색을 지연시켜 식품을 보존하기 위하여 사용하는 물질” 이라고 미국의 FDA는 정의하고 있어 조금은 광범위한 의미를 갖고 있으나 좁은 의미로는 유지의 산화억제 작용을 하는 것으로 일컫고 있다.

생체내에 있어서 생체 항산화제는 생체 성분, 특히 생체막 구성성분이 active oxygen(superoxide, hydroxyl radical, H₂O₂등)에 의해서 진행되는 radical scavenger 혹은 Quencher로서 작용하는 물질을 말한다.

따라서 본 연구자들은 식품의 저장 안정성을 향상시키고, active oxygen에 의해서 유발되는 각종 질병을 예방 및 개선시키기 위해서

- ① 천연물(생약)으로 부터 항산화 활성이 뛰어난 새로운 항산화물질을 개발하여 in vivo 및 in vitro에서 활용할 수 있는 방안을 모색하고,
- ② 식품가공 및 유통기간중 고온에서 antioxidant의 기능을 발휘하는 high temperature antioxidant의 개발과
- ③ 식품의 저장 및 유통기간 중 빛에 의해 유발되는 photooxidation을 예방하는 photooxidation antioxidant의 개발에 주안점을 두고 본 연구를 수행하고자 한다.

제 2 절 연구 개발의 필요성

1. 기술적 측면

가. 식품의 저장 안정성 증진을 위한 방안 강구

식품 성분중 맛을 내는데 중요한 역할을 하고 있는 lipid는 식품의 저장 및 유통기간중 off flavor를 발생시켜 식품의 품질을 떨어뜨릴 뿐만 아니라, 이를 섭취했을 때 각종 질병을 유발시키는 과산화물질을 생성시킨다. 따라서 식품의 저장 안정성을 확보하기 위해 항산화물질에 대한 연구는 필연적이라 할 수 있다.

나. 극미량의 산패취 원인물질 분리, 정량에 대한 새로운 분석 방법 개발의 절실성

지금까지 개발되어 사용되어 오고 있는 정량법 중 TBA법, KI법등은 그 원인 물질이 단일 성분(Single Compound)일 경우 별다른 문제점이 제기되지 않고 적용될 수 있지만, 축산물처럼 여러 성분이 혼재되어 있고 복합물을 형성하고 있는 경우 기존의 분석방법으로는 원인물질을 분리 정량하는데 어려움이 많을 뿐만 아니라, 그 원인 물질을 확인 규명할 수가 없다. 뿐만 아니라 이들 분석 방법은 감도(Sensitivity)가 낮기 때문에 산패의 초기 단계에 그 원인 물질이 극 미량인 경우 이를 검출하는데 한계가 있다. 그 밖의 UV법, Fluorescence법 등은 산패의 원인물질을 간접적으로 분석하는 방법으로서 그 정량에 있어 신뢰도가 떨어진다. 따라서 축산물을 비롯한 각종 식품 더 나아가 생체내에서 생성되는 초기 단계의 극미량의 산패취 원인물질인 과산화물질을 ① 직접적이고, ② 신속하고, ③ 정확하게, ④ Sensitivity가 높고, ⑤ 경제성이 뛰어난 새로운 분리 정량법의 개발이 절실히 요구된다.

다. 이들 산화 생성물을 발생시키는 환경조건을 개선시키고, 그 생성 원인을 규명 하고 대처하는 방안의 강구가 절실히 요구된다. 따라서 고온에서 항산화력을 발휘하는 물질의 검색 및 빛에 의해 일어나는 oxidation을 억제시키는 방안을 모색하는 것은 식품의 저장 안정성을 향상시키는 데 매우 중요하다.

라. 여러종류의 식품들이 천연적으로 광산화 촉진 광감태들이 함유하고 있기 때문에, 이들 식품들이 광선이 조사되는 조건하에서는 산화반응이 상당히 촉진되어 저장성이 급격히 떨어지게 된다. 효과적인 자동산화 억제제라고 알려진 BHA, BHT, TBHQ, PG등은 이러한 식품의 광산화를 억제하는 능력이 전혀 갖추지 못하고 있다. 이러한 광산화를 억제 할 수 있는 첨가제로 알려진 것들은 카로테노이드, 토코페롤, 아스코르빈산등 만이 알려져 있을뿐, 다른 광산화 억제제들은 발견되지

않는 상태이다. 광산화에 의한 식품의 산화속도는 자동산화에 비하여 약 1,500 - 30,000가량 빠르다고 알려져 있고, 또한 소비자들의 구매력을 높이기 위하여 투명한 포장재질을 이용한 포장이 요구되기 때문에 여러종류의 식품의 관산화를 억제하는 새로운 첨가제의 개발이 절실히 요구된다.

2. 경제 사회적 측면

가. 식품의 저장 유통과정에 변질되어 파기되는 사례는 비일비재하다. 단 하루라도 유통기간을 연장 시키는 일이야 말로 기업의 이윤 증대에 크게 기여 할 뿐만 아니라 국민 보건에도 이바지 할 것이다.

나. 새로운 항산화제의 개발이야 말로 식품산업발전에 기여할 뿐만 아니라 국제 경쟁력 재고에도 크게 이바지 할 것이다.

다. 천연물(생약재)로 부터 항산화 활성이 높은 항산화물질의 검색이야말로 식품관련산업뿐만 아니라 화장품, 의약품 산업에 크게 기여할 것이다.

라. 신 물질이 확인되어 생체내의 과산화물질 생성억제에 기여할 경우 active oxygen에 의해 발병되는 노화, 동맥경화, 당뇨, 파킨슨병등 각종 질병을 예방 및 개선 하는데 기여 할 것이다. 따라서 천연물로부터 항산화력의 활성이 높은 항산화 물질의 검색이 절실히 요구된다.

마. 생약재배 농가 수입 증대에 크게 기여할 것이다.

3. 사회적 측면

가. 식품의 저장 안정성을 향상시킴으로써 식품의 변질로 부터 야기되는 국민 건강 복지증진에 크게 기여할 것이다.

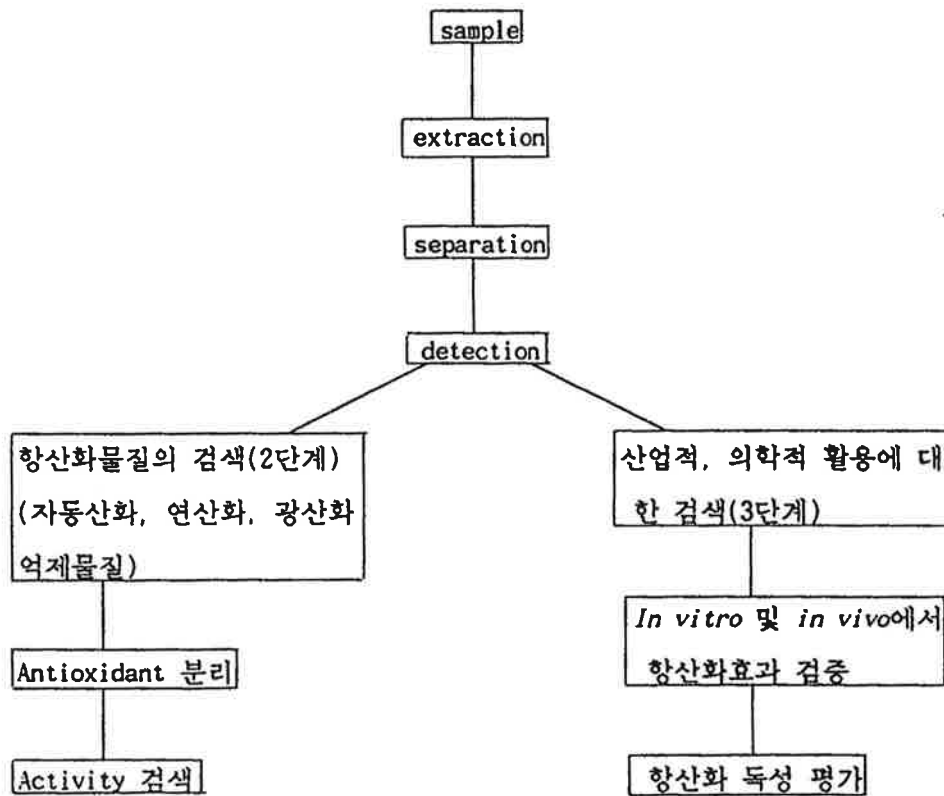
나. 식 생활이 윤택해지면서 발병되는 각종 혈관계 질환의 예방 및 개선에 도움을 줌으로써 개개인의 의료비 절감은 물론 국민 건강증진에 크게 기여할 것이다.

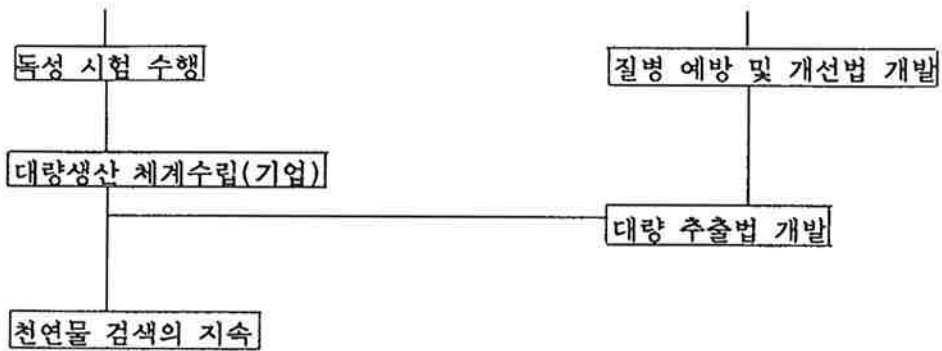
제 2 장 연구개발 내용 및 범위

제 1 절 연구 개발 내용

본 연구를 수행함에 있어 그 내용을 상호 관련성을 도식하면 다음과 같다.

산패취 원인물질 및 생체내 산화
생성물의 검색 (1단계)





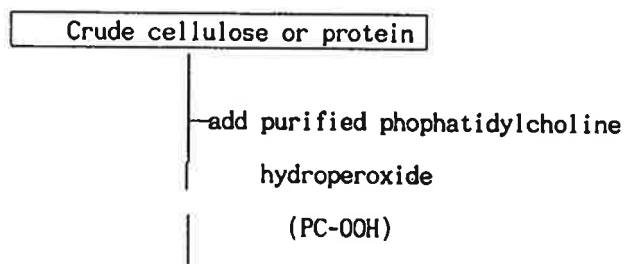
제 2 절 연구 개발 방법

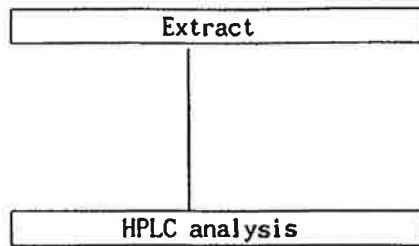
가. 식품 및 생체시료로부터 hydroperoxide의 추출법 확립

현재까지 개발되어 일반적으로 이용되는 추출법에는

- ① Hexane- isopropylalcohol method
- ② Folch's method
- ③ Bligh and Dyer's method 등이 있다.

이들 고전적인 방법을 근간으로 solvent의 배합 비율을 변화시켜 최적 추출조건을 검색한다. 각 추출법에 대한 우수성의 비교 검토는 다음과 같이 실시한다.





각각의 추출법에 의해 회수된 회수량을 계산하여 최우수 추출법을 확립한다.

나. 식품 및 생체 시료중에 존재하는 hydroperoxide의 정량법 개발

Miyazawa 팀에 의해 새로 개발된 CLD-110 Chemiluminescence -detector를 구입하여 기존의 EC-, UV, Fluorescence, RI-detector를 비교 검토하여 최우수 검출법을 확립한다.

CL-HPLC분석조건은 다음과 같다.

CL(Chemiluminescence) detector(CLD-110)를 장착한 HPLC와 이동상 A는 Hexane: Iso-PrOH: MeOH: H₂O (5:7:2:1, v/v/v/v)으로 흘려 보내고, 이동상 B는 50 mM의 borate buffer로 1 ml/min으로 속도로 흘려 보낸다. Column은 Sil-NH₂ column(4.6 X 250 mm)를 사용하고, 온도는 40℃를 유지한다.

다. 천연물로부터 antioxidant의 분리 검색

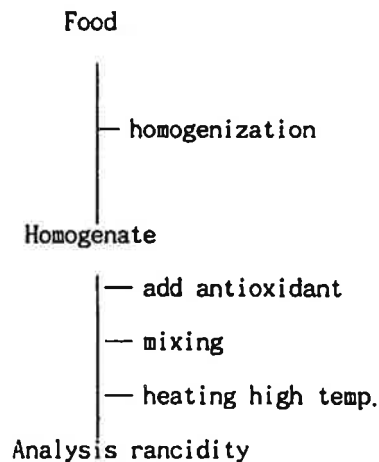
1. 생약으로부터 flavonoid의 분리 정제법

천연에 널리 존재하고 있는 생약재중에 함유되어 있는 flavonoid

를 solvent fraction 및 column chromatography를 이용하여 분리한 다음 각 fraction에 대해 antioxidant activity를 검증한다. 본 분리정제에 관한 새로운 기술 및 정보를 획득하기 위하여 이 분야의 국제적 권위자인 J. Terao(독구시마 대학) 및 Mayazawa교수(일본 동북대 교수)의 자문을 받는다. 천연물 중 Flavonoid는 다양하기 때문에 그 분리 정제법 역시 연구자에 따라 각기 다른 knowhow를 갖고 있다. 따라서, 본 연구자는 새로운 항산화 물질을 탐색하기 위하여 이 분야 연구자들과 유기적인 연계성을 갖지 않으면 안된다.

라. 새로운 antioxidant에 의한 식품의 극한 고온에서 산화 안정성 검색

다. 항에서 밝혀낸 가장 강력한 antioxidant activity를 갖는 antioxidant를 식품에 첨가하여, 다음과 같이 이 물질의 식품에 대한 산화 안정성을 비교 검토한다.



식품을 homogenization한 뒤, 새로 개발한 antioxidant 혹은 시판용 antioxidant(tocopherol, BHT)를 농도별로 첨가하여 잘 혼합시킨 다음 극한 고온 튀김하여 이들 제품의 산패도를 앞 항에서 개발한 방법들을 이

용해서 측정하여 식품의 산화 안정성을 평가한다. 기타 식품에 대해서도 동일한 방법으로 분석한다.

마. 새로 밝혀낸 (개발한) antioxidant의 in vivo에서의 antioxidant activity 측정

새로 개발한 antioxidant를 rat에 경구 투여한 다음 smoking, stress등의 관련질병을 유발시켜 각 조직 및 혈액으로부터 생성된 hydroperoxide량을 나향에서 기술한 CL-HPLC방법으로 분석하여 in vivo 중의 antioxidant효과를 검증한다. 본 연구분야의 새로운 기술과 정보를 습득하기 위해 일본 센다이 동북대의 Okubo 교수 연구실을 방문하고 상호교류를 확대한다.

바. 광산화에서의 항산화 활성 물질의 검색

일 황련에서 분리 동정한 베르베르에 대한 광산화 활성을 검증하고 이의 산업적 이용법을 개발한다.

사. 새로 개발된 antioxidant의 구조 결정

강력한 antioxidant activity가 확인된 새로운 항산화물질의 구조를 GC-Mass, NMR, IR등으로 이용하여 밝힌다. 본 구조분석을 위해 이 분야 전문가인 장윤석 박사 및 임유희 교수의 협조를 구한다.

아. 생리 기능 검증

항산화력이 검증된 물질을 실험동물에 투여하여 생체내의 기능을 규명한다.

본 연구분야에 새로운 이론을 도입시켜 연구를 진행하고 있는
미국 Texas주립대 유병팔 교수로부터 다양한 정보와 기술을 전수받는다.

자. 대량 생산

협력 업체인 한일 인삼에서 대량 추출 및 정제

제 3 장 연구개발 결과

제 1 절 식품 및 생체중의 산화 생성물 hydroperoxide의 분석

1. 식품 및 생체 시료로부터 산화 생성물 분석

In vivo 및 in vitro에서 생성되는 극미량의 산화 생성물을 측정하는 것은 산화의 진행과정 및 항산화성 활성을 검토하는 데 매우 중요하다. 본 연구팀은 chemiluminescence detector가 장착된 HPLC(CL-HPLC)를 이용하여 pico mol이하의 hydroperoxide를 Fig. 1-1과 같은 조건에서 분석했을 때, Fig. 1-2와 같은 chromatogram을 나타내며, phosphatidyl choline의 hydroperoxide (PCOOH)함량과 chromatogram상의 peak 면적 사이에는 매우 높은 상관관계를 나타냈다 (Fig.1-3).

본 CL-HPLC에 의한 산화 생성물의 분석은 in vitro 및 in vivo에서 산화초기에 극미량의 hydroperoxide를 특이적으로 정량할 수 있기 때문에 식품 및 생체 sample의 산화 안정성을 검토하는 데 매우 유익하다.

2. 천연물로부터 항산화 물질의 추출

pH조정 및 ultrasonicator를 이용하여 천연물 중의 항산화 물질을 추출할 때 고온처리에 의해 유효 성분이 파괴되는 것을 막을 수 있고, 추출 효율 (Table 1)을 높일 수 있는 새로운 방법이 확립되었다.

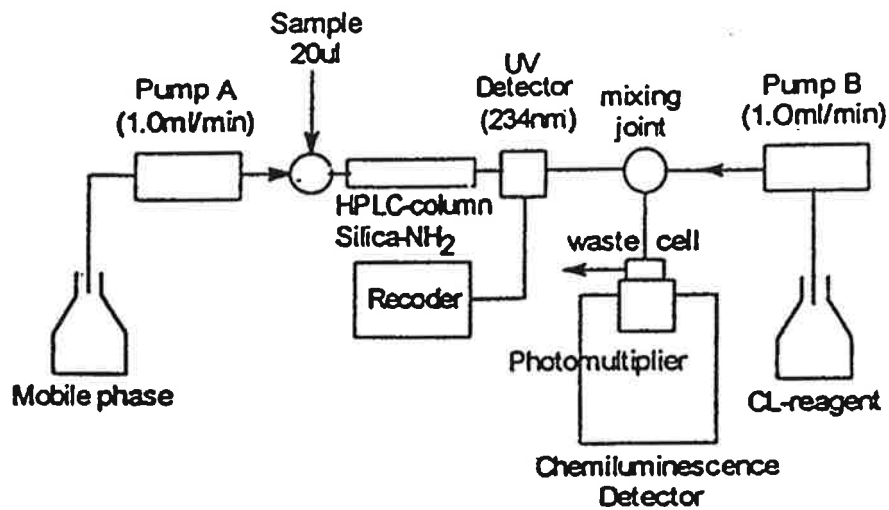


Fig. 1-1. Schematic diagram of CL (chemiluminescence) - HPLC for the assay of lipid hydroperoxide

mobile phase: Hexane: 2-propanol: MeOH : H₂O = 5:7:2:1 (v/v/v/v)
 CL-reagent: cytochrome c-luminol/pH 10.0 borate buffer

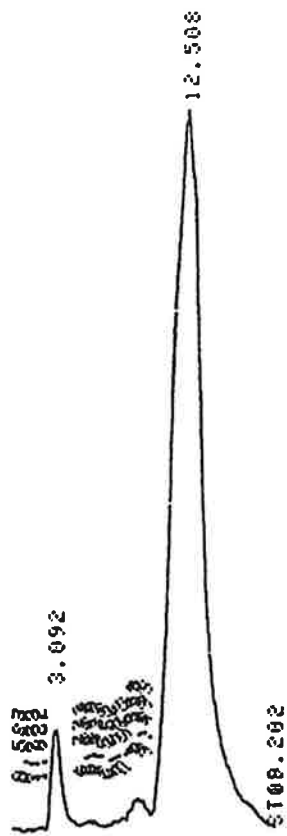


Fig. 1-2. Chromatogram of standard phosphatidyl choline hydroperoxide

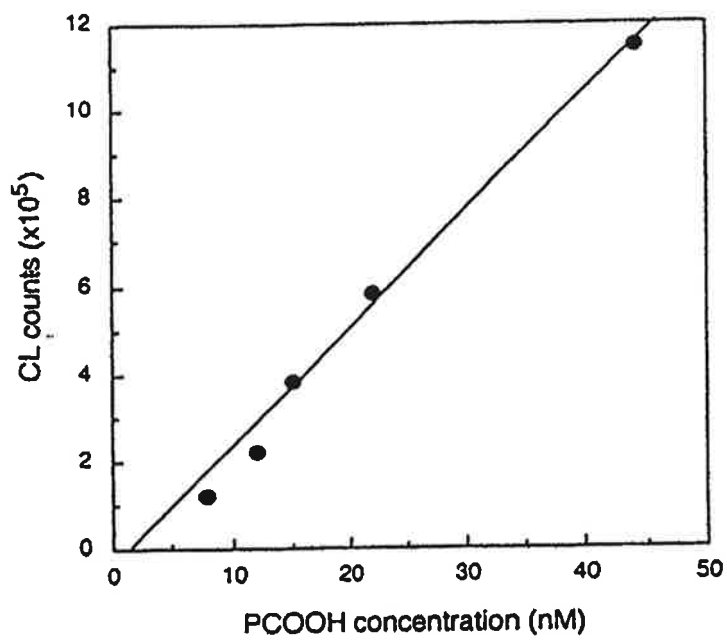


Fig. 1-3. Calibration line of phosphatidyl choline hydroperoxide (PCOOH) in CL-HPLC

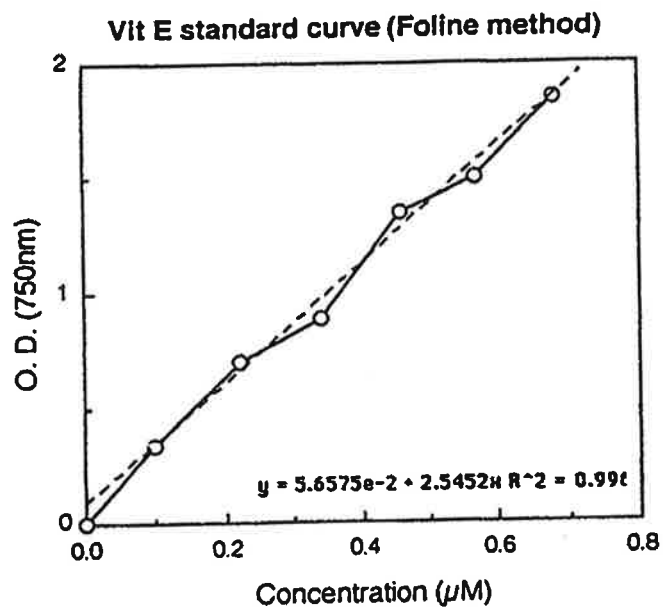
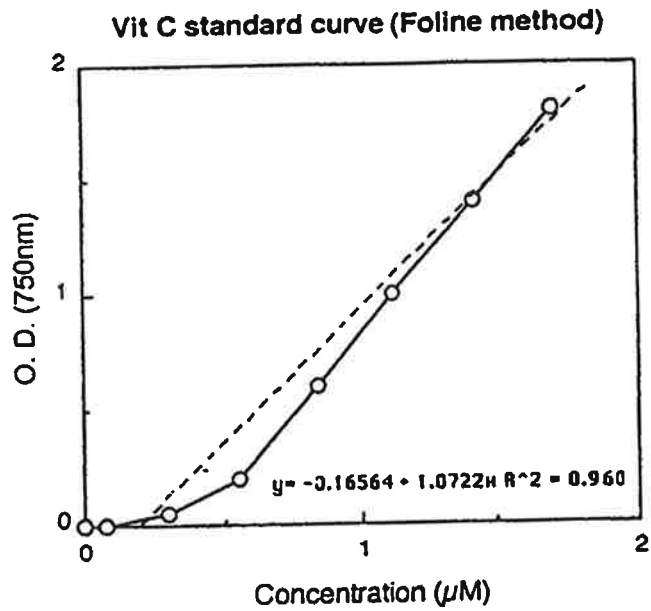


Fig. 1-4. Standard curve of vitamine C and E measured by Foline method

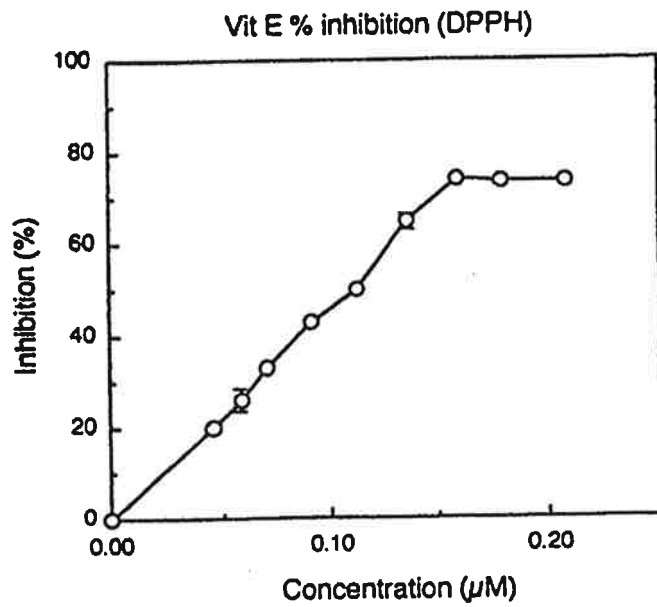
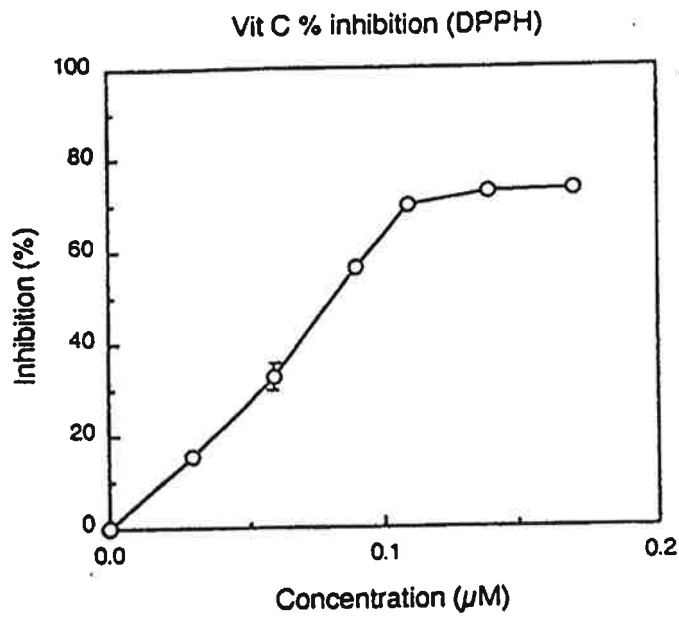


Fig. 1-5. Inhibition of vitamine C and E measured by DPPH

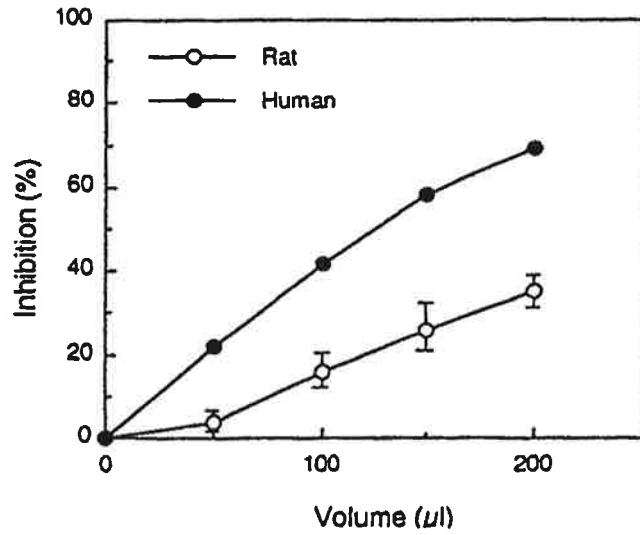


Fig. 1-6a. Comparison of rat and human plasma antioxidant activity by DPPH

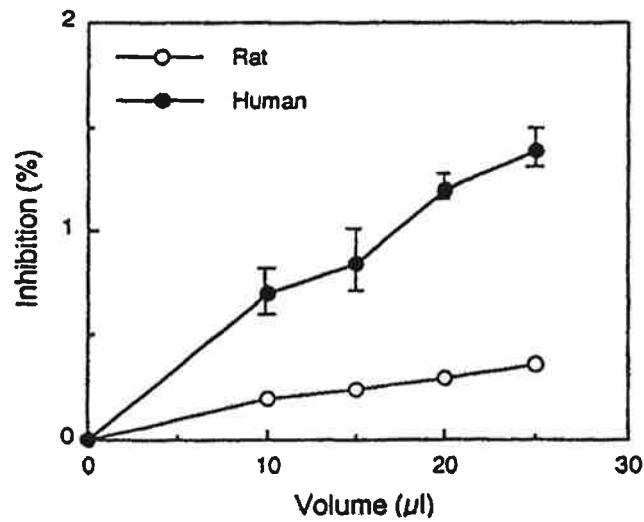


Fig. 1-6b. Comparison of rat and human plasma antioxidant activity by Foline method

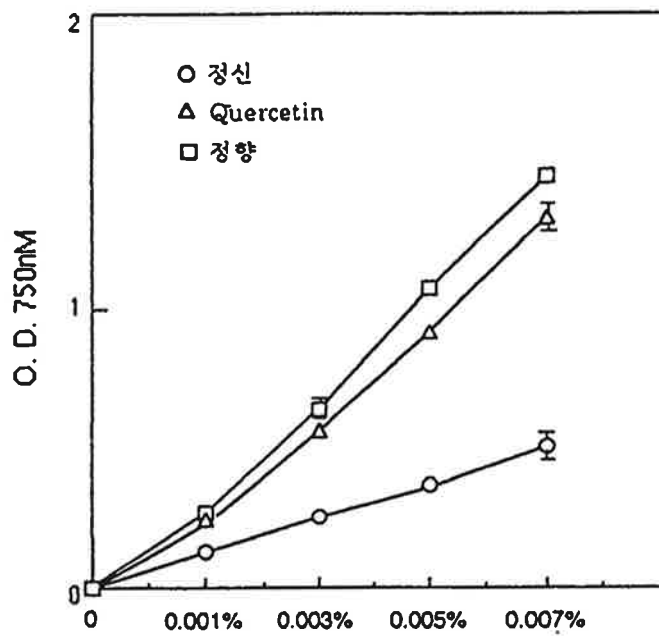


Fig. 1-7. Comparison of antioxidant activity

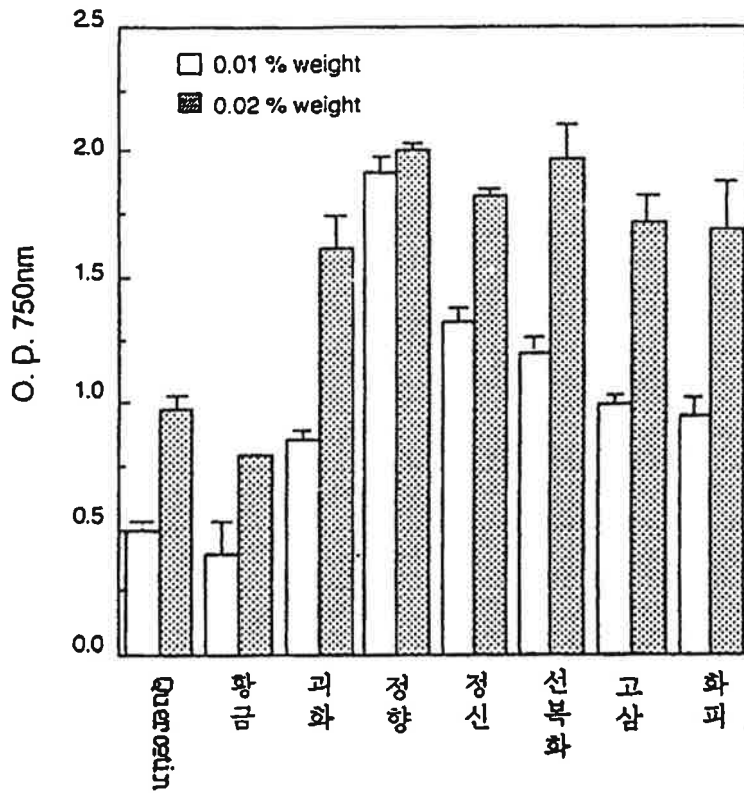


Fig. 1-8. Comparison of antioxidant activity

Table 2. 향산화 활성 측정을 위한 천연물

1	감송향	11	금전초	21	목단피	31	복신	41	수국차	51	육두구	61	지골피	71	토사자	81	황연
2	감초	12	귀견우	22	목향	32	복분자	42	시호	52	육종용	62	지실	72	토치자	82	황백
3	갈근	13	달개비	23	방귀	33	부자	43	신곡	53	울피	63	지부자	73	과극	83	황정
4	갈화	14	당귀	24	백강잠	34	빈랑	44	양강	54	위유	64	진피	74	판랍근	84	현삼
5	곽향	15	당약	25	백선피	35	사인	45	어성초	55	자초	65	창출	75	포룡 공용	85	홍화
6	계피	16	대황	26	백복령	36	산약	46	연교	56	작약	66	천궁	76	폐정근	86	후박
7	괴화	17	두충	27	백령	37	산수유	47	오미자	57	접골목	67	천문동	77	천화분	87	흑출
8	고본	18	두충잎	28	백출	38	삼내자	48	육이인	58	정신	68	청피	78	하부 자초		
9	공사인	19	마황	29	백화 사술초	39	상백피	49	울금	59	정향	69	초롱담	79	황기		
10	금은화	20	백문동	30	백하수오	40	선복화	50	원지	60	조각자	70	토복령	80	황백		

결과 마황, 위유, 자초, 현삼등이 매우 높은 항산화 활성을 나타냈다. 한편 gallic acid를 scavenger로 했을 때, 천연물의 quencher로서의 항산화 활성을 비교한 결과, 특히 후박이 quencher로서 매우 높은 활성을 나타냈다 (Fig. 1-10).

Fig. 1-11은 quencher로서 활성을 지닌 acetaldehyde를 표준물로 하여 천연물의 scavenger로서의 활성을 비교한 결과, 현삼이 매우 높은 활성을 나타냈다. quencher로서 활성이 가장 높은 후박을 표준물로 했을 때, scavenger로서 활성이 큰 것은 마황, 위유, 정향, 현삼 등으로 나타났다 (Fig. 1-12).

Fig. 1-13는 현삼을 scavenger로서 표준물로 삼았을 때 마황, 위유, 후박, 특히 현삼의 활성이 매우 높게 나타났다. 한편 SOD의 활성은 복분자, 오미자, 정향, 조각자, 토치자 등이 높게 나타났으며, 특히 정향이 매우 높은 활성을 나타냈다 (Fig. 1-14).

Fig. 1-15은 quencher로서 가장 활성이 높은 후박과 혼합했을 경우 SOD의 활성이 높은 것은 복분자, 오미자, 토치자 등이고, 후박과 조합을 이루었을 때 가장 높은 것은 복분자였다.

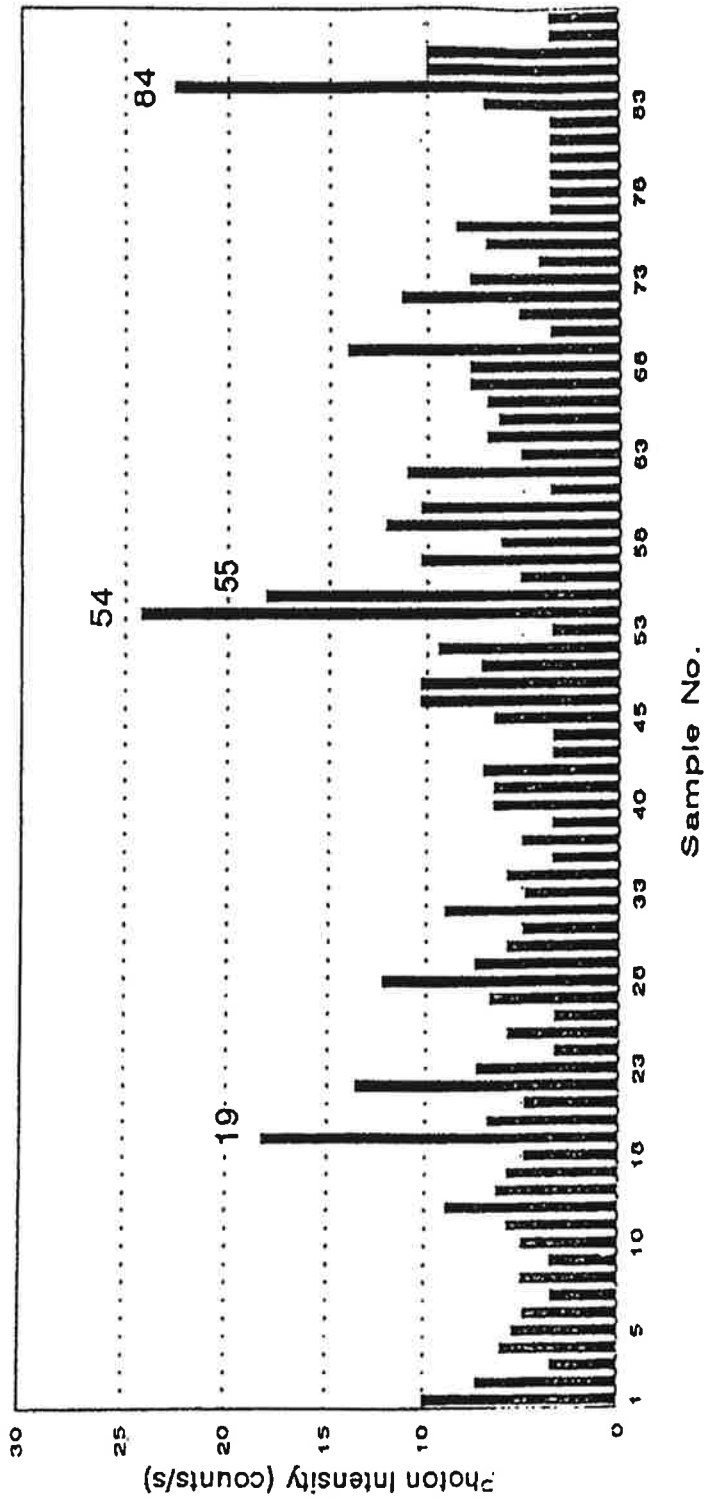


Fig. 1-9. The activities of antioxidant as quencher and scavenger for 87 antural products
 X: H₂O₂, Y, Z: sample

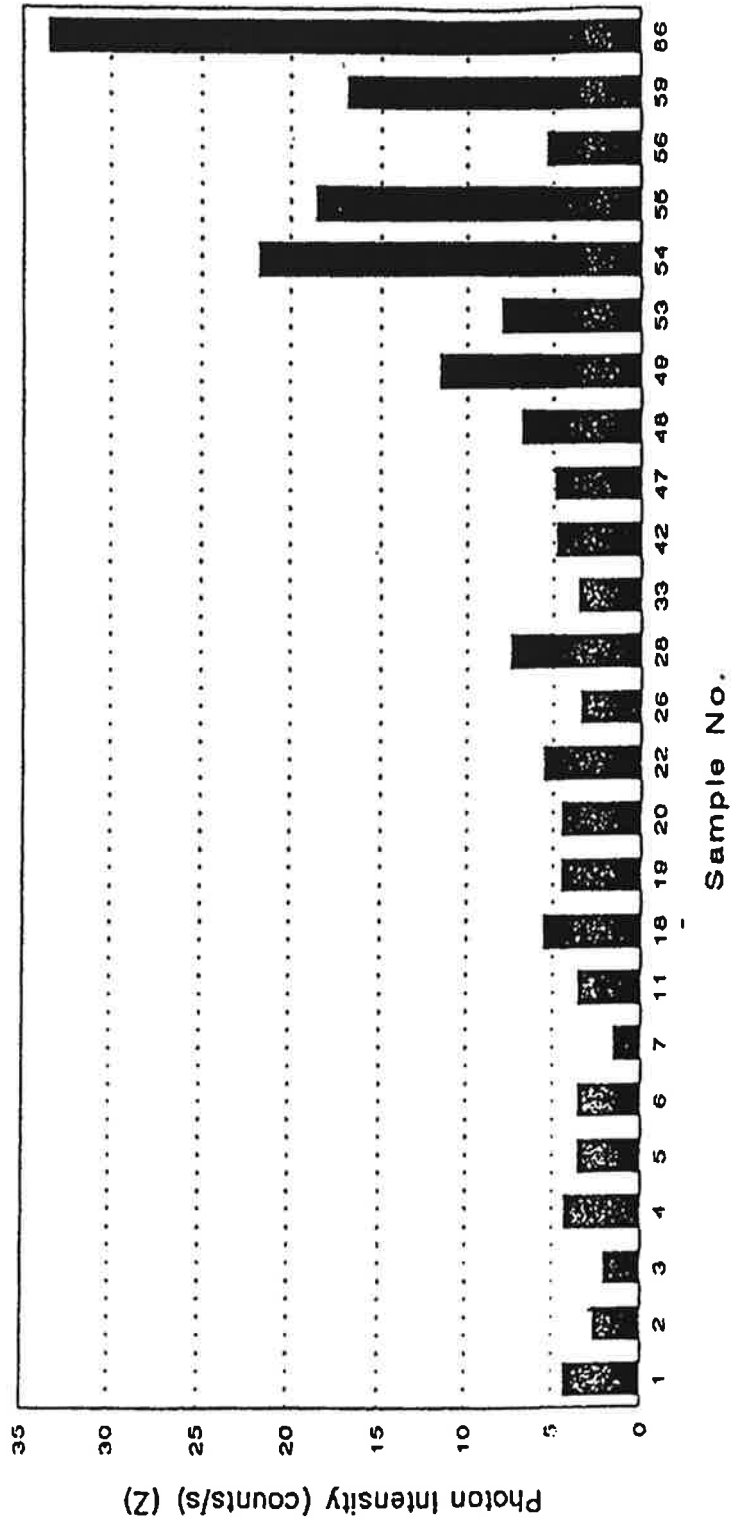


Fig. 1-10. The activities of antioxidant as quencher compared with the scavenger of gallic acid

X: H₂O₂, Y: gallic acid., Z: sample

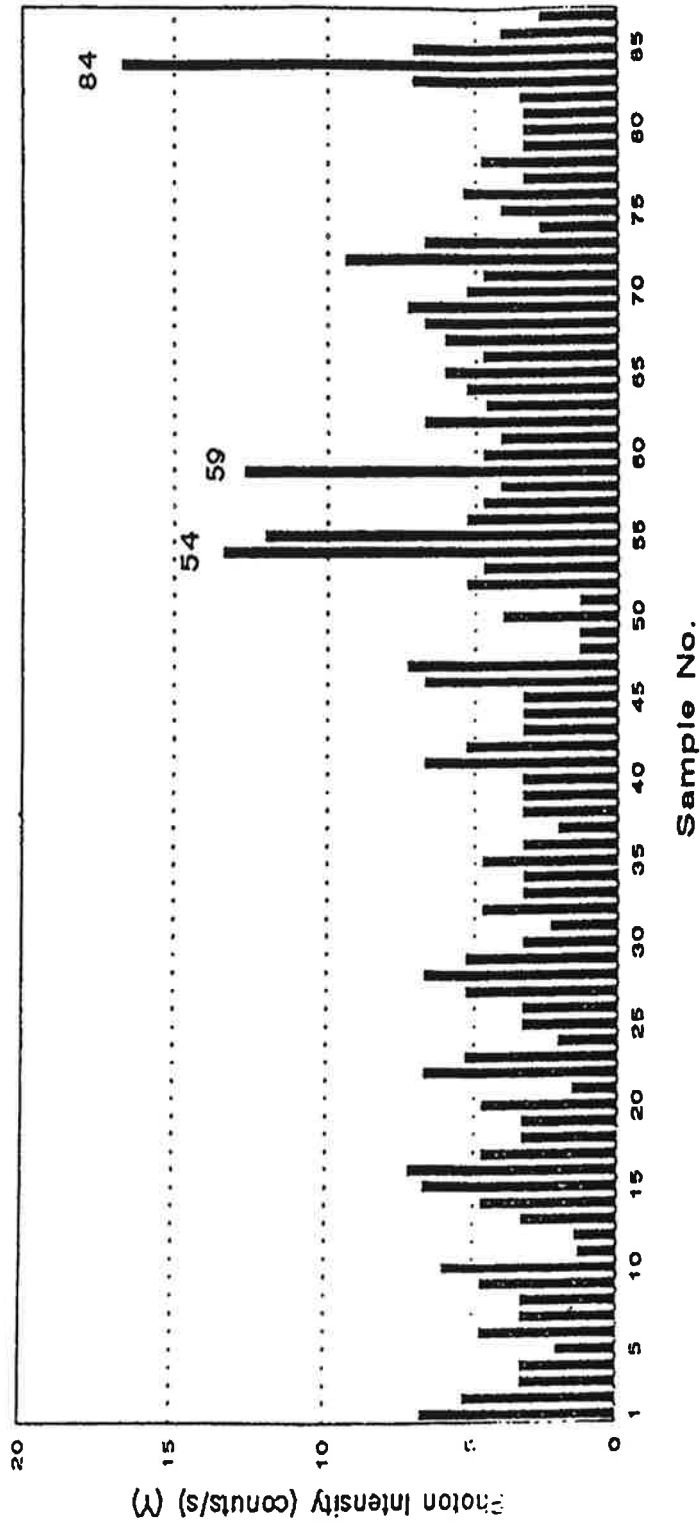


Fig. 1-11. The activities of antioxidant as scavenger compared with the quencher of acetaldehyde
 X: H₂O₂, Y: sample., Z: CH₃CHO

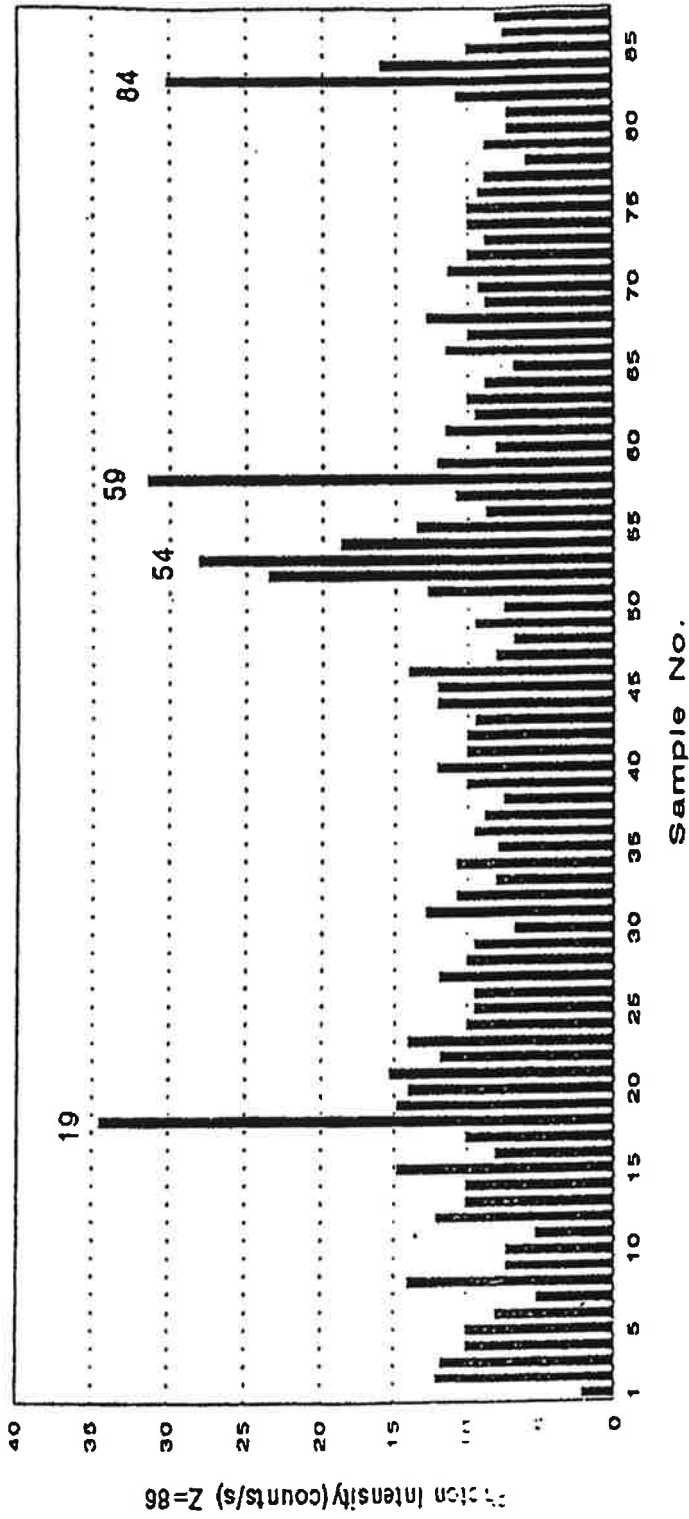


Fig. 1-12. The activities of antioxidant as scavenger compared with the quencher of 86 samples
 X: H₂O₂., Y: sample., Z: 86 sample

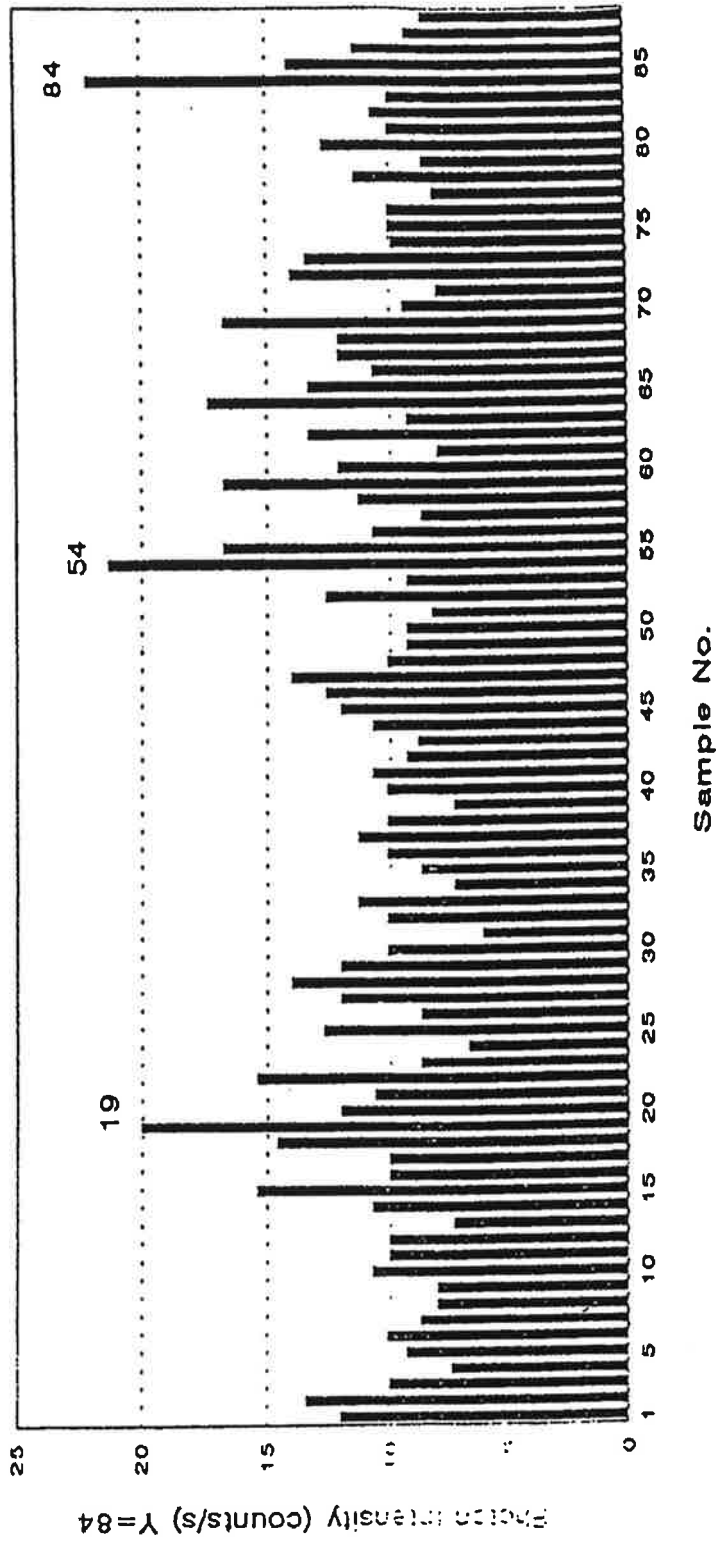


Fig. 1-13. The activities of antioxidant as quencher compared with the scavenger of 84 samples
X: H₂O₂, Y: 84 sample., Z: sample

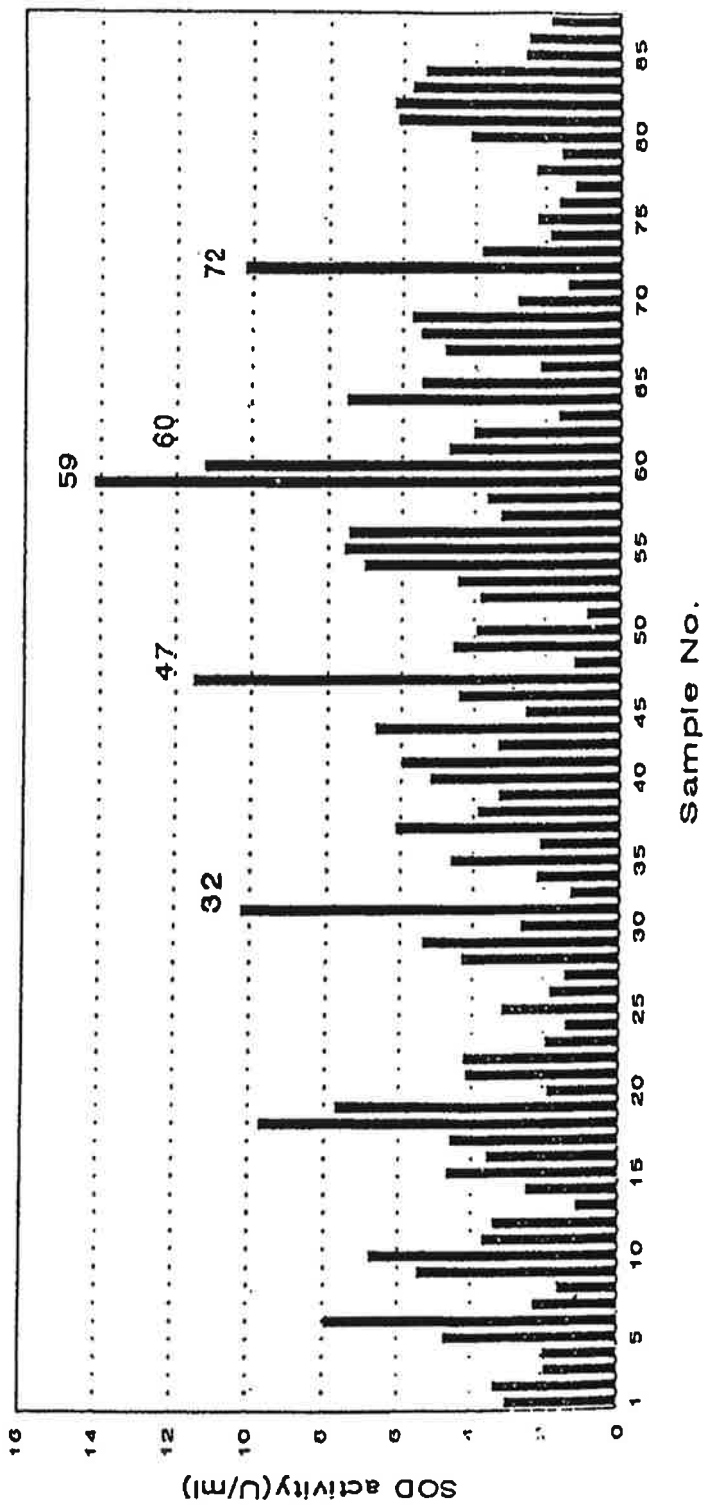


Fig. 1-14. Compare of SOD activities for 87 natural products

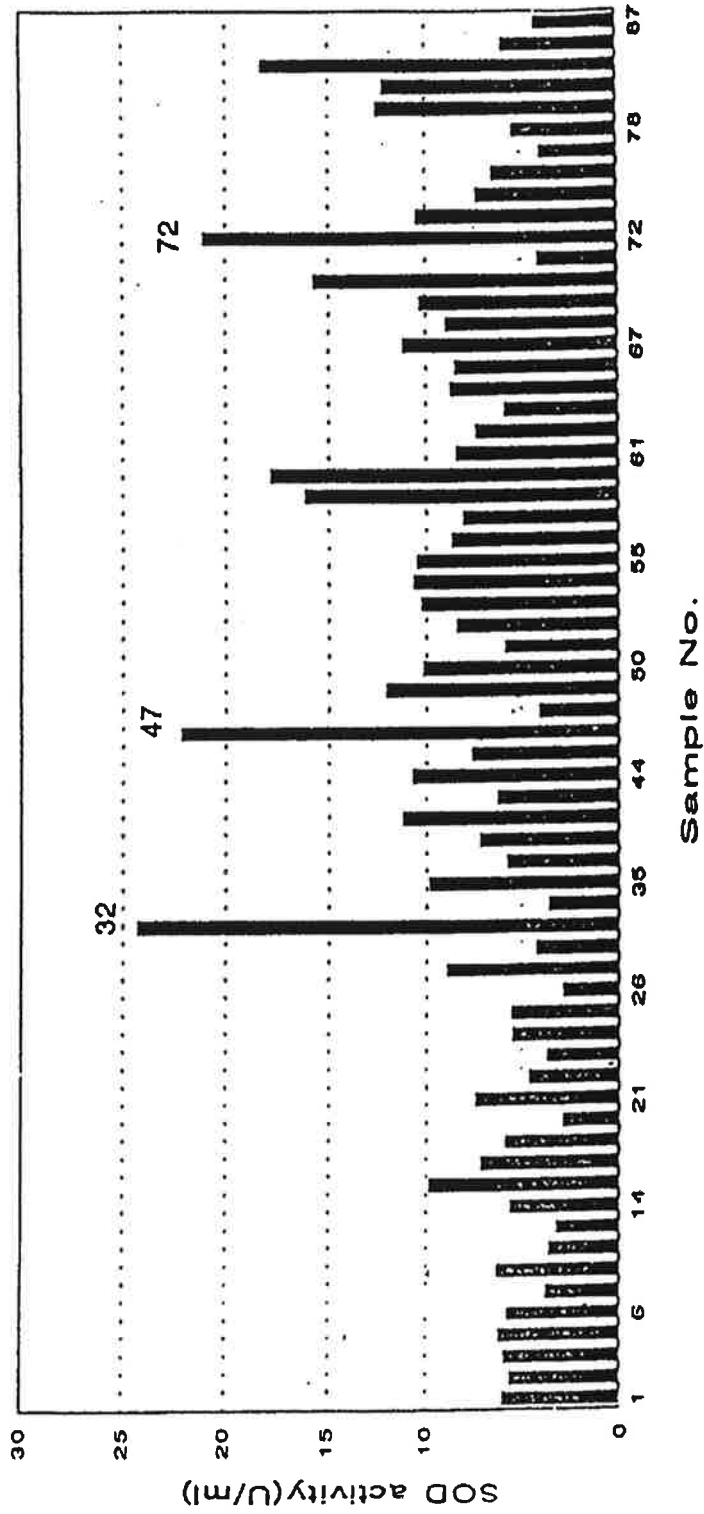


Fig. 1-15. Compare of SOD activities for 87 natural products mixed with the quencher of 86 sample

3. 천연물로부터 자동 항산화 물질의 screening

활성이 높고, 항염증 및 항균제로 알려진 정공둥으로 부터 분리, 정제하여 solvent fractionation으로 얻은 각 fraction에 대해 항산화 활성을 검토한 결과 n-BuOH층이 매우 높게 나타났으며 (Fig. 1-16), 이를 silica gel column chromatography를 이용하여 5개의 fraction으로 분리하였다. 이 fraction에 대해 항산화 활성을 측정한 결과 Fig.1-17과 같이 fraction 1 (compound I), fraction 2(compound II), fraction 4(compound III)에서 활성이 매우 높게 나타났다.

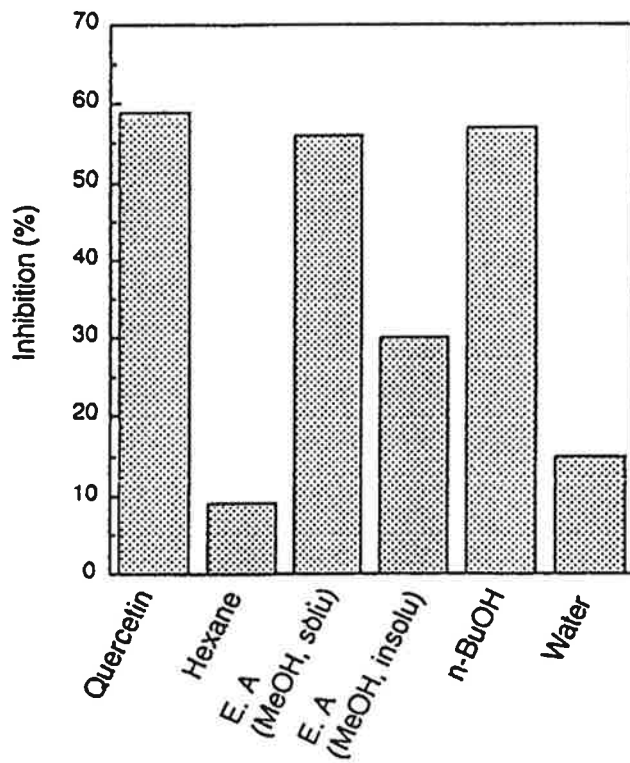


Fig. 1-16. Comparison of antioxidant activity (0.005% DPPH)

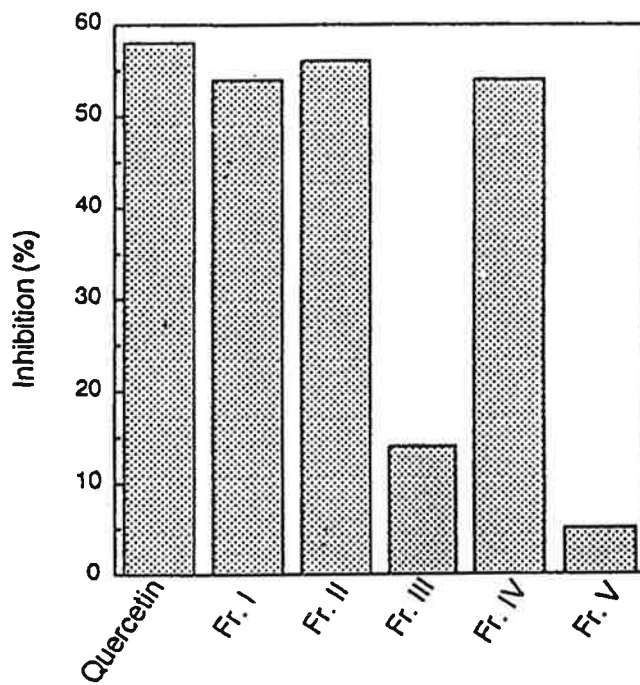


Fig. 1-17. Comparison of antioxidant activity (0.005% DPPH)

제 2 절 황금으로부터 radical scavenger로서의 항산화 활성측정결과

1. 황금으로부터 분리된 각 성분의 Liposome에 있어서 항산화 활성

Fig. 2-1과 같이 황금으로부터 분리된 각 성분에 대해 Phosphatidylcholine으로 조제한 liposome에 대한 항산화 활성을 측정한 결과 Comp. III (ganhuangenin으로 확인됨)는 반응 개시 5시간까지 PCOOH의 생성을 99이상 억제함으로써 탁월한 항산화 효과를 나타내고 있다.

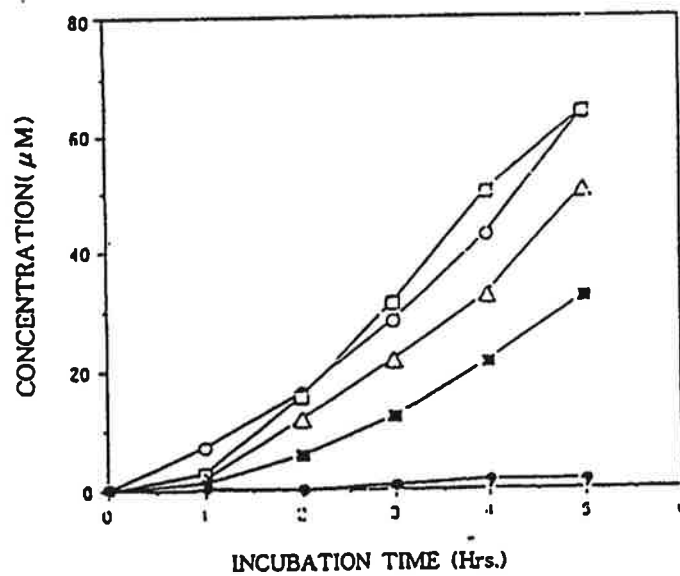


Fig. 2-1. Inhibitory effects of the flavonoids on the production of PCOOH
in liposome

○:control., □:wogonin., ●:ganhuangenin
▲: wogonin-7-O-glucuronide methyl ester
■: 2',3,5,6',7-pentahydroxyflavanone

2. 쥐의 간 microsome에 대한 ganhuangenin의 항산화 활성

in vitro 실험에서 강력한 항산화 활성이 확인된 ganhuangenin을 쥐의 간세포로부터 조제된 microsome 중에서 α -tocopherol보다 뛰어난 항산화 활성을 나타냈다. (Fig. 2-2)

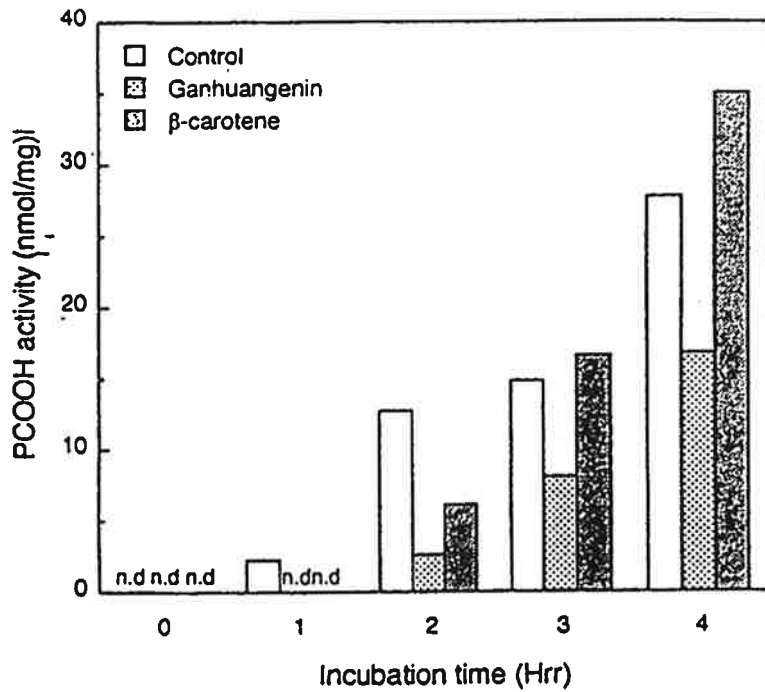


Fig. 2-2. Antioxidant activity of ganhuangenin in rat liver microsome. n.d: not detected

3. 생체 내에서의 ganhuangenin의 항산화 효과

Ganhuangenin의 생체 내에서의 항산화 효과를 확인하기 위하여 Sprague Dawely rat에 ganhuangenin을 체중 100mg/kg씩 마취 해부전 24시간, 12시간, 6시간 3회에 걸쳐 경구투여하고 처리 1시간 전에 반응개시제로서 AAPH를 복강 주사 후 혈장, 간, 폐, 신장 및 뇌에서 생성된 PC-OOH생성량은 Table 3과 같다.

Table. 3. Antioxidant activity of ganhuangenin in the tissues of rat

Tissues	Control	Ganhuangenin	β -carotene
Liver	69.54 ± 3.32 ^a	9.77 ± 0.46	32.55 ± 18.56
Lung	11.95 ± 3.36	3.33 ± 2.61	3.07 ± 0.77
Kidney	2.39 ± 0.70	0.80 ± 0.34	2.02 ± 0.41
Brain	6.67 ± 2.73	6.20 ± 2.45	6.04 ± 2.43
Unit : pmol/plasma ml			
Blood plasma	1,347 ± 326.9	168.7 ± 20	247.5 ± 50.2

Ganhuangenin투여군은 brain을 제외한 모든 장기에서 Control에 비해 현저한 항산화 활성을 나타내고 있다. 동물 체내에서 1차로 흡수가 일어나는 혈장중에서의 PC-OOH 생성량은 대조군에 비해서 약 1/10정도로 억제 되었다. Liver, Lung, Kidney 역시 ganhuangenin투여군은 강력한 항산화 활성을 나타냈다. 특이하게도 Brain에서는 각 그룹간 차이를 나타내지 않고 있다. Brain의 장기 중에서 가장 중요한 기관이기 때문에 이미 강력한 항산화 물질로 대비하고 있기 때문에 외부에서 투여된 항산화 물질에 대해 영향을 받고 있지않나 생각 되는데 이 점에 대한 앞으로 더 많은 검토가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

4. Ganhuangenin이 LDL의 산화에 미치는 영향

LDL의 산화적 수식에 있어 ganhuangenin농도 조건 Fig. 2-3은 PBS에 용해되어 있는 LDL(250 μ g protein/ml)을 농도별로 ganhuangenin이 첨가되어진 상황에서 20 μ M CuSO₄와 함께 5시간동안 배양함으로써 생성된 TBARS의 함량으로 ganhuangenin의 최적의 농도를 측정 한 결과이다. Quercetin 및 Ganhuangenin은 최종 1% 이내의 EtOH용액에 용해되어진 상태에서 5 μ M에서 160 μ 의 농도까지 실험에 임했다. Fig 2-3에서 보는 바와 같이 20 μ M의 농도까지는 항산화제가 첨가되지 않은 control과 비교해서 별로 차이를 보이지 않았다. 그러나 40 μ M의 농도 이상에서는 Quercetin 및 Ganhuangenin 모두 항산화 활성을 보이기 시작했다. 따라서 본 실험에서는 실험환경의 특이적 상황을 고려하여 40 μ M 과 80 μ M의 농도에서 LDL의 산화적 수식에 있어 이들 물질의 항산화 활성을 비교 측정하였다.

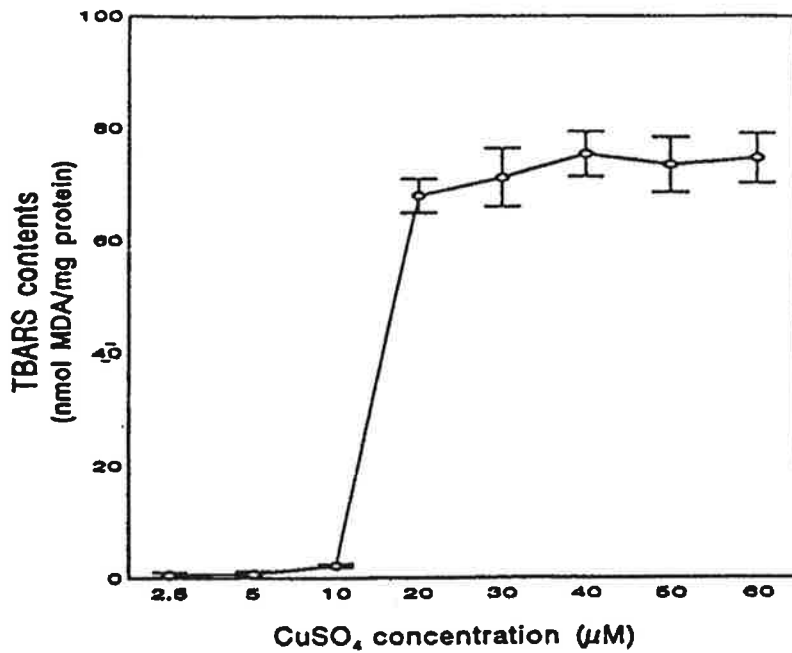


Fig. 2-3. Effect of different concentration of CUSO₄ on the oxidative modification of LDL

LDL (250μg protein/ml) was incubated for 5h in PBS at the concentrations shown. The oxidative was arrested by the addition of 200μM EDTA and 40μM BHT and refrigeration. Thereafter an aliquot was assayed for TBARS activity. The data were given a the mean ± S.D. (n=4).

5. LDL의 산화적 수식에 있어 Ganhuangenin의 활성 측정

Fig. 2-4, 5, 6은 PBS에 용해되어 있는 LDL(250 μ g protein/ml)을 각각 40 μ M과 80 μ M의 두가지 농도에서 Quercetin 및 Ganhuangenin이 첨가 상태에서 20 μ M CuSO₄로 37 $^{\circ}$ C에서 5시간 배양하여 산화를 일으켜 LDL에서 생성되어지는 TBARS 및 PCOOH의 함량과 형광 세기를 측정함으로써 이들 항산화 물질이 LDL의 산화적 수식에 미치는 영향을 측정한 결과이다.

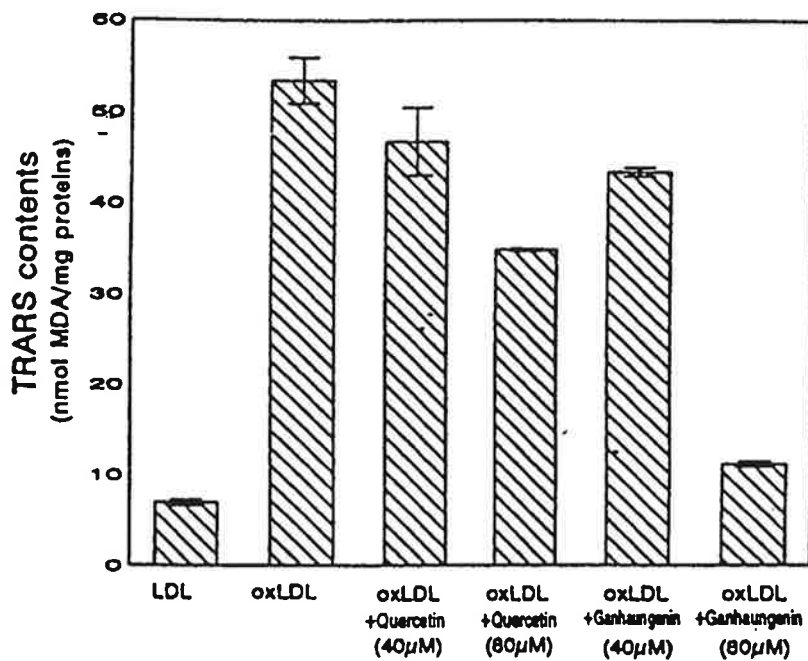


Fig. 2-4. Effect of quercetin and ganhuangenin on the 5hr oxidative modification of LDL.

LDL (250 μ g protein/ml) was subjected to a 5hr oxidation with 20 μ M CuSO₄ in PBS in the absence and presence of quercetin and ganhuangenin at the concentration shown. The data was given as the mean \pm SD (n=4).

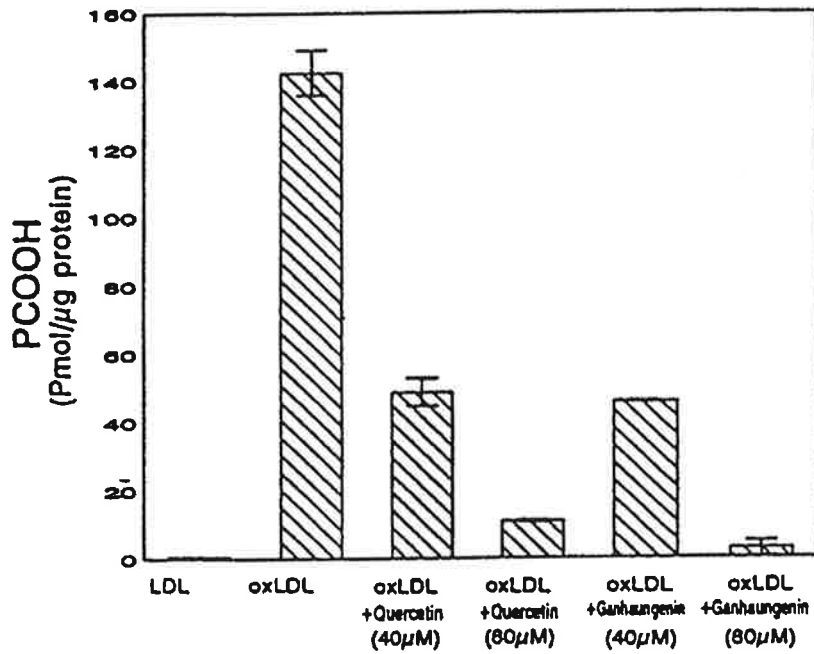


Fig. 2-5. Effect of quercetin and ganhuangenin on the 5hr oxidative modification of LDL.

LDL (250μg protein/ml) was subjected to a 5hr oxidation with 20μM CuSO₄ in PBS in the absence and presence of quercetin and ganhuangenin at the concentration shown. Thereafter an aliquot was assayed for the determination of PC hydroperoxide in oxidized LDL. The data was given as the mean ± SD (n=4).

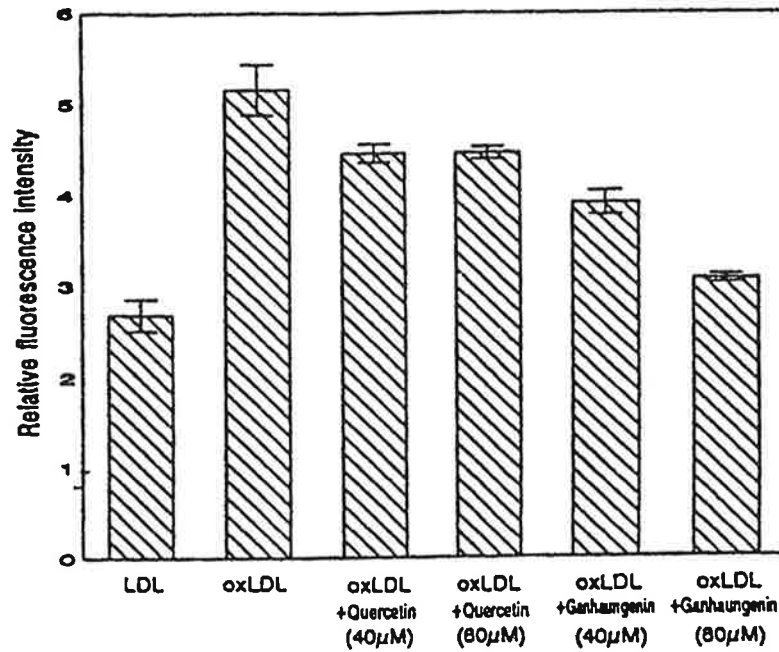


Fig. 2-6. Effect of quercetin and ganhuangenin on the 5hr oxidative modification of LDL.

The experimental procedure was the same as the legend of Fig. 2-4. Relative fluorescence intensity was expressed relative to 0.2µM quinine sulfate in 0.1N sulfuric acid with Ex: 350nm, Em: 410nm. The data was given as the mean ± SD (n=4).

제 3 절 화피로부터 radical scavenger로서 항산화 활성 측정 결과

1. solvent fractionation에 의해 분리된 fraction의 항산화 활성 측정

solvent fractionation에 의해 분리된 hexane, ethylacetate, n-butanol, water 등의 항산화 활성을 DPPH법에 의해 측정한 결과 butanol과 ethylacetate층은 기지의 Quercetin과 거의 동등한 항산화 활성을 나타냈다(Fig. 3-1). 특히 butanol층이 강력하게 나타나, 이 층의 계속 분리, 정제에 들어갔다.

2. column chromatography에 의한 butanol층의 분리 및 활성 측정

butanol층을 silica gel column chromatography를 이용하여 $\text{CHCl}_3:\text{CHCl}_3:\text{MeOH}=10:1, 7:1, 4:1, 2:1, 1:1, \text{MeOH}$ 순으로 재분리를 실시하였다.

Fig. 3-2과 같이 $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}(1:1)$ solvent system에서 강력한 항산화 활성을 나타냈으며 이 fraction을 다시 pre HPLC에 의해 분리한 결과 2성분으로 분리되어 이를 SC_1, SC_2 로 명명하였고, 그중 SC_1 은 강력한 항산화 활성을 나타냈으며, 이 성분에 대해 구조 확인 중에 있다.

3. liposome 중에서의 SC_1 의 항산화 활성 측정

Fig. 3-3과 같이 phosphatidyl choline을 이용하여 liposome을 조제하여 항산화 활성을 측정한 결과 Quercetin과 거의 대등한 항산화 활성을 나타냈다.

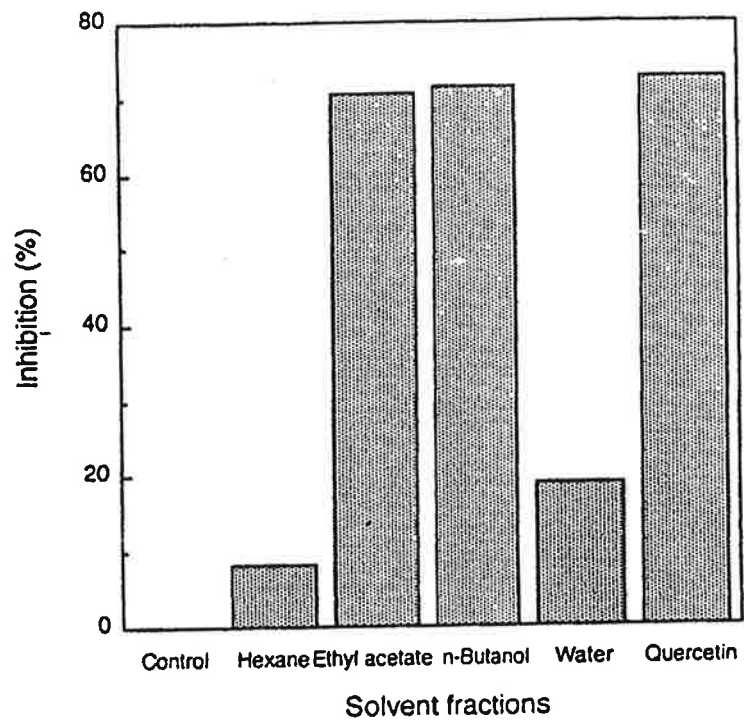


Fig. 3-1. Comparison of antioxidant activities of solvent fractions from *Betula platyphylla*

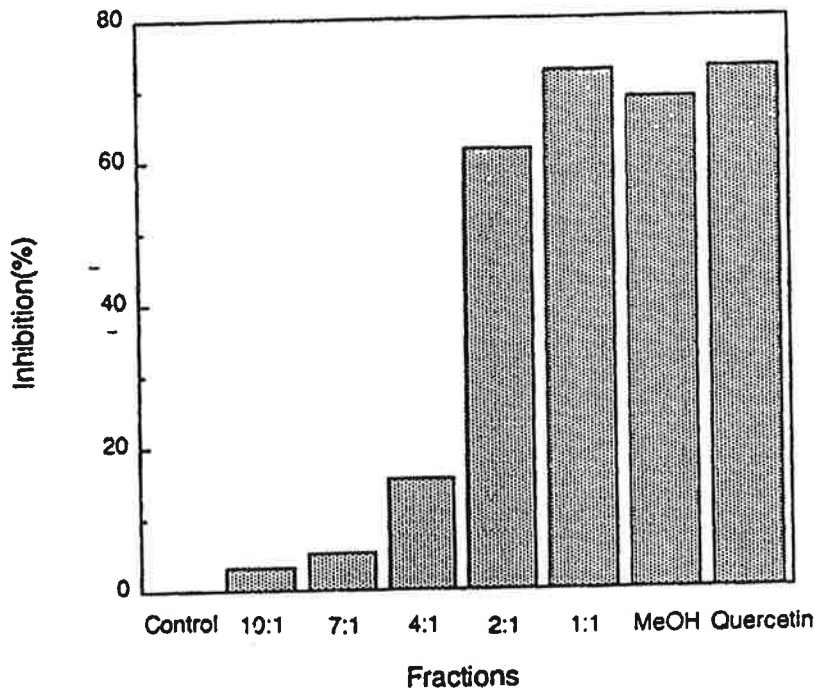


Fig. 3-2. Comparison of antioxidant activities of 6 fractions from BB by column chromatography

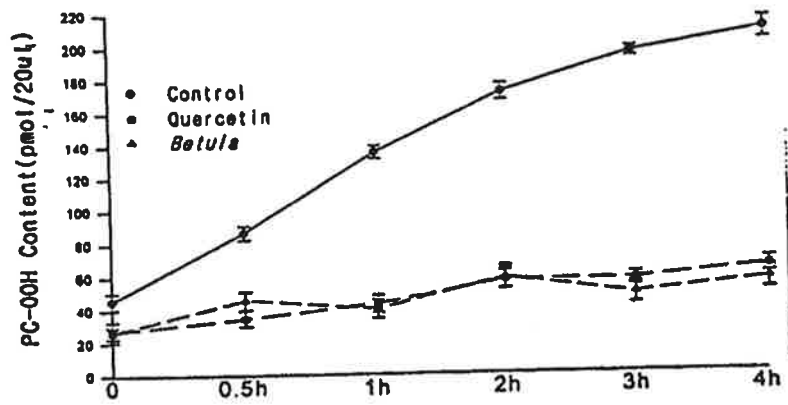


Fig. 3-3. The antioxidant activity in PC-liposome

4. SC₁의 생체 내에서의 항산화 활성 측정

SC₁을 rat에 투여하면서 Streptozotocin으로 당뇨병을 유발시켜 (free radical 생성에 의해서 당뇨병이 유발되는 것으로 보고되어 있음) 혈당치의 변화를 측정함으로써 생체내에서의 항산화 활성을 비교 검토하였다. Fig. 3-4와 같이 SC₁의 투여는 비교 control group과 비교했을 때 월등한 항산화 활성이 나타내는 것으로 확인되었다.

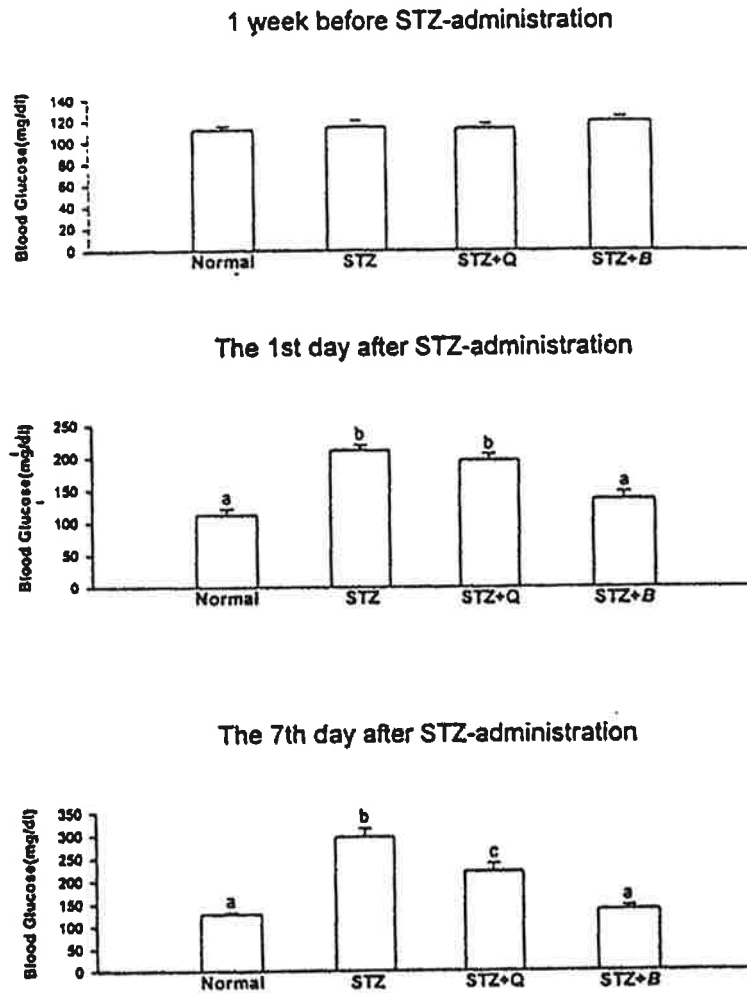


Fig. 3-4. The blood glucose level
 a-c value without the same subscript letter are significant different at $p < 0.05$

제 4 절 노관초로부터 radical quencher 로서의 항산화 활성 측정

1. Ethylacetate 층 물질의 분리

Ethylacetate층이HPLC에 의해 분리된 Peaks를 각각 GE-1,2,3,4, 5,6,으로 명명하고, 그 중에서 활성이 높게 나타나는 GE-2, GE-3, GE-6 에 대해 항산화 활성을 측정하였다. (Fig. 4-1)

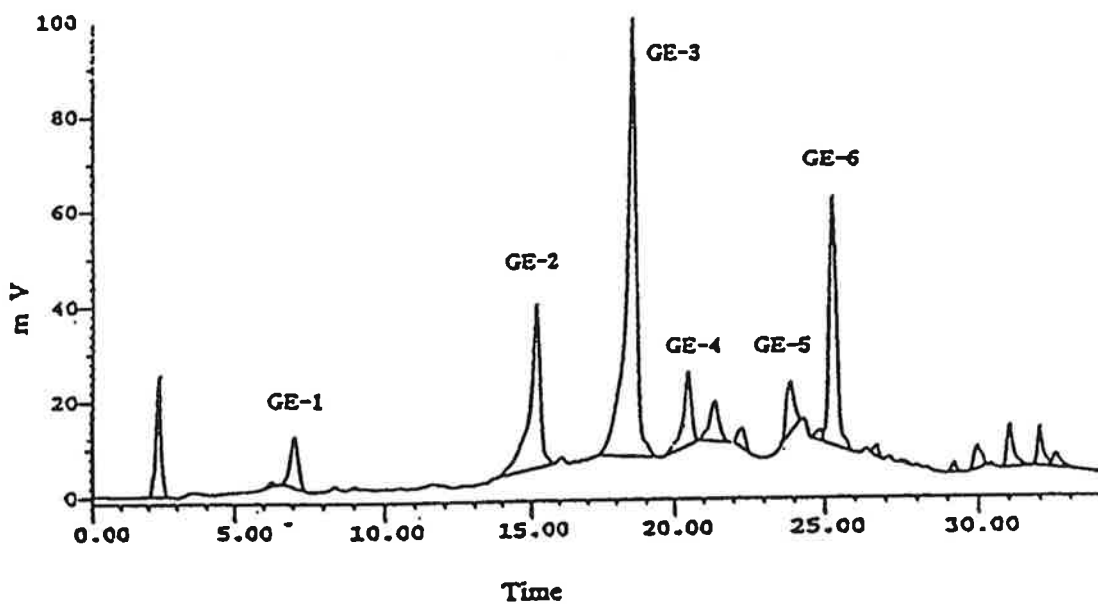


Fig. 4-1. The chromatogram of ethylacetate-layer by HPLC on TST gel ODS-80Tm column (280nm)

2. DPPH에 의한 항산화 활성 측정

3종류의 Flavonoids 인 Quercetin, Naringenin, (+)-Catechin 과 GE-2, GE-3, GE-6를 비교한 결과 Naringenin은 거의 활성을 나타내지 못하였고 GE-2, GE-3, GE-6는 모두 강한 항산화제로 알려진 Quercetin, (+)-Catechin과 비슷한 정도의 활성을 보였다.(Fig. 4-2)

3. DPPH에 의한 항산화활성의 pH 의존성

모두 Nernst law 에 따라 pH가 낮을수록 높은 활성을 보였다.

Nernst law 은 pH가 낮을수록 표준 산화환원 전위가 높아진다는 것으로 위의 pH가 2이고 위점막 상해의 3가지 원인이라고 할 수 있는 Stress, 항염증성 약물, Helicobacter pylori 가 모두 Free radical을 통해 위점막 상해를 유발시킨다는 점을 고려할 때 다른 조직보다도 Antioxidant를 통해 위점막 상해를 예방, 치료 할수있을 것이라는 근거를 제시해주고 있다.(Fig. 4-3)

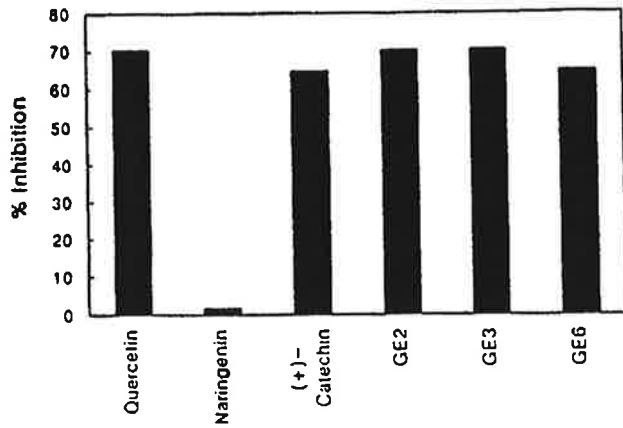


Fig.4-2 The Comparison of Antioxidant activity by DPPH-Inhibition Method (0.005% samples)

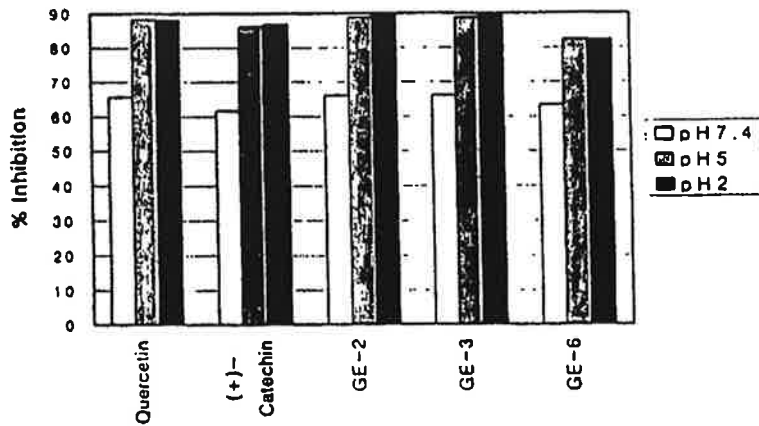


Fig.4-3. The Show of pH Dependent-Antioxidant activity by DPPH-Inhibition Method

4. Chemiluminescence에 의한 Quencher로서 Antioxidant Activities 비교

Chemiluminescence를 이용하여 GE-2, GE-3, GE-6에 대해 Quencher로서의 항산화 활성을 측정된 결과, GE-2, GE-3, GE-6 모두 다른 Flavonoids와 비교했을 때 높은 항산화 활성을 나타냈다.

특히 GE-2 는 그 활성이 특이적으로 높았다.(Fig. 4-4, 5)

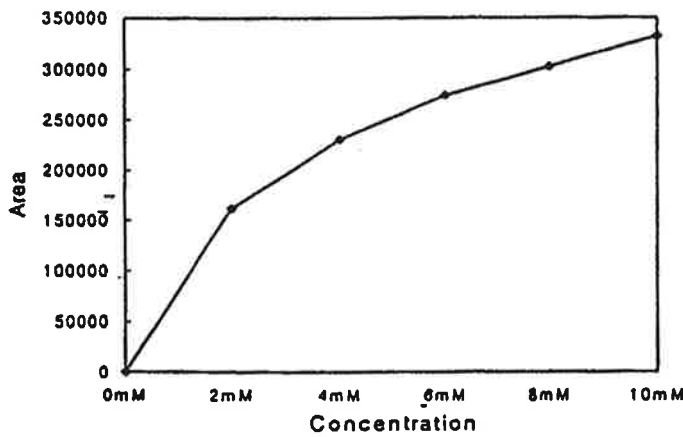


Fig.4-4. The Standard Curve of Gallic Acid as a quencher(Y factor)

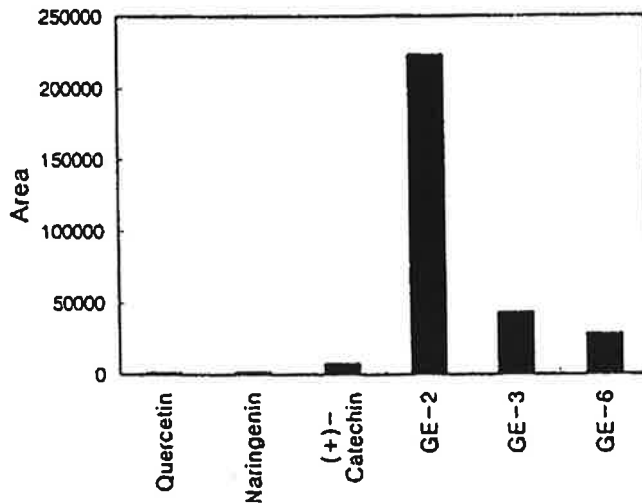


Fig.4-5. The Comparison of Antioxidant activity as a quencher(Y factor) by Chemiluminescence.

5. Phosphatidylcholine-Liposome에 대한 Antioxidant Activities의 비교

Naringenin을 제외한 나머지는 모두 Control에 비교해볼 때 높은 활성을 나타내었다. (Fig. 4-6)

특히 GE-2는 시간이 경과해도 PCOOH양을 계속 억제하고 있어 주목할 만하다. Quercetin, (+)-Catechin 경우 3시간까지는 PCOOH양이 떨어지는데 이것은 Liposomes에 대한 흡수성의 문제로 생각된다. (Fig. 4-7)

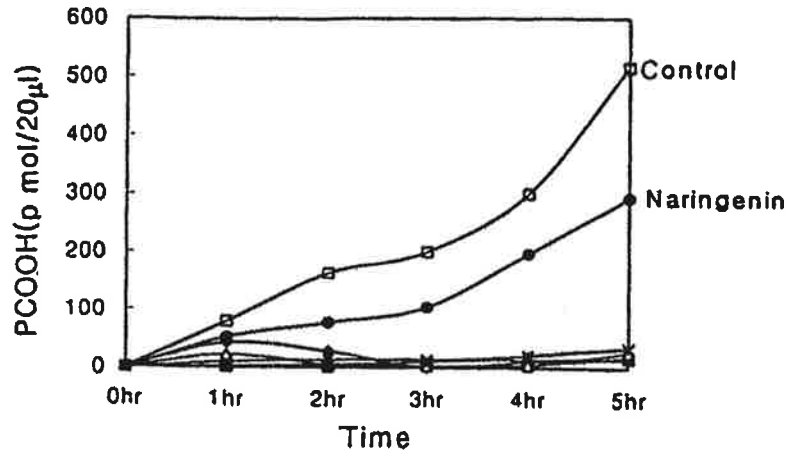


Fig.4-6. The Comparison of Antioxidant activity in PC Liposome

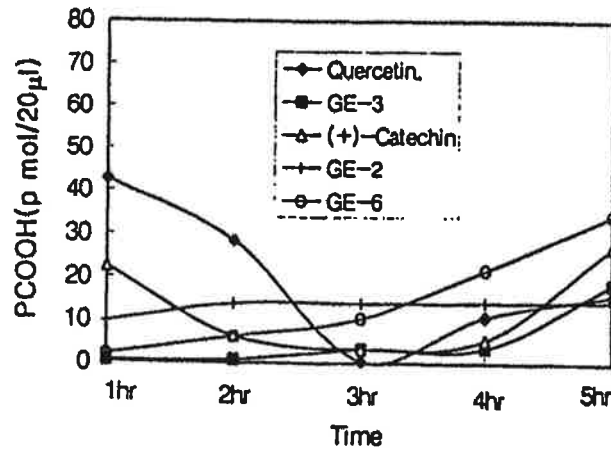


Fig.4-7. The Comparison of Antioxidant activity in PC Liposome.

6. Gastric Mucosal Tissues의 Antioxidant Activities 비교 및 MDA양의 측정

Test Samples을 경구투여한 rats의 Tissues가 모두 Control Group에 비해 높은 Antioxidant Activities를 보였으며 GE-2, GE-6가 상대적으로 좀 더 높았다. (Fig. 4-8)

MDA양에 있어서도 Antioxidant Activities에 상관적인 관계를 보이고 있는데 GE-2, GE-3의 경우는 조금 예외적인 경향을 보이고 있다.

in vitro에서 높은 활성을 보였던 Quercetin, GE-3보다 상대적으로 낮은 활성을 보였던 (+)-Catechin, GE-6가 in vivo에서 높은 활성을 보이는 것은 in vivo에서의 흡수성의 문제로 생각된다. (Fig. 4-9)

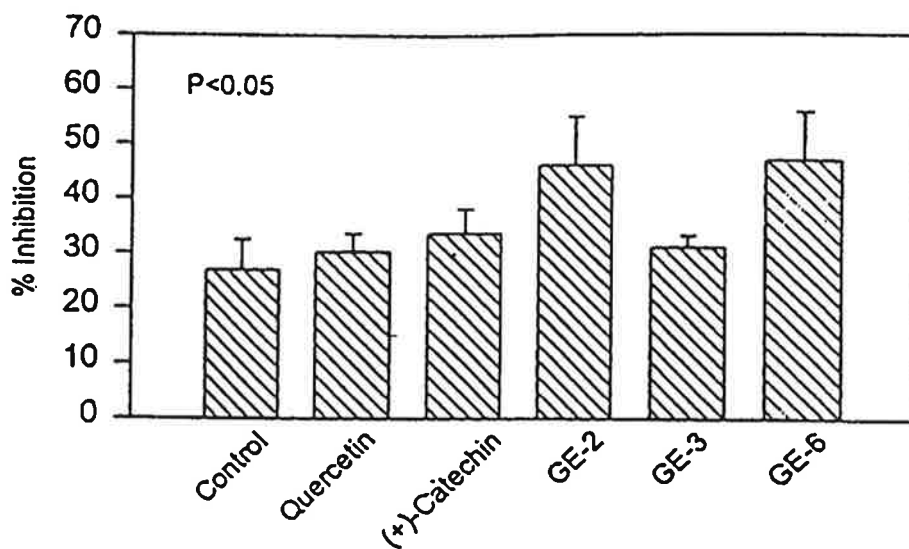


Fig. 4-8. The comparison of antioxidant activity in gastric mucosal tissue

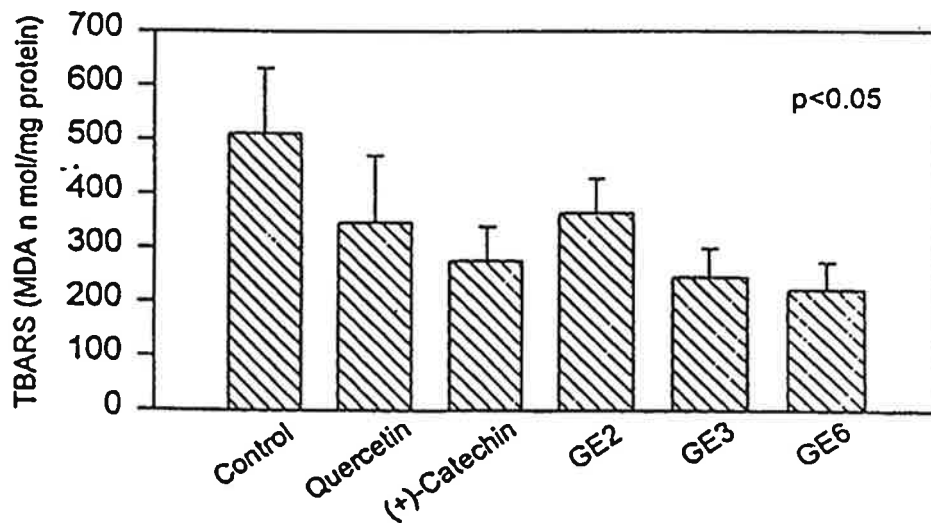


Fig. 4-9. The comparison of MDA in gastric mucosal tissues

7. Plasma 의 Antioxidant Activities 비교 및 MDA양 의 측정

Test Samples 모두 Control에 비해 높은 Antioxidant Activities, 낮은 MDA양을 보이고 GE-2, GE-6가 상대적으로 조금 높은 활성을 보였다. (Fig. 4-10, 11)

그러나 그 차이의 정도가 Tissues에 비해 작은 것은 시간 경과에 따른 Blood에서 Tissues로의 이동 흡수로 생각된다. 이것은 Blood로의 흡수 뿐만 아니라 Target Site인 위점막 조직으로의 흡수도 이루어 지고 있음을 시사한다.

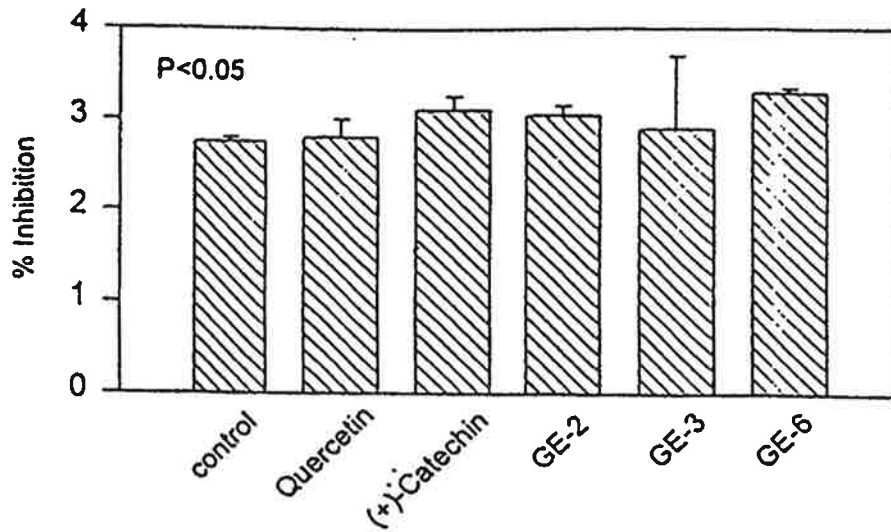


Fig. 4-10. The comparison of antioxidant activity in plasma

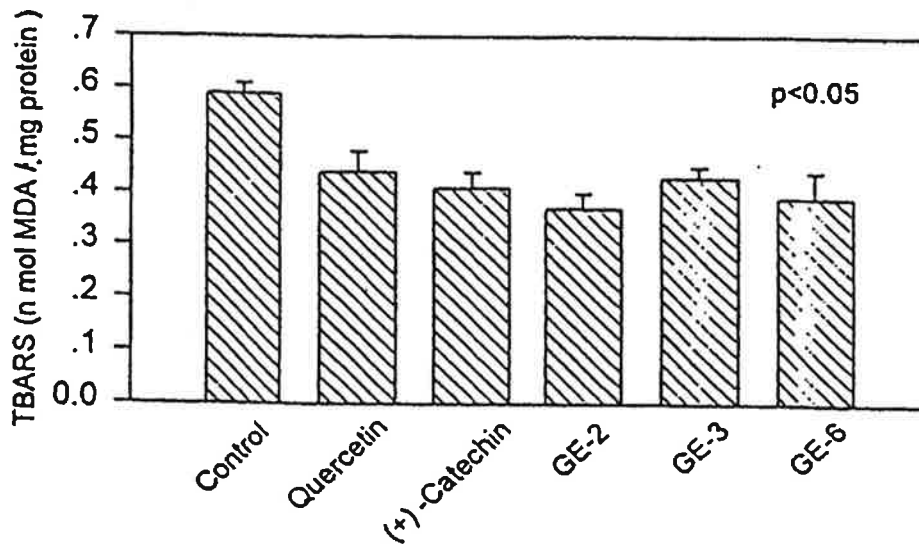


Fig. 4-11. The comparison of MDA in plasma

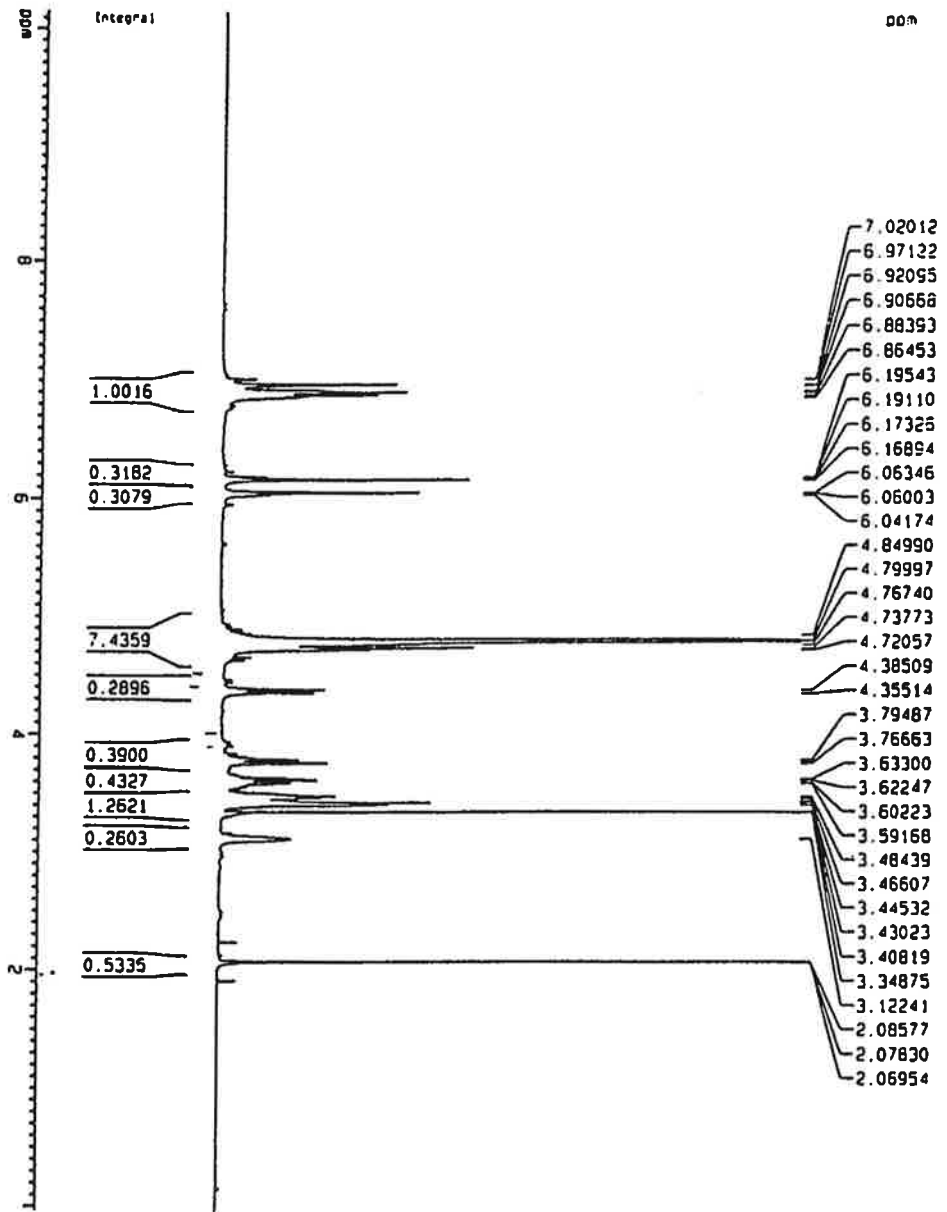
제 5 절. 화피로부터 화피 1과 화피2의 분리

화피로부터 분리, 정제한 물질들 중 약효를 보이는 두가지 물질의 구조를 결정하였는데 각각을 화피 1과 화피2로 명명하였다

화피의 $^1\text{H-NMR}$ (Fig. 5-1)은 당을 포함한 flavonoids의 일종이라는 정보를 알려주었고 $^{13}\text{C-NMR}$ (Fig. 5-2)에서는 모두 23개의 peaks가 관찰되었다. 그러나, 20.8ppm과 177.2ppm의 두 peak는 acetic acid로 판명되어서 화피1은 모두 21개의 탄소로 이루어진 화합물임을 알 수 있었다. 화피의 DEPT (Fig. 5-3), 2D-COSY (Fig. 5-4), 2D-HMQ (Fig. 5-5), 2D-HMBC (Fig. 5-6)등의 실험들로부터 Table 4와 같은 결과를 얻었고 또한 이들 실험으로부터 얻은 부분 구조들을 종합하여 Fig. 5-7과 같은 구조를 얻을 수 있었는데 β -D-Idose의 pyranose form을 가진 isoflavanal로 판명되었다. 화피1의 IUPAC이름은 3-(3,4-dihydroxyphenyl)-4-([3,4,5-trihydroxy-6-hydroxymethyl]tetrahydro-2H-pyran-2-yl]oxy)-2,5,7-chromanetriol이다.

Table 1. Chemical shifts of ^1H -NMR and ^{13}C -NMR and their assignments. (화피1)

no.	δ_c	CH_n DEPT	δ_H of directly attached protons HMQC (J(Hz))	^{13}C assignments
1	20.8	q		acetic acid
2	49.2	d	3.2	C3
3	60.4	t	3.5/3.7	Idose6
4	69.1	d	3.3	Idose5
5	72.4	d	4.3	C4
6	72.8	d	3.3	Idose2
7	75.7	d	3.3	Idose4
8	76.2	d	3.1	Idose3
9	83.2	d	4.5	C2
10	96.1	d	5.9	C8
11	97.7	d	6.1	C6
12	99.7	d	4.6	Idose1
13	102.6	s		C10
14	115.7	d	6.9	C5'
15	116.5	d	6.8	C2'
16	120.8	d	6.8	C6'
17	128.7	s		C1'
18	144.4	s		C4'
19	145.3	s		C3'
20	162.3	s		C9
21	162.7	s		C7
22	165.2	s		C5
23	177.2	s		acetic acid



betula platyphylla

Fig. 5-1

Current Data Parameters
NAME:
EXPNO: 1
PROCNO: 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_: 990512
Time: 10.31
INSTRUM: spect
PROBHD: 5 mm Dual 13
PULPROG: zg30
TD: 32768
SOLVENT: D2O
NS: 64
DS: 2
SWH: 4084.967 Hz
FIDRES: 0.124663 Hz
AQ: 4.0108533 sec
RG: 456.1
DH: 122.400 usec
DE: 6.00 usec
TE: 300.0 K
D1: 1.00000000 sec
P1: 9.70 usec
DE: 6.00 usec
SF01: 400.131850 MHz
NUC1: 1H
PL1: 0.00 dB

F2 - Processing parameters
SI: 16384
SF: 400.129597 MHz
WDW: ns
SSB: 0
LB: 0.00 Hz
GB: 0
PC: 1.00

10 near plot parameters
CX: 20.00 cm
F1P: 10.166 ppm
F1: 4067.83 Hz
F2P: -0.043 ppm
F2: -17.14 Hz
FNUC1: 0.51046 ppm/cg
HZCM: 204.24837 Hz/cg

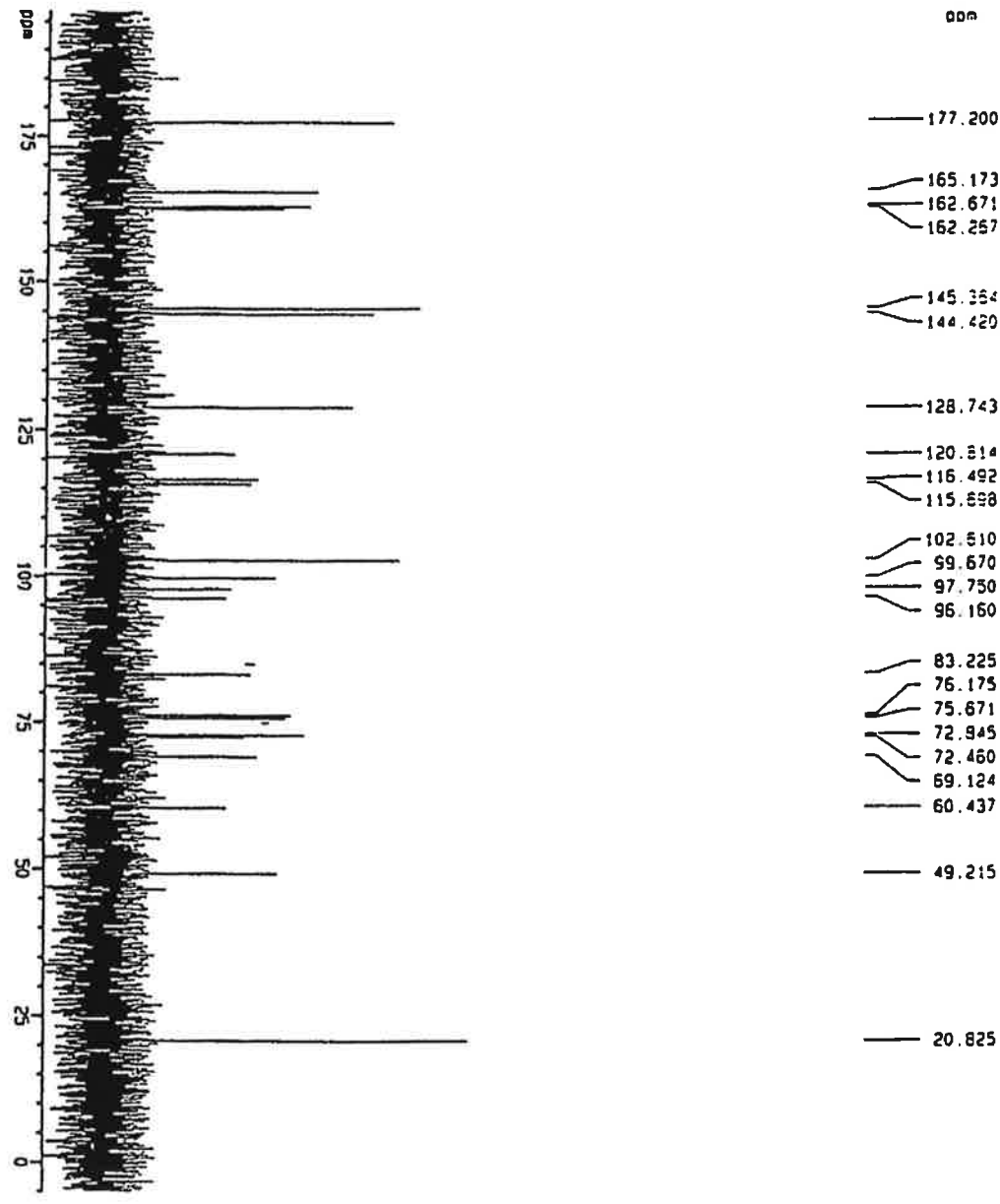


Fig. 5-2

```

Current Data Parameters
NAME          header
EPRMID       2
PROCDM       1

F2 - Acquisition Parameters
Date_        980512
Time        14 46
INSTNAM     10011
PROBID      5 mm Dual J3.
PULPROG     200920
INSTRUM     85535
PROBID      0200
SOLVER      2361
NS          0
DS         20325.203 Hz
SMW        0.310138 Hz
F1DRES     1.6122255 Hz
AD         16384
RG         24.600 uSec
DE         6.00 uSec
TE         360.0 K
O12        0.00002000 sec
P(L1)      21.00 dB
O1         2.00000000 sec
COPROC2    *all:16
PCPROG     105.00 uSec
SFRQ2      400.1316005 MHz
MFC2       1M
R12        -1.00 dB
P(L12)     19.00 dB
P1         9.00 uSec
DE         6.00 uSec
SFRQ1      100.6223079 MHz
MFC1       13C
R(L1)      -2.00 dB
O11        0.03000000 sec

F2 - Processing Parameters
SI         32768
SF         100.61272290 MHz
MOM        no
SSB        0
LB         0.00 Hz
GB         0
PC         1.00

INSTRUM     10011
PROBID      5 mm Dual J3.
PULPROG     200920
INSTRUM     85535
PROBID      0200
SOLVER      2361
NS          0
DS         20325.203 Hz
SMW        0.310138 Hz
F1DRES     1.6122255 Hz
AD         16384
RG         24.600 uSec
DE         6.00 uSec
TE         360.0 K
O12        0.00002000 sec
P(L1)      21.00 dB
O1         2.00000000 sec
COPROC2    *all:16
PCPROG     105.00 uSec
SFRQ2      400.1316005 MHz
MFC2       1M
R12        -1.00 dB
P(L12)     19.00 dB
P1         9.00 uSec
DE         6.00 uSec
SFRQ1      100.6223079 MHz
MFC1       13C
R(L1)      -2.00 dB
O11        0.03000000 sec

F2 - Processing Parameters
SI         32768
SF         100.61272290 MHz
MOM        no
SSB        0
LB         0.00 Hz
GB         0
PC         1.00

INSTRUM     10011
PROBID      5 mm Dual J3.
PULPROG     200920
INSTRUM     85535
PROBID      0200
SOLVER      2361
NS          0
DS         20325.203 Hz
SMW        0.310138 Hz
F1DRES     1.6122255 Hz
AD         16384
RG         24.600 uSec
DE         6.00 uSec
TE         360.0 K
O12        0.00002000 sec
P(L1)      21.00 dB
O1         2.00000000 sec
COPROC2    *all:16
PCPROG     105.00 uSec
SFRQ2      400.1316005 MHz
MFC2       1M
R12        -1.00 dB
P(L12)     19.00 dB
P1         9.00 uSec
DE         6.00 uSec
SFRQ1      100.6223079 MHz
MFC1       13C
R(L1)      -2.00 dB
O11        0.03000000 sec
    
```

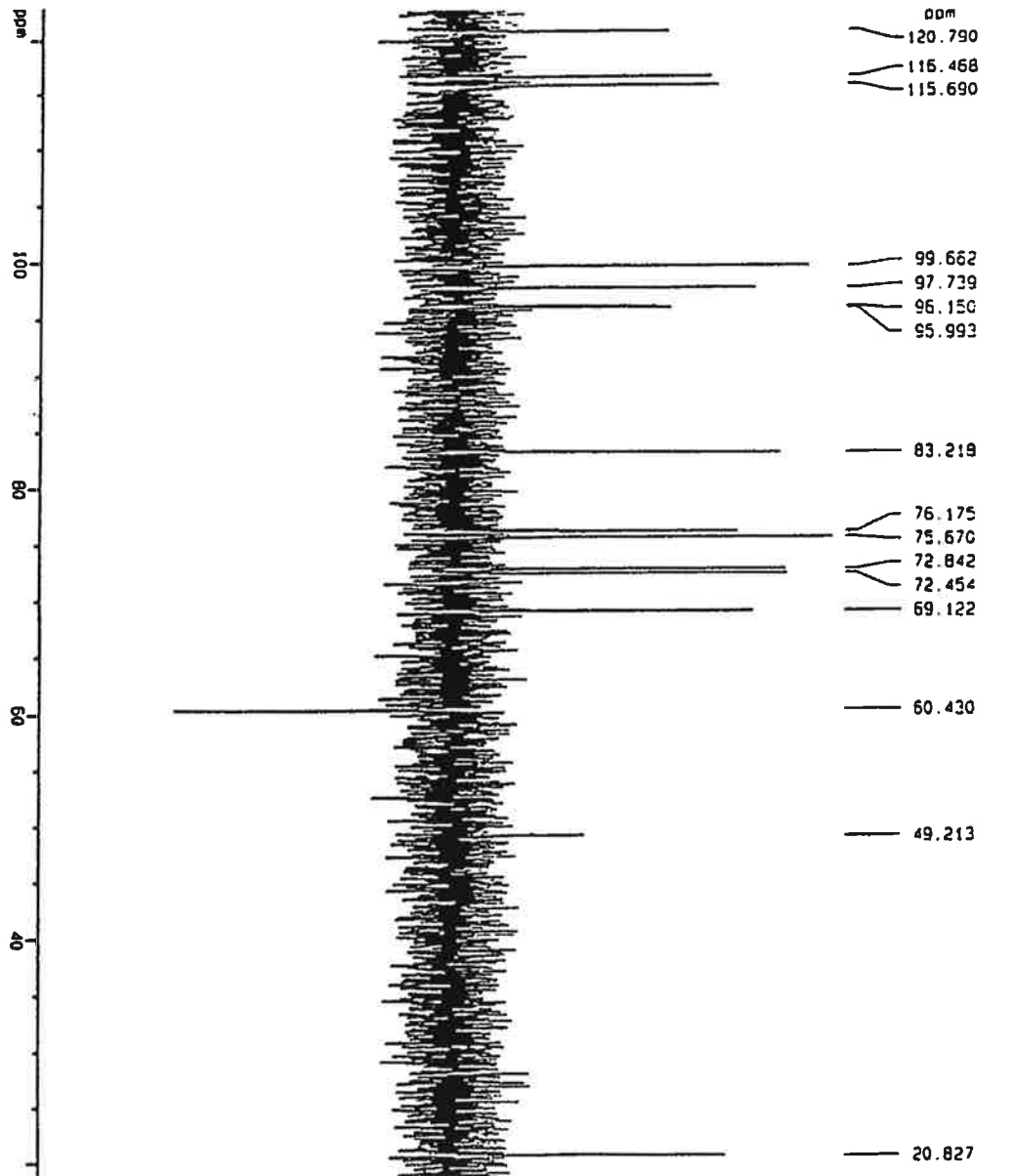



Fig. 5-3

```

Current Data Parameters
NAME          Number
LINE         3
PROB         1

F2 - Acquisition Parameters
Date_        980513
Time_        13 31
INSTNAME     Spect
PROBID       5 see Dual 13
PULPROG      opul135
ID           65536
SOL VEH1     020
MS           2183
DS           4
SM          20325 203 Hz
FIDRES       0 310138 Hz
AQ           1.6123555 sec
RG           15384
OR           24.600 usec
DE           6.00 usec
TE           300.0 K
P1           9.00 usec
DELTA        0.0000125 sec
D1           2.000000000 sec
D12          0.000020000 sec
P12          -1.00 dB
P3           0.00 usec
SWEPT        0.00 usec
Sweep2       0.00 usec
F1           1.00 MHz
F2           1.00 MHz
MFC1         1X
MFC2         -2.00 dB
P2           19.60 usec
P12          19.00 dB
DE           6.00 usec
ORPROG2      volt116
POPR2        105.00 usec

F2 - Processing parameters
SI           32768
SF           100.6127790 MHz
KON          no
SSB          0
LB           0.00 Hz
GB           0
PC           1.40

10 main plot parameters
CX           20.00 cm
F1P         123.047 ppm
F1          12300.05 Hz
F2P         18.833 ppm
F2          1894.83 Hz
MPOWCH      5 21068 dBm/Hz
MPCM        527.26111 Hz/Hz
    
```

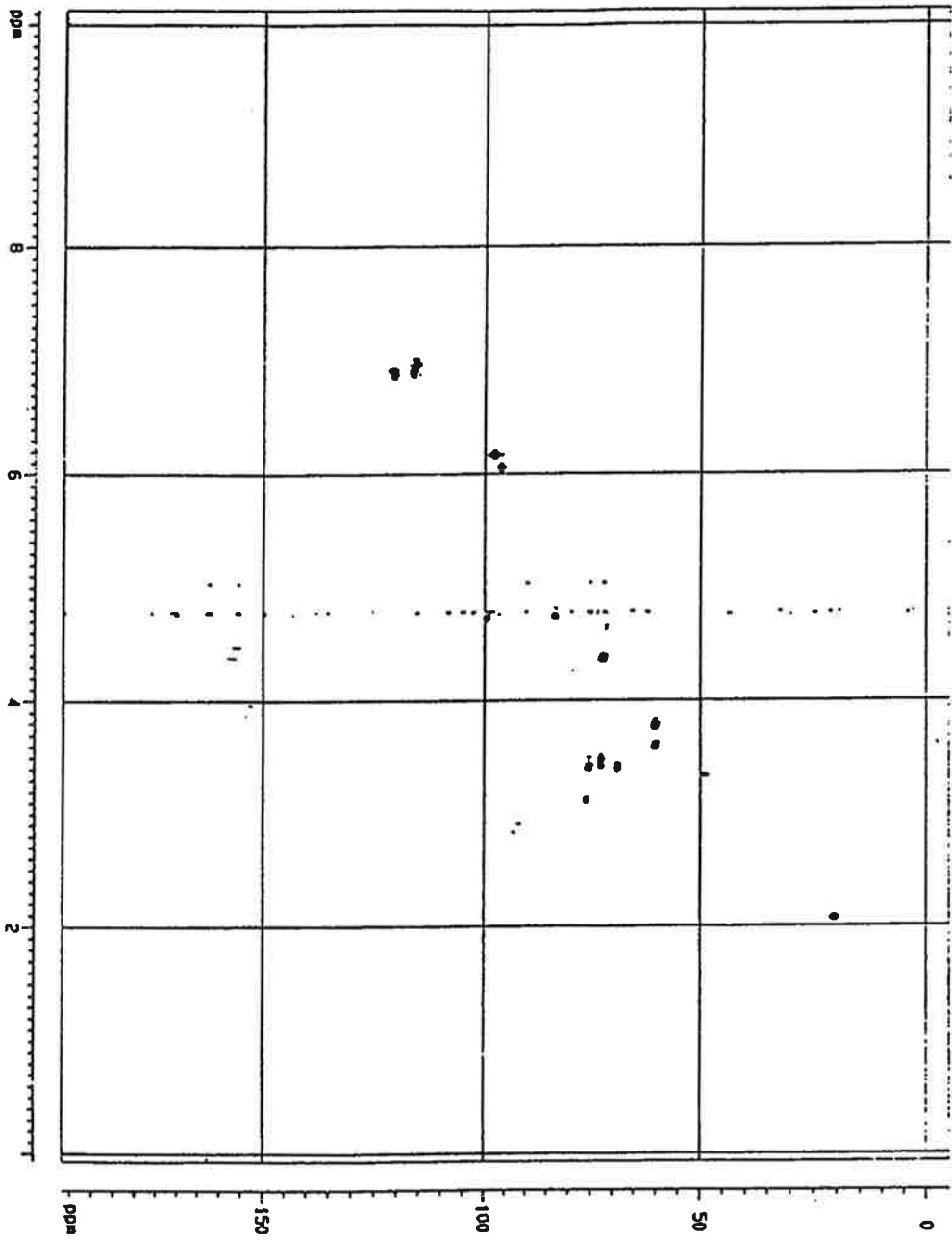



Fig. 5-5

Legend
 1 - 1000000
 2 - 100000
 3 - 10000
 4 - 1000
 5 - 100
 6 - 10
 7 - 1
 8 - 0.1
 9 - 0.01
 10 - 0.001
 11 - 0.0001
 12 - 0.00001
 13 - 0.000001
 14 - 0.0000001
 15 - 0.00000001
 16 - 0.000000001
 17 - 0.0000000001
 18 - 0.00000000001
 19 - 0.000000000001
 20 - 0.0000000000001
 21 - 0.00000000000001
 22 - 0.000000000000001
 23 - 0.0000000000000001
 24 - 0.00000000000000001
 25 - 0.000000000000000001
 26 - 0.0000000000000000001
 27 - 0.00000000000000000001
 28 - 0.000000000000000000001
 29 - 0.0000000000000000000001
 30 - 0.00000000000000000000001
 31 - 0.000000000000000000000001
 32 - 0.0000000000000000000000001
 33 - 0.00000000000000000000000001
 34 - 0.000000000000000000000000001
 35 - 0.0000000000000000000000000001
 36 - 0.00000000000000000000000000001
 37 - 0.000000000000000000000000000001
 38 - 0.0000000000000000000000000000001
 39 - 0.00000000000000000000000000000001
 40 - 0.000000000000000000000000000000001
 41 - 0.0000000000000000000000000000000001
 42 - 0.00000000000000000000000000000000001
 43 - 0.000000000000000000000000000000000001
 44 - 0.0000000000000000000000000000000000001
 45 - 0.00000000000000000000000000000000000001
 46 - 0.000000000000000000000000000000000000001
 47 - 0.0000000000000000000000000000000000000001
 48 - 0.001
 49 - 0.0001
 50 - 0.001
 51 - 0.0001
 52 - 0.001
 53 - 0.0001
 54 - 0.001
 55 - 0.0001
 56 - 0.001
 57 - 0.0001
 58 - 0.001
 59 - 0.0001
 60 - 0.001
 61 - 0.0001
 62 - 0.001
 63 - 0.0001
 64 - 0.001
 65 - 0.0001
 66 - 0.001
 67 - 0.0001
 68 - 0.001
 69 - 0.0001
 70 - 0.001
 71 - 0.0001
 72 - 0.001
 73 - 0.0001
 74 - 0.001
 75 - 0.0001
 76 - 0.001
 77 - 0.0001
 78 - 0.001
 79 - 0.0001
 80 - 0.001
 81 - 0.0001
 82 - 0.001
 83 - 0.0001
 84 - 0.001
 85 - 0.0001
 86 - 0.001
 87 - 0.0001
 88 - 0.001
 89 - 0.0001
 90 - 0.001
 91 - 0.0001
 92 - 0.001
 93 - 0.0001
 94 - 0.001
 95 - 0.0001
 96 - 0.001
 97 - 0.0001
 98 - 0.001
 99 - 0.0001
 100 - 0.001

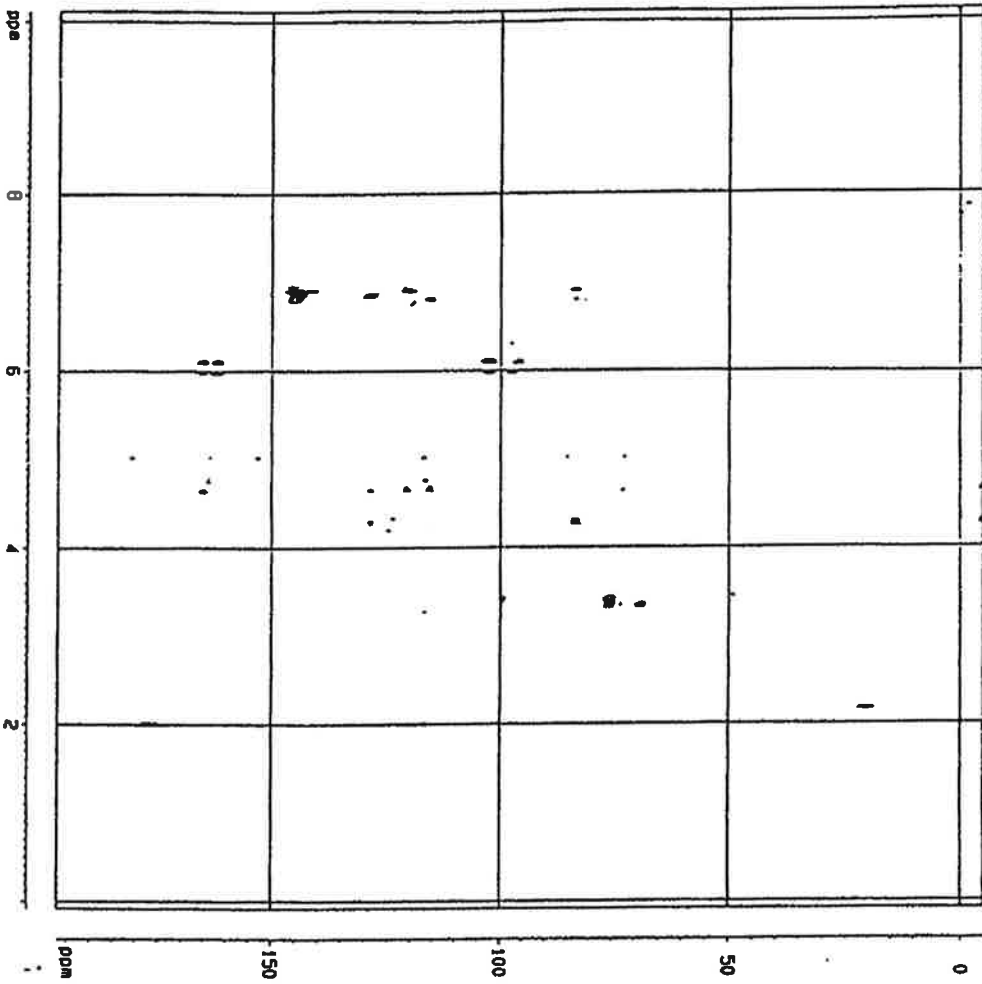


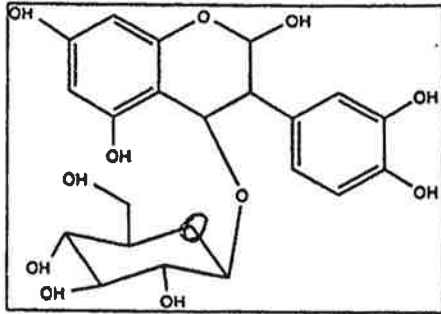
Fig. 5-6

Label	Value	Units
max	4	dBm
(min)	1	dBm
meas	1	dBm
11 - Acquisition Parameters		
File	0	
Line	3 21	
1000	1000	Hz
Format	3 on dual 12	
Alarms		
12 - Display Parameters		
File	0	
Line	3 21	
1000	1000	Hz
Format	3 on dual 12	
Alarms		
13 - Acquisition Parameters		
File	0	
Line	3 21	
1000	1000	Hz
Format	3 on dual 12	
Alarms		

Table 4. Chemical shifts of ^1H -NMR and ^{13}C -NMR and their assignments. (화피1)

no.	δ_c	CH_n DEPT	δ_H of directly attached protons HMQC (J(Hz))	^{13}C assignments
1	20.8	q		acetic acid
2	49.2	d	3.2	C3
3	60.4	t	3.5/3.7	Idose6
4	69.1	d	3.3	Idose5
5	72.4	d	4.3	C4
6	72.8	d	3.3	Idose2
7	75.7	d	3.3	Idose4
8	76.2	d	3.1	Idose3
9	83.2	d	4.5	C2
10	96.1	d	5.9	C8
11	97.7	d	6.1	C6
12	99.7	d	4.6	Idose1
13	102.6	s		C10
14	115.7	d	6.9	C5'
15	116.5	d	6.8	C2'
16	120.8	d	6.8	C6'
17	128.7	s		C1'
18	144.4	s		C4'
19	145.3	s		C3'
20	162.3	s		C9
21	162.7	s		C7
22	165.2	s		C5
23	177.2	s		acetic acid

Fig. 5-7.



화피2는 화피1과 유사한 NMR 실험 결과를 보였는데 $^1\text{H-NMR}$ (Fig. 5-8), ^{13}NMR (Fig. 5-9), DEPT (Fig. 5-10), 2D-COSY (Fig. 5-11), 2D-HMQC (Fig. 5-12), 2D-HMBC (Fig. 5-13) 등의 실험들로부터 Table 5와 같은 결과를 얻었고 또한, 이들 실험들로부터 얻은 부분 구조들을 종합하여 Fig. 5-14과 같은 구조를 얻을 수 있었는데 화피2 역시 β -D-Idose의 pyranose form을 가진 isoflavanal로 판명되었다. 화피2의 IUPAC이름은 3-(3-hydroxyphenyl)-4-([2,3,4-trihydroxy-5-(hydroxymethyl)cyclohexyl]oxy)-2,5,7-chromanetriol이다.

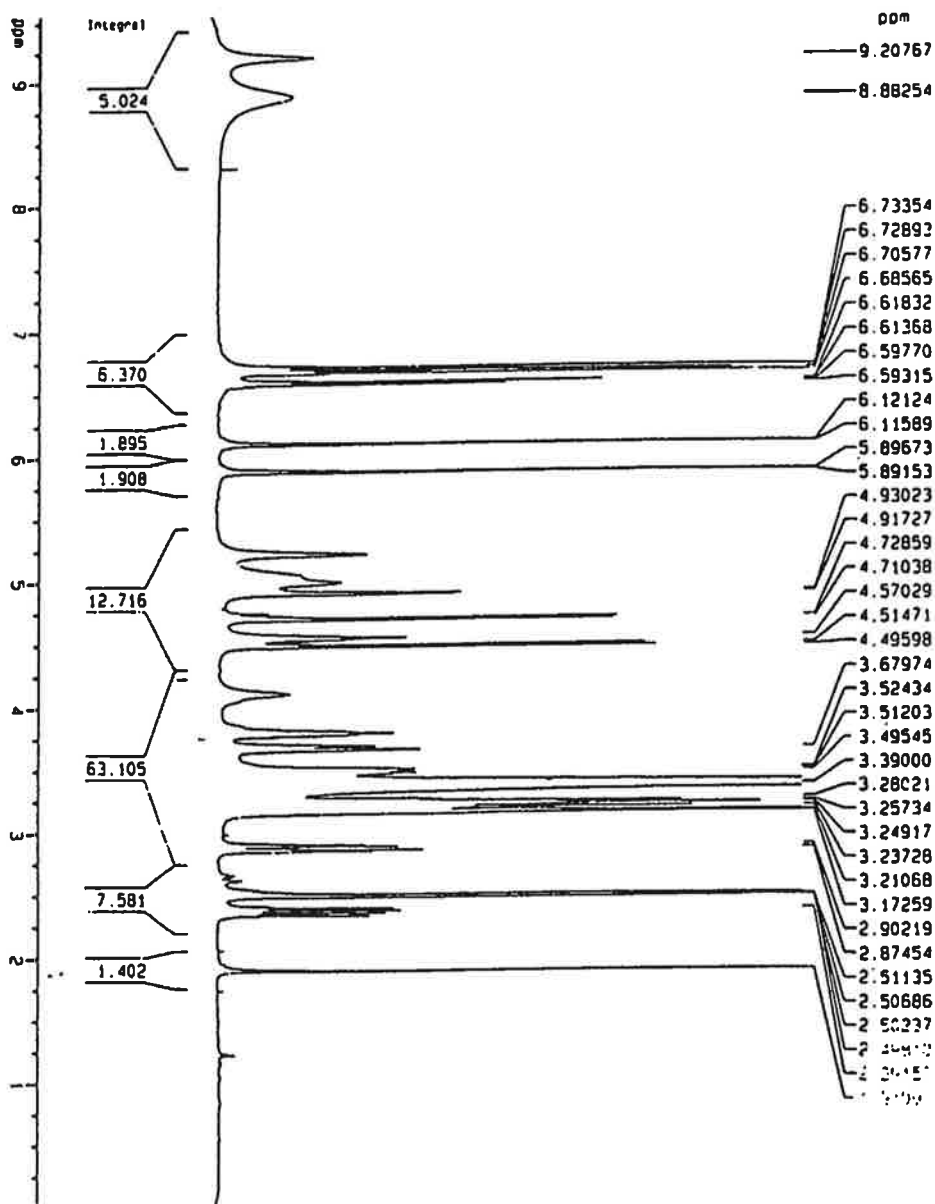


Fig. 5-8

Current Data Parameters
NAME: sunder-2
EXPNO: 1
PROCNO: 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_: 980519
Time: 14.59
INSTRUM: spect
PROBHD: 5 mm QNP 13
PULPROG: zg30
IQ: 32768
SOLVENT: DMSO
NS: 64
DS: 0
SWH: 3910.576 Hz
FIDRES: 0.116302 Hz
AQ: 4.2992115 sec
RG: 456.1
DH: 131.300 usec
DE: 6.00 usec
TE: 300.0 K
O1: 1.00000000 sec
P1: 9.70 usec
DE: 6.00 usec
SF01: 400.1319312 MHz
NUC1: 1H
PC: 0.00 dB

F2 - Processing parameters
SI: 16384
SF: 400.1300000 MHz
WDW: EM
SSB: 0
LB: 0.30 Hz
GB: 0
PC: 1.00

10 best fit parameters
Cx: 20.00 cm
F1p: 9.564 ppm
F1: 3026.68 Hz
F2p: 0.039 ppm
F2: 15.70 Hz
PPMCH: 0.47622 ppm/cm
MTCM: 190.54878 Hz/cm

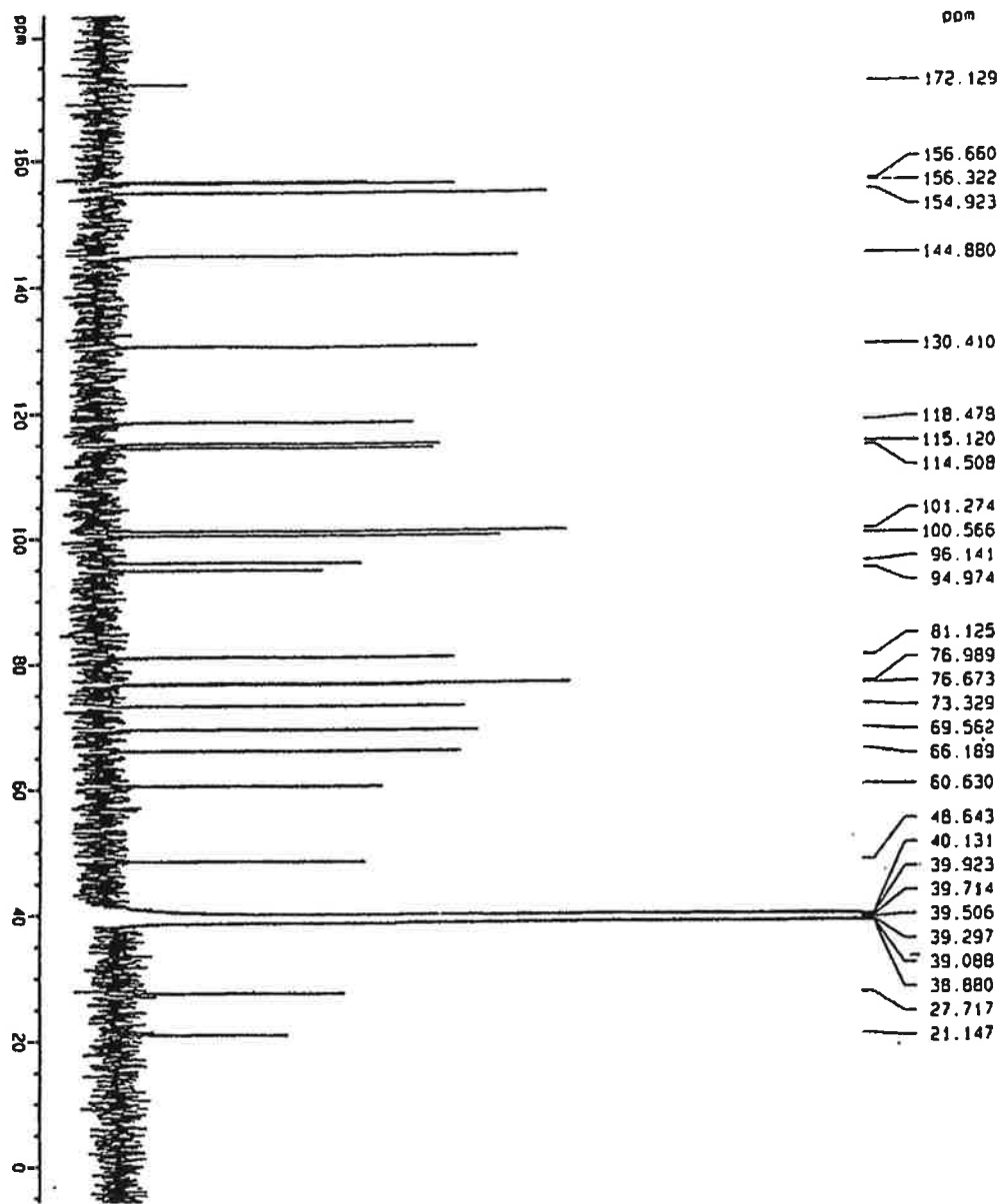


Fig. 5-9

```

Current Data Parameters
NAME          sample-2
EXPNO        2
PROCNO       1

F2 - Acquisition Parameters
Date_         980519
Time         21 44
INSTRUM      spect
PROBHD       5 mm QNP 13
PULPROG      zgpg30
TD           65536
SOLVENT      DMSO
NS           10240
DS           2
SWH          31847.133 MHz
FIDRES      0.485949 Hz
AQ          1.0289652 sec
RG          3548.1
OR          15.700 usec
DE          6.00 usec
TE          300.0 K
D12         0.00000000 sec
D13         21.00 68
D1          2.00000000 sec
CDEPRG2     waltz16
PCPD2       105.00 usec
SP02        400.1316005 MHz
MAG2        1N
FL2         -1.00 68
PL2         19.00 68
PI          9.80 usec
DE          8.00 usec
SF01        100.6254358 MHz
MAG1        1X
PL1         -2.00 68
D11         0.03000000 sec

F2 - Processing parameters
SI          32768
SF          100.6128117 MHz
WDW         EM
SSB         0
LB          1.00 Hz
GB          0
PC          1 68

F2 - Acquisition Parameters
NUC1        13C
P1          12.50 usec
PL1         0.00 68
PL2         19.00 68
PL3         21.00 68
PL4         21.00 68
PL5         21.00 68
PL6         21.00 68
PL7         21.00 68
PL8         21.00 68
PL9         21.00 68
PL10        21.00 68
PL11        21.00 68
PL12        21.00 68
PL13        21.00 68
PL14        21.00 68
PL15        21.00 68
PL16        21.00 68
PL17        21.00 68
PL18        21.00 68
PL19        21.00 68
PL20        21.00 68
PL21        21.00 68
PL22        21.00 68
PL23        21.00 68
PL24        21.00 68
PL25        21.00 68
PL26        21.00 68
PL27        21.00 68
PL28        21.00 68
PL29        21.00 68
PL30        21.00 68
PL31        21.00 68
PL32        21.00 68
PL33        21.00 68
PL34        21.00 68
PL35        21.00 68
PL36        21.00 68
PL37        21.00 68
PL38        21.00 68
PL39        21.00 68
PL40        21.00 68
PL41        21.00 68
PL42        21.00 68
PL43        21.00 68
PL44        21.00 68
PL45        21.00 68
PL46        21.00 68
PL47        21.00 68
PL48        21.00 68
PL49        21.00 68
PL50        21.00 68
PL51        21.00 68
PL52        21.00 68
PL53        21.00 68
PL54        21.00 68
PL55        21.00 68
PL56        21.00 68
PL57        21.00 68
PL58        21.00 68
PL59        21.00 68
PL60        21.00 68
PL61        21.00 68
PL62        21.00 68
PL63        21.00 68
PL64        21.00 68
PL65        21.00 68
PL66        21.00 68
PL67        21.00 68
PL68        21.00 68
PL69        21.00 68
PL70        21.00 68
PL71        21.00 68
PL72        21.00 68
PL73        21.00 68
PL74        21.00 68
PL75        21.00 68
PL76        21.00 68
PL77        21.00 68
PL78        21.00 68
PL79        21.00 68
PL80        21.00 68
PL81        21.00 68
PL82        21.00 68
PL83        21.00 68
PL84        21.00 68
PL85        21.00 68
PL86        21.00 68
PL87        21.00 68
PL88        21.00 68
PL89        21.00 68
PL90        21.00 68
PL91        21.00 68
PL92        21.00 68
PL93        21.00 68
PL94        21.00 68
PL95        21.00 68
PL96        21.00 68
PL97        21.00 68
PL98        21.00 68
PL99        21.00 68
PL100       21.00 68
    
```

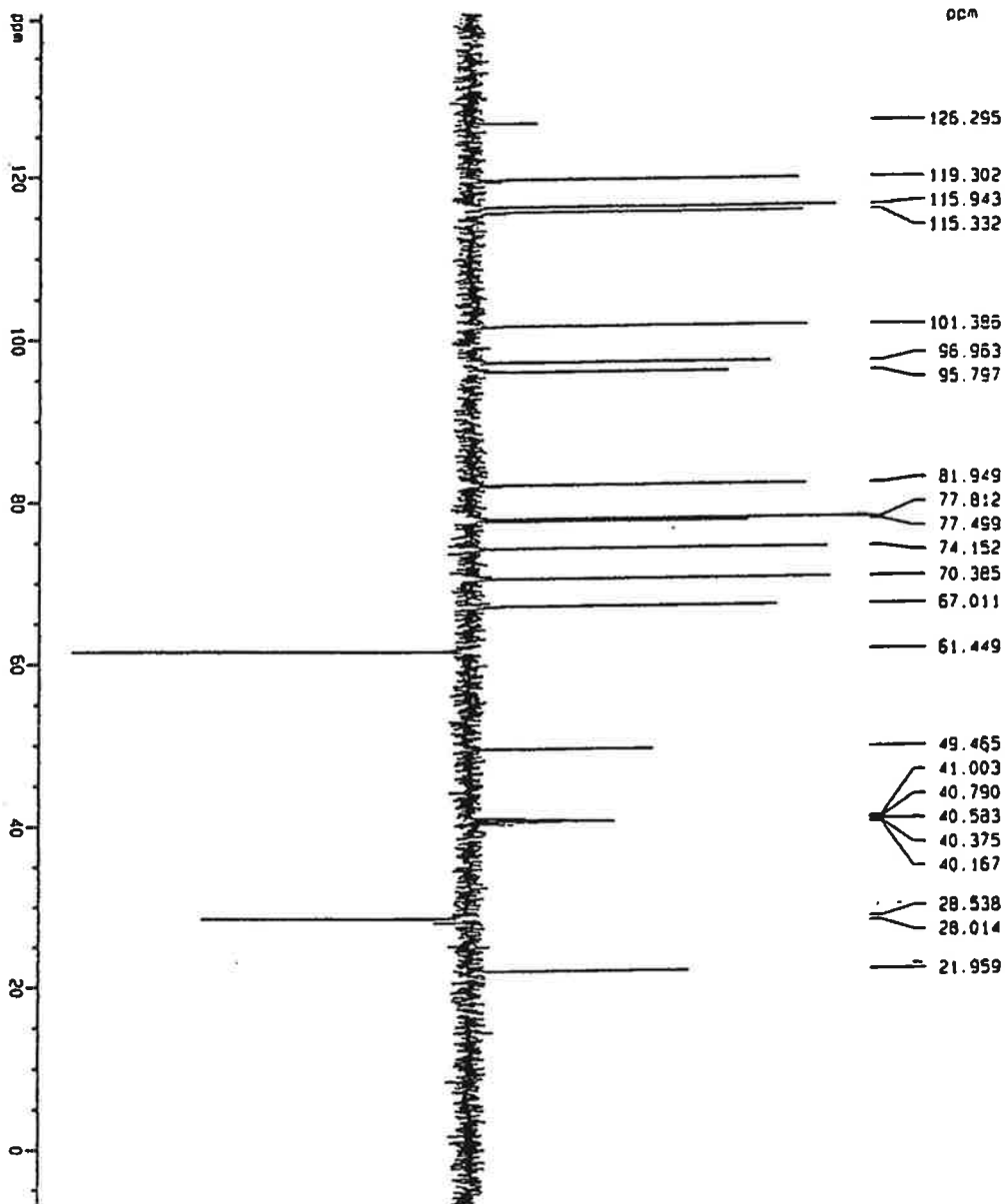


Fig. 5-10

```

Current Date Parameters
Unit Link# Number 2
PROCCMD 1 1

F2 - Acquisition Parameters
Date- 980530
Time 13.13
INSTRUM intel
PROBID 5 mm Dual 33
PULPROG depl135
10 SCSJMS 65536
SCLVEHT DM50
NS 5155
DS 4
SMH 31847.133 Hz
FIDRES 0.485948 Hz
10 1.028852 sec
MC 16384
DM 15.700 usec
DE 6.00 usec
FE 300 0 K
P1 9.00 usec
BELTA 0.000125 sec
D1 2.0000000 sec
D12 0.0000200 sec
P2 -1.00 dB
P3 10 80 usec
SFO2 409.1316095 MHz
WRT? 11
UP 0.0017143 sec
Pd 21.60 usec:
SFO1 100.6294358 MHz
NACT1 1K
PL1 -2.00 dB
P2 19 60 usec
PL12 19.00 dB
OE 6.00 usec
CROSSC2 wait116
PCPQ2 105.00 usec

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 100.6121250 MHz
ADM CW
SSM 0
LQ 1.00 Hz
CA 0
PC 1.40

10 real data parameters
CA 20.00 ca
FIP 146.903 dBm
F1 14176.64 Hz
F2P -6.710 dBm
F2 -875.15 Hz
PROCM 7 380651 dBm/Hz
MCD 742 58948 Hz/Hz
    
```

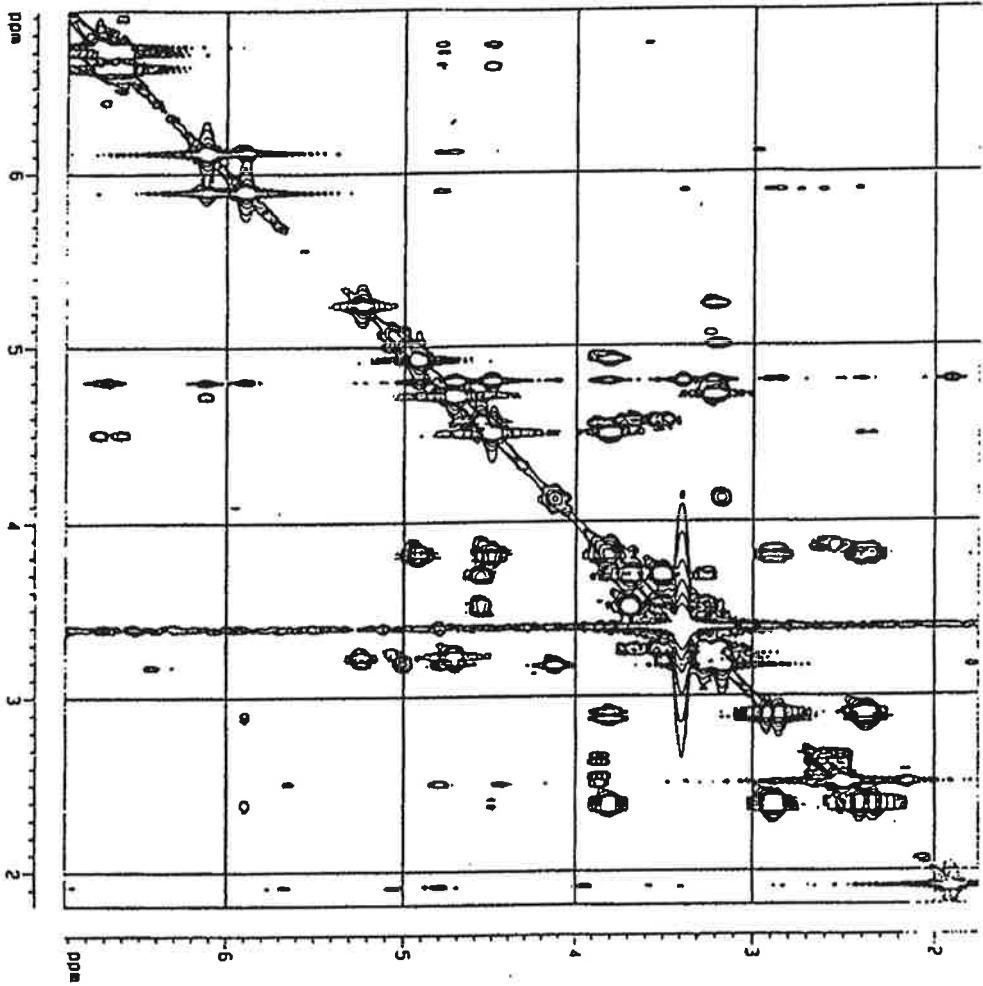


Fig. 5-11

```

Current Data Parameters
=====
LINEID      1
PROJID      1
PROJCD      1

1 - Acquisition Parameters
=====
DATE        13 22
LINE        13 22
INSTID     3001
PROJID     300 Datal 13
ALYID     01190
NO        2000
SEA Wtd    0.050
OS        32
SPR        2000.000 Hz
FREQS      2
PROJID     0.000000 Hz
NO        10
AC        131.200 MHz
PR        5.00 MHz
TE        300.0 Hz
F1        2.000000 MHz
F2        5.70 MHz
DR        0.0000000 Hz
DE        0.00 MHz
SFO1      400.131870 MHz
SFO2      800.263740 MHz
SFO3      0.0000000 Hz
SFO4      0.0000000 Hz

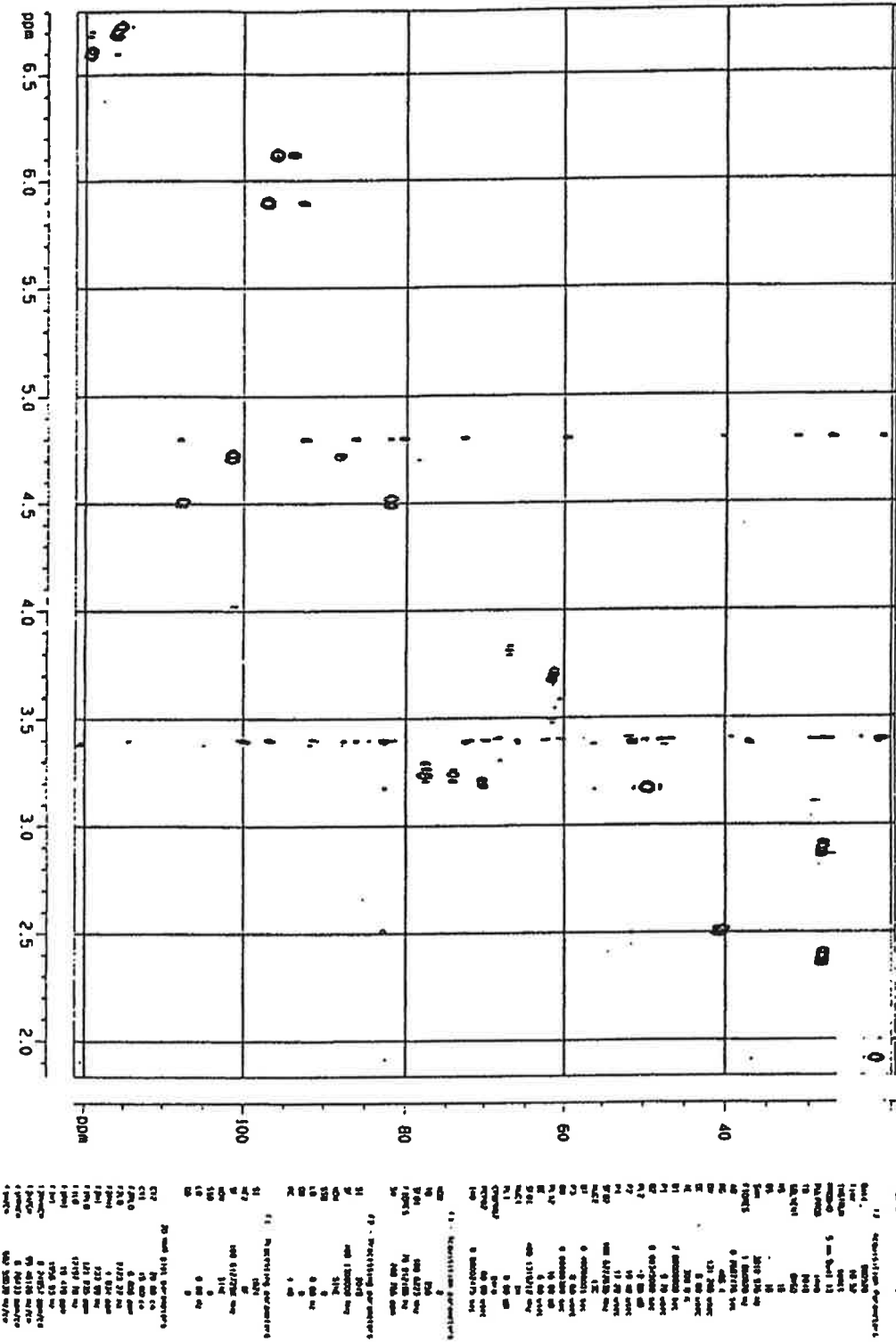
2 - Processing Parameters
=====
WDW        1
HP        0
SFO1      400.131870 MHz
SFO2      800.263740 MHz
FREQS     13.264 MHz
SN        0

3 - Acquisition Parameters
=====
SI        400.132000 MHz
SR        1600
WDR        514C
WDR        0
SSR        0.00 Hz
CA        0
CA        0
PC        1.00

7 - Processing Parameters
=====
SI        1600
WDR        514C
WDR        0
SSR        0
SSR        0.00 Hz
TR        0
CA        0

20 user data parameters
=====
CZ2      15.00 cm
CA1      15.00 cm
FPA0     0.531 GHz
FPA1     2770.00 MHz
FPA2     12.000 MHz
FPA3     0.832 MHz
FPA4     2700.00 MHz
FPA5     1.100 GHz
FPA6     0.000000 MHz
FPA7     0.000000 MHz
FPA8     0.000000 MHz
FPA9     0.000000 MHz
FPA10    137.000000 MHz
    
```

Fig. 5-12



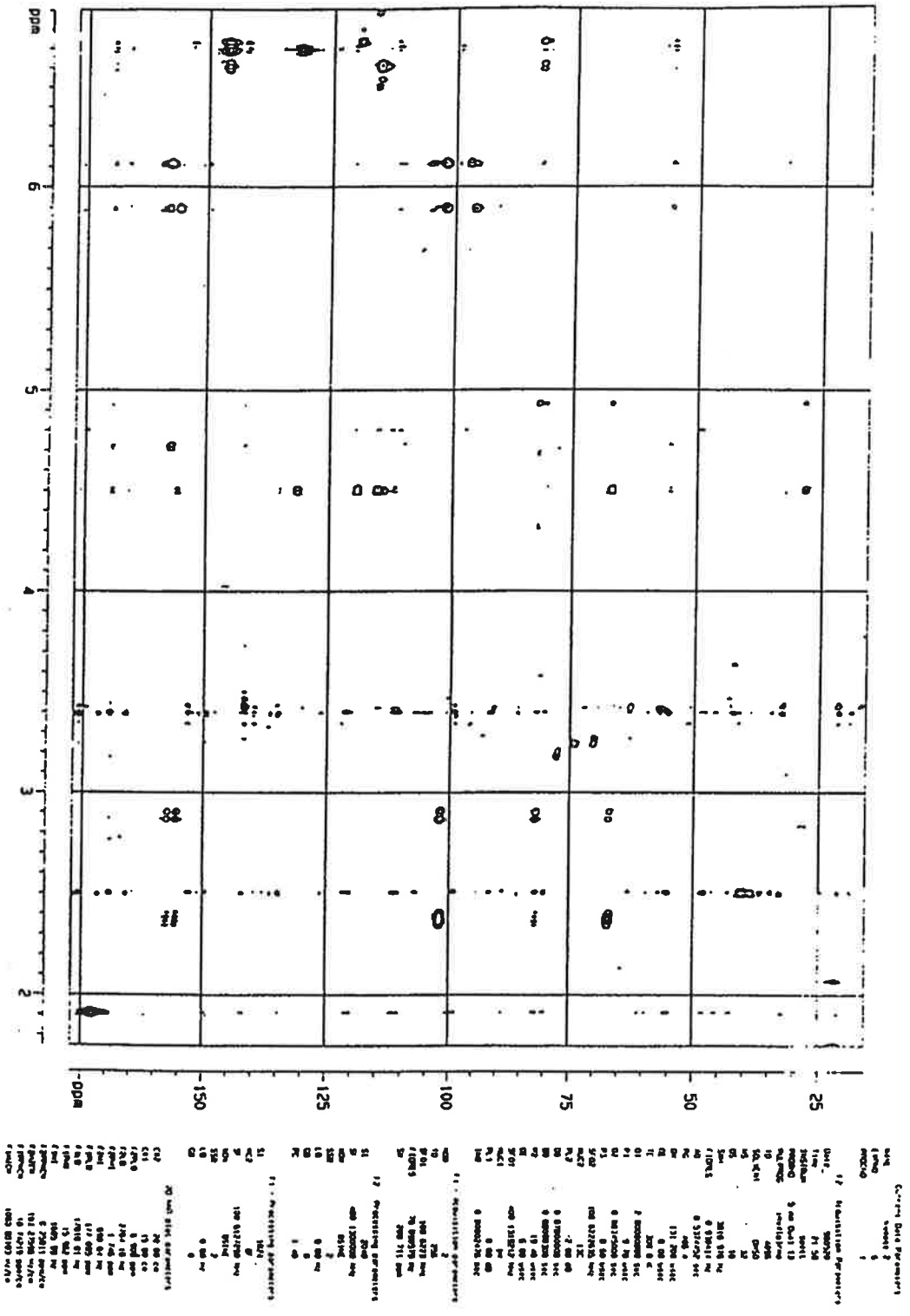
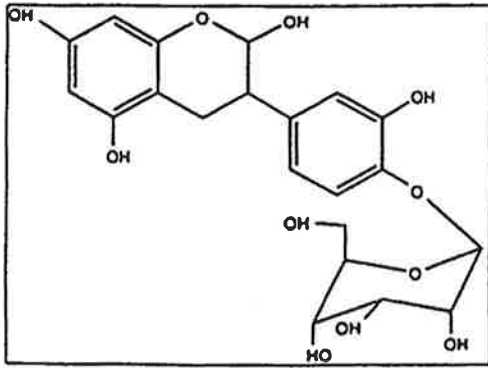


Fig. 5-13

Table 5. Chemical shifts of ^1H -NMR and ^{13}C -NMR and their assignments. (화피2)

no.	δ_c	CH_n DEPT	δ_H of directly attached protons HMQC (J(Hz))	^{13}C assignments
1	21.1	q		acetic acid
2	27.7	t	2.4/2.9	C4
3	48.6	d	3.2	C3
4	60.6	t	3.7	Idose6
5	69.6	d	3.2	Idose5
6	73.3	d	3.25	Idose2
7	76.7	d	3.3	Idose4
8	77.0	d		Idose3
9	81.1	d	4.5	C2
10	95.0	d	6.1	C8
11	96.1	d	5.9	C6
12	100.6	d	4.7	Idose1
13	101.3	s		C10
14	114.5	d	6.8	C5'
15	115.1	d	6.7	C2'
16	118.5	d	6.6	C6'
17	130.4	s		C1'
18	144.9	s		C4'
19	144.9	s		C3'
20	154.9	s		C9
21	156.3	s		C7
22	156.7	s		C5
23	172.1	s		acetic acid

Fig. 5-14



제 6 절. 노관초로부터 노관초 1과 노관초2의 분리

노관초로부터 분리, 정제한 물질들 중 약효를 보이는 두가지 물질의 구조를 결정하였는데 각각을 노관초1과 노관초2로 명명하였다.

노관초1의 $^{13}\text{C-NMR}$ (Fig. 6-1)은 모든 peak가 100ppm보다 downfield에 위치하고 있어서 gallic acid의 유도체임을 알 수 있었고, $^1\text{H-NMR}$ (Fig. 6-2), DEPT (Fig. 6-3), 2D-HMQC (Fig. 6-4)등의 실험들로부터 Table 6과 같은 결과를 얻었다. 또한, 이들 실험들로부터 얻은 부분 구조들을 종합하여 Fig. 6-5와 같은 구조를 얻을 수 있었는데 노관초의 1의 IUPAC이름은 Phenyl 3,5-dihydroxybenzoate이다.

Table. 6. Chemical shifts of $^1\text{H-NMR}$ and $^{13}\text{C-NMR}$ and their assignments (노관초1)

No	δ_c	CHnDEPT
1	102.1	d
2	105.1	d
3	115.9	d
4	126.3	d
5	128.2	d
6	128.5	d
7	129.4	s
8	140.4	s
9	157.6	s
10	159.0	s

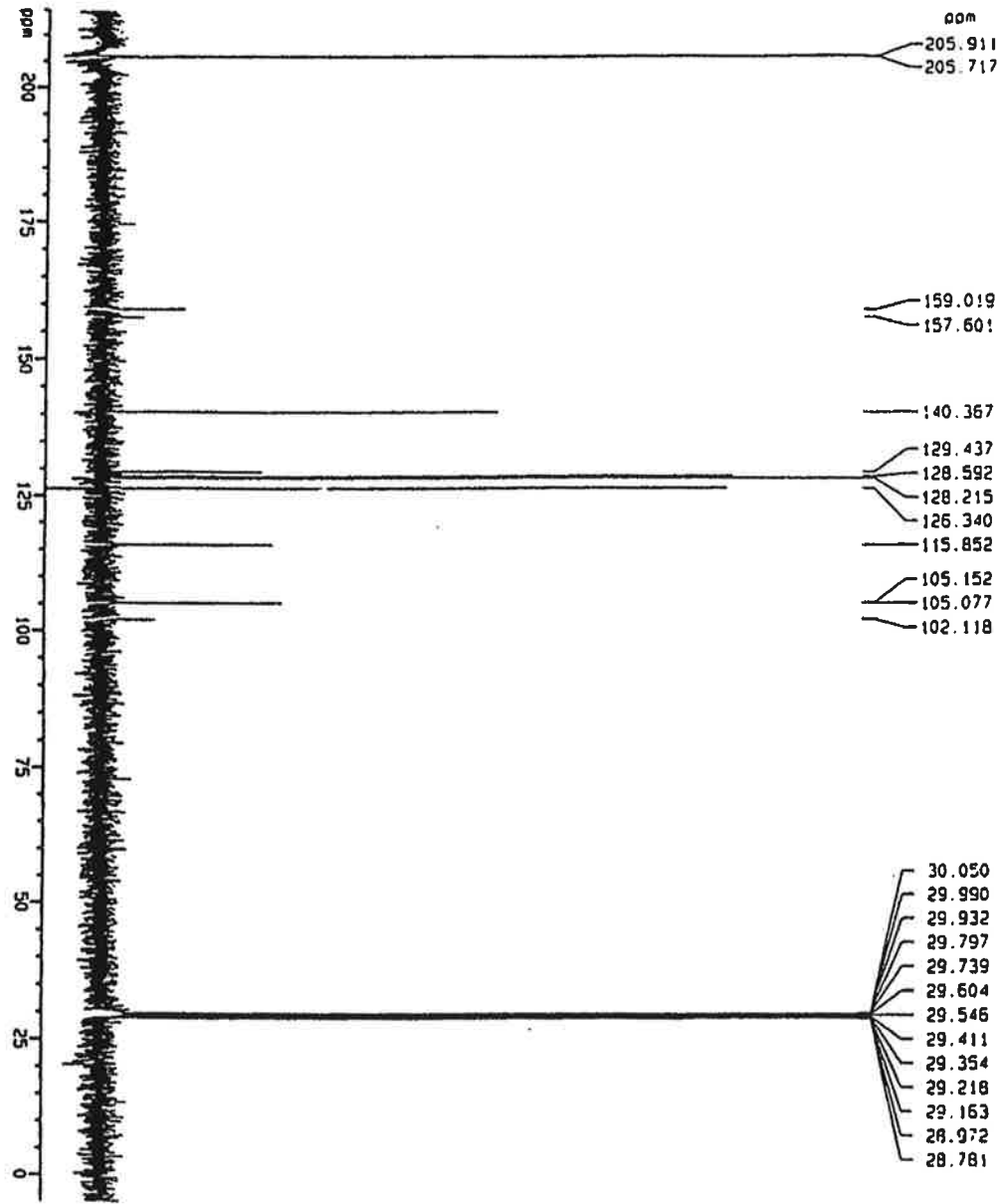


Fig. 6-1

```

Current Data Parameters
NAME      100mgK11
EXTND      122
PRCNO      1
)
F2 - Acquisition Parameters
Date      961229
Time      11.59
INSTNAM   Spect
PROB#     5 mm QM JJC-
PILPROG   700430
TD        65536
SOLVENT   Aceton
NS        1357
DS        2
SMA       30303.031 Hz
FILTERS   0.462398 Hz
AQ        1.0813549 sec
RG        2048
DM        16.500 usec
DE        6.00 usec
TE        300.0 K
D12       0.00025000 sec
R1,13     21.00 dB
O1        2.000000000 sec
CPROPRG2  va111115
PCNO2     105.00 usec
SF02      400.1316005 MHz
MFC2      IN
R1,2      -1.00 dB
R1,12     19.00 dB
P1        9.80 usec
DE        6.00 usec
SF01      100.6254358 MHz
MFC1      1XC
R1,1      -2.00 dB
O11       0.030000000 sec

F2 - Processing Parameters
SI        32768
SF        100.6127290 MHz
MGM       no
SSB       0
LB        0.00 MHz
GB        0
PC        1.40

H1 Mem Gain Parameters
LT        2.1 dB
F1P       2.5 dB
F1        21631.74 Hz
F2P       -5.000 dB
F2        -501.06 Hz
PRCNO     11.00000 dB/CM
MFCM     1106.73999 Hz/CM
  
```

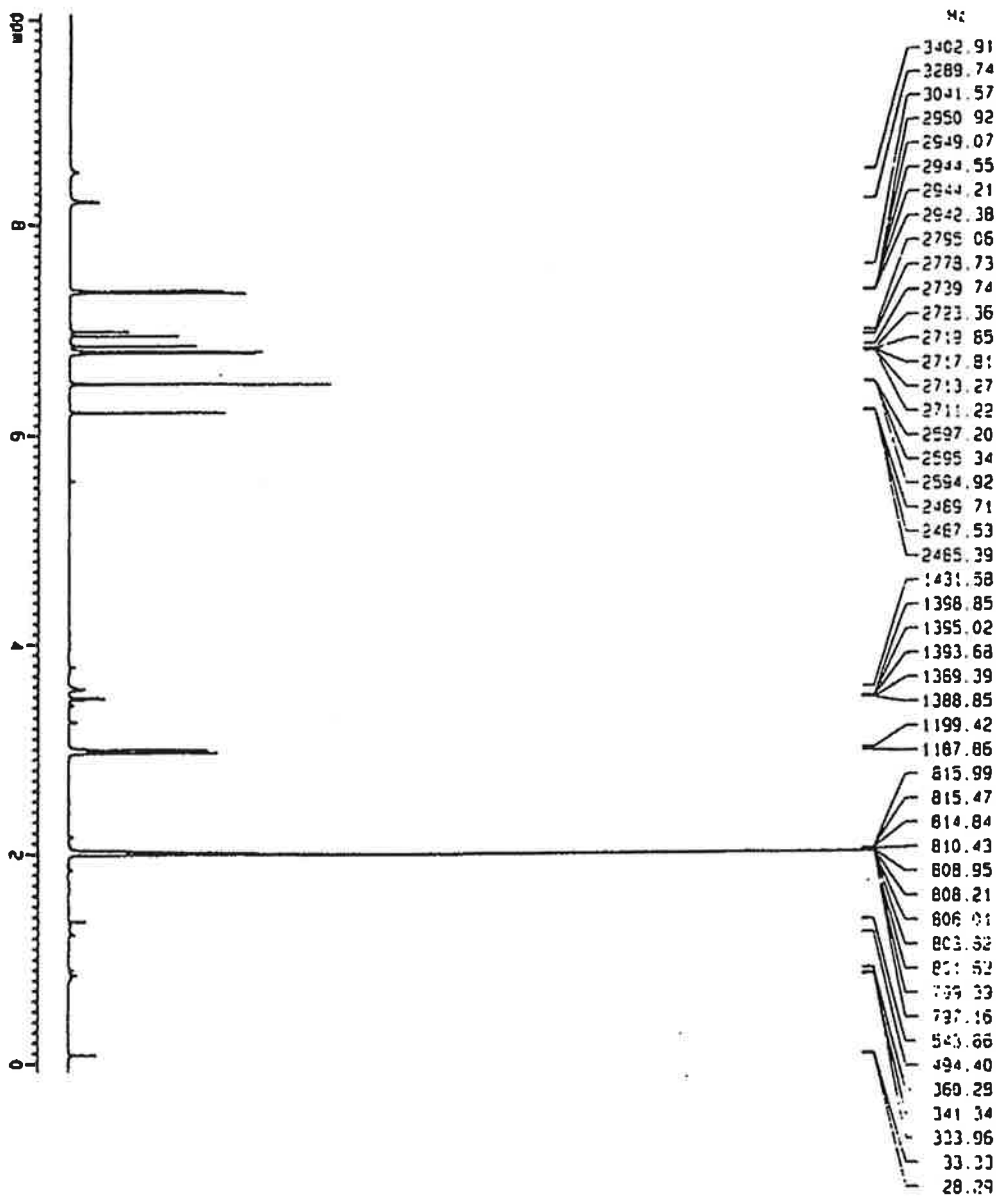


Fig. 6-2

```

Current Data Parameters
NAME      ionoph-1
EXPNO    121
PROCNO    1

F2 - Acquisition Parameters
Date_     961229
Time      11.34
INSTRUM   spect
PROBHD    5 mm QNP 13C-
PULPROG   zg30
ID        32768
SOLVENT   Aceton
NS        128
DS        2
SWH        4629.649 Hz
FIDRES    0.141285 Hz
AQ        3.5389941 sec
RG        236
DE        109.000 usec
TE        300.8 K
PI        1.00000000 sec
P1        9.70 usec
DE        6.00 usec
SF:01    400.1323664 MHz
NAC1      1W
PL1       0.00 dB

F2 - Processing parameters
SI        16384
SF        400.1300252 MHz
WDW       no
SSB       0
LB        0.00 Hz
GB        0
PC        1.00

10 most pilot parameters
CA        20.00 cm
F1P       10.067 ppm
F1        4028.15 Hz
F2P       -537.44 Hz
PPMCH    0.31426 ppm/cm
HZCM     229.71942 Hz/cm
    
```

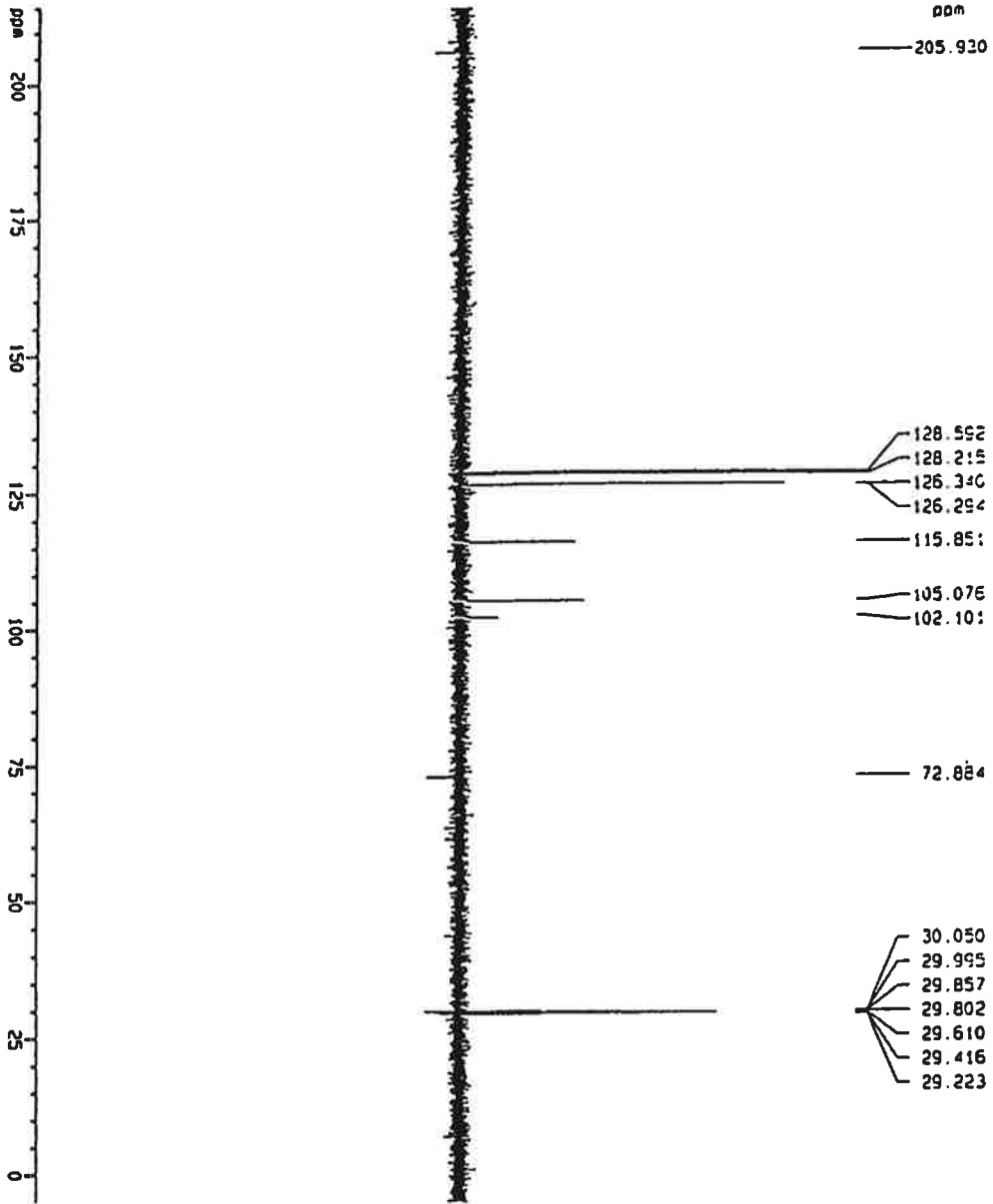


Fig. 6-3

```

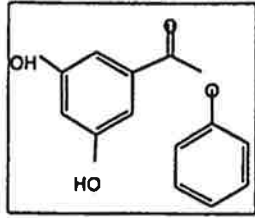
Current Data Parameters
NAME          jiangli
LUNO         123
PROGNO      1

F2 - Acquisition Parameters
Date_        97102
Time         9.40
INSTRUM     spect
PROBHD      5 mm DA, 13C-
PLFPROG     dea1135
I0          65536
SOLVENT     Action
MS          2048
US          0
SWH         20500.031 Hz
FIDRES      0.462368 Hz
AQ          1.0813940 sec
RG          2048
DM          16.500 usec
DE          5.00 usec
TE          300.0 K
P1          3.80 usec
P2          0.0000125 sec
DELTA       2.00000000 sec
D12         0.00002000 sec
RL2         -1.00 dB
P3          10.00 usec
SFO2        400.132063 MHz
MFC2        Hi
PC          F (MHz) x 10^4
SFO1        21.60 usec
PC2         100.6254350 MHz
MFC1        13C
RL1         -2.00 dB
P2         19.60 usec
RL2         19.00 dB
DE         5.00 usec
CDDPROG2   wa11716
PCDOR2      105.00 usec

F2 - Processing Parameters
S1          32768
SF          100.6127290 MHz
AQR         No
SSB         0
UB          0.00 Hz
GB          0
PC          1.40

10 mm 9131 parameters
CX          20.00 cm
FIP         215.0000 ppm
F1         21631.74 Hz
F2P        -503.06 Hz
F2         11.00000 ppm/Hz
MTCM       1100.73959 Hz/Hz
    
```


Fig. 6-5



노관초2의 $^1\text{H-NMR}$ (Fig. 6-6)은 당을 포함한 gallic acid의 유도체의 일종이라는 정보를 알려주었고 $^{13}\text{C-NMR}$ (Fig. 6-7)에서는 모두 25개의 peaks가 관찰되었다. 노관초2의 COSY, HETCOR로부터 Table 7과 같은 결과를 얻었고, 또한 이들 실험으로부터 얻은 부분 구조들을 종합하여 Fig. 6-8과 같은 구조를 얻을 수 있었는데 노관초2의 IUPAC 이름은 1-O-galloyl-3,6-(R)-hexahydroxydiphenyl- β -D-glucopyranose이다.

Table 7. Chemical shifts of $^1\text{H-NMR}$ and $^{13}\text{C-NMR}$ and their assignments. (노관초 2)

no.	δ_c	δ_H of directly attached protons HMQC (J(Hz))
1	63.3	4.4
2	65.8	4.9
3	70.2	4.0
4	72.4	4.3
5	77.0	4.5
6	95.9	6.3
7	109.2	6.6
8	111.2	6.7
9	111.9	7.1
10	117.5	
11	118.1	
12	121.5	
13	126.3	
14	126.4	
15	138.6	
16	139.1	
17	141.4	
18	146.1	
19	146.3	
20	146.6	
21	147.0	
22	147.3	
23	167.8	
24	169.6	
25	171.1	

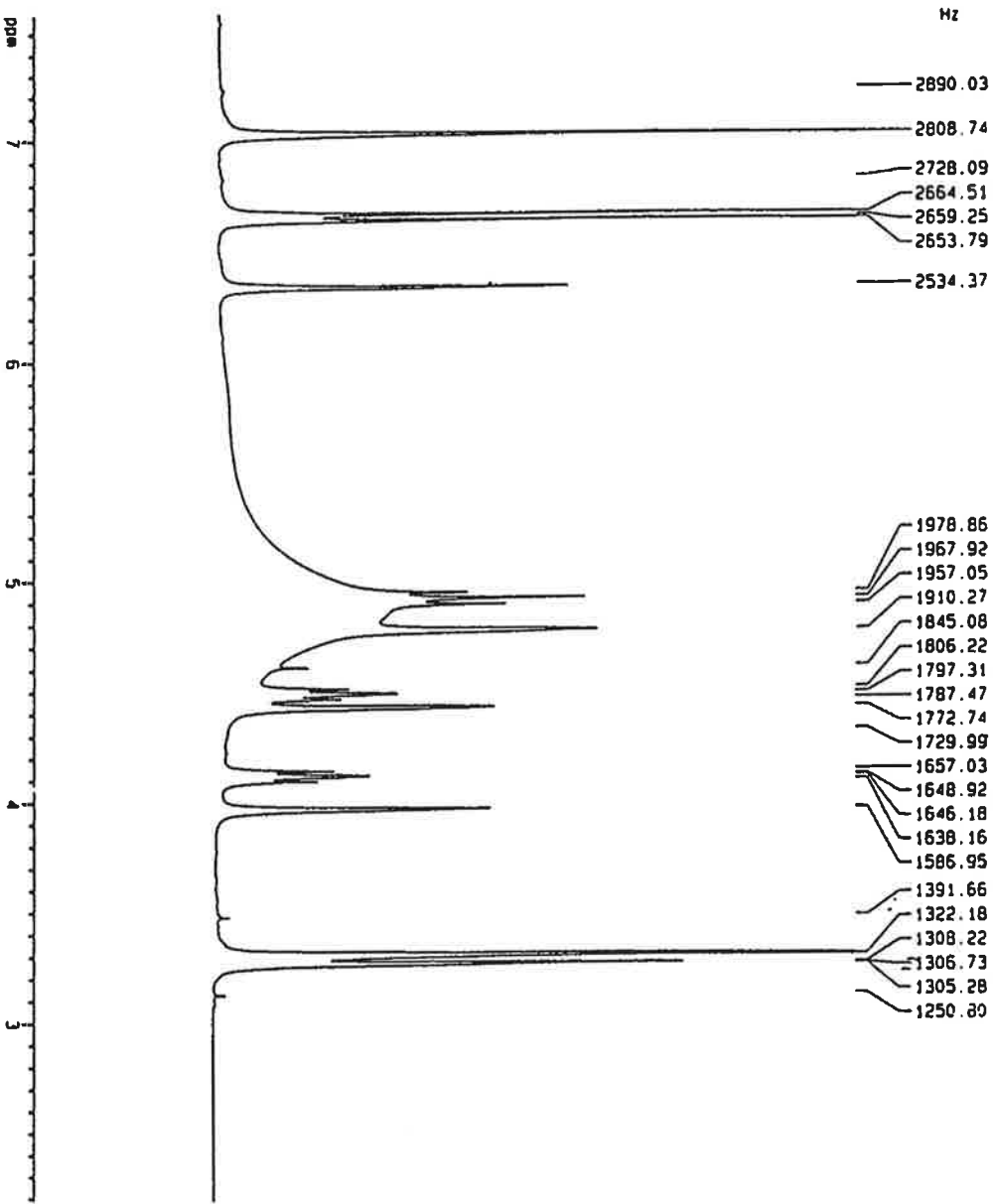


Fig. 6-6

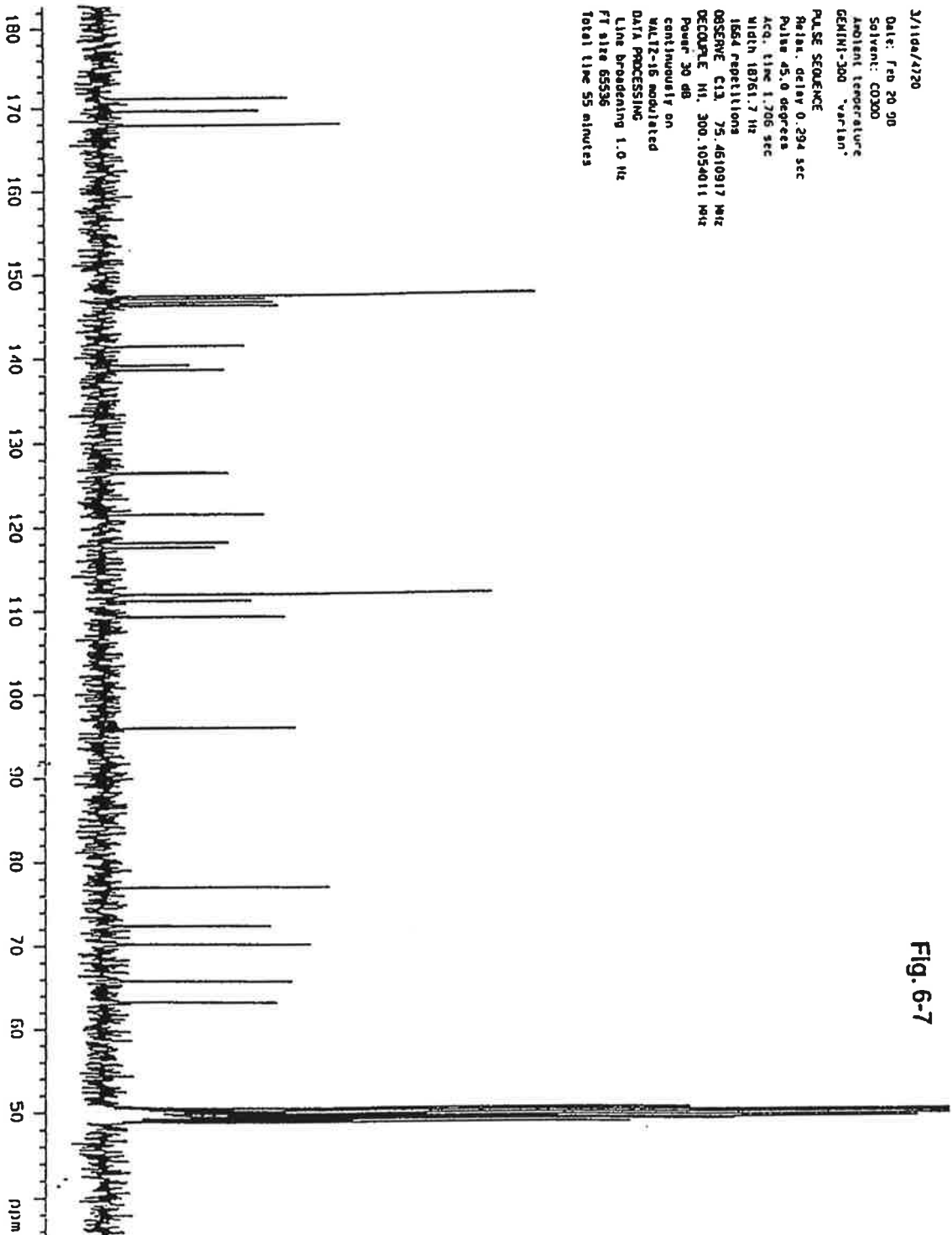
```

Current Data Parameters
NAME      100mg-e11
EXPNO    13
PROCNO   1

F2 - Acquisition Parameters
Date_    900429
Time     11 02
INSTRUM  spect
PROBHD   5 mm Ddal 13
PULPROG  zg30
TD       32768
SOLVENT  MECl
NS       16
DS       0
SWH      4401.409 Hz
FIDRES   0.134320 Hz
AQ       3.7724948 sec
RG       90.5
DM       113.600 usec
DE       6.00 usec
TE       300.0 K
D1       1.00000000 sec
P1       9.70 usec
DE       6.00 usec
SF01     400.1317555 MHz
NUC1     1H
RG1      0.00 dB

F2 - Processing parameters
SI       16384
SF       400.130252 MHz
WDW      no
SSB      0
LB       0.00 Hz
GB       0
PC       1.00

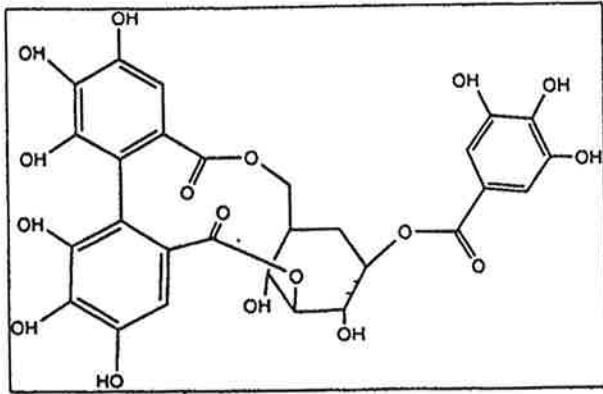
ID parameters
CX       20.00 cm
FLP      7.580 ppm
F1P      3037.02 Hz
F2P      2.187 ppm
F2       875.00 Hz
PPMACH   0.27016 ppm/cm
MZCH     100.1010 Hz/cm
    
```



3/18a/4720
Date: Feb 20 90
Solvent: CDCl3
Ambient temperature
GEMINI-300 Varian
PULSE SEQUENCE
Relax. delay 0.294 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.706 sec
Width 18761.7 Hz
1664 repetitions
OBSERVE C13 75.4610917 MHz
DECUPLE H1 300.1054011 MHz
Power 30 dB
continuously on
WALTZ-16 modulated
DATA PROCESSING
Line broadening 1.0 Hz
FT size 65536
Total time 55 minutes

Fig. 6-7

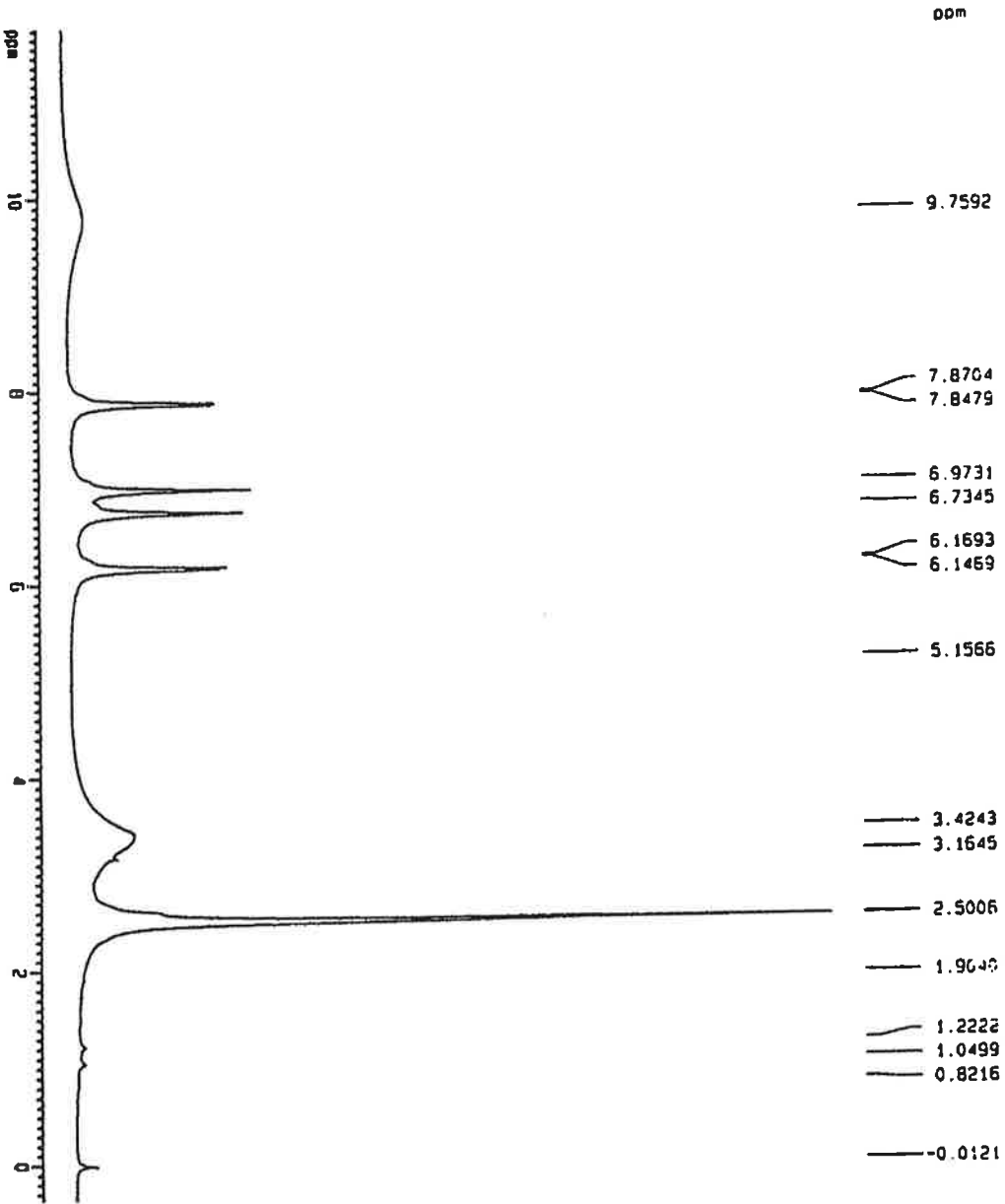
Fig. 6-8



제 7 절. 정공등으로부터 항산화 물질 정공등1의 분리

정공등으로부터 분리 정제한 물질들 중 항산화력이 뛰어난 물질의 구조를 결정하였는데 정공등1로 명명하였다.

정공등의 $^{13}\text{C-NMR}$ (Fig. 7-1)는 모든 peaks가 100ppm보다 downfield에 위치하고 있어서 gallic acid의 유도체임을 알 수 있었고, $^1\text{H-NMR}$ (Fig. 7-2)과 질량분석 (Fig. 7-3)실험들로부터 Fig. 7-4과 같은 구조를 얻을 수 있었는데 정공등1의 IUPAC 이름은 2,6-dihydroxy-4-[(4-hydroxyphenyl)peroxy]benzoic acid이다.



gallic type

Fig. 7-1

Current Data Parameters
NAME gal-1
EXPNO 1
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 9/6/74
Time 9.30
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm QNP 1H
PULPROG zg30
TD 32768
SOLVENT DMSO
NS 64
DS 2
SWH 5995.204 Hz
FIDRES 0.182959 Hz
AQ 2.7329011 sec
RG 512
OR 81.400 usec
DE 6.00 usec
TE 300.0 K
O1 1.00000000 sec
P1 9.70 usec
DE 6.00 usec
SFO1 400.1320645 MHz
NUC1 1H
PL1 0.00 dB

F2 - Processing parameters
SI 16384
SF 400.1300000 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00

30 NMR plot parameters
CX 20.00 cm
FIP 11.820 gpa
F1 4732.70 Hz
F2 -0.375 gpa
F2 -149.93 Hz
PPHCH 0.61013 gpa/cm
WCH 244.13162 Hz/cm

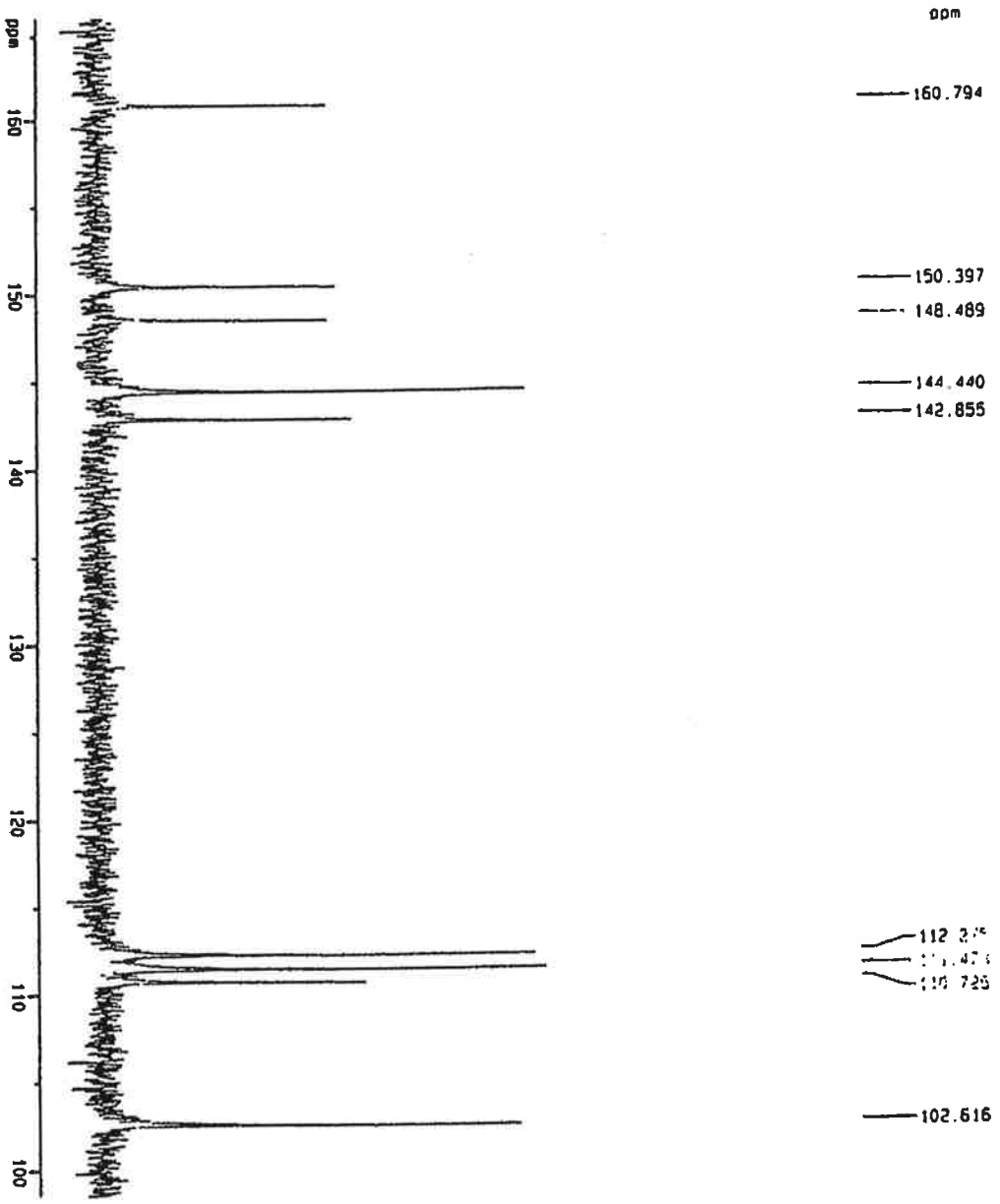


Fig. 7-2

Current Data Parameters
NAME: dck1
EXPNO: 2
PROCNO: 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_: 990724
Time: 8.20
INSTRUM: spect
PROBHD: 5 mm BBO 13
PULPROG: zgpg30
TD: 65536
SOLVENT: DMSO
NS: 10240
DS: 0
SWH: 20449.698 Hz
FIDRES: 0.312041 Hz
AQ: 1.6024052 sec
RG: 32768
OR: 24.450 usec
DE: 6.00 usec
TE: 300.0 K
D12: 0.00002000 sec
PL13: 21.00 dB
D1: 2.00000000 sec
CPOPRG2: waltz16
PCPD2: 105.00 usec
SF02: 400.1316095 MHz
NUC2: 1H
PC2: -1.00 dB
PL12: 19.00 dB
PI: 9.00 usec
DE: 6.00 usec
SF01: 100.6224735 MHz
NUC1: 13C
PL1: -2.00 dB
D11: 0.03000000 sec

F2 - Processing Parameters
SI: 32768
SF: 100.6178153 MHz
WDW: EM
SSB: 0
LB: 1.00 Hz
GB: 0
PC: 1.40

fit vpr f1-f1 parameters
L1: 20.00 cm
F1P: 166.125 ppm
F1: 16714.30 Hz
F2P: 98.529 ppm
F2: 9913.26 Hz
PCNCA: 3.37981 ppm/cm
WICM: 340.05179 Hz/cm

File: FAB_POS_0629 Ident: 1 Acq: 29-JUN-1998 16:03:59 Cal: FAB_POS_0629_1
 Autospec FAB+ Magnet BpI: 133 BpI: 104920 TIC: 779998 Flags: HALL
 File Text: MeOH.gly.

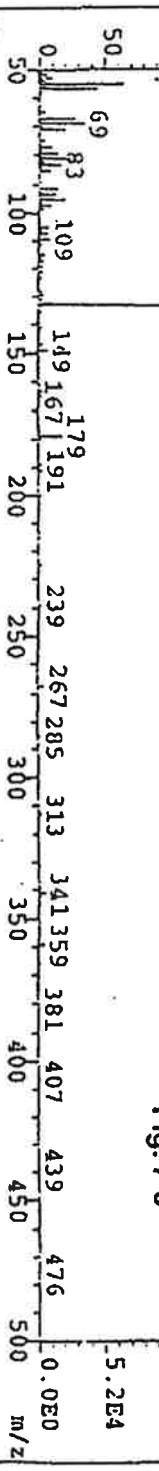
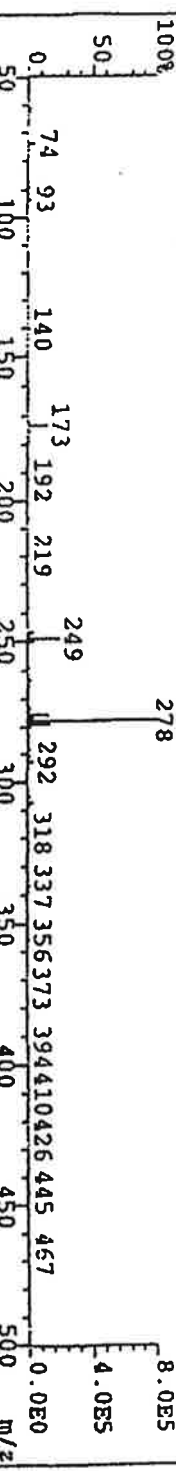


Fig. 7-3

File: FAB_POS_SCH2_0629 Ident: 1 Acq: 29-JUN-1998 16:54:52 +0:17 Cal: FAB_POS_CSI_0629_1
 Autospec FAB+ Magnet BpI: 107393 TIC: 1269425 Flags: HALL
 File Text: MeOH.gly.



File: FAB_NEG_SCH_2_0629 Ident: 1 Acq: 29-JUN-1998 16:03:26 +0:15 Cal: FAB_NEG_CSI_0629_1
 Autospec FAB- Magnet BpI: 293163 TIC: 1715339 Flags: HALL
 File Text: MeOH.gly.

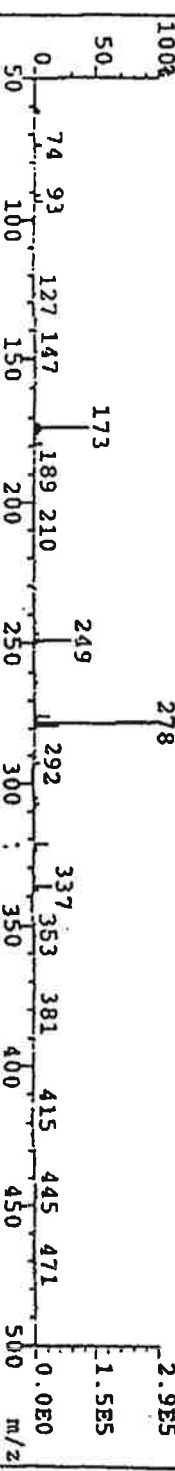
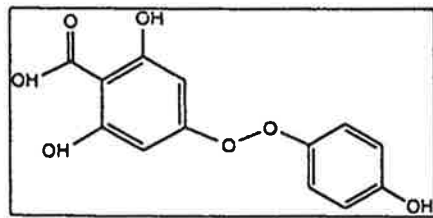


Fig. 7-4



제 8 절. 천연물로부터 항산화 물질 대량생산

Fig. 8-1, -2, -3, -4와 같은 방법에 의거 추출한 결과, 추출용매에 따라 각 단계에 분리되어 나오는 형태가 다를 뿐만 아니라 추출효율에 있어서도 각각 차이를 나타냈다. 특히, 에탄올 추출시 chloroform을 첨가했을 때에도 생성되지 않았고, 단지 Ethylacetate 침전물 및 chloroform + Ethylacetate층에서만 항산화물이 검출되었다.

추출효율 역시 Fig. 8-5와 같이 MeOH추출시 9.2%로서 가장 높았다. 이들 각 단계 분리 물질의 항산화 활성을 측정한 결과, Fig. 8-6과 같이 MeOH추출시 각 단계에서 가장 높은 항산화 활성을 나타냈다. 또한, 솔피(수피), 황금(뿌리), 두충엽(잎)등을 검토한 결과, 유사한 경향을 나타냈다.

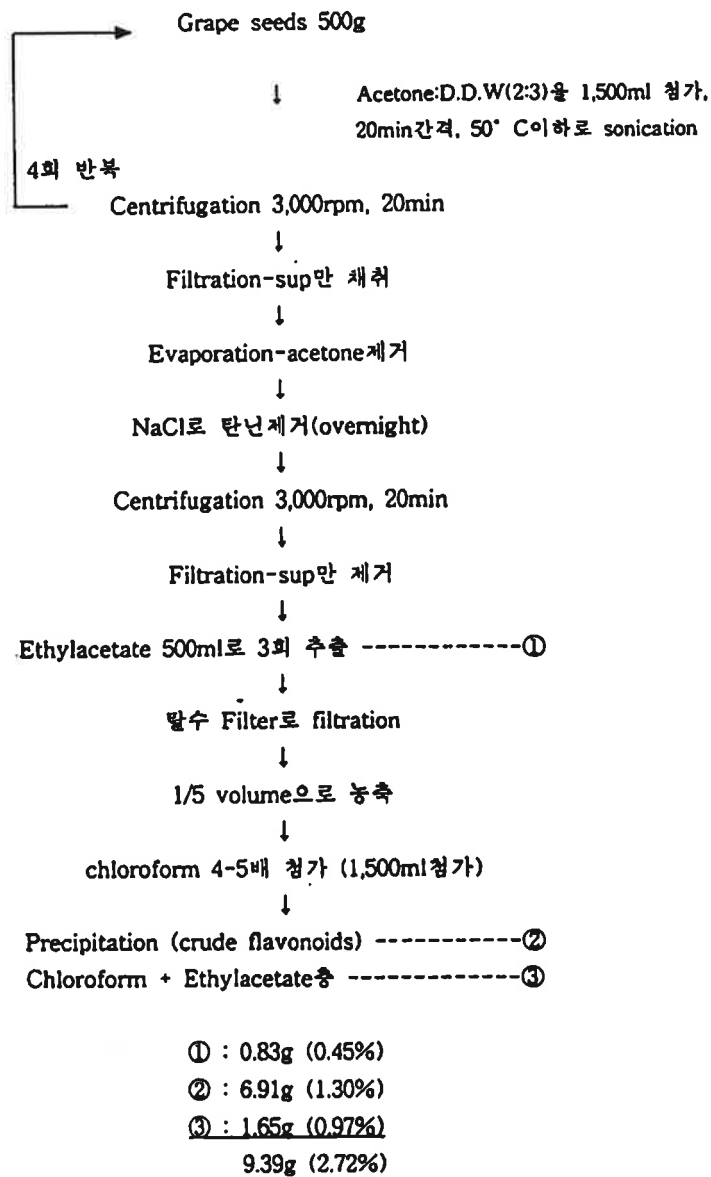


Fig. 8-1. Isolation of flavonoid from grape seed with acetone-H₂O extraction system

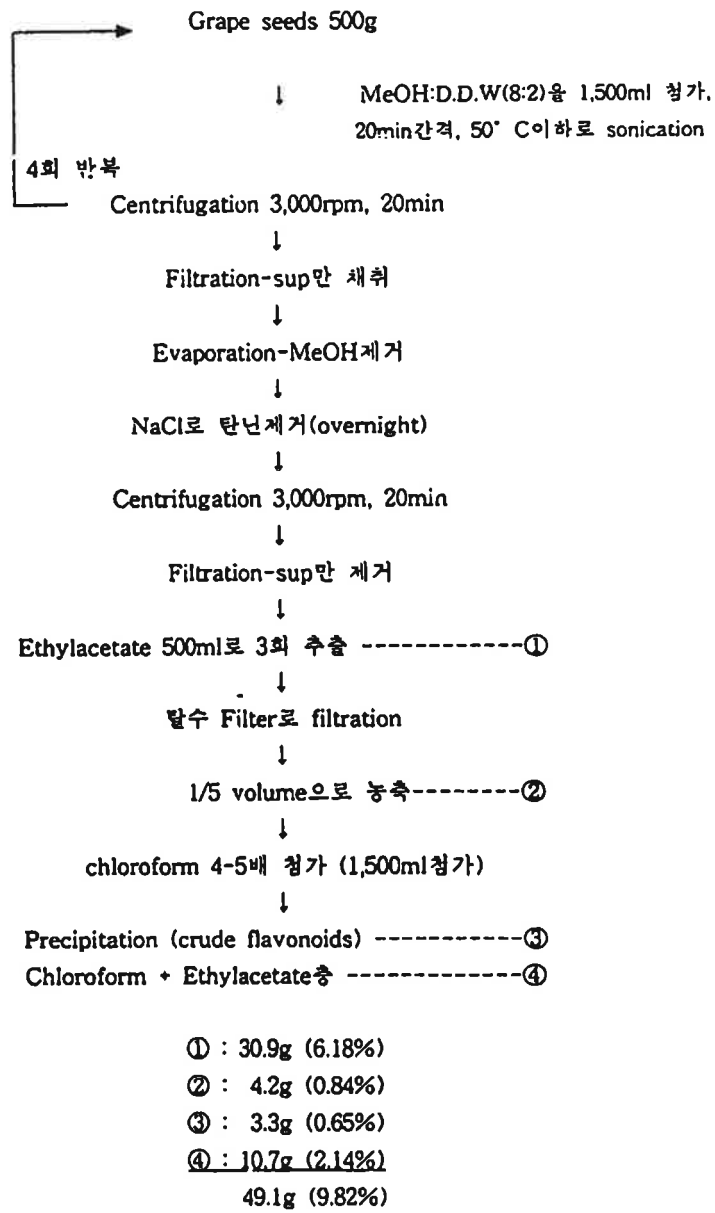


Fig. 8-2. Isolation of flavonoid from grape seed with MeOH-H₂O extraction system

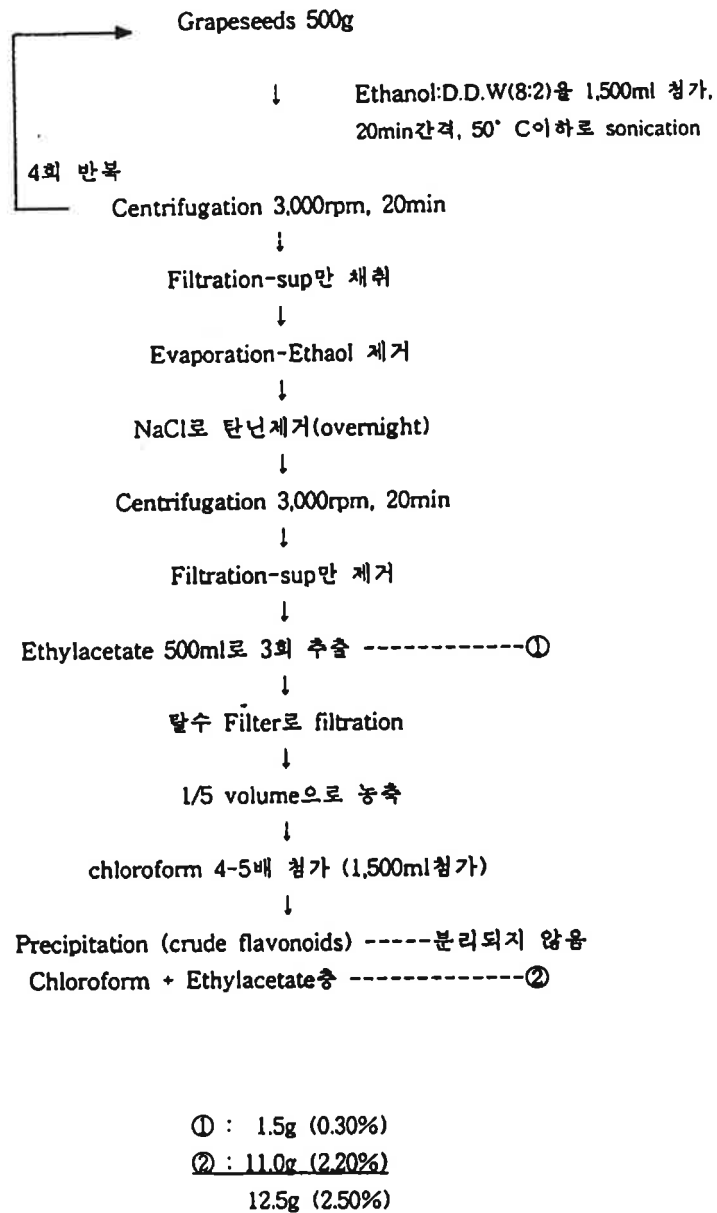


Fig. 8-3. Isolation of flavonoid from grape seed with EtOH-H₂O extraction system

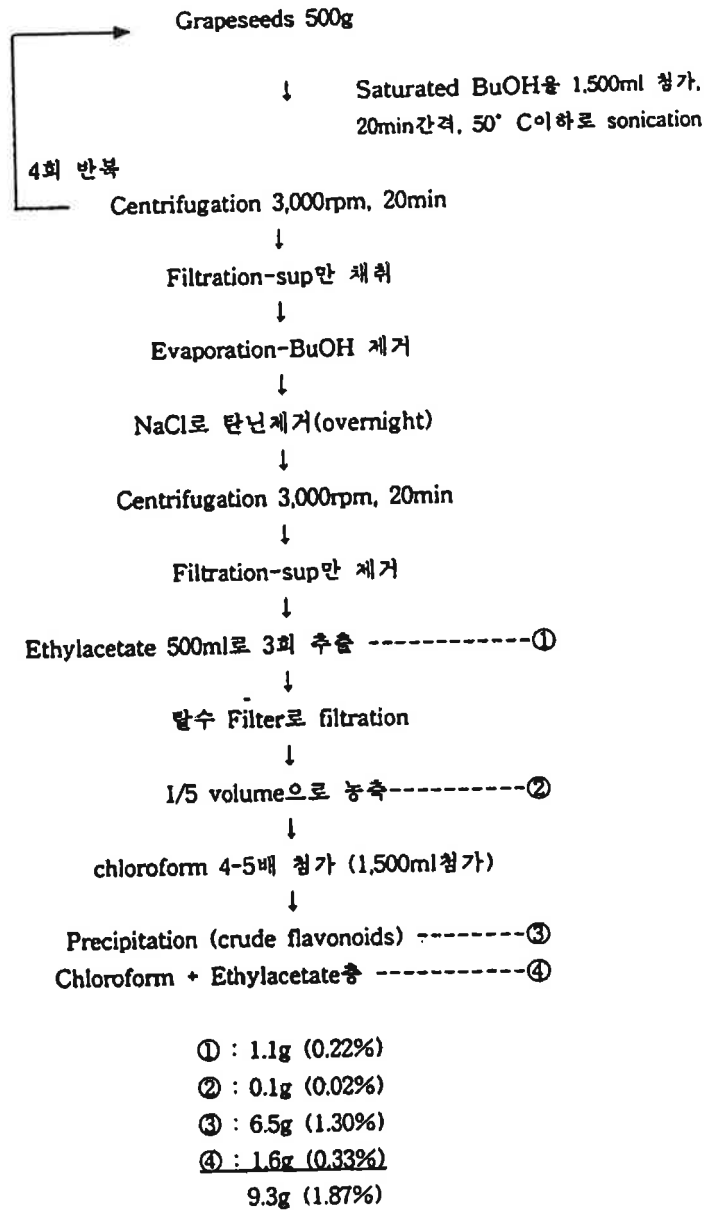


Fig. 8-4. Isolation of flavonoid from grape seed with saturated BuOH extraction system

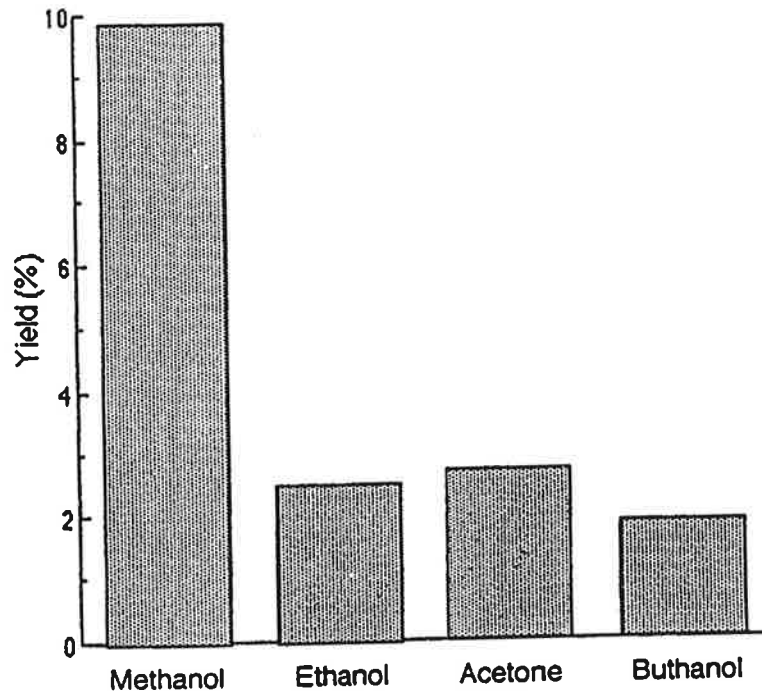


Fig. 8-5. Yields of flavonoid with the solvent extraction system

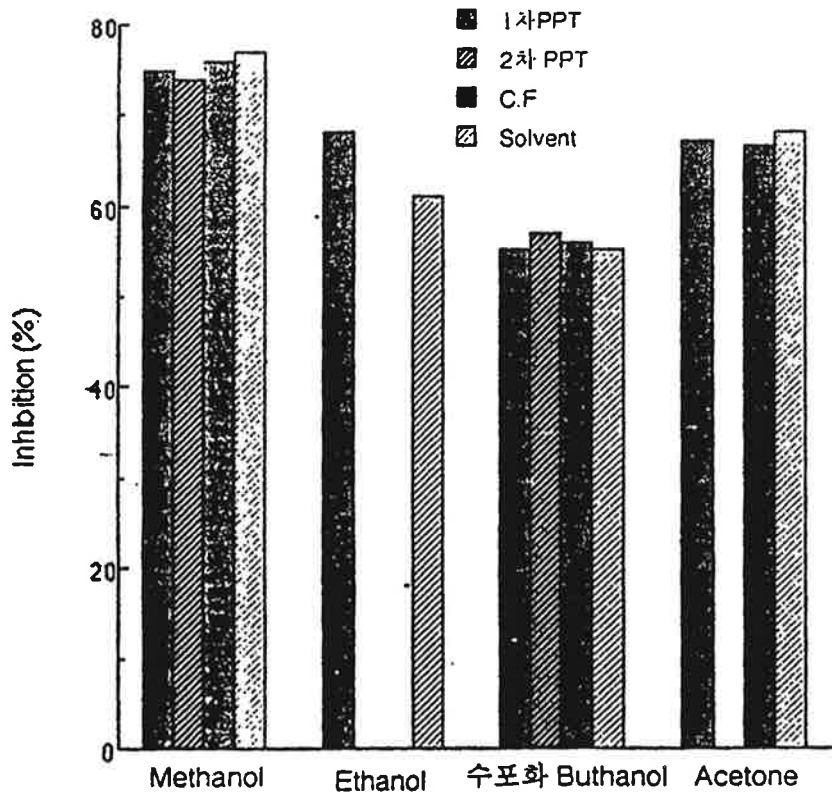


Fig. 8-6. Antioxidant activity of each solvent extracts with the extracting step

제 9 절. CL-HPLC를 이용한 흡연 Rat에 있어서 과산화지질 생성에 관한 Antioxidant의 효과

1. Plasma, Liver, Lung, Brain 에서의 PCOOH 생성량의 측정 비교

단기간 담배 연기를 흡입시킨 rat에 있어서 plasma, liver, lung, brain에 미치는 영향을 CL-HPLC를 이용하여 PCOOH 생성 결과를 Fig. 9-1.에 나타내었다. Plasma와 brain에서는 3 group 모두에서 유의차가 없는 것으로 나타났지만 plasma의 C (273.04ng/g)와 AS (246.70 ng/g) group보다 CS (596.37 ng/g) group이 높게 나타났고, brain에서도 C (69.89 ng/g)와 AS (87.88 ng/g) group보다 CS (156.51 ng/g) group에서 더 많이 검출되었다. 또한, liver에서는 C (293.65 ng/g)와 AS (314.69 ng/g) group에서 보다 CS (1724.07 ng/g) group에서 약 5.8배 더 많이 검출되었다.

Lung에서도 C (167.74 ng/g) group 에 비해 AS (505.58 ng/g), CS (642.85 ng/g) group이 각각 약 3배, 3.8배 많이 검출되었다.

이러한 결과는 담배 연기 흡입에 의해 liver와 lung에 1차적으로 손상을 주는 것으로 나타나, 흡연이 liver와 lung 질환에 매우 밀접한 관련이 있는 것을 볼 수 있다. 또한, ascorbic acid 투여군인 AS group은 C group보다는 생성이 많이 되었지만 담배 연기만 흡입시킨 CSgroup보다는 PCOOH 생성량이 현저하게 낮아서 ascorbic acid 투여가 PCOOH 생성을 억제한다고 생각된다.

따라서 담배 흡연시 항산화 물질을 동시에 섭취하는 것이 건강 유지에 매우 유익할 것으로 사료된다.

2. 장기중의 항산화 물질의 함량 측정 비교

α -Tocopherol 측정 결과는 Fig. 9-2와 같다. α -Tocopherol의 잔유 함량은 전반적으로 C group에서 제일 많았고, AS group, CS group 순이었다. 특히 lung과 plasma에서는 유의차가 있게 나타났다. Lung에서는 C (24.46 mg/g) group보다 AS (10.24mg/g), CS (11.04 mg/g) group이 각각 약 60%, 55%가 감소된 것으로 나타났다. PCOOH 생성량에서도 유의차가 나타난 것으로 보아 lung에서는 α -tocopherol이 감소됨으로서 PCOOH 생성이 증가된 것으로 나타났다.

Plasma에서는 C (0.32 mg/g) group보다 AS (0.26 mg/g), CS (0.19 mg/g) group에서 각각 약 20%, 40%가 감소된 것으로 나타났다. 또한 Liver에서는 PCOOH 생성량에 비해서 α -tocopherol의 감소가 AS (8.39 mg/g), CS (7.69 mg/g) group에서 각각 약 3%, 11%만이 감소된 것으로 측정되었다. Brain에서도 유의차는 없지만 1%, 26%가 감소되었다.

β -Carotene의 측정 결과를 Fig. 9-3에 나타내었다. β -Carotene과 ascorbic acid는 liver와 brain에서만 측정하였다. Liver에서는 C (192.62 ng/g) group보다 AS (62.89ng/g), CS (89.42 ng/g) group에서 각각 약 67%, 55%가 감소된 것으로 나타났다. Brain에서도 C와 AS group은 비슷하였지만 CS (37.74 ng/g) group은 약 30% 감소된 것으로 나타났다.

Ascorbic acid의 측정 결과를 Fig. 9-4.에 나타내었다. Liver에서는 C (108.75 μ g/g) group보다 AS (90.68 μ g/g), CS (92.39 μ g/g) group에서 각각 약 17%, 15%가 감소되었다. Brain에서도 C (5.50 μ g/g) group에 비해 AS (4.18 μ g/g), CS (4.26 μ g/g) group에서 각각 약 24%, 22% 감소되었다. Ascorbic acid를 투여하였지만 AS group에서 제일 적게 측정되어 PCOOH 생성을 보다 효과적으로 억제한 것으로 생각되어진다.

3. 생성된 PCOOH와 측정된 항산화제의 감소량 비교

각 장기마다 생성된 free radical에 대해 방어할 수 있는 효소와 항산화제의 함유량은 다르지만, 본 연구에서는 측정된 PCOOH의 생성과 항산화제의 감소량을 비교하였다.(Table. 8)

Plasma에 있어서 C와 AS group의 PCOOH 생성량은 비슷하고 CS group은 C group에 비해 약 2배정도 증가하였다. α -Tocopherol의 감소량은 C group에 비해 AS, CSgroup이 각각 약 18%, 40% 감소된 것으로 나타났다.

Liver에서는 PCOOH 생성량이 C group에 비해 AS, CS group이 각각 약 6%, 5배정도 증가하였다. α -Tocopherol은 약 3%, 11% 감소되었고, β -carotene은 약 68%, 54% 감소되었고, ascorbic acid 역시 약 17%, 15% 감소된 것으로 나타났다. ASgroup에서 β -carotene과 ascorbic acid의 감소로 인해 PCOOH 생성량이 CS group보다 많이 감소되었다고 생각된다.

Lung에서도 PCOOH 생성량이 C group에 비해 AS, CS group이 각각 약 3배, 3.8배 증가하였다. 이에따라 α -Tocopherol은 약 58%, 54%가 감소되어 AS group에있어 상대적으로 PCOOH 생성량이 감소되었다고 생각된다.

Brain에서 PCOOH 생성량은 C group에 비해 AS, CS group이 각각 약 25%, 2.2배 증가하였고, α -tocopherol은 1%, 26% 감소되었고, ascorbic acid는 24%, 22% 감소되었다. β -Carotene은 C와 AS group은 비슷하고 CS group은 33% 감소한 것으로 나타나 ascorbic acid의 감소로 인하여 PCOOH 생성이 감소된 것으로 나타났다.

결과적으로 담배 연기 흡입으로 인한 free radical 생성에 대하여 생체내에서는 효소와 항산화제들이 생성된 free radical들을 방어하지만 본 연구에서 측정된 PCOOH 생성량은 담배 연기만 흡입시킨 CS group에서 전체적으로 많이 측정되었고 ascorbic acid를 투여한 AS group은 C group

과 비슷하게 측정되어 ascorbic acid가 PCOOH 생성을 강력하게 억제한 것으로 나타났다. Schechtman 등은(1991) 흡연자에 있어서 추가적인 Vitamin C 공급을 강력하게 권한다고 보고하였다. 또한 항산화제 측정에 있어서도 전반적으로 CS group이 가장 감소되었고 AS group은 C group과 비슷한 수준으로 감소되었다.

Table. 8. Comparison of PCOOH products and antioxidants decrease

		Plasma	Lung	Liver	Brain
PCOOH ($\mu\text{mol/g}$)	C	273.0 \pm 87.6	167.7 \pm 14.8	293.7 \pm 63.2	69.9 \pm 15.6
	AS	246.7 \pm 55.9	505.6 \pm 38.9	314.7 \pm 81.9	87.9 \pm 16.7
	CS	596.4 \pm 364.1	642.9 \pm 59.5	1724.1 \pm 355.1	156.5 \pm 43.5
α -tocopherol (mg/g)	C	0.32 \pm 0.03	24.46 \pm 3.21	8.60 \pm 0.30	4.54 \pm 1.24
	AS	0.26 \pm 0.02	10.23 \pm 1.67	8.39 \pm 0.88	4.50 \pm 0.59
	CS	0.19 \pm 0.04	11.04 \pm 2.58	7.69 \pm 1.09	3.34 \pm 0.60
β -carotene (ng/g)	C			192.62 \pm 49.36	53.67 \pm 10.61
	AS			62.89 \pm 8.08	56.00 \pm 15.42
	CS			89.42 \pm 14.26	36.74 \pm 2.21
ascorbic acid ($\mu\text{g/g}$)	C			108.75 \pm 6.94	5.50 \pm 0.27
	AS			90.68 \pm 4.46	4.18 \pm 0.11
	CS			92.39 \pm 3.60	4.26 \pm 0.18

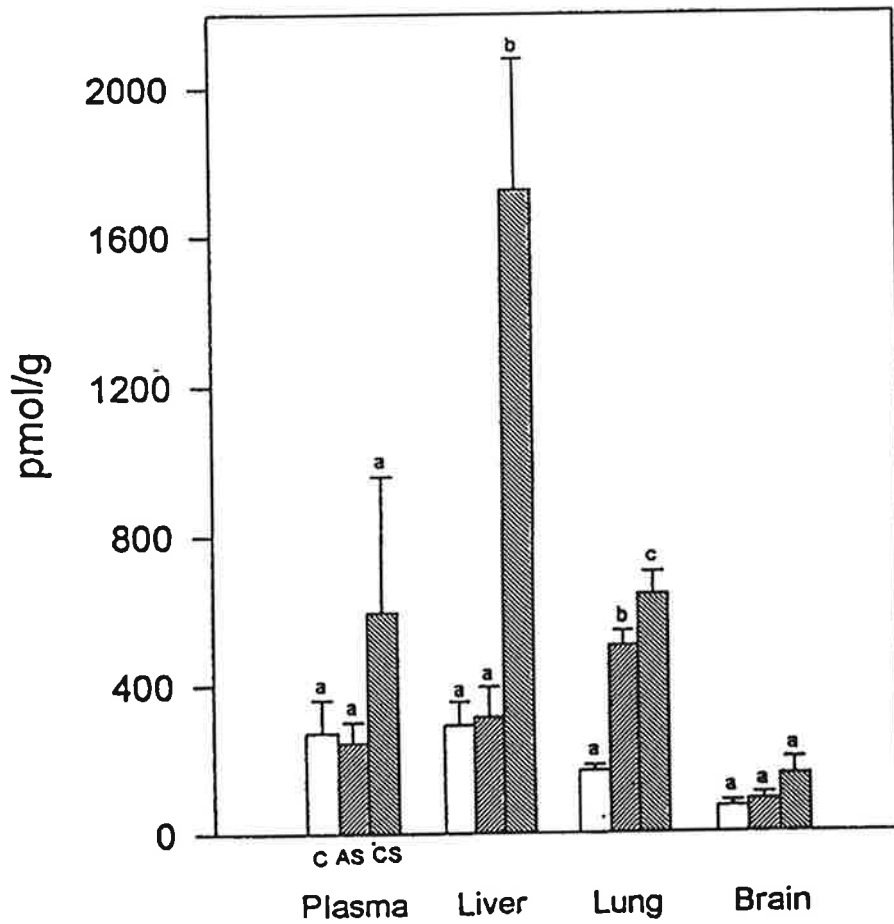


Fig. 9-1. Determination of PCOOH from plasma, liver, lung, and brain in rat

C: Control, □: AS: Ascorbic acid + smoking, ▨: CS: Smoking, ▩: .

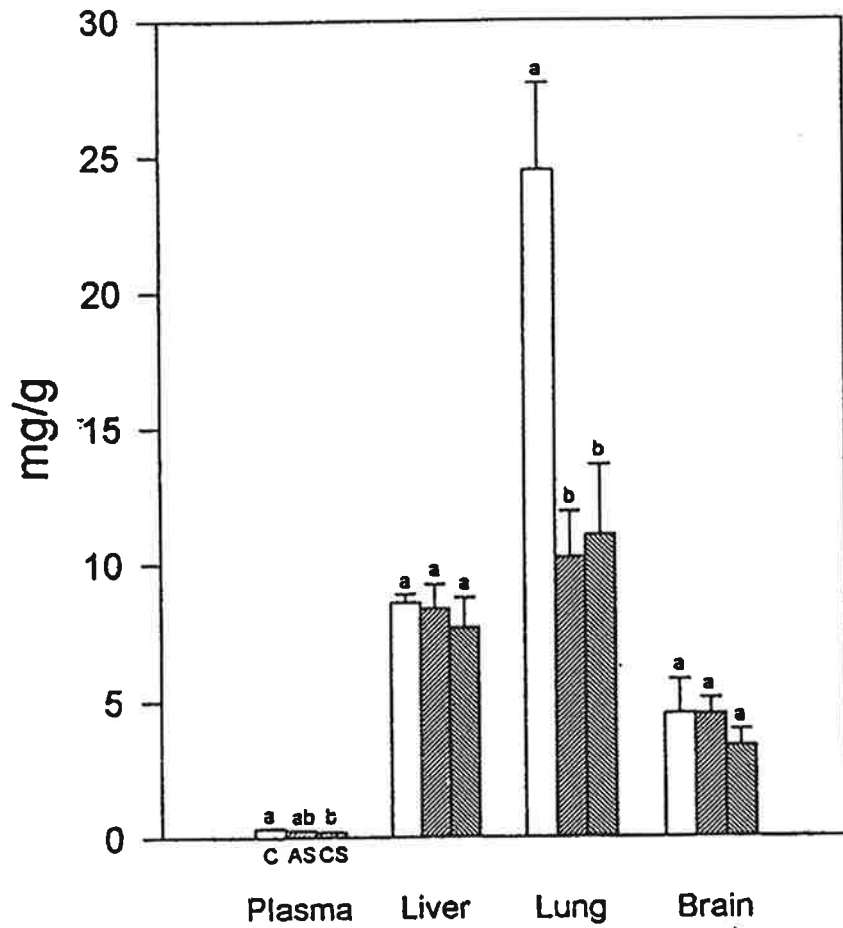


Fig. 9-2. Determination of α -tocopherol from plasma, liver, lung, and brain in rat.

C: Control, □ : AS: Ascorbic acid + smoking, ▨ : CS: Smoking, ▩ .

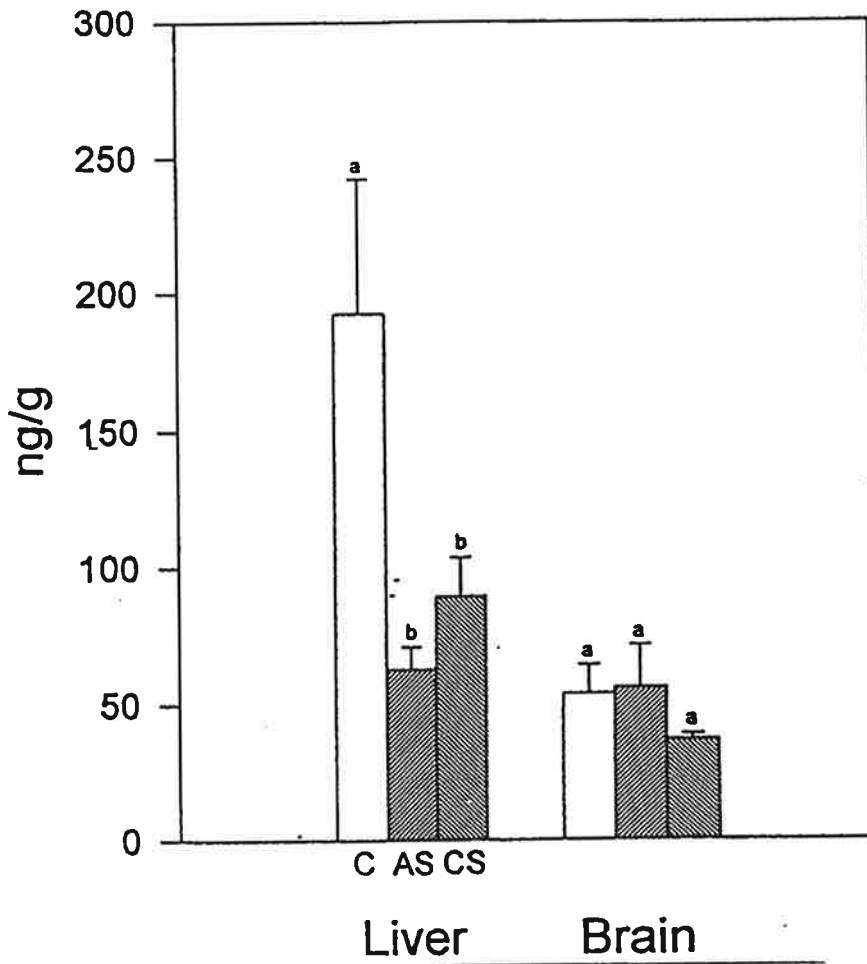


Fig. 9-3. Determination of β -carotene from plasma, liver, lung, and brain in rat.

C: Control, □ ., AS: Ascorbic acid + smoking, ▨ ., CS: Smoking, ▩ .

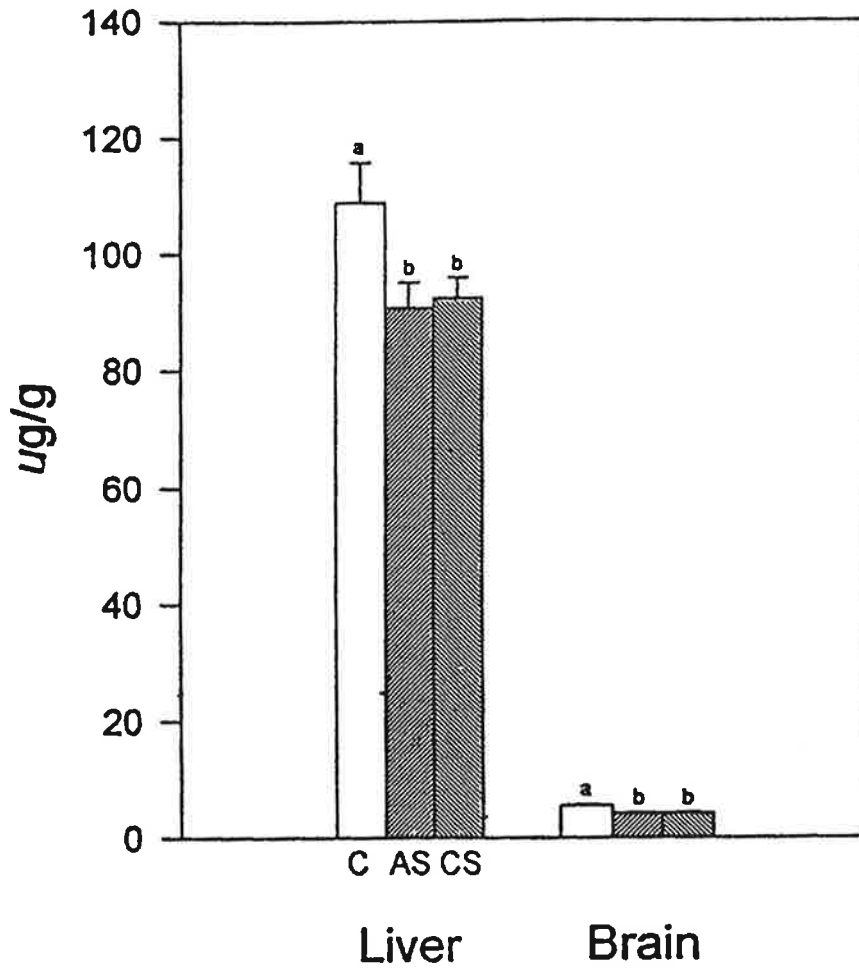


Fig. 9-4. Determination of ascorbic acid from plasma, liver, lung, and brain in rat.

C: Control, □ .. AS: Ascorbic acid + smoking, ▨ .. CS: Smoking, ▩ .

제 10 절. 화피 추출물의 당뇨 억제작용

1. Phosphatidylcholine-Liposome에 있어서 Antioxidant Activities 비교

Quercetin과 화피를 처리한 Liposome에서는 모두 Control 보다 산화가 지연, 억제되는 결과를 보였다(Fig.10-1). 1시간 이전에는 화피처리군이 PCOOH 생성이 적었으나 1시간 이후에는 Quercetin 처리군이 더 적게 생성되었다

2. 당뇨병 유발 쥐의 체중 및 장기의 무게변화

Fig.10-2는 각 군에 대한 체중의 변화를 기록한 것이다. Normal은 STZ+B 군에서는 체중의 유의차는 없었다. 또한 Control 군과 STZ+Q 군에서는 체중의 유의차는 없었다. 장기무게는 모든 장기에서 군간 유의차가 나타나지 않았다.

3. STZ 처리에 따른 혈당 비교

STZ 처리 1주 전에는 군간 유의차가 없으나, STZ처리 1일 후부터 차이가 나타나기 시작했으며 STZb > SEZ+Quercetin b > STZ+화피a > Normal a 처리군의 순으로 그 차이를 나타냈으며, 특히 STZ처리 7일후에는 STZb > STZ+Quercetinc > STZ+화피a > Normal a 순서로 군간의 유의차를 나타냈다 (Fig 10-3).

4. 광학 현미경을 이용한 췌장의 관찰

광학 현미경(400X)을 통해 관찰한 각 군들의 췌장 소도 내의 β

-cell 갯수는 Table 9와 같다.

Table 9. The number of β -cell in pancreatic islet

Group	Normal	STZ	STZ+Q	STZ+B
β -cell/islet	121 \pm 16	31 \pm 7	64 \pm 9	112 \pm 18

정상군에서는 β -cell이 고르게 분포된 구형의 islet이 관찰되었으며, 당뇨병이 유발된 STZ 군에서는 necrosis가 일어난 β -cell과 islet의 심한 shrinkage가 관찰되었다. STZ+Q 군에서는 β -cell의 수와 islet의 크기가 감소되는 necrosis와 shrinkage의 초기단계가 관찰되었으며, STZ+B 군에서는 β -cell이 고르게 분포된 구형의 islet이 관찰되었다. (Photol, 2, 3, 4)

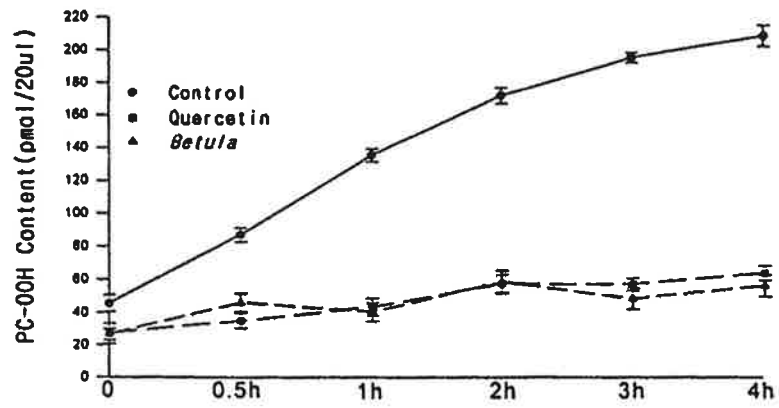


Fig. 10-1 The Antioxidant Activity in PC-liposome

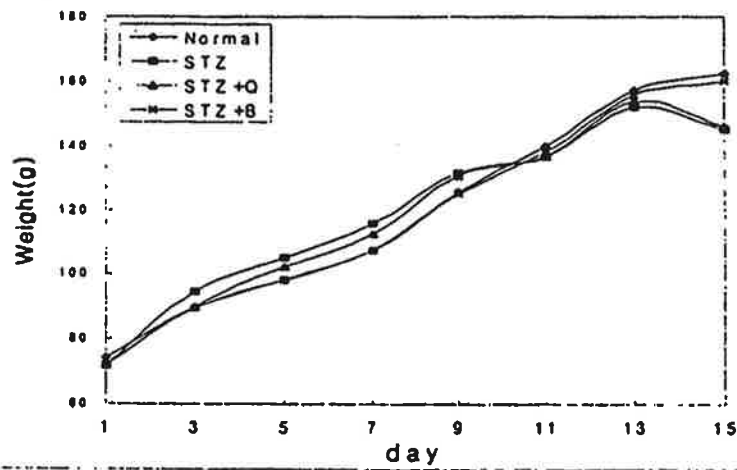


Fig.10-2 The Change of Body Weight with the treatment

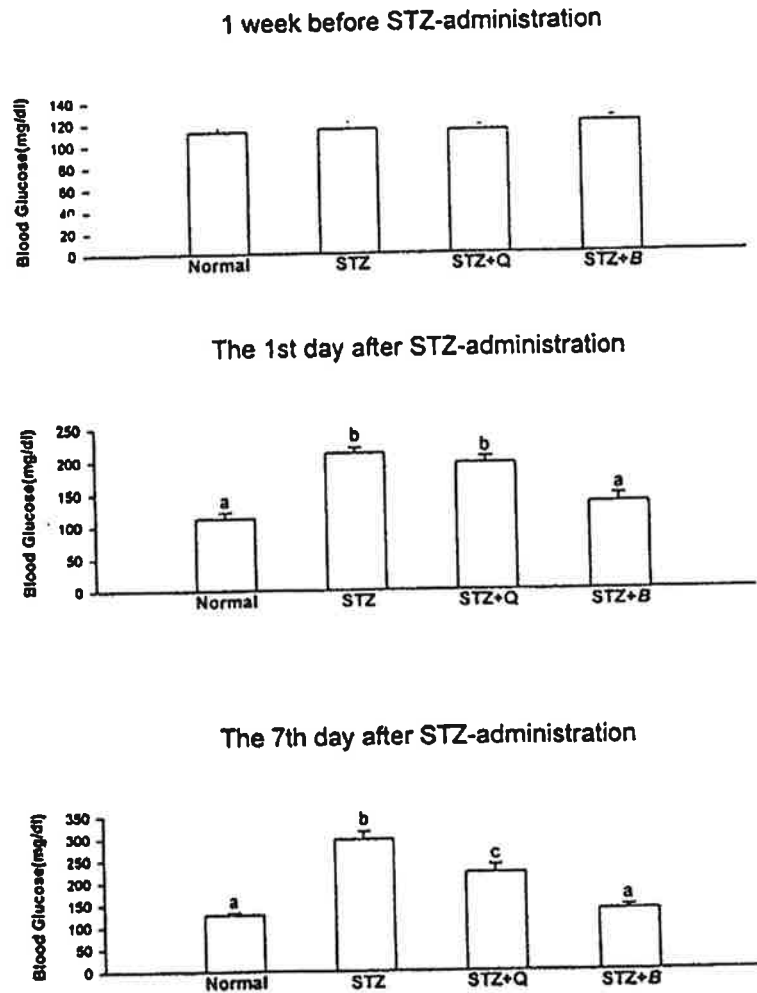


Fig.10-3. The Blood Glucose Level.
 (*-c Value without the same subscript letter are significant different at $p > 0.05$)

Normal

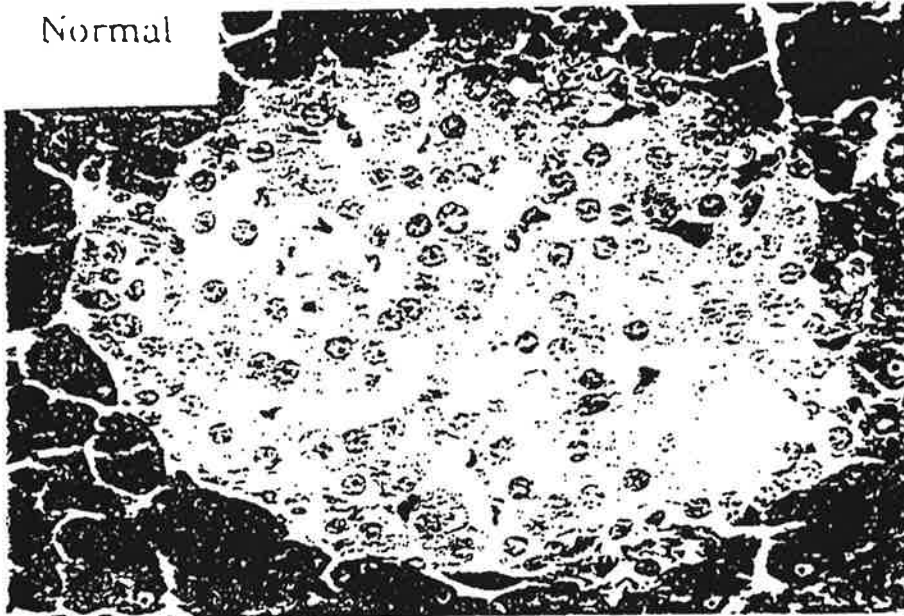
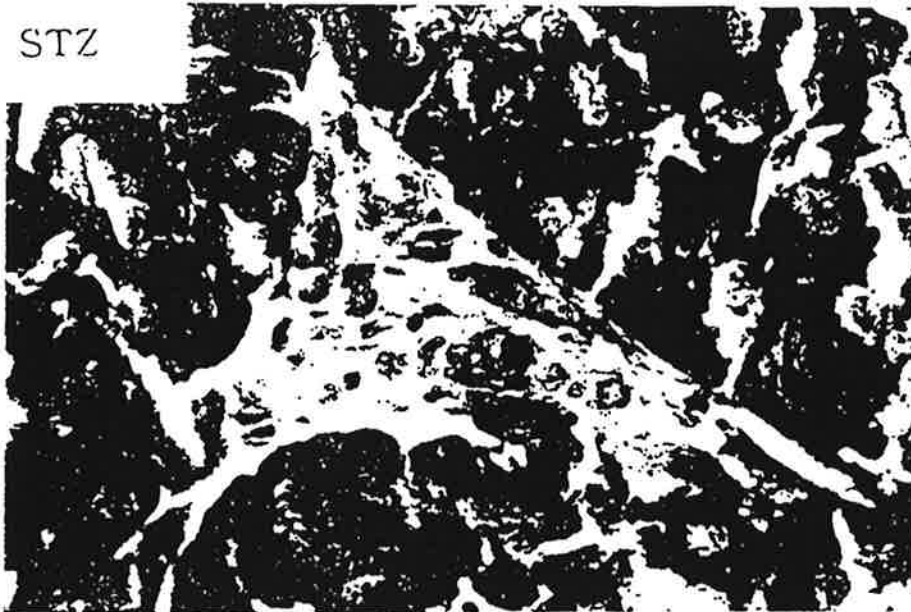


Photo 1. The Langerhans islet of Normal Group N-400

STZ



2. The Langerhans islet of STZ Group N-400.

STZ+Q

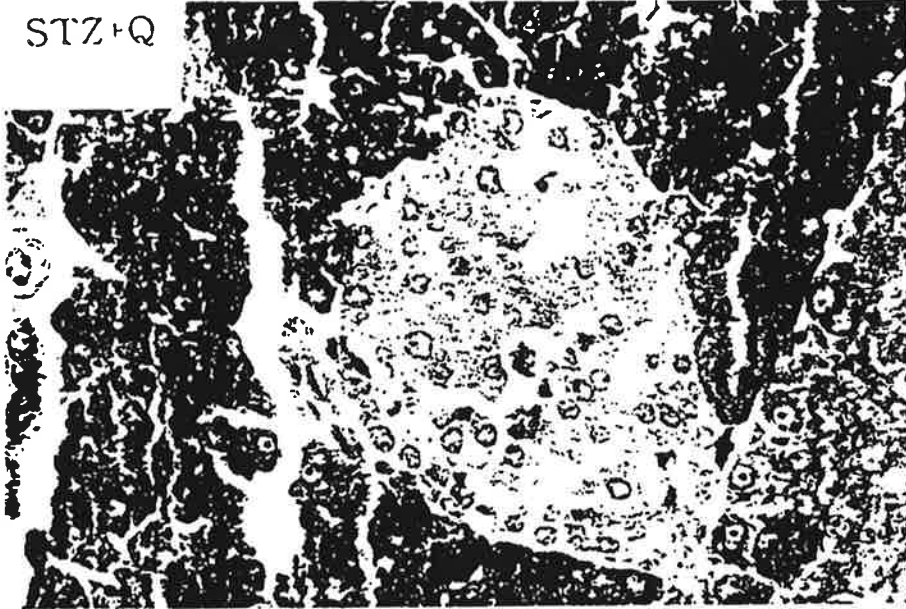


Photo 3 The Langerhans Islet of STZ-Q Group(X400)

STZ+B

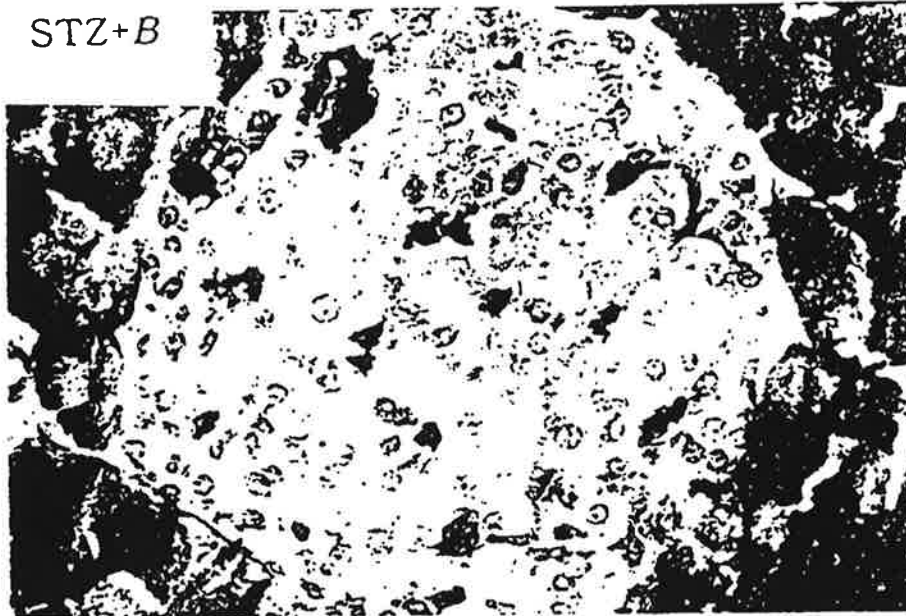


Photo 4 The Langerhans Islet of STZ-B Group(X400)

5. Tissue, Plasma의 항산화력 측정

Liver에서는 군간 항산화에 대한 활성의 유의차가 나타나지 않았으나, Plasma에서는 STZ 처리군을 제외한 나머지 군에서 활성을 보였으며 Pancreas에서는 정상군과 STZ+화피군이 높은 항산화 활성을 나타냈다 (Fig.10-4).

6. MDA(Malondialdehyde)양의 비교(*In vivo*)

Plasma와 간에서 MDA 생성양의 유의차는 나타나지 않았고, 췌장에서만 STZ+화피 처리군이 MDA의 생성이 적었다(Fig10-5).

7. Liver, Pancreas, Plasma에서의 PC-00H양의 비교

Liver에서는 군간 유의차가 나타나지 않았으며, Plasma에서는 STZ 처리 군에서만 PC-00H가 검출되었다. Pancreas에서는 STZ > STZ+Q > STZ+B > Normal 순서로 화피 처리군만이 normal수준으로 PC-00H가 검출되었다(Fig 10-6).

8. 혈장 중에 Cholesterol, Triglyceride, Phospholipid, 칼슘, 마그네슘, GOT, GTP, Choline-esterase의 측정.

혈장 내에서 Phospholipid, GOT, GTP의 양과 Choline-esterase의 활성은 군간 유의차가 나타나지 않았고 (Fig. 10-7), Calcium과 Magnesium의 함량은 STZ > STZ+Q > STZ+B > Normal 순서로 STZ 처리군에서 다른 군들보다 증가되었다. (Fig. 10-8) cholesterol 측정에서는 STZ > STZ+Q > STZ+B > Normal 순서로 약물 처리군에서 cholesterol 저하를 보여 주었

다. Triglyceride 측정에서는 STZ > Normal > STZ+Q > STZ+B 순서로 약물 처리군에서 triglyceride 저하를 보여주었다 (Fig. 10-9).

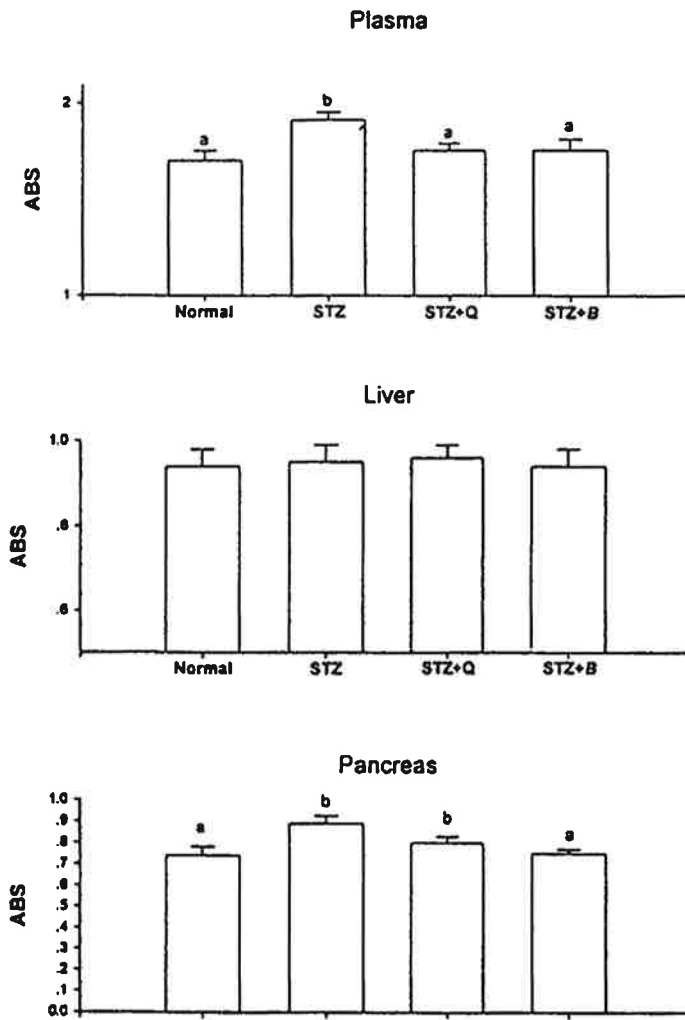


Fig.10-4. The Compare of Antiradiant Activity with Mellow & Tapper Method : *b value without the same subscript letter are significant different at $p > 0.05$

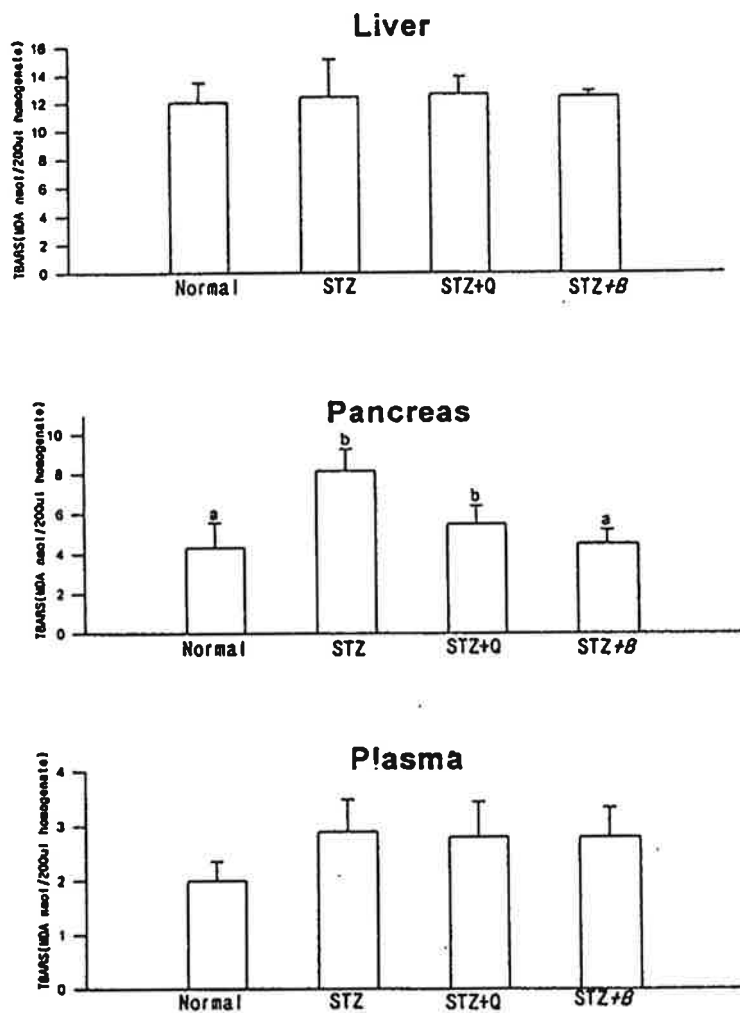


Fig.10-5 The Antioxidant Activity with TBA Method
 (Okawa *et al*) : *^cValue without the same subscript letter are significant
 different at $p > 0.05$

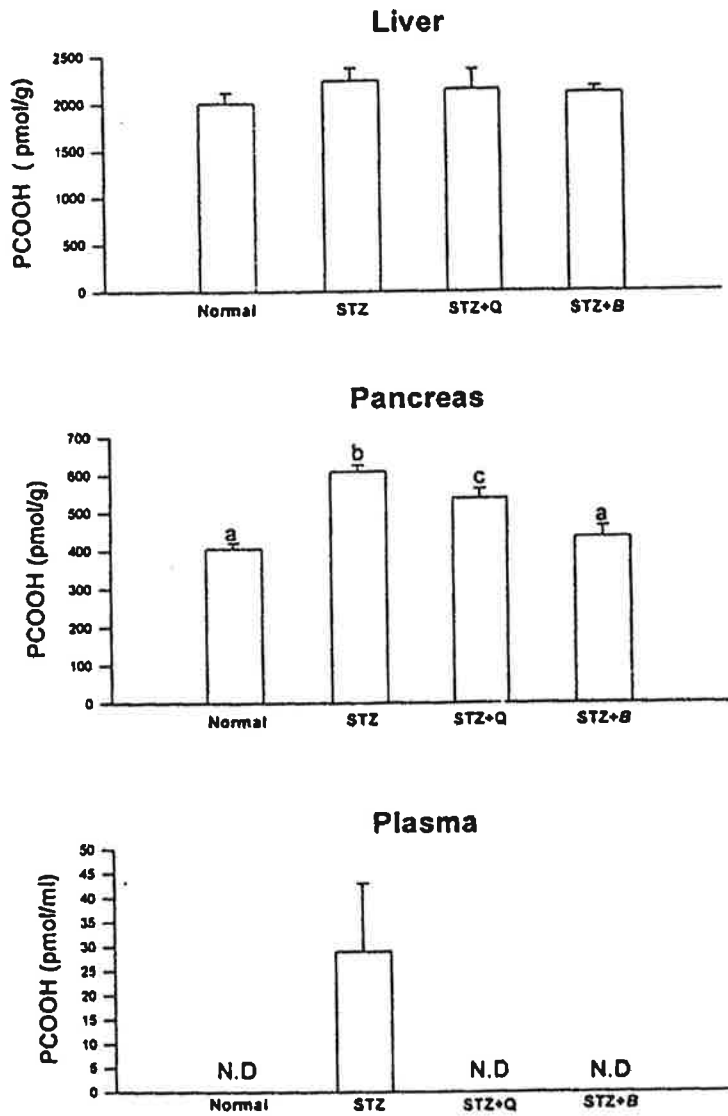


Fig.10-6 The Content of PC-OOH in Organs

^{a-c}Value without the same subscript letter are significant different at $p > 0.05$

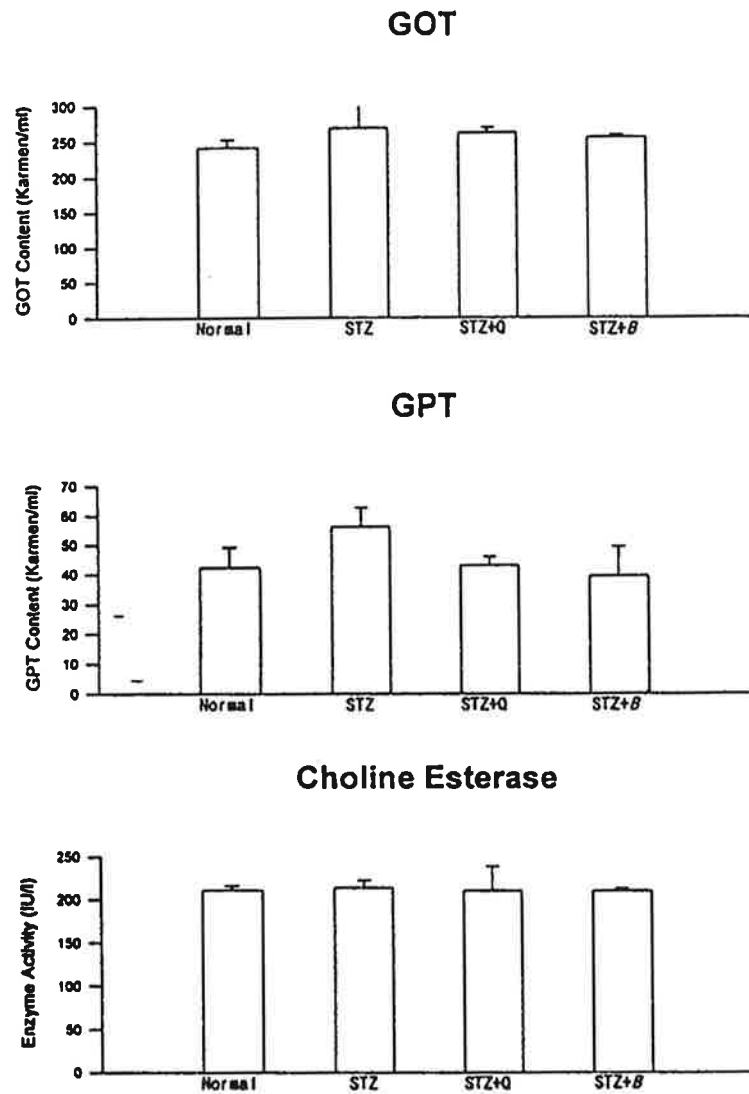


Fig.10-7 The Compare of GOT, GPT and Choline-esterase activity in plasma : *^cValue without the same subscript letter are significant different at p>0.05

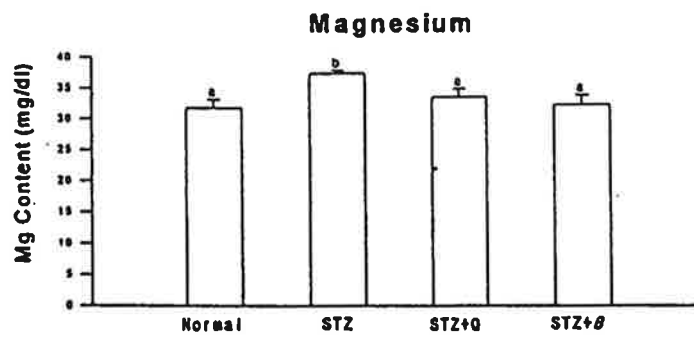
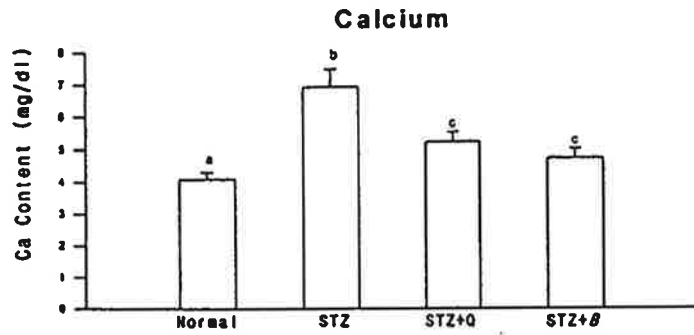


Fig.10-8 The Content of Calcium and Magnesium in plasma
 **Value without the same subscript letter are significant different at $p > 0.05$

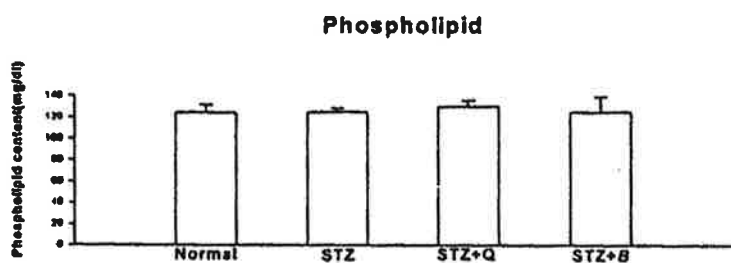
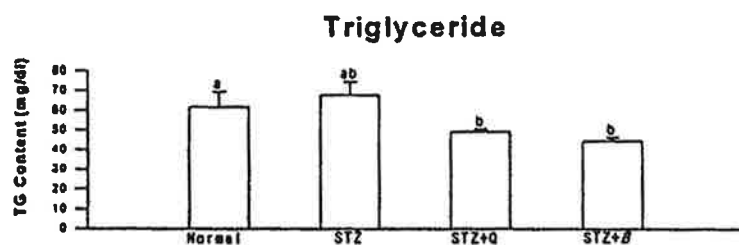
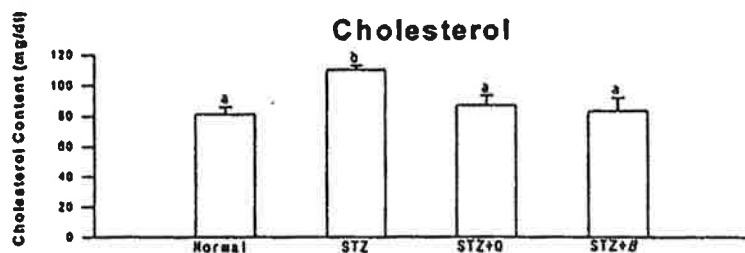


Fig.10-9 The Content of Cholesterol, Triglyceride and Phospholipid in plasma : ^{a-c}Value without the same subscript letter, are significant different at $p > 0.05$

제 11 절. 극 고온 가열조건에서 유지의 산화를 억제하는 물질의 탐색 및 개발

1. 유지의 불검화물의 고온 가열산화억제 효과

Table 10은 대두유를 180°C로 16시간 연속 가열 처리하는 동안 8종의 불검화물처리(0.25 및 0.50%)가 대두유의 지방산조성의 변화에 미치는 영향을 나타낸 것이다. 가열 저장전의 대두유의 지방산 조성은 palmitic acid (10.68%), stearic acid (4.15%), oleic acid (23.21%), linoleic acid (55.21%), linolenic acid (6.74%)이었으나, 16 시간 가열 처리후 지방산조성은 palmitic acid (13.52%), stearic acid (5.51%), oleic acid (26.40%), linoleic acid (50.29%), linolenic acid (4.28%)이었다. 특히 주목해야 할 부분은 linoleic acid의 함량의 감소인데 이는 유지의 지방산 조성중 linoleic acid가 가열 산화에 가장 민감하여 감소가 가장 뚜렷하기 때문으로 해석되며, 산화에 안정한 포화지방산인 myristic acid, palmitic acid, stearic acid등의 상대적 지방산함량은 가열 처리후 증가 하게된다. 따라서 고온 처리유지의 경우 linoleic acid와 palmitic acid ($C_{18:2}/C_{16:0}$) 비율이 가열산화의 중요한 척도로 이용된다.

Table 10에서 보는 바와 같이, 이 실험에 이용된 모든 불검화물들은 180°C의 고온 가열 조건에서는 유지의 안정성을 증가시키는 것들은 없었고 오히려 일부 종들은 산화를 촉진하여 유지의 열화가 촉진되었다. 예를 들면 0.5% 호박씨기름으로 부터 추출한 불검화물을 처리한 대두유의 경우 16시간 가열후 지방산조성은 palmitic acid(14.96%), stearic acid (5.11%), oleic acid (26.56%), linoleic acid (49.27%), linolenic acid (4.10%) 이었다. 호박씨 불검화물 처리구의 경우 그 가열산화 지표 값인 $C_{18:2}/C_{16:0}$ 값이 3.29인데 반하여, 대조구 (무처리구)의 경우는 3.72이었다.

여러문헌에 의하면 ethylidene 구조를 갖는 sterol인 avenasterol 및 fucosterol이 고온열산화를 억제한다고 밝혀져있으나^(6,8,9) 이번 실험에서는 불검화물의 첨가가 고온열산화를 억제하지 못하였는데 그 이유로는 불검화물의 순도와 관련된 것으로 생각되어, 미강유 불검화물을 TLC로 분리를 시도하여 좀 더 정제된 6개의 분획(rf value는 각각 0, 0.22, 0.30, 0.41, 0.83, 0.97)을 얻었고, 이들 fraction별 추출물의 무게 비율은 각각 1.55, 13.40, 14.43, 39.69, 9.79 및 21.13%이었다. 이렇게 얻어진 분획물질을 대두유에 첨가하여 다시 180°C에 14시간 저장한 결과 항산화력을 나타내는 분획은 찾아낼 수 없었다 (Table 11).

Table 10. Effects of 0.25 and 0.50% unsaponifiabiles of various oils on the fatty acid compositions of soybean oil during 14 hour storage at 180°C

Unsaponifiabiles C _{18:2} /C _{16:0}	Addition(%)	C _{16:0}	C _{18:0}	C _{18:1}	C _{18:2}	C _{18:3}
Control		13.52	5.51	26.40	50.29	4.28
3.72						
Pumkin seed oil	0.25	14.00	5.25	26.84	49.58	4.33
3.54						
unsaponifiabiles	0.50	14.96	5.11	26.56	49.27	4.10
3.29						
Corn oil	0.25	14.44	5.22	26.79	49.42	4.14
3.42						
unsaponifiabiles	0.50	13.84	5.42	26.78	49.77	4.20
3.60						
Sessame oil	0.25	14.08	5.31	27.09	49.16	4.36
3.49						
unsaponifiabiles	0.50	14.11	5.26	27.08	49.46	4.09
3.51						
Boxthorn seed oil	0.25	13.93	5.08	26.57	50.13	4.30
3.60						
unsaponifiabiles	0.50	13.73	5.25	26.67	49.84	4.50
3.63						
Palm oil	0.25	13.04	5.26	27.22	50.18	4.30
3.85						
unsaponifiabiles	0.50	12.88	5.24	26.81	50.60	4.45
3.93						

Canola oil	0.25	13.50	5.48	26.53	50.39	4.10
3.73						
unsaponifiables	0.50	13.48	5.19	26.74	50.29	4.30
3.73						
Ricebran oil	0.25	12.86	5.29	26.97	50.45	4.42
3.92						
unsaponifiables	0.50	12.90	5.17	27.06	50.21	4.66
3.89						
Cottonseed oil	0.25	13.45	5.08	26.69	50.52	4.26
3.76						
unsaponifiables	0.50	13.51	5.23	26.53	50.10	4.63
3.71						

The relative composition of palmitic, stearic, oleic, linoleic and linolenic acid of the original soybean oil before heating was 10.68, 4.15, 23.21, 55.21 and 6.74%, respectively. The value of $C_{18:2}/C_{16:0}$ for the original soybean oil was 5.17.

Table 11. Effects of TLC fractions of ricebran oil unsaponifiable on the fatty acid composition of soybean oil during heating at 180°C for 14 hour.

$C_{18:2}/C_{16:0}$	rf	$C_{16:0}$	$C_{18:0}$	$C_{18:1}$	$C_{18:2}$	$C_{18:3}$
Control 4.19		12.57	4.58	24.42	52.73	5.73
Fraction 1 4.32	0	12.21	4.64	24.72	52.79	5.61
Fraction 2 4.01	0.22	13.03	4.65	24.49	52.27	5.56
Fraction 3 4.22	0.30	12.43	4.66	25.22	52.50	5.19
Fraction 4 4.03	0.41	12.97	4.62	24.53	52.23	5.65
Fraction 5 4.20	0.83	12.52	4.69	24.64	52.53	5.63
Fraction 6 4.21	0.97	12.48	4.67	24.58	52.59	5.68

¹⁾The relative composition of palmitic, stearic, oleic, linoleic and linolenic acid of the original soybean oil before heating was 10.68, 4.15, 23.21, 55.21 and 6.74%, respectively. The value of $C_{18:2}/C_{16:0}$ for the original soybean oil was 5.17.

2. 생약 및 농산물 추출물의 극한고온 항산화력 검토

Table 12는 53종의 생약 및 농산물의 methanol 추출물들이 180°C에서 14시간 가열처리한 면실유의 지방산 조성의 변화에 미치는 영향을 나타낸 것이다. 53종의 생약 및 기타 농산물의 methanol 추출물의 경우, 180°C에서 면실유를 14시간 가열하는 동안에 면실유의 지방산 조성 변화를 억제하는 능력을 측정하였던바, 몇가지 종들은 linoleic acid파괴를 강력하게 억제하는 능력을 나타내었다. 이러한 고온가열 조건에서의 linoleic acid파괴를 강력하게 억제하는 종들로는 대황, 면화자, 백출, 백굴채, 정향등이었으며, 나머지 종들은 그 억제력이 적거나 미미하였다. 이번 실험에 사용된 시료들의 대부분이 강력한 자동산화억제력을 가진 것들이라는 사실을 고려하면⁽¹⁴⁾, 고온 가열처리시 추출물의 대부분이 항산화력이 없거나 약하다는 것은, 자동산화와 고온가열산화의 기작이 상이하기 때문인 것으로 사료된다. 가열 저장전의 면실유의 지방산조성은 myristic acid (0.74%), palmitic acid (23.51%), stearic acid (2.48%), oleic acid (19.39%), linoleic acid (53.88%)이었고, 180°C에서 14시간 연속 가열후에 면실유(Control)의 지방산 조성은 myristic acid (0.81%), palmitic acid (27.02%), stearic acid (2.61%), oleic acid (21.25%), linoleic acid (48.31%)로 바뀌었다. 이들 추출물을 처리하지 않은 면실유의 경우 가열전 C_{18:2}/C_{16:0} 값이 2.29에서, 180°C에서 14시간 가열후 1.79로 감소하였다. 그러나 백굴채 methanol 추출물 8 mL를 처리한 면실유의 경우, 14시간 가열처리후 myristic acid (0.78%), palmitic acid (24.65%), stearic acid (2.40%), oleic acid (20.24%), linoleic acid (51.93%) 이었다(Table 12). 정향 methanol 추출물 8mL를 처리한 면실유의 경우, 14시간 가열 처리후, 그 지방산 조성이 myristic acid (0.79%), palmitic acid (25.31%), stearic acid (2.57%), oleic acid (20.16%), linoleic acid (51.01%)이었다 (Table 12). 대황, 백굴채 및 정향의

methanol 추출물 8mL를 처리한 면실유의 경우, 그 $C_{18:2}/C_{16:0}$ 값은 각각 2.05, 2.11 및 2.02이었다. 즉 대황, 백굴채 및 정향 추출물들이 가열산화의 중요한 품질지표인 $C_{18:2}/C_{16:0}$ 값의 감소를 약 52, 64 및 46%억제하는 강력한 효과를 가지고 있다는 것을 의미한다. 또한 이 결과는 백굴채 추출물이 대황이나 정향 추출물보다 고온가열산화를 억제하는 능력이 탁월하다는 사실을 나타내는 것이다. 특히 할만한 사항은 기존에 알려진 고온에서의 항산화력이 있는 귀리 (oat)의 methanol 추출물⁽⁸⁾은 동일한 조건하에서 대황, 정향 및 백굴채의 methanol 추출물에 비하여 linoleic acid파괴를 억제하는 능력이 거의 미미할 정도이었다.

3. 정향의 methanol추출물의 장기 가열시험

단기 고온 가열 산화 실험에서 linoleic acid파괴억제능력이 탁월한 정향의 methanol 추출물들이 장기간의 고온 가열조건하에서도 linoleic acid파괴억제력, conjugated diene 생성억제 및 중합체생성억제력을 계속 유지할 수 있는지 여부를 측정하기 위하여, 정향의 추출물(0.5, 1.0, 2.0%, w/w)을 처리한 40 g의 면실유를 180°C에서 1일 7시간씩 8일간 가열 처리한 후, 면실유의 지방산조성의 변화, conjugated diene함량변화 및 중합체생성량을 측정하였다. 8일간 가열처리후에도 정향추출물은 면실유의 $C_{18:2}/C_{16:0}$ 값의 감소를 억제하는 능력이 탁월하였으며, 추출물의 처리농도를 증가시킬수록 그 억제력은 증가하였다 (Fig. 11-1). 추출물을 첨가하지 않은 면실유(대조구)의 경우 8일 가열 처리한 결과 가열산화지표값인 $C_{18:2}/C_{16:0}$ 의 값이 1.33인 반면, 0.5%, 1.0% 및 2.0% 정향methanol추출물 처리구 및 0.02% TBHQ 처리구의 경우, 그 값이 각각 1.44, 1.57, 1.64 및 1.51 이었다.

이 결과는 180°C에서 8일간 면실유를 가열처리하는 동안, 1.0% 정향 추출물이 0.02% TBHQ 보다 면실유의 $C_{18:2}/C_{16:0}$ 값의 감소치를 억제하

는 능력이 크다는 것을 의미한다. 이는 장기간의 가열처리중에도 정향추출물들은 linoleic acid의 파괴를 억제하는 능력을 계속 유지하고 있다는 것을 나타낸 것이다.

Table 12. Effects of 4ml and 8ml methanol extracts of plants on the fatty acid composition of cottonseed oil during 14 hour storage at 180°C

한국명	Botanical Name	첨가량	C _{14:0}	C _{16:0}	C _{18:0}	C _{18:1}	C _{18:2}	C _{18:2} /C _{16:0}
대조구 (Control)			0.81	27.02	2.61	21.25	48.31	1.79
감국	<i>Crystanthemum indicum</i> L. (flower and calulis)	4 mL	1.01	26.79	2.64	20.65	48.91	1.83
		8 mL	0.80	26.98	2.59	20.07	48.55	1.80
감초	<i>Glycyrrhiza glabra</i> L. (root)	4 mL	0.80	26.20	3.01	20.99	48.99	1.87
		8 mL	0.78	25.83	2.65	21.12	49.63	1.92
갈근	<i>Pueraria hirsuta</i> Matsum (root)	4 mL	0.79	26.25	2.70	21.06	49.26	1.88
		8 mL	0.82	26.43	2.69	21.09	48.98	1.85
고구마	<i>Ipomeoa batatas</i> Poiret (root)	4 mL	0.81	26.65	2.77	20.87	48.85	1.83
		8 mL	0.77	25.92	2.70	20.55	50.05	1.93
고삼	<i>Sophora angustifloia</i> S. & Z. (root)	4 mL	0.78	26.67	2.57	20.81	49.17	1.84
		8 mL	0.79	26.17	2.56	20.62	49.86	1.91
패화	<i>Sophora japonica</i> L. (flower)	4 mL	0.83	26.05	2.59	20.77	49.77	1.91
		8 mL	0.74	25.80	2.81	20.48	50.17	1.94
귀리	<i>Avena sativa</i> L. (grain)	4 mL	0.81	26.72	2.68	20.93	48.86	1.83
		8 mL	0.80	26.63	2.76	20.90	48.91	1.84
나복자	<i>Raphanus Sativus</i> L. (seed and root)	4 mL	0.77	26.43	2.84	20.68	49.28	1.86
		8 mL	0.85	26.55	2.60	20.85	49.15	1.85
녹차씨	<i>Thea sinensis</i> L. (seed)	4 mL	0.77	26.18	2.62	20.75	49.67	1.90
		8 mL	0.77	25.85	2.60	20.64	50.14	1.94
대황	<i>Rheum undulatum</i> L. (root & caulis)	4 mL	0.69	24.90	2.48	20.37	51.55	2.07
		8 mL	0.72	25.03	2.53	20.44	51.27	2.05

continued

마자인	<i>Cannabis sativus</i> L. (stem)	4 mL	0.76	26.01	2.59	20.87	49.77	1.91
		8 mL	0.75	25.33	2.81	20.57	50.33	1.99
만형자	<i>Vitex rotundifolia</i> L. (fruit)	4 mL	0.87	26.45	2.64	20.42	49.62	1.88
		8 mL	0.74	25.66	2.58	20.32	50.70	1.98
메밀	<i>Fogopyrum esculentum</i> Moench (grain)	4 mL	0.81	26.78	2.92	20.99	48.50	1.81
		8 mL	0.79	26.66	2.90	21.48	48.16	1.81
면화자	<i>Gossypium indicum</i> Lam. (seed)	4 mL	0.84	25.28	2.52	20.33	51.03	2.02
		8 mL	0.78	24.88	2.59	20.08	51.66	2.08
목마	<i>Pseudocydonia sinensis</i> Schneider (fruit)	4 mL	0.80	26.56	2.69	20.80	49.14	1.85
		8 mL	0.82	26.44	2.66	20.84	49.25	1.86
목통	<i>Akebia quinata</i> Decne (root)	4 mL	0.77	26.90	2.69	20.94	48.70	1.81
		8 mL	0.80	26.59	2.66	20.87	49.07	1.85
백겨자	<i>Brassica Cernaue</i> Forbes et Hensl (seed)	4 mL	0.78	26.62	2.73	20.78	49.09	1.84
		8 mL	0.75	26.16	2.55	20.92	49.62	1.90
백굴채	<i>Chelidonium majus</i> L.v. <i>asiaticum</i> (whole plant)	4 mL	0.72	24.83	2.62	20.51	51.32	2.07
		8 mL	0.78	24.65	2.40	20.24	51.93	2.11
백출	<i>Atractyloides lyrata</i> S. & Z. (root & caulis)	4 mL	0.79	25.72	2.73	21.05	49.71	1.93
		8 mL	0.74	25.02	2.58	20.60	51.05	2.04
산사	<i>Crataegus curneata</i> S. & Z. (fruit)	4 mL	0.81	26.41	2.68	20.74	49.37	1.87
		8 mL	0.80	26.05	2.80	20.71	49.63	1.91
삼백초	<i>Palupara cordata</i> Busk (whole plant)	4 mL	0.81	26.43	2.79	20.82	49.15	1.86
		8 mL	0.79	26.11	2.61	20.73	49.76	1.91
상지	<i>Morus alba</i> L. (leaf)	4 mL	0.78	26.07	2.55	20.83	49.76	1.91
		8 mL	0.79	26.34	2.50	20.97	49.31	1.87
상백피	<i>Morus bombycis</i> Koitzumi (cortex)	4 mL	0.78	26.30	2.60	20.95	49.38	1.88
		8 mL	0.82	25.96	2.57	20.91	49.75	1.92

									continued
생강	<i>Zingiber officinale</i> Rosc. (root)	4 mL	0.78	26.11	2.61	20.83	49.67	1.90	
		8 mL	0.78	25.68	2.56	20.69	50.30	1.96	
세신	<i>Asarum heterotropoids</i> Maekawa (whole plant)	4 mL	0.82	26.58	2.69	20.87	49.04	1.84	
		8 mL	0.84	26.42	2.69	21.19	48.85	1.85	
소회향	<i>Prunus mume</i> S. & Z. (flower)	4 mL	0.84	26.29	2.68	20.77	49.42	1.88	
		8 mL	0.81	25.91	2.62	20.88	49.78	1.92	
승마	<i>Cimicifuga heracleifolia</i> Komarov (root & leaf)	4 mL	0.77	25.96	2.69	20.81	49.77	1.92	
		8 mL	0.79	26.03	2.63	20.68	49.87	1.92	
신이화	<i>Magnolia kobus</i> A.P. DE Candolle (flower)	4 mL	0.80	26.38	2.59	20.73	49.50	1.88	
		8 mL	0.77	25.67	2.84	20.63	50.09	1.95	
양파	<i>Allium cepa</i> L. (root)	4 mL	0.76	25.76	2.58	20.73	50.17	1.95	
		8 mL	0.83	27.22	2.81	20.95	48.19	1.77	
연자육	<i>Nelumbo nucifera</i> G. (seed)	4 mL	0.81	26.89	2.67	20.74	48.90	1.82	
		8 mL	0.95	26.72	2.67	20.68	48.98	1.83	
연화예	<i>Nelumbo nucifera</i> G. (flower)	4 mL	0.80	26.35	2.73	20.99	49.13	1.86	
		8 mL	0.80	26.60	2.85	20.88	48.87	1.87	
오수유	<i>Evadia rutaecarpa</i> Benth (seed)	4 mL	0.75	25.86	2.55	20.82	50.02	1.93	
		8 mL	0.78	25.80	2.69	20.78	49.94	1.94	
우박자	<i>Arctum lappa</i> L. (root & seed)	4 mL	0.79	26.49	2.78	20.66	49.28	1.86	
		8 mL	0.82	26.17	2.59	20.71	49.71	1.90	
유피	<i>Ulmus japonica</i> Sarg (cortex)	4 mL	0.80	26.69	2.78	20.86	48.87	1.83	
		8 mL	0.82	27.56	2.79	21.19	47.64	1.73	
옴양곽	<i>Epimedium Koreanum</i> Nakai (stem & leaf)	4 mL	0.78	26.25	2.61	20.68	49.68	1.89	
		8 mL	0.78	25.90	2.61	20.83	49.89	1.93	
인삼	<i>Panax Ginseng</i> (root)	4 mL	0.81	26.10	2.65	20.63	49.80	1.91	
		8 mL	0.81	26.20	2.70	20.75	49.54	1.89	

continued

일황련	<i>Coptis japonica</i> Makino (root & caulis)	4 mL	0.85	26.39	2.60	20.87	49.28	1.87
		8 mL	0.78	26.01	2.62	20.79	49.80	1.91
자소자	<i>Perilla frutescens</i> B. v. <i>Crispa</i> D. (seed)	4 mL	0.79	26.27	2.63	20.81	49.51	1.88
		8 mL	0.80	26.19	2.67	20.65	49.68	1.90
자초	<i>Lithospermum officinale</i> L. (root)	4 mL	0.88	27.85	2.87	20.18	48.22	1.73
		8 mL	0.76	25.05	2.76	20.27	51.15	2.04
저실자	<i>Broussonetia kozinoki</i> Sieb. (seed)	4 mL	0.79	26.41	2.70	20.66	49.44	1.87
		8 mL	0.80	26.28	2.72	20.60	49.59	1.89
전호	<i>Anthriscus sylvestris</i> Hoffman (root)	4 mL	0.83	26.39	2.72	20.94	49.13	1.86
		8 mL	0.78	26.33	2.79	20.89	49.21	1.87
정향	<i>Eugenia caryophyllata</i> T. (bud)	4 mL	0.77	25.63	2.72	20.50	50.38	1.97
		8 mL	0.79	25.31	2.57	20.16	51.01	2.02
지유	<i>Sanguisorba officinalis</i> v. <i>coreana</i> (stem)	4 mL	0.77	26.17	2.66	20.78	49.62	1.90
		8 mL	0.89	25.97	2.59	20.53	50.01	1.93
진범	<i>Aconitum rocyanum</i> Raymund (root)	4 mL	0.79	26.27	2.73	20.81	49.41	1.88
		8 mL	0.75	25.61	2.79	20.69	50.15	1.96
창출	<i>Atractylodes ovata</i> Thunb. (root & caulis)	4 mL	0.76	26.18	2.69	21.00	49.37	1.89
		8 mL	0.78	26.46	2.61	20.91	49.24	1.86
천궁	<i>Cnidium officinale</i> Makino (aerial tuber)	4 mL	0.75	26.21	2.63	20.86	49.56	1.89
		8 mL	0.80	27.20	2.85	21.28	47.87	1.76
커피	<i>Coffea</i> spp. (instant coffee)	4 mL	0.75	25.74	2.70	20.64	50.17	1.95
		8 mL	0.82	25.43	2.59	20.49	50.67	1.99
토사자	<i>Cuscuta japonica</i> Choicy (seed)	4 mL	0.78	26.39	2.70	20.83	49.31	1.87
		8 mL	0.81	26.61	2.74	20.89	48.95	1.84
하고초	<i>Thesium chinensis</i> Turc. (whole plant)	4 mL	0.77	26.27	2.71	20.81	49.44	1.88
		8 mL	0.77	25.83	2.60	20.66	50.13	1.94

continued								
하수오	<i>Polygonum multiflorum</i> Thunber (root)	4 mL	0.77	25.93	2.64	20.74	49.92	1.93
		8 mL	0.76	25.84	2.60	20.71	50.09	1.94
호두	<i>Julans regia</i> L. (seed)	4 mL	0.81	26.48	2.75	21.17	48.85	1.84
		8 mL	0.81	26.10	2.96	20.74	49.39	1.89
황금	<i>Scutellaria baicalensis</i> George (root)	4 mL	0.83	25.88	2.94	21.03	49.32	1.91
		8 mL	0.80	26.16	2.72	20.76	49.54	1.89
후박	<i>Machilus rimosa</i> v. <i>thumbergii</i> (cortex)	4 mL	0.85	27.73	3.16	21.44	46.81	1.69
		8 mL	0.83	27.43	2.91	21.83	47.00	1.71

¹⁾The relative composition of myristic, palmitic, stearic, oleic and linoleic acid of original cottonseed oil before heating was 0.74, 23.51, 2.48, 19.39, 53.88%, respectively.- The value of C_{18:2}/C_{16:0} for the original cottonseed oil was 2.29.

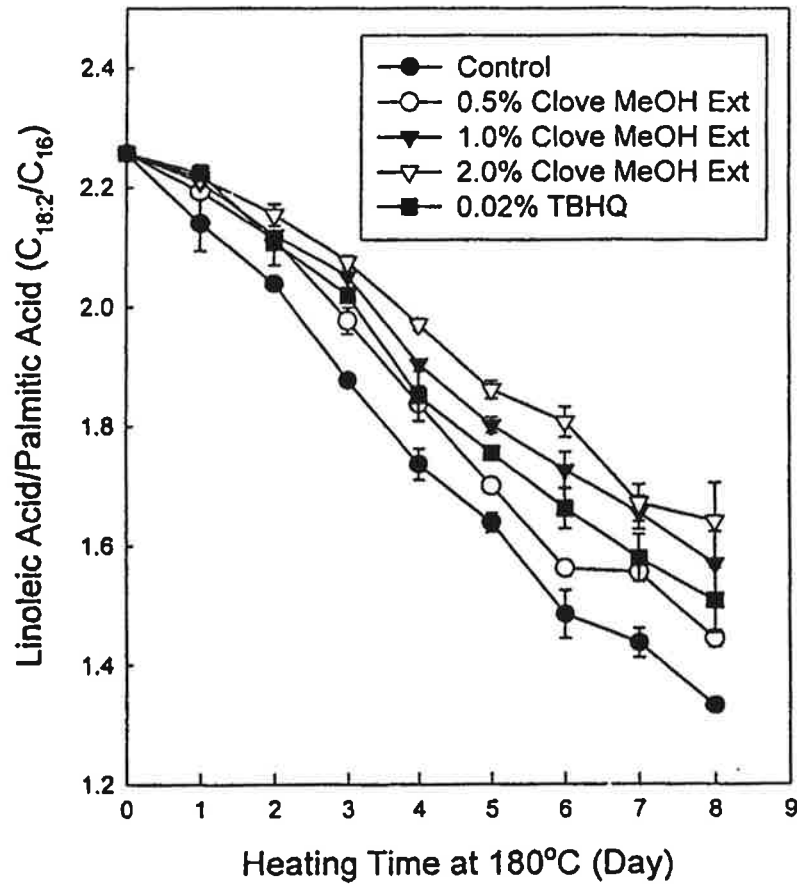


Fig. 11-1. Effects of 0.5, 1.0, 2.0% clove methanol extract and 0.02% TBHQ on the values of linoleic acid/palmitic acid in cottonseed oil during heating at 180°C.

Fig. 11-2 및 Fig 11-3는 정향메탄올 추출물이 면실유의 고온 가열시 conjugated diene 생성 및 중합체생성에 미치는 영향을 나타낸 것이다. White와 Armstrong⁽⁸⁾은 식용유지 가열처리시 그 가열 처리 시간이 증가함에 따라서 오중합도 이상의 중합체의 함량은 지속적으로 증가하기 때문에 이들 중합체의 함량은 가열 처리유지의 중요한 품질 지표로 이용될수 있다고 보고하였다. 이 결과는 정향 추출물들이 8일동안의 장기간에 걸친 고온가열 조건에서도 conjugated diene생성 및 중합체 생성을 억제하는 효과를 계속 유지하고 있음을 시사하는 결과로서 매우 흥미로운 결과이다.

중합체의 생성 및 불포화지방산 파괴는 튀김유지의 품질특성과 밀접한 관계를 갖고 있기 때문에, 정향추출물을 이용하여 튀김유와 같은 고온 가열 처리유의 품질을 안정시킬 수 있는 새로운 첨가물의 개발도 기대된다.

Figs 11-4, 5와 6은 각각 정향 (clove) 메탄올 추출물, 귀리추출물, 0.02%TBHQ 및 0.02% BHA 처리 면실유가 $C_{18:2}/C_{16:0}$ 값, conjugated diene 생성 및 중합체생성에 미치는 효과를 비교한 것이다. 이 실험에서 정향메탄올 추출물은 비교연구한 첨가물들보다 그 활성이 강하였고, 특히 중합체 억제력을 매우 탁월한 것으로 나타났다.

정향의 추출물을 diethyl ether, ethyl acetate, methanol등의 다른 용매로 추출하여 그 면실유의 가열산화에 미치는 영향을 연구하였는데, 정향을 methanol로 추출한 추출물이 면실유의 가열처리중 linoleic acid 생성억제, conjugated diene 생성억제 및 중합체 생성억제력이 가장 탁월하였다 (data not shown).

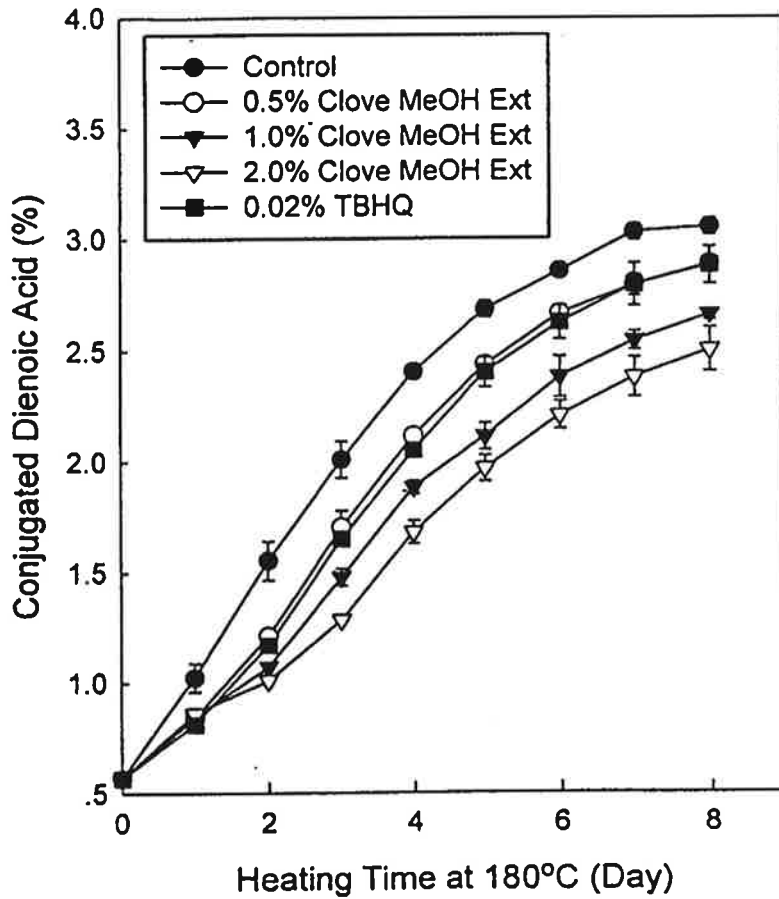


Fig. 11-2. Effects of 0.5, 1.0, 2.0% clove methanol extract and 0.02% TBHQ on conjugated diene formation in cottonseed oil during heating at 180°C.

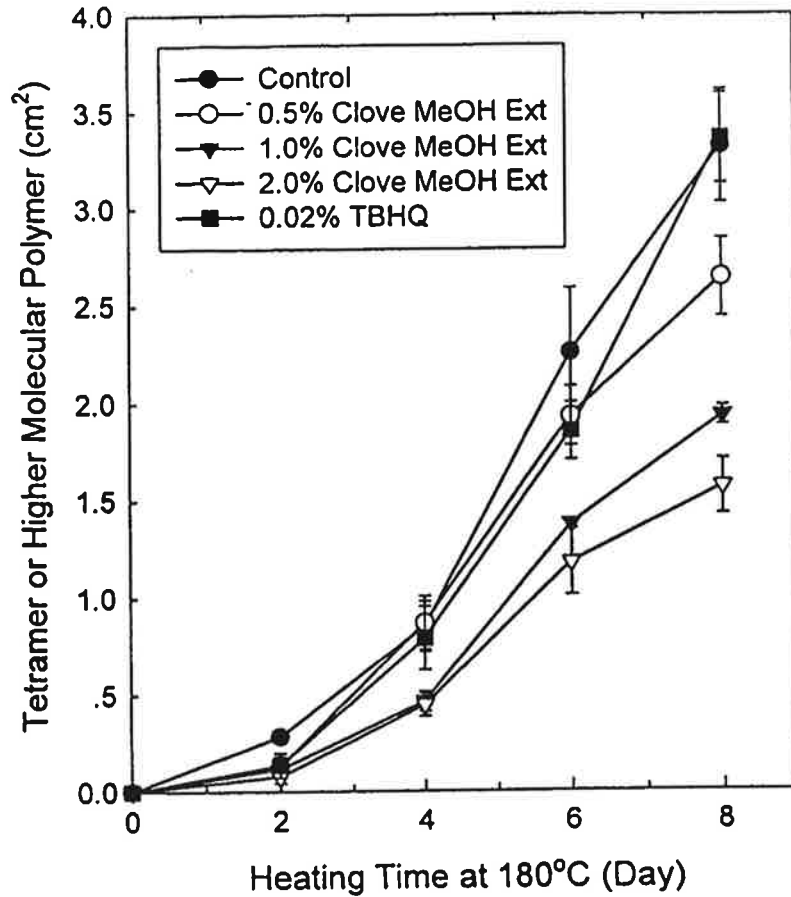


Fig. 11-3. Effects of 0.5, 1.0, 2.0% clove methanol extract and 0.02% TBHQ on polymer (tetramer or higher molecular weight) formation in cottonseed oil during heating at 180°C.

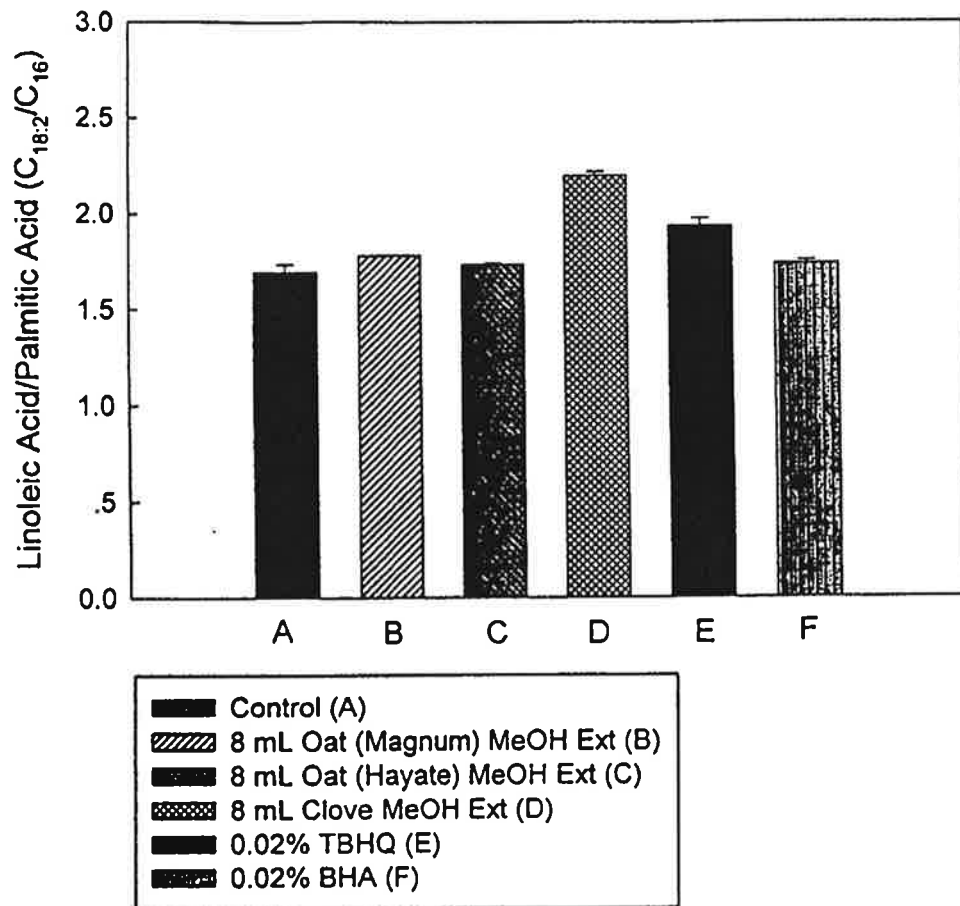


Fig. 11-4. Effects of 8 mL clove methanol extract and oat methanol extracts, 0.02% TBHQ and 0.02% BHA on the values of linoleic acid/palmitic acid in cottonseed oil during heating at 180°C.

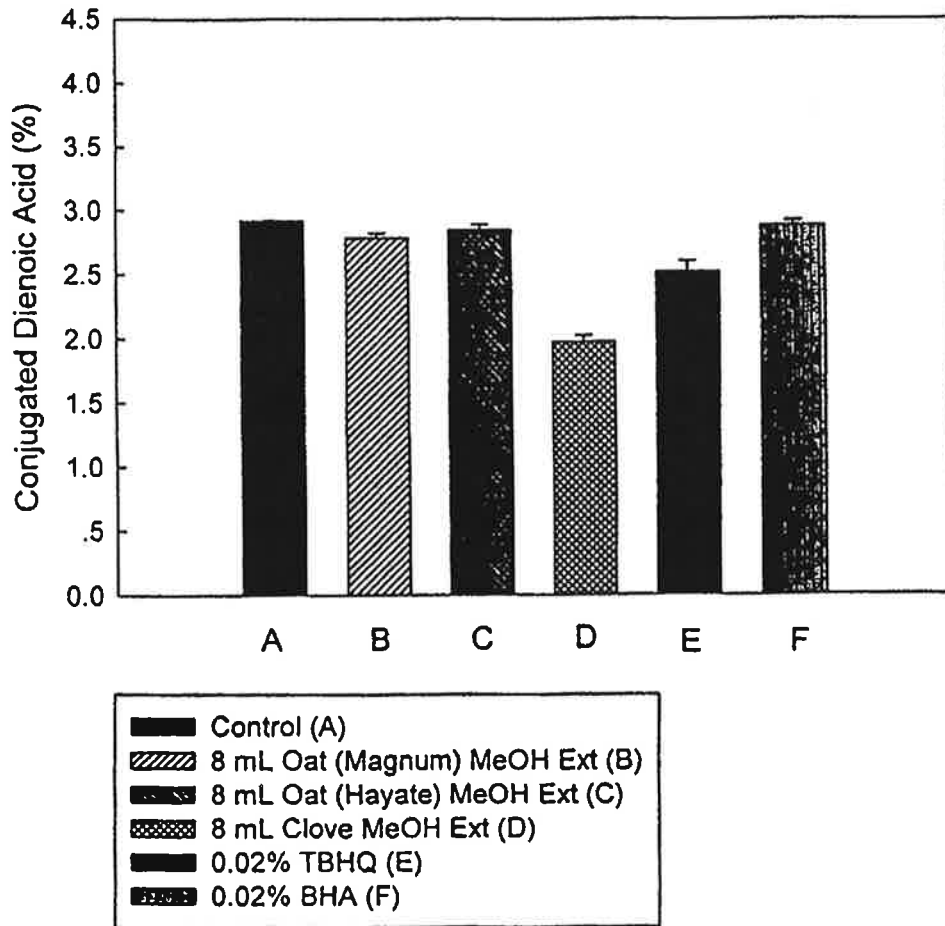


Fig. 11-5. Effects of 8 mL clove methanol extract and oat methanol extracts, 0.02% TBHQ and 0.02% BHA on conjugated diene formation in cottonseed oil during heating at 180°C.

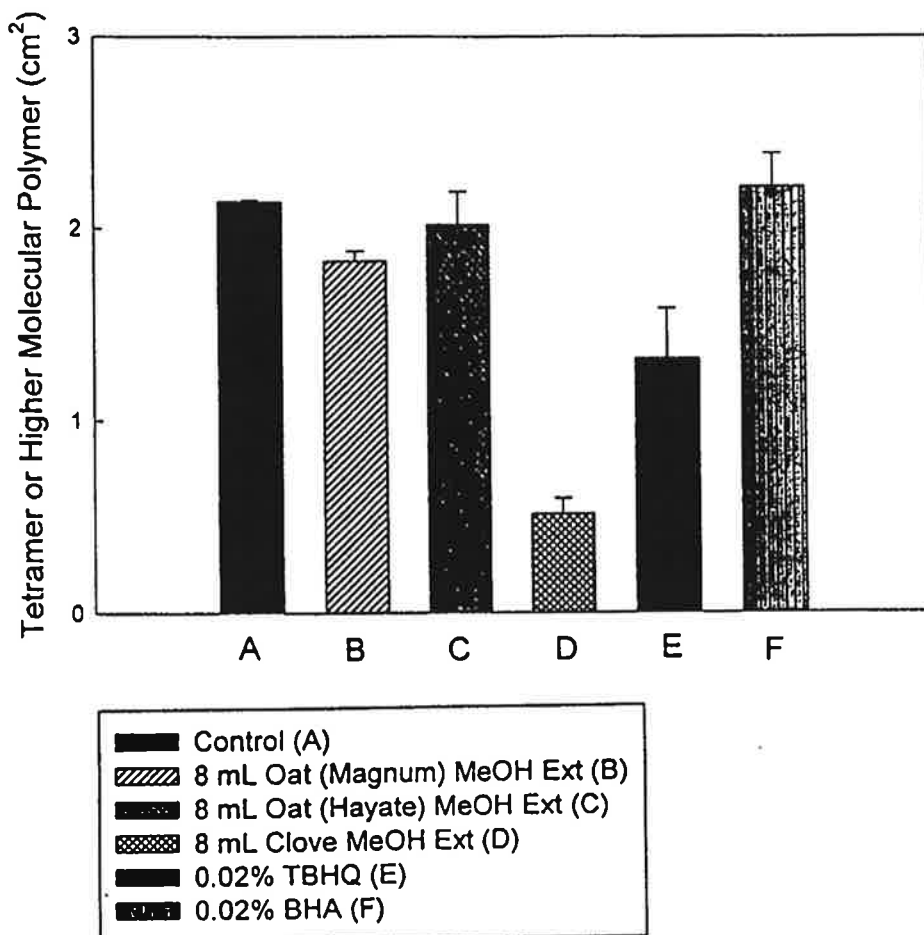


Fig. 11-6. Effects of 8 mL clove methanol extract and oat methanol extracts, 0.02% TBHQ and 0.02% BHA on polymer (tetramer or higher molecular weight) formation in cottonseed oil during heating at 180°C.

4. 정향 메탄올 용매별 분획물(liquid-liquid partitioning)의 가열산화억제효과

정향의 메탄올 추출물을 용매별로 분획하여 이분획물(ethyl ether 분획물, ethyl acetate 분획물, butanol분획물)들의 면실유의 가열산화억제력을 실험하였다. (Figs 11-7, 8, 9) 실험한 결과 모든 분획중 ethyl acetate분획물은 linoleic acid파괴 억제력, conjugated diene 생성 억제, 및 중합체 생성 억제력이 모두 뛰어 났으나, ethyl ether 분획물의 경우는 특이하게 중합체 생성만을 억제하는 양상을 보였다. 이러한 결과는 대두유를 이용한 가열산화실험에서도 동일하게 나타났다. (data not shown) 가열산화 억제력이 강한 ethyl acetate분획물의 정량적 가열산화억제력을 연구하기 위하여, ethyl acetate 분획의 양을 0.1, 0.4, 0.8% 처리한 면실유를 180°C에서 8일간 가열처리하면서 linoleic acid파괴, conjugated diene생성, 및 중합체생성을 관찰하였다. 이 결과 ethyl acetate 분획물의 처리량을 정량적으로 증가 시킴에 따라서, 이러한 산화지표들의 변화를 억제하는 효과가 증가 하였다. (data not shown)

5. 정향 메탄올 추출물의 ethyl acetate 분획의 column chromatography를 이용한 1차 분획

정향의 메탄올 추출물중 ethyl acetate 분획 0.1g을 Sepadex LH20 17g을 충전한 glass column (1.8x30 cm)에 100% methanol을 elution하여서 6개의 분획물 (F1-1, F1-2, F1-3, F1-4, F1-5, F1-6)을 얻었다. 그리고 이들 각각의 분획물들을 면실유에 처리한후 8시간 180°C에서 연속 가열 한후 linoleic acid파괴억제, conjugated diene생성 억제력, 중합체 생성 억제력을 측정하였다. 5개의 분획물중 F1-2분획물이 가장 강력한 linoleic acid파괴 억제력, conjugated diene 생성억제력, 중합체 생성 억제력이

있음을 확인하였다. (Fig 11-10, 11, 12) 대조구 (무처리구)는 8시간 가열후 면실유의 $C_{18:2}/C_{16:0}$ 값이 1.53 이었으나, F1-2 처리구의 경우 그 값이 2.13이었다. 또한 8시간 가열후 대조구(면실유)의 conjugated diene함량은 3.17% 이었으나, F1-2 처리구의 conjugated diene함량은 2.13이었다. 대조구의 5 중합 이상의 중합체 함량은 3.07 (peak area, cm^2)인데 반하여, FA1-1 분획물처리구의 중합체 생성량은 1.34이었다. 이 F1-2를 대두유에 첨가시 면실유에 처리한것과 유사한 가열산화억제력이 있는지 알아보기 위하여, FA1-1을 대두유에 첨가한후 180°C로 8 시간 연속가열 한후, linoleic acid 파괴 억제력, conjugated diene생성 억제력, 중합체 생성 억제력을 측정하였다 (data not shown). 이 결과 F1-2이 면실유 뿐만아니라 대두유의 경우도, conjugated diene생성, linoleic acid파괴, 중합체 생성을 매우 효과적으로 억제한다는 사실도 확인하였다.

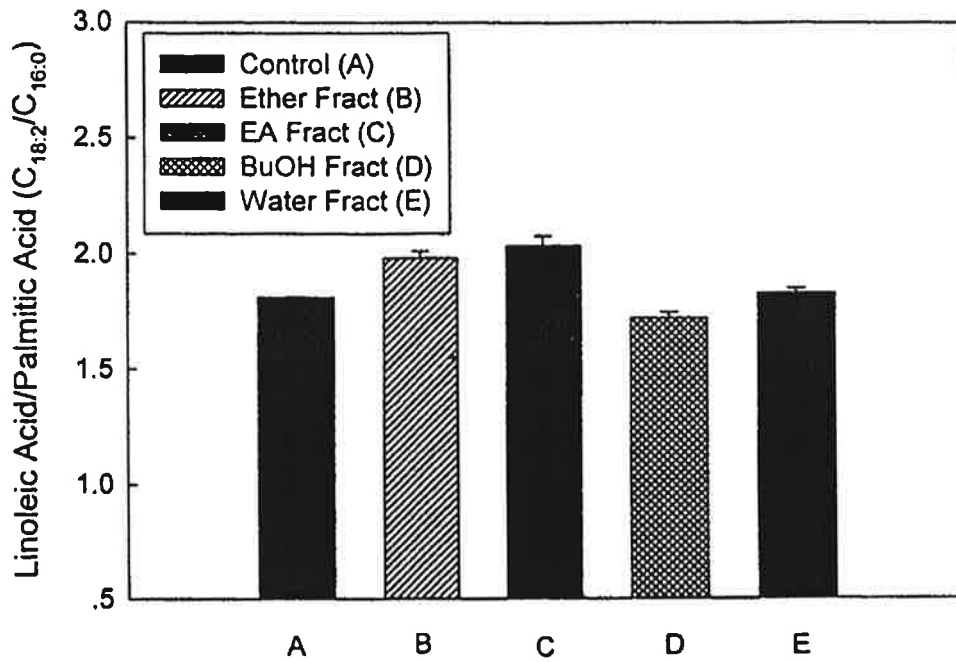


Fig. 11-7. Effects of ether, ethyl acetate, butanol and water fractions of clove methnolic extract on the values of linoleic acid/palmitic acid in cottonseed oil during heating at 180°C.

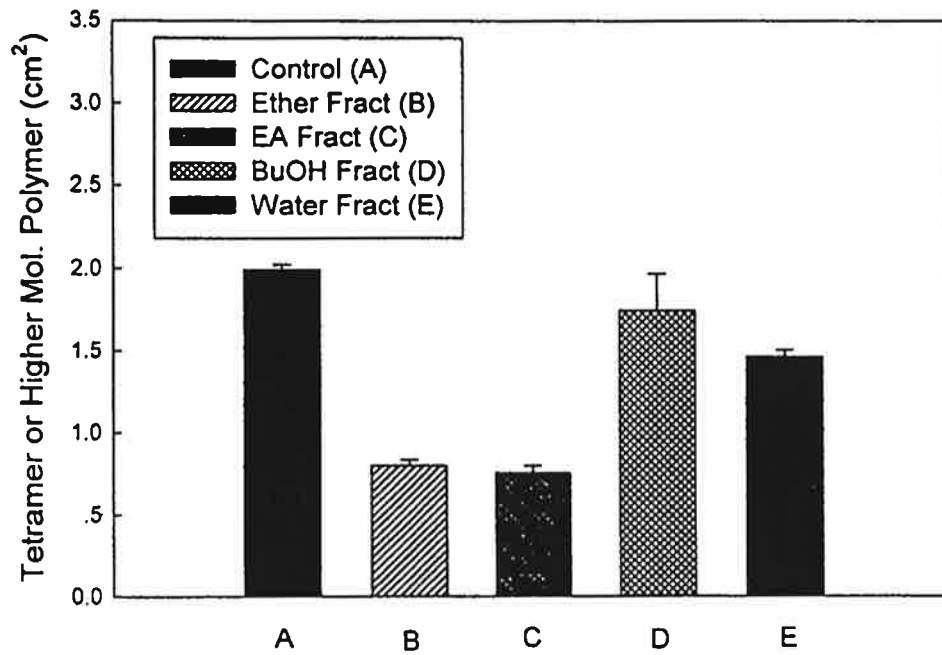


Fig. 11-8. Effects of ether, ethyl acetate, butanol and water fractions of clove methanolic extract on the conjugated diene formation in cottonseed oil during heating at 180°C.

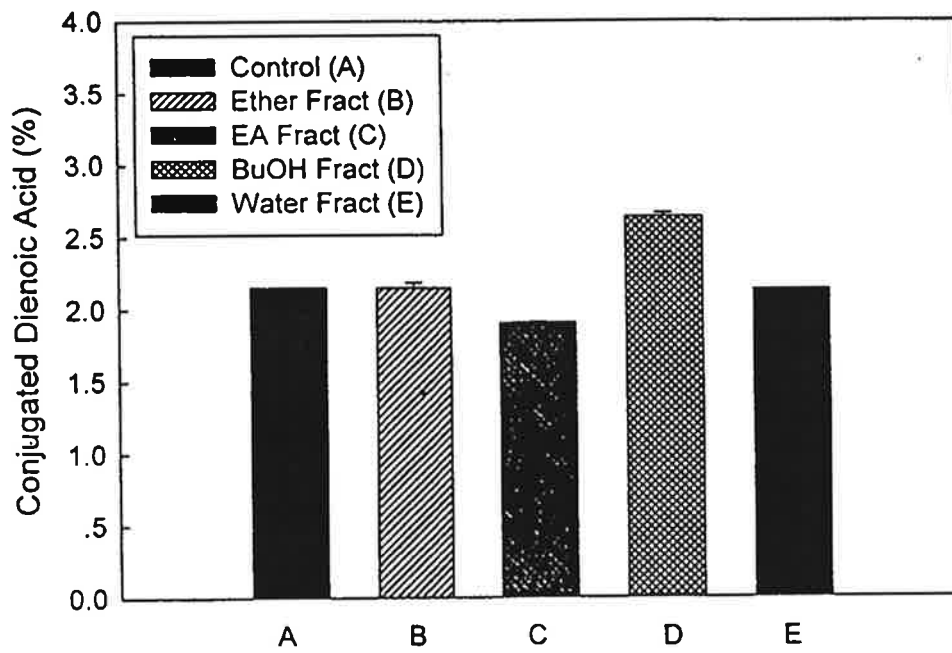


Fig. 11-9. Effects of ether, ethyl acetate, butanol and water fractions of clove methnolic extract on the polymer (tetramer or higher molecular weight) in cottonseed oil during heating at 180°C.

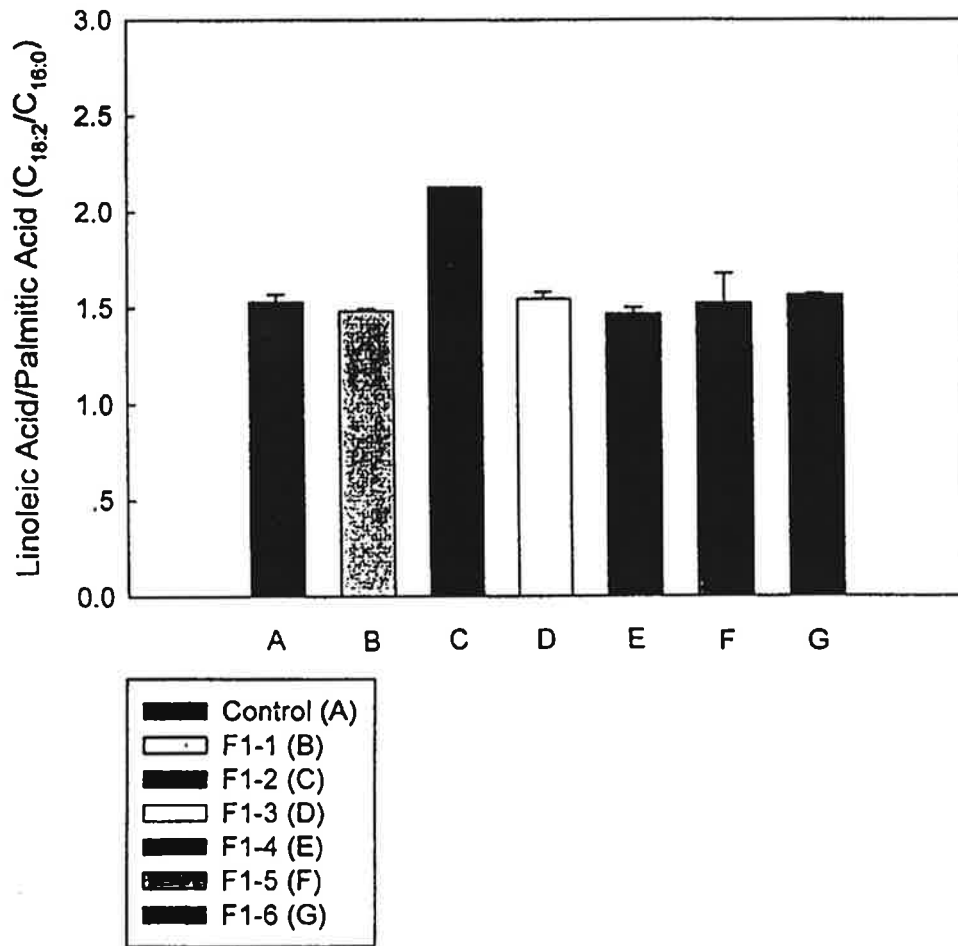


Fig. 11-10. Effects of fractions obtained from 1st column chromatography on the values of linoleic acid/palmitic acid in cottonseed oil during heating at 180°C.

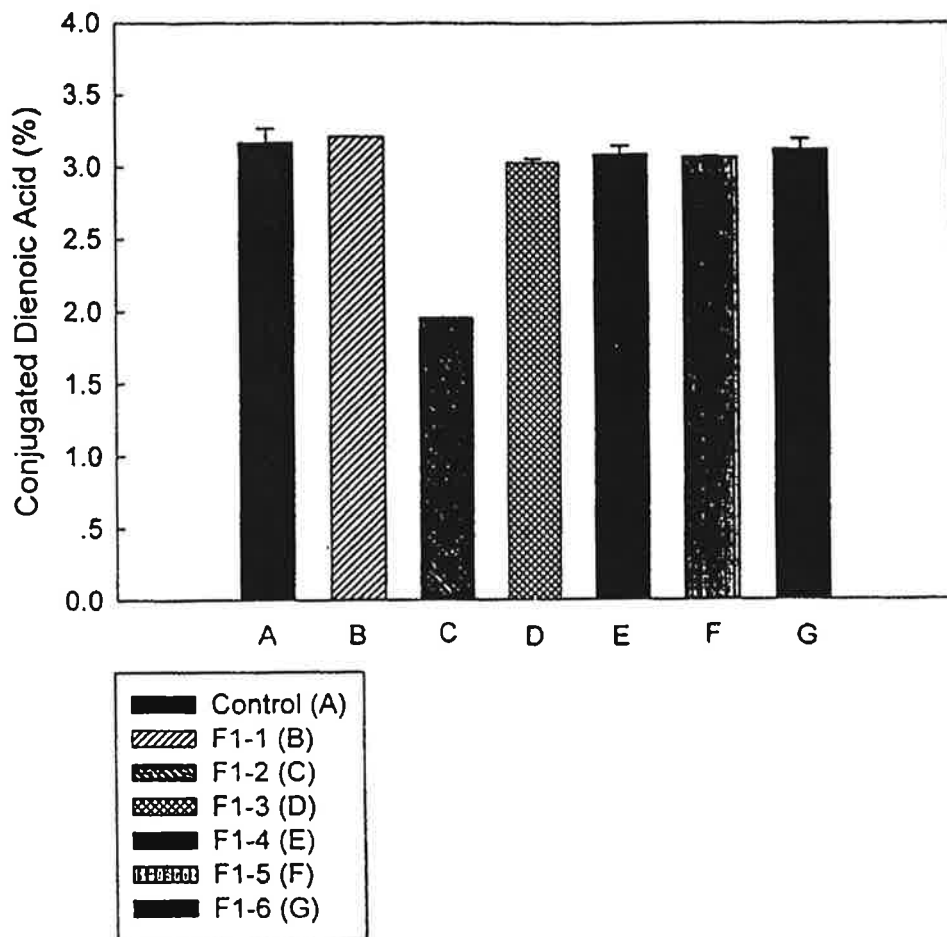


Fig. 11-11. Effects of fractions obtained from 1st column chromatography on the conjugated diene formation in cottonseed oil during heating at 180°C.

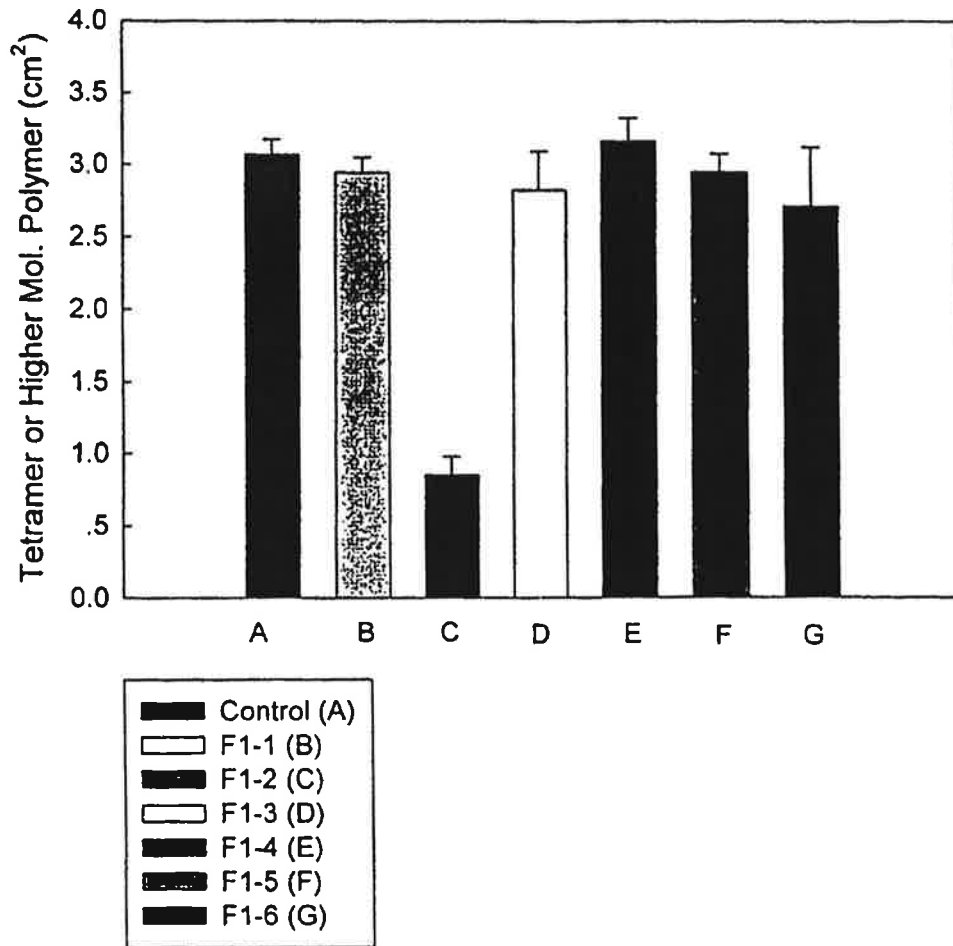


Fig. 11-12. Effects of fractions obtained from 1st column chromatography on the polymer (tetramer or higher molecular weight) in cottonseed oil during heating at 180°C.

6. 이차 column chromatoghy 분획

일차 column chromatography에 의한 분획물 6개중 가장 강력한 가열 산화 억제력을 갖고 있는 F1-2을 110g의 Sepadex LH20를 충전한 glass column (2.3 x 50 cm)를 통하여 70% 메탄올 (methanol: water, 7:3)으로 elution하여 5개의 분획물 (F2-1, F2-2, F2-3, F2-4)을 얻었다.

삼차 column chromatography에 의해 얻어진 활성이 강한 분획물 FB1-2를, 다시 110g의 Sepadex LH20를 충전한 glass column (2.2. x 100 cm)를 통하여 70% 메탄올(methanol: water, 7:3)으로 elution하여 4개의 분획물 (FB2-1, FB2-2, FB2-3, FB2-4)을 얻었다. 이들 분획물들을 면실유에 처리하여 180°C에서 8시간 연속가열 시키고, linoleic acid파괴, conjugated diene생성, 및 중합체 생성억제능력을 측정하였다. 이들 분획물중 F2-2분획만이 linoleic acid파괴, conjugated diene, 및 중합체 생성을 억제하였고, 그밖의 분획물들은 전혀 그 활성을 나타내지 않았다. (Fig. 11-13, 14, 15) 대조구, F2-1, F2-2, F2-3, F2-4를 처리한 경우, conjugated diene의 생성은 2.93, 3.33, 2.15, 2.92 및 3.33 %이었다. 대조구, F2-1, F2-2, F2-3, F2-4를 처리한 경우, 오중합도 이상의 중합도를 갖는 중합체 (peak 4)의 생성은 3.19, 5.82, 1.68, 3.14 및 4.42(peak area, cm²)이었다.

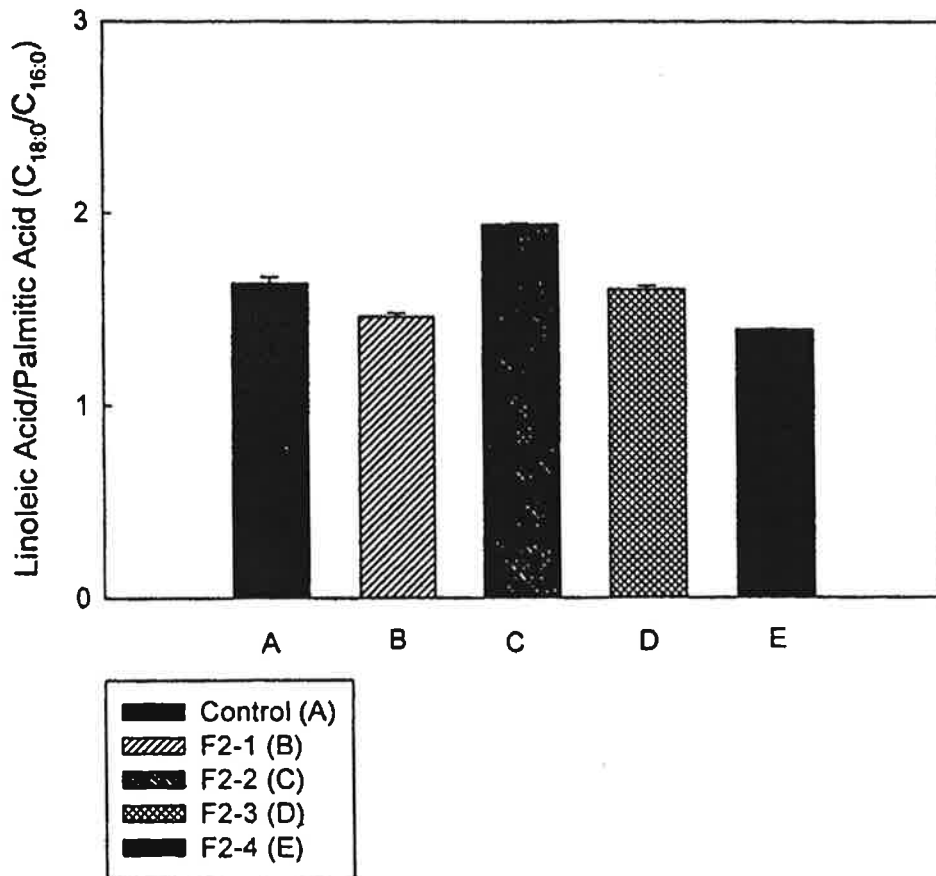


Fig. 11-13. Effects of fractions obtained from 2st column chromatography on the values of linoleic acid/palmitic acid in cottonseed oil during heating at 180°C.

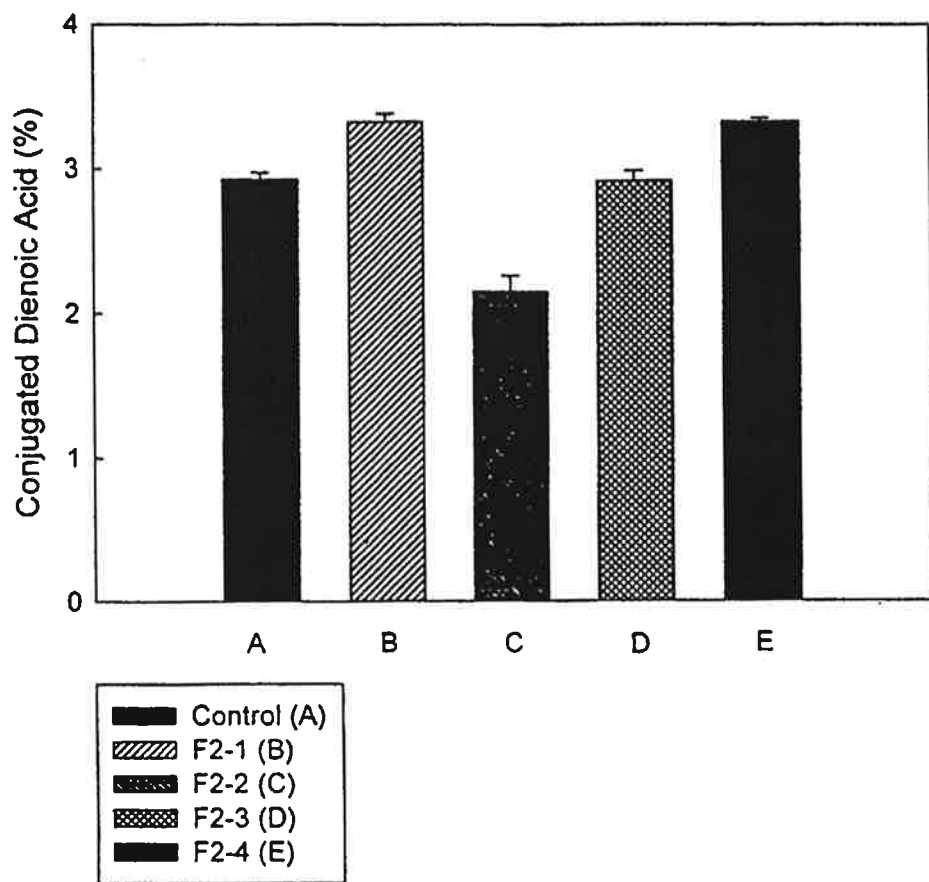


Fig. 11-14. Effects of fractions obtained from 2st column chromatography on the conjugated diene formation in cottonseed oil during heating at 180°C.

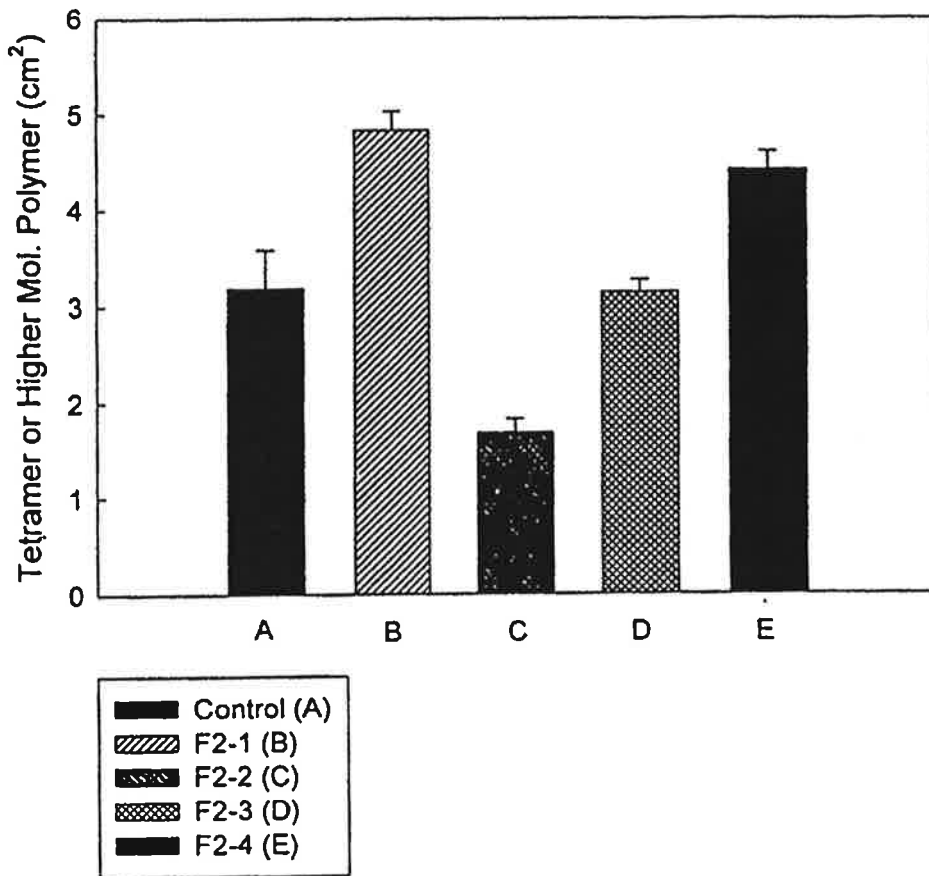


Fig. 11-15. Effects of fractions obtained from 2st column chromatography on the polymer (tetramer or higher molecular weight) in cottonseed oil during heating at 180°C.

7. ODS TLC를 이용한 분획

사차 chromatography에 의하여 분획된 분획물중 강력한 활성을 나타내는 F2-2를, ODS TLC를 이용하여 2두개의 분획 (FT1-1, FT1-2)를 얻었다 (전개용액 40% 메탄올). F3-1 및 F3-2의 Rf치는 각각 0.46 및 0.65이었다. 이들 분획물을 ^1H NMR 및 ^{13}C NMR을 이용하여 동정한 결과 F3-1는 mixture 인 것으로 사료되며, FT1-2는 gallic acid임을 확인하였다. (Fig 11-16, 17)

8. Gallic acid의 가열산화실험

대두유를 180°C에서 1일 7시간씩 6일간 가열한 결과 대두유의 지방산 조성이 현격히 바뀌었다. 가열처리전 대두유의 지방산 조성은 11.29% palmitic acid, 3.94% stearic acid, 21.68% oleic acid, 56.09% linoleic acid, 및 7.01% linolenic acid로 구성되어 있었으나, 6일 간 가열후 대두유의 지방산 조성은 15.54% palmitic acid, 5.49% stearic acid, 26.97% oleic acid, 47.94% linoleic acid, 및 4.07% linolenic acid이었다. 그러나 gallic acid를 첨가한 시료에서는 180°C 가열 저장중에 지방산조성의 변화를 상당히 억제하였다. gallic acid의 지방산조성변화억제 효과는 gallic acid의 산화억제력에 기인하며, 이들의 효과는 0.02%에서 0.1%로 농도를 증가할수록 증가하였다. 가열산화 척도중의 하나인 linoleic acid와 palmitic acid의 비율($C_{18:2}/C_{16:0}$)이 가열처리 전의 대두유는 4.97에서 6일 간 가열후 대조구의 경우 3.08로 감소하였으나, 0.02, 0.05 및 0.1% gallic acid처리시료들은 각각 3.17, 3.54 및 3.82이었다. (data not shown) Conjugated diene 함량도 가열 시간의 증가에 따라서 증가하였으며 6일후 대조구의 conjugated diene 함량은 3.6 % 이었다. 이러한 conjugated diene함량의 증가도 gallic acid를 첨가한 경우

어느정도 억제하였다. Gallic acid 를 0.02, 0.05 및 0.1% 함유한 처리구에서는 conjugated diene 함량이 3.5, 3.1, 2.7%이었다. Gallic acid의 첨가는 180°C 가열 처리시 대두유에서 polymer의 생성도 현격히 억제하였다. 오중합 및 그이상의 중합도를 갖는 중합체의 함량이 180°C에서 6일간 저장 후 0에서 4.56(cm², peak area)로 증가하였으나, gallic acid를 0.02, 0.05 및 0.1% 처리한 시험구에서는 각각 4.32, 3.03, 2.27 (cm², peak area)이었다. (data not shown) 이상의 결과에서 gallic acid는 대두유의 180°C 가열 처리중 강력한 가열산화억제력을 함유하는 것으로 확인되었다.

1H spectrum of D1

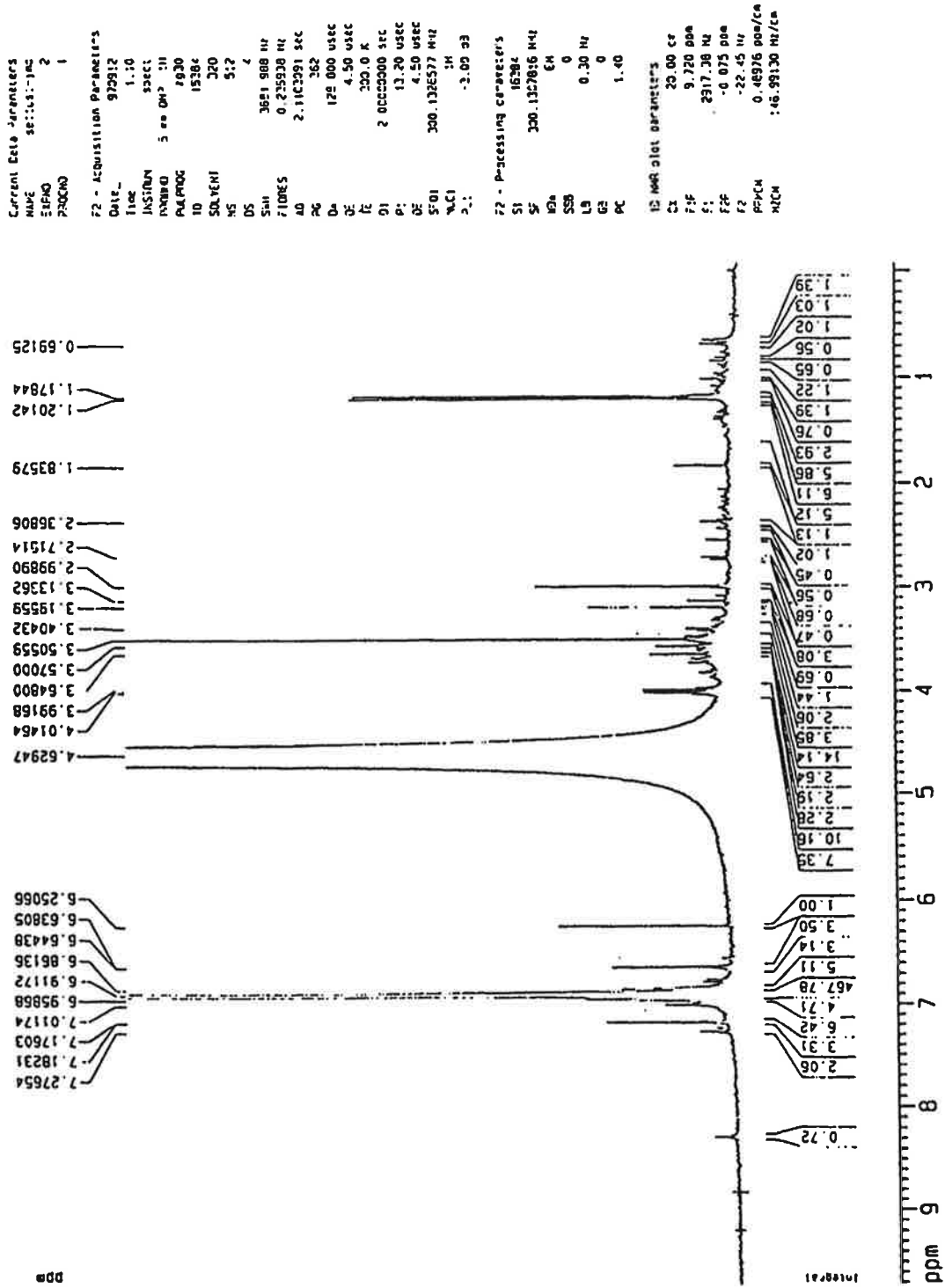


Fig. 11-16. 1H NMR spectrum for F3-2 fraction obtained after TLC

13C spectrum of D1

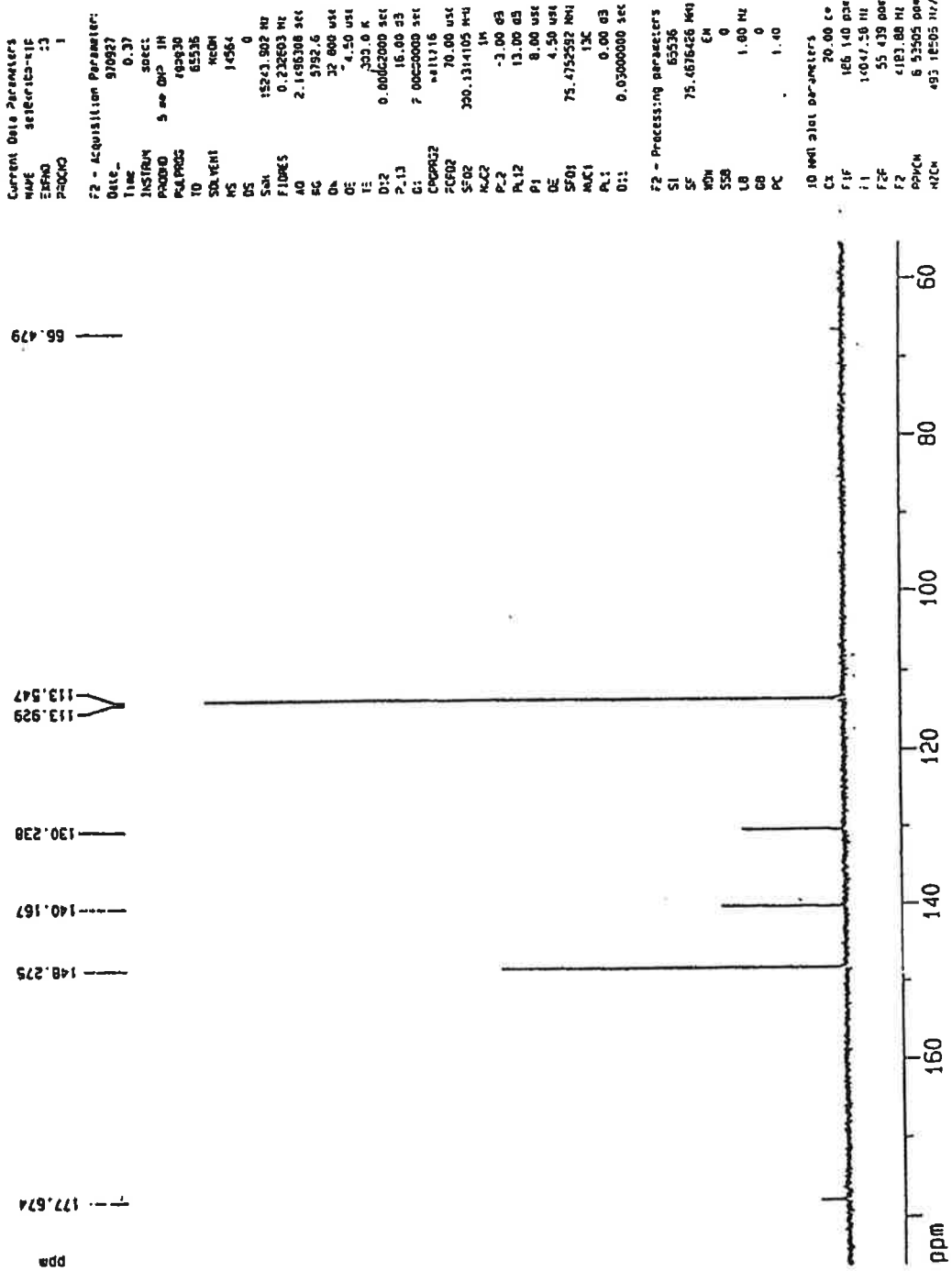


Fig. 11-17. 13C NMR spectrum for F3-2 fraction obtained after TLC

면실유는 40g을 50 mL-capacity beaker에서 1일 7시간 씩 8일간 180°C에서 가열저장 하였다. 가열저장중 면실유의 지방산중 불포화도가 높은 linoleic acid의 파괴가 상대적으로 많이 일어나, 지방산 조성이 바뀌었다. 가열처리전에 linoleic acid와 palmitic acid의 비율 ($C_{18:2}/C_{16:0}$)이 2.43에서 8일간 가열처리후 1.38로 감소하였다. (Fig. 11-18) Gallic acid를 0.02, 0.05 및 0.1% 처리한 면실유에서는 $C_{18:2}/C_{16:0}$ 값이 각각 1.44, 1.57 및 1.81이었다. 이는 gallic acid가 면실유의 가열처리시 linoleic acid을 파괴를 억제하는 능력이 있으며, 그 억제력은 gallic acid의 농도가 증가할수록 증가한다는 것을 의미한다. 면실유의 가열시 conjugated diene의 함량이 증가하여 무처리 대조구의 경우 8일간 저장후 그 값이 3.2이었으나, 0.02, 0.05, 및 0.1% gallic acid를 첨가한 경우 conjugated diene 함량의 증가가 무처리 대조구에 비하여 현저히 낮았다. 또한 중합체 생성도 가열시간이 증가할수록 증가하는 경향을 나타내었는데, gallic acid의 첨가는 면실유의 중합체생성을 현격히 감소시켰다. (Fig 11-19) 면실유를 180°C에서 8일간 가열하였을 때 오중합 및 그이상의 중합도를 나타내는 중합체의 함량은 4.01 (cm^2 , peak area)를 나타내었으나, gallic acid 0.02, 0.05 및 0.1% 를 처리한 시험구에서는 각각 3.46, 2.37 및 1.91이었다. (Fig 11-20)

옥배유의 가열산화 옥배유를 180°C에서 8일간 가열할 경우 옥배유 중의 linoleic acid등의 지방산 파괴가 일어나서 지방산 조성이 변화되었다. 그러나 옥배유의 경우는 대두유나 면실유에 비하여 지방산 조성의 변화정도가 적은 편이었다. Linoleic acid와 palmitic acid의 비율 ($C_{18:2}/C_{16:0}$)이 가열전 5.40에서 8일간 가열후 대조구 (무처리)의 경우 3.04로 감소하였으나, 0.02, 0.05 및 0.1% gallic acid의 처리구에서는 $C_{18:2}/C_{16:0}$ 값이 각각 3.31, 3.62, 3.93이었다. (data not shown) 이 결과는 gallic acid의 처리가 옥배유의 가열처리에 의한 linoleic acid의 파괴를 현격히 억제하는 효과가 있음을 의미한다. Conjugated diene의 함량은 가

열 처리에 의하여 증가되어 가열전 0.25% 에서 8일간 가열후 4.53%으로 증가하였다. 그러나 gallic acid를 처리한 시험구에서는 conjugated diene의 함량을 현저히 감소시키는 경향을 나타내었으며, 그 감소효과는 gallic acid의 처리농도가 증가할수록 증가하였다. Gallic acid 0.02, 0.05 및 0.1% 처리구의 conjugated diene 함량은 각각 3.8, 2.9, 및 2.3이었다 (data not shown). Gallic acid는 중합체의 생성도 효과적으로 억제하였다. 옥배유를 8일간 가열한 대조구, 0.02%, 0.05% 및 0.1% gallic acid처리구의 오중합 및 그이상의 중합도를 갖는 중합체의 생성량은 각각 4.53, 3.76, 2.90 및 2.32 (cm², peak area)이었다. (data not shown)

이상의 결과에서와 같이 정향추출물에서 분리동정한 gallic acid는 대두유, 면실유 및 옥배유에서 모두 180°C 가열산화시 linoleic acid 파괴억제, conjugated diene 생성억제 및 중합체생성억제효과를 갖는 것으로 확인되었다.

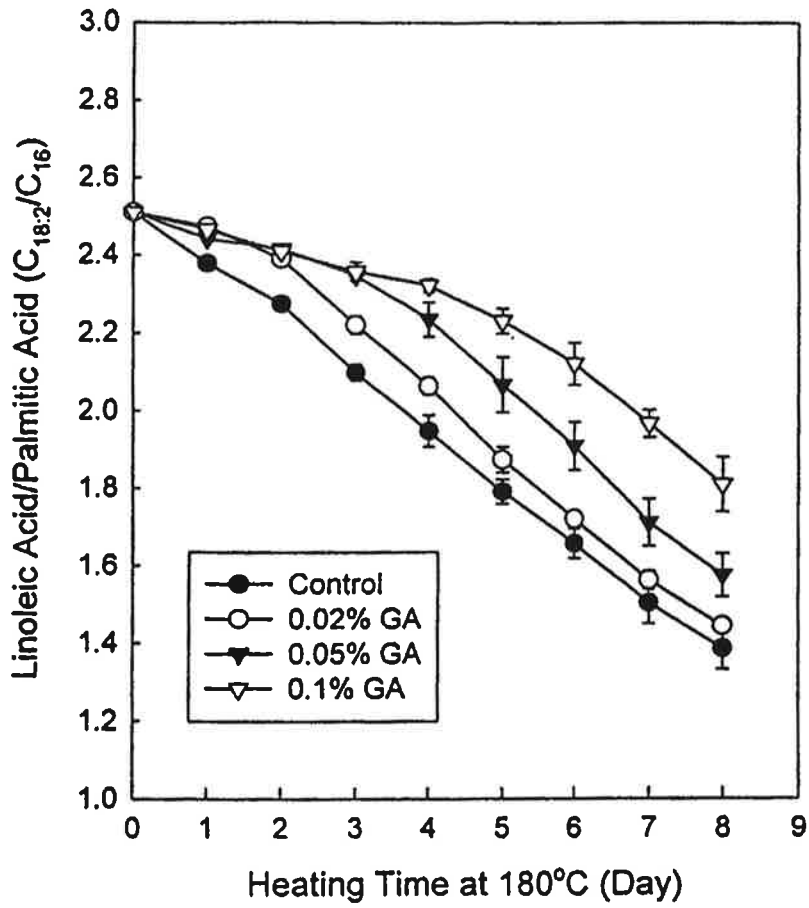


Fig. 11-18. Effects of 0.02, 0.05, 1.0% gallic acid on the values of linoleic acid/palmitic acid in cottonseed oil during heating at 180°C.

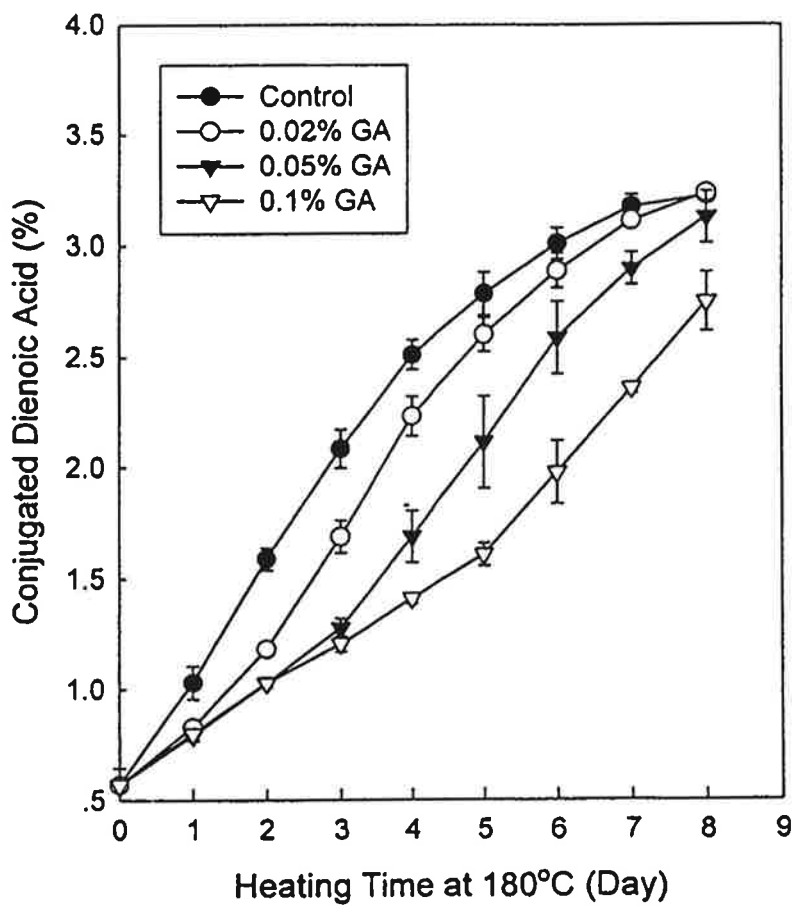


Fig. 11-19. Effects of 0.02, 0.05, 1.0% gallic acid on the conjugated diene formation in collnseed oil during heating at 180°C.

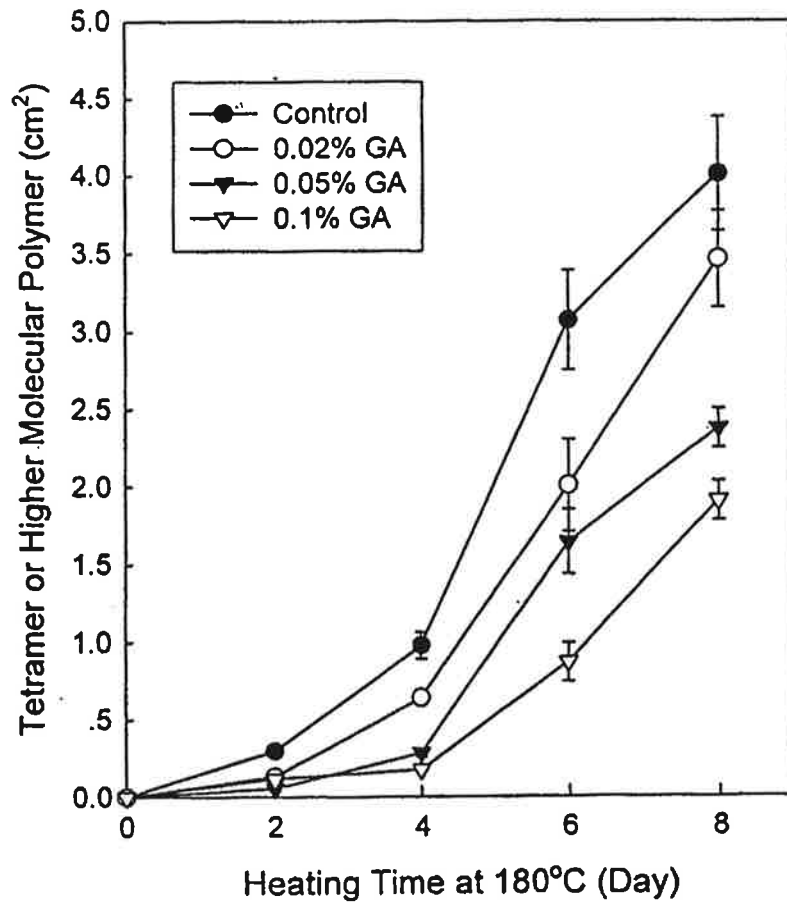


Fig. 11-20. Effects of 0.02, 0.05, 1.0% gallic acid on the polymer (tetramer or higher molecular weight) in cottonseed oil during heating at 180°C.

Gallic acid (0.05%)처리구와 0.02% TBHQ, 및 0.02% BHA의 처리가 면실유 가열산화에 미치는 영향을 연구하였다 (Fig. 11-21, 22, 23). 이때 0.05% gallic acid의 처리가 linoleic acid파괴, conjugated diene생성 및 polymer생성을 보다 효과적으로 억제하였다. 이러한 일련의 결과에 의하면 정향의 고온 가열산화억제력은 주로 gallic acid에 기인하고, 기타 발견되지 않은 항산화제가 의한다고 결론지어진다. 특히 추정되는 화합물중 terminal 탄소에 이중결합을 함유하고 있는eugenol이 정향의 고온가열산화 억제효과를 나타낼 것으로 사료된다.

9. 정향메탄올 추출물이 튀김공정중의 유지의 산화에 미치는 효과(응용연구)

정향메탄올 추출물이 유지의 고온가열중에 강력한 항산화력이 있다는 것과, 이 추출물의 항산화력은 주로 gallic acid에 의한다는 사실을 이번 연구를 통해서 밝혀진바 있기 때문에, 이러한 정향메탄올 추출물이 고온가열처리공정중에 실제 응용될 수 있는지를 알아보기 위하여 면실유와 옥배유를 가열매체로 한 감자튀김실험을 실시하였다.

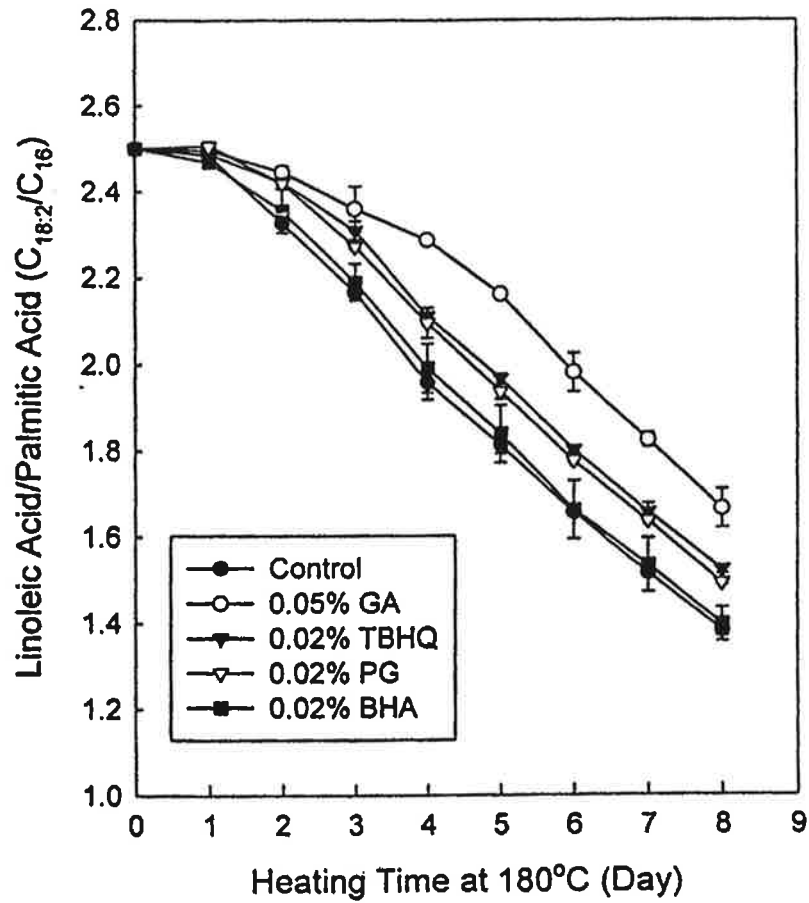


Fig. 11-21. Effects of 0.05% gallic acid, 0.02% TBHQ, 0.02% propyl gallate, 0.02% BHA on the values of linoleic acid/palmitic acid in cottonseed oil during heating at 180°C.

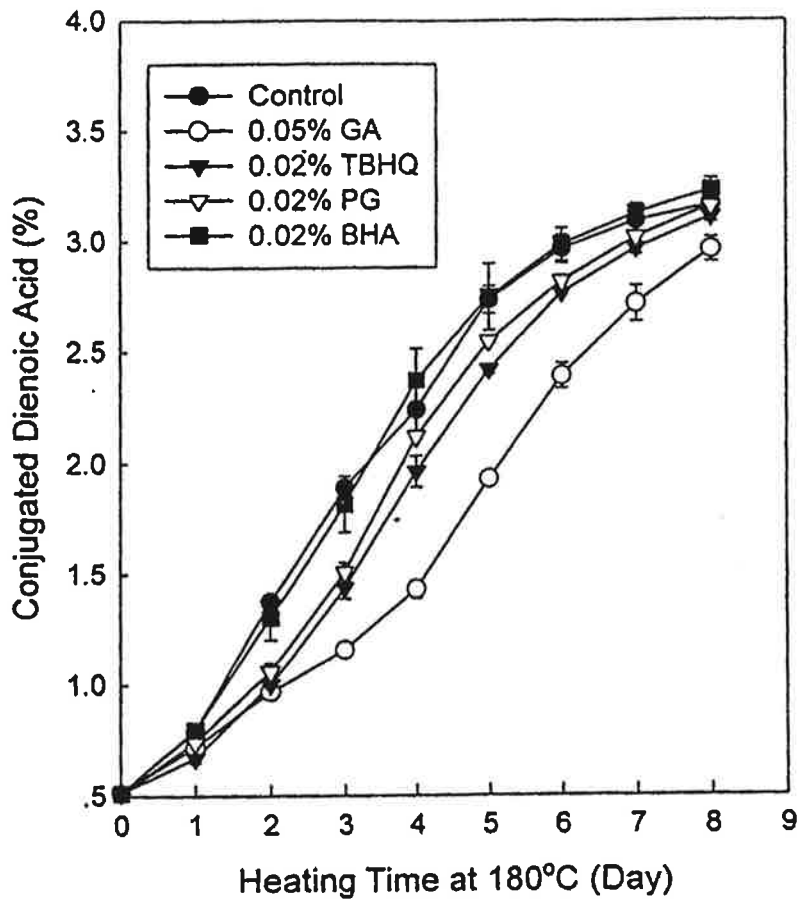


Fig. 11-22. Effects of 0.05% gallic acid, 0.02% TBHQ, 0.02% propyl gallate, 0.02% BHA on the conjugated diene formation in cottonseed oil during heating at 180°C.

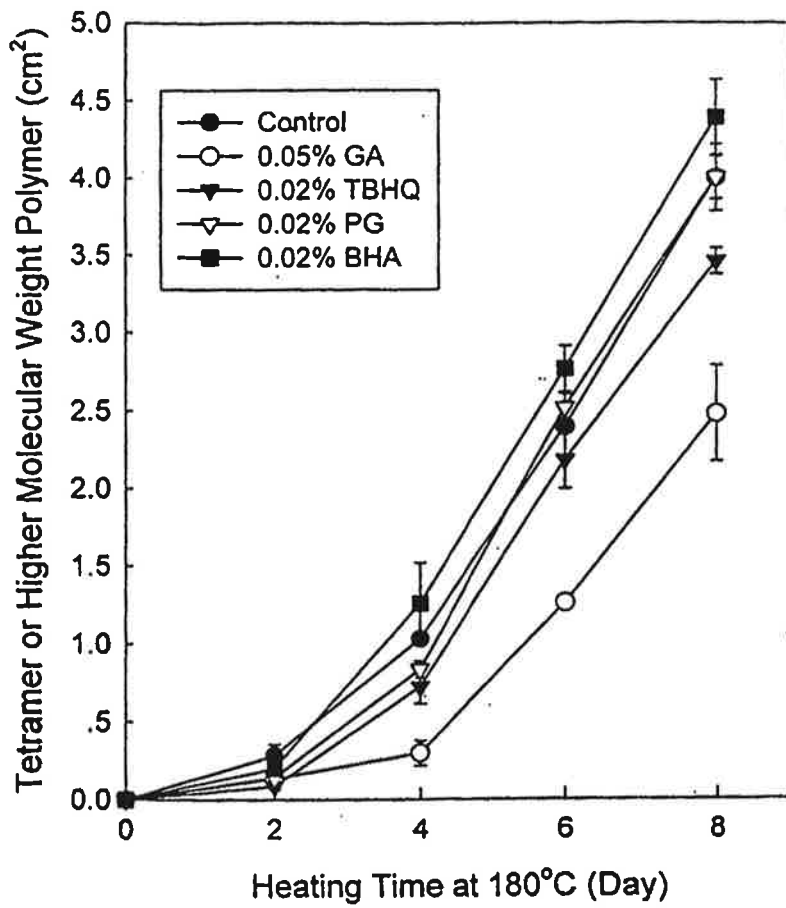


Fig. 11-23. Effects of 0.05% gallic acid, 0.02% TBHQ, 0.02% propyl gallate, 0.02% BHA on the polymer (tetramer or higher molecular weight) in cottonseed oil during heating at 180°C.

면실유를 이용하여 감자편(1회 100g씩, 1일 6회)을 1일 7시간씩 5일간 튀김을 실시한 결과, 정향메탄올 추출물 (0.1%, w/w)처리구의 경우가 무처리구에 비하여 linoleic acid파괴, conjugated diene 생성 및 중합체 생성을 모두 효과적으로 억제하였다 (Fig. 11-24, 25, 26). 튀김을 행하기 전에 면실유의 $C_{18:2}/C_{16:0}$ 값은 2.26이었으나, 5일 튀김후에 1.0% 정향메탄올 추출물처리구 와 무처리구의 그값은 1.79와 1.66이었다. (Fig 11-24) 즉 이결과는 1.0% 정향메탄올추출물이 5일간의 튀김과정중 $C_{18:2}/C_{16:0}$ 값의 변화를 약 22%억제하는 효과를 갖고 있음을 나타낸 것이다. 또한 5일간 튀김중의 면실유의 Conjugated diene함량은 0.57%에서 2.23%로증가 하였으나, 1.0% 정향메탄올추출물 첨가구에서는 0.57%에서 2.04%로 증가하여, 정향메탄올 추출물이 conjugated diene생성도 약 11.4% 억제하였다 (Fig 11-25). 그리고 정향추출물은 중합체 (4중합 및 그이상의 분자량을갖는 중합체)의 생성도 억제하였으며, 5일간 튀김후에는 중합체 생성을 20.9%억제하는 효과를 보였다. (Fig 11-26)

옥배유를 이용하여 위의 실험과 동일한 조건으로 5일간 튀김을 실시하여 튀김중 linoleic acid파괴, conjugated dienoic acid 생성 및 polymer생성을 측정하였다. 이 결과는 1% 정향메탄올 추출물이 linoleic acid파괴 및 conjugated diene생성을 억제하는 정도는 면실유의 경우와 매우 유사하였으나 (data not shown), polymer 생성억제력은 매우 뛰어난 것으로 나타났다. Fig. 11-27에서 보는 바와 같이 1% 정향메탄올추출물이 5일간 감자편을 튀김을 행한 후에 옥배유중의 polymer생성억제력은 52.2%에 달하였다. 이 결과는 정향메탄올추출물이 강력한 중합체생성억제력을 갖고 있다는 사실을 밝혀낸 것이어서 추후 여러 가지 고온가열가공식품에 그 응용이 가능할 것으로 사료된다.

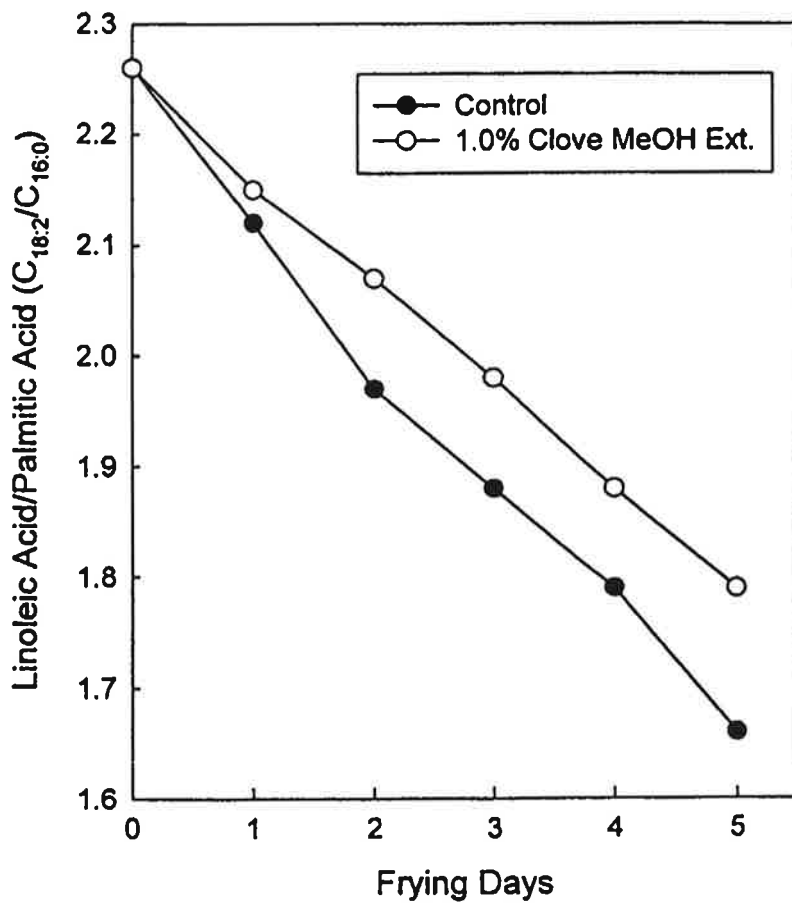


Fig. 11-24. Effects of 1.0% clove methanolic extract on the values of linoleic acid/palmitic acid in cottonseed oil during frying fresh fries for 5 days at 180°C.

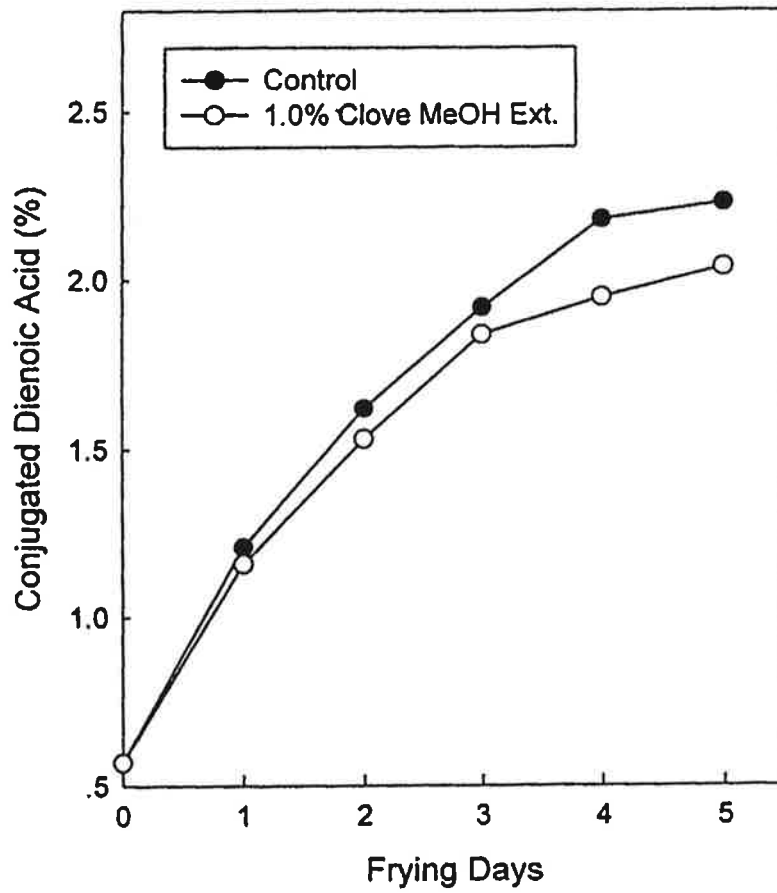


Fig. 11-25. Effects of 1.0% clove methanolic extract on the conjugated diene formation in cottonseed oil during frying french fries for 5 days at 180°C.

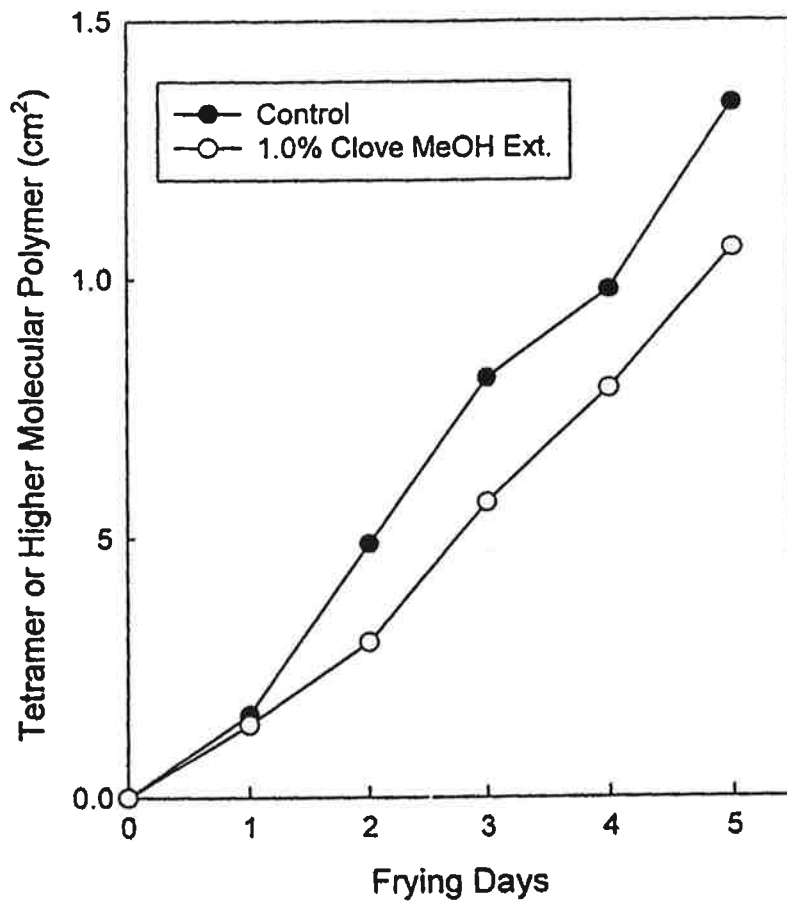


Fig. 11-26. Effects of 1.0% clove methanolic extract on the polymer (tetramer or higher molecular weight) in cottonseed oil during frying frenching fries for 5 days at 180°C.

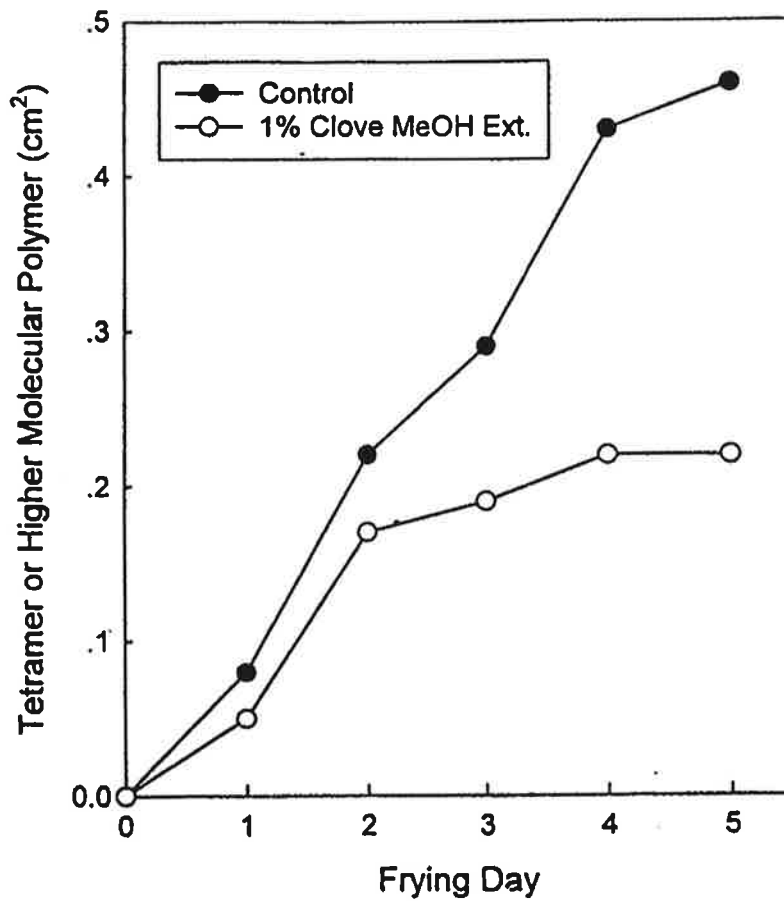


Fig. 11-27. Effects of 1.0% clove methanolic extract on the polymer (tetramer or higher molecular weight) in corn oil during frying frenching fries for 5 days at 180°C.

제 12 절. 고광도 광산화조건에서 유지의 산화를 억제하는 물질의 탐색 및 개발

1. methylene blue를 광감체로한 리놀레산의 광산화에서 생약메탄올추출물의 항산화 억제력 탐색

Methylene blue는 광조사시 일중항산소를 효과적으로 생성하는 물질로 알려져있는데, 이 실험에서 methylene blue는 linoleic acid의 광산화를 현격히 증가시켰다. 실험에서 사용된 47종의 메탄올 추출물중 10종(No. 14, 19, 22, 24, 26, 31, 36, 37, 41 및 45)들이 30%이상의 광산화억제력을 나타내었다 (**, *** or ****) (Table 13). 이들중 일황련 (*Coptis japonica* Makino, No. 14)와 정향 (*Eungennia Caryopylla* T, No. 19)가 특별히 강력한 광산화억제효과(각각 88.5% 및 81.1%)를 나타내었다.

2. 선발된 10종의 생약추출물의 chlorophyll을 광감체로하는 linoleic acid광산화에 미치는 영향

위의 선발실험에서 얻은 10개 종들의 메탄올 추출물이 chlorophyll을 광감체로하는 linoleic acid의 광산화에서도 산화억제력을 나타내는지 알아보기위하여 실험을 행하였다. (Table 14) 이 실험 결과에 의하면, 정향은 chlorophyll을 광감체로하는 linoleic acid의 광산화를 억제하는 능력이 불과 23%정도에 그쳤다. 이는 이전 methylene blue를 광감체로하는 광산화실험에서 그 항산화력이 81.1%에 달하던 것에 비하면 상당히 적은 것이었다. 그러나 일황련은 chlorophyll을 광감체로하는 linoleic acid의 광산화를 억제력이 80%였다. 이 결과는 황련의 메탄올 추출물의 경우 chlorophyll과 methylene blue를 광감체로하는 두 시스템 모두에서

강력한 광산화 억제력을 갖고 있음을 의미한다. 여러식품중에 chlorophyll은 다양한 농도로 함유되어 있기 때문에 황련의 chlorophyll을 매체로 한 linoleic acid의 광산화를 억제한다는 것은 중요한 의미를 갖고 있다고 볼 수 있다.

Table 13. Antioxidative activity of methanolic extracts of selected plants on the methylene blue sensitized photooxidation of linoleic acid in methanol during 5 hr storage under fluorescent light.

No.	Botanical Name	Plant Part	Activity ¹	PVs/PVc ²
1.	<i>Aectum lappa</i> L	root & seed	-	0.83
2.	<i>Aconitium rocyanum</i> Raymund	root	-	1.11
3.	<i>Akebia quinata</i> Decne	root	-	1.08
4.	<i>Anthriscus sylvestris</i> Hoffman	root	-	1.08
5.	<i>Asarum heterotropoids</i> Maekawa	whole plant	-	1.10
6.	<i>Atractylodes ovata</i> Thunb	root & caulis	-	0.88
7.	<i>Atractylides lyrata</i> S. & Z.	root & caulis	-	1.48
8.	<i>Brassica Cernaua</i> Forbes et Hensl	seed	-	0.95
9.	<i>Broussonetia</i> Kozinoki Sieb.	seed	-	0.88
10.	<i>Canabis sativus</i> L.	stem	-	1.46
11.	<i>Chelidonium majus</i> L. v. <i>asiaticum</i>	whole plant	-	1.94
12.	<i>Cimicifuga heracleifolia</i> Komarov	root & leaf	-	0.87
13.	<i>Cnidum officinale</i> Makino	aerial tuber	-	1.51
14.	<i>Coptis japonica</i> Makino	root & caulis	++++	0.22
15.	<i>Crataegus curneata</i> S.	fruit	+	0.74
16.	<i>Crystanthenum indicum</i> L.	flower & seed	-	0.91
17.	<i>Cuscuta japonica</i> Choicy	seed	-	0.91
18.	<i>Epimedium koreanum</i> Nakai	stem & leaf	-	1.88
19.	<i>Eugennia caryopylla</i> T.	bud.	++++	0.29

20.	<i>Evadia rutaecarpa</i> Benth seed	-	0.86
21.	<i>Foropyium esculentum</i> Moench seed	-	1.08
22.	<i>Glycirrhiza glabra</i> L. root	++	0.64
23.	<i>Gossypium indicum</i> Lam. Seed	-	1.08
24.	<i>Julans regia</i> L. seed	++	0.59
25.	<i>Lithospermum offinale</i> L. root	+	0.76
26.	<i>Machilus rimosa</i> v. <i>thumbergii</i> cortiex	+++	0.49
27.	<i>Maganolia kobus</i> A.P. DE Candolle flower	-	1.18
28.	<i>Morus alba</i> L. leaf	-	1.18
29.	<i>Morus bombycis</i> Koitzumi cortex	-	0.96
30.	<i>Nelumbo nucifera</i> G. seed	+	0.71
31.	<i>Nelumbo nucifera</i> G. flower	++	0.58
32.	<i>Palupara cordata</i> Busk whole plant	-	2.80
33.	<i>Panax Ginseng</i> root	-	1.1
34.	<i>Polygonum multiflorum</i> Thunber root	-	1.06
35.	<i>Prunus mume</i> S. & Z. flower	-	1.35
36.	<i>Pueraria hirsuta</i> Matsum root	++	0.69
37.	<i>Pseudocydonia sinensis</i> Schneider fruit	++	0.57
38.	<i>Raphanus Sativus</i> L. seed & root	-	1.02
39.	<i>Rheum undulatum</i> L. root & caulis	-	1.52
40.	<i>Sanguisorba officinalis</i> v. <i>coreana</i> stem	+	0.75
41.	<i>Scutellaria baicalensis</i> Geogie root	++	0.56
42.	<i>Sorphora angustifloia</i> root	-	0.87
43.	<i>Sorphora japonica</i> L. flower	-	0.94
44.	<i>Thesium chinensis</i> Turc. whole plant	-	1.76

45. <i>Ulmus japonica</i> Sarg cortex	+++	0.37
46. <i>Vitex rotundifolia</i> L. fruit	-	1.08
47. <i>Zinger officinale</i> Rosc. root	+	0.74

^{1,2}The level of antioxidant activity of plants on the methylene blue-sensitized photooxidation of linoleic acid was arbitrarily divided into 4 categories by calculating the ratio of peroxide value (PVs) of sample containing plant extract to peroxide value (PVc) of control after 5 hr storage under fluorescent light (++++: $PVs/PVc < 0.3$; +++ : $0.3 < PVs/PVc < 0.5$; ++: $0.5 < PVs/PVc < 0.7$; +: $0.6 < PVs/PVc < 0.8$; -: $0.8 < PVs/PVc$).

Table 14. Effects of the methanolic extract of selected plant extracts on the chlorophyll b-sensitized photooxidation of linoleic acid in a solvent mixture (methanol : benzene, 1:4, v/v) during 5 hr storage under fluorescent light (3300 lux)

No.	Botanical Name	PV	PVs/PVc ^{1,2}
	Control	136.3	1.00 ^a
14.	<i>Coptis japonica</i> Makino	26.7	0.20 ^e
19.	<i>Eugenia caryophyllata</i> T.	103.0	0.76 ^c
22.	<i>Glycyrrhiza glabra</i> L.	115.1	0.84 ^b
24.	<i>Julans regia</i> L.	133.3	0.98 ^a
26.	<i>Machilus rimosa</i> v. <i>thumbergii</i>	108.0	0.79 ^c
31.	<i>Nelumbo nucifera</i> G.	109.5	0.80 ^b
36.	<i>Pueraria hirsuta</i> Matsum	128.7	0.94 ^{ab}
37.	<i>Pseudocydonia sinensis</i> Schneider	121.8	0.89 ^b
41.	<i>scutellaria baicalensis</i> George	119.3	0.88 ^b
45.	<i>Ulmas japonica</i> Sarg	86.5	0.63 ^d

¹The ratio of peroxide value (PVs) of sample containing plant methanolic extract to peroxide value (PVc) of control after 5 hr storage under fluorescent light.

²Means with the different superscript italicized letters are significantly different at p<0.05.

3. 추출용매별 황련추출물의 chlorophyll 광감체를 이용한 linoleic acid의 산화에 미치는 영향

황련의 메탄올 추출물이 methylene blue 및 chlorophyll을 광감체로 하는 두가지 시스템에서 모두 강력한 linoleic acid의 광산화를 억제하는 활성이 있는 것으로 확인되어 이 황련을 이번 연구의 재료로 선택하여 연구를 계속 진행하기로 판단하였다. 황련을 여러 가지 다른 용매들(ethyl ether, ethyl acetate, methanol)로 추출하여 그 추출물(0.2%)이 chlorophyll을 광감체로 하는 linoleic acid의 광산화를 억제하는 정도를 확인하는 실험을 행하였다. (Fig 12-1) 황련의 메탄올 추출물은 linoleic acid의 5시간 및 10시간 광산화시켰을 때 각각 61% 및 59%의 광산화억제력을 나타내었다. 그러나 ethyl acetate 및 ethyl ether 추출물은 오히려 산화를 촉진하였다. 이는 황련중에 함유된 광산화활성을 갖는 물질들이 극성용매에 잘 용해되어 추출된다는 것을 의미한다.

4. 황련메탄올추출물의 liquid-liquid partitioning 분획별 광산화억제 효과

황련의 메탄올 추출물을 liquid-liquid partitioning에 의하여 3분획물(ethyl ether 분획, ethyl acetate 분획, butanol 분획)을 얻었다. 이들 3분획물(0.1%)의 chlorophyll을 광감체로 하는 linoleic acid의 광산화에 미치는 영향을 연구하였다. (Table 15) 이 실험 결과에 의하면, butanol 분획이 가장 항산화 활성이 강하였다. 고광도(3300 lux)하에서 5시간 linoleic acid의 광산화를 시킨후에 약 50% 정도의 광산화 억제력을 나타내었다. Ethyl ether 분획은 동일 조건에서 11%의 항산화 활성을 나타내었고, ethyl acetate분획은 오히려 산화를 촉진하였다.

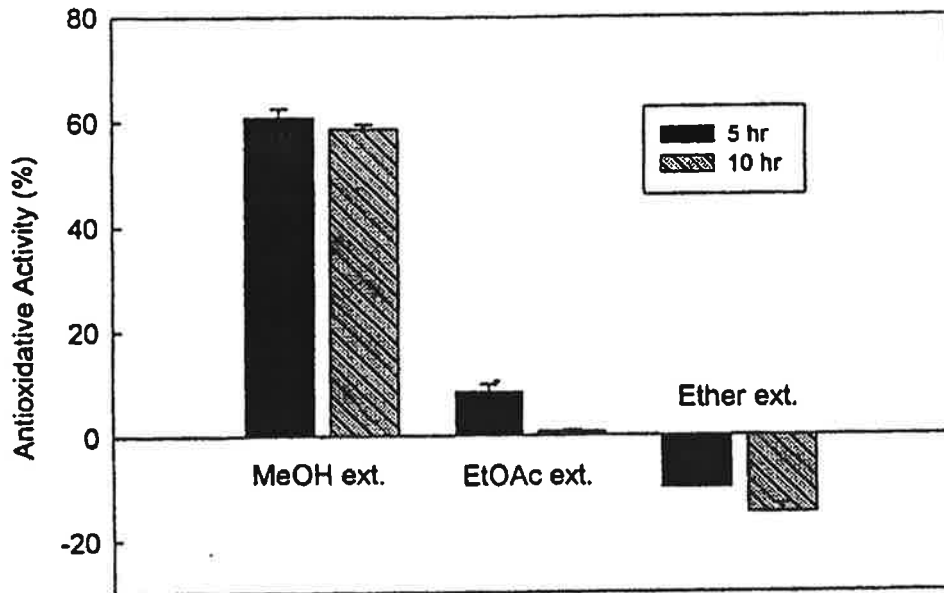


Figure 12-1. Effects of 0.2% methanol extract, ethyl acetate extract or ethyl ether extract of *Coptis japonica* Makino on the chlorophyll b-sensitized photooxidation of linoleic acid in a solvent mixture of methanol and benzene (1:4, v/v) under fluorescent light illumination (3300 lux) for 5 and 10 hr at 7±2°C. MeOH. ext., EtOAc ext., and Ether ext. in the figure represent methanol extract, ethyl acetate extract and ethyl ether extract, respectively.

Table 15. Effects of 0.1% (w/v) ethyl ether, ethyl acetate, or butanol fractions of *Coptis japonica* Makino on the chlorophyll b-sensitized photooxidation of linoleic acid in methanol after 5 hr storage during fluorescent light illumination

Fraction	PV	PVs/PVc ¹
Control	51.7	1.00 ^a
Ethyl ether fraction	46.2	0.89 ^b
Ethyl acetate fraction	57.1	1.10 ^a
Butanol fraction	25.8	0.50 ^c

¹The ratio of peroxide value (PVs) of sample containing plant extract (0.1%) to peroxide value (PVc) of control after 5 hr storage under fluorescent light.

²Means with the different superscript italicized letters are significantly different at $p < 0.05$.

5. 황련의 부탄올 분획 (0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25%) 의 methylene blue 를 광감체로 한 linoleic acid의 광산화 및 chlorophyll b를 광감체로한 linoleic acid의 광산화를 억제하는 광산화에 미치는 효과

Figs 12-2 와 3은 각각 황련의 butanol 분획이 농도별로 chlorophyll 혹은 methylene blue를 광감체로 이용한 linoleic acid의 광산화에 미치는 영향을 연구한 결과를 나타낸 것이다. 이 실험 결과에서 보는 바와 같이 butanol 분획물의 처리량이 0.05%에서 0.25%로 증가함에 따라 광산화억제력은 증가 하였다. Chlorophyll을 광감체로 한 10시간 동안의 광산화실험에서는, 0.25%의 butanol 분획물이 linoleic acid 광산화를 77.6% 억제하는 활성을 나타내었으나, 알파-토코페롤은 오히려 광산화를 촉진하였다. Methylene blue를 광감체로 이용한 10시간 광산화실험에서는, 0.15, 0.20 및 0.25% butanol 분획물처리가 linoleic acid 광산화를 22.7, 48.8 및 62.7%억제하는 효과를 나타내었다. 알파-토코페롤 (0.1%)의 경우 그 활성이 0.2% butanol분획보다 유의적으로 낮았다.

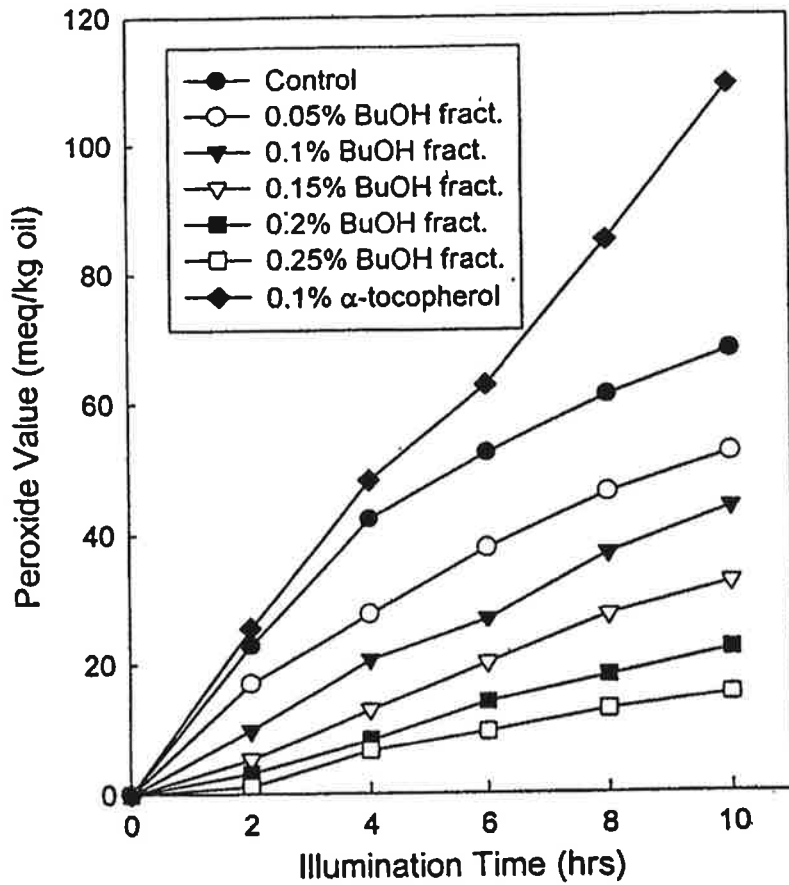


Figure 12-2. Effects of 0, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 and 0.25% butanol fraction of *Coptis japonica* Makino methanol extract on the chlorophyll b-sensitized photooxidation of linoleic acid in methanol during 10 hr fluorescent light illumination (3300 lux) at 7 ± 2 °C.

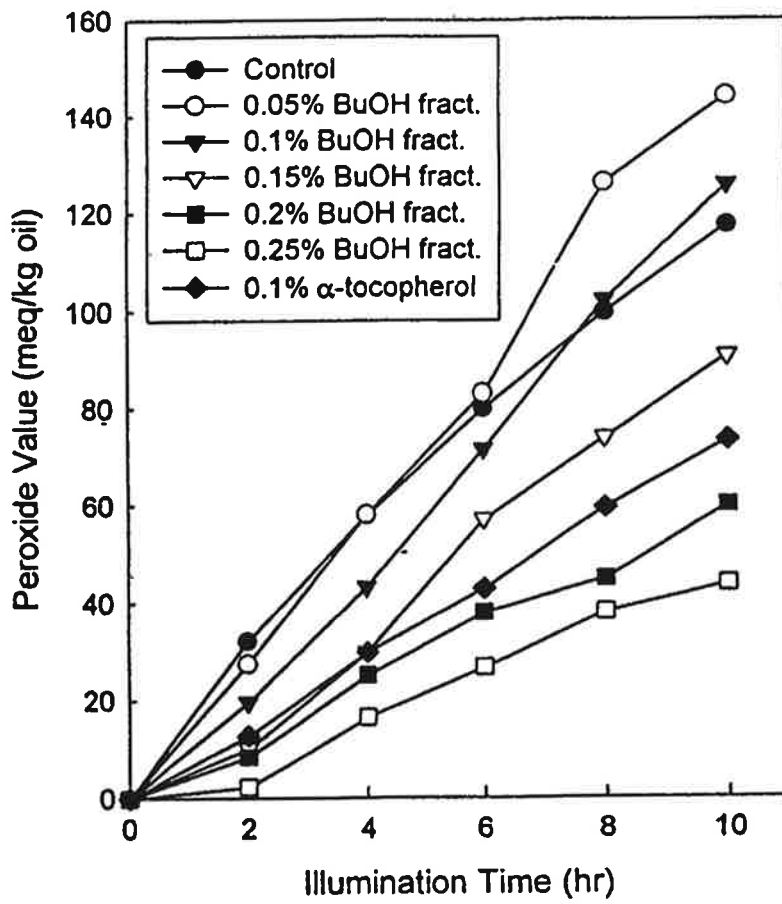


Figure 12-3. Effects of 0, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 and 0.25% butanol fraction of *Coptis japonica* Makino methanol extract on the methylene blue-sensitized photooxidation of linoleic acid in methanol during 10 hr fluorescent light illumination (3300 lux) at 7 ± 2 °C.

6. 황련의 butanol 분획물이 모델식품에멸전의 광산화에 미치는 영향

많은 식품들이 에멸전 상태로 존재하고 유통되고 있기 때문에, 황련의 butanol분획물이 모델식품에멸전의 광산화에서도 항산화 활성을 갖고 있는지를 알아보기 위하여 이 실험을 행하였다. 이번 실험에서 대두유와 증류수로 만든 모델식품에멸전은 광산화에 민감하여 3300 lux의 광도하에서 저장 60시간 만에 과산화물가가 60 meq/kg oil로 급격히 증가하는 양상을 보였다. 그러나 알루미늄호일로 광선을 차단한 시료에서는 동일한 조건하에서 60시간 후에 과산화물가는 1.2 meq/kg oil에 불과하여 광선의 조사가 산화에 결정적인 역할을 하고 있음을 확인 하였다. 0.2% 및 0.3% butanol 분획물의 모델식품에멸전의 60시간 광산화를 각각 32.6% 및 64.9% 억제하는 상당한 능력을 나타내었다. (Fig 12-4)

7. Cop1, Cop2, Cop3, Cop4의 화학구조 결정

Table 16은 cop1, cop2, cop3, cop4의 물리-화학적 특성을 나타낸 것이다. 이들 화합물들은 UV-visible 및 IR spectrum을 포함한 다양한 물리화학적 특성이 화합물 상호간에 서로 일치하거나 거의 유사하였다. 이들 화합물들은 UV-visible spectrum은 특히 알카로이드 화합물과 유사한 것으로 사료되었다. 그리고 IR spectrum에서도 1560, 1410 cm^{-1} 부근의 방향족 C=C, 1030 cm^{-1} 부근의 amine기에 기인하는 밴드가 관찰되었다. 또한 이들 cop1, cop2, cop3, cop4의 EI-MS분석에 의한 분자량은 각각 320, 339, 337 및 342로 확인되었다. Figs. 12-5, ,6, 7, 8은 각각 cop1, cop2, cop3, cop4의 ^1H 및 ^{13}C -NMR spectra를 나타낸 것이다. Fig 12-9은 cop4의 HMBC spectrum을 나타낸 것이다. 이들 NMR spectra 및 물리-화학적특성연구 결과에 따라, cop1, cop2, cop3, cop4는 각각 coptisine, jatrorrhizine, berberine 및 magnoflorine이었다 (Fig 12-10).

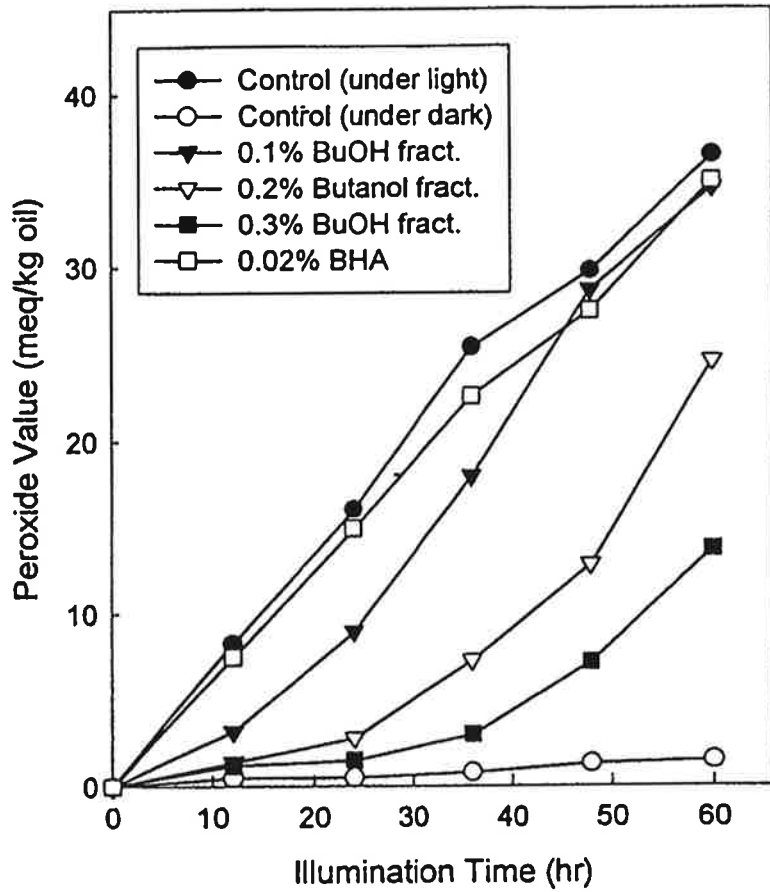


Figure 12-4. Effects of 0, 0.1, 0.2 and 0.3% butanol fraction of *Coptis japonica* Makino methanol extract on the photooxidation of model food emulsion (50% soybean oil emulsion) during 60 hr fluorescent light illumination (3300 lux) at 7 ± 2 °C.

Table 16. Physico-chemical properties of Cop1, Cop2, Cop3 and Cop4

	Cop1	Cop2	Cop3	Cop4
Appearance	yellowish	reddish-yellow	yellow needles	white
EIMS (m/z)	320(M ⁺)	339(M ⁺)	337(M ⁺)	342(M ⁺)
Molecular formula	[C ₁₉ H ₁₄ NO ₄] ⁺	[C ₂₀ H ₂₀ NO ₄] ⁺	[C ₂₀ H ₁₈ NO ₄] ⁺	[C ₂₀ H ₂₂ NO ₄] ⁺
UV λ _{max} nm	215(4.54)	224(5.08)	228(4.99)	228(4.00)
(log ε)	264(4.43)	264(5.01)	294(4.89)	272(3.40)
in MeOH	57(4.43)	349(4.99)	347(4.89)	318(3.36)
	460(3.71)	390(4.57)	428(4.42)	
IR		3433, 2923	3423, 2923	
	3441, 2923,	2852, 2392	2362, 1637	3433, 2924
	1560, 1412,	2343, 1560	1561, 1508	1645, 1561
	1035	419, 1023	1385, 1278	1407, 1049
			1232, 1105	
			1037,	

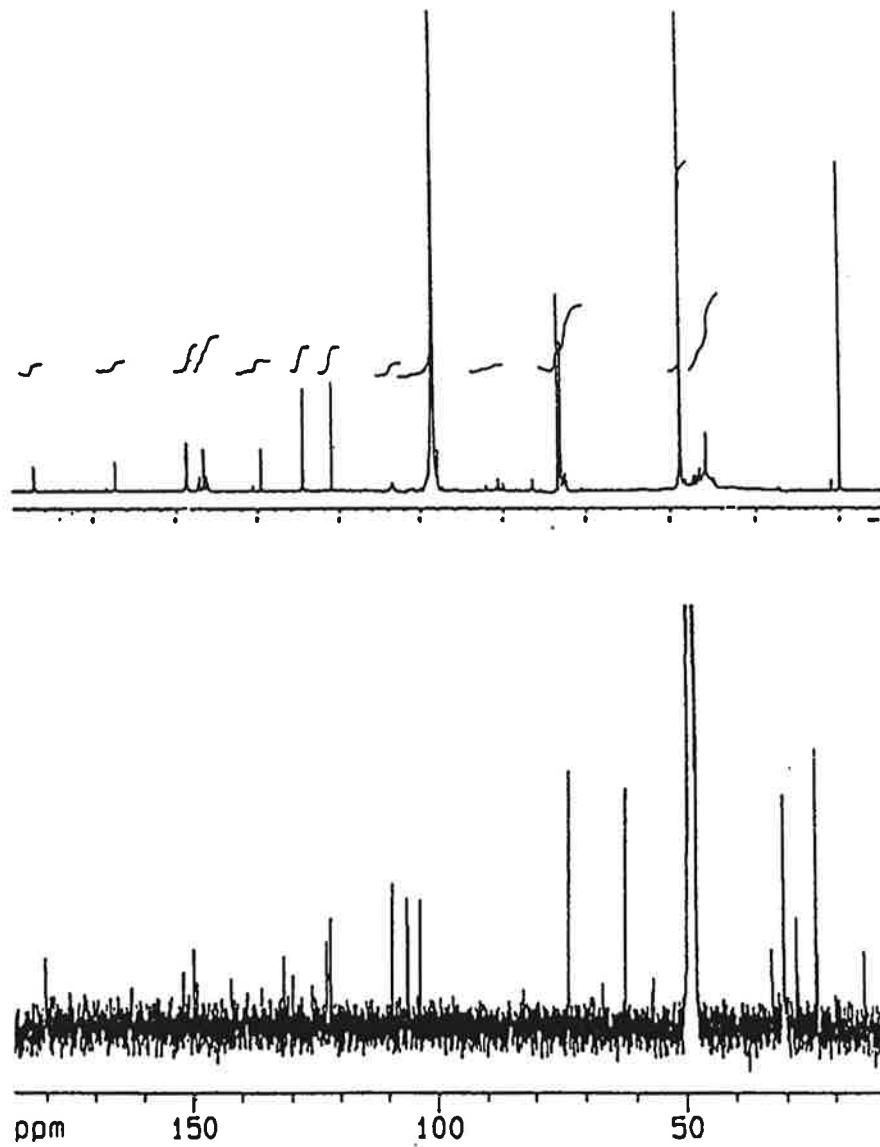


Figure 12-5. ^1H and ^{13}C -NMR spectrum of Cop1 in CD_3OD .

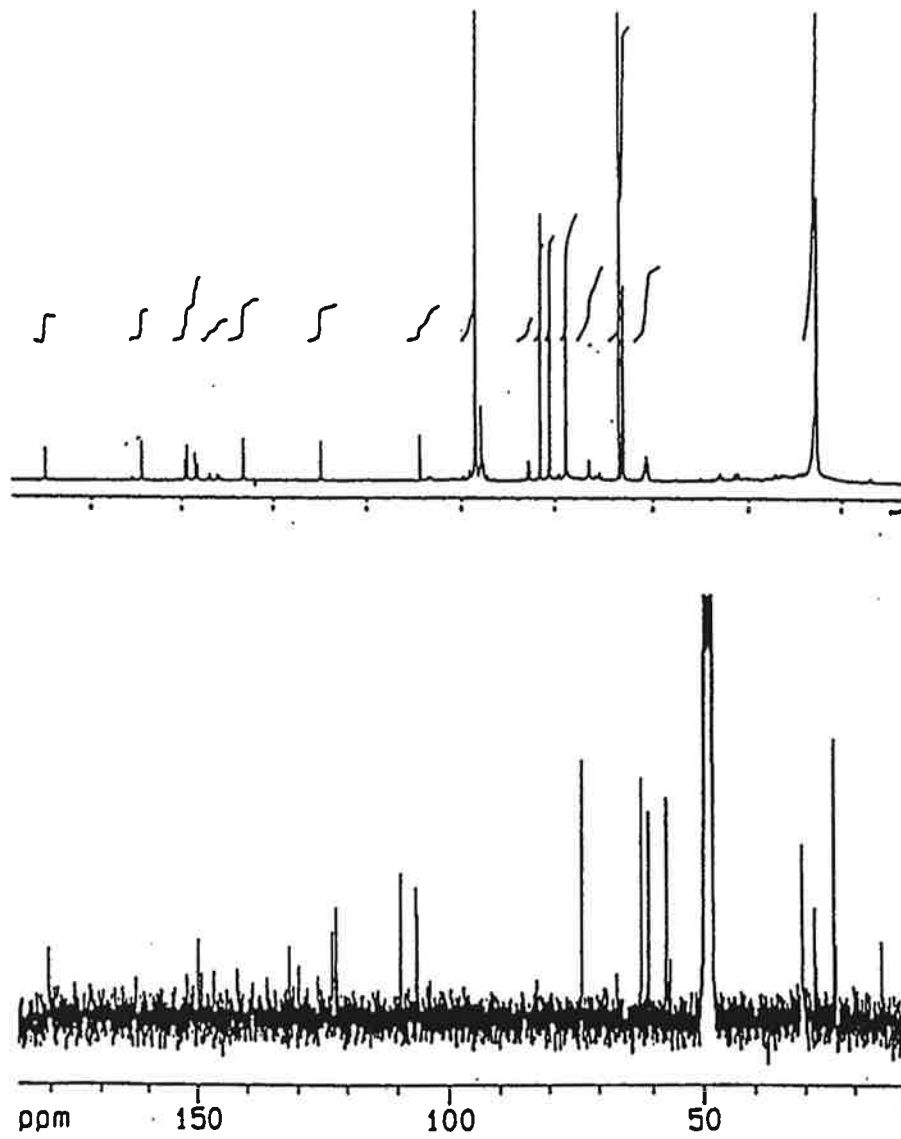


Figure 12-6. ¹H and ¹³C-NMR spectrum of Cop2 in CD₃OD.

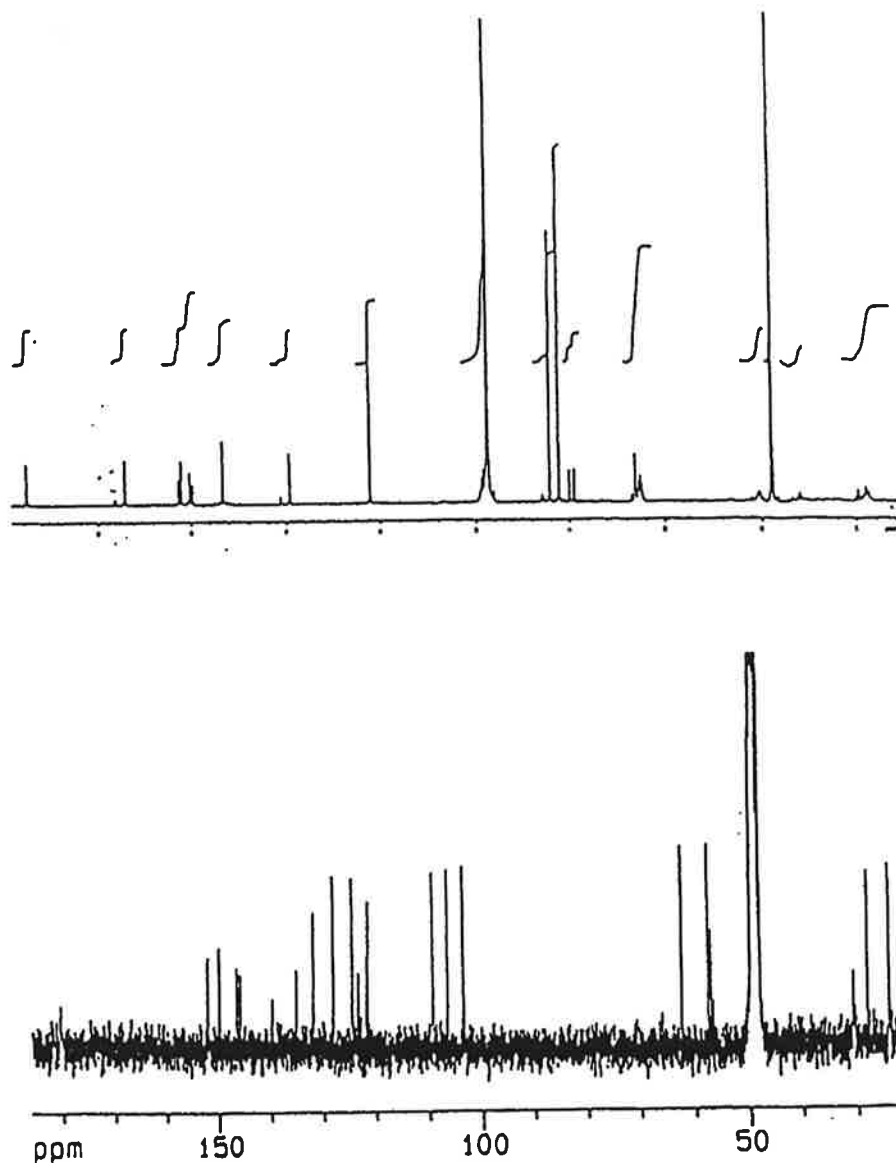


Figure 12-7. ^1H and ^{13}C -NMR spectrum of Cop3 in CD_3OD .

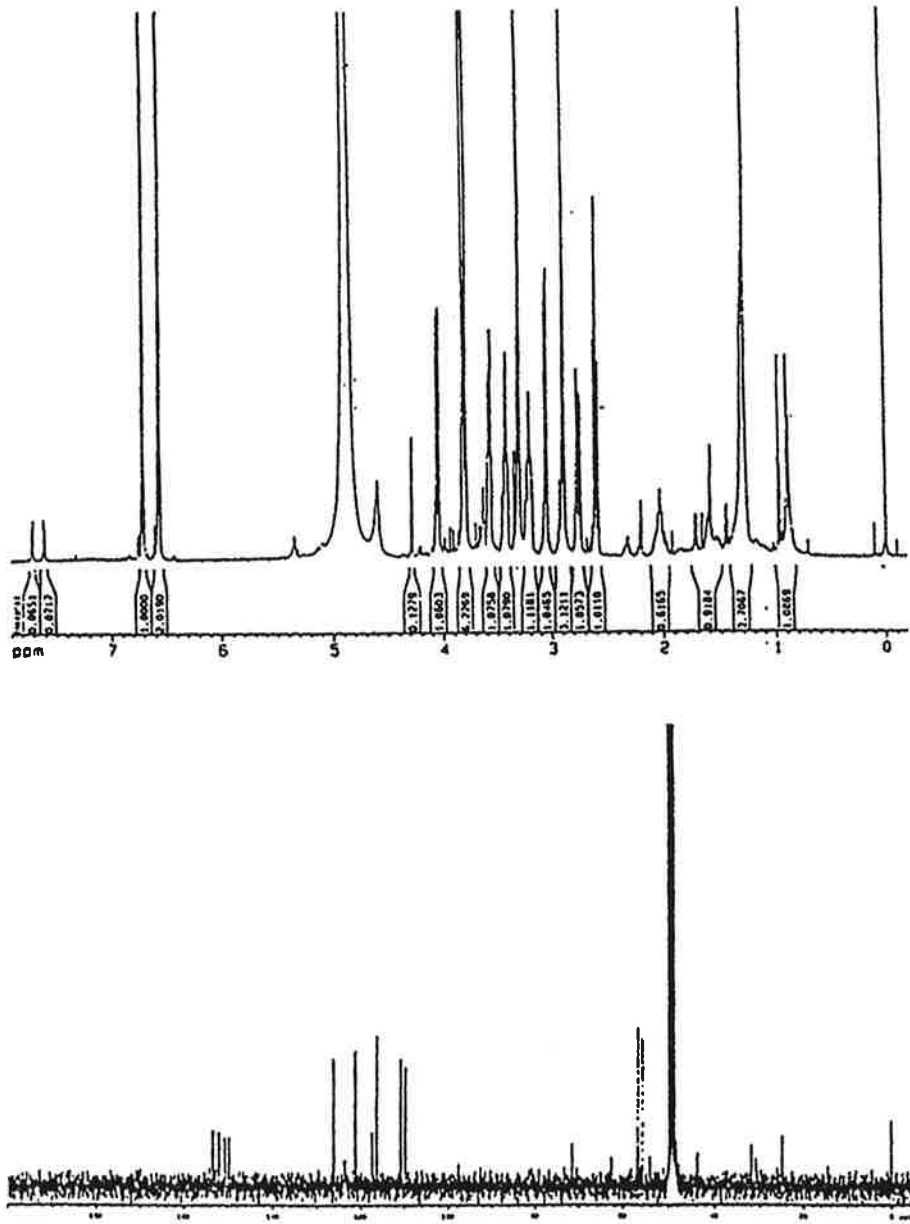


Figure 12-8. ^1H and ^{13}C -NMR spectrum of Cop4 in CD_3OD .

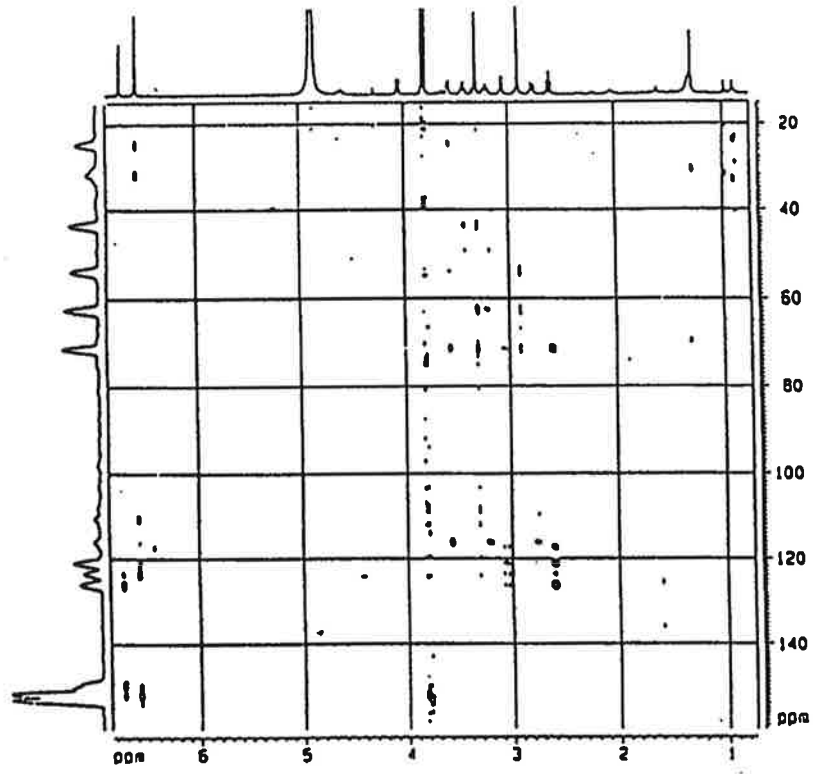
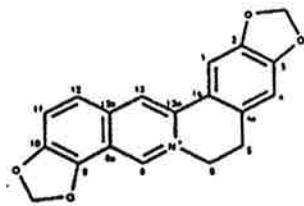
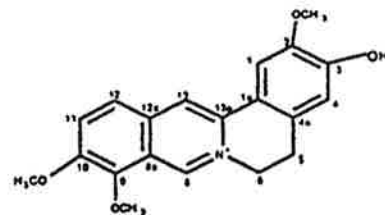


Figure 12-9. HMBC spectrum of cop4 in CD₃OD.



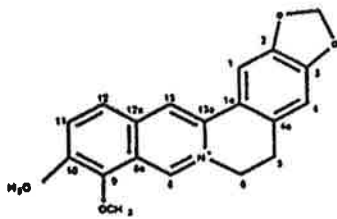
Coptisine

cop1 Mw. 320.33
[C₁₉H₁₄NO₄]⁺



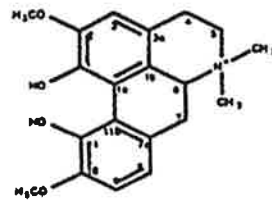
Jatrorrhizine

cop2 Mw. 338.39
[C₂₀H₂₀NO₄]⁺



Berberine

cop3 Mw. 336.37
[C₂₀H₁₈NO₄]⁺



Magnoflorine

cop4 Mw. 342.50
[C₂₀H₂₄NO₄]⁺

Figure 12-10. Molecular structures of Cop1, Cop2, Cop3 and Cop4 obtained from *Coptis japonica* Makino.

8. Cop1, Cop2, Cop3 의 chlorophyll을 광감체로한 linoleic acid 광산화 억제 효과

Table 17은 cop1(coptisine), cop2(jatrorrhizine), cop3(berberine)들이 chlorophyll을 광감체로하는 5시간동안의 linoleic acid의 광산화에 미치는 영향을 나타낸 것이다. 이 결과에 의하면 대조구의 경우 5시간 광산화후 과산화물가는 69.64 meq/kg oil인데 반하여 이들 화합물들은 모두 광산화억제력을 나타내었다. 특히 cop3 (berberine)은 그 중 가장 강력한 항산화력을 나타내었다. 0.01%, 0.05% 및 0.1% cop3(berberine)의 처리가 각각 28.2, 48.7% 78.63%의 linoleic acid광산화를 억제하였다. 이때 분리 동정된 화합물들이 모두 quaternary amine구조를 갖고 있으며 그 functional group만 다른 형태인데, 이러한 quaternary amine들이 광산화억제를 나타낸다는 사실은 전혀 보고된바 없는 새로운 사실로서 매우 중요한 발견이다.

Table 17. Effects of 0.01%, 0.05%, and 0.1% Cop1, Cop2, Cop3 on the chlorophyll b-sensitized photooxidation of linoleic acid for 3 hrs under fluorescent light

Samples	Peroxide Value (meq/kg oil)
Control	69.6
0.01% Cop1	61.9
0.05% Cop1	50.0
0.1% Cop1	42.9
0.01% Cop2	71.4
0.05% Cop2	53.6
0.1% Cop2	44.0
0.01% Cop3	50.0
0.05% Cop3	35.71
0.1% Cop3	14.9

9. 베르베린의 모델식품에멀전의 광산화에 의한 과산화물 생성에 미치는 영향

이번 연구결과에서 일황련의 분획물중 베르베린이 chlorophyll 광 감체에 의한 linoleic acid의 광산화를 억제하는 활성이 강한물질이라는 것을 LV spectrum, MS, NMR 등의 연구를 통하여 밝힌바가 있기 때문에, 베르베린을 Sigma사로 부터 구입하여, 베르베린이 식품-에멀전 모델의 광 산화에 어떠한 영향을 미치는지 연구하였다. 대두유-에멀전을 40시간 저장 하는 동안에 POV는 0.8에서 24.3 meq/kg oil 로 증가하였다. (Fig. 12-11) 한편 알루미늄으로 광선을 차단시킨 시료에서는 동일한 조건하에 서 48시간저장 후에도 전혀 POV의 변화가 없었다. 이는 대두유-에멀전의 산화안정성이 광선의 조사에 의하여 상당히 영향을 받고 있다는 것을 의미 한다. 그리고 에멀전 제조시 외부로부터 sensitizer를 첨가하지 않은 상태 이기 때문에, 대두유 자체에 상당량의 sensitizer를 함유하고 있다는 것을 의미하기도 한다. 베르베린을 0.008%, 0.016%, 0.04% 참가한 시료에서는 48시간후 POV가 7.9, 6.3 및 3.2 meq/kg oil이었다. (Fig. 12-11) 즉,

0.008%의 베리베린 첨가가 대두유-에멀전의 광산화를 약 69% 억제 하는 것으로서, 이는 식품-에멀전 모델에서 베르베린의 광산화억제 활성이 대단히 강력하다는 것을 의미한다.

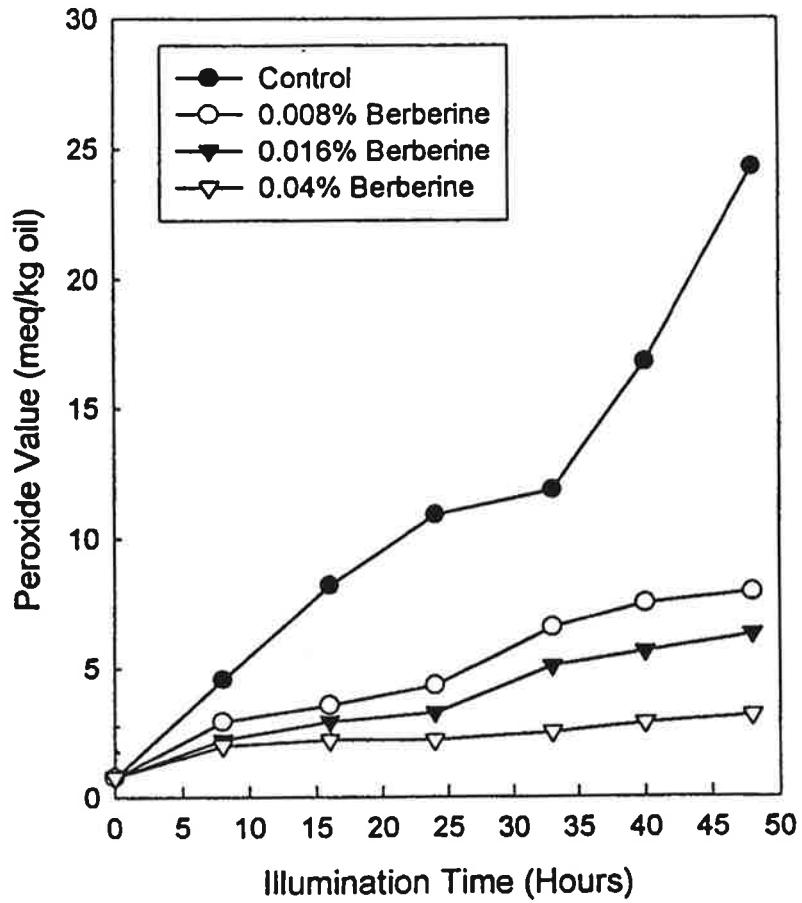


Figure 12-11. Effects of 0.008, 0.016, and 0.04% berberine on the peroxide formation in model food emulsion (50% soybean oil emulsion) during 48 hr fluorescent light illumination (3300 lux) at 7 ± 2 °C.

면실유로 제조된 에멀전의 경우에서도, 대두유-에멀전과 마찬가지로 광선에 의하여 산화가 촉진되었으며, 48시간 저장후 POV가 0.8에서 26.6 meq/kg oil 으로 증가하였다. (Fig. 12-12) 면실유에멀전에서 알루미늄-foil로 광선을 차단시킨 시료에서는 48시간 동일한 조건에서 저장시켰을 때 전혀 POV의 증가가 관찰되지 않았다. 48시간 저장후 0.008, 0.016 및 0.04% 베르베린 첨가구의 POV는 각각 8.1, 7.7, 및 5.3 meq/kg oil이었다. (Fig. 12-12) 면실유의 경우에는 베르베린의 농도를 0.008%에서 0.04%까지 5배 증가 시켰을 때 과산화물의 생성억제 효과는 크게 증가하지 않았다.

옥배유를 이용하여 제조한 에멀전에서도, 광선의 조사는 과산화물 생성을 현격히 증가 시켰다. 그러나 옥배유-에멀전에서 과산화물증가는 대두유나 면실유로 제조된 에멀전의 경우보다 현격히 적었다. 이는 옥배유의 지방산조성에 주로 기인하는 것으로 사료되나, 유지에 함유된 광감체의 종류와 양에도 상당한 관련이 있을 것으로 판단된다. 옥배유-에멀전을 48시간동안 광선을 조사 시켰을 경우, POV는 0.9에서 12.5meq/kg oil로 증가하여(Fig.12-13), 과산화물 생성이 대두유나 면실유로 제조된 에멀전에 비하여 약 50% 혹은 그이하에 불과 하였다. 이러한 옥배유 에멀전에 베르베린을 0.008, 0.016, 0.04% 첨가한 시료는 48시간 광조사후 POV가 각각 6.2, 3.9 및 3.4meq/kg oil이었다. 옥배유-에멀전에서도 베르베린은 강력한 광산화억제효과를 나타내었다.

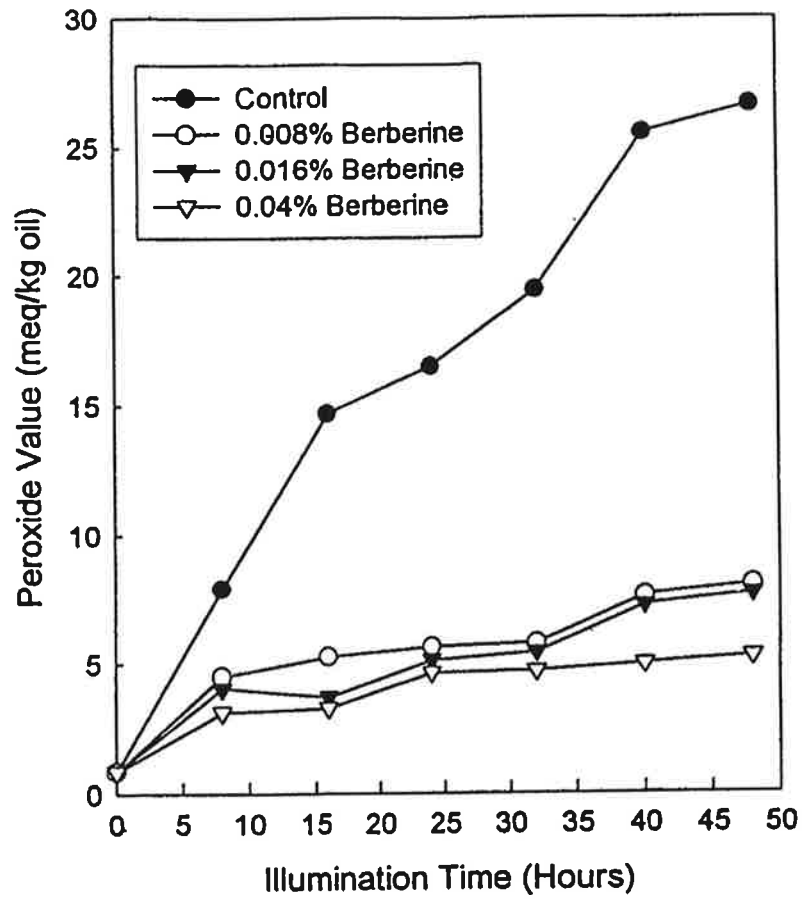


Figure 12-12. Effects of 0.008, 0.016, and 0.04% berberine on the peroxide formation in model food emulsion (50% cottonseed oil emulsion) during 48 hr fluorescent light illumination (3300 lux) at 7 ± 2 °C.

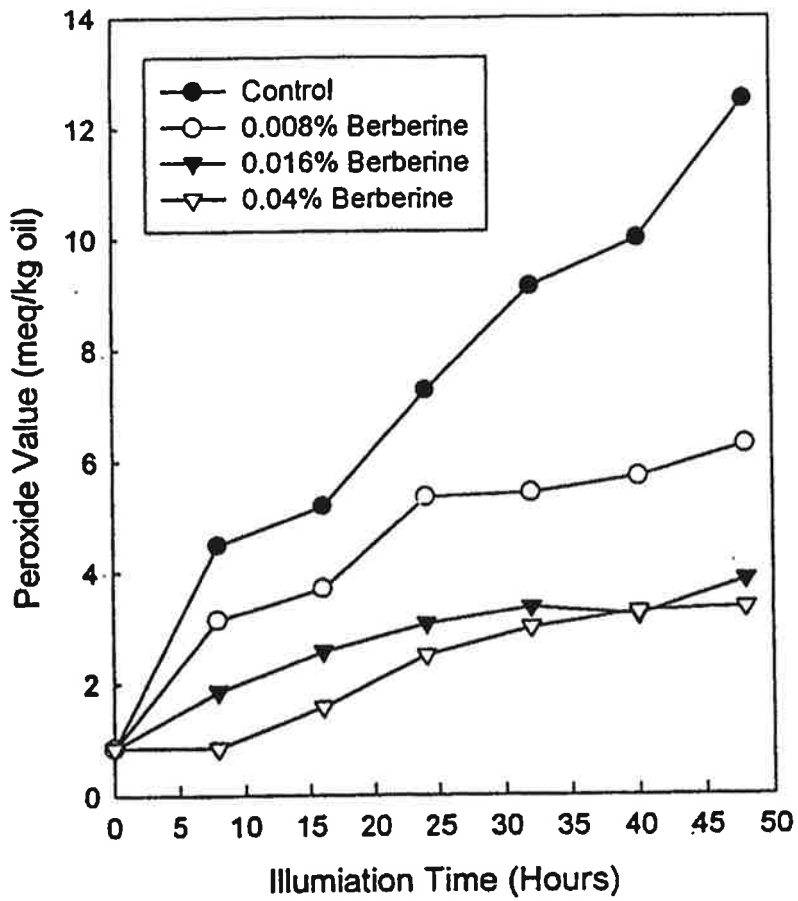


Figure 12-13. Effects of 0.008, 0.016, and 0.04% berberine on the peroxide formation in model food emulsion (50% corn oil emulsion) during 48 hr fluorescent light illumination (3300 lux) at 7 ± 2 °C.

10. 베르베린이 모델식품에멸전의 광산화에서 conjugated diene의 생성에 미치는 영향

일중항 산소에 의한 광산화 진행시, nonconjugated diene 및 conjugated diene이 생성하게 되는데, 이중 conjugated diene은 233nm에서 강한 흡수밴드를 형성하기 때문에 233nm에서 흡광도를 측정하여 conjugated diene생성을 측정하여 산화정도를 관찰하였다.

대두유 에멸전의 경우 conjugated diene 함량이 0.26% 에서 48시간 광조사후 0.83%로 증가하였다.(Fig. 12-14) 그러나 aluminum foil로 광선을 차단한 시료에서는 conjugated diene함량의 증가가 나타나지 않았다. 또한 0.008, 0.016, 0.04% berberine처리구에서는 48시간 광조사후 conjugated diene 함량이 각각 0.56, 0.36 및 0.25%이었다.(Fig. 12-14) 면실유-에멸전에서도 48시간 광조사후 conjugated diene 함량이 0.25에서 0.76%로 증가 하였다.(data not shown) 면실유-에멸전에서 베르베린 첨가는 conjugated diene 증가를 현격히 억제하였다. 0.008, 0.016, 0.04% berberine 처리구에서는 48시간 광조사후에 conjugated diene 함량이 각각 0.46, 0.46 및 0.39%이었다.(data not shown) 옥배유-에멸전을 대상으로 한 실험에서도 위와 유사하게 berberine의 첨가가 48시간동안의 광조사중에 conjugated diene 함량의 증가가 현저히 감소되었다.(data not shown)

그런데 특이한 사항은 48시간 광조사중에 대두유-에멸전과 면실유-에멸전의 경우가 옥배유-에멸전에 비하여 과산화물의 생성은 약 2배 혹은 그 이상로 많았었는데, conjugated diene의 증가는 이들 3 가지 에멸전에서 모두 비슷하게 나타났다.

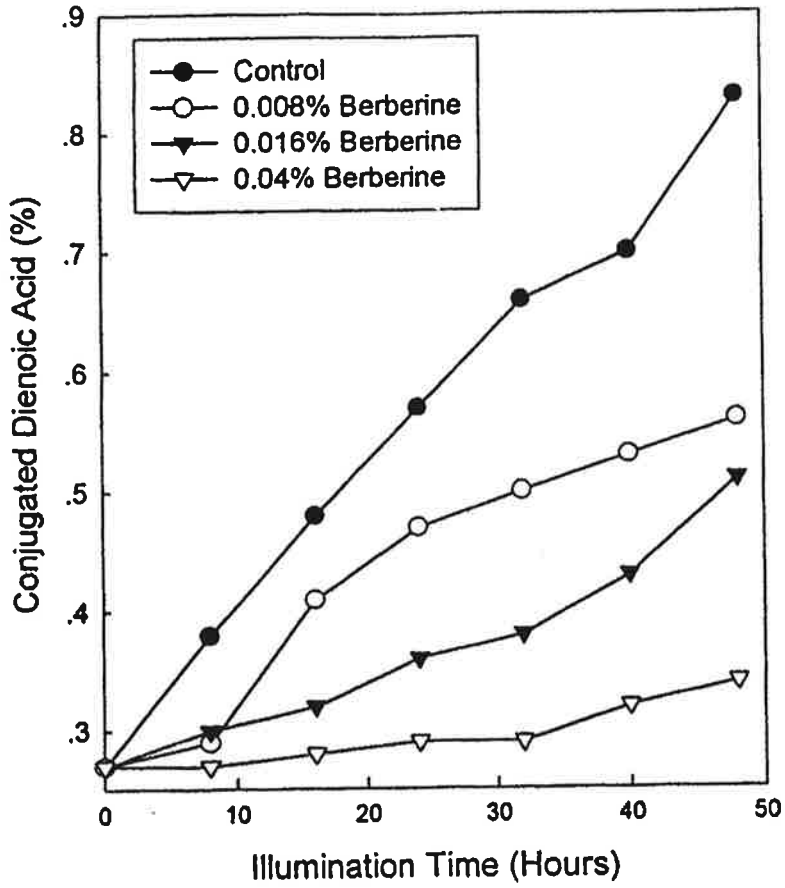


Figure 12-14. Effects of 0.008, 0.016, and 0.04% berberine on the conjugated dienoic acid formation in model food emulsion (50% soybean oil emulsion) during 48 hr fluorescent light illumination (3300 lux) at 7 ± 2 °C.

11. 베르베린과 기타 첨가제들의 에멀전식품의 광산화억제력 비교 실험

Fig 12-15은 $2.4 \times 10^{-4} \text{M}$ ascorbic acid, berberine, palmatine, 및 sodium azide가 면실유로 제조한 모델식품에멀전을 48시간 광조사시키는 중에 과산화물의 생성에 미치는 영향을 나타낸 것이다. 이 실험결과에 의하면 동일한 물농도하에서 berberine이 과산화물생성을 억제하는 효과가 가장 탁월하였고, 이어서 ascorbic acid, palmatine 및 sodium azide의 순서이었다. 대두유로 제조한 모델식품에멀전의 광산화실험에서도 동일한 결과를 얻었다 (data not shown). 이 중에서 berberine과 palmatine은 둘다 quaternary amine이며 유사한 화학적 구조를 갖는 물질이기 때문에 이 실험의 재료로 이용하였는데 이들의 모두 우수한 광산화억제력을 갖는 것으로 판명되어 매우 흥미롭다. 또한 sodium azide는 일중항산소만을 소거하는 능력이 있는 물질 이므로, 이러한 sodium azide에 의한 광산화억제효과는, 모델식품에멀전의 광산화에 일중항 산소가 관여한다는 것을 말해준다.

Fig 12-16은 $2.4 \times 10^{-4} \text{M}$ ascorbic acid, berberine, palmatine, 및 sodium azide가 면실유로 제조한 모델식품에멀전을 48시간 광조사시키는 중에 conjugated dienoic acid의 생성에 미치는 영향을 나타낸 것이다. 이 실험결과에서도 과산화물가를 측정된 결과와 유사한 경향을 보였다. 즉 이 때 첨가한 모든 첨가물들이 강력히 conjugated dienoic acid생성을 억제하였으며, 그 억제력이 동일한 물농도에서 berberine이 가장 강하고, ascorbic acid, palmatine, sodium azide의 순서이었다. 대두유로 제조한 모델식품에멀전에서도 이와 유사한 실험결과를 얻을 수 있었다. (data not shown)

그런데, 이들 에멀전을 암소에서 자동산화시키면서 berberine, palmatine, ascorbic acid, sodium azide의 산화억제력을 실험한 결과에 의하면, ascorbic acid만이 자동산화를 억제하는 효과를 보였으나, 이들 berberine, palmatine, sodium azide는 자동산화억제력을 보이지 않았다.

면실유로 제조한 에멀전을 암소에서 (60°C) 산화시킨 결과 대조구, $2.4 \times 10^{-4} \text{M}$ ascorbic acid, berberine, palmatine, sodium azide첨가구들이 2일후에 과산화물가가 각각 29.4, 22.7, 28.3, 28.4 및 29.5 meq/kg oil이었다 (data not shown). 또한 대두유로 제조한 모델식품에멀전의 자동산화 실험에서도 이와 유사한 결과를 얻었다. 대조구, $2.4 \times 10^{-4} \text{M}$ ascorbic acid, berberine, palmatine, sodium azide첨가구들의 과산화물가는 2일후 각각 32.5, 19.9, 29.9, 31.7, 31.8 meq/kg oil이었다 (data not shown). 이 결과는 황련의 광산화억제활성물질인 berberine은 광산화억제력은 뛰어나나, radical이 관여하는 자동산화를 억제하는 능력이 없다는 것을 의미한다.

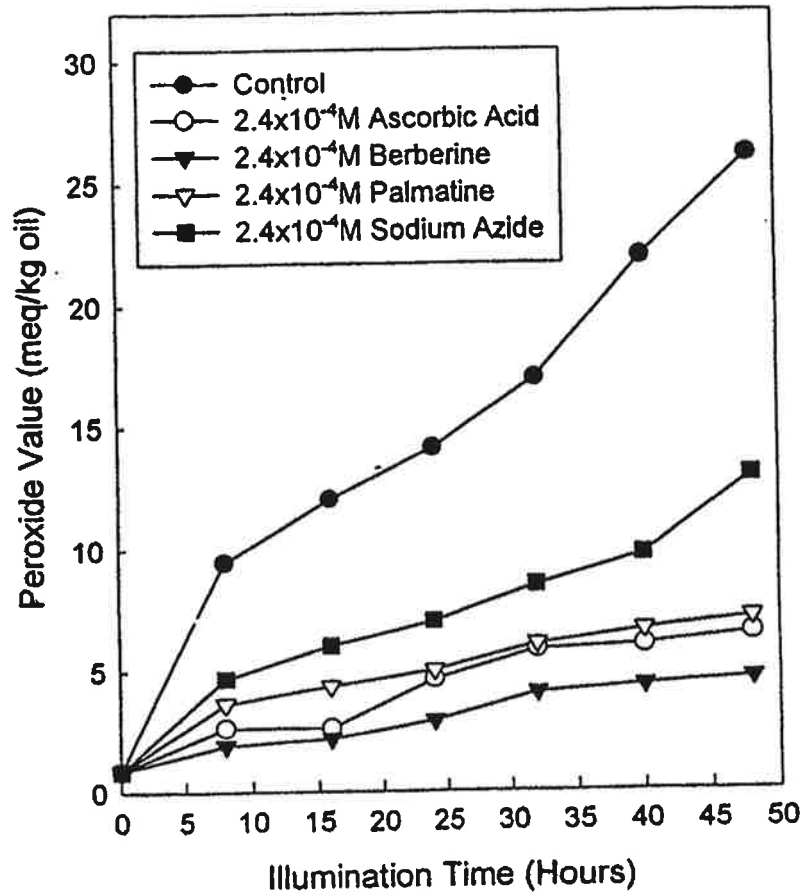


Figure 12-15. Effects of 2.4×10^{-4} M ascorbic acid, berberine, palmatine and sodium azide on the peroxide formation in model food emulsion (50% cottonseed oil emulsion) during 48 hr fluorescent light illumination (3300 lux) at 7 ± 2 °C.

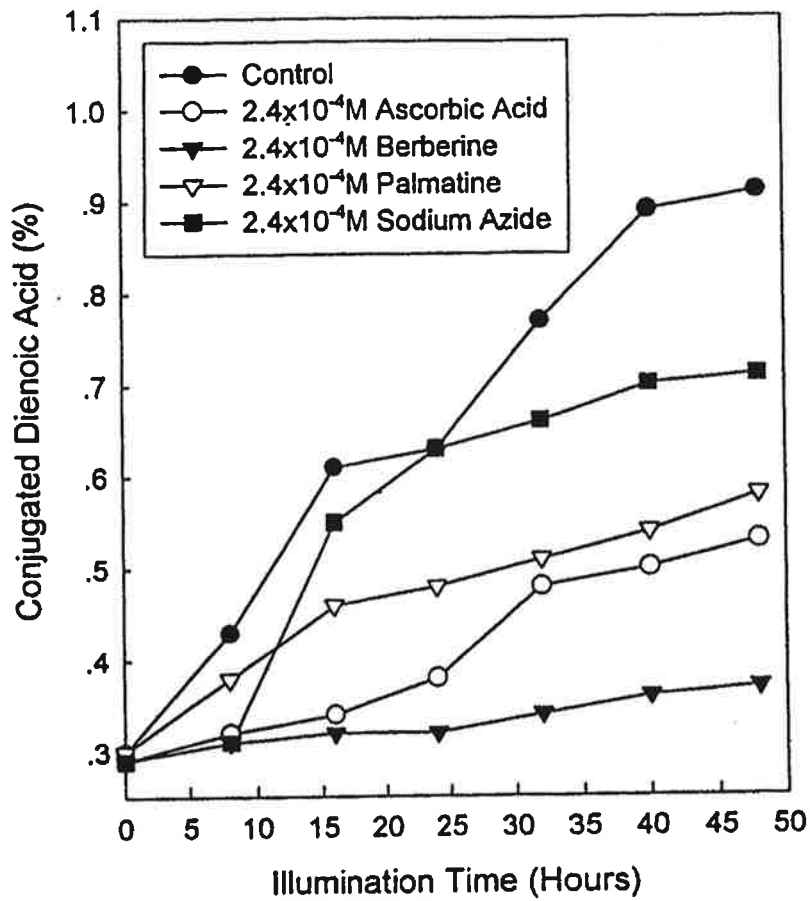


Figure 12-16. Effects of $2.4 \times 10^{-4} \text{M}$ ascorbic acid, berberine, palmatine and sodium azide on the conjugated dienoic acid formation in model food emulsion (50% cottonseed oil emulsion) during 48 hr fluorescent light illumination (3300 lux) at $7 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.

12. 베르베린의 샐러드드레싱의 과산화에 미치는 영향

황련에서 분리하여 밝혀낸 활성물질인 berberine이 salad dressing의 과산화를 억제하는 능력이 있는지를 연구하기 위하여, 0, 0.01, 0.02, 0.05% berberine이 함유된 salad dressing을 제조하여 이들 salad dressing을 고광도하에서 과산화안정성을 실험하였다. (Fig 12-17, 18) 이 실험 결과에 의하면, berberine을 첨가하지 않은 salad dressing은 48시간 광선의 조사에 의하여 과산화물가의 증가가 현격하여, 처음에 0.51 meq/kg oil 에서 48시간 후 16.5meq/kg oil로 증가하였다. 그러나, 0.01%, 0.02% 및 0.05% berberine을 첨가한 salad dressing의 경우 과산화물의 생성이 현격히 서서히 증가하는 양상을 보여서, 48시간후 과산화물가는 각각 6.0, 4.1, 2.1 eq/kg oil이었다. (Fig 12-17) 또한 berberine을 첨가하여 제조한 salad dressing의 경우 광조사중에 conjugated dienoic acid 생성이 이를 첨가하지 않고 제조한 salad dressing의 경우보다 현격히 적었다. 0%, 0.01%, 0.02% 및 0.05% berberine을 첨가한 salad dressing의 경우 48시간 광조사 후에 생성된 conjugated dienoic acid함량은 각각 0.91, 0.65, 0.55, 0.46%이었다. (Fig 12-18)

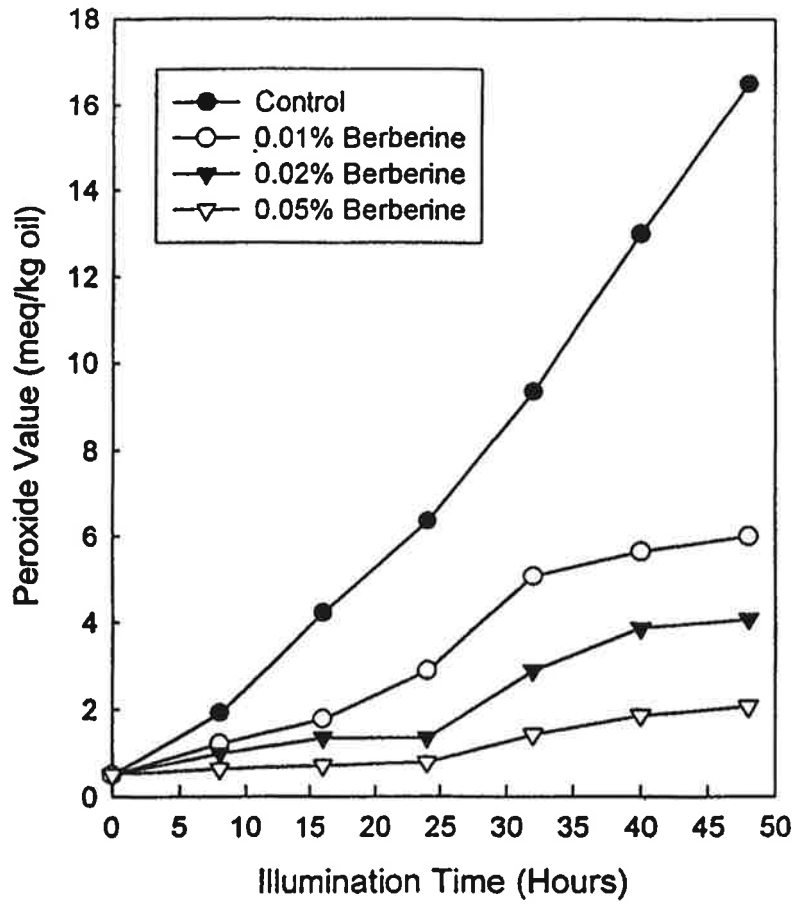


Figure 12-17. Effects of 0.01, 0.02 and 0.05% berberine on the peroxide formation in salad dressing during 48 hr fluorescent light illumination (3300 lux) at 7 ± 2 °C.

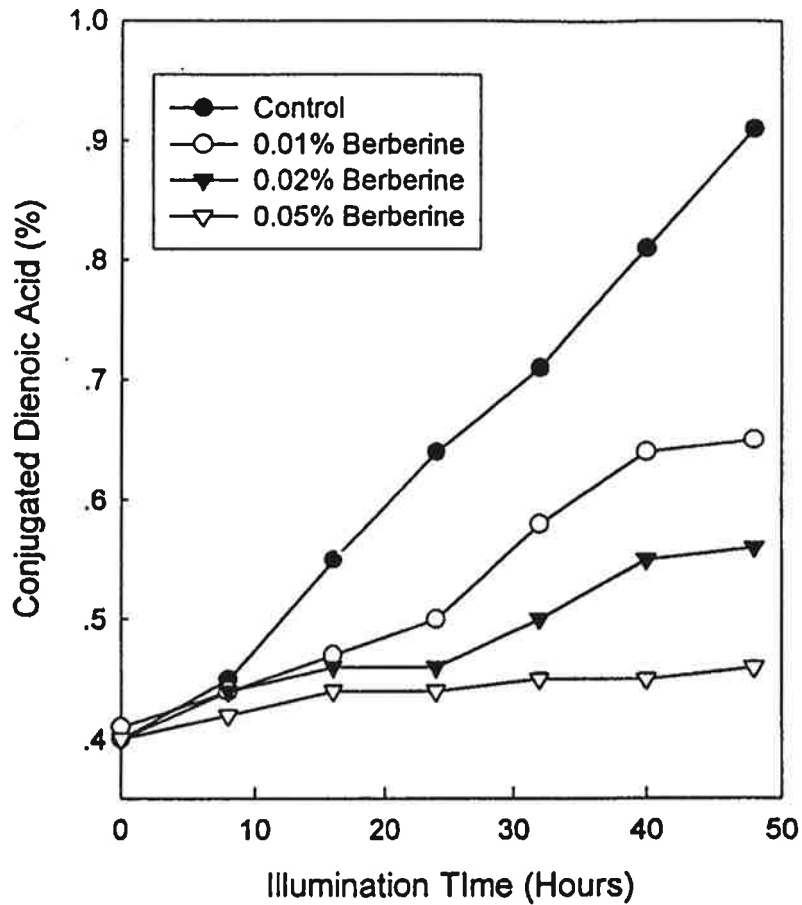


Figure 12-18. Effects of 0.01, 0.02 and 0.05% berberine on the conjugated dienoic acid formation in salad dressing during 48 hr fluorescent light illumination (3300 lux) at 7 ± 2 °C.

IV. 적요

1. 식품 및 생체중의 산화 생성물 hydroperoxide의 분석

- ① 식품 및 생체중의 극미량으로 존재하는 hydroperoxide를 pico mol 이하에서 검출할 수 있는 방법이 강구되어 질병의 진단 및 식품의 산화 안정성을 활립할 수 있는 방안이 강구되어 식품의 보존성 향상에 활용할 수 있을 것이다.
- ② 천연물로부터 저온에서 추출효율을 높일수 있는 방법이 개발되었다. (Ultrasonication 및 pH조절방법) 성분의 변화를 최소화시킴으로써 식품의 품질을 향상시킬 수 있는 제품 개발에 활용할 수 있다.
- ③ 항산화 활성 측정법 개발을 통해서 천연물로부터 항산화 물질을 screening하는데 활용할 수 있을 것이다.

2. 황금으로부터 항산화 활성물질 검색

황금으로부터 항산화력이 뛰어난 ganhaungenine을 발견하였다. 이 물질은 항산화력이 뛰어나기 때문에 식품 및 의약품으로 활용할 가치가 충분하다.

3. 화피로부터 항산화물질의 검색

화피 추출물로부터 항산화력이 뛰어난 물질을 검색한 결과 화피1 이라고 명명한

3-(3,4-dihydroxyphenyl)-4{[3,4,5-trihydroxymethyl-tetrahydro-2H-pyran-2-yl]oxy}-2,5,7-chromanetriol과 화피2로 명명한 3-(3-hydroxy-4-{[2,3,4-trihydroxy-5-(hydroxymethyl)cyclohexyl]oxy}-2,5,7-chromanetriol)

을 검출하였다. 이들 두 물질 역시 항산화력이 뛰어나기 때문에 식품, 의약품 및 화장품 등에 활용할 수 있다.

4. 정공등으로부터 항산화 물질의 검색

정공등으로부터 gallic acid유도체인 2,6-dihydroxy-4-[(4-hydroxyphenyl)peroxy]benzoic acid를 검출하였다.

이 물질은 항산화력이 뛰어나 식품, 화장품, 의약품의 첨가제로 활용할 수 있다.

5. 천연물로부터 항산화물 대량생산

항산화물질을 대량으로 생산하는 방법의 고안으로 이를 산업적으로 활용할 수 있을 것으로 본다.

6. 정향으로부터 극한 고온 가열에서 작용하는 항산화 물질의 검색

정향으로부터 극한 고온에서 유지의 항산화 작용을 나타내는 gallic acid를 밝혀냈다. 이를 유지식품의 제조에 활용할 수 있다.

7. 황련으로부터 항산화 물질의 탐색

황련으로부터 항산화력이 뛰어난 coptisine, jatrorrhizine, Berberine, Magnoflorine등을 검출해 냈다. 이들 중 Berberine이 모델식품 에멀전에서 광산화 억제 효과가 뛰어난 것을 밝혀냈다. 이는 식품의 광산화 억제제로서 활용성이 기대된다.