GOVP1199904435

664.07
L293ㅎ
v.3

제 3 차 년도
최종 연구보고서

항 알레르기성 신기능물질의 탐색

Screening of New Functional Agents with Anti-allergic Activities

1. 항 알레르기 효과검색 및 항 알레르기 기전연구
   Studies of Anti-allergic Actions and Underlying Mechanisms
2. 항 알레르기성 유효성분의 분리
   Separation and Identification of Anti-allergic Components
3. 항 알레르기성 건강식품으로의 개발
   Development of Functional Food Supplements with Anti-allergic Activities
4. 유효성분의 분리 및 유기 합성
   Organic Synthesis of Anti-allergic Components

연 구 기 관

전남대학교 약학대학
전남대학교 농과대학
한국 화학연구소

농 림 부

최 종 보 고 서

1995 년도 농림특정연구사업에 의하여 완료한 항 알레르기성 신기능 물질의 탐색 에 관한 연구의 최종보고서를 별첨과 같이 제출합니다.

첨부 : 1. 최종보고서 8부
2. 최종보고서 디스켓 1매 - Internet 발송
3. 초록 - Internet 발송

1998 . 12 . .

주관연구기관 : 전남 대학교

총괄연구책임자 : 유 경 수 (인)

주관연구기관장 : 직 인

농 림 부 장 관 귀 하

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 "항 알레르기성 신기능 물질의 탐색" 과제 (세부과제 "항 알레르기 효과검색 및 항 알레르기 기전연구", "항 알레르기성 유효성분의 분리", "항 알레르기성 건강식품으로의 개발", "유효성분의 분리 및 유기 합성")의 최종 보고서로 제출합니다.

1998. 12. 20.

주관연구기관명 : 전남 대학교
총괄연구책임자 : 유 경 수
연　　구　　원 : 유 경 수
연　　구　　원 : 박 근 형
연　　구　　원 : 김 경 만
연　　구　　원 : 천 승 훈
협동연구기관명 : 한국 화학연구소
협동연구책임자 : 유 시 용

요 약 문

Ⅰ. 제 목

항 알레르기성 신기능 물질의 탐색

Ⅱ. 연구개발의 목적 및 중요성

알레르기성 질환은 현대 사회에서 매우 심각한 보건문제로서 국민의 약 20%가 이 질환으로 고생하고 있다. 하지만 현재 쓰이고 있는 약품들은 모두 수입에 의존하고 있으며, 또한 그 치료효과가 만족스럽지 못하며 그 부작용 또한 심각한 편이다. 우리는 천연물을 스크리닝하여 항 알레르기 유효성분을 찾던 중 우리 주변에서 손쉽게 구할 수 있는 밤나무잎이 강력한 항 알레르기작용을 지니고 있음을 발견하였다. 한편 밤나무는 막대한 임산자원임에도 불구하고 이용도가 종실채취에 국한되고 있어서 종실 이외의 부위에 대한 활용도 개발을 위한 부가가치 향상이 절실히 요구되고 있는 실정이다.

본 연구에서는 밤나무의 부산물을 이용하여 산, 학, 연 합동 연구개발팀을 형성하여 각 각이 가진 연구인력과 연구시설, 정보 및 자금을 최대한 결집, 활용하여 국민 건강과 복지에 큰 도움이 되는 식품이나 의약품을 개발하고자 본 연구를 진행하였다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

본 연구진은 이 연구과제를 크게 두 가지의 방향으로 진행하였다.

첫째, 우리는 밤나무잎을 항 알레르기성 건강식품으로 개발하고자 하는 연구인데, 이를 위해서 우리는 밤나무 잎의 항 알레르기 효과를 체계적으로 검증하고 동시에 생체 내에서의 안전성, 성분의 구성비, 그리고 성상 등에 관한 연구를 진행

하였다.

둘째, 우리는 또한 밤나무잎을 알레르기성 질환에 대한 치료약으로 개발하고자 한다. 어떤 물질이 의약품으로 승인 받기 위해서는 그 유효성분과 작용기전, 그리고 보다 상세한 독성 실험이 요구된다. 그러므로 우리는 성분의 분획과 약효 검색을 함께 하면서 유효성분을 분리, 동정하였다. 그 다음 단계로 우리는 유효성분의 대량 생산을 위해서 합성방법을 모색하고 그에 따른 구조활성관계를 연구하였다.

위의 연구를 진행하기 위해서 본 연구진은 다음과 같이 4개의 세부과제로 구성되어 있다. 제 1 세부과제 (항 알레르기 효과 검색 항 알레르기 기전연구)에서는 밤나무잎의 추출물의 항알레르기 작용을, 48-hr PCA, 히스타민 유리시험, TNF-α 억제작용 등을 중심으로을 검색하고 더 나아가서, 여러가지의 염증모델에서 그 효능을 평가하였다. 또한 생체내에서 안전성에 대한 실험을 진행하고 다른 연구진이 연구를 진행하는데 assay를 담당하였다. 제 2 세부과제 (항 알레르기성 유효성분의 분리) 에서는약리팀과의 유기적인 협조하에 밤나무 잎의 MeOH 추출물 중에 함유되어 있는 활성본체, 즉 항알레르기효과를 나타내는 약효성분(들)을 분리하여 일차적으로 그 화학구조를 규명였다. 제 3 세부과제 (항 알레르기성 건강식품으로의 개발) 에서는 밤나무잎을 건강 식품으로 허가 받기 위한 예비자료를 준비하는 동시에 가능성 있는 제제로 개발하려는 시도를 병행하면서 다른 기능성에 대해서 연구하였다. 제 4 세부과제 (유효성분의 분리 및 유기 합성) 에서는 유기용매에 추출되는 분획에서 성분분리를 담당하였으며, 유효성분이 분리된 후에 분리된 성분 및 여러 가지의 유도체를 합성함을 목적으로 하였다.

Ⅳ. 연구개발결과 및 활용에 관한 건의

1) 연구개발결과

제 1 세부과제에서는 ① 생체실험과 실험관실험을 통해서 예비실험에서 얻은 결과를 바탕으로 밤나무 잎의 추출물의 항 알레르기작용을 명백히 규명하였다. 생체실험으로에서 밤나무잎 추출물의 수층은 200 mg/kg (복강투여)의 투여량에서 48시간 동종 수동피부아나필락시를 약 90%, 화학적 매개체들에 의한 혈관 투과성 증가를 75-80% 억제하였다. Rat의 복강 비만세포로부터 histamine 유리실험에서 밤

나무잎의 수층 성분은 histamine 유리를 몇 십 μg/ml의 낮은 농도에서도 억제함을 발견하였다. ② TNF-α의 유리실험 및 접촉성피부염에 대한 실험에서는 을 진행하였는데 거의 효과를 나타내지 않았다. 그러므로 밤나무잎 추출물의 약리작용은 degranulation의 억제를 주요 약리기전으로 하며, type IV hypersensitivity에는 별로 영향을 미치지 않고 type I hypersensitivity의 억제를 선택적으로 억제함을 발견하였다. ③ 분리된 성분인 quercetin과 현재 임상적으로 사용되고 있는 ketotifen과 비교 실험에서 quercetin은 ketotifen 보다 더 강력한 degranulation 억제작용을 나타내었다. ④ 생체 내의 안전성 실험에서 밤나무 수추출물은 생체에 극히 안전한 물질로 판명되었다.

제 2 세부과제는 제 1 세부과제팀과 공동으로 "항 알레르기성 유효성분의 분리"를 목표로 강력한 항 알레르기 효과를 보여주는 밤나무 잎 추출물로부터 유효성분 즉 항 알레르기성 물질의 분리를 시도하였다. ① rat의 복강 비만세포로부터 histamine 유리를 저해하는 효과를 지표로 하여 activity-guided fractionation방법에 준하여 밤나무 잎 추출물에 함유된 유효성분을 정제한 결과 처음 시료로 사용한 밤나무 잎의 물 추출물의 항 알레르기효과에 비하여 약 100배정도 탁월한 효과를 보여주는 활성 성분 분획을 얻었다. 또 이 활성성분 분획으로 부터 quercetin을 유효성분을 최종 정제하였으며 화합물의 각종 물리 화학적 성질 및 분광학적 소견을 종합 검토하여 그 화학구조를 규명하였다. ② 밤나무의 활용성을 최대화하기 위해서 과육의 채취 후 폐기하는 밤 속껍질에 대한 항 알레르기 작용을 연구하여 이 부분에도 미량의 quercetin이 함유되어 있음을 확인하였다. ③ 분리된 활성성분이 quercetin과 유사한 분자구조를 지닌 약 20개의 flavonoids에 대해서 구조-활성 관계에 관한 실험을 진행하여 새로운 물질을 합성하는데 필수적인 정보를 제공하였다.

제 3 세부과제는 "항 알레르기성 건강식품으로의 개발"에 관한 연구인데, ① 밤나무 잎을 이용하여 증제차와 유념차를 개발하고 이에 대해서 특허를 출원하였다. ② 제조한 밤나무 잎 차를 식품으로 신청하기 위해서 차를 구성하고 있는 화학성분을 분석하였다. 여기에는 일반성분, 무기성분, 유리당, 비타민 C, 탄닌, 아미노산, 지방산 등의 함량을 측정하였다. ③ 밤나무 잎 차의 항 알레르기성 작용에 대한 연구를 진행하여 유념차와 증제차가 모두 유의성있는 항 알레르기 작용을 지니고 있음이 증명되었다. ④ 밤나무 잎 차의 항균작용을 여러 균주를 이용하여

진행하였다. 밤나무 잎 차의 추출물은, G(+), G(-), lactic acid bacteria, yeasts, molds 중에서, 특히 G(+), G(-) 균의 몇 몇 종에 강력한 효과를 나타내었다. ⑤ 밤나무 잎 차의 항 비만 작용에 관한 연구에서 밤잎 차는 에너지 섭취가 증가된 만큼의 체지방의 증가는 유도하지 않은 등, 흥미로운 항 비만효과를 나타내었다. ⑥ 밤나무 잎 차의 저장 안전성에 대한 실험에서 제조된 밤잎 차는 포장 및 저장조건에 크게 영향을 받지 않고 1년 정도는 안정된 수색을 유지하였다.

제 4 세부과제에서는 "유효성분의 분리 및 유기합성"에 대한 연구를 진행하였다. ① 밤나무 잎의 비수용성 추출물에서 우수한 in vitro 항 알레르기 효과를 나타내는 성분은 quercetin이라는 사실을 규명했다. ② quercetin의 합성에 성공하여 다량 합성이 가능하게 되었다. ③ quercetin과는 상이한 구조를 지닌 일련의 oxazolidine 유도체를 합성하였으며, 각각에 대한 약리효과를 검정하여 최적의 물질을 유추하였다.

2) 활용에 대한 건의

본 연구를 통해서 본 연구진은 밤나무 잎이 차의 형태로 개발될 수 있으며, 생체에 투여시 안전한 기능식품으로 개발될 수 있음을 증명하였다.

앞으로 항 알레르기성 기능성 차로 시판될 경우, 알레르기 환자의 치료목적 뿐만 아니라 계절적으로 알레르기 증상 때문에 고생하는 환자들이 이 차를 미리부터 복용함으로써 알레르기 증상을 예방할 수 있다고 판단된다. 뿐만 아니라 이 식품은 항 알레르기성 효과 외에도 미생물 성장의 억제 및 항 비만작용 등의 다양한 기능성을 지니고 있음이 증명되어 커다란 장점으로 생각된다.

특히 이 식품은 농촌에서 흔한 밤나무잎을 원료로 사용하므로 경쟁력이 있고, 여러 가지의 훌륭한 약리효과를 지니고 있으므로 그 성공 가능성이 매우 크다. 따라서 본 연구는 우리의 농촌경제에 커다란 도움이 될 수 있는 기능성식품의 개발로 판단된다. IMF의 경제난이 어느 정도 진정되면 상품화하는 절차를 반드시 추진해야 한다고 생각된다.

SUMMARY

Ⅰ. Title

Screening of New Functional Agents with Anti-allergic Activities

Ⅱ. Objectives and Significances

Allegy is considered as an abnormal biological defense mechanism, and it brings in numerous annoying physiological consequences such as hay fever, rhinitis, atopic dermatitis, bronchial asthma, and anaphylactic shock. To develop effective agents of the treatments of allergic diseases, over 30 different potential natural products were screened for their anti-allergic actions. The leaves of Castanea crenata showed potent anti-allergic activities, and we conducted series of studies to develop it as valuable resources for the managements of allergic diseases.

Ⅲ. Contents

Two different approaches were used for this project.

First, the isolation and structure determination of the key component(s). The extracts from the leaves of chestnut tree were fractionated and each fraction was tested for its anti-allergic activities in *in vitro* and *in vivo*. This process was continued until the fraction contained a pure compound. The structure of the active compound was determined by spectroscopic methods and verified by total synthesis. Structure-activity relationship studies were initiated to increase the anti-allergic activity of this compound.

Second, development of functional food supplement (non-fermented and fermented steaming tea) from the leaves of chestnut tree. The anti-allergic activity, safety, stability, and the compositions of various ingredients of the tea were determined

Ⅳ. Results and Applications

This project was carried out by four different but related research groups. The first group evaluated the anti-allergic activities in *in vitro* and *in vivo* and studied the anti-allergic mechanism of action(s). The aqueous extract of the leaves of chestnut tree strongly suppressed the 48hr-PCA and the mediators-induced vascular permeability increases. It also inhibited the histamine release from rat mast cells (IC_{50} was about 30 μM), but it failed to suppress the TNF-α release and contact dermatitis. It did not cause any noticeable toxicities when administered intraperitoneally or orally.

The second research group isolated and identified active component from the aqueous extract of chestnut tree leaves by bioassay-directed fractionation method. The suppression of β-hexosaminidase release (degranulation marker) from RBL-2H3 cells were employed as a guidance. The active component was identified as quercetin. The structure-activity relationship of quercetin type of commercially available flavonoids was also studied for suppressing the degranulation event.

The third research group developed tea products (fermented and non-fermented steaming teas) using the leaves of chestnut tree. The chemical compositions (inorganic components, sugar, vitamin C, tannin, amino acids, fatty acids) and the stability of tea products were studied, and the patent for processing procedures of tea products was obtained. Prepared tea products showed variety of biological activities including potent anti-allergic activities,

anti-microbial activities (G(+), G(-), lactic acid bacteria, yeasts, molds), and anti-obesity activities.

The fourth research group isolated and identified active component from the organic extracts of chestnut tree leaves by bioassay-directed fractionation method using the same assay as the second group. The active component from the organic extracts was the same as from the aqueous extracts. The synthetic pathway for quercetin was established to verify the structure and to synthesize analogs. In addition, the structure-activity relationship studies of over 30 different oxazolidine derivatives were carried out to find a different lead compound.

대한민국국회도서관장서

CONTENTS

SUMMARY (in Korean) 4

SUMMARY 8

CONTENTS 11

CONTENTS (in Korean) 12

Chapter 1 Introduction 13

Chapter 2 Studies of Anti-allergic Actions and Underlying Mechanisms 17

Chapter 3 Seperation and Identification of Anti-allergic Components 31

Chapter 4 Development of Functional Food Supplements with Anti-allergic Activities 45

Chapter 4-1 Preparation of Tea Products and Studies of Chemical Compositions 51

Chapter 4-2 Functional Studies of Prepared Tea Products 65

Chapter 4-2-1 Studies of Anti-allergic Actions 65

Chapter 4-2-2 Studies of Anti-microorganism Actions 68

Chapter 4-2-3 Studies of Anti-obesity Actions 76

Chapter 4-3 Stability Tests of Prepared Tea Products for Long-term Storage 83

Chapter 5 Organic Synthesis of Anti-allergic Components 94

Chapter 6 The Summary of Experimental Results and Further Opinions for Practical Applications 115

목　　　차

요약문 4

SUMMARY 8

CONTENTS 11

목 차 12

제1장 서론 13

제2장 제 1 세부과제 : 항 알레르기 효과검색 및 항알레르기 기전 연구 17

제3장 제 2 세부과제 : 항 알레르기성 유효성분의 분리 31

제4장 제 3 세부과제 : 항 알레르기성 건강식품으로의 개발 45

제4-1장 밤나무잎을 이용한 차의 제조 및 화학성분의 분석 51

제4-2장 밤나무 잎차의 기능성 검색 65

제4-2-1장 항 알레르기 효과 65

제4-2-2장 항 미생물 활성효과의 탐색 68

제4-2-3장 항 비만성 효과의 검색 76

제4-3장 밤잎차의 저장 안정성 83

제5장 제 4 세부과제 : 유효성분의 분리 및 유기합성 94

제6장 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의 115

제 1 장 서 론

제1절 연구개발의 목적과 범위

제1항 연구개발의 목적

지금 세계는 WTO 체제 출범으로 무한 경쟁체제하에서 본격적으로 국제화, 개방화 시대로 돌입하였다. 특히 농업 분야는 중국과 미국 같은 나라들이 광대한 토지와 인력을 무기로 파상적으로 공격하고 있어 우리 농촌의 존립을 위태롭게 하고 있다. 이러한 자유 경쟁체제에서 인력과 토지의 크기로 비교가 되지 않는 국가들과 같은 방법, 같은 품목으로 대결한다는 것은 현명치 못한 방법이며, 농림수산기술이 기후나 토양 등 자연환경에 따라 이전이나 모방이 어려운 각자의 지역성을 갖는다는 점을 이용하여 우리 나름 대로의 첨단 기술을 이용한 고 부가치성 산업을 육성하여 국제 경쟁력을 배양하는 것이 마땅하다.

이러한 국제사회의 상황을 인식한 우리 정부도 여러 각도로 농림수산분야에서의 경쟁력을 확보하려고 노력하고 있다. 벌써 농특세를 투입하여 농림수산기술 개발에 박차를 가하고 있고 효율적인 재원활용과 기술 발전을 위해서 중장기 계획을 수립하고 있으며 농림수산업의 경쟁력을 증가시키려고 관계법령 및 제도를 정비하여 정부의 개술개발지원 기능을 강화하고 있다.

현대 사회에서 알레르기성 질환은 대단히 심각한 문제이다. 알레르기 질환이란 면역기관의 과민반응에 의해 다양한 임상증상을 나타내는 질환이다. 알레르기를 일으키는 allergen은 외래물질로서 집진드기, 화분, 각종 공해물질, 음식, 미생물 분비물 등이며 사람에 따라 종류가 다양하다. 뿐만 아니라 국내외에서 알레르기질환을 가진 환자들의 수는 산업화에 따른 수질, 대기 및

해양오염 등의 증가로 해마다 늘어가고 있는 실정이며 선진국에서는 대략 인구 20% 정도가 한가지 이상의 allergen에 대하여 반응한다는 보고가 있으며 우리 나라는 수년 내에 선진국 수준으로 문제시 될 것으로 전망된다.

본 연구진은 많은 천연물을 스크리닝하여 항 알레르기 유효성분을 찾던 중 우리 주변에서 손쉽게 구할 수 있는 밤나무잎이 강력한 항 알레르기작용을 지니고 있음을 발견하였다. 밤나무는 유실수로서 전국 87,000 ha의 재배면적에서 년간 101,742톤의 종실을 생산하는 막대한 임산자원이다. 특히 전라남도의 경우 94년 현재 19,000 ha의 재배면적에 6,430,000 주가 식재되어 있고, 13,000 농가로부터 년간 23,000 여톤의 종실을 생산하여 약 250 억원의 소득을 올리는 전략적 임산자원이다. 그러나 밤나무가 이처럼 막대한 임산자원임에도 불구하고 이용도가 종실채취에 국한되고 있어서 종실 이외의 부위에 대한 활용도 개발을 위한 부가가치 향상이 절실히 요구되고 있는 실정이다.

위에서 언급한 바와 같이 밤나무의 부산물을 이용하여 산, 학, 연 합동 연구개발팀을 형성하여 각 각이 가진 연구인력과 연구시설, 정보 및 자금을 최대한 결집, 활용하여 국민 건강과 복지에 큰 도움이 되는 식품이나 의약품을 개발하고자 본 연구를 진행하였다.

제2항 연구개발의 내용

본 연구진은 이 연구과제를 크게 두 가지의 방향으로 진행하였다.

첫째, 우리는 밤나무잎을 항 알레르기성 건강식품으로 개발하고자 하는 연구인데, 이를 위해서 우리는 밤나무 잎의 항 알레르기 효과를 체계적으로 검증하고 동시에 생체 내에서의 안전성, 성분의 구성비, 그리고 성상 등에 관한 연구를 진행하였다.

둘째, 우리는 또한 밤나무잎을 알레르기성 질환에 대한 치료약으로 개발하

고자 한다. 어떤 물질이 의약품으로 승인 받기 위해서는 그 유효성분과 작용기전, 그리고 보다 상세한 독성 실험이 요구된다. 그러므로 우리는 성분의 분획과 약효 검색을 함께 하면서 유효성분을 분리, 동정하였다. 그 다음 단계로 우리는 유효성분의 대량 생산을 위해서 합성방법을 모색하고 그에 따른 구조활성관계를 연구하였다.

본 연구진은 다음과 같이 4개의 세부과제로 구성되어 있다.

① 제 1 세부과제 : 항 알레르기 효과 검색 항 알레르기 기전연구

본 연구에서는 밤나무잎의 추출물의 항알레르기 작용을, 48-hr PCA, 히스타민 유리시험, TNF-α 억제작용 등을 중심으로을 검색하고 더 나아가서, 여러가지의 염증모델에서 그 효능을 평가하였다. 또한 생체내에서 안전성에 대한 실험을 진행하고 다른 연구진이 연구를 진행하는데 assay를 담당하였다.

② 제 2 세부과제 : 항 알레르기성 유효성분의 분리

본 세부연구과제의 최종목표를 한마디로 요약하자면 약효연구팀과의 유기적인 협조하에 밤나무 잎의 MeOH 추출물 중에 함유되어 있는 활성본체, 즉 항알레르기효과를 나타내는 약효성분(들)을 분리하여 일차적으로 그 화학구조를 규명하고자 함이라고 할 수 있겠다.

③ 제 3 세부과제 : 항 알레르기성 건강식품으로의 개발

예비 실험에서 밤나무 잎은 강력한 항 알레르기 작용을 보였으므로 우수한 건강식품으로의 개발 전망이 대단히 밝다. 그러므로 본 세부과제의 목적은 밤나무잎을 건강 식품으로 허가 받기 위한 예비자료를 준비하는 동시에 가능성 있는 제제로 개발하려는 시도를 병행하면서 다른 기능성에 대해서 연구하는

것이다.

④ 제 4 세부과제 : 유효성분의 분리 및 유기 합성

제 2세부과제는 수용성에서 성분 분리를 담당하고 본 세부과제는 유기용매에 추출되는 분획에서 성분분리를 담당하였으며, 유효성분이 분리된 후에 분리된 성분 및 여러 가지의 유도체를 합성함을 목적으로 하였다.

아래의 왼쪽은 본 연구진이 처음 연구 신청서에서 추진하기로 제안한 연구 내용이고 오른 쪽은 실재로 진행한 연구내용을 나타낸 것이다.

제 안 내 용	실 시 내 용
1. 동물모델 및 실험관 실험을 통한 항 알레르기 효과검색	48-hr PCA, 혈관투과성, histamine 유리 및 hexosaminidase assay, safety test 등을 진행함.
2. 분말이나 음료수 등의 식품으로의 개발	차의 형태로 개발함.
3. 항 알레르기 성분의 확인 및 제제화	유효성분을 quercetin으로 확인했고, 증제차와 유념차의 형태로 개발함.
4. 항 알레르기 성분 효능에 대한 작용기전 규명	Degranulation억제가 주용기전임을 증명함.
5. 활성 성분의 합성화 방안 모색	약 20종의 유도체까지 합성하여 구조-활성 연구를 진행함.

제 2 장 항 알레르기 효과 검색 및 항 알레르기 기전연구

제1절 연구 개발 목표

본 연구진은 새로운 항알레르기 약물을 개발하기 위하여 가능성이 있는 20 여종 이상의 천연물에 대한 연구를 수행하던 중 밤나무잎에서 추출한 유효성분이 강력한 항 알레르기 작용을 가지고 있음을 발견하고 생체실험 및 실험관실험을 통하여 그 약효를 규명하였다. 한편, 밤나무잎은 민간약으로서 알레르기질환에 사용되었다는 예는 있으나 그 구체적인 약리작용이 연구논문이나 학계에 보고된 적은 없다.

우리는 밤나무잎에서 추출한 유효성분의 항알레르기 작용을 평가하기 위하여 여러 가지 항알레르기작용의 평가실험을 실시하였다.

첫째, 실험동물을 이용한 생체실험을 실시하였다. 여기에 해당하는 사항은 48 시간 수동적 피부아나필락시 (48 hr-passive cutaneous anaphylaxis)와 화학적 매개체인 히스타민, 세로토닌, compound 48/80 등에 의한 혈관투과성 증가에 대해서 밤나무잎에서 추출한 유효성분이 미치는 영향을 살펴본 실험이다.

둘째, 실험동물에서 얻은 생체조직의 일부를 이용한 실험관 실험을 실시하였다. 우리는 래트의 복강에서 얻은 비만세포를 이용하여 히스타민유리에 미치는 밤나무잎에서 추출한 유효성분의 효과를 연구하였다.

제2절 실험방법

제1항 Rat Peritoneal Mast Cells에서 histamine 유리에 관한 실험

Peritoneal mast cells은 Foreman과 Mongar의 방법으로 준비했다. Rats에 DNP-specific rat Ig E (titer=27, 1:10 dilution, 0.5 ml)를 복강에 주사하여 sensitize 시키고 48 시간 후에 heparin 용액 (10 units/ml, HBSS)를 복강으로 주입하여 peritoneal cells의 현탁액을 제조하였다. Cell suspensions을 10분간 pre-incubation 한 후 DNP-BSA를 가한 후 다시 10 분간 배양하였다. 유리된 histamine의 량은 spectrofluorometer 방법으로 정량하였다.

제2항 Hexosaminidase Assay

예전에 많이 쓰이던 히스타민의 정량법 (Nagai et al., 1983)은 rat의 세포를 직접 사용하는 장점은 있으나 그 과정이 대단히 길고 복잡하여 실험결과 또한 재현성이 그다지 우수하지 못하였다. 이러한 이유로 최근에는 대부분의 알레르기 실험실에서는 그 단계가 훨씬 짧으나 동일한 의미의 결과를 얻을 수 있는 hexosaminidase assay를 이용한다. Hexosaminidase는 히스타민과 동일한 granule에 저장되어 있다가 자극이 들어오면 히스타민과 함께 분비되기 때문에 hexoaminidase를 정량하는 것은 히스타민의 량을 정량하는 것과 같은 의미를 지니고 있다.

세포를 siraganian buffer로 씻은 후 siraganina buffer에서 preincubation 한다. 작용을 보고 싶은 물질을 가한 후 37 oC 에서 10 분 동안 incubation 한다. 얼음에 방치한 후 상층액을 취하여 30 초 동안 원심분리 한다. 각 sample을 96 well plate에 가한 후 substrate로써 p-nitrophenyl-N-acetyl-β-D-glucosaminide를 가한다. 한 시간 동안 37 oC 에서 incubation 후 bicarbonate buffer를 가하여 400 nm에서 흡광도를 측정한

다.

제3항 48 hr-passive cutaneous anaphylaxis (48hr-PCA)

Rat 등피부에 IgE 용액 0.1 ml을 등피내에 주사하고 48 시간 동안 감작시킨다. 항원 으로써 DNP-BSA 5 mg/Kg 과 evans blue 20 mg/Kg을 꼬리정맥으로 주사하고 30 분후 누출된 색소의 량을 620 nm에서 흡광도를 측정한다.

제4항 TNF-α의 분비 억제

현재 약물에 의한 TNF-α의 분비저해 효과는 in vitro에서 평가하였다. Murine macrophage cell line인 RAW264.7 세포를 2X106 cells/ml 농도로 RPMI 1640 배지에서 24 well plate에서 18 시간 동안 배양하였다. 이 후 1 μg/ml의 lipopolysaccharide (LPS)로 TNF-α의 분비를 유도한 후 밤잎 추출물을 DMSO에 녹여서 LPS와 동시에 처리하여 37 oC CO2 incubator에서 6 시간 매양하였다. 배양액을 2 분간 원심분리 (48,000 x g) 후 상등액을 취하여 분비된 TNF-α 량을 ELISA로 정량하였다. 정량시에는 mouse TNF-α ELISA kit (Amersham)을 사용하였으며 % inhibition은 LPS 단독 처리군의 TNF-α 량과 비교하여 계산하였다.

제5항 접촉 알레르기성 피부염에서의 약효 평가

5 주된 BAlb/c mouse의 털을 제거한 후 1% FITC 용액 200 μl를 복부에 골고루 도포하고 6일 후 이용액 20 μl를 오른쪽 귀에 도포하여 재잠작시켰다. 재감작 후 24 시간/48시간 후에 귀 두께를 Dial thickness gauge로 측정하여 swelling %를 구하고 이로부터 약물의 효과를 판정했다.

이방법의 특징으로는 '1) 실험조작이 간편하여 정량성과 재현성이 우수하므로 약물의 초기 약효평가에 적합하다. 2) 염증의 수치화가 용이하다. 3) 항

원항체반응, 항염증약, 항알레르기약등의 약효평가 및 작용기전의 해석에 이용된다. 4) 외용제의 약효평가에 이용할 수 있다.' 등을 들 수 있다.

제3절 실험 결과

제1항 밤나무 잎에서 유효성분의 추출

밤나무의 잎을 통풍이 잘되고 햇빛이 들지 않는 장소에서 건조한 후, 환류 냉각기가 설치된 둥근 flask에 100g의 밤나무잎에 1 l 의 증류수를 가하여 2 시간 동안 직화한 후 상등액을 취하여 뜨거운 상태에서 와트만 1번 여과지로 여과한다. 생약잔사에 다시 증류수 700 ml를 가하여 위의 과정을 반복한다. 여과액을 합친 후 0.22 ㎛의 구멍 크기의 여과 장치로 여과한 액을 수추출물이라고 한다. 일부는 감압 증류기로 농축하여 분말을 제조하고 일부는 농축하지 않고 클로르포름, 에틸아세테이트 및 부탄올로 순차적으로 추출하고, 각각의 추출액을 클로르포름층, 에틸아세테이트층 및 부탄올층이라고 명명하였다. 마지막까지 남아 있는 물층을 수층이라고 명명하였다.

제2항 항알레르기 효과실험

제2-1항 48시간 수동피부아나필락시 (48 hr-cutaneous anaphylaxis, 48 hr-PCA)

48 hr-PCA는 알레르기 반응의 중요한 특징 중의 하나인 모세혈관 투과성 항진을 이용하여 알레르기 반응에서 나타나는 전신성 아나필낙시를 동물실험으로 모식화한 것으로 알레르기 반응의 거의 모든 조건을 갖추고 있으므로 항

알레르기약의 스크리닝에 일반적으로 쓰이고 있다. 48 hr-PCA가 유발되면 혈관투과성이 증가되어 정맥으로 주사한 색소가 혈관내에서 조직으로 이행되므로 검증하고자 하는 약물을 투여한 후 조직에서의 색소의 량을 정량하여 약물의 항알레르기작용을 연구한다. 항알레르기 약물을 처리하면 혈관투과성이 회복되므로 조직으로 이행되는 색소의 량이 감소한다.

실험 결과는 하기 표 1에 나타내었는데, 복강투여의 경우 (표 1-1) 밤나무잎 수추출물을 항원을 투여하기 1 시간 전에 200 mg/kg의 용량으로 복강 내에 투여하였다. 대조군에는 밤나무잎 수추출물 대신 생리식염수를 투여하였다. 대조군은 약물처리를 하지 않았으므로 48 hr-PCA에 의해 유도된 혈관투과성증가로 인하여 정맥주사한 색소가 다량 조직으로 이행됐으나 (74 μg) 처리군의 경우 실험적으로 유도된 혈관투과성 증가가 밤나무잎 수추출물에 의해서 억제되어 소량만이 혈관내에서 조직으로 이행되었음을 보여주고 있다 (7.5 μg). 즉, 유도된 알레르기 반응 (48 hr-PCA)이 밤나무잎 수추출물에 의해서 현격히 (90%) 억제된 것으로 보아 밤나무잎 수추출물은 매우 강력한 항알레르기작용을 지니고 있음을 보여준다.

표 1. 48 시간 수동피부아나필락시에 미치는 밤나무 수추출물의 효과 (복강 투여)

	누출색소의량 (μg/spot)
대조군	74.0 ± 10.8
밤나무잎 수추출물 처리군	7.5 ± 0.2*
억제률 (%)	90.0 ± 13.3

실험치는 누출색소의량의 평균 ± 표준편차를 나타내며 한 구릅에 6 마리씩의 동물이 사용되었다. 억제률은 (대조군 - 처리군)/대조군 x 100 으로 계산하였다.
* : $p < 0.01$

제2-2항 화학적 매개물질에 의한 혈관투과성증가에 대한 수추출물의 효과

화학적 매개체에 의한 혈관투과성증가에 대한 실험 역시 실재 알레르기 반응이나 이를 수반한 염증반응에서 일어나는 현상을 실험 모델화 시킨 것이다. 이 경우에는 48 hr-PCA와는 달리 항원-항체의 반응을 이용하는 것이 아니고 화학적 매개체를 피부내로 직접 주사하여 혈관투과성을 증가시킨 후에 검증약물이 이것을 억제하는지를 연구하는 것이다. 이때도 혈관투과성이 증가되므로 정맥 주사된 색소가 혈관내에서 조직으로 이행되는데 항알레르기/항염증 약물은 이 현상을 차단하므로 조직으로 이행되는 색소의 량이 감소된다.

실험결과는 하기 표 2 에 나타내었는데, 밤나무잎 수추출물은 각 화학적 매개체에 의한 혈관내에서 조직에로의 색소의 이행을 유의성있게 억제하였다. 이 결과는 밤나무잎 수추출물이 화학적 매개체에 의한 혈관투과성 증가를 억제하므로 알레르기나 염증의 치료에 유용함을 보여 주고 있다.

표 2 : 쥐의 등피부에서 화학적 매개물질에 의해 증가된 혈관투과성에 밤나무잎 수추출물이 미치는 효과

	누출색소의량 (μg/spot)		
	히스타민	세로토닌	화합물48/80
대조군	15.3 ± 3.08	8.7 ± 1.1	15.5 ± 2.5
밤나무잎 수추출물군	2.7 ± 0.2*	1.7 ± 0.2*	3.8 ± 0.2*
억제률 (%)	82.6 ± 17.7	80.2 ± 13.7	75.5 ± 12.8

실험치는 누출색소의량의 평균 ± 표준편차를 나타내며 한 구룹에 6 마리씩의 동물이 사용되었다. 억제률은 표 1 과 같은 방식으로 계산하였다.
* : $p < 0.01$

제2-3항 밤나무의 추출물이 복강 비만세포에서 히스타민의 유리에 미치는 영향

복강 비만세포에서의 히스타민의 유리 억제 시험은 알레르기 반응에서 매우 중요한 역할을 하고 있는 비만세포의 탈과립에 대한 약물의 효과를 보는 실험이다. 위에서 언급한 것처럼 비만세포내에는 염증의 생성과 진행에 중요한 역할을 하는 많은 화학적 매개체들이 저장되어 있다가 함께 유리되므로 이 실험은 어떤 물질의 항알레르기 작용의 평가에 매우 중요한 의미를 지니고 있다. 본 연구진은 먼저 밤나무잎 수추출물이 래트의 복강 비만세포에서 히스타민의 유리에 미치는 효과를 살펴보았다. 표 3에 나타난 것 처럼 밤나무잎 수추출물은 래트의 복강 비만세포에서 히스타민의 유리를 강력히 억제하였다.

표 3. 수추출물이 래트의 복강 비만세포에서 히스타민의 유리에 미치는 영향

시험약	처리농도	히스타민 유리량 (ng/ml)	억제률 (%)
히스타민 총량		1738.3	
대조군		465.63 ± 52.6	
수추출액	1 mg/ml	142.24 ± 9.30	69.5 ± 13.9*

유리된 히스타민 측정치는 4회 실험에서 측정한 값의 평균 ± 표준편차를 나타낸다. * : $P < 0.01$

제2-4항 밤나무의 추출물과 히스타민의 유리의 억제간의 용량-반응 관계

표 4. 밤잎 추출물과 히스타민 유리억제간의 용량-반응 관계

시험약	처리농도 (μg/ml)	히스타민 유리량 (ng/ml)	억제률(%)
히스타민 총량		590.1 ± 42.1	
대조군		111.7 ± 15.2	
수추출액	1,000	33.3 ± 1.4	70.2 ± 16.7
	300	49.6 ± 9.3	55.6 ± 17.7
	100	51.3 ± 6.3	54.1 ± 16.5
	30	61.0 ± 6.4	45.4 ± 16.0

유리된 히스타민 측정치는 4회 실험에서 측정한 값의 평균 ± 표준편차를 나타낸다.

제2-5항 밤나무잎 추출물이 TNF-α의 유리에 미치는 영향

TNF-α는 초기 암세포를 제거하는 매우 유용한 cytokine의 하나로 인정되면서 많은 연구가 진행되었으나 최근 여러 염증반응 및 류마티스성 관절염, 전신홍반성 낭창 등과 같은 자가 면역반응이나 여러 알레르기반응 등을 매개하며, 패혈증 및 말라리아 등에서 과다분비에 의한 쇼크 등을 유발하는 원인 물질로 밝혀지면서 TNF-α분비억제 약물들의 개발이 매우 빠르게 진행되고 있다. 따라서 TNF-α 분비억제 평가는 약물의 일차적인 항염 및 항알레르기 효과 검색에 매우 중요하다. 밤잎 수층 (0.1 mg/ml), column 수층 (0.05 mg/ml0, 20% methanol 층 (0.05 mg/ml), 100% methanol 층 (0.05 mg/ml)에 대해서 TNF-α 억제효과를 in vitro에서 평가해 본 결과 위의 분획은 TNF-α의 분비를 억제하지 않았다. 이 결과는 밤잎 추출물의 항 알레르기 효과는 TNF-α의 분비의 억제가 아니고 다른 target에 작용한다고 생각된다.

표 5. 밤잎 추출물이 TNF-α의 분비에 미치는 영향

시험약	처리농도 (mg/ml)	억제률 (%)
수층	0.1	-3.8 ± 3.1
Column 수층	0.05	5.8 ± 2.7
20% MeOH층	0.05	-4.3 ± 2.4
100% MeOH층	0.05	-20.1 ± 4.1

제2-6항 접촉 알레르기성 피부염에서의 약효 평가

지연형 과민반응은 특이하게 감작된 T-lymphocyte에 의해서 시작되며, 이는 항원제시세포(antigen-presenting cell)의 표면에 있는 항원을 인식하게 되고, memory T-lymphocyte를 형성한다. 이때 개체가 동일한 항원에 다시 노출된 경우 memory T-lymphocyte는 분열을 하여 수가 많아지며 여러 종류의 lymphokine을 분비하게 된다. 분비된 lymphokine들은 염증세포를 불러모으고 활성화시키며 염증세포를 병소에 머무르게 하는 등의 작용을 하여 염증반응을 더욱 증폭시킨다. 접촉성피부염 모델은 상피세포를 외인성 hapten에 노출시켜 지연형 과민반응을 일으키고 이를 정량화하는 것으로 세포매개 면역반응의 간단한 in vivo assay법이다.

본 실험에서 밤잎 수층 (10, 100, 200 mg/kg)은 FITC로 인한 귀의 부종을 억제하지 않았다. 이 결과는 밤잎이 PCA test에서 확실한 효과가 있었으므로 알레르기의 가장 많은 부분을 차지하는 type I 과민반응에 선택적으로 효과가 있는 것으로 사료된다.

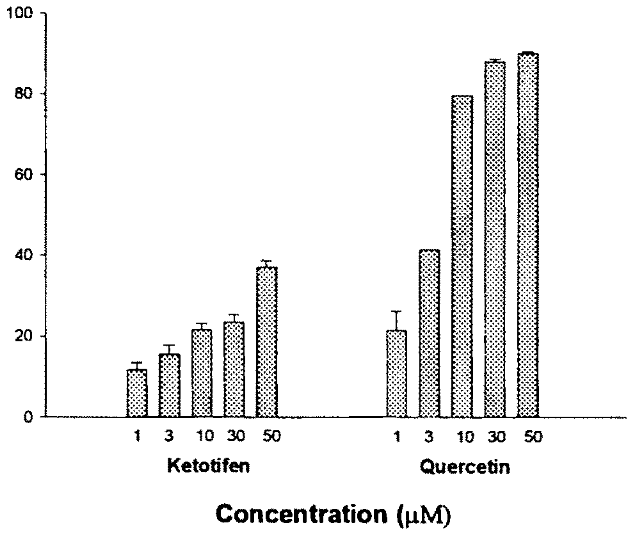
표 6. 밤잎 추출물의 접촉성 알레르기 반응에 대한 효과

시험약	용량 (mg/kg)	억제율 (%) 24 hr	48 hr
Normal		6.97	6.37
Control (FITC)		59.1	35.6
Dexamethasone	10	30.3*	28.3
밤잎 수층	10	67.2	36.0
	100	70.6	23.7
	200	93.4	38.9

* : significantly different from control group ($p < 0.01$)

제2-7항 분리된 유효성분의 약리효과의 확인

최종 분리된 성분이 quercetin으로 확인되었으므로 이 물질과 현재 임상적으로 사용되고 있는 ketotifen과의 약리 작용을 비교하였다. 아래의 그림에서 보는 바와같이 quercetin은 ketotifen보다 훨씬 더 강력하게 degranululation을 억제하였다. 한편, quercetin은 PCA도 억제하는 것으로 보고되어 있다.



제2-8항 밤나무 잎 추출물의 안전성 실험

제2-8-1항 밤나무잎 추출물의 제조

밤나무잎의 추출물은 위에 기술한 방법으로 제조하였다.

제2-8-2항 안전성 실험

밤나무잎 추출물에 대하여 소요농도 (500 mg/kg)를 생리식염수에 현탁하여 마우스 (ICR, female, 7 마리/군)에 하루에 한번 5일간 경구 투여 후 시간의 경과에 따른 몸무게의 변화, 치사율, 행동양태, 주요 장기의 무게 변화 등을 관찰하였다.

제2-8-2a항 몸무게의 변화

실험 전과 실험 후에 측정하여 비교하였으나 두 군간의 몸무게의 차이는 발견되지 않았다.

표 7. 밤나무잎 추출물이 몸무게에 미치는 영향

군	용량 (mg/kg)	몸무게 (g)	
		시험전	시험후
시험군	500	22.7 ± 0.05	26.2 ± 0.51
대조군 (정상)		22.4 ± 0,95	28.0 ± 0.85

제 2-8-2b 항 주요 장기의 무게

주요 장기의 무게 변화에 있어서 시험군과 대조군 (정상) 간의 장기무게의 변화는 관찰되지 않았다.

표 8. 밤잎 추출물이 주요 장기의 무게에 미치는 영향

군	용량 (mg/ml)		장기무게/몸무게 (%)
시험군	500	비장	0.29 ± 0.03
		간	5.11 ± 0.16
대조군 (정상)		비장	0.26 ± 0,02
		간	4.87 ± 0.12

제2-8-2c항 치사율, 행동양태, 조직소견

상기 시험물질에 의한 시험기간 중 치사 및 이상행동, 시험물질 투여 후 30일 경과 시점에서 주요 장기간의 대한 특이한 이상 현상은 관찰되지 않았다.

이상의 실험결과로부터 밤나무잎의 추출물의 생체 안전성은 극히 양호하므로 밤나무잎 추출물을 유효 성분으로 함유하여 구성되는 조성물은 전술에서 설명한 바와 같이 항 알레르기 효과가 입증되는 바 체내의 안전한 알레르기성 질환의 치료제로 이용할 수 있다.

상기의 실험결과에서 나타난 바와 같이 생체실험에서 밤나무 잎의 수추출

물과 수층은 200 mg/kg (복강투여)의 투여량에서 48시간 동종 수동피부아나필락시를 약 90%, 화학적 매개체들에 의한 혈관 투과성 증가를 75-80% 억제하였다. Rat의 복강 비만세포로부터 histamine 유리실험에서 밤나무잎의 추출물의 여러 분획 중, 수추출물과 수층에서만 약리학적 활성이 발견되었는데 1 mg/ml의 농도에서 histamine 유리를 약 70% 억제하였다. 수층 성분을 이용한 용량-반응실험에서 histamine 유리는 몇 십 μg/ml의 낮은 농도에서도 억제함을 발견하였다. 또한 안전성 실험에서 밤나무 수추출물은 생체에 극히 안전한 물질로 판명되었다.

제4절 참고문헌

Cox,J. S. G. (1986) disodium cromoglycate (FPL 670'intal') (1986) A specific inhibitor of reagenic antibody-antigen mechanisms. *Nature* **216**: 1328-1329.

Dahlen, S. E.,Hansson, G., Hedqvist, P., Bjork, T., Granstrom, E. and Dhalen, B. (1983) Allergen challenge of lung tissue form asthmatics elicits bronchial construction that correlates with the release of leukotriene C_4, D_4, and E_4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**: 1712-1716.

Ishizaka, T., Ishizaka, K., Conrad, D. H. and Foese, A. (1978) A new concept of triggering mechanisms of IgE-mediated histamine release. *J. Allegy Clin. Immunol.* **61**: 320-330.

Koda, A., Nakai, H., Watanabe, S., Yanagihara, Y. and Sakamoto, K (1976) Inhibition of hypersensitivity reactions by a new drug, N(3',4'-dimethoxy cinnamoyl) anthranilic acid(N-5). *J. Allergy Clin. Immunol.* **57**: 396-407.

Kulczycki, A. and Metzger, H (1974) The interaction of Ig E with rat

basophilic leukemia cells. II. Quantitative aspecs of the binding reation. *J. Exp. Med.* **140**: 1676-1695.

Martin, U., and Baggiolini, M (1981) Dissociation between the antianaphylactic and antihistaminic actions of ketotifen. *Arch. Pharmacol.* **316**: 186-189.

May, C. D., Lyman, M., Alberto, R. and Chang, J. (1970) Procedure for immunocytochemical study of histamine release from leukocytes with small volume of blood. *J. Allergy* **46**: 12-20.

Nagai, H., Takizawa, T., Nakatomi, I., Matsura, N. and Koda, A. (1983) Anti-allergic action of glucocorticoids in rats. *Japan J. Pharmacol.* **33**: 349-355.

Narasimhan, V., Holowka, D. and Baird, B. (1990) A guanine nucleotide-binding protein participates in IgE receptor-mediated activation of endogenous and reconstituted phospholipase A2 in a permeabilized cell system *J. Biol. Chem.* **265**: 1459-1464.

Samuelsson, B (1983) Lekotrienes, mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Science* **228**: 568-575.

Siraganian, R. P., Hook, W. A. and Levine, B. B.(1975) Specific in vitro histamine release from basophils by bivalent haprens: The evidence for activation by simple bridging of membrane bound antibody. *Immunochemistry* **12**: 149-157.

제 3 장 항 알레르기성 유효성분의 분리

제1절 연구 개발 목표

본 세부과제에서는 밤나무 잎의 추출물 중에 함유된 항 알레르기물질의 분리 및 화학구조 규명을 목표로 하였다. 식물체의 추출물로부터 특정생리활성을 지표로 하여 그 유효성분을 추적분리하는 연구의 성패는 전적으로 생리활성을 test하는 방법 즉 약효검색 system이 얼마나 계량적 측정이 가능한가하는데 달려 있다고 할 수 있다. 강력한 항 알레르기 효과를 보여주는 밤나무 잎 추출물로부터 유효성분 즉 항 알레르기성 물질을 분리하기 위해서 rat의 복강 비만세포로부터 histamine 유리를 저해하는 효과를 지표로 사용하였다. Activity-guided fractionation방법에 준하여 밤나무 잎 추출물에 함유된 유효성분을 정제한 결과 처음 시료로 사용한 밤나무 잎의 물 추출물의 항 알레르기효과에 비하여 약 100배 정도 탁월한 효과를 보여주는 활성 성분 분획을 얻었다. 또 이 활성 성분 분획으로부터 유효성분을 최종 정제하였으며 화합물의 각종 물리 화학적 성질 및 분광학적 소견을 종합 검토하여 그 화학구조를 규명하였다.

제2절 실험 방법

검체가 보여주는 생리활성 즉 약리작용을 지표로 하여 그 속에 함유되어 있는 활성본체물질을 분리하기 위하여서는 본 연구팀이 금번 연구에 활용하고 있는 활성유도분획법 (Bioassay-directed fractionation)이 가장 널리 사용되고 있다.

즉, 우선 검체를 random하게 두가지 혹은 그 이상의 분획(fraction)으로 나

눈후 각각의 분획에 대하여 약리작용을 모검체의 경우와 똑같은 조건하에서 측정하여 약리작용이 어느 분획에서 발현하는지를 확인한다. 약리작용이 나타난 분획을 다시 수개의 분획으로 재차 나눈 후 이때 얻어진 분획들에 대하여 다시 같은 방법으로 약리작용을 측정하여 본다. 우수한 효과를 보여주는 분획을 단계적으로 selection하여 나가는 방식이라고 할수 있다. 이와 같은 조작을 수차례 반복하게 되면 마침내 약효성분의 분리에 도달할수 있게된다. 간혹 검체 중에 두가지 이상의 서로 다른 활성본체가 존재할 경우에는 보다 복잡한 분획작업(fractionation)이 요구될 수 있다. 또, 모검체가 보여주는 activity의 총량(total activity)이 fractionation이 진행됨에 따라 하나의 분획(fraction)으로 집중되어 나타나야만 보다 빨리 활성성분의 분리에 도달할 수 있게 된다. 따라서 fractionation이 진행될 때마다 각 분획의 약리효과를 정량적으로 비교할 수 있도록 specific activity 등의 parameter를 미리 설정하여 활성성분이 각각의 분획으로 분산되는 양상을 정확하게 파악하여야 한다. 즉 매단계의 fractionation이 진행될 때마다 하나의 분획으로 total activity의 분산이 일어나지 않고 specific activity가 계속적으로 증가할수 있도록 하는 적합한 fractionation방법을 고안하는 일이 본 방법의 성패를 좌우하는 가장 중요한 요건이라고 할 수 있겠다.

제3절 실험 결과

제1항 밤나무 잎의 물추출물 중에 함유된 항알레르기성 물질의 분리

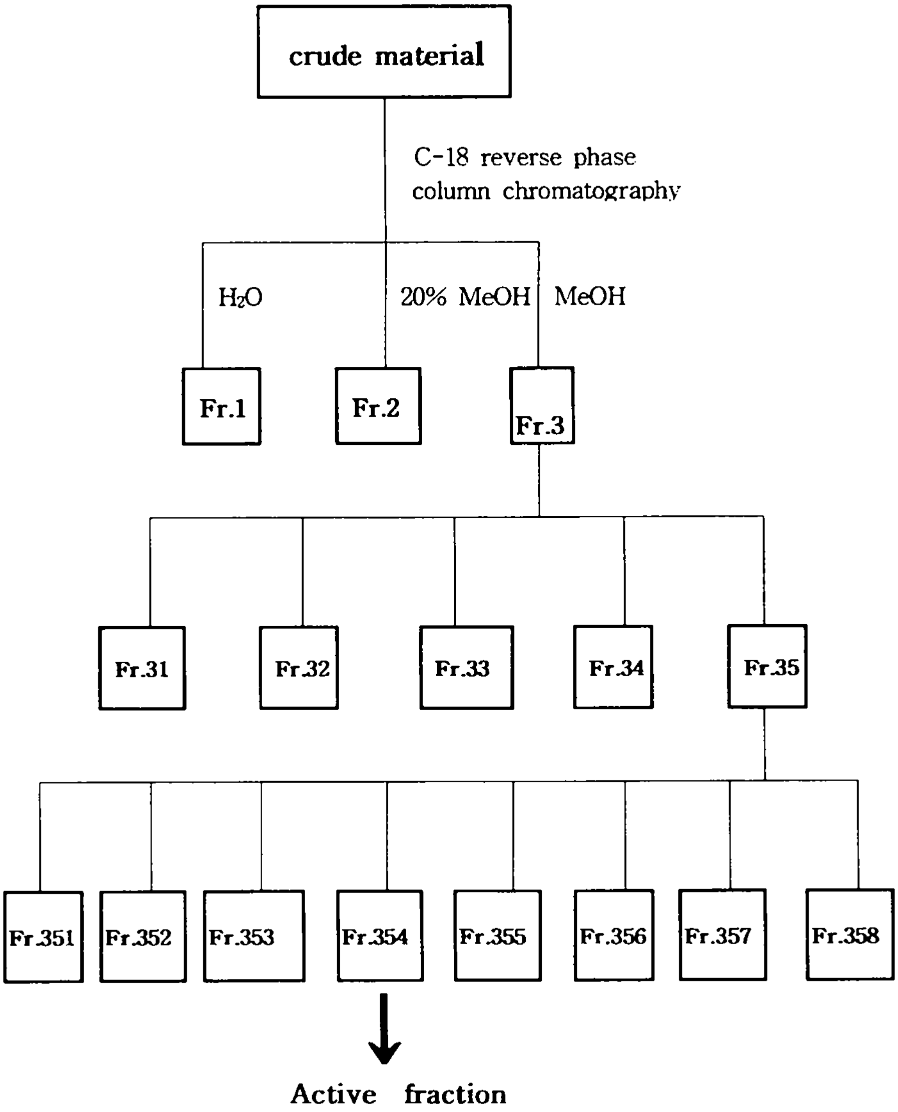
a) 밤나무 잎의 물추출물 중에 함유된 항알레르기성 물질을 분리하고자 우선 항알레르기효과를 간편하게 측정하는 방법을 모색하였다. 즉 rat의 복강에 존재하는 비만세포(mast cell)로부터 histamine 유리를 저해시키는 효과를 지표로하여 항알레르기효과를 간접적으로 측정하는 in vitro assay방법을 확립하고 (제 1세부과제 참조) 이 방법을 활용하여 밤나무잎추출물을 Bioassay-guided fractionation 방법으로 단계적으로 분획하여 얻은 분획물들에 적용하여 보았다. (표 1 참조).

b) 가을에 밤 수확 직후 밤나무 잎을 채집하여 그늘에서 일주일 이상 말렸다. 음건한 밤나무 잎 1 kg을 물 30 L에 넣고 3시간 끓이고 여과하였다. 잔사는 다시 동량의 물을 넣고 3시간 끓이고 여과하였다. 여액을 모두 모아 rotary evaporator에서 농축하여 농축액이 약 2 L 가 되었을 때 동결건조하여 약 300g의 분말상 물추출물 (water extract)를 얻었다. 이 밤나무 잎의 물추출물 20g을 증류수 1 L에 용해시켜 C-18 (octadecyl silica gel) column (Ø 2.5 x 30 cm) 에 loading하고 H_2O 1 L, 20% MeOH 1 L 및 MeOH 1 L 로 순차적으로 용출시켜 Fr.1 (13.9 g), Fr.2 (4.0 g) 및 Fr.3 (1.3 g)를 각각 조제하였다. Crude material 및 Fr.1 - Fr.3의 항알레르기효과를 histamine 유리억제실험 (Hexosaminidase release inhibition)으로 각각 평가하여본 결과 crude material의 ED_{50} value (hexosaminidase 유리를 50% 저해하는 농도)는 약 500 ㎍/ml 인데 반하여 Fr.1 은 ED_{50} value가 약 2000㎍/ml 이상, Fr.2 은 약 300 ㎍/ml 으로 나타난 반면 Fr.3 은 ED_{50} value가 100㎍/ml 이하의 값을 보여주었

다. 따라서 밤나무잎 추출물에 존재하는 항알레르기성분은 Fr.1 속에는 거의 존재하지 아니하며 대부분 Fr.2 혹은 Fr.3으로 이행하였으며 대부분 Fr.3에 농축되어 있음을 알수 있었다.

Fr.3 0.9g을 다시 200ml H_2O에 현탁시킨 후 C-18 (octadecyl silica gel) column (Ø 2.0 x 20 cm)에 loading하고 30% MeOH로 200ml 씩 elution하여 Fr.31 (0.2g), Fr.32 (0.18g), Fr.33 (0.1g) 및 Fr.34 (0.14g)를 조제하고 MeOH 200ml로 washing하여 Fr.35 (0.36g)을 조제하였다. 이들 fraction을 같은 방법으로 histamine 유리저해효과를 측정하여본 결과 ED_{50} value는 Fr.31의 경우 2000㎍/ml 이상, Fr.32와 Fr.33은 각각 1000㎍/ml 이상, Fr.34는 500㎍/ml 이상 그리고 Fr.35는 100㎍/ml 이하로 나타나 항알레르기활성물질은 Fr.35로 이행되고 있음을 알수 있었다. 이와 같이 C-18 reverse phase column chromatography를 통한 fractionation으로 얻어진 각각의 분획(fraction)에 대하여 활성을 test하고 그중 가장 강한 활성을 나타내는 분획을 다시 C-18 reverse phase column chromatography로 재분획하는 방식을 한번 더 반복하여 ED_{50} value가 20㎍/ml 이하인 Fr.354 (active fraction) 40mg을 최종확보할수 있었다.

Table I. Isolation scheme of active components from *Castanea moilissima* extract.



또 crude material 200g을 전술한 조작과 동일하게 처리하여 active fraction 300mg을 확보하였으며 이 active fraction을 모두 합하여 C-18 reverse phase column chromatography를 통한 fractionation을 수차반복하고 활성을 moniteration하여 ED_{50} value가 4 μg/ml 이하인 active component 100mg을 얻었다. 이를 MeOH로 재결정을 반복하여 미황색 분말 45mg을 얻었으며 이 화합물의 physicochemical data 및 spectral data는 아래와 같다.

제2항 활성성분의 동정

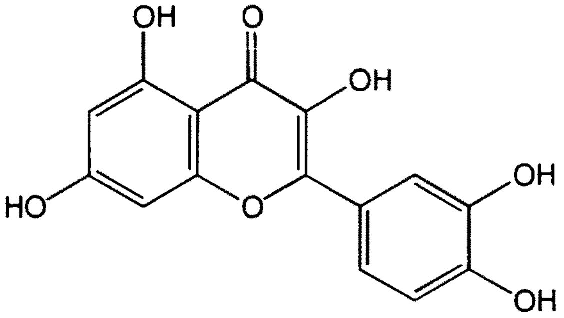
mp 310～313℃;

IR, $\nu_{max}^{KBr}(cm^{-1})$ 3380 (OH), 1670 (α, β-unsaturated C=O), 1610, 1510 (aromatic C=C), 1240 (aromatic C-O).

UV, λ_{max}^{MeOH}nm (log ε) : 259 (4.30), 270 (sh, 4.16), 305 (sh, 3.91), 372 (4.34); λ_{max}^{CH3ONa}nm (log ε) : 248 (4.26), 323 (4.17); λ_{max}^{NaOAc} nm(log ε) : 269(sh, 4.23), 270(4.24), 323 (4.01), 388 (4.28); $\lambda_{max}^{NaOAc+H3BO3}$ nm(log ε) : 262(4.34), 334(sh, 4.24), 394(4.40); λ_{max}^{AlCl3}nm(log ε) : 272(4.35), 351(sh, 3.68), 460(4.51); $\lambda_{max}^{AlCl3+HCl}$ nm(log ε) : 270 (4.36), 301 (sh, 3.86), 354 (4.01), 428 (4.38).

MS, m/z (rel, int.) 302 $[M]^+$ (93.0), 301 $[M-H]^+$ (31.1), 274 $[M-CO]^+$ (10.7), 273 $[M-HCO]^+$ (16.0), 245 $[M-(CO+HCO)]^+$ (27.5), 153 $[A_1+H]^+$ (59.0), 142 $[M-H_2O]^{++}$ (22.1), 137 $[B_2]^+$ (59.0), 128 $[M-(CH_2O+CO)]^{++}$ (44.7), 109 $[B_2-CO]^+$ (21.7).

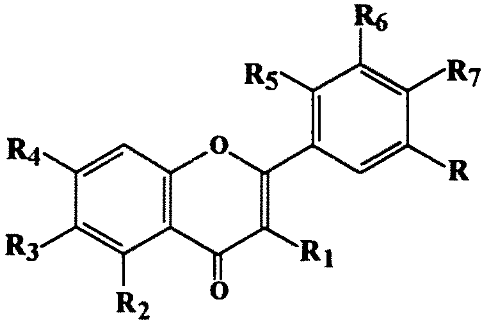
밤나무 잎의 물추출물로부터 최종분리한 항알레르기성 활성물질은 상기와 같은 이화학적 자료를 종합 검토하여 본 결과 flavonoid계에 속하는 quercetin (M.W. $C_{15}H_{10}O_7$) 으로 확인할 수 있었다. (그림)



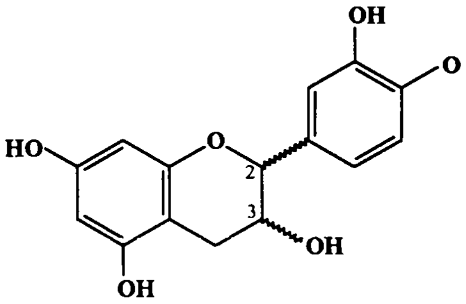
Quercetin

한편, 각종 참고자료를 토대로 quercetin의 항알레르기효과를 조사하여본 결과 본 화합물이 여러 가지 실험model에서 탁월한 항알레르기효과를 보여주고 있음을 확인할 수 있었으며 결과적으로 밤나무 잎의 물추출물이 보여주는 강력한 항알레르기효과는 아마도 밤나무 잎의 물추출물에 존재(약 0.01%) 하는 flavonoid 성분인 quercetin에 기인하는 것으로 추정하고 있다. 이러한 추정을 뒷받침하고자 본 연구진은 밤나무 잎의 물추출물에 존재하는quercetin 이외에 식물계에 널리 존재하는 기타 flavonoid들을 따로따로 수집하여 항알레르기효과를 quercetin과 비교분석하였다.

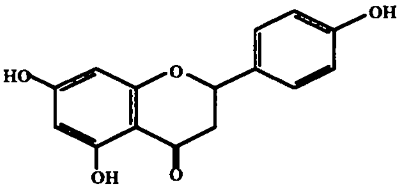
제3항 Quercetin 유도체들이 mast cell degranulation에 미치는 영향



	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	비고	IC50 (μM)
flavone	-H	-H	-H	-H	-H	-H	-H	-H	Q7	>100
3-hydroxyflavone	-OH	-H	-H	-H	-H	-H	-H	-H		>100
6-hydroxyflavone	-H	-H	-OH	-H	-H	-H	-H	-H		28
7-hydroxyflavone	-H	-H	-H	-OH	-H	-H	-H	-H		21
chrysin	-H	-OH	-H	-OH	-H	-H	-H	-H	Q1	>100
baicalein	-H	-OH	-OH	-OH	-H	-H	-H	-H	Q6	17
apigenin	-H	-OH	-H	-OH	-H	-H	-OH	-H		2.4
luteolin	-H	-OH	-H	-OH	-H	-OH	-OH	-H		2.1
diosmetin	-H	-OH	-H	-OH	-H	-OH	$-OCH_3$	-H	Q13	<3.0
fisetin	-OH	-H	-H	-OH	-H	-OH	-OH	-H	Q8	3
galangin	-OH	-OH	-H	-OH	-H	-H	-H	-H	Q5	40
kaempferol	-OH	-OH	-H	-OH	-H	-H	-OH	-H		5
quercetin	-OH	-OH	-H	-OH	-H	-OH	-OH	-H		≒3.2
myricetin	-OH	-OH	-H	-OH	-H	-OH	-OH	-OH	Q9	6.7
morin	-OH	-OH	-H	-OH	-OH	-H	-OH	-H		≒50
diosmin	-H	-OH	-H	-OS	-OH	-H	$-OCH_3$	-H	Q4	>100

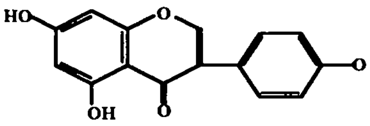


	비 고	IC_{50} (μM)
(±)-catechin (2*RS*, 3*SR*)	Q2	>100
(+)-catechin (2*R*, 3*S*)	Q3	>100
(−)-epicatechin (2*R*, 3*R*)	Q10	>100



Naringenin - IC50 (μ M) >100

[4, 5, 7-trihydroxyflavanone]



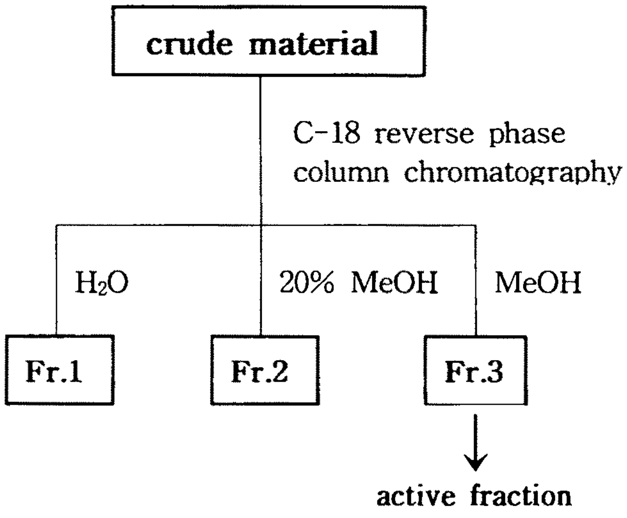
Baichanin A - IC50 (μ M) >100

제4항 밤나무의 열매의 속껍질 추출물로부터 항알레르기물질의 분리

전술한 바와 같이 본연구팀은 본 연구팀은 강력한 항알레르기효과를 보여주는 밤나무 잎 추출물로부터 유효성분 즉 항알레르기성 물질의 분리연구를 수행하였다. 본 연구를 수행하는 동안 부가적으로 밤나무의 잎추출물은 물론 밤나무의 열매의 속껍질 추출물도 역시 어느정도 항알러지효과를 나타내고 있음을 알 수 있었다. (밤나무의 열매의 속껍질은 농가에서 밤나무의 잎과 함께 별다른 효용 가치가 알려져 있지못하여 현재로서는 그냥 버려지는 상황임). 따라서 이들 자원들로 부터 유용한 항알러지성 물질을 얻을수 있다면 이는 이들 폐자원의 부가가치를 한층 더 높여줄수 있는 매우 가치있는 일이라고 할 수 있겠다는 취지 하에 본 연구팀에서는 밤나무의 열매의 속껍질 추출물로부터 항알러지성분을 분리하는 연구를 추진하여보았다. 즉 밤나무잎추출물의 경우와 같은 방법으로 활성유도분획방법에 준하여 그 유효성분을 추적하였으나 분획이 진행되는 과정중 밤나무의 열매의 속껍질 추출물의 활성분획으로 추정되는 100% MeOH분획으로부터 아주 미량의 quercetin이 존재함을 알 수 있었으며 그외 뚜렷한 활성성분의 존재는 확인할 수 없었다 (Table 11).

또, 밤나무의 열매속껍질 추출물의 항 알레르기효과는 밤나무 잎 추출물의 그것에 비하여 약 100분의 1에 해당하였으며 밤나무잎 추출물로부터 최종 얻어진 활성성분 quercetin의 함량이 밤나무의 열매속껍질 추출물로부터 얻어진 quercetin의 함량의 약 100배에 해당됨을 감안하여 볼 때 밤나무의 열매속껍질 추출물이 보여준 미미한 항 알레르기효과 역시 그 속에 미량으로 존재하는 quercetin에 기인하는것으로 최종 결론지을 수 있었다.

Table II. Fractionation scheme of the water extract of the nutpeel



약물	농도	% of Inhibition	
		평균값	표준오차
Quercetin	10 μM	74.2	2.0
	30 μM	82.2	1.3
crude material	10 μg/ml	34.4	0.1
	30 μg/ml	32.2	1.6
H_2O	10 μg/ml	21.0	1.1
	30 μg/ml	20.4	1.2
20 % MeOH	10 μg/ml	30.6	4.2
	30 μg/ml	29.9	0.7
100 % MeOH	10 μg/ml	35.5	4.8
	30 μg/ml	49.7	2.0

강력한 항알레르기효과를 보여주는 밤나무 잎추출물로부터 유효성분 즉 항 알레르기성 물질의 분리를 시도하였다. 즉 rat의 복강 비만세포로부터 histamine 유리를 저해 하는 효과를 지표로하여 activity-guided fractionation방법에 준하여 밤나무 잎 추출물에 함유된 유효성분을 정제한 결과 처음 시료로 사용한 밤나무 잎의 물추출물의 항 알레르기효과에 비하여 약 100배 정도 탁월한 효과를 보여주는 활성성분 분획을 얻었다. 또 이 활성 성분분획으로부터 유효성분을 최종 정제하였으며 화합물의 각종 물리 화학적 성질 및 분광학적 소견을 종합 검토하여 그 화학구조를 규명하였다. 식물체의 추출물로부터 특정생리활성을 지표로 하여 그 유효성분을 추적분리하는 연구의 성패는 전적으로 생리활성을 test하는 방법 즉 약효검색 system이 얼마나 계량적 측정이 가능한가하는데 달려 있다고 할 수 있다. 현재 본연구진이 채택하고 있는 약효평가법은 이러한 요구조건을 가장 잘 만족시켜주고 있어 당초 3년 정도를 예상하였던 유효성분분리연구를 보다 빠른 시일 내에 종결할 수 있었다.

제4절 참고문헌

Chiej, R., The Macdonald encyclopedia of medicinal plants, pp. 72, The Macdonald Co (Publisher) Ltd (1984).

Ovary, Z., Passive cutaneous anaphylaxis in the mouse *J. Immunol.* 81, 355-357 (1958).

Katayama, S., Shionoya, H. and Ohtake, S., A new method for extraction of extravasated dye in the skin and the influence of fasting stress on passive cutaneous anaphylaxis in guinea pigs and rats. *Microbiol. Immunol.* 22, 89-101 (1978).

Foreman, J. C. and Mongar, J. L., The role of the alkaline earth ions in anaphylactic histamine secretion *J. Physiol.* (Lond) 224, 753-769 (1972).

Cheong, H., Choi, E. J., Yoo G. S., Kim, K. M. and Ryu, S. Y., Desacetylmatricarin, an anti-allergic component from Taraxacum platycarpum. *Planta Medica* 64 : 577-578 (1998).

Owen, D. A., Pipkin, M. A. and Woodward, D. F., Studies on cutaneous vascular permeability in the rat : increases caused by histamine and histamine-like agents. *Agents and Actions* 14, 39-42 (1984).

Craps, L., Greenwood, C. and Radielovic, P., Clinical investigation of agents with prophylactic anti-allergic effects in bronchial asthma. *Clin. Allergy* 8, 373-382 (1978).

von Wichert, P., Ketotifen, an anti-allergic drug. Pharmacological figures anc clinical experience. *Respiration* 39 *Suppl* 1, 1-2 (1980).

Cox, J. S., Disodium cromoglycate (FPL 670) ('Intal'): a specific inhibitor of reaginic antibody-antigen mechanisms. *Nature* 216, 1328-1329 (1967).

Schwartz, L. B., Lewis, R. A., Seldin, D. and Austen, K. F., Acid hydrolases and tryptase from secretory granules of dispersed human lung

mast cells. *J. Immunol.* 126, 1290-1294 (1981).

Fischer, M. J., Paulussen, J. J., Horbach, D. A., Roelofsen, E. P., van Miltenburg, J. C., de Mol, N. J. and Janssen, L. H., Inhibition of mediator release in RBL-2H3 cells by some H1-antagonist derived anti-allergic drugs: relation to lipophilicity and membrane effects. *Inflamm. Res.* 44, 92-97 (1995).

Saeki, K. and Kurose, M., Histamine release from rat mast cells sensitized with mouse antiserum. *Agents and Actions* 11, 98-100 (1981).

Pearce, F. L., Befus, A. D. and Bienenstock, J., Mucosal mast cells. III. Effect of quercetin and other flavonoids on antigen-induced histamine secretion from rat intestinal mast cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* 73, 819-823 (1984).

Cheong, H., Ryu, S. Y., Oak, M. H., Cheon, S. H., Yoo, G. S. and Kim, K. M., Studies of structure activity relationship of flavonoids for the anti-allergic actions. Arch. Pharm. Res. 21, 478-480 (1998).

Fanning, M. J., Macander, P., Drzewiecki, G. and Middleton, E., Jr, Quercetin inhibits anaphylactic contraction of guinea pig ileum smooth muscle. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 71, 371-373 (1983).

제 4 장 항 알레르기성 건강식품으로의 개발

식품이 갖는 주요한 기능을 보면 영양·에너지성의 1차 기능과 감각·기호성의 2차 기능, 생체 조절 기능인 3차 기능으로 크게 분류할 수 있으며, 이중 3차 기능은 생체의 생리 기능 조절이나 항상성 유지에 관여하며 식품이 갖는 새로운 기능으로 최근 이에 대한 연구가 큰 관심을 끌고 있다. 이러한 기능성을 갖는 식품은 질병의 예방이나 노화억제 등 인간의 건강을 유지하는데 중요한 역할을 하며, 특히 생체방어 및 조절 능력이 있는 것으로 알려진 일부 성분은 자연계의 동·식물 및 미생물 등에 널리 분포되어 있으며, 옛부터 이러한 유용성분을 생약이나 약제로 널리 이용해 왔다1~3). 한편 식품관련 산업 및 학계에서도 이러한 3차 기능을 갖는 성분을 식품소재로 활용하여 다양한 기능성식품을 개발하려는 연구가 최근 활발히 진행되고 있으며, 국내에서도 농림수산기술개발사업중 첨단기술개발사업 과제의 가공 및 생명공학 분야의 절반에 이르는 연구가 건강식품 및 기능성 식품에 관한 것으로 집중되고 있는 것을 보더라도 이에 대한 연구의 중요성을 실감할 수 있다3-5). 따라서 국내의 전통식품 및 동·식물자원, 미생물 등을 이용한 다양한 식품소재의 개발과 특히 천연물 유래의 생리활성물질의 탐색에 관한 연구를 통해 새로운 기능성 물질을 발견하고 이들을 이용해 기능성 식품으로 개발하는 것은 추후 식품산업의 주요한 연구 목표가 되리라 생각된다.

이러한 기능성 식품에 관한 연구가 활발하게 대두된 배경을 먼저 살펴보면, 식량이 부족했던 시대에 식품은 영양과 에너지 섭취가 주된 목적이었으나 경제발전과 더불어 이러한 1차기능이 충족되면서 오히려 영양소의 과잉섭취와 불균형적인 섭취로 인한 성인병 등 각종 질병의 원인이 사회문제로 대두 되게 되었다. 또한 보건·의료 기술의 발달과 건강에 대한 욕구가 증진되면서 인간의 평균수명은 날로 증가하게 되었고, 수명이 증가함에 따라 노령인구의 비율

이 높아지고 이에 따른 암, 심장병, 당뇨병, 뇌졸증 등 소위말하는 성인병 환자의 발생빈도와 이로 인한 사망률이 급격히 증가하게 되었다. 일반적으로 이러한 성인병의 발생원인은 운동부족이나 스트레스, 흡연, 식습관, 유전적인 요인 등으로 지적되고 있으며,. 이 가운데 특히 식생활로 인한 성인병의 발생비율이 높아짐에 따라 이를 억제하고 예방할 수 있는 식품들에 자연 관심이 모아지게 되었다. 또한 의학의 발달에도 불구하고 이러한 성인병은 예방이나 치료 대책을 뚜렷이 제시하지 못하였고, 환자의 발생이 성인에게만 국한되지 않고 어린이에게 까지 확대됨에 따라 식생활의 개선과 건강식품이나 이들 질병의 예방 효과가 있는 기능성 식품이 전세계적으로 주목을 받게 되었다.3-6)

이와 같은 배경으로 식품의 기능성에 대한 관심이 높아지게 되었으나 그 개념이 명확히 구분되지 않은채 유통되는 등 문제점이 제기되자 일본후생성에서는 1980년대부터 식품, 영양, 의학자 등 관련학자들을 중심으로 기능성 식품에 대한 연구를 시작하여 국제적인 동향이나 각분야의 의견을 수렴해 이를 구체화 하기에 이르렀으며, 이들 기능성 식품을 생체조절기능을 갖는 즉, 3차 기능이 강조된 식품으로 분류하고 한편, 식품으로의 영양성이나 감각성이 무시되지않고 소비자가 이용해야 한다는 관점에서 1991년 영양개선법의 일부를 개정하여 "특정보건용식품"으로 허가제도가 시행되기에 이르렀다5). 여기에서 특정보건용식품으로 효능을 표시하여 판매할 수 있게 되있는 기능성 식품에 관한 후생성의 정의를 보면 "식품 성분이 갖는 생체방어, 생체리듬의 조절, 질병의 예방과 회복 등 생체조절기능을 충분히 발휘할 수 있도록 설계, 가공된 식품"으로 정의하였고 다음과 같은 조건을 만족시켜야 한다. 즉, 어떤 종류의 생체조절을 대상으로 어떠한 건강상태의 효과를 목적으로 할 것인가가 명확해야하고, 목적하는 효과를 달성하기위한 화학구조가 해명된 기능성 인자가 함유되어 있어야하며, 기능성 인자의 생체작용 기작이 생화학적, 분자 생물학적으로 해명되어 있어야 하고, 섭취했을때 기대한 기능이 실제로 나타나

야하며, 유효섭취량과 위험량이 안전하게 설정되어 있어 식품으로 일상적으로 섭취할 수 있고, 안정성이 확보되야 한다고 규정하였다. 따라서 특정보건용식품은 생체조절기능 만이 지나치게 강조된 식품 즉, 기능성만을 강조해 식품이 갖추어야할 영양기능이나 감각기능이 무시된 채 편향된 영양의 섭취나 질병의 예방·치료를 목적으로 자칫 의약품으로 오인할 수 있는 문제점을 우려해 식품이 갖는 영양 및 감각기능과 함께 유용한 기능성을 활용할 수 있는 관점에서 용어를 정의하였다.

한편, 미국에서도 기능성 식품과 유사한 개념으로 1989년 국립암연구소(NCI)에서 과일이나 채소에 함유된 성분중 항암효과가 밝혀진 물질을 이용해 이들 함량을 높여 암을 예방할 수 있는 식품으로 개발하고자 고안된 식품을 "designer food"란 용어로 사용하면서 이들에 대한 연구가 본격적으로 진행되었다7). 여기에서 designer food란 지방의 감소나 질병의 예방과 치료 등 특정한 기능을 갖고 있으며 특정그룹의 특정목표에 부합하도록 개발된 식품이나 천연의 식용식물로부터 암을예방할 수 있는 성분을 추출하여 강화시킨 식품, 골다공증이나 심장병 등 질병을 예방하기 위해 가공하거나 유전조작에 의해 변환시킨 식품, 식품으로 허용되어 있고 특정질병의 예방에 도움이 되는 식물성 화학물질(phytochemical)을 함유하고 있는 과일이나 야채가 기본재료인 식품, 질병의 예방과 치료 및 건강에 유익한 식품 또는 식품의 일부가 될 수 있는 성분(nutraceuticals)으로 정의된 식품등 우리가 흔히 말하는 기능성 식품과 동일한 개념임을 알수 있다. 그러나 미국에서는 제품에 건강정보를 표시할 경우 소비자의 혼란이 있을 것을 우려하여 식품에 질병에 관한 표시를 금지시켜 왔는데 Kellogg사가 고섬유, 저지방 식품이 암예방에 효과가 있다는 NCI의 연구결과를 곡류제품에 표시하면서 계기가 되어 1990년 미의회에 법안의 개정이 상정되고 동의가 이루어지면서 1993년 개정된 법안이 공표되었다. 따라서 개정된 법령에 의해 몇가지 기능성 식품과 질병과의 관계에 대해 건강강조표

시를 할 수 있도록 허가가 되었으며, 점차 소비자들의 disigner food에 대한 인식이 높아지게 되었다. 또한 미국인의 대다수가 식품 및 영양이 그들의 건강에 영향을 미친다고 믿고 있으며, 지방이나 염, 당, 콜레스테롤 등이 많은 식품을 피하고 건강을 증진시키는데 효과가 있다고 생각되는 비타민이나 미네랄이 풍부한 과일이나 야채, 식물 등 이른바 phytochemical성분을 함유한 식품을 섭취하는 방향으로 개선되고 있으며, 이와 함께 nutraceuticals로 정의된 기능성 식품에 대한 요구가 갈수록 증가하고 있다.

한편, 국내의 경우를 살펴보면 기능성 식품은 식품위생법시행령 제7조 에 명시되어 있는 특수영양식품과 건강보조식품에서 찾아볼 수 있다8). 여기에서 특수영양식품이란 영유아, 병약자, 노약자, 비만자 또는 임산부 등을 위한 용도로 제공할 목적으로 식품원료에 영양소를 가감하거나 식품과 영양소를 배합하는 등의 방법으로 제조·가공된 이유식, 식이섬유가공식품, 조제분유, 영양보충용식품, 특정용도식품 등으로 정의되어 있으며, 1989년에 새롭게 신설된 건강보조식품은 건강보조의 목적으로 특정성분을 원료로 하거나 식품원료에 들어 있는 특정성분을 추출, 농축, 정제, 혼합 등의 방법으로 제조·가공한 식품으로 정제어유가공식품, 로얄제리가공식품, 효모식품, 화분가공식품, 스쿠알렌식품, 효소식품, 유산균식품, 조류식품, 감마리놀렌산식품, 배아가공식품, 대두레시틴가공식품, 옥사코사놀식품, 알콕시글리세롤식품, 포도씨유식품, 식물추출물발효식품, 단백식품류, 엽록소함유식품, 버섯가공식품, 알로에식품, 매실추출물식품, 칼슘함유식품, 자라가공식품, 베타카로틴식품, 키토산가공식품, 프로폴리스식품 등이 허용되어 있다. 그러나 이들 특수영양식품 및 건강보조식품은 대부분 일본 등에서 허가가 되있는 것들을 국내에서도 인정하는 정도가 대부분이며 우리나라 고유의 전통식품이나 발효식품, 식용 및 약용식물, 민간약 등을 이용하여 기능성 식품화 한 것은 극히 드문실정이나 경제발전과 더불어 식생활의 향상, 보건·의료 기술의 발달로 평균수명이 높아져

서 각종 노인성 질환이나 순환기계질환, 암을 비롯한 성인병의 예방이 중요한 과제로 대두되고 있다. 따라서 우리나라 고유의 식품소재로부터 다양한 기능성 식품을 개발하는 것은 추후 국제간 기능성 식품의 특허문제를 야기하지 않고 경쟁력있는 제품으로 발전시킬 수 있으며, 또한 국민들의 수요증가에 따라 그 효능이 충분히 입증되지 않은 상태에서 유통되고 있는 각종 건강보조식품 및 기능성 식품의 과학적인 해명과 안전성에 대한 연구는 국민보건 측면에서도 상당히 중요한 과제가 되고 있다.

이와 같이 특정보건용식품, desingner food, 건강보조식품 등으로 인식되고 있는 각종 기능성 식품에 대한 연구는 21세기를 주도할 새로운 식품산업으로 이미 전세계적으로 집중적인 투자가 이루어 지고 있으며, 보다 조직적이고 과학적인 노력을 기울이고 있다. 지금까지 연구되어온 식품성분이 관여하는 것으로 알려진 생체기능 조절작용을 살펴보면, 면역증강과 macrophage활성화에 관여하는 면역계 조절작용, 성장호르몬, 인슐린, 아드레날린 등 분비기능 증강에 관여하는 분비계 조절작용, 뇌신경 조절이나 진정작용 등의 신경계 조절작용, 적혈구생산, 혈압강하, 항혈전, 콜레스테롤 저하작용 등의 순환계 조절작용, 칼슘, 아미노산의 흡수촉진, 평활근의 수축, 정장작용 등의 소화계 조절작용, 항균, 항바이러스, 항산화 등 세포계 보호 및 조절작용, 항암, 항종양활성, 항돌연변이 등이 주로 연구 대상 이었으며, 이중 특히 항산화 효과가 있는 소재와 항암효과, 항균효과, 순환기계질환 예방, 항콜레스테롤, 당뇨 조절기능 등의 효과가 있는 소재와 식품 등이 상당부분을 차지하였으며 이는 국내의 경우에도 대부분을 차지하였다. 한편, 이러한 기능성 물질의 소재로는 주로 우리가 일상적으로 섭취하고 있는 식품으로부터 식생활에 주로 이용되는 과일 및 채소, 식용식물, 버섯 등의 균류, 약용식물 및 동물, 수산자원, 미생물 등 자연계에 존재하는 대부분의 생물이 그 대상이 되고 있다3,5,6). 따라서 국내유래의 자원식물 및 식품성분 등을 활용하여 새로운 기능성 물질을 확

보하고 식품용 신소재로 이용하는 것은 전세계적으로 21세기 식품산업을 주도할 새로운 산업으로 기능성 식품을 지목하고 있는 시점에서 무엇보다도 시급한 문제로 대두되고 있다. 그동안 국내에서 이루어져 왔던 기능성 식품소재의 연구동향을 살펴보면, 식품재료로 이용되고 있는 다양한 식용식물과 가공식품류, 각종 유지류, 다류, 민간유래의 생약재 및 약용식물, 버섯, 인삼류, 일부 수산자원 등을 이용해 항산화, 항균, 항암활성 등의 생물활성 검색을 통한 기능성 물질의 탐색에 대한 연구가 주류를 이루어 왔다. 따라서 추후 기능성 식품에 대한 폭넓은 연구를 위해서는 보다 다양한 기능성 검색방법과 유용물질의 분리 및 정제, 구조결정 등의 기술이 필요하며, 활성이 규명된 물질의 안정성 확인 및 산업에의 응용방안 또한 필수적으로 뒷바침되야할 과제이다.

이에 본 연구에서는 옛부터 과실을 주로 식용 또는 약용으로 널리 이용해 왔고, 그외 수피, 꽃, 잎을 달인 액이나 분말은 창상이나 염증의 치료에 효과가 있는 것으로 나타나 있으며9,10), 특히 잎은 우리나라와 유럽 등지에서 옻나무에 의한 알레르기 질환(lacquer poisoning)이나 천식성기침(whooping cough) 등에 민간약으로 알려져 있는11) 밤나무 잎에 주목하여 이들의 생리활성 물질의 기능성 식품으로의 활용 방안을 검토 하였다. 이에 밤나무 잎의 기능성분을 식품화 할 수 있는 적절한 방법을 모색하던중 기호음료의 기능과 독특한 생리활성 및 기능성 물질을 함유하고 있는 다류제품에 착안하여 茶로 제조하는 방법을 연구하였으며, 대표적인 차의 형태인 불발효차와 반발효차의 제조방법을 응용해 밤나무 잎을 증제차와 유념차로 제조하였다. 제조된 각각의 차는 식품성분에 관한 정보를 제공하고자 화학성분 분석을 실시하였으며 한편, 제조된 차의 다양한 기능성 탐색의 일환으로 추출물의 항알레르기 효과의 검정, 항미생물 활성 탐색, 항비만효과의 탐색 등을 조사하였으며, 또한 제조된 차의 저장중 안정성에 대한 연구를 수행하였다.

※ 결과에서 본 세부과제는 다시 몇 개의 세부과제로 나뉘므로 편의상 각 과제에 대해서 다시 서론, 방법, 결과 부분으로 분류했음.

제 4-1 장 밤나무 잎을 이용한 차의 제조 및 화학성분 분석

제1절 연구 개발 목표

경제 발전과 더불어 소득이 증대됨에 따라 식생활의 개선 및 건강에 대한 요구가 높아지면서 기호음료에 대한 선호도가 다양해지고 있으며, 생산량 또한 나날이 증가하고 있다. 그 중에서도 각종 기능성 음료 및 다류 식품은 특유한 맛과 건강음료로의 생리활성 및 기능성 성분등이 규명되면서 점차 녹차를 비롯한 다류 식품의 이용범위가 증가하고 있다. 이러한 연구의 일환으로 본 연구에서는 밤나무 잎을 이용해 식품화 할 수 있는 방법을 모색하였다. 밤나무는 참나무과에 속하는 낙엽교목으로 우리나라 전역에 걸쳐 자생 또는 재배되고 있으며, 주로 과실을 식용, 약용, 가공식품 등으로 이용해 왔다. 그러나 밤나무의 잎은 그동안 한의학에서 수렴제로 이용하는 정도 외에는 별로 활용되지 못하고 있는 실정이었으나9.10) 최근 밤나무 잎 추출물의 항알레르기 효과에 대한 연구 등이 진행되고 있다16,17).

본 연구에서는 이러한 밤나무 잎을 원료로 하여 다류 식품으로 개발하고자 제차(製茶)방법을 검토하였으며, 제조된 차의 식품화학적 성질을 분석하여 밤나무 잎 차의 식품성분에 관한 정보를 제공하고자 한다.

제2절 실험 방법

제1항 실험재료

본 실험에 사용된 밤나무(*Castanea crenata S.* et Z) 잎은 전라남도 보성군에서 잎이 여리지않고 또한 경화되지 않아 제차용으로 적당한 시기인 5월 하순에 엽장 14 ㎝ × 엽폭 5 ㎝정도의 밤나무 잎을 채취하여 잎자루를 제거하고 정선한 다음 차의 제조에 이용하였다.

제2항 밤나무 잎차의 제조

밤나무 잎 차는 Fig. 1에 제시한 바와 같이 각각 잎을 증제한 후 효소활성을 억제시켜 건조하여 만든 불발효차인 증제차(non-fermented steaming tea)와, 잎을 위조와 유념과정을 통하여 효소작용을 가동시켜 만든 반발효차의 형태인 유념차(semi-fermented rolling tea)로 제조하였다[13,14,18].

<u>증제차의 제조</u>

증제차는 정선한 밤나무 잎을 연속형 송대식 증열기를 이용하여 0.2 ㎏/㎠의 수증기압으로 99℃에서 30초 동안 잎을 증열시켰다. 증열 공정을 거친 잎은 배출구의 끝에서 연속적으로 송풍기를 통해 급냉시킨 다음 격자형의 열풍건조기 선반위에 고르게 펴서 선반식 순환 열풍건조기에서 50~60℃에서 10시간 동안 건조시킨 후, 차 제조용 분쇄기로 2 ㎜이하의 크기로 분쇄하여 황차로 만들어 녹차 제조용포장재를 이용해 티백 또는 알루미늄 포장하였다.

<u>유념차의 제조</u>

유념차는 정선한 밤나무 잎을 18~20℃의 실내에서 약간 두텁게 펴서 8시간 동안 음건 위조시킨 후 가압식 유념기를 이용하여 투입된 원료 밤나무 잎

의 1~1.2배의 중량을 하방으로 가하며 1분당 45~50회 정도를 회전시키면서 20분간 유념 하였다. 유념 공정을 마친 밤나무 잎은 비닐로 가볍게 덮은 다음 20℃의 실내에서 12시간 동안 2차 발효시켰다. 2차 발효가 끝난 밤나무 잎은 선반위에 고르게 편 다음 증제차와 같이 선반식 열풍건조기를 이용해 90℃에서 4시간 동안 건조시킨 후 분쇄하여 황차로 만들어 티백 또는 알루미늄 포장하였다.

제3항 화학성분 분석

<u>일반성분</u>

일반성분 분석은 차의 분석법19-21) 및 AOAC시험법22)에 준하여 실시하였다. 즉, 밤나무 잎을 Fig. 1 에서와 같이 증제차와 반발효 형태인 유념차로 제조한 다음 녹차분쇄기를 이용, 2 ㎜이하의 크기로 분쇄하여 재료로 사용하였으며, 물추출물은 각각의 차 2 g에 증류수 100 ㎖을 가하여 90℃ 열수중에서 5분동안 추출한 다음 여과하여 분석에 사용하였다. 수분함량은 105℃에서 상압가열 건조법으로 회분은 550℃ 전기회화로에서 상법으로, 지방은 Soxhlet추출법, 단백질은 자동 질소증류장치를 이용한 Kjeldahl법으로 측정하였으며, 섬유소는 AOAC 방법으로 정량하였다22,23).

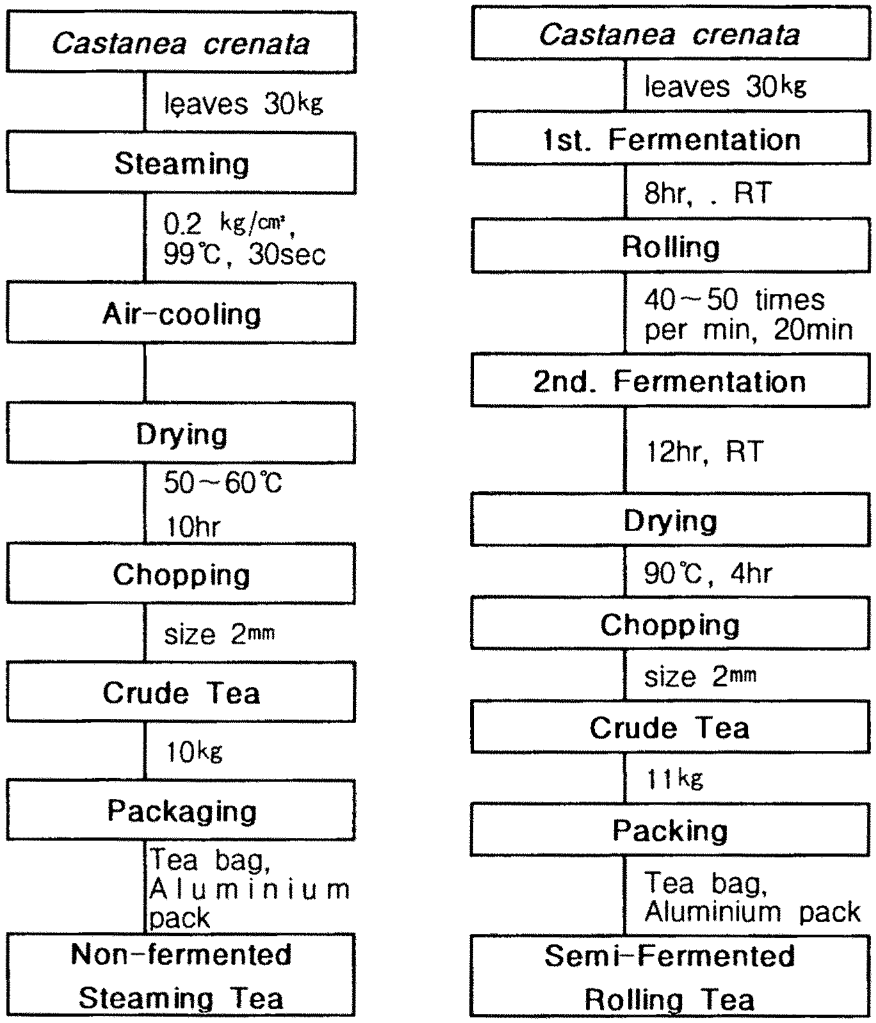


Fig. 1. Flow diagram of non-fermented steaming tea(left) and semi-fermented rolling tea(right) processing with *Castanea crenata* leaf

무기성분

제조된 밤잎차의 무기성분함량은 각각의 시료를 마쇄하여 2 g/100 mℓ을 100℃ 열수중에서 20분동안 추출한 다음 0.45 ㎛ membrane filter(Milipore Co, U.S.A)로 여과한 후 정용한 뒤 Ultrasonic Nebulizer(USN)을 사용하여 플라스마에 도입시킨후 Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectroscopy (Jovin Yvon 138 Ultrace, France)로 정량하였으며24) ICP-AES의 분석조건은 Table 1, 2와 같다.

Table 1. Operating conditions of ICP

Instrument	Jobin Yvon Model 138 Plus
Sequential Monochromator(Grating)	2,400 grooves/mm
Power	1,000W
RF Generator	40.68MHz
Plasma gas flow(P1)	12 ℓ/min
Sheath gas flow(G1)	0.3 ℓ/min
Measure Mode	4 Mode(3 Point)

Table 2. Operating conditions of Ultrasonic Nebulizer

Instrument	Model U-5000AT*
RF Source	1.35 MHz, 35W
Sample Uptake Rate	2.5 mℓ/min
Carrier Gas Flow	0.7 ℓ/min
Desolvation Heating Temperature	140℃
Desolvation Cooling Temperature	5℃

유리당

증제차와 유념차 각각 2 g을 열수중에서 30분동안 추출한 다음 추출물을 0.45 ㎛ membrane filter(Milipore Co, U.S.A)로 여과한 후 당분석 전용 APS NH2 컬럼을 이용해 HPLC로 분석하였으며, 분석조건은 Table 3과 같다.

Table 3. Conditions of HPLC for analysis of free sugar

Instrument	Hewlett Packard Associate
Column	APS NH_2, 300×4 mm(Hewlett Packard)
Eluent	Acetonitrile - Water (83 : 17, V/V)
Flow rate	1.5 mℓ/min
Column temperature	40℃
Detector	RI

비타민 C

밤나무 잎차의 비타민 C의 분석은 식품공전의 HPLC에 의한 분석 방법25)에 준하여 실시하였다. 증제차와 유념차의 분쇄된 시료 각각 1 g을 정확히 칭량한 후 5% meta-phosphoric acid 100 mℓ를 가하여 magnetic stirrer에서 열을 가하지 않고 10분동안 추출한다음 여과하여 여액을 메스플라스크에 옮기고 5% meta-phosphoric acid로 100 mℓ로 정용하였다. 정용한 시료를 1,380×g에서 15분간 원심분리한 뒤 상징액을 0.25 ㎛ filter(Milipore Co, U.S.A)로 여과하여 HPLC 주입용 시료로 하였으며, 분석조건은 Table 4와 같다.

Table 4. Condition of HPLC for analysis of vitamin C

Instrument	Waters Associate Model 441
Detector	Waters 441 UV Detector
Wave length	254 nm
Column	Radial-Pak NH_2 column
Eluent	0.05M KH_2PO_4 - CH_3CN (6 : 4, V/V)
Flow rate	1.0 mℓ/min

Tannin

증제차와 유념차의 tannin함량은 차의 분석 시험법14,21)에 준하여 실시하였다. 각각의 차 1 g을 80℃ 수욕상에서 30분간 추출한 다음 추출액 5 mℓ를 25 mℓ volumetric flask에 취하고 ferrous tartrate solution (FeSO4·7H2O 100 g + Rochelle salt 500 g/ distilled water 100 mℓ) 5 mℓ를 가하고 1/15 M phosphate buffer solution(pH 7.5)으로 정용한 뒤 spectrophotometer로 540 nm에서 흡광도를 측정하여 별도로 ethyl gallate의 표준품으로 작성된 standard curve에 의해 tannin함량을 다음식에 의해 계산하였다.

Tannin (%) = G × 1.5 × 100/W

G : 시료용액 흡광도에 대한 ethyl gallate량

W : 시료의 량(g)

아미노산

구성 아미노산은 증제차와 유념차 각각 1 g을 ampoule에 넣고 6 N HCl 15 mℓ를 가하여 110℃에서 24시간 가수분해시켜 얻은 여액을 원심분리하고, 상등액을 50℃에서 농축하여 염산과 물을 완전히 증발시킨 후 구연산나트륨 완충용액(pH 2.2)을 사용하여 5 mℓ로 정용한 다음 0.22 ㎛ membrane filter로 여과하여 Table 5와 같은 분석조건하에서 아미노산 자동분석기로 분석하였다26).

유리아미노산의 분석은 각각의 시료에 EtOH을 가하여 homogenizer로 마쇄한 후 박27)의 방법에 따라 시료를 처리하여 시료액 10mℓ를 sulfosalicylic acid 25mg을 가하여 4℃에서 4시간 동안 방치한 후 50,000 rpm에서 30분동안 원심분리하여 단백질등을 제거하고, 상등액을 0.22㎛ membrane filter로 여과한 다음 구성아미노산과 동일한 조건(Table 5)으로 분석하였다.

Table 5. Condition of amino acid analyzer for analysis of amino acid

Instrument	LKB 4150, alpha autoanalyzer
Column	Ultrapac II cation exchange resin
Buffer solution	pH 3.20 - pH 4.25 - pH 10.0, 0.2 M sodium citrate
Flow rate	Buffer 35 mℓ/hr, ninhydrin 25 mℓ/hr
Column temperature	50~80℃

지방산 조성

AOAC 방법22)에 따라 증제차와 유념차 각각 10 g을 soxhlet추출기를 이용하여 ethyl ether로 16시간동안 추출한 다음 evaporator로 ethyl ether를 제거하고 지방을 얻었다. 이중 100 ㎎의 지방을 250 ㎖ 평저 플라스크에 취하여 0.5 N NaOH 4 ㎖를 가하고 80℃ water bath에서 20분간 검화시켰다. 그 다음 BF3/MeOH 5 ㎖를 천천히 가하여 유도체화한 후 *n*-heptane 5 ㎖를 넣어 추출하고 *n*-heptane층을 취하여 무수 Na2SO4로 탈수한 다음 여과하여 GC 주입용 시료로 하였으며 지방산 유도체의 분석조건은 Table 6과 같다.

Table 6. Condition of GC for analysis of fatty acid

Instrument	VARIAN, STAR 3400 CX
Column	STABLE WAX Capillary column (30m × 0.25 ㎜)
Detector	Flame Ionization Detector
Column temperature	100℃ (2min) - 20℃/min - 180℃ (5min) - 10℃/min - 230℃ (14min)
Injector temperature	230℃
Detector temperature	240℃
Carrier gas	N_2
Flow rate	20 ㎖/min

제3절 연구 결과

제1항 제조된 밤나무 잎차의 특성

녹차의 대표적인 제조방법인 불발효차와 반발효차의 제조법을 응용하여 밤나무 생엽을 각각 증제차와 유념차로 제조하였다. 제조된 증제차는 잎을 채취 후 곧바로 증열시켜 효소활성을 억제하여 고유의 선명한 색을 유지하였고, 밤나무 잎 특유의 상쾌한 풋내를 가지고 있으며, 생엽 30 kg에서 제조된 차는 10 kg이었다. 유념차는 반발효차 특유의 제조공정인 위조공정을 실시하여 1차 발효시킨 후 유념하여 잎의 미묘한 화학변화를 일으킴과 동시에 성분의 용출을 용이하게 한 다음 2차 발효 공정을 12시간정도 가짐으로서 반발효차의 특징적인 방향성과 독특한 맛을 내도록 공정을 설계하였다. 따라서 유념차는 효소반응이 진행되어 증제차에 비해 짙은 색을 띄는 적갈색을 나타내었다. 생엽 30 kg에서 제조된 유념차는 약 11 kg정도였다.

제2항 밤나무 잎차의 화학성분

<u>일반성분 및 무기성분</u>

Fig. 1에 제시한 방법으로 제조된 증제차와 유념차 및 이들 차의 물추출물의 일반성분은 Table 7에 나타나 있으며, 제차방법에 따른 일반성분의 차이는 없는 것으로 나타났다. 또한 밤나무 잎차의 물추출물의 수분, 회분, 조단백질의 함량은 녹차와 비슷한 수준을 나타냈다19,28).

무기성분은 추출물을 ICP를 이용해 Zn, Cu, Fe, Mn, Mg, Ca, Na, K등의 성분을 분석한 결과 Table 8에 제시한 바와같이 증제차와 유념차 각각 Ca 40 mg%, Na 40mg%, K, 780~1,000mg%, Mg 95~120mg% 수준을 나타냈으며, 특히 이들 양이온 무기성분의 함량이 높게 나타났다.

Table 7. The Proximate composition of *Castanea crenata* leaf tea (g/100g)

Item	NFS-tea[1]	SFR-tea[2]	water extracts of NFS-tea	water extracts of SFR-tea
Moisture	5.2±0.1[3]	6.4±0.1	99.6±0.05	99.6±0.05
Crude ash	8.6±0.2	8.1±0.2	< 0.1	< 0.1
Crude protein	12.1±0.2	11.9±0.2	< 0.1	< 0.1
Crude lipid	3.7±0.5	3.2±0.2	-	-
Crude fiber	10.2±0.5	9.8±0.2	-	-
Reducing sugar	<0.02	<0.02	-	-

1)NFS-tea : non-fermented steaming tea

2)SFR-tea : semi-fermented rolling tea

3)Values are mean±standard deviation (n=3)

Table 8. The contents of minerals in *Castanea crenata* leaf tea (mg%)

Tea	Zn	Cu	Fe	Mn	Mg	Ca	Na	K
NFS-tea[2]	2.09	0.17	0.40	41.70	95.48	41.29	43.01	789.89
SFR-tea[3]	1.91	0.21	0.45	44.30	120.98	48.29	44.51	1089.89

1)content standard deviation are ±0.05 (n=2)

2)NFS-tea : non-fermented steaming tea

3)SFR-tea : semi-fermented rolling tea

유리당, 비타민 C, 탄닌

유리당, 탄닌, 비타민 C의 함량은 Table 9에 제시하였다. 유리당은 당분석 전용 APS NH2 column을 이용해 HPLC로 분석한 결과, 증제차는 glucose 0.99 mg%, sucrose 3.72 mg%를 함유하고 있었고, 유념차는 glucose 2.62 mg%, fructose 1.90 mg% 수준을 함유하고 있었다. 유념차에서 sucrose가 검출되지 않은 것은 유념차 제조공정중 위조 및 발효과정에서 sucrose가 glucose와 fructose로 분해되어 기인한 것으로 생각된다. 밤잎차의 tannin함량은 1.5%~1.8% 수준으로 녹차류의 12~18%보다 훨씬 낮은 함량이었고19,28), 비타민 C는 HPLC를 이용해 함량을 표준품과 비교해서 측정한 결과 증제차에서만 1.24 mg%를 함유하고 있었으며, 유념차에서는 발효과정중 산화된 것으로 추정되며 검출되지 않았다.

Table 9. The contents of free sugars, tannin, vitamin C in *Castanea crenata* leaf tea (mg%)

Item	non-fermented steaming tea	semi-fermented rolling tea
Glucose	0.99	2.62
Sucrose	3.72	ND
Fructose	ND	1.90
Tannin	1800	1500
Vitamin C	1.24	ND

ND : Not Detected

아미노산, 지방산

증제차와 유념차의 아미노산 및 지방산 조성은 Table 10, 11에 제시한 바와같이 아미노산은 Glu, Leu, Ser, Val 등 15종의 구성아미노산, 11종의 유리아미노산이 확인 되었으며, 필수 아미노산도 상당량 함유되어 있었다. 밤잎차의 지방산은 분석결과 포화지방산으로 myristic, palmitic, stearic, behenic acid와 불포화지방산으로 oleic, linoleic, linolenic acid의 존재가 확인되었다.

Table 10. Amino acid compositions of *Castanea crenata* leaf tea (mg%)

Amino acid	Bound amino acid		Free amino acid	
	non-fermented steamed tea	semi-fermented rolling tea	non-fermented steamed tea	semi-fermented rolling tea
Aspartic acid	302.748	555.490	3.303	4.548
Threonine	287.163	504.042	1.863	2.042
Serine	357.328	650.513	1.282	1.594
Glutamic acid	430.984	667.241	ND	ND
Proline	159.264	200.010	3.964	5.308
Glycine	308.241	630.966	ND	ND
Alanine	226.276	450.881	1.430	1.597
Cystine	ND	ND	ND	ND
Valine	391.229	680.142	4.725	14.144
Methionine	ND	ND	ND	ND
Isoleucine	271.357	405.855	7.601	9.376
Leucine	417.015	629.417	3.637	5.821
Tyrosine	206.740	181.787	ND	ND
Phenylalanine	272.798	329.848	ND	ND
Histidine	294.058	586.486	6.423	12.335
Lysine	284.238	530.581	0.797	0.750
Arginine	262.251	508.676	11.335	12.690
Total	4471.696	7511.941	46.360	70.205

ND : not detected

Table 11. Fatty acid composition of *Castanea crenata* leaf tea

Fatty acid	area %	
	non-fermented steamed tea	semi-fermented rolling tea
Butyric acid (C4:0)	-	-
Caproic acid (C6:0)	-	-
Caprylic acid (C8:0)	-	-
Capric acid (C10:0)	-	-
Undecanoic acid (C11:0)	-	-
Lauric acid (C12:0)	-	-
Tridecanoic acid (C13:0)	-	-
Myristic acid (C14:0)	2.0	1.6
Myristoleic acid (C14:1)	-	-
Pentadecanoic acid (C15:0)	-	-
Palmitic acid (C16:0)	8.6	0.7
Palmitoleic acid (C16:1)	-	-
Heptadecanoic acid (C17:0)	-	-
Stearic acid (C18:0)	6.6	6.6
Oleic acid (C18:1)	21.4	31.9
Linoleic acid (C18:2)	38.1	42.8
Linolenic acid (C18:3)	8.8	3.0
Arachidic acid (C20:0)	-	-
Behenic acid (C22:0)	14.5	13.4
Sturated fatty acid	31.7	22.3
Unsaturated fatty acid	68.3	77.7

- : Not Detected

제 4-2 장 밤나무잎차의 기능성 탐색

제4-2-1장 항알레르기 효과

제1절 연구 개발 목표

식물유래의 민간약 및 천연물을 이용한 항알레르기 물질의 탐색과 개발에 많은 연구가 진행되고 있는데, 江田 등은 생약과 한방제를 이용하여 알레르기 반응에 미치는 영향을 실험한 결과 지실, 시호, 오미자, 항금 및 대추 등에서 유의성있는 억제효과를 보고 한바 있다16,17).

이에 본 연구에서는 밤나무 잎에 유용성분을 식품으로 활용할 수 있는 방안으로 제조한 증제차와 유념차 각각의 물추출물의 항알레르기 효과를 검정하여 기능성 효과에 대한 탐색을 시도하였다.

제2절 실험 방법

제1항 알레르기 시료의 추출

항알레르기 효과를 실험하기위한 밤나무 잎차의 추출물은 증제차와 유념차를 각각 40 mesh로 분쇄하여 2 g을 100 mL의 증류수로 30분 열수추출한 후 냉각하였다. 추출물을 다시 1,400 g에서 20분간 원심분리한 후 상징액을 동결건조하여 실험재료로 사용하였다.

제2항 항알레르기 효과의 실험

항알레르기 효과의 검정은 Choi등 39)의 enzyme assay방법을 이용하여 RBL-2H3 세포로부터 유리된 hexosaminidase의 억제 효과를 통해 항알레르기 효과를 측정하였다 (제 1세부과제참조).

제3절 연구 결과

시험물질의 항알레르기 효과를 측정하기위한 방법으로 한때는 Ig E로부터 감작된 비반세포에서 유리된 히스타민의 양을 측정하였다. 그러나 이 방법은 비만세포에서 히스타민 농도가 매우 낮고 또한 복잡한 여러단계를 거쳐야 하기때문에 큰 편차를 나타내기가 쉽다. 따라서 새로운 측정방법이 요구되어 현재는 hexosaminidase assay가 널리 이용되고 있다. Hexosaminidase는 높은 농도로 cell내에 존재할 뿐아니라 다른 화학적 매개체들이 탈 과립되어 방출될 때 함께 배출되므로 hexosaminidase활성 측정은 탈 과립의 지표로 이용될 수 있으며, 또한 이 효소의 반응으로 생성된 생성물은 자외선 영역에서 용이하게 측정될수 있기 때문에 유리된 히스타민의 양을 측정하는 방법을 대체할 수 있는 assay방법으로 이용될 수 있다. 따라서 밤나무 잎차의 항알레르기 효과는 RBL-2H3 세포로부터 hexosaminidase의 방출 정도를 측정하여 실험하였으며, 茶로서의 기능성을 실험할 목적으로 물추출물을 가지고 각각 농도를 달리하여 hexosaminidase의 방출 저해 효과를 비교하였다. 그 결과 각 dose-response에서 유의성 있는 억제효과를 나타냈으며, Table 12에 나타난 바와 같이 실험상 오차가 적은 농도인 300 ㎕/㎖의 수준에서 증제차는 대조구에 비해서 50.4%의 저해효과를 나타냈으며, 유념차는 35.4%의 저해효과를 나타내어 상당한 항알레르기 효과가 있음을 확인하였다.

Table 12. Inhibition effects of water extracts from *Castanea crenata* leaf tea on hexosaminidase release from RBL-2H3 cells

Sample	Dose (μg/mℓ)	Absorbance (405nm)	Inhibition (%)[1]
Total[2]		0.949 ± 0.045[3]	
Control		0.356 ± 0.010	
Non-fermented Steaming tea	300	0.180 ± 0.020	50.42 ± 5.20
Semi-fermented Rolling tea	300	0.230 ± 0.020	35.39 ± 5.34
Quercetin	300	0.060 ± 0.005	83.15 ± 3.08

1) Inhibition(%) =
[(Control ABS − Sample ABS)/Control ABS] × 100
Spontaneously released hexosaminidase(not challenged with antigen) was substracted from the control and *Castanea crenata* leaf tea treated group.

2) Total represents the whole amount of hexosaminidase in the cell.

3) Each of absorbance represents the mean ± S.E of 4 experiments.

제4-2-2장 항 미생물 활성효과의 탐색

제1절 연구 개발 목적

미생물에 의한 식품의 품질저하와 부패방지를 위해 각종 보존료 및 살균료를 사용하여 미생물의 생육을 억제하거나 살균을 해왔으나 이들 보존제들은 대부분 화학적 합성품으로 그 안전성의 문제가 제기 되면서 최근 천연물에 존재하는 항미생물활성 물질을 이용해 유용 항균제를 개발하려는 연구와 식품재료중에 존재하는 항미생물활성에 대한 연구가 많이 진행되고 있다. 한편, 각종 다류제품 에서도 이러한 항미생물활성 물질의 존재가 보고되고 있으며15), 특히 녹차에서 추출한 카테킨류 성분은 김치발효 지연 효과와 김치의 산패에 관여하는 균들에 대해 억제효과가 있는 것으로 보고되고 있고 또한 치아우식증의 원인균에 대한 항균효과도 보고 되고 있다. 그외 항암효과, 항산화효과, 항진균효과 등 각종 생리활성을 갖는 물질의 존재가 다양한 식물류의 잎을 이용해 제조한 다류제품에서 보고 되고 있어40-43) 본 연구에서도 밤나무 잎차의 기능성 탐색의 일환으로 항미생물 활성 효과를 검토하였다.

제2절 실험 방법

제1항 실험재료

항미생물 효과의 실험을 위한 밤나무 잎차 시료는 Fig. 1, 2에 제시한 바와 같이 제조한 증제차 유념차 각각 100 g을 2,000㎖의 100℃ 열수로 환류추출하여 냉각한 후 여과한 다음 동결건조기를 이용하여 건조한뒤 실험재료로 하였다.

제2항 실험방법

(1) 시료의 추출

증제차 추출물의 동결건조물 24 g과 유념차 추출물의 동결건조물 26 g을 각각 *n*-Hexane, EtOAc, MeOH로 순차 추출하여 각 용매 추출물을 얻었다. 즉 증제차 와 유념차의 각각의 건조물에 10배량의 *n*-Hexane을 가하여 magnetic stirrer에서 열을 가하지 않고 1시간 추출하여 여과하고 남은 잔사를 10배량의 EtOAc에서 다시 동일한 방법으로 1시간 추출하였으며, EtOAc 추출후 남은 잔사를 다시 동일한 방법으로 MeOH로 추출하여 각각의 추출물을 얻었으며, 이 추출물을 cooling aspirator(EYELA COOL ACE CA-111)가 장치된 vacuum evaporator(EYELA TYPE N-N)를 사용하여 농축한 뒤 각각의 용매 추출물을 얻었다.

(2) 항미생물 활성검색

① 사용 미생물

밤잎차 추출물의 항미생물 활성 검색을 위해 사용된 미생물은 Table 13에서 보는 바와 같이 세균은 충치의 원인균인 *Streptococcus mutans*, 화농질환 병원균이며 식품의 세균성 식중독 원인균인 *Staphylococcus aureus*와 사람의 피부에 존재하는 병원세균인 *Staphylococcus epidermidis*, 고온 유포자 세균으로 주로 단백식품의 부패에 관여하는 *Bacillus subtilis*, 내열성이 강한 가공식품 부패세균인 *Micrococcus luteus*, 음식물과 하수 등의 분변 오염 지표균인 *Escherichia coli*, 병원성 장내세균인 *Salmonella typhimurium*, 저온세균으로 주로 냉장식품의 부패에 관여하는 *Pseudomonas aeruginosa*, 병원성 해양세균으로 위장염과 패혈증의 원인균인 *Vibrio vulnificus*, 젖산생성 세균으로 포도주와 맥주의 변패균으로 작용하며 김치 산생성 원인균인 *Lactobacillus plantarum* 및 젖산생성 세균으로 김치의 주 발효균인 *Leuconostoc mesenteroides* 등을 사용하였다. 효모는 발효식품에 관여하는 *Saccharomyces cerevisiae*를 사용하였으며 곰팡이는 aflatoxin 생산균으로 알려진 *Aspergillus parasiticus*를 사용하였다.

② 사용배지

세균의 경우 *Streptococcus mutans*는 BHI(Brain Heart Infusion) 배지(Difco), *Vibrio vulnificus*는 LB(Luria-Bertani) 배지(Difco), 젖산균은 Lactobacilli MRS 배지(Difco), 그 밖의 세균은 Nutrient 배지(Difco)를 사용하였고, 효모의 경우는 YM배지(Difco), 곰팡이의 경우는 Potato dextrose 배지(Difco)를 사용하였다.

③ 항미생물 활성 측정

각각의 사용배지를 이용하여 세균 중 *Streptococcus mutans, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Escherichia coli, Salmonella typhimurium, Pseudomonas aeruginosa* 등은 37℃에서, *Bacillus subtilis, Micrococcus luteus, Vibrio vulnificus, Lactobacillus plantarum, Leuconostoc mesenteroides* 등은 30℃에서 24시간 동안, 효모는 30℃에서 24시간 그리고 곰팡이는 30℃에서 48시간 동안 3회 반복하여 전배양을 행한 후 접종균주로 사용하였다.

항미생물활성의 검정은 Zaika의 paper disc법44)으로 측정하였다. 먼저 pour-plate method45)에 의해 45℃로 조절된 멸균배지 15 ㎖에 전배양액 0.1 ㎖를 micro pipette을 이용하여 무균적으로 옮겨 잘 혼합시킨 후 지름이 9.0 ㎝인 petri dish에 넣고 굳혔다. 여기에 시료의 일정 상당량을 적하하여 용매를 제거한 paper disc를 올린 뒤 0.85% 식염수로 확산시켜 세균 중 *S. mutans, S. aureus, S. epidermidis, E. coli, S. typhimurium, P. aeruginosa* 등은 37℃에서, *B. subtilis, M. luteus, V. vulnificus, L. plantarum, L. mesenteroides* 등은 30℃에서 16시간, 효모는 30℃에서 16시간 그리고 곰팡이는 30℃에서 48시간 배양하여 paper disc 주위의 clear zone의 크기(㎜)로 활성의 정도를 측정하였다.

Table 13. Microorganisms used for testing the antimicrobial activities.

Gram positive bacteria

Streptococcus mutans ATCC 25175

Staphylococcus aureus ATCC 6538

Staphylococcus epidermidis ATCC 12228

Bacillus subtilis ATCC 6633

Micrococcus luteus ATCC 9341

Gram negative bacteria

Escherichia coli ATCC 10536

Salmonella typhimurium ATCC 19430

Pseudomonas aeruginosa ATCC 1628

Vibrio vulnificus CDC C7184

Lactic acid bacteria

Lactobacillus plantarum KCTC 3104

Leuconostoc mensenteroides KCTC 3100

Yeasts

Saccharomyces cerevisiae IFO 1850

Mold

Aspergillus parasiticus KCTC 6170

ATCC is the abbreviation of American Type Culture Collection.

KCTC is the abbreviation of Korean Collection for Type Culture.

IFO is the abbreviation of Institute for Fermentation, OSAKA.

CDC is the abbreviation of Central Disease Center.

제3절 연구 결과

증제차와 유념차의 열수추출물을 동결건조한 분말을 *n*-Hexane, EtOAc, MeOH 로 순차추출하여 항균활성을 조사한 결과, MeOH추출물에 활성이 집중되었다. 이에 각각의 차 0.2 g 및 0.5 g에 상당하는 MeOH추출물로 항미생물 활성을 측정한 결과, Table 14, 15에 나타난 바와 같이 Gram양성세균 중에서 *S. aureus* 와 *S. epidermidis*는 대조구에서 보다 강한 활성이 나타났고, *M. luteus*와 *L. mesenteroides*, *B. subtilis*에서도 활성이 인정되었으며, Gram음성세균은 *E. coli*, *S. typhimurium*, *P. aeruginosa*에서 비교적 강한 활성이 나타났다. 그외 *S. mutans*를 비롯한 몇몇 균주와 효모에서는 활성이 미약하였지만 증제차와 유념차의 물추출물은 비교적 넓은 항균 spectra를 나타냈으며, 활성도 강한 편이었다. 이상의 결과로 보아 밤나무 잎차는 상당한 항균활성 효과가 있음이 확인되었고, 또한 가공방법을 달리한 두종류의 차 모두 황균활성이 나타나 이는 항균활성의 효과가 밤잎차의 재료인 밤나무 잎에서 유래한 물질로 생각된다. 따라서 추후 밤잎차에존재가 시사된 이들 항미생물활성 물질의 분리, 정제를 통해 활성본체의 규명과 다양한 항균활성 검정을 통해 밤나무 잎이 갖는 항미생물 효과의 기능성을 규명하는 것은 좋은 연구과제가 되리라 사료된다.

Table 14. Antimicrobial activities of methanol extracts from water extracts of Non-fermented steaming tea

Microorganism	Clear zone (mm)		
	Non-fermented steaming tea 0.2 g eq.[1]	Non-fermented steaming tea 0.5 g eq.[1]	B.A[2] 0.65mg
Staphylococcus aureus ATCC 5638	12	15	12
Staphylococcus epidermidis ATCC 12228	-	15	12
Bacillus subtilis ATCC 6633	-	14	12
Micrococcus luteus ATCC 9341	12	16	12
Streptococcus mutans ATCC 25175	-	-	-
Lactobacillus plantarum KCTC 3104	12	14	12
Leuconostoc mesenteroides KCTC 3100	12	16	12
Escherichia coli ATCC 10536	12	15	13
Salmonella typhimurium ATCC 19430	12	16	12
Pseudomonas aeruginosa KCTC 1628	12	17	13
Vibrio vulnificus CDC C7184	-	12	12
Candida albicans ATCC 10231	12	17	13
Saccharomyces cerevisiae IFO 1850	12	13	14

1) Extract of *Castanea crenata* leaf tea g. eq. /10 mm paper disc

2) Benzoic acid

- : No inhibition

Table 15. Antimicrobial activities of methanol extracts from water extracts of Semi-fermented rolling tea

Microorganism	Clear zone (mm)		
	Semi-fermented rolling tea 0.2 g eq.[1]	Semi-fermented rolling tea 0.5 g eq.[1]	B.A[2] 0.65mg
Staphylococcus aureus ATCC 5638	13	16	13
Staphylococcus epidermidis ATCC 12228	11	15	12
Bacillus subtilis ATCC 6633	-	15	12
Micrococcus luteus ATCC 9341	12	17	13
Streptococcus mutans ATCC 25175	-	-	-
Lactobacillus plantarum KCTC 3104	12	14	12
Leuconostoc mesenteroides KCTC 3100	12	15	12
Escherichia coli ATCC 10536	12	16	13
Salmonella typhimurium ATCC 19430	12	16	12
Pseudomonas aeruginosa KCTC 1628	12	17	13
Vibrio vulnificus CDC C7184	-	12	12
Candida albicans ATCC 10231	11	17	13
Saccharomyces cerevisiae IFO 1850	12	13	13

1) Extract of *Castanea crenata* leaf tea g. eq. /10 mm paper disc

2) Benzoic acid

- : No inhibition

제 4-2-3 장 항 비만성 효과의 탐색

제1절 연구 개발 목표

비만은 단순히 외모상의 문제 때문이 아니라 이에 수반되는 당뇨병이라든지 고혈압, 심혈관계질환, 뇌혈관계 질환, 유방암, 관절염 및 담낭 질환 등의 합병증 발생으로 인하여 의학적으로 심각한 질병으로 여겨지고 있다. 비만으로 인한 사망률의 증가는 관상 동맥성 심장질환에 있어서 40%, 고혈압과 담석증의 경우는 50%, 그리고 당뇨병의 경우는 무려 80-130%가 증가된다고 보고되었다. 서구 여러 나라에서는 해가 거듭될수록 비만에 대한 문제가 더욱 심각해져 전체인구의 40~50%가 과다체중 혹은 비만으로 시달리고 있으며 비만으로 인하여 야기되는 질병치료에 소요되는 의료비는 날로 증가하고 있다고 한다. 우리 나라에서도 최근에 식생활의 형태가 급격히 서구화되고 교통수단의 발달로 활동량이 저하되면서 비만의 문제가 심각한 사회문제로 대두되고 있는데 성인여성을 대상으로 한 최근의 조사에 의하면 과다체중을 포함한 비만인구의 비율이 24-36%인 것으로 나타났으며, 비만인구의 비율은 계속적으로 증가하고 있다. 더욱이 최근에는 점차 비만중이 발생하는 연령이 낮아져, 소아비만증의 발생율이 높아지고 있다46-48).

비만이 이와 같이 국제적으로 하나의 심각한 건강문제로 대두되면서 비만의 예방 및 치료를 위한 방법들이 다각적인 측면에 연구되고 있다. 열량섭취를 제한하는 열량제한 식이요법, 운동요법, 수술요법 그리고 식욕억제제 혹은 에너지대사 촉진제 등을 사용하는 약물요법 등이 제시되었으나, 여러 가지 이유로 인하여 기대하는 만큼 효과적으로 사용되어지는 못하고 있다.

현재 서구에서는 비만의 치료를 위하여 위의 열거한 방법들의 단점을 보완하는 연구가 활발히 진행되고 있다. 특히 에너지대사 촉진제의 경우 열량섭취를 제한하지 않고도 체중감소 효과를 얻을 수 있다는 장점 때문에 이 분야

의 연구가 활발히 이루어지고 있다. 그러나 현재까지 개발된 에너지대사 촉진제는 모두가 심각한 부작용을 수반하는 문제점을 안고 있다. 만일 이러한 약물이 실용화될 경우 비만인 뿐만 아니라 과다체중인 그리고 정상 체중인에 이르기까지 남용될 우려가 있으며 약물에 장기간 의존할 경향이 크므로 약물복용에 따른 부작용은 심각한 문제로 인지되고 있다. 이러한 면에서 부작용을 수반하지 않고 에너지대사를 유의적으로 증가시킬 수 있는 약물의 개발이 시급한데 현재로서는 거의 걸음마 단계에 있다고 하겠다49-52).

한편, 우리 나라는 동양 의학권에 속하면서 한방의학과 민간요법을 상당히 발전시켜 왔는데 최근에 한방의학과 민간요법에서 쓰이는 재료 등이 탁월한 생리활성을 나타내고 부작용이 없다는 것이 서서히 밝혀지면서 한방의학과 민간요법에 대한 관심이 더욱 높아지고 있으며 이를 과학화하는 노력이 절실히 요구되어 지고 있다. 한방의학과 민감요법에서 비만의 예방 및 치료에 효과가 있다는 물질들에 관한한, 문헌보다는 구전에 의해 알려지고 있는 것들이 많은데 비만의 예방 및 치료에 이들의 사용에 대한 연구는 전무한 상태이다.

따라서 본 연구에서는 그동안 운동 전 녹차를 마시면 에너지원으로 지방이 우선적으로 연소되기 때문에 다이어트 효과가 있으며, 또한 최근 녹차나 뽕나무를 이용한 차등 일부종류의 차를 식후에 마시면 차성분중 탄닌, 카테킨 등의 성분이 지방분해효소의 작용을 강화시켜 주기 때문에 기름기 있는 음식을 먹는 경우에 효과적이라는 보고를 토대로 밤나무잎차 추출물의 항비만효과에 대한 탐색을 시도하였다53).

제2절 실험 방법

제1항 밤잎차 추출물의 제조

제조한 밤잎차중 증제차를 실험시료로 하였으며, 증제차 2 g에 90℃ 열수 50 ㎖의 비율로 5분동안 추출한 다음 여과하고 여액을 동결건조하여 분말로 만들어 추출물로 하였다.

제2항 실험동물 및 식이

실험동물은 170±3 g 정도의 Sprague-Dawley 종의 male rat를 구입하여 실험전 1주일간 본 실험장소의 환경에 적응시킨 후 정상군과 고지방식이군으로 나누어 정상군에는 10%의 지방식이를 섭취시켰으며, 고지방식이군에는 30% 지방식이를 섭취시켜 사육하였으며, 대조군과 함께 실험 동물은 각각 한마리씩 분리하여 metabolic cage에서 14일간 사육하였다. 이때 사용된 식이의 구성은 Table 16과 같다.

제3항 실험방법

(1) 고지방식이에 의한 체지방 증가 유도

어떤 물질이 항비만성 효과를 가지고 있는지를 조사하려면 우선 실험동물에서 지방축적의 증가를 유도하여야 하는데 실험동물에서 지방축적을 증가시켜 비만을 유도하는 방법에는 식이조절법, 내분비계 변형법 그리고 수술 혹은 화학물질에 의한 뇌신경 파괴법 등 다양한 방법들이 사용되어지고 있다. 이들 중에서 인위적인 스트레스를 주지 않고 자연적으로 비만을 유도하는 방법이 식이조절법인데 그중에서도 고지방식이를 섭취시키는 방법이 가능한 것으로 제시되고 있으며 본 실험에서 도 이와 같은 방법으로 지방축적의 증가를 유도

하였다. 따라서 본 실험에서는 대략 총섭취 열량의 55% 정도를 지방으로부터 얻게 만든 30% 지방식이를 실험동물에 섭취시킨후 체지방 축적과 에네지 균형의 변화를 조사하여 항비만성 효과를 검색하였다[49-52].

(2) 밤잎차 추출물의 투여 방법

열수 추출하여 동결건조한 증제차 건조분말을 고지방식이에 각각 0.1%와 0.5%를 첨가하여 고르게 섞은뒤 일정량을 실험군에 투여하였다.

Table 16. Composition of basal diet

Ingredients	Normal (g/kg)	High Fat (g/kg)
Casein	200	200
Corn starch	521	321
Sucrose	100	100
Corn oil	100	100
Lard		200
Cellulose	30	30
DL-methionine	2	2
Mineral mix·(AIN 76)	35	35
Vitamin mix (AIN 76)	10	10
Choline chloride	2	2
Protein content	174 g/kg	174 g/kg
Metabolizable Energy content	4.12 Kcal/g	5.04 Kcal/g

(3) 체지방 축적 및 에너지 균형에 미치는 영향 요소의 측정내용 및 방법

① 체중변화(body weight gain) : 최종변화(final body weight)에서 최초체중 (initial body weight)을 뺀 값

② 열량섭취량(energy intake) : 실험기간 동안 섭취한 열량

③ 체지방 축적(body fat gain) : 체지방은 동물을 건조하여 믹서에 균질화한 후 Soxhlet 추출법에 의해 지방을 추출하고 체지방 축적은 체지방 함량에서 최초의 체지방 함량을 뺀 값

④ 체단백질 축적(body protein gain) : 체단백질은 동물을 건조하여 믹서에서 균질화한 후 Kjeldahl 법에 의해 단백질을 정량하고 체단백질 축적은 최종 체단 백질 함량에서 최초의 체단백질 함량을 뺀 값

⑤ 에너지 소비량(energy expenditure) : 열량 섭취량에서 체지방 축적에 의한 에너지 축적량 (체지방 축적량 × 9.22Kcal)과 체단백질 축적에 의한 에너지 축 적량 (체단백질 축적량 × 5.42 Kcal)를 합한 값을 뺀 값

제3절 실험 결과

제1항 고지방식이에 의한 체지방 증가 유도

정상식이에서 전분의 일부를 라드로 대치하여 지방함유량을 30% 되게한 고지방식이를 실험쥐에 14일간 섭취시켰을 때 열량섭취량은 변화하지 않았으나 체지방축적량이 43% 증가하였으며, 이러한 현상은 에너지소비량의 감소에 의한 것이었다. 따라서 본 연구에서 사용된 고지방식이는 체지방의 축적을 증가시키는데 적합한 것으로 나타났으며, 천연물의 항비만성 효과를 조사하는데 적합하다고 사료된다.

제2항 밤잎차 추출물이 체지방 축적 및 에너지 균형에 미치는 영향

밤잎차 추출물을 30% 고지방식이에 각각 0.1%, 0.5% 수준으로 섞어 투여하였을때 에너지 섭취는 증가하였으나 체지방 축적은 변화하지 않았으므로 결국 에너지 소비가 증가한 것으로 나타났다. 따라서 밤잎차 추출물의 항비만성 효과를 조사해본 결과 Table 17에 제시한 바와 같이 밤잎차 추출물은 체지방을 감소시키는 효과를 나타내지는 않았지만 식이섭취량을 증가시키는 다시말해서 식욕증진 효과를 보였는데 흥미롭게도 에너지 섭취가 증가된 만큼 체지방 증가를 유도하지는 않았다. 비록 그 유의차가 미미한 것이기는 하지만 이들 결과를 토대로 pair-feeding방법 즉, 실험동물을 두군으로 나누고 몸무게에 따라 2마리씩 짝을 이루게 한 다음 한짝에서 한쪽군은 자유롭게 식이를 섭취하게 하고, 다른 한쪽군은 각각의 짝이 섭취한 양만큼의 식이만을 섭취하게 하여 식욕을 억제하여 추출물의 항비만성 효과를 보다 정확하게 측정하는 방법이나 지방 분해 효과가 있는 triiodothyronine, growth horomone, norepinephrine 등의 혈중 농도를 측정하여 항비만성 효과의 보다 정확한 실

험을 실시하고 또한 다른 항비만성 효과가 있는 물질과 혼합하여 항비만성 효과의 증가 여부 등을 조사하는 것이 추후 과제이며, 본 실험방법으로 조사한 항비만성효과는 유의차가 적어 단정하기는 어렵겠지만 에너지 섭취가 증가된 만큼 체지방 증가를 유도하지 않은 점은 밤잎차가 갖는 또 하나의 기능성 이라는 점에서 흥미로운 결과로 사료된다.

Table 17. Effects of high-fat diet (30% fat) on energy intake, body fat gain, body protein gain and energy expenditure

Group	Initial Body Weight (g)	Final Body Weight (g)	Weight Gain (g/14d)	Energy Intake (Kcal/14d)	Final Body Fat Content (g)	Energy Expenditure (Kcal/14d)
High-fat diet	172.1±3.9	255.7±16.8	83.6±14.9	851±66	33.0±5.4	590±21
High-fat diet + Extract (0.1%)	169.0±8.0	257.6±13.4	88.6±8.5	858±61	33.0±4.3	591±47
High-fat diet + Extract (0.5%)	169.5±5.9	259.8±22.9	90.3±18.1	908±158	34.6±12.0	623±62

※ Value are means with their standard errors represented by vertical bars for eight rats. Mean values for the normal and high-fat groups were significantly different, $p<0.05$.

제 4-3 장 밤잎차의 저장 안정성

제1절 연구 개발 목적

밤나무 잎을 이용한 기능성식품을 개발하고자 제조한 증제차와 유념차는 성분분석 결과, 다양한 식품성분을 함유하고 있는 것으로 나타났고, 또한 항알레르기 효과, 항미생물 활성, 항비만성 효과 등 기능성을 갖고 있는 것으로 확인되었다. 그러나 밤잎차는 잎을 수확할 수 있는 시기가 한정되어 있어 제조된 밤잎차는 저장성이 요구되므로 이에 포장방법과 저장조건을 달리하여 차의 수색, 비타민 C의 함량과 항알레르기 효과의 안정성을 경시적으로 분석하여 밤잎차가 갖고 있는 기능성분이나 기호적 요소의 저장성을 검토 하였다.

제2절 실험 방법

제1항 실험재료

Fig 1, 2에서 제시한 방법으로 제조된 각각의 밤잎차를 차 제조용 분쇄기로 2 ㎜이하의 크기로 분쇄하여 저장성 실험을 위해 녹차 제조용 포장재를 이용해 각각 tea bag 및 aluminium 포장하여 4℃와 35℃에서 저장한 것을 실험재료로 사용하였다.

제2항 수색의 분석 및 측정

포장 및 저장 조건을 달리한 증제차와 유념차 각각 1 g을 100℃ 열수중에서 5분 동안 추출한 다음 냉각 후 녹차 여과용 마포천으로 여과하고 10분 동안 정치하여 상징액 10 ㎖를 색차계(Color difference meter, TC-3600, Tokyo Denshoku Co., LTD)로 Hunter's value L, a, b를 측정하여 lightness, redness, yellowness를 비교하였으며, 이때 사용한 표준 백색판의 색도는 L=90.2, a=1.3, b=3.2였고 동일조건에서 한달간격으로 12개월 동안 수색의 L, a, b값을 측정하였다[54]. 밤나무 잎을 차로 제조한 초기 Hunter's value는 Table 18에 나타내었다.

Table 18. Hunter's value of *Castanea crenata* leaf tea by Color difference meter

Tea	Hunter's value		
	L	a	b
Non-fermented steaming tea -Tea bag	70.4	0.1	15.5
Non-fermented steaming tea -Aluminium pack	72.0	0.2	15.3
Semi-fermented rolling tea -Tea bag	67.0	2.1	32.3
Semi-fermented rolling tea -Aluminium pack	69.0	1.9	31.0

제3항 비타민 C 의 분석

밤나무 잎차의 비타민 C의 분석은 식품공전의 HPLC에 의한 분석 방법에 준하여 실시하였다19-21). 즉, 증제차와 유념차를 분쇄하여 각각 1 g을 정확히 칭량한 후 5% meta-phosphoric acid 100 mℓ를 가하여 magnetic stirrer에서 열을 가하지 않고 10분동안 추출한다음 여과하여 여액을 메스플라스크에 옮기고 5% meta-phosphoric acid로 100 mℓ로 정용하였다. 정용한 시료를 1,380×g에서 15분간 원심분리한 뒤 상징액을 0.25 ㎛ filter로 여과하여 HPLC 주입용 시료로 하였으며 HPLC 분석 조건은 Table 19와 같다.

Table 19. Conditions of HPLC for analysis of vitamin C

Instrument	Waters Associate Model 441
Detector	Waters 441 UV Detector
Wave length	254 nm
Column	Radial-Pak NH_2 column, Waters
Eluent	0.05M KH_2PO_4 - CH_3CN (6 : 4, V/V)
Flow rate	1.0 mℓ/min

제4항 항알레르기 효과의 검정

밤잎차의 항알레르기 효과는 Fig. 4의 항알레르기 효과의 실험방법과 동일한 Choi 등의 enzyme assay방법39)을 이용하여 RBL-2H3 세포로부터 hexosaminidase의 방출 억제 정도를 측정하여 검정하였다.

제3절 실험 결과

제1항 수색의 안정성

제조된 각각의 밤잎차를 tea bag과 aluminium pack으로 포장방법을 달리하고 4℃ 냉장조건과 35℃ 가혹조건으로 저장조건을 달리하면서 색차계를 이용해 Hunter의 L, a, b값를 측정하여 한달간격으로 수색의 변화를 분석한 결과 증제차는 Fig. 4에 제시한 바와 같이 tea bag 및 aluminium pack시료 모두 1개월후 명도인 L값이 증가하고 황색도인 b값이 감소하였으며, 35℃에서 저장한 시료가 4℃에서 저장한 시료 보다 약간 높은 차이를 나타냈고 적색도인 a값의 변화는 나타나지 않았으며, 이후 전 실험기간동안 비교적 안정된 수색을 나타냈다. 유념차는 Fig. 5에 나타난 바와 같이 L값과 a값의 변화는 거의 나타나지 않았고 황색도인 b값 만이 저장 초기에 약간 감소하는 경향을 보인후 실험기간동안 거의 일정한 수색을 나타냈다. 따라서 밤잎차 추출물의 수색의 변화는 차를 제조시 수분함량을 6%이하로 건조했기 때문에 큰 변화를 나타내지 않는 것으로 생각되며, 본 방법으로 제조된 밤잎차는 포장 및 저장조건에 크게 영향을 받지 않고 1년 정도는 안정된 수색을 유지하는 것으로 확인되었다.

제2항 비타민 C의 변화

증제차와 유념차를 HPLC로 비타민 C 함량을 표준품과 비교해서 측정한 결과 유념차에서는 제조공정중 유념 및 발효과정에서 산화된 것으로 생각되며 검출되지 않았다. 증제차는 제조직 후 약 1.24 mg%정도를 함유하고 있었으며,

그 후 35℃에서 저장한 시료는 1개월후부터 검출되지 않았고 4℃ 저장시료는 함량이 점차 감소하여 3개월째 부터는 검출되지 않았다. 따라서 aluminium포장하여 4℃에서 저장한 시료가 비타민 C의 안정성이 비교적 유지 되는 것으로 나타났으며, 추후 포장방법 등의 개선을 통해 이들 성분의 손실을 방지할 수 있는 방법을 검토해야 할 것으로 사료된다.

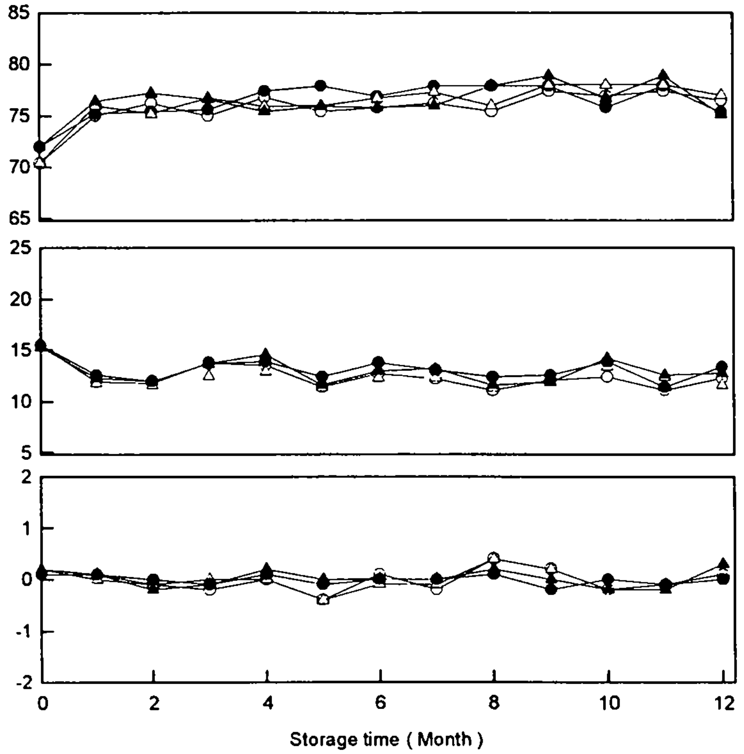


Fig. 4. Changes in Hunter value of non-fermented steaming tea with conditions of storage and packing.

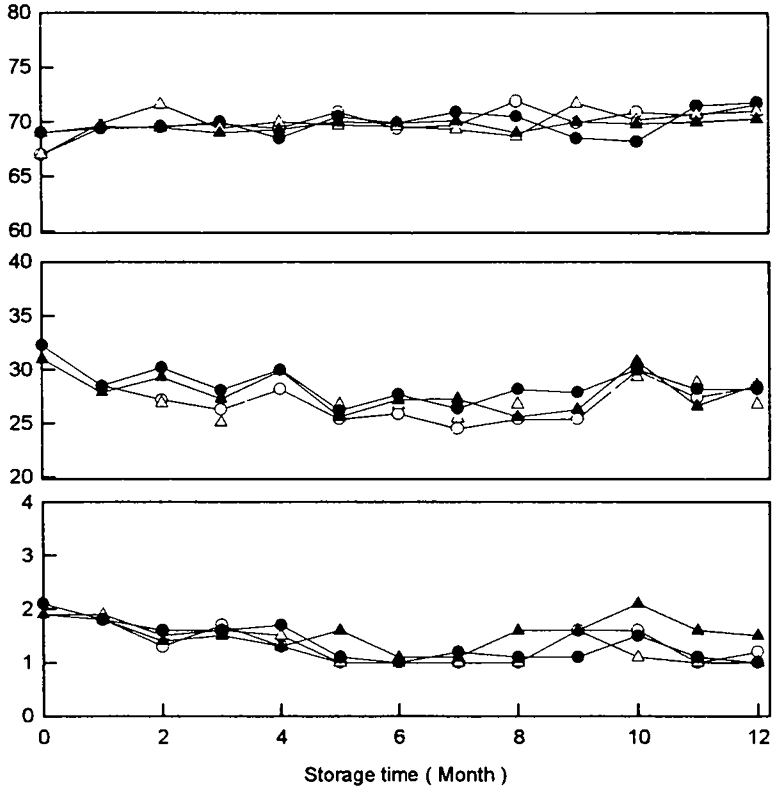


Fig. 5. Changes in Hunter value of semi-fermented rolling tea with conditions of storage and packing.

—○— 4℃, tea bag —△— 4°C, aluminium pack

—●— 35°C, tea bag —▲— 35°C, aluminium pack

제3항 항알레르기 효과의 저장중 안정성

RBL-2H3 세포로부터 hexosaminidase의 방출 억제 정도를 측정하는 enzyme assay방법으로 밤나무 잎차 추출물의 항알레르기 효과를 검정한 결과 초기 밤잎차 추출물 300 ㎍/㎖의 수준에서 증제차는 50.4%, 유념차는 35.4%의 저해 효과를 나타냈으며, 대조구로 사용한 quercetin이 같은 농도에서 83.15%의 저해 효과를 나타내어 밤나무 잎차 추출물이 조추출물(crude extracts) 상태인 점을 고려해 보면 상당한 항알레르기 효과가 있음이 확인되었다. 한편, 포장방법 및 저장조건을 달리하여 한달간격으로 항알레르기 효과를 측정한 결과, 증제차는 Fig. 6에 나타난 바와 같이 초기 50%정도의 항알레르기 활성이 전 실험기간동안 거의 변화 없이 유지되고 있음을 확인 하였고, 유념차 또한 Fig. 7에 제시한 바와 같이 초기의 활성을 그대로 유지하고 있는 것으로 나타나 밤나무 잎차의 항알레르기 효과의 기능성은 포장 및 저장방법에 상관없이 1년 정도는 안정적으로 유지되고 있음이 확인되었다.

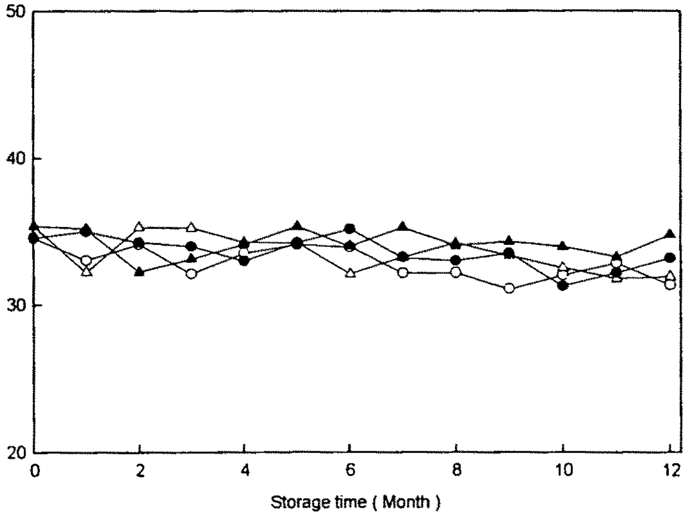


Fig. 7. Changes in anti-allergy effects of semi-fermented rolling tea with conditions of storage and packing.

—○— : tea bag (4 °C) —△— : aluminium pack (4 °C)
—●— : tea bag (35 °C) —▲— : aluminium pack (35 °C)

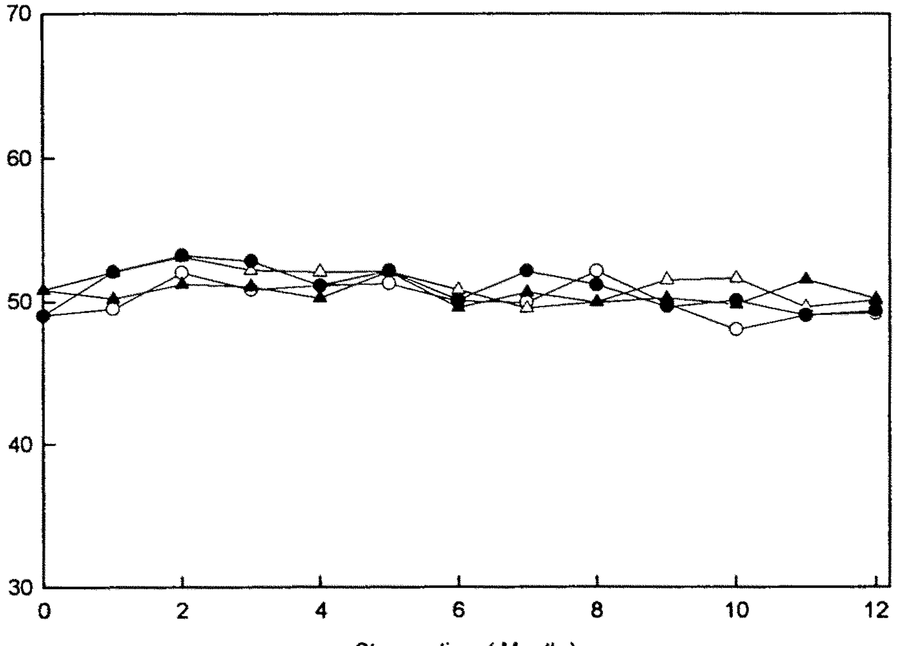


Fig. 6. Changes in anti-allergy effects of non-fermented steaming tea with conditions of storage and packing.

—○— : tea bag (4 °C) —△— : aluminium pack (4 °C)
—●— : tea bag (35 °C) —▲— : aluminium pack (35 °C)

제4절 참고문헌

1. 露木英男(1994) 食品の本質と機能を考える, *New Food Industry*, 34(2)
2. 신물질탐색연구회 · 생명공학연구소(1996) 신물질탐색, 자유아카데미
3. 신현경(1997) 기능성식품의 개발 및 연구동향, 식품과학과 산업, 30(1)
4. 최동성, 고하영 (1997) 식품기능화학, 지구문화사, p 235-329
5. 황금희, 김현구(1995) 기능성식품 소재로서 생물활성 천연물의 국내 연구동향, 식품과학과 산업, 28(3)
6. 양한철(생체기능조절 천연소재연구회) (1996) 식품신소재학, 도서출판 한림원
7. Pszczola, D.E. (1993) Designer foods, *Food Technology*, 47(3)
8. 식품위생교재편찬위원회 (1998) 식품위생관계법규 (식품위생법 해설), 지구문화사
9. 鄭普燮, 辛民敎(1990) 圖解 鄕藥(生藥)大辭典-植物篇, 營林社, p.806-807
10. 李昌福(1994) 大韓植物圖鑑, 鄕門社, p.273
11. Roberto Chiej (1984) The Macdonald encyclopedia of medical plants. *Macdonald Press*, Britain, No. 72
12. 韓國食品工業協會(1997) 食品工典(茶類), p.309-318.
13. 中林敏郎(1991) 綠茶, 紅茶, 烏龍茶の化學と機能, 弘學出版, p,1-10
14. 靜岡 茶業會議所 (1988) 新茶業全書, p.327-380
15. 한국식품과학회 (1995) 제3회 국제 녹차 심포지움 발표 논문집-녹차의 기능성
16. Eun Lee (1996) Effects of *Castanea crenata* on immediate hypersensitivity, Ms. thesis, Chonnam National Univ., Kwangju, Korea
17. Young-Ran Kim (1992) Anti-allegic action of some crude drugs Ms. thesis, Chonnam National Univ., Kwangju, Korea
18. 김동연, 권용주, 양희천(1990) 식품화학, 영지문화사, p545
19. 朴章炫 (1997) 茶樹의 葉位別 化學成分에 관한 硏究, 韓國茶學會誌, 3 (1)

20. 靜網 農業水産部(1983) 茶生産指導指針, p.74-86
21. 池谷賢次郎, 高柳博次, 阿南豊正(1990) 茶の分析法, 茶業硏究報告, 71, p43-74
22. Association of Official Analytical Chemists (1990) Official Methods Analysis, 15th ed, Washington, D.C
23. 주현규외 5인 (1995) 식품분석법, 5장-일반성분 분석법, 학문사
24. 千葉百子(1995) 微量元素の攝取と健康, 化學と生物, 33(6), p370-371
25. 韓國食品工業協會(1997) 食品工典(비타민류 분석), p268-269
26. 정선영, 이수정, 성낙주(1995) 감잎차의 화학 성분, 한국영양식량학회지, 24(5)
27. 박수선 (1977) 고들빼기의 성분 및 생물활성 활성에 관한 연구, 한국 생화학회지, 10(4)
28. 科學技術廳資源調査會 (1991) 日本食品成分表(四丁) 医歯藥出版株式會社, し好飲料類, p.238-239
40. 戶田眞佐子, 大久保辛枝, 大西玲子, 島村忠勝 (1989) 感染病誌, 44, 996
41. 戶田眞佐子, 大久保辛枝, 島村忠勝 (1990) 感染病誌, 64, 1108
42. 原征彦, 石上正 (1989) 茶ポリフエノ-ル類の食中毒細菌に對する抗菌活性, 日本食品工業學會誌, 36, 996
43. Cao Jin (1995) External test and clinical observation and evaluation of the caries preventive effect of tea. The 3rd International Symposium on Green Tea, p.83
44. Zaika, L.L. (1988) Spices and herbs. Thier antimicrobial activity and it's determination. *J. Food Safty,* **9**, 97
45. Harrigan, W.F. and Margaret E.M. (1976) Laboratory methods in food and dairy. *Microbiology, Academic Press*, p. 25
46. Danforth E and Burger A. (1984) The role of thyroid hormones in the control of energy expenditure. Clinics in Endocrinology and Metabolism, 13 (3): 581-596
47. Brooks SL,Rothwell NJ and Stock MJ. (1982) Effects of diet and acute noradrenaline treatment on brown adipose tissue development and mitochondrial purine-nucleotide binding. *Quarterly Jounal of Experimental Physiology*, 67: 259-268
48. Garrow JS. (1992) Treatment of obesity. The Lancet, 340 : 409-413

49. Iossa S, Mollica MP, Lionetti L, Barletta A and Liverini G. (1997) Energy balance and liver respiratory activity in rats fed on an energy-dense diet. *British Journal of Nutrition,* 77: 99-105

50. Macdonald IA. (1995) Advances in our understanding of the role of the sympathetic nervous system in obesity. *International Journal of Obesity, Supplement* 7: S2-S7

51. Miller DS and Dulloo AG. (1983) Energy balance following sympathetic denervation of brown adipose tissue. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, 62: 235-240

52. Rothwell NJ and Stock MJ. (1984) The development of obesity in animals : The role of dietary factors. Clinics in Endocrinology and Metabolism, 13(3): 437-449

53. 김종태 (1995) 茶 이야기, 오롬시스템출판, 서울

54. Kim, S.J. and Park K.H. (1992) Studies on the storage stability of Jindo Hongju pigment *Korean J. Food Sci. Technol.,* 24

제 5 장 유효성분의 분리 및 유기 합성

제1절 연구개발목표

본 연구의 목적은 우리의 농림자원인 밤나무 잎을 이용하여 새로운 식품 또는 의약품을 개발하는데 있으며 이러한 목적을 달성하기 위하여 제 4 세부과제에서는 밤나무잎의 비수용성 추출물에서 항알레르기 성분을 분리하고 구조를 규명한 후 이 활성 성분에 대한 합성을 추진하고자 하였다.

밤나무잎에서 항알레르기 효과를 지닌 성분을 분리하기 위해서 우리는 bioassay-directed fractionation 방법 (활성유도 분획법)을 사용하였는데 활성유도 분획법이란 일반적으로 검체가 보여주는 약리작용을 토대로 하여 그 속에 함유되어 있는 활성본체물질을 분리하는 방법이며 일반적으로 가장 널리 쓰이고 있는 방법중의 하나이다. 우선 검체를 임의로 두 가지 혹은 그 이상의 분획 (fraction)으로 나눈 후 각각의 분획에 대하여 약리작용을 모검체의 경우와 똑같은 조건하에서 측정하여 약리작용이 어느 분획에서 발현하는지를 확인하고, 약리작용이 나타난 분획을 다시 수개의 분획으로 재차 나눈 후 이때 얻어진 분획들에 대하여 다시 같은 방법으로 약리작용을 측정하여 보다 우수한 효과를 보여주는 분획을 단계적으로 선택하여 나가는 방식이라고 할 수 있다. 이와 같은 조작을 수 차례 반복하게 되면 마침내 추출물에서 가장 우수한 약리효과를 나타내는 성분을 분리할 수 있게 된다. 간혹 검체 중에 두 가지 이상의 서로 다른 활성본체가 존재할 경우에는 보다 복잡한 분획작업 (fractionation)이 요구될 수 있다. 또, 모검체가 보여주는 약리효과의 총량 (total activity)이 fractionation이 진행됨에 따라 하나의 분획 (fraction)으로 집중되어 나타나야만 보다 빨리 활성성분의 분리에 도달할 수 있게 된

다. 따라서 fractionation이 진행될 때마다 각 분획의 약리효과를 정량적으로 비교할 수 있도록 specific activity 등의 parameter를 미리 설정하여 활성성분이 각각의 분획으로 분산되는 양상을 정확하게 파악하여야 한다. 즉 각 단계의 fractionation이 진행될 때마다 하나의 분획으로 total activity의 분산이 일어나지 않고 specific activity가 계속적으로 증가할 수 있도록 하는 적합한 fractionation방법을 고안하는 일이 본 방법의 성패를 좌우하는 가장 중요한 요건이다.

제 4 세부과제에서는 비수용성 추출물질에서의 활성성분 분리, 추출, 검색이므로 다양한 용매의 사용이 가능하다. 용매의 성질은 친수성, 소수성, 극성, 비극성, 휘발성, 비휘발성 등으로 나누어지는데 수용성 추출물을 분리한 후이므로 친수성과 극성이 점차 작아지는 용매들을 이용하여 추출하였다.

위의 방법으로 최대의 약리효과를 나타내는 분획을 선발한 후 분획 중에 포함된 유효성분이 단일 물질인지의 여부를 확인하기 위하여 chromatography 등의 방법을 이용하였다. 다음으로 단일활성성분의 분자구조와 물리화학적 성질, 안정성 등을 규명하고 이의 확인과 다량 생산의 가능성을 조사하기 위하여 분리된 물질의 합성을 모색하였다. 규명된 분자 구조를 확정시키는 최선의 방법은 잘 알려진 화합물로부터 정립된 유기합성법을 이용하여 구조가 밝혀진 화합물을 총합성하는 것이다. 총합성을 하기 위해서는 분자의 화학적, 물리적 특성을 파악한 후 역합성분석법 (retro-synthetic analysis)을 이용하여 몇가지 합성 계획을 세운 후 기초 실험을 진행하여 가장 합리적인 합성계획을 수립하고 이에 따라 총합성을 완성한다. 이렇게 하여 합성이 완료되면 분자구조의 규명이 확실해질 뿐만 아니라 개발해낸 합성법을 이용하여 약리효과가 높은 화학물질의 대량생산도 가능하게 되어 그의 약리작용을 밝혀내는데 도움을 줄 수 있게 된다.

또한 확립된 분자구조와 확인된 약리활성은 구조-활성상관관계의 연구에 이

용될 수 있다. 구조-활성상관관계의 연구는 의약화학에서 흔히 사용되는 방법으로 분자구조와 활성이 알려진 화합물을 선도물질로 하여 그 분자구조에서 약리효과를 나타내는 부위들을 파악한 후 이들을 변형시켜가면서 활성을 높이고 부작용을 최소화하는 것이다. 만약 분리된 물질이 단일 성분이고 *in vitro* 와 *in vivo* 실험 모두에서 우수한 항알레르기 효과를 나타낼 경우에는 구조-활성상관관계의 연구로 새로운 약물이 개발될 수 있을 것이다.

제2절 실험방법

제1항 밤나무 잎에서 유효성분의 추출

봄(5월 말 경)에 지역별로 수집한 밤나무의 어린잎을 통풍이 잘되고 햇빛이 들지 않는 장소에서 건조한다. 환류 냉각기가 설치된 둥근 flask에 120g의 마른 밤나무 잎을 넣고 MeOH (800 mL) 과 물 (200 mL)을 가하여 3 시간 동안 가열환류시킨 후 상등액을 취하여 뜨거운 상태에서 와트만 1번 여과지로 여과한다. 밤나무 잎 잔사에 다시 MeOH (800 mL) 과 물 (200 mL)을 가하여 추출하는 위의 과정을 2번 더 반복하여 얻어진 여과액을 모두 합하여 감압하에서 농축한 후 잔류물을 hexanes, methylene chloride, ethyl acetate 및 n-butanol로 순차적으로 추출하고, 각각의 추출액을 핵산층, 메칠렌클로라이드층, 에틸아세테이트층 및 부탄올층이라고 명명하였다. 이와 같이 얻어진 핵산층, 메칠렌클로라이드층, 에틸아세테이트층 및 부탄올층의 항알레르기 효과를 histamine 유리억제실험 (Hexosaminidase release inhibition)으로 각각 평가하여본 결

과 핵산층과 에틸아세테이트층의 ED_{50} 값 (hexosaminidase 유리를 50% 저해하는 농도)은 약 30 ㎍/㎖ 인데 반하여 메칠렌클로라이드층 및 부탄올층은 ED_{50} 값이 약 200 ㎍/㎖ 이상이 되었다. 따라서 밤나무 잎의 비수용성 추출물에 존재하는 항알레르기 성분은 메칠렌클로라이드층, 에틸아세테이트층 속에는 거의 존재하지 아니하며 대부분 핵산층 혹은 에틸아세테이트층으로 이행하였음을 알 수 있었다.

핵산층 (Fr. 1) 3 g을 핵산과 에틸아세테이트에 녹인 후 silica gel column (Ø 2.0 x 60 ㎝)에 loading하고 핵산과 에틸아세테이트의 혼합용매 (10:1-1:10) 로 elution하여 Fr. 11-17을 조제하였다. 이들 fraction을 같은 방법으로 histamine 유리저해효과를 측정하여본 결과 Fr. 16이 100 ㎍/㎖에서 hexosaminidase 유리를 70% 이상 저해하여 항알레르기 활성물질은 Fr. 16으로 이행되고 있음을 알 수 있었다. 이와 같이 flash chromatography를 통한 fractionation으로 얻어진 각각의 분획(fraction)에 대하여 활성을 test하고 그중 가장 강한 활성을 나타내는 분획을 다시 flash chromatography로 재분획하는 방식을 한번 더 반복하여 100 ㎍/㎖에서 hexosaminidase 유리를 74% 이상 저해하는 Fr. 165를 30 mg 확보할 수 있었다. 또 에틸아세테이트층 (Fr. 3) 3 g을 전술한 조작과 동일하게 처리하여 100 ㎍/㎖에서 hexosaminidase 유리를 70% 이상 저해하는 Fr. 3212를 26 mg 확보할 수 있었다. Fr. 165와 Fr. 3212는 같은 물질임을 확인하고 이들을 MeOH로 재결정을 하여 미황색 분말 10 mg을 얻었다. 마른 밤나무 잎 120 g으로부터 얻어진 각각의 추출물의 양과 항알레르기 효과는 다음과 같다 (표 1).

표1. 각 분획에서의 항 알레르기효과

추출물	추출량 (g)	항알레르기 효과 측정농도 (μg/ml)	항알레르기 효과 (% control)
Hexanes층	6.41	200	79.3
		100	68.2
		30	61.3
Methylene chloride층	1.01	200	29.8
Ethyl acetate층	3.81	200	92.1
		100	62.3
		30	48.2
n-Butanol층	5.75	200	40.7
		100	28.5
		30	25.6

활성도가 높은 핵산추출물과 에틸아세테이트추출물에 대해서는 각 성분들을 flash column chromatography와 preparative thin layer chromatography를 이용하여 분리하고 분리된 성분들의 효과를 측정한 결과는 다음과 같다 (표2).

제2항 밤나무 잎에서 추출된 유효성분의 구조 결정

약리 효과가 가장 뛰어난 단일 성분의 구조를 밝히기 위하여 최근의 분자 구조 규명 방법을 이용하였는데 이는 질량측정법 (mass spectroscopy or tandem ms), 핵자기공명법 (nmr, nuclear magnetic resonance), 적외선 (IR)을 이용한 구조 규명법 등이다. 이들을 이용하여 측정한 밤나무 잎 추출물(Fr. 165와 Fr. 3212를 정제한 물질)의 물리화학적 성질 및 spectral data는 다음과 같다.

mp. >300℃;

IR (KBr, cm^{-1}): 3380, 1670, 1610, 1510, 1240;

MS (m/z) 302, 301, 274, 273, 245, 153, 142, 137, 128, 109

^{1}H-NMR (DMSO-d_6), δ 6.21 (s, 1H), 6.42 (s, 1H), 6.91 (d, 1H), 7.59 (d, 1H), 7.7 (s, 1H), 9.5 (bs, 4H), 12.7 (s, 1H)

위의 data는 물층에서 최종 분리된 항알레르기성 활성물질의 data와 같으며 이는 quercetin으로 확인되어 구조는 다음과 같다 (그림 1).

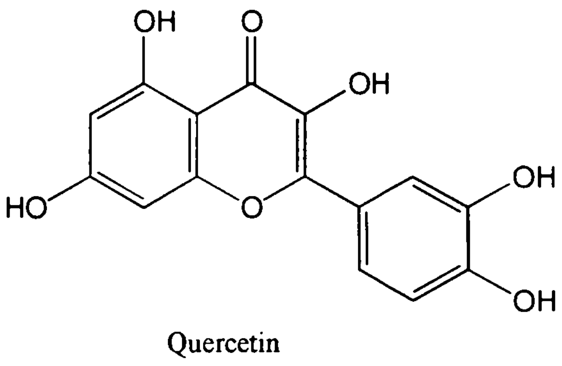


그림 1. Quercetin의 구조

표 2. 유기층에서 활성물질의 분리과정

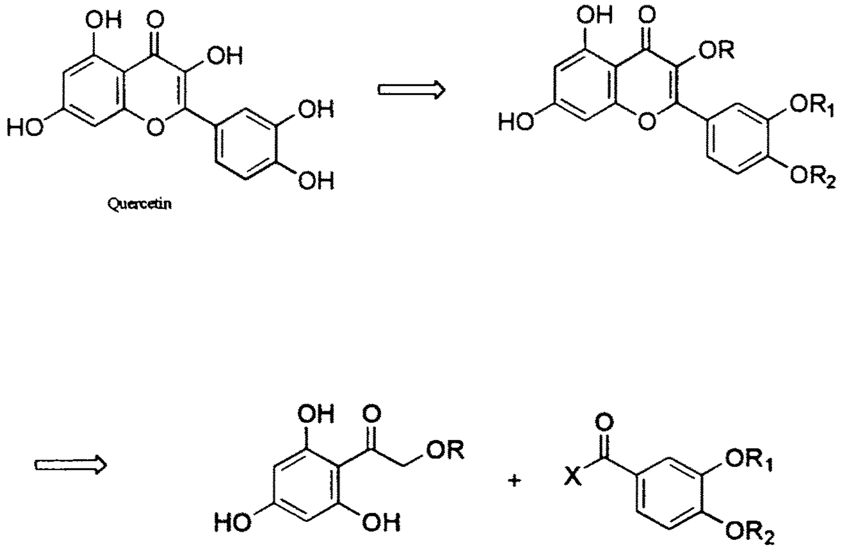
추출물	측정 농도 (μg/ml)	항 알레르기 효과 (% control)							
Hexanes층	100	F-1	68.2	F-11	22.0				
				F-12	30.8				
				F-13	46.2				
				F-14	66.0				
				F-15	67.5				
				F-16	70.8	F-161	34.0		
						F-162	71.7		
						F-163	52.5		
						F-164	24.7		
						F-165	74.7		
				F-17	47.9				
Ethyl acetate층	100	F-3	62.3	F-31	23.9				
				F-32	81.9	F-321	88.8	F-3211	28.0
								F-3212	70.9
								F-3213	23.9
								F-3214	23.0
						F-322	61.7		
						F-323	66.8		
						F-324	56.7		
						F-325	29.5		
				F-33	61.8				
				F-34		F-341	32.2		
						F-342	23.3		
						F-343			
						F-344	28.8		
						F-345	20.7		
				F-35	31.5				
				F-36	18.6				

제3항 밤나무 잎에서 추출된 유효성분 (quercetin)의 총합성

규명된 분자 구조를 확정시키는 최선의 방법 중의 하나는 잘 알려진 화합물을 출발 물질로 하여 확립된 유기합성법을 이용하여 구조가 밝혀진 화합물을 총합성하는 것이다. 총합성을 하기 위해서 분자의 화학적, 물리적 특성을 파악한 후 역합성분석법 (retro-synthetic analysis)을 이용하여 몇 가지 합성 계획을 세웠다. 이 중에서 기초 실험을 통하여 가장 합리적인 합성법을 결정하고 그 계획에 따라 총합성을 하였다. 이렇게 하여 분자 구조의 규명이 확실해졌을 뿐만 아니라 이러한 합성법을 이용하여 필요하면 대량생산도 가능하다.

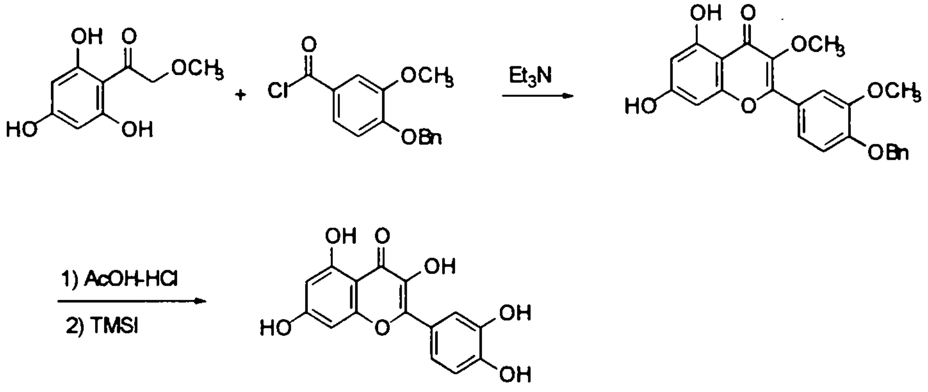
1) 역합성분석법 (Retro-synthetic analysis)

Quercetin은 flavone의 구조를 가지고 있으므로 2,4,6-Trihydroxyacetophenone 유도체와 vanillic acid 유도체로부터 쉽게 합성할 수 있다. 2,4,6-Trihydroxyacetophenone 유도체와 vanillic acid 유도체를 base 존재하에서 반응 시켜 flavone의 기본 골격을 완성시키고 protecting group을 떼어내게 되면 quercetin이 완성된다.



2) 합성법

Quercetin은 flavone계열의 천연물로 많은 생물화학적 작용을 가지고 있어 1950년대부터 널리 연구되어 왔기 때문에 quercetin 자체 뿐만이 아니라 자연에서 분리된 많은 유사체가 많이 알려져 있고 비교적 쉽게 구할 수 있다. 다음의 합성법은 이미 문헌에 보고된 방법을 변형시킨 것으로 이 방법을 이용하여 quercetin을 더 나은 수율로 얻을 수 있었다.

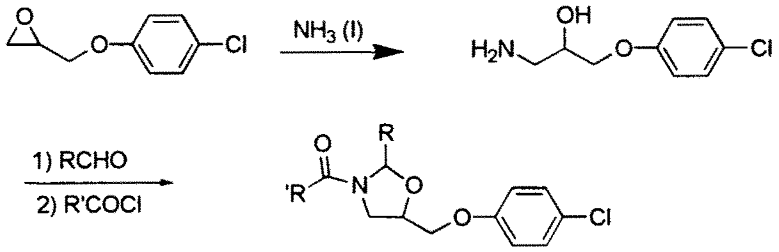


2,4,6-Trihydroxy-α-methoxyacetophenone과 4-benzyloxy-3-methoxybenzoyl chloride를 triethylamine 존재하에 150-160℃로 4 시간 동안 가열하면 5,7-dihydroxy-4'-benzyloxy-3,3'-dimethoxyflavone이 생성되고 이를 acetic acid와 hydrochloric acid의 혼합액에 넣고 약 100℃로 가열하면 4',5,7-trihydroxy-3,3'-dimethoxyflavone이 만들어진다.이를 trimethylsilyl iodide로 처리하게 되면 quercetin이 합성된다.

이와 같이 하여 합성된 quercetin은 밤나무 잎에서 추출된 천연 quercetin과 물리적 성질 및 화학적 성질이 동일했으며 spectral data도 역시 일치하였다.

또한 합성된 quercetin의 *in vitro* 활성시험 결과도 천연의 것과 차이가 없어 밤나무 잎에서 추출 분리한 물질이 quercetin임이 확정되었으며 본 합성법을 이용하면 필요시에 많은 양을 만들 수 있게 될 것이다.

본 연구에서는 이미 알려져 있는 많은 유사체들에 대해 항알레르기 작용을 검토하여 몇 몇 유사체는 quercetin과 유사하거나 더 나은 활성을 가지고 있다는 것을 밝혔다. 자연에서 분리된 유사체에 대한 연구가 많이 되어 있고 또 가능한 거의 모든 유사체가 이미 합성되어졌기 때문에 구조-활성상관관계에 대한 연구는 무의미하여 항알레르기성을 나타내는 다음과 같은 화합물들을 합성하고 그들의 항알레르기 효과를 측정하였다.



적절히 치환된 epoxide를 ammonia와 함께 methanol에서 반응시켜 aminoalcohol을 만들고 이것을 aldehyde와 반응시켜 생성된 oxazolidine환을 분리하지 않고 반응액에 electrophile을 첨가하면 trisubstituted oxazolidine환이 생성된다.

제3절 실험 결과

제1항 5,7-Dihydroxy-4'-benzyloxy-3,3'-dimethoxyflavone의 제조

2,4,6-Trihydroxy-α-methoxyacetophenone(1.98 g, 0.01 mol) 과 4-benzyloxy-3-methoxybenzoyl chloride (2.76g, 0.01 mol)의 혼합물을 triethylamine (5 mL)존재하에 150-160℃에서 4 시간 동안 가열 환류시킨 후 냉각시킨다.

생성된 고체상의 물질을 methylene chloride (300 mL)에 녹히고 물 (2 X 50 mL)로 씻은 후 유기층을 무수 $MgSO_4$로 건조하여 여과하고 여과액을 감압 증류시켜 연녹색 고체상의 5,7-dihydroxy-4'-benzyloxy-3,3'-dimethoxyflavone (3.1 g)을 얻었다.

제2항 4',5,7-Trihydroxy-3,3'-dimethoxyflavone의 제조

5,7-Dihydroxy-4'-benzyloxy-3,3'-dimethoxyflavone (2.0 g, 4.8 mmol)을 acetic acid-HCl 용액에 넣고 100℃ 정도에서 1시간 동안 가열한 후 냉각시키면 검은 황색 고체상의 4',5,7-trihydroxy-3,3'-dimethoxyflavone (1.3 g)을 얻었다.

제3항 Quercetin의 제조

4',5,7-Trihydroxy-3,3'-dimethoxyflavone(1.0 g, 3.0 mmol)을 chloroform에 녹이고 냉각한 후 trimethylsilyl iodide를 가하여 0℃에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응액을 methylene chloride (100 mL)에 녹이고 saturated $NaHCO_3$ 용액 (2 X 50 mL)과 물로 씻은 후 유기층을 anhydrous $MgSO_4$로 건조하여 여과하고 여과액을 감압 건조하고 고형물을 메탄올에 재결정하여 황색의 quercetin (0.6 g)을 얻었다.

mp. >300℃;

IR (KBr, cm^{-1}): 3380, 1670, 1610, 1510, 1240;

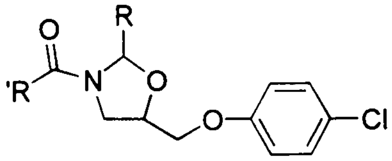
MS (m/z) 302, 301, 274, 273, 245, 153, 142, 137, 128, 109

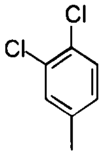
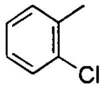
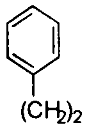
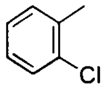
^{1}H-NMR (DMSO-d_6), δ 6.21 (s, 1H), 6.42 (s, 1H), 6.91 (d, 1H), 7.59 (d, 1H), 7.7 (s, 1H), 9.5 (bs, 4H), 12.7 (s, 1H)

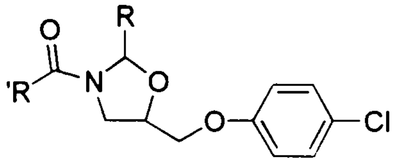
제4항 *In vitro* 실험결과

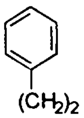
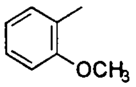
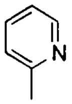
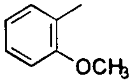
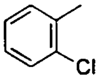
합성된 quercetin의 항알레르기에 대한 약리 효과를 histamine 유리억제실험 (hexosaminidase release inhibition)으로 평가한 결과는 추출하여 분리된 quercetin의 ED_{50} value (hexosaminidase 유리를 50% 저해하는 농도)와 동등한 5 ㎍/㎖ 이었다.

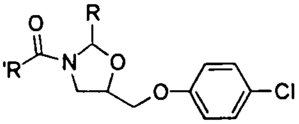
합성된 oxazolidine유도체의 구조와 그들의 histamine 유리억제실험 (hexosaminidase release inhibition)으로 평가한 항알레르기 효과는 다음과 같다.

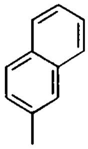
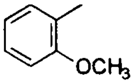
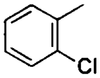


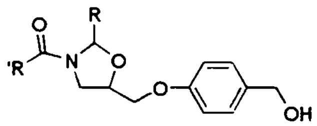
	R	R'	Stereoisomer	Activity (% inhibition at 10/ 3 μM)
1		CH_3	trans	74/45
2	"	"	cis	74/44
3	"		trans	38/37
4	"	"	cis	20/4
5		CH_3	trans	60/16
6	"	"	cis	62/19
7	"		trans	1/4
8	"	"	cis	38/34

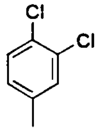


	R	R'	Stereoisomer	Activity (% inhibition at 10/ 3 μM)
9			cis	45/2
10		CH_3	trans	45/47
11	"	"	cis	45/44
12	"		trans	53/39
13	"	"	cis	17/27
14	"		trans	42/35
15	"	"	cis	59/46



	R	R'	Stereoisomer	Activity (% inhibition at 10/ 3 μM)
16		CH_3	trans	1/5
17	"	"	cis	5/12
18	"		trans	17/8
19	"	"	cis	30/21
20	"		trans	7/5
21	"	"	cis	16/29



	R	R'	Stereoisomer	Activity (% inhibition at 10/ 3 μM)
22		CH_3	trans	19/26
23	-	CH_3	cis	28/37

밤나무 잎의 비수용성 추출물에서 우수한 *in vitro* 항알레르기 효과 (histamine 유리억제실험, hexosaminidase release inhibition)를 나타내는 물질을 분리한 후 분자구조를 규명하여 quercetin임을 밝혔으며 이를 총합성하여 필요시에 다량 합성이 가능하게 되었다.

Oxazolidine 유도체도 분자 구조에 따라 quercetin과 유사한 항알레르기 효과 (histamine 유리억제실험, hexosaminidase release inhibition)를 나타내는 물질임을 밝혔다.

제4절 참고문헌

1. Shakhova et al., Zh. Obshch. Khim. 32, 390 (1962), C.A. 58, 1426f (1963)
2. Jiyun et al., Drugs of the Future 22, 720 (1997)
3. Xie, M.-L., Gu, Z.-I ., Qian, Z.-N. Protective effects of quercetin on ischemic reperfusion induced arrhythmias in the rat heart in viva. Chin J Pharmacol Toxicol 1991. 5: 90-2.
4. Feng, G.-l., Tang, Y.-Z., Wang, Z.-P. The protection of potassium quercetin phosphate against acute cerebral ischemia-reperfusion injuries in rat. Chin Pharmacol Bull 1994, 10: 204-6.
5. Tang, Y.-Z., Tao, R., Hao, Y.-B., Zhang, P., Wang, Z.-P. Effects of potassium quercetin phosphate on experimental myocardial infarction in rabbits. Chin Pharmacol Bull 1992, 8: 69-72.
6. Duan, U.-Z., Tang, Y.-Z., Liang, Y.-C., Wang, Z.-P., Liang, G.-J. Effects of potassium quercetin phosphate on cerebral reperfusion injury and relation to brain calcium. Chin Pharm J 1996, 31: 554.
7. Gu, Z.-L., Xiao, D., Jin, L.-Q., Fan, P.-S., Qian, Z.-N. Effects of quercetin on Na+/K+ -exchanging ATPase and Ca++ /Mg++-ATPase in rats. Acta Pharmacol Sin 1994, 15: 414-6.
8. Xiao, D., Gu, Z.-L., Qiao, Z.-N. Effects of quercetin on platelet and reperfusion-induced arrhythmias in rats. Acta Pharmacal Sin 1993, 14: 505-8.
9. Gu, Z.-L., Qian, Z.-N., Xiao, D., Zhou, Y.-H., Gin, Z.-H. Inhibitory effects of quercetin on platelets and its mechanism. Acta Acad Med Suzhou 1991, 11: 262-5.
10. Qin, Z.-H., Shi, L. Effects of quercetin on fluidity of platelet membrane lipids and platelet functions. Acta Pharm Sin 1987, 22: 491-4.
11. Xiao, D., Gu, Z.-L. Effects of quercetin on aggregation and intra-cellular free calcium of platelets. Acta Pharmacol Sin 1995, 16: 223-6.

12. Gu, Z.-L., Xie, M.-L., Qian, Z.-N. Effect of quercetin on chemiluminescence of human platelets induced by arachidonic acid. Acta Pharmacol Sin 1993, 14: 263-5.

13. Xie, M.-L.. Lu, Q.. Gu, Z.-L. Effect of quercetin on platelet aggregation induced by oxyradicals. Acta Pharmacol Sin 1996, 17: 334-6.

14. Li, F.-G., Wang, Z.-Y., Ruan, C.-G., Gu, Q.-L., Zhang, J. The influence of quercetin on PMN metabolism and function. Chin Pharmacol Bull 1991, 7: 466-70.

15. Zhao, X.-Y., Gu, Z.-L. Effects of quercetin on endothelin released by cultured endothelial cells. Acta Acad Med Suzhou 1996, 16: 238-40.

16. Zhao, X.-Y., Gu, Z.-L. Effects of quercetin on production and release of endothelin and cGMP from cultured endothelial cells, Acta Pharmacol Sin 1996, 17: 442-4.

16. Effects of quercetin on circulatory system and the mechanism of central nervous system in rats. Chin Pharmacol Bull 1996, 12: 479.

18. Ranelletti, F.0., Ricci, R., Larocca, L.M., Maggiano, N., Capelli, A., Scamibia, G., Pierluigi, B.P., Mancuso., S., Rumi, C., Piantelli, M Growth-inhibitory effect of quercetin and presence of type-II estrogen-binding sites in human colon-cancer cell lines and primary colorectal tumors. Int J Cancer 3 992, 50; 486-92.

19. Yuan, J., Xiao, D. External Medicine. Chinese Medicine and Chinese Drugs Fascile 1996, 18(5): 3-5.

20. Feri, P.C., Ola, F.. Cody, V., Middleton, E. Jr. Protein kinase C inhibition by plant flavonoids. Biochem Pharmacol 1989. 38: 1617-42

21. Zhang, J.-P., Wu, T-M.. Hi, Z.-L.. Qiar,, O.-H. Inhibitory effect of quercetin on tumor necrosis factor and interleukin-1β pro-osteoclastic activities. Acta Pharmacol Sin 1996, 17: 261-3.

22. Jiang, J.-H., Liu, X.-A., Wang, Q.-D Study on drug resistance of quercetin against EAC/ADR cells. Heman J Onco! 1994, 7. 164-5.

23. Xie, M.-L., Gian, Z.-N., Gu, Z.-L., Hu, T.-X Preliminary study of the anti-free radical effects of quercetin and some Chinese herbs extracts. Acta Acad Med Suzhou 1989, 9(4): 278-80.

24. Xie, M.-L., Gu, Z.-L., Qian, Z.-N. Study on the anti-superoxide anion radical effect of quercetin. Mod Appl Pharm 199Z, 9: 1-3.

25. Yan, D.-G., Zhou, M., Chen, Y., Chen, W.-M. Effects of quercetin. rutin and BHT on the oxidative modification of low density lipoprotein induced by Cu++. Acta Acad 1st Mil Med Univ 1995, 15: 24-6.

26. Yan, D.-G., Zhou, M., Chen, Y. Comparative study of the inhibitory effects of rutin and quercetin on oxidative modification of LDL already induced by Fe++ and Cu++. Acta Acad Ist Mil Med Univ 1995, 15: 103-6.

27. Yan, D.-G., Zhou, M., Chen, Y. Comparison of the inhibitory effects of quercetin and rutin on the oxidative modification of LDL induced by Fe++ and Cu++. Acta Biochem Biophys Sin 1996, 28: 106-9.

28. Mao, X.-M., Zhang, J.-Q. Inhibition of aldose reductase by Chinese herbal medicine. Chin Chinese Mater Med 1993, 18: 623-4.

29. Ge, Y., Zhang, J.-Q., Zhou, Y.-P. The inhibitory effects of Chinese herbs components on albumin nonenzymatic glycosylation. Acad J Sec Mil Med Univ 1995, 16: 333-6.

30. Mao, X.-M., Zhang, J.-Q. The effect of quercetin on Na+/K+-ATPase activity in sciatic nerve of diabetic rats. Chin J Diabetes 1995, 3: 73-5.

31. Song, B.-W., Tian, W., Liu, Y.-X., Chen, Z.-W., Ma, C.-G., Fang, M. Studies on the analgesia of quercetin. J Anhui Med Univ 1994, 29: 168-70.

32. Gong, S., Zhang, Y.-Y.. Yu, G.-D., Gu, Z.-L., Qian, Z.-N. Observation of analgesic action of quercetin. Chin Trad Herb Drugs 1996, 27: 612-3.

33. Ge, Z.-D., Zhou, A.-W.. Wei. W., Chen, M.-2., Xu, S.-Y'. The effects of quercetin on α2-adrenoceptors in rat cerebral cortex. Chin Pharmacol Bull 1995, 11: 383-6.

34. Yang, D.-L., Gu, X.-F., Chen, J., Ma, J.-Q., Nie, L. Effects of six effective components of Chinese herbal drugs on calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase. Chin Trad Herb Drugs 1995, 26: 582-4.

35. Zhao, W.-Z., Dei, L.-M., Ma, C.-G., Su, S.-Y. The studies on pharmacokinetics of quercetin in rabbits. Chin Pharmacol Bull 1992, 8: 452-5.

제 6 장 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

제1절 연구개발 결과

연구결과에 대한 자세한 내용은 위의 III 항의 "연구개발의 내용 및 범위, 결과" 부분에 기술되어 있다. 그러므로 본 항에서는 읽는 분의 이해를 돕기 위해서 연구계획서를 제출하면서 본 연구진이 제안한 연구개발 범위 및 내용, 그리고 평가의 착안점 및 척도에 대한 사항들을 중심으로 하나 씩 대조하면서 기술하고자 한다.

[제안한 평가의 착안점 및 척도]

구 분	평가의 착안점 및 척도	
	착 안 사 항	척도 (점수)
1 차년도 (1995)	ㅇ 예비실험에서 얻은 결과를 확증할 수 있는 약효검증 ㅇ 단일 또는 매우 근접한 유효 화합물의 분리 ㅇ 식품으로서의 제형	30 40 30
2 차년도 (1996)	ㅇ 유효성분의 최종분리 여부 ㅇ 단일 성분의 분리과정과 약효 재검사에 의한 성분확인의 여부 및 타당성 ㅇ 규명된 단일 성분 화학 구조의 정확도 ㅇ 식품으로 허가 받기위한 자료 및 결과의 준비성(차제품)	30 20 20 30
3 차년도 (1997)	ㅇ 규명된 단일 성분의 유도체의 합성 및 개발 ㅇ 차 제품의 기능성 연구 (항 산화, 항 미생물) ㅇ 밤 껍질에서 항 알레르기 작용의 연구	40 30 30
최종평가	ㅇ 유효성분의 분리 ㅇ 유효성분의 합성 ㅇ 식품으로의 개발	40 30 30

[제안한 연구개발 내용 및 범위]

구 분	연구 개발 목표	연구개발내용 및 범위
1차 년도 (1995)	o 항 알레르기 효과 검색 및 유효성분의 분리	o 약효 검색 o 유효성분의 분리 o 식품 제형화 o 문헌조사, 시약, 기구준비
2차 년도 (1996)	o 유효성분 분리 및 합성 o 식품 허가	o 성분분리의 완성 o 기초 약리 실험 o 유효성분의 합성모색 o 식품허가 조건 완성 o 특허 창출
3차 년도 (1997)	o 합성물질의 대량생산 o 약리독성 실험 o 식품개발의 완성 o 밤껍질에서 유효성분의 분리규명된 단일 성분의 유도체의 합성 및 개발	o 후보물질의 합성 (기본 구조를 유지하는 다수의 물질의 합성) o 항 알레르기 효과 실험 o 밤 껍질에 관한 유효성분의 분리 o 식품 기능성 실험 o 작용기전에 대한 연구

먼저, 제 1 세부과제인 "항 알레르기 효과 검색 및 항 알레르기 기전 연구"에 관해서 살펴보면 다음과 같다.

① 생체실험과 실험관실험을 통해서 예비실험에서 얻은 결과를 바탕으로 밤나무 잎의 추출물의 항 알레르기작용을 명백히 규명하였다. 생체실험으로는 48-hr PCA를 실시하였는데, 밤나무잎 추출물의 수층은 200 mg/kg (복강투여)의 투여량에서 48시간 동종 수동피부아나필락시를 약 90%, 화학적 매개체들에 의한 혈관 투과성 증가를 75-80% 억제하였다. Rat의 복강 비만세포로부터 histamine 유리실험에서 밤나무잎의 추출물의 여러 분획 중, 수추출물과 수층에서만 약리학적 활성이 발견되었는데 1 mg/ml의 농도에서 histamine 유리를 약 70% 억제하였다. 한편 수층 성분을 이용한 용량-반응실험에서 histamine 유리는 몇 십 μg/ml의 낮은 농도에서도 억제함을 발견하였다.

② 밤나무잎 추출물의 항 알레르기 작용의 기전에 대한 연구를 위하여, TNF-α의 유리실험 및 접촉성피부염에 대한 실험을 진행하였는데 밤나무잎 추출물

은 거의 효과를 나타내지 않았다. 그러므로 밤나무잎 추출물의 약리작용은 degranulation의 억제를 주요 약리기전으로 하며, type IV hypersensitivity에는 별로 영향을 미치지 않고 type I hypersensitivity의 억제를 선택적으로

③ 최종으로 분리된 성분인 quercetin이 degranulation에 대한 작용을 현재 임상적으로 사용되고 있는 ketotifen과 비교 실험을 하였다. Quercetin은 ketotifen 보다 더 강력한 작용을 나타내었다. 그러므로 우리는 분리된 성분에 대한 약효의 재평가를 통해서 그 물질의 약리학적 타당성을 증명하였다.

억제함을 발견하였다.

④ 생체 내의 안전성 실험을 진행하였다. 밤나무 수추출물은 생체에 극히 안전한 물질로 판명되었다.

⑤ 제 2, 3 세부과제가 연구를 진행하는 데 있어서 성분 분리를 위한 functional assay를 담당하여 연구를 완성하였다.

제 2 세부과제는 제 1 세부과제팀과 공동으로 "항 알레르기성 유효성분의 분리"를 목표로 강력한 항 알레르기 효과를 보여주는 밤나무 잎 추출물로부터 유효성분 즉 항 알레르기성 물질의 분리를 시도하였다.

① rat의 복강 비만세포로부터 histamine 유리를 저해하는 효과를 지표로 하여 activity-guided fractionation방법에 준하여 밤나무 잎 추출물에 함유된 유효성분을 정제한 결과 처음 시료로 사용한 밤나무 잎의 물 추출물의 항 알레르기효과에 비하여 약 100배정도 탁월한 효과를 보여주는 활성 성분 분획을 얻었다. 또 이 활성성분 분획으로 부터 quercetin을 유효성분을 최종 정제하였으며 화합물의 각종 물리 화학적 성질 및 분광학적 소견을 종합 검토하여 그 화학구조를 규명하였다.

② 밤나무의 활용성을 최대화하기 위해서 과육의 채취 후 폐기하는 밤 속껍질에 대한 항 알레르기 작용을 연구하여 이 부분에도 미량의 quercetin이 함유

되어 있음을 확인하였다.

③ 분리된 활성성분이 quercetin과 유사한 분자구조를 지닌 약 20개의 flavonoids에 대해서 구조-활성 관계에 관한 실험을 진행하여 새로운 물질을 합성하는데 필수적인 정보를 제공하였다.

제 3 세부과제는 "항 알레르기성 건강식품으로의 개발"에 관한 연구인데 다음과 같은 연구를 진행하였다.

① 밤나무 잎을 이용하여 증제차와 유념차를 개발하였다. 이에 대해서 특허를 출원하였다.

② 제조한 밤나무 잎 차를 식품으로 신청하기 위해서 차를 구성하고 있는 화학성분을 분석하였다. 여기에는 일반성분, 무기성분, 유리당, 비타민 C, 탄닌, 아미노산, 지방산 등의 함량을 측정하였다.

③ 밤나무 잎 차의 항 알레르기성 작용에 대한 연구를 진행하였다. 유념차와 증제차 모두 유의성있는 항 알레르기 작용을 지니고 있음이 증명되었다.

④ 밤나무 잎 차의 항 알레르기성 작용에 대한 연구를 진행하였다. 밤나무 잎 차의 추출물은 G(+), G(-), lactic acid bacteria, yeasts, molds에 대한 실험을 진행하였는데, 특히 G(+), G(-) 균의 몇 몇 종에 효과를 나타내었다.

⑤ 밤나무 잎 차의 항 비만 작용에 대한 연구를 진행하였다. 밤잎 차는 에너지 섭취가 증가된 만큼의 체지방의 증가는 유도하지 않은 등, 흥미로운 항 비만효과를 나타내었다.

⑥ 밤나무 잎 차의 상업적인 상품으로의 개발을 위해서 저장 안전성에 대한 실험을 진행하였다. 제조된 밤잎 차는 포장 및 저장조건에 크게 영향을 받지 않고 1년 정도는 안정된 수색을 유지하였다.

제 4 세부과제에서는 "유효성분의 분리 및 유기합성"에 대한 연구를 진행 하였다.

① 밤나무 잎의 비수용성 추출물에서 우수한 in vitro 항 알레르기 효과를 나타내는 성분은 quercetin이라는 사실을 규명했다.

② Quercetin의 합성에 성공하여 다량 합성이 가능하게 되었다.

③ Quercetin과 유사한 구조를 지닌 일련의 oxazolidine유도체를 합성 하였으며, 각각에 대한 약리효과를 검정하여 최적 물질을 유추하였다.

제2절 활용에 대한 건의

이 연구를 통해서 본 연구진은 밤나무 잎이 차의 형태로 개발될 수 있으며, 생체에 투여시 전한 기능식품으로 개발될 수 있음을 증명하였다.

앞으로 항 알레르기성 기능성 차로 시판될 경우, 알레르기 환자의 치료목적 뿐만 아니라 계절 으로 알레르기 증상 때문에 고생하는 환자들이 이 차를 미리부터 복용함으로써 알레르기 증상을 예방 수 있다고 판단된다.

뿐만아니라 이 식품은 항 알레르기성 효과 외에도 미생물 성장의 억제 및 항 만작용 등의 다양한 기능성을 지니고 있음이 증명되어 커다란 장점으로 생각된다. 특히 이 식품은 농촌에서 흔한 밤나무잎을 원료로 사용하므로 경쟁력이있고, 여러가지의 훌륭한 리효과를 지니고 있으므로 상품화 가능성이 매우 크다. 따라서 본 연구는 우리의 농촌경제에 커다란 도움이 될 수 있는 기능성식품의 개발에 관한 연구로서, IMF의 경제난이 어느 정도 진정되면 상품화과정이 필요하다고 생각된다.

그리고 마지막으로 본 연구가 진행될 수 있게 연구비를 지원해주신 농림부에 진심으로 감사드립니다.