

식물자원의 폴리페놀류 분류와 기능성
신소재 기술개발

Classification of plant polyphenols and development
of their useful new application

동국대학교

농림부



제 출 문

농림부장관 귀하

본 보고서를 “ 식물자원의 폴리페놀류 분류와 기능성 신소재
기술개발 ”에 관한 연구의 최종보고서를 제출합니다.

1999 . 10 . 30 .

주관연구기관명 : 동국대학교

총괄연구책임자 : 김 용 욱

세부과제책임자 : 임 세 진

연 구 원 : 김 영 미

연 구 원 : 오 승 희

연 구 원 : 최 우 철

협동연구기관명 : 동덕여자대학교

협동연구책임자 : 안 형 수

세부과제책임자 : 안 령 미

세부과제책임자 : 김 명 애

요 약 문

I. 제 목

식물자원의 폴리페놀류 분류와 기능성 신소재 기술 개발

II. 연구개발의 목적 및 중요성

탄닌은 크게 가수 분해형 탄닌과 축합형 탄닌의 두 가지 형태로 구별된다. 가수 분해형 탄닌은 gallic acid, ellagic acid를 기본구조로 하며 glucose 등의 당과 ester 결합을하여 산 이나 가열에 의해 쉽게 가수 분해된다. 축합형 탄닌은 catechin과 같은 flavonal-3-OH가 연속적으로 축합된 분자구조를 이루고 있다. 이러한 두 형태의 탄닌은 생체 내에서 생리 작용과 약효가 상이하며 다양한 식물에 널리 분포되어있다. 최근에 많은 종류의 탄닌이 분해되어 구조가 결정되었으며 각 탄닌성분의 구조에 따른 생물학적 활성의 차이가 연구되고 있다.

탄닌의 약효는 지사작용이외에 별로 알려지지 않았으나 최근들어 강장작용, 피부 보호작용, 항암작용 보고되면서 탄닌연구가 크게 주목 받고 있다. 작약이나 목단 피의 추출물이 항 allergy 작용이나 blood urea nitrogen 치의 저하 작용을 갖고 있음이 발견되었는데 이러한 효능이 주로 gallotannin에 기인하는 것으로 보고되고 있다. germinin은 이질풀로 알려진 현초에서 발견되는 가수 분해형 탄닌으로서 항균작용이 있고 혈청과 간에서 과산화 농도를 줄이며 또한 cholesterol치를 감소시킨다고 보고되고 있다.

오존층의 파괴로 인한 자외선량의 증가는 피부암 환자의 발생은 물론 일광 화상, 면역 반응의 변화, 광 알레르기성 반응, 백내장 발생 등을 초래하는 것으로 보고

되고 있어 외국에서는 자외선 위해성에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 피부미백제로서 현재 화장품에 가장 많이 사용되는것은 코직산과 알부틴이나 이들은 가격이 비싸고 많이 사용할 경우 피부 독성을 일으키는 것으로 알려지고 있다. 그러므로 천연 식물 자원 중에서 미백제 기능과 피부상태 개선효과가 큰 물질을 개발한다면 농가 소득 향상은 물론 수입 대체 효과와 국민 건강 향상에 크게 공헌 할 것으로 생각된다.

유지 또는 유지 함유 식품의 산패를 방지하기 위하여 합성 또는 천연의 항산화 물질이 꾸준히 개발되어 왔으며 현재는 합성 phenolic compound인 BHA, BHT 등이 널리 사용되고 있다. 비타민 C 및 비타민 E 외에 9종의 합성품이 법적으로 허용되고 있으며 천연 항산화제로는 토코페롤만이 사용된다. 토코페롤은 식물성 유지에 대해 항산화 효과가 낮고 가격이 비싼 단점을 지니며 합성항산화제는 안정성에 대한 우려로 인해 소비자의 거부감을 증가시킨다. 따라서 식물자원으로부터 값싸고 안전한 항산화 물질을 분리하여 이용하려는 시도가 활발히 진행되고 있다.

한국에 자생하는 식물자원을 대상으로 탄닌 성분을 체계적으로 조사하여 우수한 식물자원을 찾아내고, 나아가 생체 동태가 개선된 기능성 탄닌 유도체를 개발하면 국민 건강 향상에 크게 기여하고 국제적 경쟁력을 크게 높일 수 있을 것으로 기대된다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 탄닌 자원을 이용한 기능성 제품 생산 기술을 확립하는데 그 목표를 두고 있다. 탄닌이 함유된 식물자원을 산업화하는데 있어 가장 큰 취약점은 탄닌이 함유된 식물자원의 분류 미비와 고기능성 탄닌유도체의 합성법 미 확립에

기인한다. 식물자원에 대한 탄닌 함유 성분의 분류가 미비하고 안정성과 기능성이 높은 탄닌의 합성 기술이 확립되지 않은 이러한 취약성을 극복하기 위하여 탄닌이 다량으로 함유된 감, 밤, 솔잎, 호프 등을 대상으로 하여 탄닌성분을 분리하고 분석을 통하여 탄닌성분의 종류와 양을 구하고자 한다. 또한 비교적 안전하고 구조가 간단한 탄닌의 구조변경을 통하여 지용성이 증가된 유도체를 합성하고자 한다. 항산화성분으로서 탄닌 이외에 비타민 C, E, 알부민, 코직산 등이 있지만 세포의 산화적 손상을 막을 수 있으므로 노화, 암, 천식 등의 치료제로 사용될 잠재력을 지녔다. 이들이 실제 임상 실험에서 그 효과가 뚜렷하지 않은 이유는 이들의 수용성이 높아 세포막에 잔류하는 기간이 짧기 때문으로 추측되고 있다. 본 연구에서는 gallic acid 등의 카르복실기와 비타민 C 등의 하이드록실기를 축합한 화합물을 만들어 지용성은 증가하고 항산화작용은 탄닌과 비타민 C의 작용을 유지하는 새로운 항산화제를 합성하고자 한다. 최근에 많은 종류의 탄닌이 분리되어 그 구조가 확인되었으며 탄닌 성분의 구조에 따른 생리활성의 차이에 대한 연구가 진행되고 있다. 탄닌은 발암인자, AIDS, 지질과산화작용, 히스타민 유리, 간 독성 등을 억제하는데 이러한 효과가 탄닌의 구조에 따라 다르다고 보고되고 있다.

본 연구에서는 탄닌의 약효검색법을 확립하고, 탄닌자원식물추출물 과 합성탄닌 유도체를 약효 검색하여 탄닌자원의 의약품 이용 가능성을 검토하고자 한다. 율피등 자연 식품을 이용한 미용팩이 시중에 널리 이용되고 있으나, 아직까지 안전한 제품이 개발되지 않고 있다. 여러 탄닌성분의 항산화효과와 항노화효과 그리고 미백효과 등이 보고되고 있으므로 탄닌함유 식물자원과 합성유도체의 피부보호 효과를 검색하여 피부보호 물질의 개발 가능성을 검토코자 한다. 폴리페놀계 물질로서 현재 허용되고 있는 항산화제는 몰식자산유도체이며 우리 나라에서 사용되고 있는 것으로는 propylgallate 등을 들 수 있는데 수용성이기 때문에 수분

함량이 큰 지방질 식품에 주로 이용되며, 열안전성이 약한 단점이 있다. 또한 합성항산화제는 안정성에 대한 소비자의 거부감이 높아 식물자원으로부터 항산화물질을 분리 이용하려는 시도가 활발히 진행되고 있다. 따라서 본 연구에서는 탄닌 함유식물자원과 기능이 개선된 합성 유도체에 대한 항산화효과를 검색하여 식품 및 식용유의 항산화제로의 이용기술을 확립코자 한다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

가. 연구 결과

1) 식물자원의 탄닌성분 조사와 기능성유도체합성

울피, 감, 솔잎, 호프 등과 같은 주요 탄닌 함유식물자원을 대상으로 탄닌등의 폴리페놀 성분을 분석하였다. 이들에 함유된 탄닌성분을 수성 아세톤으로 추출한후 역상 HPLC로 분석하여 다수의 탄닌 성분을 확인하였고 그 양도 분석하였다. 수성아세톤의 조추출물을 극성이 다른 여러 가지의 유기용매로 분획추출하였으며 각 분획엑스를 활성검정팀에 보내 기능성을 검색토록 하였다. 또한 일부분획은 sephadex LH-20과 MCI CHP20 gel filtration 크로마토그래피를 적용하여 순수한 탄닌성분을 분리하고 그 구조분석을 수행하여 탄닌의 종류를 확인하였다. 울피에는 ellagic acid 감에는 gallic acid, 솔잎에는 ellagic acid와 catechin, 호프에는 ellagic acid 와 gallic acid 가 주 탄닌 성분으로 함유되어 있었다.

주 탄닌성분으로 밝혀진 gallic acid, catechin 과 ellagic acid를 기본구조로한 새로운 유도체를 합성하였다. gallic acid의 지용성 유도체로서 methyl gallate (MG), hexyl gallate (HG), stearyl gallate (SG)를 합성하였으며 비가수분해형유

도체로서 ascorbic acid 유도체와 축합된 2-O-(3,4,5-tribenzyloxygalloyl) 5,6-isopropylidene-L-ascorbic acid를 얻었다. catechin의 유도체로서 5,7,3',4'-terabenzyl catechin (catechin benzyl ether)과 octabenzyl catechin dimer를 얻었다. Ellagic acid의 유도체로서 hexabenzyl diphenic acid (hexahydroxydiphenic acid benzyl ether)를 얻었다. 이들을 활성검정법에 보내어 기능성을 검토하였다.

2) 약효검색분야

최근에 탄닌에 대한 생리적 효과가 다양하게 보고되어 건강식품 및 신의약품창출의 새로운 대상으로 조명을 받고 있으나 우리 나라에는 아직도 이에 대한 약효 검색연구가 미비하다. 탄닌을 이용한 새로운 의약품의 기술개발은 국민건강을 위해 중요한 과제라 생각되어 본 연구에서는 탄닌함유 천연추출물 및 탄닌성분이 갖고있는 면역증강효과, 혈관보호효과 및 Cd⁺⁺독성 해독효과등을 검색하였다.

울피추출물에 대한 면역증강효과를 구명코저 6-8주 C3H마우스를 가지고 실험하였는데 일부 농도에서 마우스 비장세포의 증식능을 보였으나 전반적으로 뚜렷한 효과를 보이지 않았다.

당뇨병에 의한 혈관손상반응효과를 검색한 결과 솔잎, 울피 추출물이 낮게 나타났으나 탄닌산보다 낮게 나타났으나 이중 울피추출물은 혈관손상반응을 유의성 있게 억제함을 보였다.

당뇨가 유발된 흰쥐의 경우 정상군에비해 혈관이완반응이 크게 증가하는데 솔잎 추출물과 울피추출물로 처리했을때 정상군과 유사한반응을 보였다. 이러한 결과는 천연추출물의 항산화작용이 당뇨시 고혈당 및 산화적스트레스에 의해 생성되는 활성산소를 억제여 혈관세포를 보호하고 NO의 유리를 촉진한 것으로 판단되

었다.

솔잎, 감, 율피추출물에 대한 카드뮴 독성 억제효과를 조사하기 위하여 CdCl₂ 50 mg/kg과 추출물들을 3주간 투여한 후 주요조직의 Cd축적량을 조사한결과 간장과 신장등에서 크게 감소하였다.

3) 피부보호 효과 검색 및 피부보호제 개발

현재 피부미백제로 사용되고있는 코직산이나 알부틴이 가격이 비싸고 피부독성을 일으키는 단점을 지녀 이를 개선한 새로운 대체 천연자원을 발족하고 또한 새로운 합성유도체를 개발하기위해 본연구가 수행되었다.

실험관내 실험, 세포실험, hairless mouse를 이용한 동물실험 및 사람피부에 적용하는 시험들을 실시하였다. 실험관내 실험과 B₁₆세포실험에서 율피추출물, 호프추출물, 솔잎추출물은 tyrosinase 억제효과, 도파산화 억제효과 및 멜라닌색소생성 억제효과를 보였으며, 동물실험에서는 각각의 추출물에 대한 생존율이 정상처리군과 유사하여 세포독성이 없다고 판명되었다. 사용된 식물추출물 중 율피추출물이 가장 효과가 좋았다.

합성 탄닌유도체를 재료로하여 실험관내 실험과 세포내 실험을 통해 피부보호효과를 검정하였는데 현재 시판되고 잇는 코직산보다는 미백효과가 모두 낮았으나 이중 hexyl gallate는 코직산보다 멜라닌 색소억제기능성이 향상된 피부보호제를 개발코자 피부보호효과 실험에서얻은 실험결과를 기초로하여 팩(Pac)을 제조하여 사람의 피부에 도포하였다. 율피, 솔잎, 호프, 감 추출물을 재료로한 팩을 제조하여 피부보호효과를 검정한 결과 율피추출물이 tyrosinase효소활성 억제 및 멜라닌 색소감소효과에 있어 가장 우수하였다. 율피 파우더와 율피추출물을 재료로한 팩을 제조하여 수행된 실험에서는 율피추출물의 경우가 효과가 더 높았다. 시

중에서 판매되는 율피파우더팩보다 율피추출물을 재료로 한 팩이 더 우수함을 보여주며 율피추출물을 이용한 새로운 팩제품의 개발이 기대된다. 합성탄닌유도체를 사용하여 팩을 만든 후 피부보호효과를 검색하였는데, hexyl gallate가 미백 효과가 가장 높았고, stearyl gallate는 보습효과가 가장 우수한 것으로 나타났다.

4) 식품 및 식용유의 항산화제 이용기술확립

식품 및 식용유의 항산화제 이용기술을 확립코저 율피, 솔잎, 호프, 감의 추출물과 합성된 지용성 탄닌유도체와 비가수분해형 탄닌유도체를 재료로 하여 이들의 항산화성을 조사하였다. 식물자원중 율피의 아세톤추출물과 감의 에테르추출물이 대두유와 돈지에서 각각 토코페놀이나 BHA보다 항산화성이 크게 높았다. gallic acid의 지용성유도체 중에서 methyl gallate 와 hexyl gallate는 토코페놀과 BHA보다 돈지와 대두유의 자동산화억제효과가 크게 높았고, 가열산화시에는 돈지에서 항산화효과를 보였다.

비가수분해형 합성탄닌유도체 중에서 HHDP benzyl ether가 BHA보다 대두유의 자동산화억제효과가 높았다.

도너츠제조시 튀김유에 율피 아세톤추출물과 감 ether추출물을 첨가하여 항산화효과를 조사한결과 도너츠의 유지산화속도를 완화시켰으며 특히 율피추출물은 BHA와 동등한 항산화효과를 나타내었다.

이상의 실험결과로 보아 율피추출물과 감의 추출물은 식품과 식용유의 천연항산화제로이용될 가능성이 높을것으로 판단되며,지용성 탄닌유도체인 methyl gallate 와 hexyl gallate 그리고 비가수분해형인 HHDP benzyl ether는 기존의 합성제인 BHA보다 항산화효과가 높아 가능성이 증가되고 경제적인 새로운 합성항산화제로 산업화될수 있을것으로 기대된다

나. 활용에 대한 건의

식물로부터 분리한 탄닌 및 그 유도체 제조방법(첨부물참조)과 식물추출물 및 갈릭산유도체의 항산화제의 용도(첨부물참조)에 대해 특허가 출원되었다. 특허가 등록된다면 울피와 감 같은 추출물은 보다 경제적이고 기능이 우수한 천연항산화제로의 이용성이 확대될 것으로 기대되고 또한 합성유도체인 methyl gallate와 hexyl gallate도 합성항산화제로의 산업화가 기대된다. 그러나 상품화는 행정적승인, 시장성의 전략 및 기업의 의지등과 보다 밀접한관계가 있으므로 산업화를 위한 기업의 역할이 요청된다.

Summary

The contents of tannin and other polyphenolic compounds in Korean plant sources, such as chestnut inner shells (*Castanea crenata* Sieb. et Zucc.), persimmon fruit (*Diospyros kaki* Thumb.), pine needles (*Pinus densiflora* Sieb. et Zucc.) and hop meals (*Humulus lupulus*) have been analyzed. These sources are characterized by their 'astringent tastes' and therefore are expected to have tannin components. By means of aqueous acetone extraction followed by reverse phase HPLC, various tannins were identified and quantified. In addition, aqueous acetone extracts have been further extracted with various organic solvents and applied to Sephadex LH-20 and MCI CHP20 gel filtration chromatography to isolate polyphenolic compounds in pure state. Chestnut inner shells have ellagic acid as their major tannins, whereas persimmons have gallic acid. Pine needles contain ellagic acid and catechin, but do not contain gallic acid. In hop meal, both ellagic acid and gallic acid were identified as main tannin components. The synthesis of new tannin derivatives was conducted by the structural modification of gallic acid, ellagic acid and catechin. Methyl gallate, hexyl gallate and stearyl gallate were synthesized as derivatives of lipid soluble tannin. 2-O-(3, 4, 5-tribenzyloxygallol)-5, 6-isopropylidene-L-ascorbic acid, catechin, benzyl ether, octabenzyl catechin dimer and hexahydroxydiphenic acid benzyl ether were gained as derivatives of insoluble tannin, respectively.

Effects of natural tannin extracts on the immunostimulatory activity, endothelial cell protection, and cadmium toxicity were evaluated in

rats. Immunostimulatory activity was measured by monitoring lymphocyte proliferation and cytokine expression. Extract of chestnut inner shell (CIS) did not show significant immunostimulatory activity. Effects of CIS extract on the contractile activity of the isolated rat thoracic aorta were measured. In the presence of intact endothelium, CIS extract caused vasorelaxation. On the other hand, in the absence of intact endothelium, CIS extract had no effect. These results suggest that CIS extract increases the endothelium-dependent vasorelaxation to acetylcholine. Extracts of CIS and pine needle did not show any significant activity on weight loss, triglyceride increase, glucose increase, and cholesterol increase induced by diabetes mellitus. However, extracts of CIS and pine needle reduced malondialdehyde level in the plasma, indicating that these extracts have antioxidant activity. These results suggest that natural tannin extracts could inhibit the impairments of vascular endothelial cell and oxidation of LDL in the hyperlipidemia induced by diabetes mellitus through antioxidant action. Protective effect of extracts of CIS, pine needle, persimmon on the cadmium toxicity were evaluated in mouse. The group of mouse treated with 50mg/kg/day for 3 weeks showed decrease in cadmium accumulation in organs such as liver and kidney. We examined the effect of decreasing melanin pigment on B-16 melanoma cells with extracts of tannic acid component plant, chestnut inner shell, pine

tree leaf, persimmon and hop. Among the extracts of tannic acid component plant, extract of chestnut inner shell was best on tyrosinase inhibitory effects and melanin decreasing effect.

The results of moisturizing effects of facial pack with powder or extract of tannin component plant, extract of chestnut inner shell was best effect.

The results of we observed the whitening effects of synthetic tannic acid derivateives(Stearyl gllate, methyl gallate, hexyl gallate) on B-16 melanoma cells, hexyl gallate was best on the whitening effects but it was not good than kojic acid, commercial product.

We observed the moistyrizing effect of facial pack with synthetic tannic acid derivatives and extract of chestnut inner shell, steary gallate was best and then extract of chestnut inner shell.

This study was conducted to develop the application of tannins as antioxidant of foods and oils. The extract of pine tree Leaves, Hop, chestnut inner shell, persimmon and synthesized tannin derivates were used in this experiment. The high antioxidant effect showed as the acetone extract of the chestnut and ether extract of persimmon was added to soybean oil and lard compared to the tocopherol and lard, respectively.

Methyl gallate and hexyl gallate had the tendency to decrease the autoxidant of soybean oil and lard, and the antiautoxidant effect was higher than tocopherol and BHA.

The higher antioautoxidant effect of soybean oil was found in the treatment of HHDP hexyl ester than in the treatment of BHA. the period of oil oxidant was delayed as the acetone extract of chestnut and ether extract of

persimmon was added to the baking oil of donut and the chestnut extract showed the same antioxidant effect as BHA.

In conclusion, the chestnut and persimmon extract would be expeted as the useful natural resources of antioxidant for oils and foods. Methyl gallate, hexyl gallate and HHDP hexyl ester was considered as the new synthetic antioxidant, respectively.

Contents

Chapt 1. Introduction	18
section 1. Background of the study	18
section 2. Objective and scope	19
section 3. Trend of study	19
Chapt 2. Classification of tannins of plants and synthesis of useful tannin derivates	21
section 1. Introduction	21
section 2. Material and Methods	24
section 3. Results and Discussion	32
Chapt 3. Medical test of tannins	41
section 1. Introduction	41
section 2. Material and Methods	46
section 3. Results and Discussion	63
Chapt 4. Skin protect test of tannin and development of pac for skin protect	91
section 1. Introduction	91
section 2. Material and Methods	92
section 3. Results and Discussion	94

Chapt 5. Useful application of tannins as antioxidant of foods and oils	129
section 1. Introduction	129
section 2. Material and Methods	131
section 3. Results and Discussion	142
Reference	176
Appendix	186

목 차

제 1 장 서론	18
제 1 절 연구개발의 배경	18
제 2 절 연구개발의 목적과 범위	19
제 3 절 현재의 연구동향	19
제 2 장 식물자원의 탄닌 조사와 기능성 유도체 합성분야	21
제 1 절 서설	21
제 2 절 재료 및 방법	24
제 3 절 결과 및 고찰	32
제 3 장 약효검색 분야	41
제 1 절 서설	41
제 2 절 재료 및 방법	46
제 3 절 결과 및 고찰	63
제 4 장 피부보호효과 검색 및 피부보호제 개발 분야	91
제 1 절 서설	91
제 2 절 재료 및 방법	92
제 3 절 결과 및 고찰	94

제 5 장 식품 및 식용유의 항산화제 이용기술 확립 분야	129
제 1 절 서설	129
제 2 절 재료 및 방법	131
제 3 절 결과 및 고찰	142
참고문헌	176
부 표	186

제 1 장 서 설

제 1 절 연구개발의 배경

시장개방과 국제화 시대를 맞이하여 선진각국의 기술보호주의가 증가하고 물질특허가 도입되면서 단시간내에 고부가가치를 창출할 수 있고, 국제 경쟁에서 이길수 있는 기술개발의 필요성이 절실히 요구되고 있다. 신약품이나 신식품의 소재개발은 막대한 고부가가치가 보장되며 특히 한국에서는 옛날부터 질병치료에 한방약 또는 민간약을 관습적으로 사용해 왔으므로 안전성이 뛰어난 식물자원으로부터 기능성제품을 개발하는 것이 한국의 현실에 가장 적합하고 국제화 시대에 선진국과의 경쟁에서도 이길 수 있고 농촌의 소득향상에 크게 기여 할 수 있는 연구분야라 하겠다. 최근에 polyphenol류중 탄닌이 항암작용, 항히스타민작용 등에 효과가 있고 항산화제로서 건강식품 및 신의약품 창출의 새로운 대상으로 조명을 받고 있는 경향이다. 한국에는 탄닌을 함유한 식물자원이 풍부한 것으로 알려 졌으나, 탄닌 함유식물자원에 대한 조사가 체계적으로 이루어지지 않았으며, 또한 식물자원이 갖고 있는 탄닌의 분류 및 양적 특성도 체계적으로 검토된 바 없고 약효 및 기능성 효과에 대한 검토가 없기 때문에 수입대체및 수출전략 품목임은 물론 농촌의 고소득 작용으로서 크게 각광을 받을 수 있는 탄닌 함유식물자원을 산업화 하는데 커다란 문제점으로 부각되고 있어서 본 연구는 풍부한 한국의 탄닌함유 천연자원으로부터 주로 항산화작용에 유용한 탄닌을 찾아내고 건강식품, 식품첨가물, 화장품, 의약품에 이용될 수 있고, 생체동태가 개선된 기능성 탄닌 유도체를 합성하여 제품화하는것을 배경으로 하고있다.

제 2 절 연구개발의 목적과 범위

탄닌은 식물에 넓게 분포된 폴리페놀성 화합물로 음식, 음료 등 식품에 함유되어 있으며 지사작용이외는 별다른 연구가 된 바 없으나 최근 탄닌의 항암, 항돌연변이, 항AIDS, 면역증강 등에 효과가 있다고 보고되어 새로운 각광을 받고 있다. 한국은 풍부한 식물자원을 갖고 있고 오랜 경험에 근거한 많은 정보를 갖고 있으면서도 아직도 과학적인 체계적인 연구가 미흡하여 유용식물자원에 대한 산업화 기술개발이 증진되지 못하고 있다. 이러한 유용식물자원에 대한 산업화 기술 연구는 국제화 개방시대를 맞이하여 대응할 수 있는 기술 전략이고 부가가치성이 높아 농가소득은 물론 국민보건 복지향상에 크게 공헌하리라 생각된다.

따라서, 본 연구에서는 한국 중요 식물자원에 대한 탄닌의 성분분리 및 구조분석을 통하여 탄닌의 분류체계를 확립하고 유망자원을 탐색함으로써 앞으로의 산업화 연구에 이용될 수 있는 자료를 제공하며 유용한 탄닌식물자원에 대한 항산화 작용, 피부보호효과 및 주요 약효검색을 통하여 새로운 기능성 소재로서의 이용 기술을 확립코자 한다. 또한 구조 변형을 통한 기능성 탄닌 유도체를 합성하고 이에 대한 효능검색을 거쳐 탄닌의 산업화 이용기술을 개발코자 한다.

제 3 절 현재의 연구동향

폴리페놀류는 한개 이상의 하이드록실기가 부착된 방향족고리를 함유한 물질로서 거의 모든 식물에 분포되어 있으며 폴리페놀류는 크게 flavonoid, anthocyanins 그리고 탄닌으로 분류되는 데 이중 flavonoids 성분은 국내외에서 많이 연구 되었으나 탄닌성분에 대한 연구가 미약한데 이는 탄닌성분의 다양성

에 기인한 것으로 생각된다. 지금까지 보고된 탄닌 성분이 600여종이나 되며 최근에는 탄닌성분에 대한 보고가 계속되고 있다. 지사작용 이외는 별로 관심을 갖지 않던 탄닌이 강정작용, 피부보호작용, 항암작용 등의 보고와 함께 많은 연구가 시도 중에 있고 최근 작약이나 목단피등에서 항allergy 작용이나 blood urea nitrogen치의 저하작용이 확인 되었고 주로 그 성분은 1,2,3,4,6-penta-o-galloylglucose인 gallotannin으로 밝혀졌다. 한편 장미과 식물인 Rubus속 식물 등에서 고분자의 가수분해형 탄닌이 있다고 보고되고 있으며 한국에서 수렴성 강장약으로 노인성 질환 등에 사용되어오고 있는 복군자에서도 고분자 탄닌이 있을 것으로 생각된다. 일본 녹차의 주성분인 epigallocatechin galats는 암발아차방제로 효과가 있다고 보고되고 있다. 탄닌은 과산화라디칼을 Tropping하므로서 지질의 과산화작용을 막아주며 따라서 탄닌을 유지의 항산화 첨가제로 개발하려는 연구가 진행되어 현재 prophyll gallate와 ethyl proto catechuate가 식용유의 산화방지 첨가제로 사용되고 있다.

근래들어 오존층 파괴의 증가와 함께 지표면에 도달하는 자외선의 양이 증가되어 피부에 홍반증, 건조증 등을 일으키며 나아가서 피부암을 유발하므로 피부를 보호할 수 있는 물질의 개발이 절실히 요구되고 있다. 따라서 탄닌을 이용한 피부보호제의 개발에 많은 관심을 가지고 연구가 시도되고 있는 실정이다.

제 2 장 식물자원의 탄닌성분 조사와 기능성 유도 체 합성

제 1 절 서 설

1. 식물자원의 탄닌성분 조사

탄닌은 식물에 폭넓게 분포된 폴리페놀성 화합물로서 음식, 음료, 식품에 다량 함유되어 있다. 탄닌의 약리효과는 수렴작용과 지사작용 이외에는 별로 밝혀진바 없으나, 최근들어 탄닌의 항암, 항돌연변이, 항AIDS, 항산화작용, 면역증강 작용 등이 보고됨에 따라 이제 탄닌은 새로운 천연자원으로 주목되고 있다.

어떤 식물이 떫은 맛을 나타낼 경우 이는 이 식물에 함유된 탄닌성분의 수렴작용에 기인한다. 우리가 주위에서 흔히 접하는 울피, 감, 솔잎등은 떫은맛을 지녀 탄닌성분을 함유한 것으로 알려지고 있으나, 어떠한 탄닌성분을 얼마만큼 함유하고 있는 지는 아직 보고된 바 없다. 따라서 본 연구에서는 울피, 감, 솔잎 등의 대표적인 우리 나라 식물자원과 호프에 함유된 탄닌성분을 체계적으로 정성, 정량 및 기기 분석함으로써 이러한 유망자원이 앞으로 산업화연구에 응용될 수 있도록 그 기반을 조성하고자 한다.

우리 나라의 대표적인 탄닌 함유자원으로 알려진 울피(*Castanea crenata* Sieb. et Zucc.)와, 감(*Diospyros kaki* Thunb.), 솔잎(*Pinus densiflora* Sieb. et Zucc.) 및 호프(*Humulus lupulus*)를 대상으로 하여, 이들에 함유되어 있는 탄닌 및 기타 폴리페놀성분을 분석 조사하였다. 울피는 밤(*Castanea crenata*

Sieb. et Zucc.)의 내과피로서 밤을 이용한 가공식품 제조시 제거되어 폐기처리 되던 일종의 산업 부산물이었다. 그러나 최근에는 울피가 민간에서 피부미용팩의 한 성분으로 널리 사용되고 있으며, 수렴효과 및 피부미백효과가 크게 인정받고 있다. 감은 감나무(*Diospyros kaki* Thunberg)의 과실로서 우리 나라를 비롯하여 중국과 일본이 그 원산지로서 병충해 등의 피해가 비교적 적어 국내에서 많이 생산된다. 미숙과실의 경우 강한 떫은맛을 지니며, 이는 탄닌성분의 존재로 인한 것으로 알려지고 있다. 솔잎은 소나무(*Pinus densiflora* Sieb. et Zucc.)의 침상형 잎으로서 아스코르빈산, 카로틴, 비타민 K, 플라보노이드, 안토시안, 수지, 키나산, 시킴산, 테르펜 성분을 다량 함유하는 것으로 보고되고 있으며, 탄닌성분도 함유하고 있다. 건조한 솔잎은 민간에서 솔잎차로 신경통이나 관절염, 동맥경화증 치료에 사용했다고 전해지며, 솔잎추출물은 음료수의 향미성분으로 사용된다. 호프(*Humulus Lupulus*)는 주로 맥주의 재료로서 많이 이용되고 있으며, 폴리페놀 화합물, 특히 탄닌계열의 화합물을 함유한다. 이와 같이 우리주변에서 널리 사용되는 탄닌 함유식물자원을 대상으로 하여 이들이 갖고 있는 탄닌성분의 종류와 양을 밝혀냄으로서 이들을 자원화 하는데 일조 하고자 한다.

2. 탄닌유도체의 합성

탄닌의 뛰어난 항산화작용을 가진 폴리페놀류 화합물로서 과산화라디칼을 Trapping함으로서 지질의 과산화를 막아준다. 유지의 항산화 첨가제로 propyl gallate와 ethyl protocatechuate등의 탄닌유도체가 식용유의 산화방지 첨가제로 개발된바 있다. 본 연구에서는 이러한 식품첨가제의 구조를 토대로 하여 보다 더 친유성이 높은 탄닌유도체를 합성함으로서 유지와의 혼합이 용이한 새로운 타입의 항산화 첨가제를 개발하고자 의도하였다. 다양한 탄닌성

분중 율피, 감, 솔잎 및 호프 등에 많이 함유되어있는 gallic acid 및 ellagic acid 등의 카르복실기를 여러 가지 탄소 길이의 에스테르로 변환하거나 카르복실기에 여러 불포화 지방산을 결합시킨 유도체 등을 합성하였다.

근래 들어 프레온 등의 화학물질이 오존층을 파괴함에 따라, 지표면에 도달하는 자외선의 양이 점차 증가하고 있다. 자외선은 피부에 홍반증, 건조증, 광선각화증 등을 일으키며 나아가 피부암을 유발한다. 따라서 점증하는 자외선으로부터 피부를 안전하고 효과적으로 보호할 수 있는 성분의 개발이 절실히 요구된다 하겠다. 본 연구에서는 UV-B에 의해 형성된 라디칼을 제거하는 성분인 수용성 gallic acid 및 digallic acid를 토대로 하여 피부에 도포할 경우 흡수가 용이한 지용성 탄닌유도체를 합성하였다.

지금까지 항산화 성분으로서 탄닌이외에 비타민 C, 비타민 E, 알부틴, 코직산 등이 있다. 이러한 항산화 성분들은 세포의 산화적 손상을 막을 수 있으므로 노화, 암, 심장마비, 일사병, 천식, 관절염, 백내장등의 치료제로 사용될 잠재력을 지녔으나 실제 임상실험에서는 그 효과가 뚜렷이 나타나지 않고 있다. 이 원인은 항산화성분의 수용성에 기인하는 것으로 세포막에 잔류하는 시간이 짧기 때문으로 추측되고 있다. 본 연구에서는 다양한 탄닌성분중 비교적 안정하고 구조가 간단한 gallic acid 및 protocatechuic acid등의 카르복실기와 비타민 C등의 히드록실기를 축합한 에스테르화합물을 만들어 지용성은 증가하고 항산화작용은 탄닌과 비타민 C의 작용을 그대로 유지한 이중작용 항산화제를 합성코자 하였다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 탄닌성분의 분석

가. 실험 재료 및 시약

율피 (공주산, 경동 한약재 시장에서 구입), 감 (원주일대에서 채집), 솔잎 (동국대 일산농장에서 채집), 호프분 (luplin, hop-meal, (주)두산주조에서 기증).

TLC (Thin Layer Chromatography)는 Kiesel gel 60 F₂₅₄ plate (Merck사)를 사용하였고, 이동상으로는 n-BuOH : Acetic acid : H₂O (4 : 1 : 1), Ethyl acetate : Hexane (1 : 1), Methylene chloride : MeOH (9 : 1), Methylene chloride : MeOH (3 : 1) , Chloroform : MeOH (3 : 1) , Chloroform : MeOH (9 : 1), Chloroform : MeOH (20 : 1) , Chloroform : MeOH (2 : 1) , Chloroform : MeOH (4 : 1) 등을 사용하였다. 전개된 성분의 검출은 10% Phosphomolybdic acid-EtOH 시약과 1% FeCl₃-EtOH 시약을 사용하였고, Phosphomolybdic acid-EtOH 시약의 경우에는 전개된 TLC plate를 검출용액에 담갔다가 꺼내어 Oven에 구워내었으며, 1% FeCl₃-EtOH 시약의 경우에는 Spray 로 분무한 후 건조하였다.

나. 실험 방법

◎ 추 출

- 율피 (*Castanea crenata* Sieb. et Zucc.)

율피 7kg을 70% aq. acetone으로 실온에서 각각 3주(3 week)씩 4회 반복 추출한

후, 여과지로 여과하였다. 추출액 중 acetone은 감압 하에서 제거하고, crude extract의 성분을 TLC로 조사하였다. 이때 사용한 이동상은 n-BuOH : Acetic acid : H₂O (4 : 1 : 1), Ethyl acetate : Hexane (1 : 1) 이었다. 수용액층을 round bottom flask에 넣고 온도를 40℃를 넘지 않게 주의하여 물을 모두 제거시켜 고체상의 물질을 얻었다 (500 g). 이 고체상의 물질을 증류수에 취해 분액 깔때기에 넣고 유기용매(Petroleum ether, Ether , EtOAc , BuOH)로 추출하였다. 극성이 낮은 유기용매에서 높은 용매순으로(Pet. ether → Ether → EtOAc → BuOH) 차례대로 추출하였으며 (그림 1), 추출 분리후 TLC로 성분을 조사하였다 (Chloroform : MeOH = 9 : 1). 유기 용매를 이용하여 추출할 때 추출되어 나오는 용액의 색이 투명해질 때까지 반복하여 추출하였다. 각 분획 용액을 감압하에서 그 용매를 날려 보내고, 얻어진 분획물은 질소 가스로 충전시킨 후, 냉동 보관시켰다.

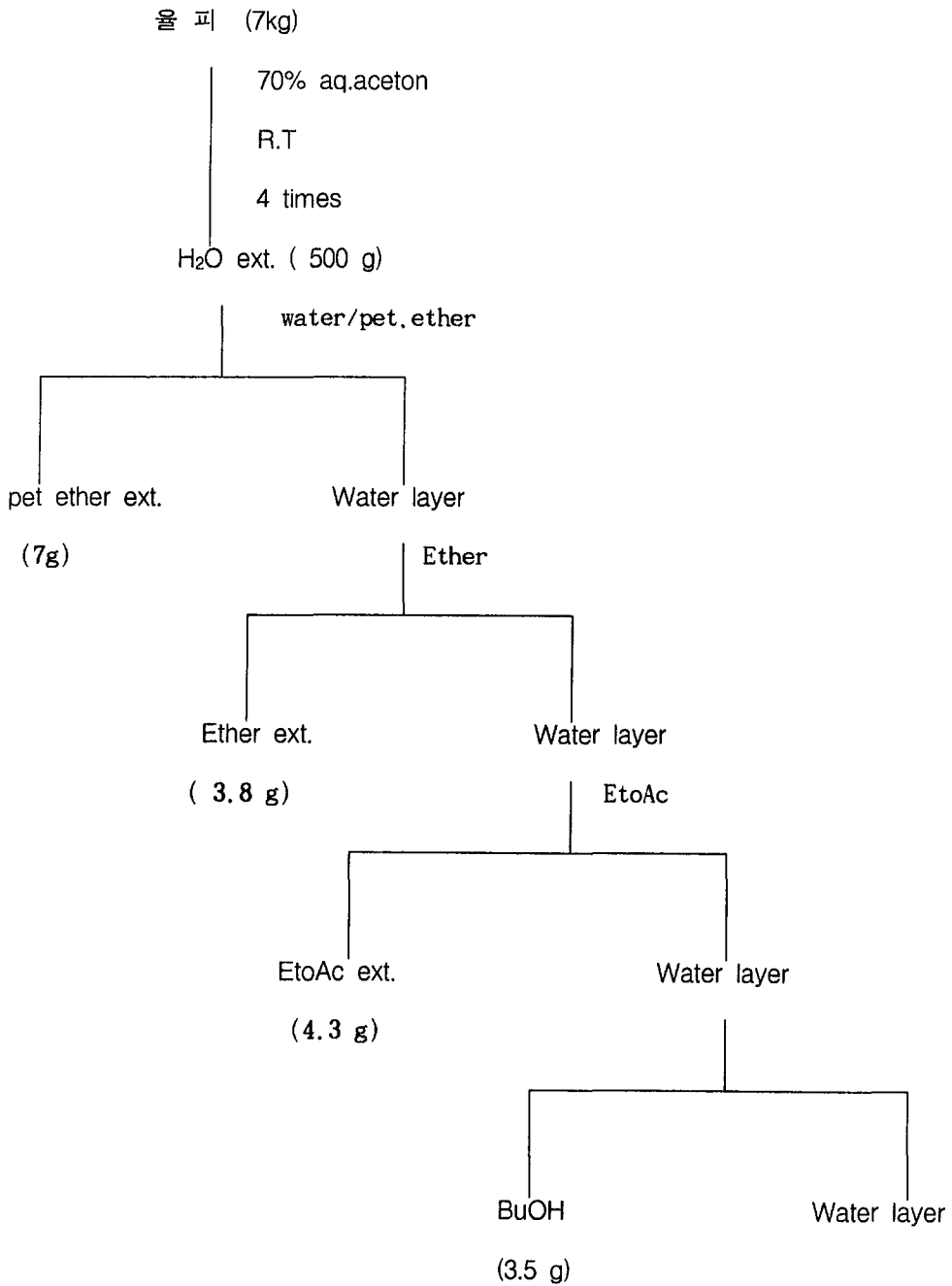


그림1. 올피의 체계적인 추출 및 분획법.

- 감 (*Diospyros kaki* Thunberg)

사용한 감은 성숙되기 전인 5월경에 채집한 것으로 직접 맛을 보아 떼음을 확인하였고, $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 의 냉동고에 넣어 보관하여 사용하였다. 감 5 kg을 세절한후 70% aq. acetone으로 각 3주씩 실온에서 2회 반복 추출하고 여과지로 여과하였다. 이때 감의 추출물은 sugar를 다량 함유하므로 점도가 높아 여과하는데 많은 시간이 소요되었다. acetone을 감압 하에서 제거하고, TLC로 (n-BuOH : Acetic acid : H_2O = 4 : 1 : 1 , Ethyl acetate : Hexane = 1 : 1) crude extract의 성분을 조사하였다. 수용액 층을 round bottom flask에 넣고 물을 모두 제거하여 고체 형태의 물질을 얻었을 경우, 어느 용매에도 녹지 않는 불용성 물질로 변형이 되어 더 이상 물을 날려 보낼 수 없었으므로 수용액층을 그대로 분액 깔때기에 취하여 유기용매로서 추출분리 하였다.

- 솔잎 (*Pinus densiflora* Sieb. et Zucc.)

솔잎 2 Kg을 70% aq. acetone으로 실온에서 3주씩 2회 반복 추출한 후, 여과지로 여과하였다. 여과후 유기용매로의 분획은 율피와 감의 경우에 준하여 시행하였다.

- 호프 (*Humulus Lupulus*)

호프분 2 Kg 을 70% 수성 acetone으로 각 3주씩 실온에서 2회 반복추출하여 여과 후 감압하에서 acetone 을 완전히 제거하였다. Rotatory evaporator를 사용하여 acetone과 물을 제거할 때 Flask에서 거품이 다량으로 발생하여 곤란하였는바 여기에 BuOH을 소량씩 가하면서 거품을 제거하면서 용매를 제거하였다. 여기서 얻은 수층엑스를 여과하여 chlorophyll등 불용물을 여별한 후 여액을 그대로 이용하였다. 여과 후 유기용매로의 분획은 율피와 감의 경우에 준하여 시행하였다.

◎ Column Chromatography (이하 C.C 로 약칭함)

올피 에테르 분획의 무게를 측정 한 후, C.C를 실시하였다. Column에 충전 할 Sephadex LH-20 resin을 미리 MeOH 용매에 1일 동안 담가 팽윤시킨 후, column에 충전하고 메탄올 용매를 계속하여 흘려 보냈다. 시료는 소량의 메탄올에 완전히 용해시킨 다음 여과지로 여과한 후, Loading시켰다. Loading한후 메탄올 용매를 사용하여 isocratic조건으로 elution 하였다. Elution된 용액의 성분을 TLC로 확인(Chloroform : MeOH = 3 : 1 , Chloroform : MeOH = 20 : 1)한후, fraction별로 모아 감압하에서 용매를 모두 제거하고, 무게를 측정하였다. Gradient로 C.C.하기 위하여 Sephadex LH-20을 MeOH에 하루간 팽윤시킨 다음, column에 충전하고 gradient 조건 상태로 (100 % MeOH → 80 % MeOH → 60 % MeOH → 40 % MeOH → 20 % MeOH → 증류수) 만들었다. Isocratic조건으로 분리한 fraction은 다시 메탄올에 녹여 column에 넣고, gradient 조건으로 elution하였다 (증류수 → 20 % MeOH → 40 % MeOH → 60 % MeOH → 80 % MeOH → 100 % MeOH). 각 fraction을 Automatic fractional collector로 받아 낸 후, TLC (Chloroform : MeOH = 3 : 1, Chloroform : MeOH = 20 : 1)로서 각 성분의 분리를 확인하였다. TLC로 확인하여, spot의 분리가 미흡하면, MCI-gel CHP-20P를 사용해서 단일 용매 조건 및 gradient 조건으로 반복하여 chromatography를 실시하였다. 다른 분획인 에틸아세테이트와 부탄올 분획도 역시 같은 방법으로 C.C를 시행하였다.

◎ HPLC 분석

각 추출 분획을 C¹⁸ Reverse-Phase HPLC를 사용하여 H₂O-MeOH gradient

로 각종 탄닌표준품 피크와 비교하여 탄닌성분을 확인하고 그 함유량을 측정하였다. HPLC 분석기기는 DIONEX system이었으며 detector는 대부분의 탄닌이 방향족고리를 가지므로 254 nm를 선택하였다. 이동상의 용매 조건은 gradient이었으며, 분리하고자 하는 시료를 메탄올에 완전히 녹여 injection하였다.

* 이동상 용매의 gradient 조건

A. μ -Bondapak C18 reverse-phase column을 사용했을 경우.

0.025% H_3PO_4 를 함유한 메탄올을 초기 농도 10%에서 18분까지 64%로 증가하는 방향으로 설정하고 22분까지 100%로 증가시키며 30분까지 다시 처음 농도인 10%로 감소하는 방향으로 조건을 설정하였다.

B. Cosmosil packed column을 사용했을 경우.

0.025% H_3PO_4 를 함유한 메탄올을 초기 10%에서 18분까지 64%로 증가시키고, 22분까지 100%로 증가시킨 후 27분까지 동일 용매인 메탄올만을 흘려 보내었다. 울피의 수용액상을 분석할 때는 이동상 조건 A를 적용하여 실시하였다. 조건 B는 유기 용매로 분획한 시료의 분석과 C.C 처리 후 나온 fraction을 분석하고자 할 때 사용하였다.

◎ 탄닌성분의 구조 분석

단일성분을 분리한 후 IR, 질량 분광법, 1H NMR, ^{13}C NMR, Optical activity, 융점 등을 측정하여 단일성분의 구조를 분석하였다.

2. 탄닌유도체의 합성

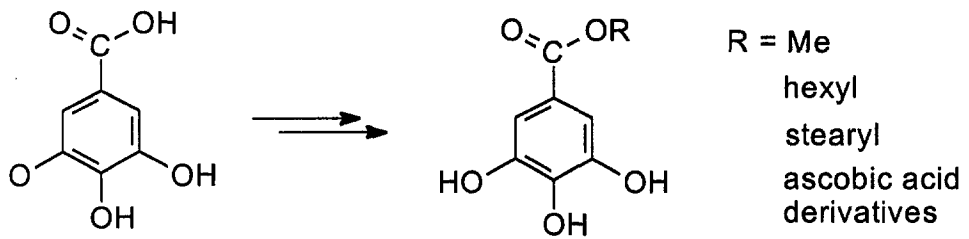
가. 시약 및 기기

본 실험에 사용된 시약들은 Aldrich사와 Fluka사의 것을 사용하였으며 각종 용매는 일제특급시약을 사용하였다. 디클로메탄 (DCM)은 CaH₂ 존재하에 증류하여 수분을 제거하였고, dicyclohexylcarbodiimide (DCC)는 진공증류하여 정제한후 사용하였다. ¹H NMR 과 ¹³C NMR spectra는 Bruker DPX400 spectrometer를 사용하여 얻었으며, CDCl₃의 경우 내부표준물질로 tetramethylsilane (TMS)을 사용하였고, deuterated dimethylsulfoxide (DMSO-d₆)와 CD₃OD의 경우 잔류해 있는 DMSO와 메탄올을 internal reference로 하였다. Chemical shift는 δ 단위로 나타내었다. Mass spectra는 Finnigan Mat TSQ 700을 사용하여 얻었다. TLC는 Merck 60F254 실리카겔 plate를 사용하였으며, UV lamp (254 nm)를 사용하거나 7% phosphomolybdic acid의 에탄올용액을 사용하여 시각화 하였다. 칼럼 크로마토그래피는 실리카 겔 (Merck, 230~400 mesh)을 사용하였다. 흡광도는 UV/VIS Spectrophotometer (JASCO V-530)로 측정하였다.

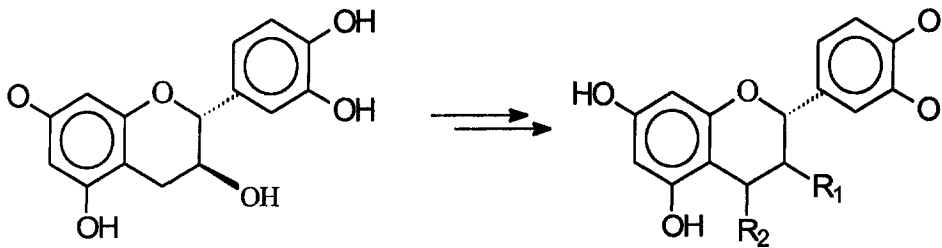
나. 합성법

다양한 탄닌성분중 율피, 감, 솔잎, 호프 등에 다량 함유된 gallic acid와 ellagic acid, 그리고 catechin 등을 출발물질로 하여 여러 가지 탄소 길이의 에스테르 구조를 가진 지용성유도체와 비가수분해형 탄닌유도체를 합성하였다.

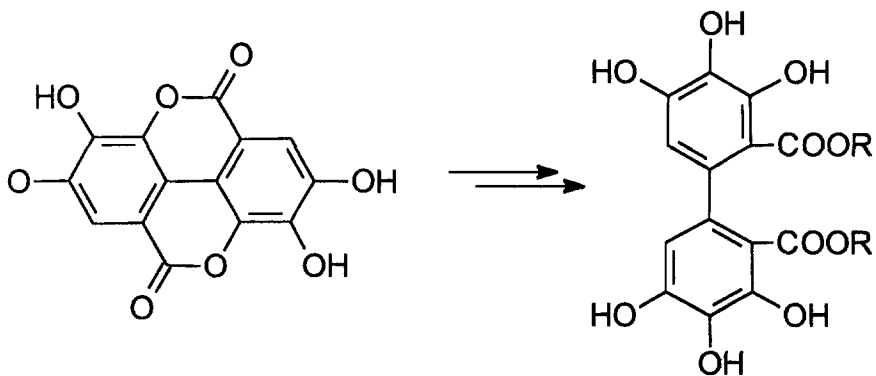
1) Gallic acid 유도체의 합성



2) Catechin 유도체의 합성



3) Ellagic acid 유도체의 합성



제 3 절 결과 및 고찰

1. 탄닌성분의 분석

다음의 탄닌성분이 확인 동정되었다.

- 울피(*Castanea crenata* Sieb. et Zucc.) :

울피의 주탄닌성분은 Ellagic acid 이었다. Crude울피 500g중에는 Elagic acid가 82.5g 함유되어 있었으며, 기타 다른 폴리페놀성분으로 quercetin 32.5g, morin 21.3g, naringenin 13.8g, Gallic acid 5g, catechin 3.8g이 존재하였다. 이 중 Elagic acid와 Quercetin은 Gel Chromatography 실시후 재결정되었으며, ^1H NMR 과 ^{13}C NMR에 의해 그 구조가 확인되었다.

Quercetin은 미황색분말로 얻어졌으며, FeCl_3 test에서 오록색, Zn-HCl test에서 홍색을 나타냈다. $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6)에서 δ : 6.17(1H, d, $J=2\text{Hz}$, H-6), 6.39(1H, d, $J=2\text{Hz}$, H-8), 6.87(1H, d, $J=8\text{Hz}$, H-5'), 7.53 (1H, dd, $J=2.8\text{Hz}$, H-6'), 7.66(1H, d, $J=2\text{Hz}$, H-2'), 12.46(1H, s, C5-OH) 그리고 $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO-d_6)에서 δ : 146.9 (C-2), 135.8(C-3), 175.9(C-4), 160.8(C-5), 98.3(C-6), 164.0(C-7), 93.5(C-8), 156.2(C-9), 103.1(C-10), 122.1(C-1'), 115.2(C-2'), 145.1(C-3'), 147.7(C-4'), 115.7(C-5'), 120.1(C-6')이 관찰되었다.

- 감(*Diospyros kaki* Thunb.) :

7월에 채취한 붉은 감을 80% acetone 으로 실온에서 추출 및 여과농축한 후, 그 수층엑스를 Pet. ether, Ether, Ethyl acetate, Butanol등으로 순차적으로

추출하여 Sephadex LH-20 C. C.와 MCI-gel CHP-20 C. C.을 반복 실시한 결과 그 주탄닌성분이 Gallic acid임을 알아내었다. Gallic acid는 주로 Ethyl acetate층에서 발견되었으며 이 층에서 Morin도 또한 다량 발견되었다. C18-Reverse Phase HPLC로 표준품과 비교분석한 결과 감 5kg당 Gallic acid 7.6g 과 Morin 4.5g이 함유되어 있었다.

gallic acid는 무색침상결정으로 FeCl_3 test에서 청색을 나타내고, IR spectrum에서 3496cm^{-1} 에서 OH기, 1668cm^{-1} 에서 COO에 의한 흡수대를 보여 phenolic acid임을 추정하였고, $^1\text{H-NMR}$ spectrum에서는 δ 6.92 ppm에서 수소적분치 2H에 해당하는 galloyl기에 의한 singlet signal을 나타내며, $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서는 δ 108.7에서 C-2, C-6, δ 120.5에서 C-1, δ 137.9에서 C-4, δ 145.3에서 C-3, C-5, δ 167.4에서 COOH기에 의한 carbonyl signal이 관찰되었다.

- 솔잎(*Pinus densiflora* Sieb. et Zucc.) :

솔잎의 탄닌성분으로는 Elagic acid가 가장 많았으며, Flavonoid성분으로 Flavanol을 다량 함유하고 있었다. 솔잎 1kg을 70% 수성아세톤으로 추출하여 Crude엑스 65g을 얻었으며, 이를 Sephadex LH-20 C. C.와 MCI-gel CHP-20 C. C.로 반복하여 크로마토그래피하여 Flavanol 12.4 mg과 Ellagic acid 3.2 mg을 얻었다. 이외에도 catechin 1.8 mg과 quercetin 1.7 mg, Morin 6.5 mg이 분리되었다.

- 호프(*Humulus lupulus*) :

호프의 탄닌성분을 분석하고자 70% 수성아세톤으로 추출하여 분석해 본 결과 Elagic acid가 주탄닌성분으로 존재하였다. 기타 폴리페놀화합물로

Quercetin 및 그 glycoside가 확인되었다.

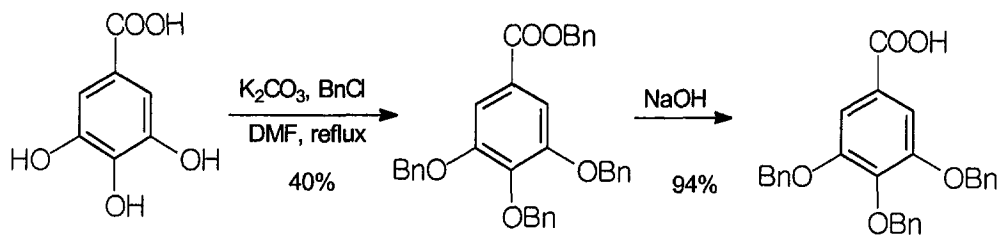
2. 탄닌유도체의 합성

비교적 안정하고 구조가 간단하여 기능기의 변환이 가능한 gallic acid, ellagic acid 및 catechin 등의 탄닌을 대상으로 분자수식을 통하여 유도체를 설계하고 합성하였다.

가. Gallic acid 유도체의 합성

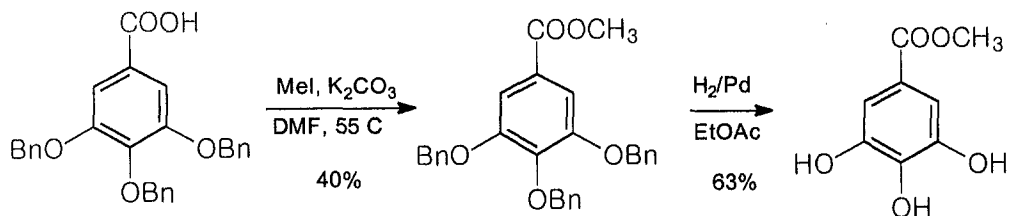
- Tribenzyl gallic acid의 합성

Gallic acid의 에스테르를 합성하고자 할 때 페놀성 수산기를 벤질기로 보호하였다. Tribenzyl gallic acid는 Gallic acid와 달리 유기용매에 잘 녹아 추출분리하기 용이하였다.



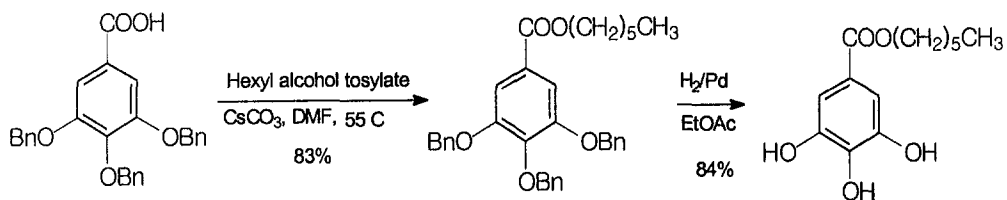
- Methyl gallate의 합성

Tribenzyl gallate에 iodomethane과 K₂CO₃를 가하여 methyl ester를 합성한 후 H₂ gas와 Pd catalyst를 사용하여 benzyli기를 제거하였다.



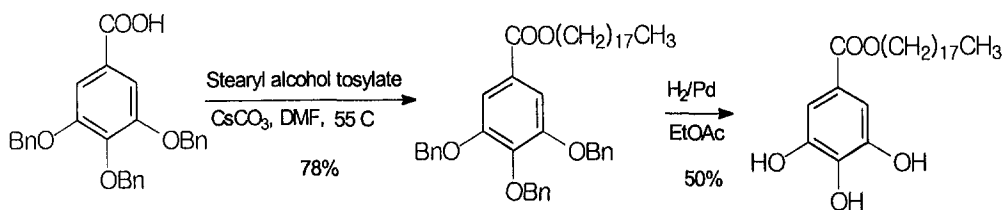
- Hexyl gallate의 합성

Hexyl alcohol tosylate를 합성한후 DMF에 녹이고 Tribenzyl gallate와 CsCO_3 를 가하고 55°C에서 반응시키고 벤질기를 탈보호하여 hexyl gallate를 얻었다.



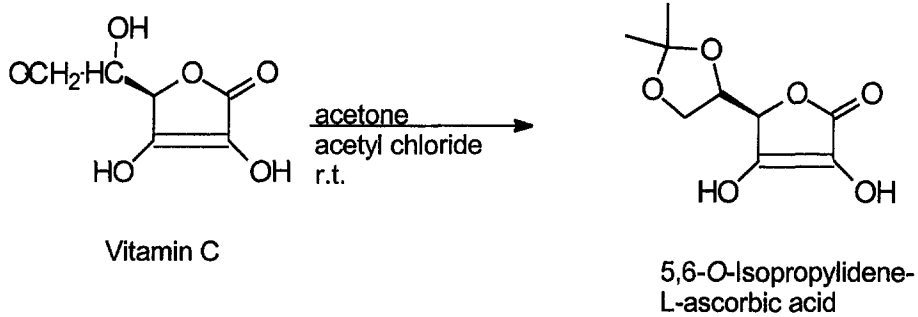
- Gallic acid stearyl ester의 합성

Stearyl alcohol tosylate를 합성한후 DMF에 녹이고 Triacetyl gallic acid와 CsCO_3 를 가하고 55°C에서 반응시켰다. 이후 수소화반응에 의해 benzyl group을 제거하여 gallic acid stearyl ester를 얻었다.



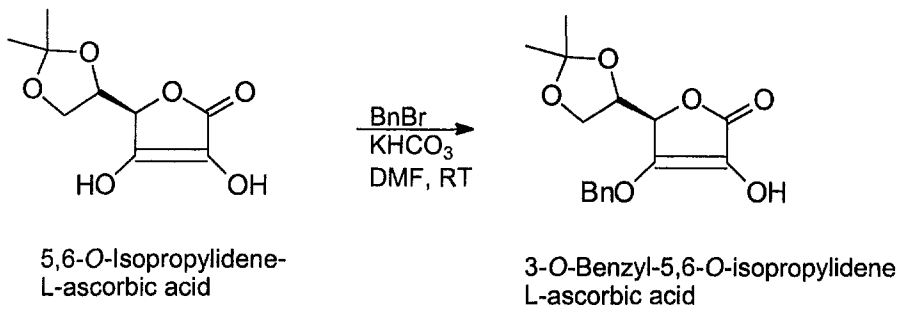
- 5,6-*O*-Isopropylidene-L-ascorbic acid의 합성

Gallic acid의 Vitamin C 에스테르를 합성하기 위하여 Vitamin C의 5번과 6번 수산기를 우선적으로 아세톤으로 보호하여 화합물 5,6-*O*-Isopropylidene-L-ascorbic acid를 합성하였다. 62 - 70%의 수율로 생성물이 얻어졌다.



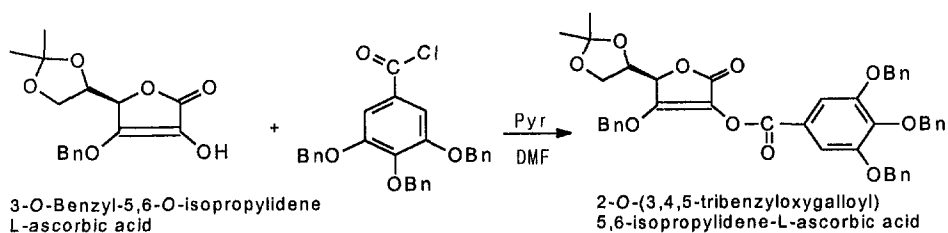
- 5,6-*O*-Isopropylidene-L-ascorbic acid의 합성

5,6-*O*-Isopropylidene-L-ascorbic acid의 3번 수산기를 benzyl ether group으로 보호하였는데, 이때 base로는 KHCO_3 를, 친전자체로는 benzyl bromide를 사용하였으며, 용매로서 DMF를 사용하였다. 실온에서 12시간 반응시키고 isopropyl ether로 재결정한 결과 40 - 45%의 수율로 생성물을 얻었다.



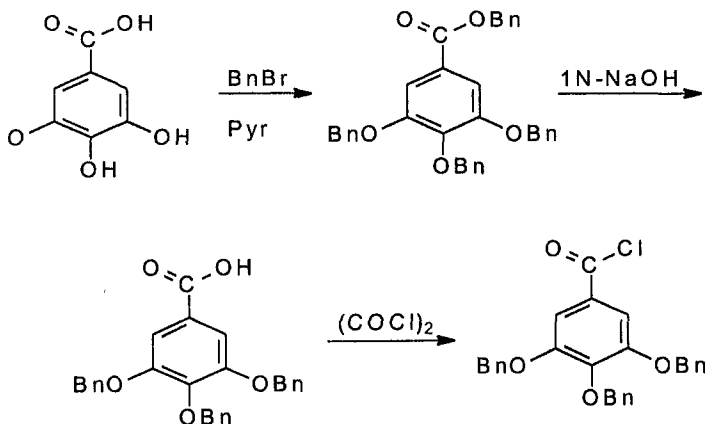
- 2-O-(3,4,5-Tribenzyloxygalloyl) 5,6-isopropylidene-L-ascorbic acid의 합성

3-O-Benzyl-5,6-O-isopropylidene-L-ascorbic acid와 3,4,5-tribenzyloxy benzoyl chloride를 pyridine 존재하에 DMF상에서 반응시켰다. 0°C에서 3시간 반응시킨후 t.l.c로 출발물질의 존재를 확인하였으나, ascorbic acid 유도체가 여전히 남아 있어 실온에서 2시간 더 반응시켰다. crude yield는 47 - 63%로서 여러 가지 용매에서 재결정을 시도하였으나 되지 않아 silica gel column chromatography로 분리하였다.



- 3,4,5-Tribenzyloxygalloyl chloride의 합성

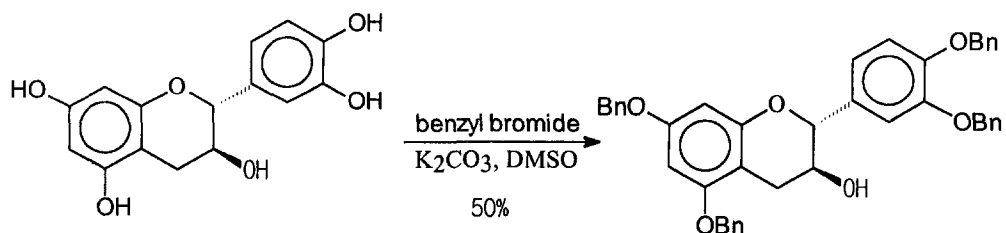
Gallic acid의 3개 phenolic 수산기와 카르복실기를 pyridine존재 하에서 benzyl ether와 benzyl ester로 보호하였다. 이후 benzyl ester를 saponification하고 이어서 oxalyl chloride로 가하여 3,4,5-Tribenzyloxygalloyl chloride를 합성하였다.



나. Catechin유도체의 합성

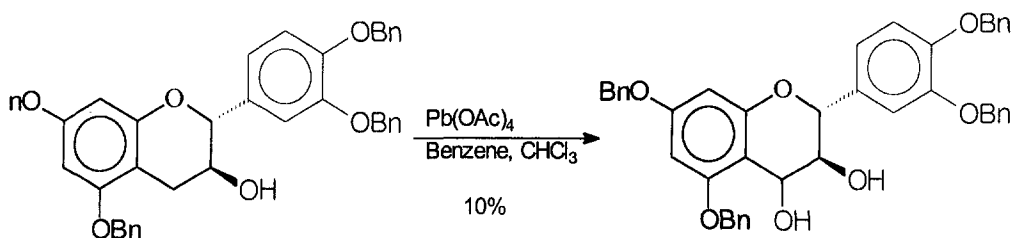
- 5,7,3',4'-Tetrabenzyl catechin(catechin benzyl ether)의 합성

Catechin의 페놀성 수산기를 benzyl ether group으로 보호하고자 하였다. benzyl bromide와 K_2CO_3 또는 pyridine을 사용하였는데 catechin의 유기용매에 대한 용해도가 낮아 반응이 매우 어려웠다. catechin은 DMSO에 일부 녹으므로 DMSO를 사용하여 반응시켰다. 반응 후 고효율의 진공펌프를 사용하여 DMSO를 제거하였다.



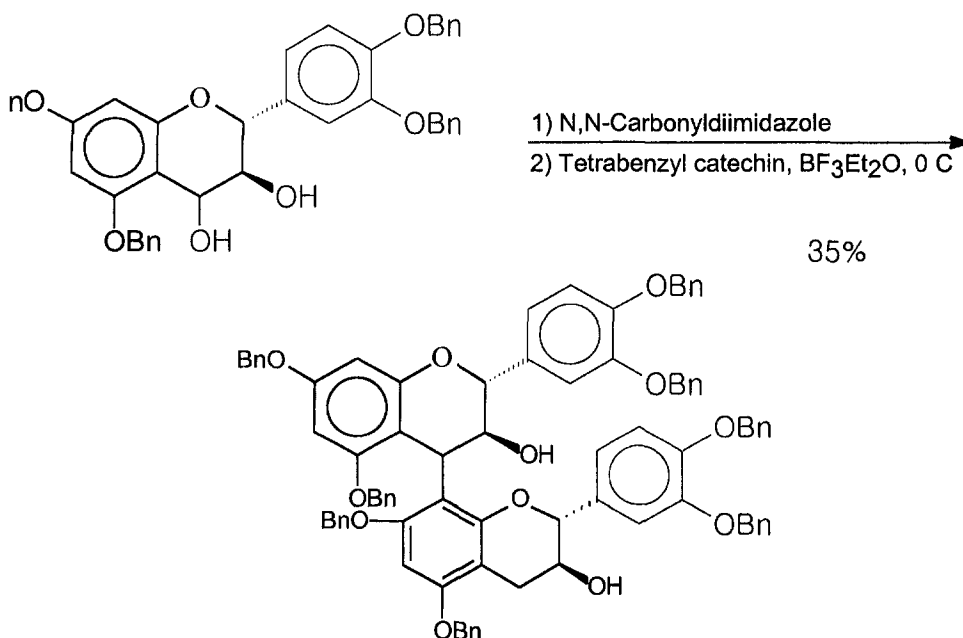
- 5,7,3',4'-Tetrabenzyl-4-hydroxycatechin의 합성

위에서 합성한 5,7,3',4'-Tetrabenzyl catechin의 4번 탄소에 hydroxyl기를 도입하기 위하여 $Pb(OAc)_4$ 를 사용하여 산화반응을 시도하였다. 반응조건을 최적화하기 위해 반응을 수회 시도하였으나 가장 높은 수율이 10%밖에 되지 않았다.



- Octabenzyl catechin dimer의 합성

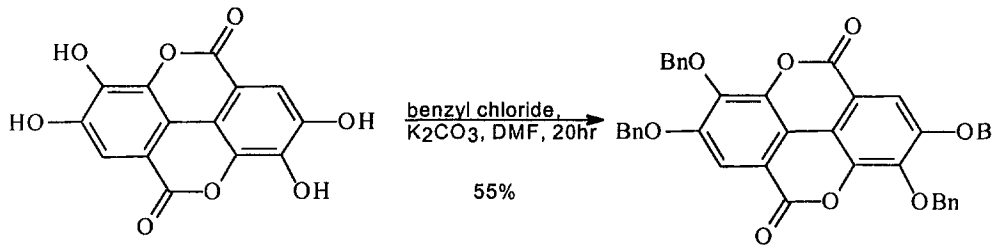
위에서 합성한 5,7,3',4' - Tetrabenzyl - 4 - hydroxycatechin에 N,N' - carbonyldiimidazole을 가하여 4번 hydroxyl기를 활성화시켰다. 여기에 BF₃ ether 존재하에 5,7,3',4'-Tetrabenzyl catechin를 가하여 dimer를 8.5 mg (35%의 수율) 얻었다. 얻어진 생성물의 양이 불충분하여 다음 단계로 진행하기 곤란하였다.



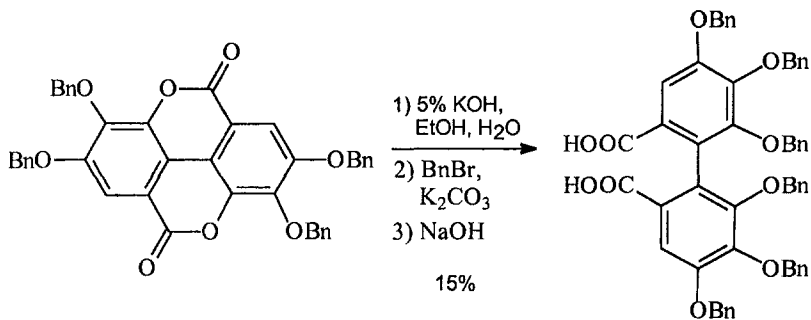
다. Ellagic acid 유도체의 합성

- Tetrabenzyl ellagic acid의 합성

Ellagic acid의 페놀성 수산기를 일단 벤질기로 보호하였다. Ellagic acid에 K₂CO₃와 benzyl chloride를 가한 후 실온에서 20시간 반응시켜 55%의 수율로 tetrabenzyl ellagic acid를 얻었다.



- Hexabenzoyldiphenic acid(hexahydroxy dipenic acid benzyl ether)의 합성
 Tetrabenzyl ellagic acid를 알칼리로 가수분해하여 tetrabenzoyldiphenic acid를 얻었다. 생성된 tetrabenzoyldiphenic acid를 분리하지 않고 여기에 benzyl bromide와 K_2CO_3 를 가하여 화합물중에 남아있는 hydroxyl기를 benzyl ether로 하였다 이때 carboxyl기도 benzyl ester기로 전환되었다. NaOH를 가하여 Ester를 가수분해하여 hexabenzoyl diphenic acid를 얻었다.



제 3 장 약효검색

제 1 절 서 설

최근에 polyphenol류는 유해산소를 제거하는 항산화작용이 보고되므로서 건강식품 및 신의약품 창출의 새로운 대상으로 조명을 받고 있다. 현대의학에서 산화적 스트레스는 염증질환, 동맥경화, 당뇨병, 발암, 심근경색, 뇌졸중, 노화 등 각종 질병발생의 주요 원인으로 제시되고 있다. 기존의 항산화제로는 Vitamin C, E, beta-carotene 등이 보고되어 있다.

한국에는 탄닌을 함유한 식물자원이 풍부한 것으로 알려 졌으나, 탄닌 함유 식물자원에 대한 조사가 체계적으로 이루어 지지 않았으며, 또한 식물자원이 갖고 있는 탄닌의 분류 및 양적 특성도 체계적으로 검토된 바 없고 약효에 대한 검토가 미비한 상황이다.

탄닌은 식물성 polyphenol의 총칭으로서 크게 가수분해형 탄닌과 축합형 탄닌의 두가지로 구별된다. 전자는 가수분해에 의해 생산되는 phenol carboxyl group의 종류에 따라 gallotannin과 ellagitannin으로 구별되며 gallic acid또는 두분자의 gallic acid가 결합된 ellagic acid와 주로 glucose같은 당과 ester로 결합하여 이루어졌다. 따라서 산이나 가열에 쉽게 가수분해되기 때문에 가수분해형 탄닌이라고 한다. 반면에 축합형 탄닌은 catechin과 같은 flavon-3-ol이 연속적으로 축합되고 고분자로 되어있다. 이러한 두 형태의 탄닌의 생체내의 생리적 작용과 약효성이 상이하므로 식물이 함유한 탄닌의 종류도 다양하다.

탄닌화합물의 생리활성에 대한 연구로는 항 virus작용, 혈압강하작용, DNA

topoisomerase II억제작용, 항종양작용, 항균작용, 항 allergy 작용, 항 HIV작용 등 다양한 활성이 보고되었다. 1992년 Gail등은 tannin의 가수분해물인 ellagic acid, 그리고 몇몇 관련 유도체가 mouse의 피부암에 유효하다고 보고하였으며, 1993년 Miyamoto 등은 5개의 ellagitannin이 in vivo에서 항암효과가 있으며, interleukin-1 beta의 유도를 증가시킨다고 하였다. 1992년 Kashiwada 등은 129종의 tannin과 관련 화합물의 암세포에 대한 세포독성을 보고하였으며, 그중 몇 종은 항암효과가 크다고 하였다. 또한 일본 미쓰이 농림식품 종합연구소에서는 catechin이 임상적으로 위내 helicobacter pylori균의 활성도를 억제하여 위암예방에 기여하고 있다고 보고하였다. 이에 탄닌을 이용할 새로운 의약품의 개발은 국민의 건강향상을 위해 필수적인 연구과제라 생각되어, 탄닌 함유 천연 추출물 이용하여 다음의 면역증가, 혈관보호, Cd²⁺중독 시 해독효과 등을 검색하고, 그 기전을 규명하고자 하였다.

1. 면역증강 효과

면역학의 발전으로 많은 질환이 면역계의 이상에 의해 발생되고 있음이 점차 밝혀져 가고 있으며, 최근에는 암 치료에 있어서도 종래의 외과적 수술, 방사선요법 및 화학요법제와 병용하여 면역요법제가 사용되고 있다. 더구나 일본 등지에서 급속히 이루어진 버섯류의 B-D-glucan 류의 면역 부활작용 등을 통한 항종양 효과 등은 in vitro에서 세포독성에 의한 효과는 없으면서도 in vivo에서는 항종양효과가 초래되었다. 이것은 소위 면역부활작용이라는 개념으로 그 작용기전이 macrophage와 T-림파구의 일종인 killer cell의 활성화에 의한 것이다. 이러한 효과들은 2차 면역반응 즉, 항원-항체반응에서의 문제가 아닌 면역의 전초병 역할을 하는 1차 면역계의 면역학적인 수위가 높아지는 것 같은 저항력이 강화되

는 것이다. 따라서 우리나라와 같은 기후조건인 지역서 이미 내려오는 민간적 경험과 풍부한 자원을 이용하여 보다 안전하게 면역계에 작용하는 천연물을 검색하고, 효과가 인정된 천연물질에 대한 작용기전의 연구 및 치료전략을 세움에 따라 AIDS 를 포함한 각종 질병을 치료하게 될 전망을 강력히 시사하고 있다. 이에 본 연구에서는 국내 식물에서 추출된 천연의 탄닌성분을 이용하여 면역증강효과를 비교 검토하고자 한다.

2. 혈관보호 효과

울피는 너도밤나무과 (Fagaceae)의 다년생 초목인 밤나무(*Castanea crenata*) 열매의 속껍질로서 탄닌을 함유한다. 또한, 울피 Ext.는 M. Guillame에 의하면 8일간 협착으로 병적상태를 유발시킨 정맥에서 정맥압을 증가시키고, histamine, serotonin, chloroform과 같은 자극성 물질에 대해 피부의 혈관투과성을 용량의존적으로 감소시킨다고 보고되었다. 또 울피 Ext.는 용량의존적으로 in vitro lipid peroxidation을 저해하여 free oxigated radical의 세포와 조직에 대한 유해작용을 저해하는 항산화 효과가 있다고 보고되었다. 이에 본 실험은 tannic acid류의 내피세포 의존성 혈관이완 반응에 미치는 영향을 고찰하고자 한다.

한편, tannic acid와 vitamin C는 모두 항산화제로 작용하면서도 각각 지용성과 수용성의 다른 부위에서 항산화작용을 나타내므로 두 제제를 병용하였을 경우 협동적인 항산화작용이 기대된다. 즉, tannic acid와 vitamin C가 항산화제로서 고지혈증과 동맥경화에 우수한 효과가 있을 것으로 예상된다.

이에 본 실험에서는 생체내 실험으로 vitamin D₂를 투여하여 혈관을 calcification시키고, 고cholesterol사료와 cholic acid로 고지혈증 및 동맥경화를 발생시킨 흰쥐에 있어 tannic acid를 단독 또는 vitamin C와 병용투여하였을 경우 억제효과

를 비교 측정하고자 하였다.^(38,44) 또한 그 작용기전을 규명하고자, 혈액 중 지질 성분의 농도변화, 혈관 내피세포 의존성 및 비의존성 작용물질의 혈관 수축 및 이완 반응성, 혈압변화 및 항산화효과 등을 측정하였다.

또한, streptozotocin을 투여하여 당뇨를 유발시킨 Sprague-Dawley계 흰쥐에게 tannic acid, 율피 Ext. 및 솔잎 Ext.를 각각 250 mg/kg/day 용량으로 5주간 경구 투여한 후 체중 및 식수 섭취량 변화, 혈장 중 glucose, cholesterol, triglyceride 농도 및 MDA 치를 측정하였다. 또한 마취하 norepinephrine, acetylcholine, isoproterenol, sodium nitroprusside 및 L-NAME을 각각 정맥내 주사시 혈압반응의 변화를 측정하였으며, 흉곽대동맥을 적출하여 organ bath내 현수하고 norepinephrine 및 L-NAME의 혈관수축 및 이완반응을 측정하였다.

3. Cd⁺⁺ 독성 해독효과

카드뮴 중독에 대한 방어 혹은 경감효과는 지질과산화 반응의 산소유리기를 -SH기와 결합시키는 방법 등의 보집제(scavenger)로 제거하는 방법, 카드뮴에 특이적으로 결합하는 metallothionein (MT)등의 합성을 촉진하는 방법, 세포에 미치는 독성을 신속하게 회복시켜주는 물질을 사용하는 방법 등이 있다. 이에 따라 직·간접적인 MT 합성자극 물질인 L-ascorbic acid, Zn, Cd의 전처치로 카드뮴독성을 경감시킨다는 보고와 -SH화합물 투여에 의한 카드뮴 보집효과, 프로그스테론에 의한 고환독성 경감효과 등이 보고되었다. 또한, 마늘성분중 diallyl disulfide, propylallyl disulfide, glutathione, thiolactic acid 및 비타민 B1 등이 카드뮴독성을 방어하였다는 보고가 있었다.

한편, tannic acid (TA)는 polyphenol 성분으로서 암발생 억제 및 단백질변성 억제물질로서 allergen의 수준을 감소시키는 효과가 보고되고 있어 카드뮴과 같은

오염 중금속의 흡수를 저해하고 장내에서의 불용성염을 형성하여 배설을 촉진시키는 효과가 있을 것으로 기대되는 물질이다. 이에, 본 연구에서는 다음과 같은 목적으로 실험을 수행하고자 한다. 즉, 우리 식생활중 자연스럽게 다량 섭취될 수 있는 TA의 오염중금속 중 카드뮴의 흡수저해 효과를 확인하고, 이때의 카드뮴 폭로 수준을 파악하고자 한다. 따라서 tannic acid의 오염 중금속중의 하나인 카드뮴 독성에 미치는 해독효과를 검색하고자 한다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 면역 증강효과

가. 마우스 비장세포(spleenocytes)의 조제

C3H 마우스(7 weeks old)를 경추 탈구법으로 희생시킨 후 복부를 절개하여 비장을 무균적으로 적출하고 멸균된 1 ml 주사기 뒷부분을 이용하여 비장을 세분 절편하였다. 세포를 HBSS에 부유시킨 후 가아제를 통과시킨 후 50 ml Falcon tube에 옮기고 1,500 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 세포 침전물을 2 번 더 세척하여 적혈구를 제거한 후 LCM에 현탁한 후 일정양을 Trypan blue 염색약으로 희석하고 세포수를 측정한 후 5×10^6 cell을 한 well (3 ml)에 분주하였다.

나. 임파구 증식능 실험

6-8주령의 C3H 마우스의 비장을 적출하여 1ml 주사기 뒷부분으로 잘게 부순 후 6겹의 가아제에 통과시켜 비장세포를 얻는다. 1500rpm에서 centrifugation하여 한번 세척한 후 tryphan blue exclusion method로 counting하여 세포를 1.5×10^6 cells/ml이 되도록 농도를 조정한다. 율피 추출물인 CIS gel과 CIS jelly를 시료로 사용하였다. (추출방법은 앞의 “엑기스 제조” 항 참조) 96well flat-bottom microplate에 시료를 적절한 농도로 serial dilution(duplicate or triplicate)하여 0.1ml씩 분주한다.

96well plate에 준비된 spleen cell을 0.1ml씩 가하여 total 0.2ml이 되도록 한 후 (cell의 최종농도 = 1.5×10^5 cells/well) 37°C, 5% CO₂ incubator에서 72시간 배

양한다. 배양 후 ^3H -Thymidine(부영사, 5mCi/5ml)을 배지로 1/25 희석한 후 plate의 각 well에 0.05ml씩($2\mu\text{Ci/well}$) 처리한 후 4시간 더 배양한 다음 세포를 수확하여 scintillation cocktail을 3ml가해 β -counter로 cpm을 측정하여 stimulation index를 구하였다.

$$\text{Stimulation index(S.I.)} = \frac{{}^3\text{H-thymidine incorporation(cpm) of splenocytes cultured with plant extracts}}{{}^3\text{H-thymidine incorporation(cpm) of splenocytes cultured in medium control}}$$

실험에 사용한 배지 : LCM (Leukocytes complete medium), RPMI 1640 (NaHCO₃ 2.0g/l + HCL 5.5ml/l + HEPES 4.766g/l), FBS 5%(50ml), penicillin-streptomycin 100u/ml (5ml), sodium pyruvate (10ml), non-essential amino acid (10ml), glutamine (10ml), 2-mercaptoethanol (1ml)

다. 세포증식효과

Spleen cell에 5, 10, 100 ug/ml의 CIS gel과 CIS gelly type을 넣어준 후 세포를 세어 성장률을 보았다. Cytokine의 발현을 보기위해 5 ug/ml의 CIS gelly를 spleen cell에 가한 후 세포로부터 RNA를 3, 6, 24 시간 후에 추출하여 RT-PCR로 cytokine양을 조사하였다.

라. Reverse Transcriptase-PCR에 의한 cytokines의 발현조사.

1) 세포로부터 RNA의 분리 ; 세포를 1,400 rpm에서 원심분리한 후 PBS로 세척한 후 eppendorf tube에 옮긴다. PBS를 제거하고 각 tube에 500 μl 의 RNAzol을 넣어 세포를 파괴시킨 후 50 μl 의 chloroform을 넣고 15초간 vortex 후 10 분간 0 °C에 방치한다. 4 °C로 냉각시킨 eppendorf tube에 넣고 12,000 rpm에서 10

분간 원심분리한다. 상층액을 다른 tube에 옮긴 후 1 배의 isopropanol을 넣어주고 -20 °C에서 1 시간 방치한 후 12,000 rpm에서 20 분간 원심분리하여 RNA를 침전시킨다. 침전물에 500 μ l 75% ethanol로 세척하고 8,000 rpm에서 10 분간 원심분리하여 재침전시키고 실온에서 건조 후 DEPC로 처리한 증류수에 용해시킨다.

2) RT-PCR ; RNA sample 1 μ g을 DEPC를 처리한 증류수 10 μ l가 되도록 맞춘 후 65 °C에서 가열한 후 얼음에 놓는다. 10.5 μ l buffer[MgCl₂ (25 mM) 4 μ l, 10xRNA PCR buffer 2 μ l (Takara RNA PCR kit), dNTP(10 mM each) 2 μ l, RNase inhibitor(40 units/ μ l) 0.5 μ l, AMV Reverse transcriptase(5 units/ μ l) 1 μ l, Random 9 mers(50 pmol/ μ l) 1 μ l]를 RNA 용액에 가하고 PCR에서 30 °C에서 10 분, 55 °C에서 30 분 그리고 99 °C에서 5분간 4 °C에서 5분간작용시켜 first strand synthesis를 마친다. PCR buffer 30 μ l에 [MgCl₂ 3 μ l, 10xRNA PCR buffer 3 μ l (Takara RNA PCR kit), primer 2.0 μ l(0.2 mM), Taq 1 unit, dH₂O 21.5 μ l] 위에서 합성된 cDNA 20 μ l 와 섞은 후 PCR에서 95 °C 5분간 가열 후 94 °C 1분, 52 °C 1분 , 72 °C 1분 으로 30 cycles 로 증폭시킨 후 72 °C 10분간 더 반응시켰다.

2. 혈관세포 보호효과

가. 급성 효과 (*in vitro* 실험)

1) 시약 및 재료

울피 Ext.는 제조하여 사용하였다. 건조한 울피 (충남 공주산)은 경동한약재 시장에서 구입하였고, 감정한후 사용하였다. 울피 2 kg을 70% 수성 아세톤 용액 15 L로 실온에서 냉침, 추출하고 감압농축하여 수성아세톤 엑스 110 g을 얻었다. 울피 Ext.는 소량 DMSO에 용해시킨 후 희석하여 사용하였다.

Tannic acid, gallic acid (3,4,5-Trihydroxybenzoic acid), ellagic acid (4,4',5,5',6,6',- Hexa hydroxydiphenic acid 2,6,2',6'-dilactone)는 Sigma社 제품을 사용하였다. 그외 Ach (acetylcholine · Cl : MW 181.7), NE (norepinephrin · HCl : MW 205.6), SNP (Sodium Nitroprusside : MW 297.95), KCl (Potassium chloride : MW 74.56), L-NAME (N-Nitro-L-Arginine Methylester · HCl : MW 269.7), Indomethacin (MW 357.79) 등을 구입하여 시약으로 조제하였다. Indomethacin의 조제(MW 357.79)는 alcohol (95% ethanol) 과 증류수를 1:1로 섞어서 가온 용해시켰다.

Krebs-Henseleit 용액은 Nacl (MW 58.44) 118 mM, NaHCO₃ (MW 84.01) 27.2 mM, KCl (MW 74.56) 4.8 mM, KH₂PO₄ (MW 136.06) 1.0 mM, MgSO₄ 7H₂O (MW 246.67) 1.2 mM, CaCl₂ 2H₂O (MW 58.44) 1.75 mM, glucose (MW 180.16) 11.1 mM을 pH 7.4로 맞추어 매일 조제하여 사용하였다.

2) 적출혈관 반응 실험

Sprague-Dawley계 숫컷 흰쥐를 ether로 마취시킨후 흉곽대동맥을 적출해서 5 mm정도 길이의 ring form으로 절단하고, 지방을 제거해서 organ bath내에 현수하였다. Bath 내는 항온순환기로 37℃를 유지하고, CO₂ 5%와 O₂ 95%의 gas를 포화시키고, Krebs-Henseleit 용액을 20 ml를 채웠다. 혈관의 한쪽은 bath에 고정하고 다른 쪽은 transducer에 연결하여 수축 이완반응을 physiograph 상에 그래프로 나타내었다. 40분간 안정화 시킨 후, KCl 70 mM로 수축을 유발시키고 다시 40분간 안정화시킨 다음 약물반응을 측정하였다.

즉, norepinephrine 10⁻⁷ M로 약 1g 정도 수축을 초래한 후, acetylcholine을 용량 의존적으로 가하여 이완반응을 초래하였다. 이것은 내피세포의 존재를 의미한다. Tannic acid 등 시료를 처치시 용량 의존적인 이완반응을 검토했다. 이어서 indomethacin 및 L-NAME을 전처치시 tannic acid 등 시료의 이완반응에 대한 영향을 검토했다. 또한, rubbing에 의해 내피세포 제거후 tannic acid 등 시료를 용량 의존적으로 가하여 혈관반응을 측정하고, 역시 indomethacin을 전처치하여 억제효과 여부를 검토했다.

한편, 내피세포 존재 및 제거시 acetylcholine에 의한 내피세포 의존성 이완반응 및 norepinephrine에 의한 혈관수축반응에 대한 tannic acid 등 시료를 10⁻⁵ M 전처치시 영향을 검토했다.

나. 만성 효과 (*in vivo* 실험)

1) 당뇨병 흰쥐에 있어 혈관보호효과

가) 시약 및 재료

Thiobarbituric acid (MW: 144.15), 1,1,3,3-tetramethoxypropane (MW: 164.2 C₇H₁₆O₄), norepinephrine · HCl (MW: 205.6), acetylcholine · Cl (MW: 181.7), NAME (L-Nitro arginine methyl ester)은 Sigma Co., U.S.A.에서 구입하여 사용하였다.

NaCl (MW: 58.44), Magnesium Sulfate (MW: 246.48, MgSO₄ · 7H₂O), Calcium chloride (MW: 110.99, CaCl₂), Potassium chloride (MW: 74.56 KCl) 등은 Shinyo Co., Japan에서 구입하였다.

그외 tannic acid (MW: 1700, C₇₆H₅₂O₄₆, Italy), 울피 Ext., 솔잎 Ext., sodium nitroprusside (MW: 297.95, Na₂[Fe(CN)₅NO]2H₂O, Hayashi, Japan)을 사용하였고, Na₂HPO₄ · 12H₂O (MW: 358.14), KH₂PO₄ (MW: 136.09), TCA (trichloroacetic acid, MW: 163.39), Glucose (MW: 180.16, C₆H₁₂O₆), NaHCO₃ (MW: 84.01)는 국내 덕산약품사 제품을 사용하였다.

울피 Ext.는 제조하여 사용하였다. 울피는 밤(학명: *Castanea crenata*)의 외피를 제거하였을 때 남게 되는 육질을 에워싼 갈색의 내피를 일컫는 것으로, 건조한 울피(충남공주산)는 경동한약재 시장에서 구입하였고, 감정한 후 사용하였다. 울피 2 kg을 70% 수성 아세톤 용액 15 L로 실온에서 냉침, 추출하고 감압 농축하여 수성아세톤 엑스 110 g을 얻었다.

솔잎 Ext.는 동국대학교 일산 농장에서 채집한 솔잎(학명: *Pinus densiflora*)을 사용하여 제조하였다. 솔잎 1 kg을 음건한 후 70% 수성 아세톤 용액 8 L로 실온에서 냉침, 추출하고 감압 농축하여 수성아세톤 엑스 35 g을 얻었다.

울피 Ext., 솔잎 Ext., tannic acid는 1일 현주의 체중 kg당 250 mg씩 섭취하도록 식수소비량과 연결 계산하여 매일 조제하여 경구 투여하였다. 특히, 당뇨병 유발

군의 경우 당뇨로 인해 식수섭취량이 증가함을 감안, 각군이 율피 Ext., 솔잎 Ext., tannic acid를 250 mg/kg/day 섭취토록 조제하여 경구 투여하였다.

Krebs-Henseleit 용액은 NaCl (MW: 58.44) 118 mM, NaHCO₃ (MW: 84.01) 27.2 mM, KCl (MW: 74.56) 4.8 mM, KH₂PO₄ (MW: 136.06) 1.0 mM, MgSO₄·7H₂O (MW: 246.67) 1.2 mM, CaCl₂·2H₂O (MW: 58.44) 1.75 mM, glucose (MW: 180.16) 11.1 mM을 pH 7.4로 맞추어 매일 용시 조제하여 사용하였다.

나) 실험동물 및 약물투여군

실험동물로는 체중 300±20 g의 수컷 Sprague-Dawley계 흰쥐를 사용하였으며, 사료와 식수를 자유롭게 섭취토록 하였다. 흰쥐를 5군으로 나누었다. 즉 1군은 Normal군으로서 당뇨를 유발시키지 않았고, 2군은 streptozotocin (60 mg/kg,i.p.) 1회투여로 당뇨를 유발시킨 대조군이고, 약물처치한 3군에는 tannic acid를 4군에는 栗殼 Ext.를 5군에는 솔잎 Ext.를 경구로 5주간 투여하였다. 모든 실험동물의 체중, 식수 섭취량은 주 1회 측정하였다. 각 군별로 사료와 식수를 자유롭게 섭취토록하였다.

Table I. Classification of experimental groups

groups	Treatment		
	-	+	-
1 Normal			
2 Control	Streptozotosin + (60 mg/kg,i.p.)		-
3 Tannic acid	Streptozotosin + (60 mg/kg,i.p.)	Tannic acid (250 mg/kg/day, p.o.)	
4 Chestnut bark Ext.	Streptozotosin + (60 mg/kg,i.p.)	Chestnut bark Ext. (250 mg/kg/day, p.o.)	
5 Pine needle Ext.	Streptozotosin + (60 mg/kg,i.p.)	Pine needle Ext. (250 mg/kg/day, p.o.)	

다) 체중 및 식수섭취량 변화 측정

흰쥐의 체중변화 및 식수섭취량은 약물투여 직전 및 매주 1회씩 측정하였다.

라) 혈장 중 혈당 및 지질성분 변화 측정

흰쥐의 복부대정맥에서 채혈하여 5,000 rpm으로 10분간 원심 분리한 후 상등액을 취하였다. 혈당측정은 영동시약 kit를 사용하였다. 즉, 혈장 0.02 ml에 발색시약 3 ml를 가하였다. 또한, PGO효소를 희석 완충액 100 ml로 희석한 표준액 0.02 ml에 발색시약 3 ml를 가하였다. 검액과 표준액을 37°C 수조에서 5분간 incubation 시켰고, 발색시약을 blank로 하여 505 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이들은 모두 표준액의 농도와 흡광도치의 상관관계에서 구한 식으로 부터 그 농도를 계산하였다. 또한, 혈장 중의 triglyceride 및 총cholesterol의 농도측정도 영동제약의 kit를 구입하여 사용하였다. 즉, 혈장 중 triglyceride 농도는 Trinder 방법에 따라 혈청 10 μ l당 시약 1.5 ml를 가한 후, 37°C 수조에서 10분간 반응시킨 후, 흡광도를 500 nm에서 측정하였다. 총cholesterol 농도는 효소법에 의거, 혈청 10 μ l를 효소용액 1.5 ml에 용해하여 37°C 수조에서 15분간 반응시킨 후, 500 nm에서 1시간이내에 흡광도를 측정하였다. 이들은 모두 표준액의 농도와 흡광도치의 상관관계에서 구한 식으로 부터 그 농도를 계산하였다.

마) 혈장 중 항산화 효과 측정

Buege 등의 방법으로 과산화된 지질이 thiobarbituric acid (TBA)와 반응하여 생성된 malondialdehyde 양을 측정하였으며, 시료는 혈장을 사용하였다. TBA 시약

은 TCA 15 g, TBA 0.375 g과 1N-HCl 25 ml를 섞어 100 ml로 당일 만들어 사용하였다. Malondialdehyde 생성실험의 표준용액은 5.11 nmol 1,1,3,3-tetramethoxy-propane을 메탄올로 25ml 되도록 녹인 원액의 0.1 μ l를 100 ml되게 증류수로 녹여 사용하였다. 혈장의 경우 원심분리 후, 얻은 상등액중 500 μ l를 취하여 2배의 TBA 시약을 넣고 진탕하였다. 수욕조에서 15분간 끓이고 냉각시킨 후 3000 rpm에서 15분간 원심분리하여 얻은 상등액을 535 nm에서 흡광도를 측정하였다.

바) 혈압반응 변화 측정

흰쥐를 urethane (900 mg/kg, i.p.)과 ketamine (100 mg/kg, i.p.)으로 마취시킨 후, 총경동맥 중 우측 경동맥을 신경과 조심스럽게 분리하여 노출시켰다. 상부를 실로 결찰하여 뇌로 가는 혈류를 차단하고, heparin (100 U/ml)-saline 용액을 채운 polyethylene cannula (PE 50)를 삽입 결찰하였다. Physiograph의 transducer와 연결시켜 놓고, 대퇴정맥으로 saline을 채운 needle을 삽입하여 약 30분간 안정시켰다.

약물로 norepinephrine 1 μ g/kg, acetylcholine 1 μ g/kg, sodium nitroprusside 3 μ g/kg, NAME (L-nitro arginine methyl ester) 10 mg/kg을 각각 bolus 로 i.v.투여하여 최대 수축기 및 이완기 혈압과 심박수의 변화를 측정 하였다.

사) 적출혈관의 수축 및 이완 반응 측정

흰쥐의 복부를 절개하고 복부대정맥으로부터 채혈 후, 흉곽 대동맥을 적출하여 Krebs-Henseleit액 (37°C, 95% O₂ + 5% CO₂)에 현수시켰다. 현수된 흉곽대동맥

을 길이 약 5 mm의 ring form으로 절단하고 분절의 주위 조직들을 제거하여 organ bath내에 현수시켰다. Grass FTO3C force transducer에 연결하여 등장성 수축반응을 Gould amplifier가 부착된 physiograph를 통해 측정하였다. 2.0 g의 basal tension을 주면서 약 40분간 안정화시킨 후, 약물에 의한 혈관의 수축-이완 반응을 측정하였다. 즉, 약물의 수축반응을 측정하기 위하여 norepinephrine을 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} M 사용하였다. 최대 수축 후 L-NAME 10^{-5} M을 가하여 이완반응을 유도하였으며, norepinephrine에 의한 수축반응을 100%로 하여 이완반응을 %로 나타내었다.

나. 동맥경화증 흰쥐에 있어 혈관보호효과

1) 시약 및 재료

Ergocarciferol (vitamin D₂, MW:396.7, C₂₈H₄₄O), thiobarbituric acid(MW; 144.15), 1,1,3,3-tetramethoxypropane(MW: 164.2 C₇H₁₆O₄), norepinephrine · HCl(MW:205.6), acetylcholine · Cl(MW: 181.7), isoproterenol · HCl(MW: 247.7) 는 Sigma Co, U.S.A.에서 구입하여 사용하였다. Cholesterol(MW: 325.4, C₂₇H₄₆O), L-ascorbic acid (vitamin C, MW: 176.13, C₆H₈O₆), olive oil, NaCl(MW; 58.44), TCA(trichloroacetic acid, MW; 163.39), Magnesium Sulfate(MW: 246.48, MgSO₄ · 7H₂O), Calcium chloride(MW: 110.99, CaCl₂), Potassium chloride(MW: 74.56 KCl) 등은 Shinyo Co., Japan에서 구입하였고, K₂HPO₄(MW; 174.18), NaH₂PO₄ · 2H₂O(MW; 156.01), Na₂CO₃(MW; 105.99), NaOH(MW; 40.0)는 일본의 Junsei사에서 구입하였다. 그의 tannic acid (MW : C₇₆H₅₂O₄₆, Italy), cholic acid (MW: 408.58, C₂₄H₄₀O₅, Fluka, Japan), sodium

nitroprusside(MW: 297.95, $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]2\text{H}_2\text{O}$, Hayashi, Japan)을 사용하였고, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (MW; 358.14), KH_2PO_4 (MW; 136.09), TCA (trichloroacetic acid, MW; 163.39), Glucose(MW: 180.16, $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$), NaHCO_3 (MW: 84.01)는 국내 덕산약품사 제품을 사용하였다.

투여할 vitamin D₂ (ergocarciferol)의 조제와 고cholesterol 사료 (HCD)의 조제는 다음과 같다. Vitamin. D₂는 흰쥐에게 3×10^5 IU/kg를 2.0mL의 olive oil에 녹여 사용하였다. 고cholesterol 사료는 사료중에 1.5% cholesterol과 0.5% cholic acid를 섞어 투여하였다. Tannic acid는 사료 섭취량의 2% 정도가 가장 유효하므로⁽⁴⁰⁾, 이를 체중당 식수소비량과 연결 계산하여 식수 1ml 당 4mg 함유되도록 매일 조제하여 투여하였다. 이는 1일 흰쥐의 체중 kg당 약 500mg 경구투여시킨 결과이다. Vitamin C는 식수 1ml당 0.5 mg이 함유되도록 조제하여 투여하였다. 이는 1일 흰쥐의 체중 kg당 60mg을 경구투여시킨 결과가 된다. Krebs-Henseleit 용액은 NaCl (MW: 58.44) 118mM, NaHCO_3 (MW: 84.01) 27.2mM, KCl (MW: 74.56) 4.8mM, KH_2PO_4 (MW: 136.06) 1.0mM, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (MW: 246.67) 1.2mM, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (MW: 58.44) 1.75mM, glucose (MW: 180.16) 11.1mM을 pH 7.4 로 맞추어 매일 용시 조제하여 사용하였다.

2) 실험동물 및 약물투여군

7주령된 체중 $260 \pm 20\text{g}$ 의 숫컷 Sprague-Dawley 계 흰쥐를 사용하였으며, 사료와 식수를 자유롭게 섭취토록 하였다.

흰쥐를 6군으로 나누었다. 즉 1, 5, 6군은 Normal군으로서 보통사료를, 2, 3, 4군은 고cholesterol 사료 투여군이였다. 약물처치는 3군과 5군에는 식수에 tannic acid를, 4군과 6군에는 식수에 tannic acid와 vitamin C를 섞어서 투여하였다. 모

든 실험동물의 체중, 사료섭취량, 식수섭취량은 주 1회 측정하였다.

고cholesterol 사료군의 경우 동맥경화를 유발시키기 위하여 처음 연속하여 4일간 흰쥐 체중 kg당 vitamin D₂ 3×10⁵ IU/2ml olive oil을 경구투여하였으며, 경구투여하기 전후의 체중변화와 사료섭취량의 변화를 측정하였다. 4일 이후부터 각군 별로 정상사료 식이와 고cholesterol 사료 식이의 7주간의 투여를 시작하였다.

Table II. Classification of experimental groups

group	사료	식수
G1	Normal	Normal
G2	HCD (1.5%)	Normal
G3	HCD (1.5%)	Tannic acid (4mg/ml)
G4	HCD (1.5%)	Tannic acid + Vitamin C (4mg/ml) (0.5mg/ml)
G5	Normal	Tannic acid (4mg/ml)
G6	Normal	Tannic acid + Vitamin C (4mg/ml) (0.5mg/ml)

3) 체중변화 및 간무게 측정.

Vitamin D₂를 처음 연속하여 4일간 경구투여한군 (HCD군)은 투여 전후의 몸무게를 처음 매일 1주일간 기록하였다. 모든 동물의 체중은 매주 1회 측정하였다. 약물투여한 후 7주 후 복부 절개하여 적출한 간장을 여과지에 blotting하여 혈액을 제거, 간 무게를 측정 후 지질과 항산화효과의 측정을 위해 -40℃에 보관하였다.

4) 혈장 중 지질성분 변화 측정

혈청 중의 triglyceride, 총 cholesterol, HDL-cholesterol의 측정은 영동제약에서 kit를 구입하여 사용하였다. 단백질 정량은 영동제약에서 Buret kit를 구입하여 사용하였다. 즉, 혈청중 triglyceride 농도는 Trinder 방법에 따라 혈청 10 μ l당 시약 1.5ml를 가한 후, 37 $^{\circ}$ C 수조에서 10분간 반응시킨 후, 흡광도를 500nm에서 측정하였다. 총 cholesterol 농도는 효소법에 의거, 혈청 10 μ l를 효소용액 1.5ml에 용해하여 37 $^{\circ}$ C 수조에서 15분간 반응시킨 후, 500nm에서 1시간이내에 흡광도를 측정하였다. HDL은 혈청 0.5ml에 침전시약 50 μ l를 섞어 실온에서 5분간 방치 후 10분간 원심분리한다. 상등액을 20 μ l를 효소용액 3ml에 혼합후 37 $^{\circ}$ C 수조에서 15분간 반응 시킨 후 1시간 이내에 500nm에서 흡광도를 측정하였다. 이들은 모두 표준액의 농도와 흡광도치의 상관관계에서 구한 식으로 부터 그 농도를 계산하였다. 다만 LDL의 경우는 다음의 공식에 의거하여 산출하였다.

$$\text{LDL (mg/100ml serum)} = \text{총 cholesterol} - \text{HDL} - \text{TG}/5$$

5) 혈관 반응 측정

Ether로 흡입 마취시킨 흰쥐의 복부를 절개하고 복부대정맥으로부터 채혈 후, 흉곽 대동맥을 적출하여 Krebs-Henseleit액 (37 $^{\circ}$ C, 95% O₂ + 5% CO₂)에 현수시켰다. 채취한 혈액은 공기중에 5분간 방치한 후 3000rpm에서 10분간 원심분리, 상등액을 취해 지질과 항산화도의 측정을 위하여 -40 $^{\circ}$ C에서 보관하였다.

현수된 흉곽대동맥을 길이 약 5mm의 ring form으로 절단하고 분절의 주위 조직들을 제거하여 organ bath내에 현수시킨다. Grass FTO3C force transducer에 연결하여 등장성 수축반응을 Gould amplifier가 부착된 physiograph를 통해 측정하였다.

2.0g의 basal tension을 주면서 약 40분간 안정화시킨 후, 약물에 의한 혈관의 수축-이완반응을 측정하였다. 즉, 약물의 수축반응을 측정하위하여 norepinephrine 10^{-7} M, KCl 70mM을 사용하였다. 또한 이완반응은 acetylcholine, isoproterenol, sodium nitroprusside를 농도별로 누적법으로 가하여 이완반응을 유도하였으며, norepinephrine에 대한 의한 수축반응을 100%로 하여 이완반응을 %로 나타내었다.

KCl 70mM과 norepinephrine 10^{-7} M을 각군에 동일하게 가하여 수축반응을 비교 관찰하였다. Norepinephrine 10^{-7} M을 전처치하여 수축반응을 초래한 후, acetylcholine 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} M을 누적적으로 가하여 각군의 혈관반응을 비교 관찰하였으며, 동일한 방법으로 isoproterenol 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} M과 sodium nitroprusside 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} M을 누적적으로 가하여 혈관반응을 비교 관찰하였다.

6) 혈압반응 측정

흰쥐를 urethane (900mg/kg, i.p.)과 α -chloralase로 마취시킨 후, 총경동맥 중 우측 경동맥을 신경과 조심스럽게 분리하여 노출시켰다. 상부를 실로 결찰하여 뇌로 가는 혈류를 차단하고, heparin (100U/ml)-saline용액을 채운 polyethylene cannula (PE 50)를 삽입 결찰하였다. Physiograph의 transducer와 연결시켜 놓고 대퇴정맥으로 saline을 채운 needle을 삽입하여 약 30분 간 안정시킨다. Norepinephrine 1 μ g/kg, aetylcholine 1 μ g/kg, isoproterenol 1 μ g/kg, sodium nitroprusside 3 μ g/kg을 각각 bolus 로 i.v.투여하여 최대 수축기 및 이완기 혈압과 심박수의 변화를 측정 하였다. 또한 physiograph의 amplifier를 통하여 수축기 및 확장기 혈압으로부터 평균혈압 [확장기 혈압 + (수축기 혈압 - 확장기 혈압

) / 3]을 구하였다.

7) 항산화 효과 측정

Buege등의 방법으로 과산화된 지질이 thiobarbituric acid (TBA)와 반응하여 생성된 malondialdehyde 양을 측정하였으며, 시료는 혈장을 사용하였다.

TBA 시약은 TCA 15g, TBA 0.375g과 1N-HCl 25ml를 섞어 100ml로 당일 만들어 사용하였다. Malondialdehyde 생성실험의 표준용액은 5.11nmol 1,1,3,3-tetramethoxypropane을 methanol로 25ml 되도록 녹인 원액의 0.1 μ l를 100ml되게 증류수로 녹여 사용하였다. 혈장의 경우 원심분리 후, 얻은 상등액중 500 μ l를 취하여 2배의 TBA 시약을 넣고 진탕하였다. Water bath에서 15분간 끓이고 냉각시킨 후 3000rpm에서 15분간 원심분리하여 얻은 상등액을 535nm에서 흡광도를 측정하였다.

3. Cd⁺⁺ 독성 해독효과

가. 솔잎, 감피, 울피 추출물의 해독효과

1) 시약 및 실험재료

건조한 울피 (충남 공주산)는 경동 한약재시장에서 구입하였고, 감정한 후 사용하였다. 울피 2kg을 70% 수성 아세톤 용액 15 ℓ 로 실온에서 냉침, 추출하고 감압 농축하여 수성아세톤 엑스 110g을 얻었다. 솔잎은 동국대학교 일산 농장에서 채집하여 사용하였고, 1kg을 음건한 후 70% 수성 아세톤으로 8 ℓ 로 실온에서 냉침,

추출하고 감압농축하여 수성아세톤 엑스 35g을 얻었다. 감은 강원도 강릉일대에
서 7월에 채취한 뽕은 감을 사용하였으며, 2kg을 증절한 후 80% 수성아세톤 용
액 15ℓ로 실온에서 냉침, 추출하고 감압농축하여 수성아세톤 엑스 150g을 얻어
시험에 사용하였다.

2) 실험동물 및 약물투여군

실험동물은 한림실험동물에서 공급받은 ICR계 마우스를 사용하였으며, 실험실
사육조건은 명암교대 12시간, 환기회수 12 - 15회/시간, 온도 $22\pm 3^{\circ}\text{C}$, 상대습도
 $55\pm 5\%$ 가 유지되는 조건에서 실험을 시행하였다. 실험기간중 실험동물용 고품사
료 ((주)삼양사)는 자유로이 급식토록 하였으며, 음수는 증류수에 탄닌산을 용해
하여 음용토록 하였고, 대조군 및 양성대조군은 수돗물을 음용토록 하였다. 실험
시작시에 8주령 동물을 공급받아 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다.
사료중의 미량금속 함량은 다음과 같다.

Table III. Trace metal contents of diet ingested by experimental mice during
experiment.

(unit : mg/kg)

Metal	Cd	Pb	Se	As	Cu	Mn	Fe	Zn
Content	0.002	0.039	0.150	0.175	8.0	18.7	60	80

카드뮴은 CdCl_2 로서 50mg/kg/day을 투여하였으며, 카드뮴 투여 1주일 전부터
솔잎추출물 (PND) , 감추출물(PSM), 밤겉질추출물(CIS)을 1.0mg/ml가 되도록

증류수에 용해하여 자유롭게 음용토록 하였다. 카드뮴은 3주간 경구투여 하였으며, 투여직전에 조제하여 사용하였다.

3) 혈액학적 분석

마우스를 안락사한 직후 심장채혈하여 혈액을 채취하였고, 채취한 혈액은 EDTA-Na가 첨가된 vial에 넣어 응고되지 않도록 충분히 혼합하였다. 혈액 샘플은 취취 후 24시간 내에 실험실에서 분석하였다.

4) 장기조직 중의 카드뮴 함량 분석

간장, 신장, 고환 및 비장에 대한 전처리는 Goering 등의 방법에 따라 각 장기 조직 50mg/ml HCl을 넣어 24시간 소화시킨 후 3,000g 10분간 원심분리하여 상층액을 취하였다. 이 상층액을 Inductivity Coupled Plasma 로 카드뮴 함량을 측정하였다. 이때 분석조건은 가스유속 0.3 l/min, 시료주입 속도 1ml/min, Rf power 65V로 하였다.

제 3 절 결과 및 고찰

1. 면역증강 효과

가. 임파구 증식능 측정

Fig. 1 에서와 같이 cell viability의 결과 율피 추출물인 CIS gel는 10 ug/ml 처리시 24 시간 후 약 20%의 splenocytes의 증가를 나타내었으나, 5 ug/ml의 농도에서는 변화가 없었다. 반면에 100 ug/ml의 농도에서는 오히려 24시간 후 억제되는 결과를 나타내었다.

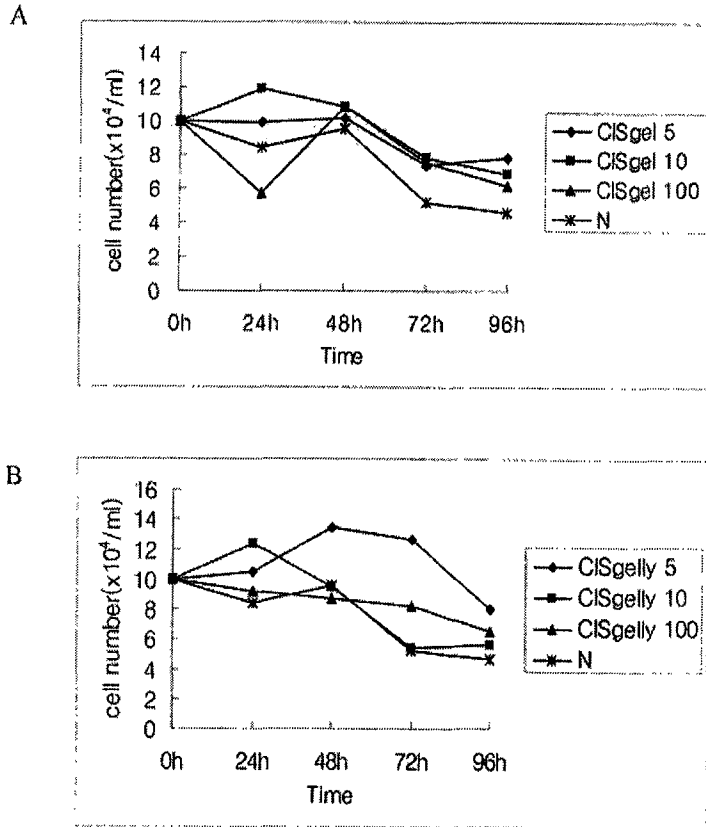


Fig. 1 Cell viability of CIS gel(A) and CIS gelly(B)

한편, CIS jelly의 경우 10 ug/ml 농도에서는 24 시간 후 5 ug/ml의 농도에서는 48시간 후 일부 splenocytes의 증가를 볼 수 있었으나, 오히려 100 ug/ml의 농도에서는 변화를 초래하지 않았다. 이러한 결과는 울피 추출물이 일부 농도에서만 비장세포의 증식능을 나타내었을 뿐 용량의존성을 초래하지 못하였으므로, 면역 증강 효과가 전반적으로는 뚜렷하지 못하였다.

한편, splenocytes proliferation에 필요한 thymidine incorporation을 CIS jelly의 0.32, 0.65, 1.3, 2.5, 5, 10 ug/ml의 다양한 농도로 처리하여 측정 한 결과, 10

ug/ml 농도에서 2.8배의 증식 효과를 나타내었지만, 용량의존적인 변화를 초래하지는 못하였다. (Fig. 2) 이러한 결과는 앞서의 spleenocyte 증식능 실험결과와 일치되는 결과이다. 즉, 울피 추출물은 그 자체로서 직접적인 면역증강 효과가 뚜렷하지 못하였다.

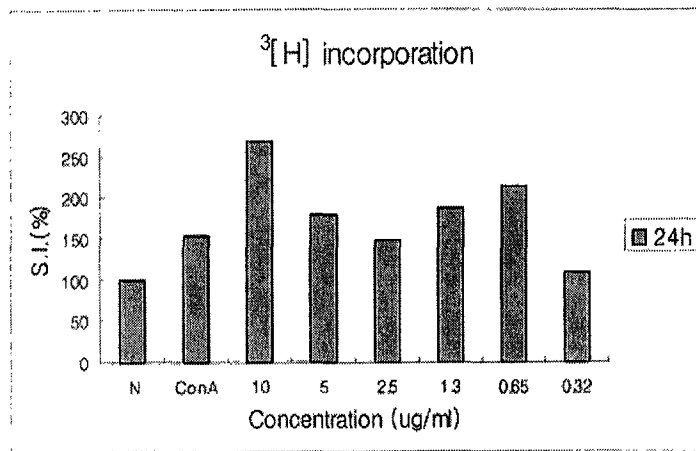


Fig. 2 Proliferation of splenocytes by culturing with CIS gelly.

Spleen cells(1.5×10^6 cell/wll) were cultured with a various concentration of CIS gelly. One day later, the growth of lymphocytes was determined bt the incorporation of $3[H]$ -Tdr after 4hr pulsing with 2uci of $3[H]$ -Tdr

나. Reverse Transcriptase-PCR에 의한 cytokines의 발현

CIS jelly에 의한 cytokines의 발현 변화를 RT-PCR로 검색해 본 결과, interferon gamma와 TNF-alpha가 3시간과 6시간에서 일부 증가함을 나타내었다

(Fig. 3). 그러나, IL-4, IL-10, IL-12, beta actin 등에 대해서는 뚜렷한 변화를 나타내지 못하였다. 이러한 cytokines의 증가는 면역작용을 일으키는 lymphocytes와 macrophage의 activation을 초래할 수 있음을 제시하는 것이나, 전반적으로 율피 추출물인 CIS gel 및 CIS jelly 에 있어 뚜렷한 면역 증가 효과를 초래하지 못하였다.

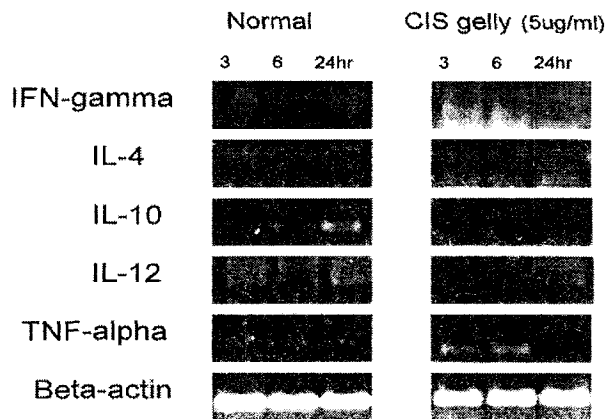


Fig 3. Cytokine mRNA expression in cultured spleen lymphocytes

2. 혈관보호 효과

가. 적출혈관에 대한 영향 (in vitro실험)

1) 율피 Ext.의 혈관반응

흰쥐의 흉곽대동맥을 적출해서 Endothelium이 손상되지 않도록 organ bath에 현수하고서 Endothelium 존재시(E+), norepinephrine 10^{-7} M로 수축을 시킨 후 율피 Ext.를 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} g/ml 누적적으로 가하였을 때(후처리)

acetylcholine의 이완반응과 유사하게 용량의존적 이완반응을 보였는데 처음에는 서서히 이완하다가 10^{-4} g/ml에서 급격하게 이완반응을 초래하였다. (Fig. 4) 율피 Ext. 10^{-5} g/ml을 전처치하고, norepinephrine 10^{-7} M로 수축을 시킨 뒤 acetylcholine을 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} M 누적으로 가하여 그 이완반응을 보았을 때 전처치가 없을때의 acetylcholine의 normal 이완반응과 유사하게 이완반응이 보이며 이완경향이 다소 증진되었다. (Fig. 4)

율피 Ext. 10^{-5} g/ml을 전처치하고, norepinephrine 10^{-9} , 10^{-8} , 3×10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} M을 누적으로 가하여 용량변화에 따른 norepinephrine의 수축반응을 보았을 때 전처치없는 normal군과 수축반응이 유사하였다.

Indomethacin과 NAME을 각각 10^{-5} M 전처치하고, norepinephrine 10^{-7} M로 수축을 시킨 뒤 율피 Ext. 10^{-5} , 10^{-4} g/ml을 차례로 가했을 때, control과 비교해서 prostaglandin 저해제인 indomethacin은 율피 Ext.의 이완반응에 별 영향을 끼치지 않았으나, EDRF 저해제인 NAME을 전처치했을때는 율피 Ext.의 이완반응이 다소 억제되었다. (Fig. 4)

Endothelium 제거시(E-), norepinephrine 10^{-7} M로 수축을 시킨후 율피 Ext.를 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} g/ml 누적으로 가하였을 때는(후처치) 용량의존적인 이완반응을 볼수 없었다.(Fig. 5) 율피 Ext. 10^{-5} g/ml을 전처치하고, norepinephrine 10^{-7} M로 수축을 시킨 뒤 acetylcholine을 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} M 누적으로 가하여 그 이완반응을 보았을 때 acetylcholine이 내피세포 의존성 이완물질이므로 이완반응을 볼수 없었다.(Fig. 5) 율피 Ext. 10^{-5} g/ml을 전처치하고, norepinephrine 10^{-9} , 10^{-8} , 3×10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} M을 누적으로 가하여 용량변화에 따른 norepinephrine의 수축반응을 보았을 때 normal군과 유사한 반응을 보였다.

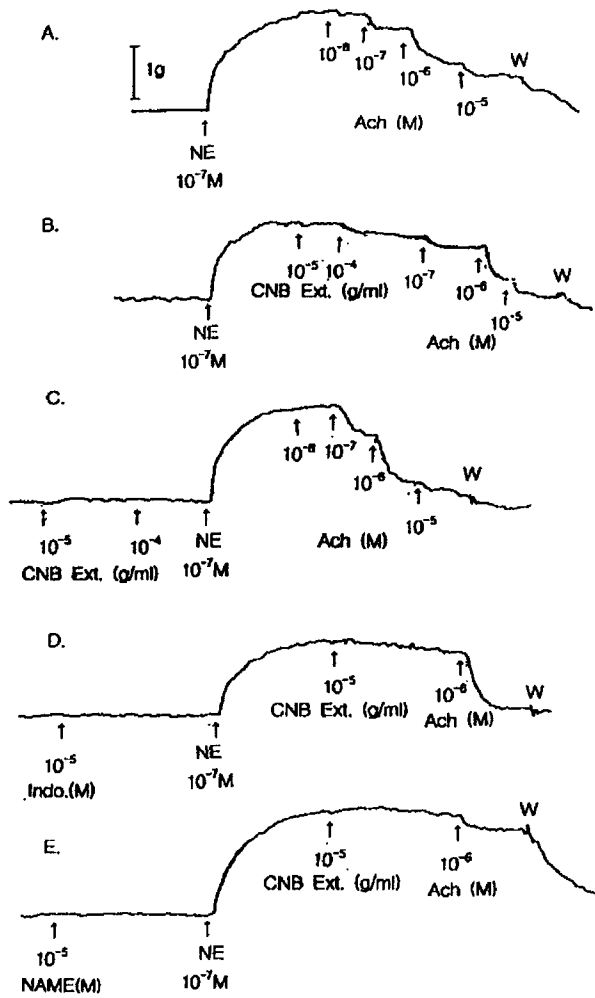


Fig. 4 Effect of chestnut bark extract on the contractile activity of the isolated rat thoracic aorta in the presence of intact endothelium. All thoracic aorta with intact endothelium were initially contracted with 10^{-7} M norepinephrine. NE, Ach, Indo and NAME indicate norepinephrine, acetylcholine, indomethacin, L-nitroarginine methylester, respectively. W denotes wash. Similar experiments were obtained from at least 6 different thoracic aorta preparations.

- A. Normal
- B. Chestnut bark Ext. posttreatment(control)
- C. Chestnut bark Ext. pretreatment(control)
- D. Indomethacin pretreatment
- E. NAME pretreatment

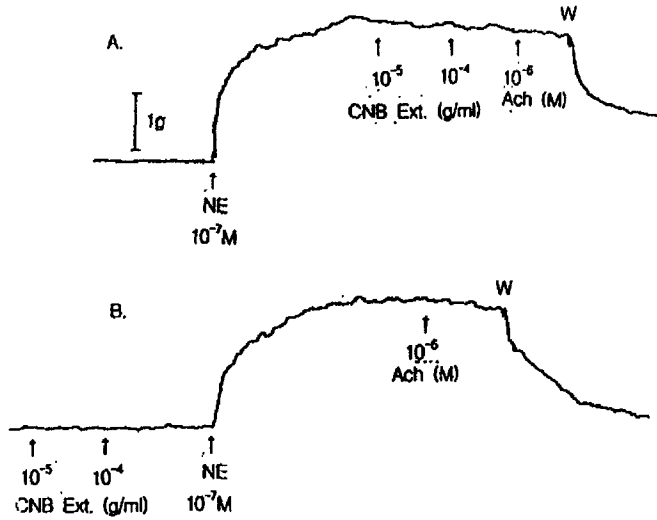


Fig. 5 Effects of chestnut bark extract on the contractile activity of the isolated rat thoracic aorta in the absence of intact endothelium. NE and Ach indicate norepinephrine, acetylcholine, respectively. W denotes wash. Similar experiments were obtained from at least 6 different thoracic aorta preparations.

A. Chestnut bark Ext. posttreatment B. Chestnut bark Ext. pretreatment

울피 Ext.는 내피세포 존재시 10^{-4} M에서 이완반응을 초래하였으나, 내피세포를 제거하면 울피 Ext. 10^{-4} M에서 혈관에 대한 직접적인 영향이 없었다. 그러나 acetylcholine처럼 급작스런 이완반응을 초래하는 것이 아니라, 서서히 그리고 지속적으로 이완반응을 초래하였으며, 또한 내피세포 존재시 울피 Ext.는 acetylcholine에 의한 내피세포 의존성 이완반응을 보다 증가시켰다.

이러한 결과는 울피 Ext.가 함유된 tannic acid의 성분에 의해 내피세포 의존성 이완반응을 초래하며, acetylcholine에 의한 내피세포 의존성 이완반응을 보다 증가시키는 것으로 고려된다.

나. 생체내 혈관에 대한 영향 (in vivo 실험)

1) 당뇨병에 의한 혈관손상에 대한 보호효과

(가) 체중 및 식수섭취량 변화

체중변화를 측정한 바, 5주후 정상 흰쥐는 43 ± 4 g의 체중 증가를 가져온 반면, streptozotocin으로 당뇨를 유발시킨 대조군의 경우 -74 ± 8 g의 체중 감소를 초래하였다 (Fig. 6). Tannic acid, 울피 Ext. 및 솔잎 Ext.를 5주간 투여시 각각 -54 ± 6 , -57 ± 7 , -68 ± 6 g의 체중감소를 초래하였으며, tannic acid 투여군이 가장 체중감소를 억제하는 경향을 나타내었으나, 대조군에 비해 통계적인 유의성은 없었다.

한편, 식수섭취량의 변화를 살펴본 바, 정상 흰쥐는 식수섭취량의 변화가 거의 없는 반면에, 당뇨가 유발된 대조군 흰쥐는 처음과 비교시 5주후 유의성 있게 증가되었다 (Fig. 7). Tannic acid 투여군의 경우는 식수 섭취량의 증가가 유의성 있게 억제되었으며, 울피 Ext. 투여군도 억제되는 경향을 나타내었는데, 이는 Tannic acid의 수렴성 맛 때문으로 식수섭취량이 감소된데 기인한다. 한편, 솔잎 Ext. 투여군의 경우에는 대조군과 유사하여 억제효과가 없었다.

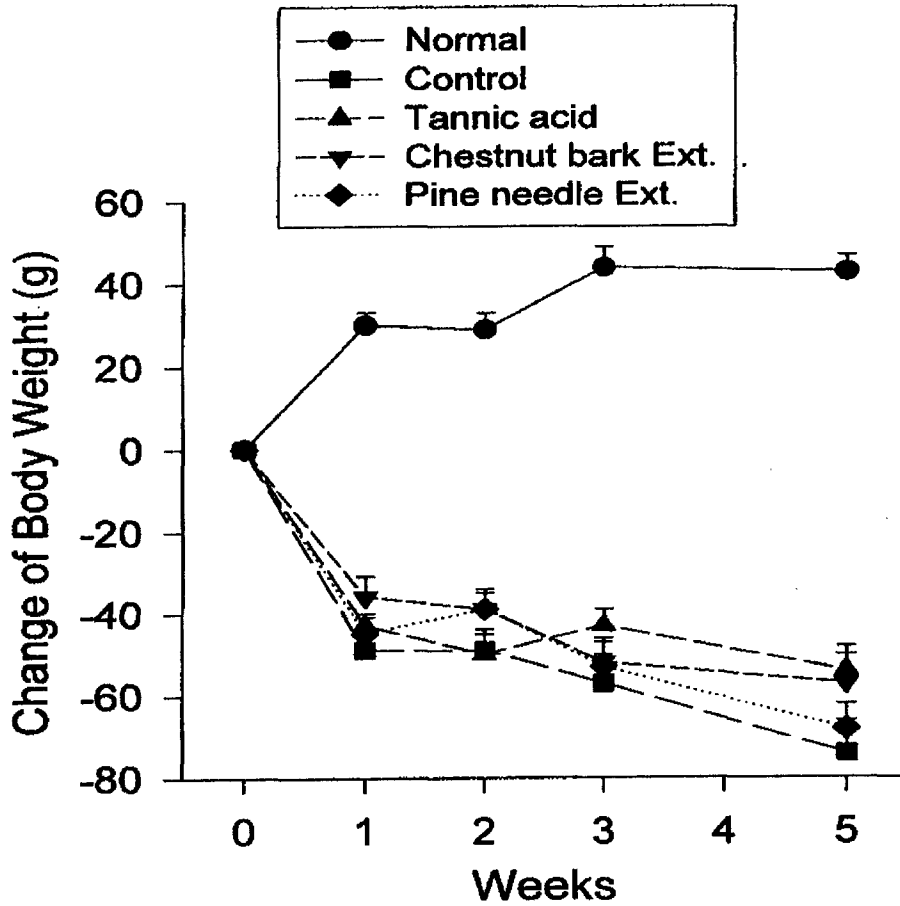


Fig. 6 Effects of tannic acid, chestnut bark Ext. and Pine needle Ext. Treatment for 5weeks on the change of body weight in diabetic rats induced by steptozotocin. Each data point represents mean \pm SEM(n=6)

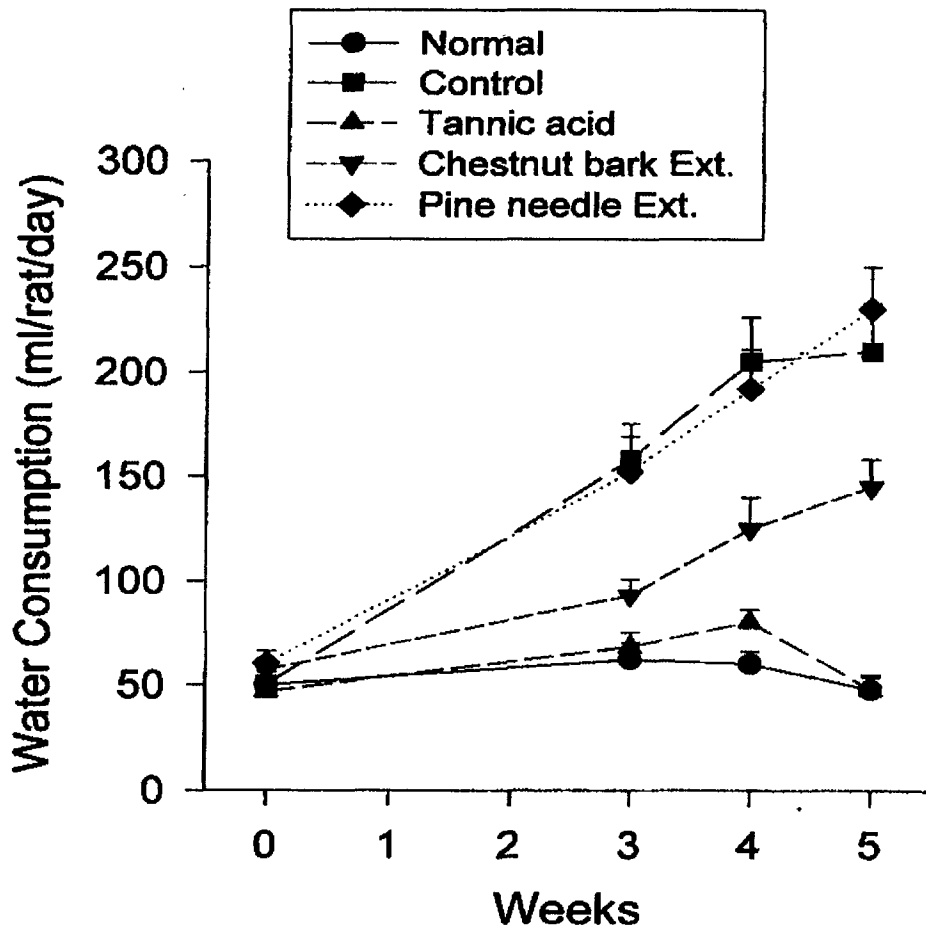


Fig. 7 Effects of tannic acid, chestnut bark Ext. and pine needle Ext. treatment for 5 weeks on the change of water consumption in diabetic rats induced by streptozotocin. Each data point represents mean \pm SEM (n=6)

(나) 혈장 중 혈당 및 지질성분 변화

당뇨가 유발된 흰쥐는 혈당치가 675 ± 77 mg/dl로 정상 흰쥐의 174 ± 19 mg/dl에 비해 유의성 있게 증가되었다 (Table IV). 반면에 tannic acid, 율피 Ext. 및 솔잎 Ext.를 5주간 투여한 각군의 경우는 525 ± 65 , 631 ± 155 , 486 ± 149 mg/dl로 대조군과 비교시 솔잎 Ext.가 가장 억제하는 경향을 나타내었으나, 유의성 있는 혈당치 억제효과는 없었다.

당뇨병 유발 5주후 대조군 흰쥐의 경우는 혈장 중 triglyceride 및 총cholesterol 농도가 각각 173 ± 20 , 197 ± 18 mg/dl 농도로서 정상 흰쥐의 경우 76 ± 28 , 57 ± 4 mg/dl 에 비해 유의성 있게 증가되어 고지혈증을 나타내었다.

반면에 tannic acid, 율피 Ext. 및 솔잎 Ext.를 5주간 투여한 각군의 경우 혈장 중 triglyceride 및 총cholesterol 농도가 각각 92 ± 15 및 82 ± 14 , 108 ± 29 및 72 ± 13 , 120 ± 41 및 81 ± 18 mg/dl 농도로서 약물 투여군의 경우 고지혈증의 억제효과는 없었다.

Table IV. Effect of tannic acid, chestnut bark Ext. and pine needle Ext. on the concentration of glucose, triglyceride and cholesterol of plasma in diabetic rats induced by streptozotocin.

Treatment	Glucose (mg/dl)	Triglyceride (mg/dl)	Cholesterol (mg/dl)
Normal	174.3 ± 19.0	76.0 ± 27.6	56.7 ± 4.4
Control	$674.8 \pm 76.5^{##}$	$173.3 \pm 20.0^{\#}$	$98.5 \pm 9.0^{##}$
Tannic acid	$524.6 \pm 65.1^*$	$91.6 \pm 14.7^*$	82.0 ± 14.0
Chestnut bark Ext.	630.7 ± 155.3	107.7 ± 28.6	72.0 ± 13.0
Pine needle Ext.	$486.0 \pm 149.1^*$	119.8 ± 40.9	80.8 ± 18.1

#: $p < 0.05$, ##: $P < 0.01$ Significantly different from normal.

*: $P < 0.05$ Significantly different from control.

Each values represent mean \pm SEM of six rats.

(다) 혈장 중 항산화 효과

혈장 중 MDA치를 측정할 때, 정상 흰쥐에 비해 당뇨가 유발된 흰쥐의 경우 MDA가 약간 증가하였으나, 유의성 있는 변화가 없었다 (Table V). Tannic acid, 울피 Ext. 및 솔잎 Ext.를 5주간 투여한 각 군의 경우도 지질과산화에 대한 영향을 혈장 중 MDA치 농도로 측정할 때, tannic acid 투여군의 경우 대조군에 비해 유의성 있게 억제하여 항산화작용을 나타내었다. 이는 tannic acid의 항산화 작용에 의해 혈중의 지질과산화가 억제된 것으로 여겨진다. 한편, 울피 Ext. 및 솔잎 Ext. 경우에는 유의성 있는 차이가 없었으며, 이것은 tannic acid의 함량이 보다 적었기 때문으로 고려된다.

Table V. Effect of tannic acid, chestnut bark Ext. and pine needle Ext. on the concentration of MDA of plasma in diabetic rats induced by streptozotocin.

Treatment	MDA (nmol/ml)
Normal	3.6±0.2
Control	3.8±0.5
Tannic acid	2.8±0.2*
Chestnut bark Ext.	4.3±0.5
Pine needle Ext.	3.6±0.4

* : P<0.05 Significantly different from control. Each values represent mean±SEM of six rats.

(라) 혈압반응 변화

혈압 및 심박수 변화; 당뇨병이 유발된 대조군의 혈압반응을 측정할 때, 당뇨 유발 흰쥐의 경우는 110/148 mmHg로 정상 흰쥐의 125/152 mmHg에 비해 유의

성 있는 변화가 없었다.

이에 tannic acid, 울피 Ext. 및 솔잎 Ext.를 5주간 투여한 각군의 경우도 103/139, 107/140, 88/125 mmHg로 혈압에 대한 영향이 없었다. (Fig. 8) 한편, 당뇨병 유발시 및 약물 처치시 심박수는 정상군에 비해 유의성 있는 차이가 없었다.

NE, L-NAME에 의한 승압반응; Ketamine과 urethane 마취하 정상군 또는 당뇨병이 유발된 대조군의 흰쥐에게 norepinephrine 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 을 bolus로 1회 정맥 주사시 최대 수축기 및 이완기 승압반응을 Fig. 9에 나타내었다. 즉, 당뇨병이 유발된 대조군의 경우 정상군에 비해 NE의 승압반응이 유의성 있게 억제되었다. 또한, 이 경우 당뇨병 유발과 함께 tannic acid, 울피 Ext. 및 솔잎 Ext. 투여군의 경우 NE에 의한 승압반응이 회복되어 정상군과 유사하게 되었다.

정상군에 L-NAME (10 mg/kg)을 정맥주사시 지속적인 혈압상승을 초래하는데, 정상군에 비해 당뇨가 유발된 대조군의 경우 유의성 있게 감소되었다. 그러나 tannic acid, 울피 Ext. 및 솔잎 Ext. 처치군의 경우 모두 유의성 있게 회복되었다 (Fig. 10).

이러한 결과는 당뇨병에 의해 혈관내피세포의 손상이 유발되어 대조군의 경우 NE 및 L-NAME에 의한 승압반응이 감소되지만, tannic acid, 울피 Ext. 및 솔잎 Ext. 처치군의 경우 NO 유리촉진 및 불활성화억제의 내피세포 보호작용으로 승압반응이 회복됨을 제시해 준다.

ACh, SNP에 의한 강압반응; Ketamine과 urethane 마취하 정상군 또는 당뇨병이 유발된 대조군의 흰쥐에게 acetylcholine 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 을 bolus로 1회 정맥 주사시 최대 수축기 및 이완기 승압반응을 Fig. 11에 나타내었다.

즉, 당뇨병이 유발된 대조군의 경우 정상군에 비해 ACh의 강압반응이 유의성 있게 억제되었다. 또한, 이 경우 당뇨병 유발과 함께 tannic acid, 울피 Ext. 및 솔잎 Ext. 투여군의 경우도 ACh에 의한 강압반응은 대조군과 유사하였다.

Ketamine과 urethane 마취하 정상군 또는 당뇨병이 유발된 대조군의 흰쥐에게 sodium nitroprusside 3 µg/kg을 bolus로 1회 정맥 주사시 최대 수축기 및 이완기 승압반응을 Fig. 12.에 나타내었다.

즉, 당뇨병이 유발된 대조군의 경우 정상군에 비해 SNP의 강압반응이 유의성 있게 억제되었다. 또한, 이 경우 당뇨병 유발과 함께 tannic acid, 울피 Ext. 및 솔잎 Ext. 투여군의 경우도 SNP에 의한 강압반응은 대조군과 유사하였다.

이러한 결과는 당뇨병이 유발된 대조군의 경우 정상군에 비해 ACh, SNP에 의한 강압반응이 감소되었으나, tannic acid, 울피 Ext. 및 솔잎 Ext. 투여가 L-NAME의 승압반응과는 달리 손상된 ACh, SNP의 강압반응을 회복하지 못함은 이의 내피세포 보호작용이 완전치 못함을 제시해준다.

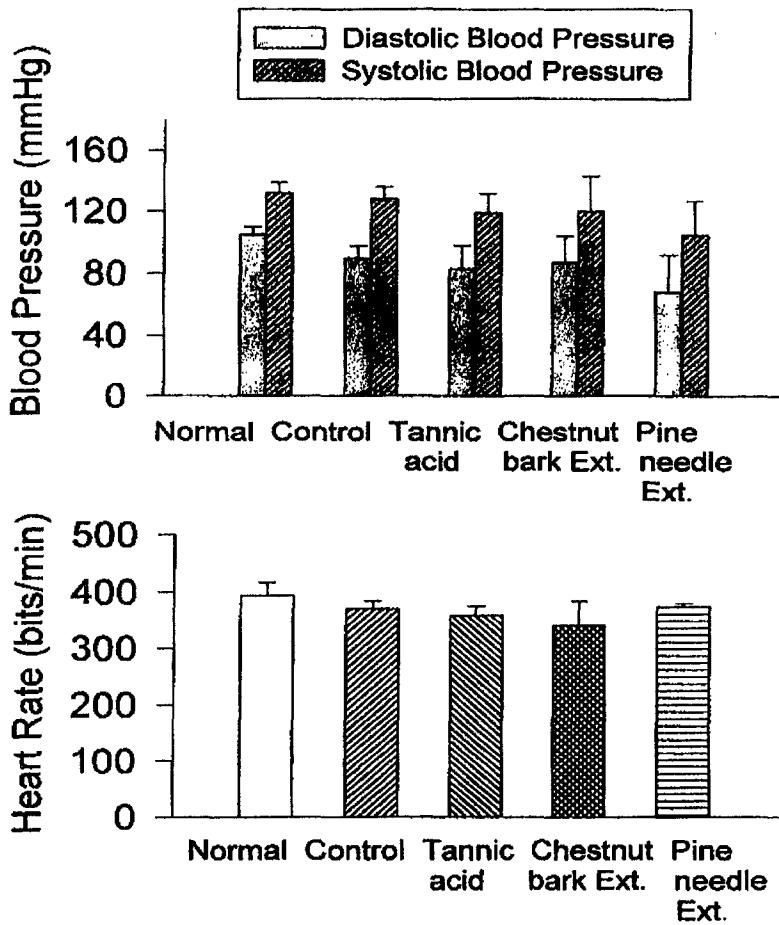


Fig. 8 Effects of tannic acid, chestnut bark Ext. and pine needle Ext. treatment for 5 weeks on the blood pressure(top) and heart rate(bottom) in diabetic rats induced by streptozotocin. Each bar represents mean \pm SEM(n=6)

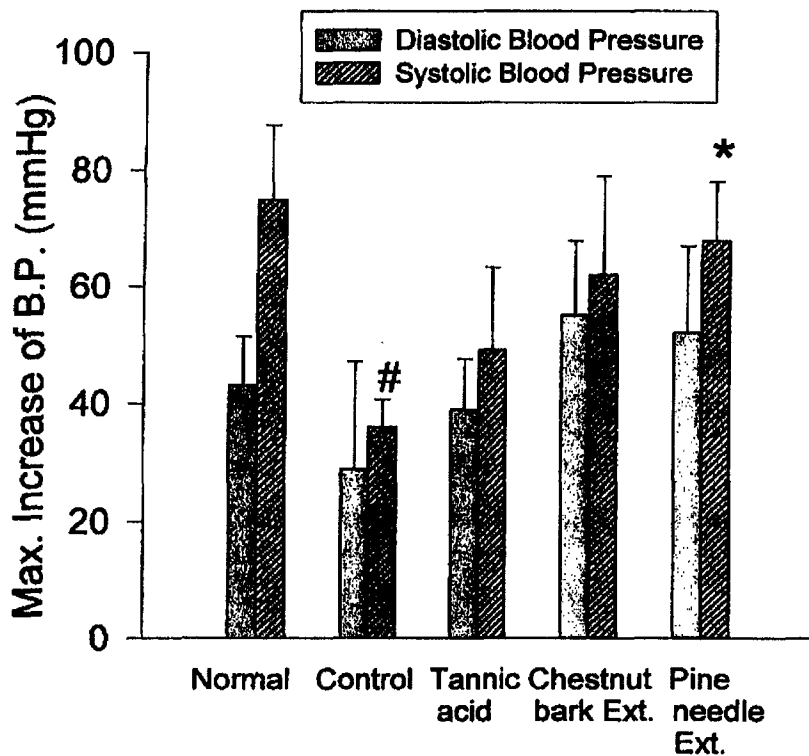


Fig. 9 Effects of tannic acid, chestnut bark Ext. and pine needle Ext. treatment for 5 weeks on the maximum increase of systolic and diastolic blood pressure induced by norepinephrine 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (i.v. bolus) in diabetic rats induced by streptozotocin. Each data point represent mean \pm SEM (n=6).

#; p < 0.05 significantly different form normal.

*; p < 0.05 significant different from control.

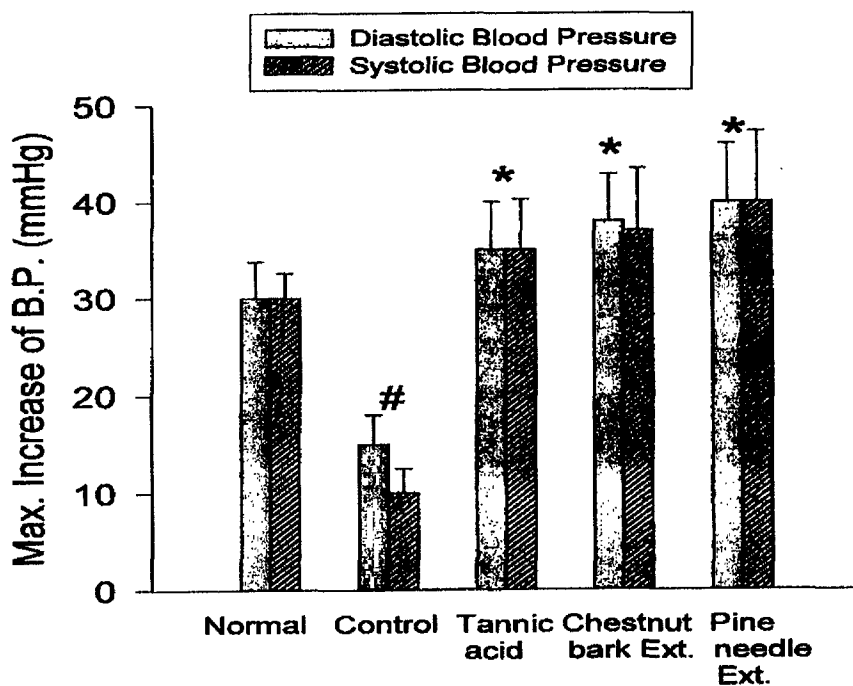


Fig. 10 Effects of tannic acid, chestnut bark Ext. and pine needle Ext. treatment for 5 weeks on the maximum increase of systolic and diastolic blood pressure induced by L-NAME 10 mg/kg(i.v. bolus) in diabetic rats induced by streptozotocin. Each data point represent mean \pm SEM(n=6).

#; p < 0.05 significantly different form normal.

*; p < 0.05 significant different from control.

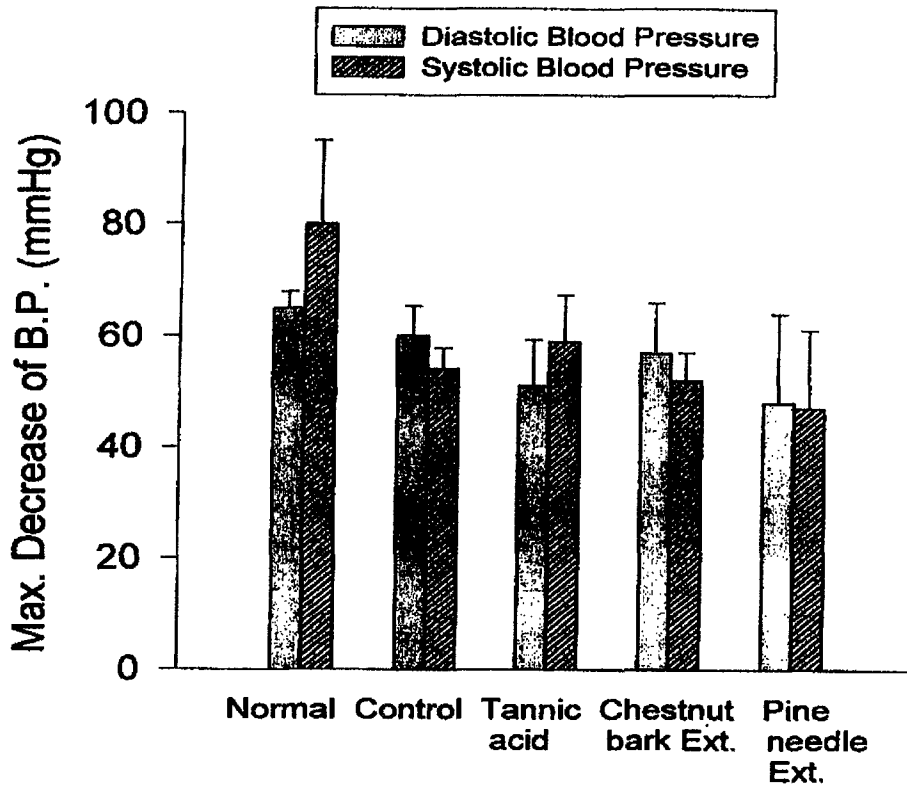


Fig. 11 Effects of tannic acid, chestnut bark Ext. and pine needle Ext. treatment for 5 weeks on the maximum decrease of systolic and diastolic blood pressure induced by acetylcholine 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (i.v. bolus) in diabetic rats induced by streptozotocin. Each data point represent mean \pm SEM (n=6).

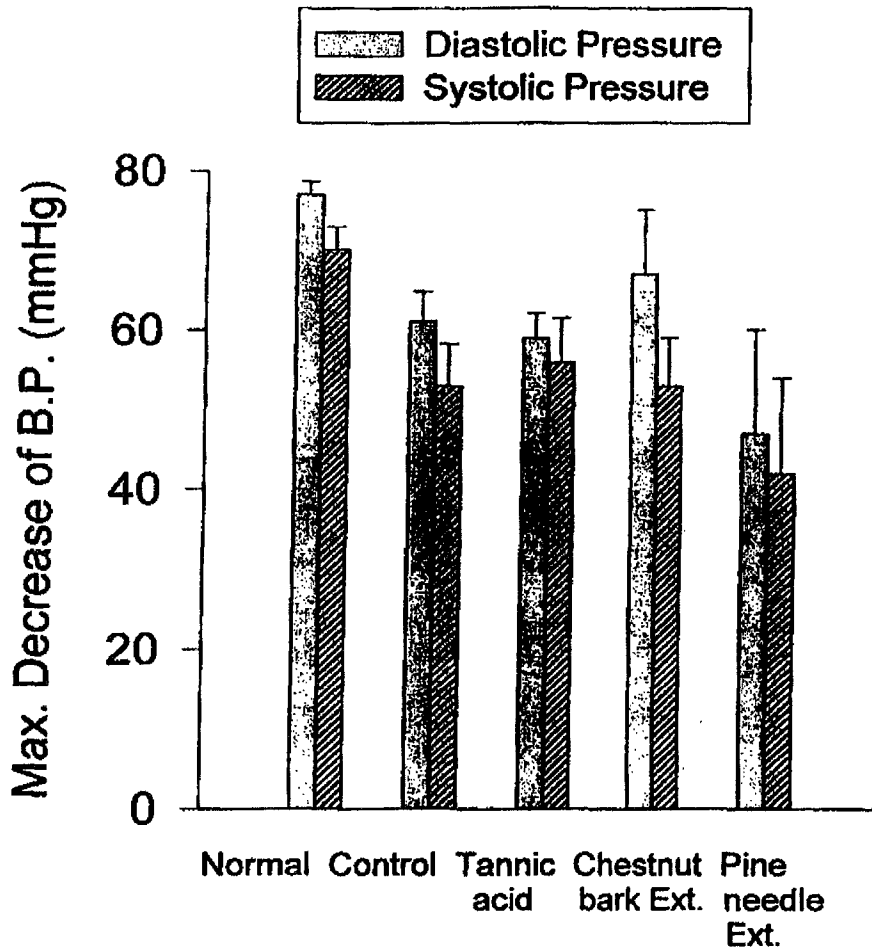


Fig. 12 Effects of tannic acid, chestnut bark Ext. and pine needle Ext. treatment for 5 weeks on the maximum decrease of systolic and diastolic blood pressure induced by SNP 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (i.v. bolus) in diabetic rats induced by streptozotocin. Each data point represent mean \pm SEM (n=6).

(마) 적출혈관의 수축 및 이완 반응

정상 흰쥐 또는 당뇨병이 유발된 흰쥐의 흉곽대동맥을 적출하여 norepinephrine 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} M을 organ bath내 처치시 최대 수축반응을 비교한 바, Fig. 13와 같다.

당뇨가 유발된 흰쥐의 경우 정상군에 비해 norepinephrine에 의한 혈관수축반응이 유의성 있게 증가되었다. 또한, 각 약물 처치군의 경우도 대조군과 유사하였다.

정상 흰쥐 또는 당뇨병이 유발된 흰쥐의 흉곽대동맥을 적출하여 norepinephrine 10^{-5} M을 전 처치하여 수축반응을 초래한 후, L-NAME을 10^{-5} M을 가하여 혈관이완반응을 비교한 바, Fig. 14과 같다. 당뇨가 유발된 흰쥐의 경우 정상군에 비해 L-NAME에 의한 혈관이완반응이 유의성 있게 증가되었다. 그러나, 율피 Ext. 및 솔잎 Ext. 처치군의 경우는 정상군과 유사하게 이완반응을 나타냈다. 이러한 결과는 앞의 승압반응에서 대조군의 L-NAME에 의한 승압반응이 유의성 있게 감소되었고, 약물처치시 정상군과 유사하게 회복된 결과와 일치한다.

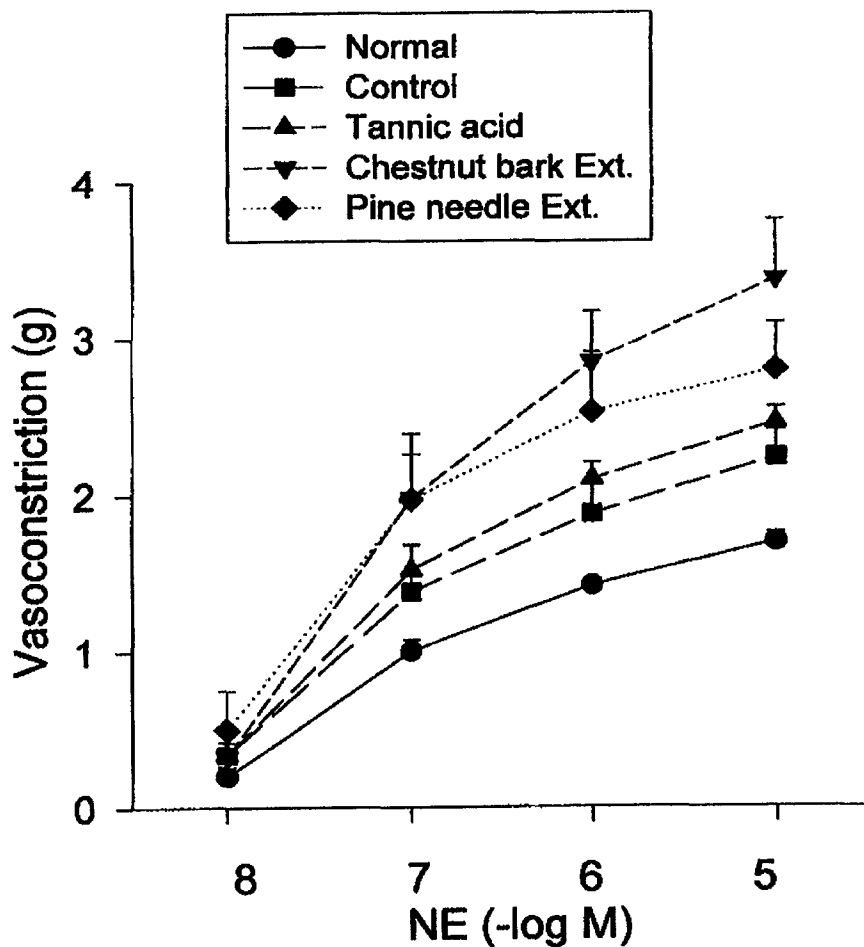


Fig. 13 Effects of tannic, chestnut bark Ext. and pine needle Ext. treatment for 5 weeks on the vasoconstriction induced by orepinephrine in the isolated thoracic aorta of diabetic rats by streptozotocin.

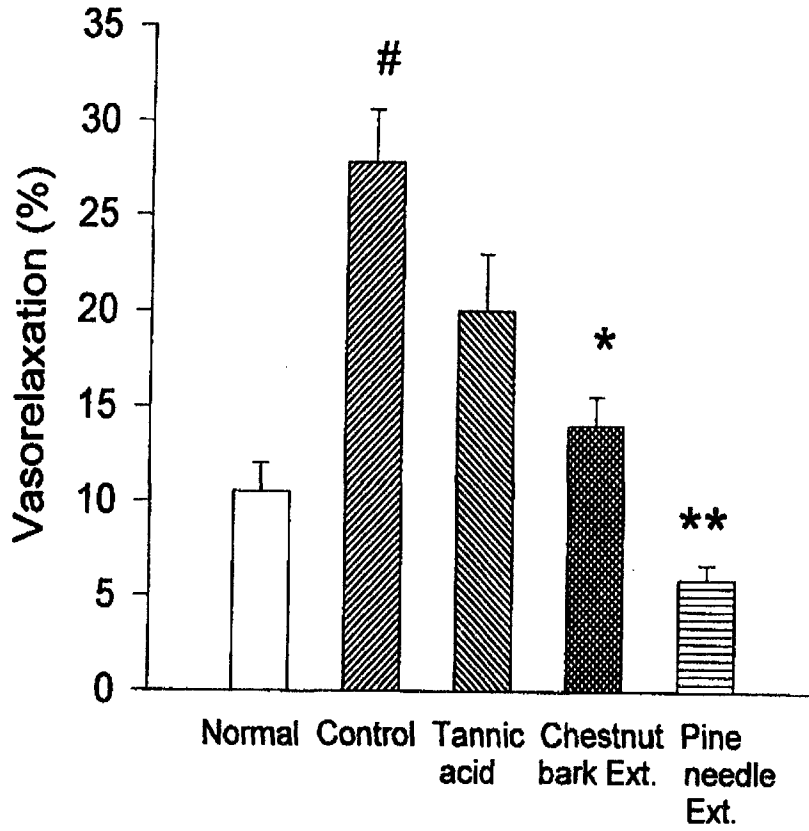


Fig. 14 Effects of tannic acid, chestnut bark Ext. and pine needle Ext. treatment for 5 weeks on the vasorelaxation induced by NAME after maximum vasoconstriction by NE 10^{-5} M in the isolated thoracic aorta of diabetic rats induced by streptozotocin.

Streptozotocin을 투여하여 당뇨를 유발시킨 Sprague-Dawley계 흰쥐에게 tannic acid, 율피 Ext. 및 솔잎 Ext.를 각각 250 mg/kg/day 용량으로 5주간 경구 투여한 후 체중 및 식수 섭취량 변화, 혈장 중 glucose, cholesterol, triglyceride 농도 및 MDA 치를 측정하였다. 또한 마취하 norepinephrine, acetylcholine, isoproterenol, sodium nitroprusside 및 L-NAME을 각각 정맥내 주사시 혈압반응의 변화를 측정하였으며, 흉곽대동맥을 적출하여 organ bath내 현수하고 norepinephrine 및 L-NAME의 혈관수축 및 이완반응을 측정하였다. 한편, 당뇨가 유발된 흰쥐의 경우 체중감소와 식수섭취량 증가, 혈중 glucose, cholesterol 및 triglyceride의 증가를 초래하였다. 이에 대해 tannic acid 투여군의 경우 유의성 있는 억제효과를 나타내었으나, 율피 Ext. 및 솔잎 Ext.는 억제 경향을 나타내었으나, 통계적인 유의성은 없었다. 또한, 당뇨가 유발된 흰쥐의 경우 정상 흰쥐에 비해 혈압 및 심박수에 유의성 있는 변화가 없었으며, tannic acid, 율피 Ext. 및 솔잎 Ext.를 5주간 투여한 각군의 경우 역시 혈압 및 심박수에 영향이 없었다. Urethane 마취하 norepinephrine을 정맥주사시 당뇨가 유발된 흰쥐의 경우 정상 흰쥐에 비해 수축기 혈압의 최대 상승이 유의성 있게 억제되었으며, 솔잎 Ext. 처치군의 경우 유의성 있게 회복되었다. L-NAME (10 mg/kg)을 정맥주사시 지속적인 혈압상승을 초래하는데, 당뇨가 유발된 대조군의 경우 정상군에 비해 유의성 있게 감소되었으나, tannic acid, 율피 Ext. 및 솔잎 Ext. 처치군의 경우 모두 유의성 있게 회복되었다. 한편, 흉곽 대동맥을 적출한 실험에서 정상군에 비해 당뇨가 유발된 흰쥐의 경우 norepinephrine에 의한 혈관수축반응이 유의성 있게 증가되었으며, 각 약물 처치군의 경우에도 정상군에 비해 증가되었다. 또한, norepinephrine 10^{-5} M로 최대 수축을 유도한 후 L-NAME에 의한 혈관 이완반응을 측정시 당뇨가 유발된 흰쥐의 경우 정상군에 비해 유의성 있게 증가되었으나, 율피 Ext., 및 솔잎 Ext. 처치군의 경우 정상군과 유사하게 억제되었

다.

이러한 결과는 율피 Ext. 및 솔잎 Ext.가 이중에 함유된 tannic acid의 항산화 작용에 의해 당노시 고혈당 및 산화적 스트레스에 의해 생성되는 활성산소를 억제하므로써 혈관내피세포 손상을 보호하고 자발적인 NO의 유리를 촉진할 수 있음을 제시해 준다.

3. Cd⁺⁺독성에 대한 해독 효과

가. 솔잎, 감피, 율피 추출물의 해독효과

1) 음수량 및 체중에 대한 영향

Table VI.에서와 같이 탄닌산을 혼합한 음수를 투여 받은 군은 실험이 진행됨에 따라 대조군에 비교하여 유의하게 낮은 음수량을 보였다.($p < 0.05$) 감피추출물을 첨가한 군은 첫주동안에는 음수량이 많이 감소하지 않았으나, 2주부터는 유의하게 감소된 음수량을 보였다($p < 0.05$) 체중은 Table VII.와 같이 감피추출물과 카드뮴을 투여한 군에서 카드뮴 투여 1일 후에 유의하게 감소하였으며($p < 0.05$), 밤피추출물과 카드뮴을 투여한 군의 체중은 카드뮴 투여 후 4일 그리고 15일에서 대조군에 비하여 유의한 감소를 보였다($p < 0.05$). 음수량이 감소한 것에 비하여 체중의 감소는 유의한 차이가 많지 않았으며, 카드뮴만을 투여한 군에서도 대조군에 비하여 체중의 감소는 유의성이 인정되지 않았다.

Table VI. Water consumption during cadmium and tannic acid administration on mouse.

(unit : ml/mouse/day)

	groups				
	control	Cd	PND+Cd	PSM+Cd	CIS+Cd
b 4-7 days	8.08±1.34	6.93±2.13	7.18±4.35	9.60±3.46	6.95±1.16
b 3-1 days	8.80±2.12	8.30±2.44	12.40±3.76*	9.95±3.85	6.40±2.04*
a 1-4 days	9.36±3.15	8.08±2.65	8.80±2.34	6.25±2.73*	5.35±1.68*
a 5-7 days	6.20±1.54	3.73±0.68*	3.33±0.48*	4.40±1.79*	3.00±0.57*
a 8-11 days	5.40±1.13	3.56±0.59*	3.52±0.56*	4.14±1.58*	3.16±0.38*
a 12-14 days	5.40±1.51	3.70±0.84*	2.30±0.37*	3.20±1.59*	2.70±0.23*
a 15-18 days	5.07±1.27	4.48±1.10	3.37±0.41*	3.90±0.36*	5.63±1.12
Total	6.90±2.56	5.54±2.07	5.84±1.75	5.92±2.12	4.74±0.97

a means after cadmium treatment

b means before cadmium treatment

* : Statistically different from control group (p<0.05)

Table VII. Body weight change of mice during tannic acid and cadmium administrations

	groups				
	control	Cd	PND+Cd	PSM+Cd	CIS+Cd
b 4-7 days	8.08±1.34	6.93±2.13	7.18±4.35	9.60±3.46	6.95±1.16
b 3-1 days	8.80±2.12	8.30±2.44	12.40±3.76*	9.95±3.85	6.40±2.04*
a 1-4 days	9.36±3.15	8.08±2.65	8.80±2.34	6.25±2.73*	5.35±1.68*
a 5-7 days	6.20±1.54	3.73±0.68*	3.33±0.48*	4.40±1.79*	3.00±0.57*
a 8-11 days	5.40±1.13	3.56±0.59*	3.52±0.56*	4.14±1.58*	3.16±0.38*
a 12-14 days	5.40±1.51	3.70±0.84*	2.30±0.37*	3.20±1.59*	2.70±0.23*
a 15-18 days	5.07±1.27	4.48±1.10	3.37±0.41*	3.90±0.36*	5.63±1.12
Total	6.90±2.56	5.54±2.07	5.84±1.75	5.92±2.12	4.74±0.97

day	-7	1	4	8	11	15
group	days					
control	30.6±4.12	32.4±2.63	31.6±2.84	30.6±3.37	30.1±4.04	30.6±4.30
Cd	31.2±3.24	33.7±4.76	31.1±3.21	29.3±3.65	29.1±4.57	29.6±4.61
PND+Cd	30.2±3.56	33.0±3.06	31.5±3.31	31.2±4.34	29.5±2.72	29.7±4.35
PSM+Cd	31.4±3.28	29.3±2.06*	30.3±3.50	29.9±3.38	29.5±3.89	29.5±4.40
CIS+Cd	30.3±3.64	31.4±3.47	29.1±2.92*	29.4±3.13	28.5±2.17	27.0±3.23*

* : statistically different from control group (p<0.05)

2) 혈액학적인 변화

혈액학적인 변화는 카드뮴을 투여한 모든 군에서 백혈구수가 유의하게 감소하였다 (Table VIII). 이러한 감소는 탄닌산의 투여에 의하여 영향을 받지 않았다. 이러한 백혈구수의 감소는 Table IX와 같이 내용상 카드뮴만을 투여한 군에서는 호중구와 임파구의 수가 유의하게 감소하였으며, 단구는 유의하게 증가하였다 (p<0.05). 솔잎추출물과 카드뮴을 투여한 군에서는 임파구, 단구, 호염기구 수가 유의하게 감소하였다(p<0.05). 감피추출물과 카드뮴을 투여한 군에서는 임파구, 단구 수가 유의하게 감소하였다(p<0.05). 울피추출물과 카드뮴을 투여한 군에서는 호중구, 임파구, 호염기구, 호산구가 유의하게 감소하였으며, 단구는 유의하게 증가하였다(p<0.05).

Table VIII. The hematological effects of tannic acid to the cadmium administrations for 18 days on mouse

	control	Cd	PND+Cd	PSM+Cd	CIS+Cd
WBC($10^3/\mu\ell$)	6.79±2.11	3.92±2.32*	3.86±2.41*	3.56±2.03*	3.34±2.34*
RBC($10^9/\mu\ell$)	10.24±2.17	9.18±2.41	10.10±2.36	9.74±1.96	9.40±2.11
HGB(g/dl)	14.4±3.21	13.5±3.14	14.1±2.15	13.7±2.36	13.3±2.54
HCT(%)	56.7±4.12	52.7±4.63	55.3±3.69	52.5±3.85	51.5±3.66
MCV(fL)	55.4±3.11	57.4±3.25	54.8±3.24	53.9±2.87	54.7±2.75
MCH(pg)	14.1±2.31	14.7±1.86	13.9±1.65	14.1±1.86	14.1±2.08
MCHC(g/dl)	25.5±3.15	25.7±2.45	25.5±2.13	26.1±2.56	25.8±2.33
RDW(%)	17.3±1.25	16.2±1.52	16.5±1.55	15.9±1.75	16.4±1.65
HDW(g/dl)	2.49±0.24	2.44±0.32	2.46±0.28	2.49±0.22	2.37±0.29
PLT($10^3/\mu\ell$)	790±154	1256±241*	1018±237	968±209	1167±227
MPV(fL)	4.0±0.32	3.7±0.29	3.5±0.17	3.6±0.24	3.8±0.22

* : statistically different from control group (p<0.05)

Table IX. The effects of tannic acid on cadmium administrations for 18 days by differential counts of the mice

	control	Cd	PND+Cd	PSM+Cd	CIS+Cd
neutrophile ($\times 10^3 \mu\ell$)	1.94±0.23	0.37±0.04*	1.53±0.17	1.47±0.14	0.36±0.03*
(%)	28.6±3.12	9.3±0.09*	42.9±4.12	38.3±3.58	10.8±1.12*
lymphocyte ($\times 10^3 \mu\ell$)	3.83±0.34	2.04±0.18*	1.57±0.16*	1.82±0.16*	1.67±0.15
(%)	56.4±5.32	52.0±5.04	44.2±4.36*	47.2±4.25*	50.2±4.87
monocyte ($\times 10^3 \mu\ell$)	0.36±0.03	1.13±0.11*	0.18±0.02*	0.19±0.02*	1.09±0.17*
(%)	5.2±0.48	29.0±2.26*	4.9±0.05	4.9±0.42	32.7±3.11
eosinophile ($\times 10^3 \mu\ell$)	0.14±0.01	0.11±0.01	0.09±0.01	0.12±0.01	0.05±0.01
(%)	2.1±0.18	2.9±0.27	2.4±0.21	3.2±0.31*	1.4±0.11
basophile ($\times 10^3 \mu\ell$)	0.11±0.01	0.06±0.01	0.05±0.01*	0.09±0.01	0.03±0.01
(%)	1.6±0.14	1.5±0.12	1.3±0.12	2.2±0.20*	1.0±0.11
leucocyte ($\times 10^3 \mu\ell$)	0.41±0.03	0.21±0.02	0.15±0.02*	0.16±0.02*	0.13±0.01
(%)	6.1±0.57	5.4±0.47	4.3±0.42*	4.2±0.03*	3.8±0.28

* : statistically different from control group (p<0.05)

3) 카드뮴 함량 변화

대조군의 카드뮴함량은 김등¹⁸⁾의 보고에서와 같은 수준이었다 (Table X). 카드뮴만을 투여한 군은 간장 41.97 $\mu\text{g/g}$, 신장 14.90 $\mu\text{g/g}$, 비장 1.18 $\mu\text{g/g}$, 고환 0.66 $\mu\text{g/g}$ 이었다. 이러한 결과는 3종류의 탄닌산 투여에 의하여 대부분 유의하게 조직내 카드뮴함량이 감소하였다($p < 0.05$). 이는 카드뮴의 조직내 축적이 탄닌산 투여에 의하여 감소한 것으로 인정된다.

Table X. Cadmium contents in some tissues administered CdCl₂ 30mg/kg and tannic acids for 3 weeks in mouse

	Groups				
	control	Cd	PND+Cd	PSM+Cd	CIS+Cd
liver	0.46 \pm 0.36	41.97 \pm 24.07	22.00 \pm 6.14*	10.46 \pm 5.20*	9.17 \pm 3.34*
kidneys	0.03 \pm 0.01	14.90 \pm 2.27	7.18 \pm 1.01*	8.13 \pm 1.77*	8.00 \pm 0.75*
spleen	0.10 \pm 0.08	1.18 \pm 0.25	0.74 \pm 0.29*	0.74 \pm 0.24*	1.18 \pm 0.18
testis	0.03 \pm 0.01	0.66 \pm 0.12	0.40 \pm 0.18*	0.46 \pm 0.17	0.44 \pm 0.16*

* : Statistically different from Cd group except of control group. ($p < 0.05$)

우리나라에서 생산되는 솔잎, 감피, 율피에서 추출한 탄닌산으로 카드뮴에 대한 독성방어효과가 있는지를 파악하기 위하여, 마우스에 카드뮴 CdCl₂ 로서 50mg/kg/day을 3주간 경구 투여하였으며, 카드뮴 투여 1주일 전부터 솔잎추출물 (PND) , 감추출물(PSM), 밤껍질추출물(CIS)을 1.0mg/ml가 되도록 증류수에 용해하여 자유롭게 음용토록 한 결과, 탄닌산투여에 의하여 간장, 신장등의 주요장기에 카드뮴 축적량이 유의하게 감소하였다($p < 0.05$). 따라서, 우리나라에서 추출한, 솔잎, 감피, 율피의 탄닌산은 카드뮴의 조직내 축적을 예방하는 효과를 나타냈다.

제 4 장 피부보호효과 검색 및 피부보호제개발

제 1 절 서 설

근래 지구환경문제의 하나인 오존층 파괴로 인한 자외선량의 증가 문제는 한반도도 예외가 아니어서 우리나라의 피부암환자의 발생은 물론 일광화상, 면역 반응의 변화, 돌연변이, 광알레르기성 반응, 광과민성 질환, 백내장 발생의 증가등을 위시하여 인체 피부의 색소침착, 기미, 주근깨의 피부 흑화현상을 증가하고 있는 것으로 보고되었다. 이러한 자외선을 방어하기 위해서 외국에서는 이미 자외선의 위해성에 대한 연구 뿐 아니라 자외선을 방어하는 물질에 대한 연구가 많이 시행되고 있는 실정이다.

현재 화장품에 미백제로 가장 많이 사용되고 있는 코직산이나 알부틴은 가격이 비싸고, 많이 사용할 경우 피부 독성을 일으키고 있는 것으로 알려져 있다.

만일 천연식물자원중에서 미백제의 기능을 가지고 있으면서 피부생리개선효과가 큰 물질을 개발한다면 농가소득의 향상은 물론 수입대체효과로 국가경제력의 제고에도 이바지 할 것이며 국민의 건강의 향상에도 도움이 될 것이다.

본 연구에서는 예로부터 민간에서 꿀에 개어 바르면 얼굴의 잡티가 없어진다고 알려져 민간에서 널리 사용하고 있는 울피를 비롯한 폴리페놀함유 식물자원을 이용하여 피부 미백 효과 및 피부생리개선기능을 검색하고, 피부 보호물질 개발 가능성을 검토하고자 하였다.

본 연구는 폴리페놀식물에서 추출한 추출물을 이용해 자외선에 대한 항산화작용, 피부미백작용, 피부생리개선효과등을 시험관내 실험, 세포실험, hairless mouse를 이용한 동물실험 및 사람피부에서 검토하였다.

또한 gallic acid 의 합성 유도체인 steary gallate, metyl gallate 및 hexyl gallate 의 미백효과를 실험관내실험과 세포실험에서 검토하였고, 피부보호효과를 백으로 제조해 검토하였다.

제 2 절 재료 및 방법

실험 1. 율피 추출물의 tyrosinase 활성억제 및 melanin 생성억제 효과

Mouse 피부암 세포인 B-16 melanoma를 heat inactivation시킨 10%의 fetal bovine serum (FBS, Gibco BRL, Life Technologies, Inc. USA) 및 100 I.U./ml 의 penicillin과 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 streptomycin (Sigma Chemical Co., USA)을 포함한 Dulbecco's Modified Eagle Medium (Gibco Life technologies. Inc. USA) 배지에서 배양하였으며, 5% CO₂가 공급되는 37°C의 배양기(Vision Scientific Co.)에서 ml당 3×10^5 의 세포를 넣어 배양하였다.

본실험에서 사용한 율피는 밤의 내과피(Chestnut Inner Shell, CIS)로서 경동시장에서 구입하였으며(충남 공주산) 육안으로 성상을 확인한 후 선별하여 사용하였다. 70% 수성아세톤으로 추출한후 아세톤과 물을 모두 제거하고 동결건조하여 분말상의 고체(CIS)를 얻었다. 추출후 용매를 제거하는 과정에서 플라스크 내벽에 부착되어 다른물질과 구별되는 결정상의 고체가 발견되었는데 이를 분리하여 CIS-gel로 명명하였다.

또한 이과정에서 점도가 높은 젤리상의 물질도 발견되었는데 이를 분리하여 CIS jelly로 명명하였다. CIS-gel은 물에 잘녹지 않으나, 메탄올, 에탄올, 클로로포름 등의 유기용매에 잘녹았다. 이에비해 CIS jelly는 물에 잘녹으나, 유기용매에는 비교적 잘 녹지 않았다.

울피 추출물인 CIS, CIS-gel, CIS jelly는 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 1/15 M의 PBS에 녹여 단계별 희석하여 사용하였다. Tyrosinase(EC 1.14.18.1), L-3,4-Dihydroxyphenylalanine(L-DOPA), Kojic acid, Triton-X, Synthetic melanin, MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) 2,5-diphenyl tetrazolium bromide)등은 Sigma사 (St. Louis, MO., U.S.A)에서 구입하였고, Soluene 350은 Canberra사 (Netherlands)에서 구입하였다.

실험 2. 울피 · 솔잎 · 호프의 물-acetone 추출물에 의한 melanin 생성억제효과

실험한 방법은 실험 1과 같다.

실험 3. 울피 팩의 계절별 피부보습효과

실험대상자는 건강한 피부를 가진 여대생 20명을 본인의 동의를 얻어 그 대상으로 하였다. 본 실험에서 사용한 울피, 감잎, 찻잎, 도토리, 누룩(효모)은 제기동 경동시장 한약 재료 상에서 순수한 국산품으로 구입하였다. 꿀, 밀가루, 우유 등은 시중에서 구입하였다.

(1) 수분량과 피지량의 측정 : 피부 수분측정기인 Beauty Vision K1(kanebo 96년)을 금비화장품회사의 호의로 제공받아, 얼굴 중 볼 부위의 수분량 변화를 측정하였다

(3) 각질 측정 : 각질 측정은 Beauty Vision K1(kanebo 96년)으로 금비화장품의 호의로 제공받아 팩전과 팩후의 여대생의 볼 부위를 찍은 후 사진으로 출력하였다.

실험 4. 탄닌 유도체의 피부미백효과

탄닌 유도체의 미백효과를 검색하기 위해 실험관내 실험과 세포실험을 하였으며 실험 방법은 실험 1 과 같다. 이때 사용된 합성 탄닌 유도체는 Stearyl gallate, methyl gallate, hexyl gallate 으로 3 종이였다.

실험 5. 율피 추출물과 탄닌 유도체의 피부보호효과

율피 추출물과 탄닌을 팩으로 만들어 피부 생리 개선 효과 실험을 하였다. 실험 방법은 실험 3 과 같다.

제 3 절 결과 및 고찰

실험 1. 율피 추출의 tyrosinase 활성억제 및 melanin 생성억제 효과

1. 시험관내 실험

가. Tyrosinase 활성 억제 실험

율피 추출물 CIS, CIS-gel, CIS jelly와 kojic acid의 tyrosinase 활성 억제 실험결과는 Fig. 3과 같다. 율피 추출물은 농도가 증가함에 따라 tyrosinase 활성 억제율(inhibition rate)이 유의하게 증가하였다.($f < 0.01$) 또한 tyrosinase의 활성도의 IC_{50} (Inhibition rate 50%)은 CIS-gel이 $62 \mu\text{g/ml}$, CIS가 $81 \mu\text{g/ml}$, CIS jelly가

170 $\mu\text{g/ml}$ 순이었으며($p < 0.05$) 율피 추출물중에서 CIS-gel의 억제능이 가장 높았다.

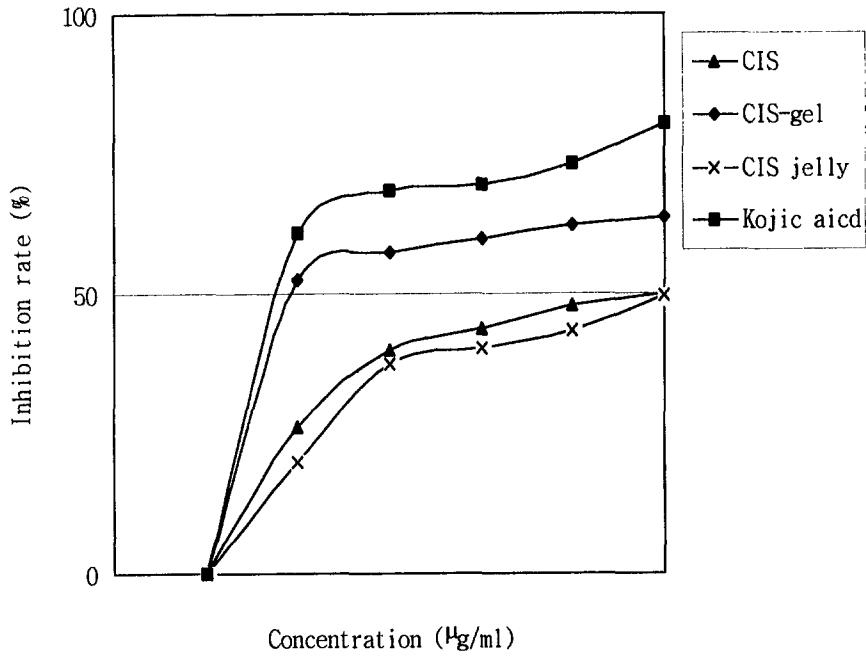


Fig. 1 Inhibition effect of tyrosinase activity with chestnut inner shell ext. and Kojic acid

$f < 0.01$; significantly different from concentration of test substances.

나. 도파 자동산화 (Dopa auto-oxidation)

율피 추출물 CIS, CIS-gel, CIS jelly와 kojic acid의 도파 자동산화 억제 실험 결과는 다음과 같다. 각 실험물질은 농도가 증가함에 따라 dopa auto-oxidation 억제율이 유의하게 증가하였으며($f < 0.01$), 율피 추출물은 농도 80 $\mu\text{g/ml}$ 에서 30% 미만의 억제효과를 보여주었으나, CIS와 CIS-gel은 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 억제능이 최고 90% 이상이었다.

또한 dopa auto-oxidation의 IC_{50} 은 율피 추출물인 CIS가 102 $\mu\text{g/ml}$, CIS-gel이 124 $\mu\text{g/ml}$, CIS jelly가 148 $\mu\text{g/ml}$ 순이었으며($p < 0.05$) 율피 추출물중에서 CIS가 억제능이 가장 높았다. (Table 1)

Table 1. Inhibition effect of Dopa auto-oxidation with chestnut bark ext. and kojic acid

concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Dopa auto-oxidation inhibition rate (%)			
	CIS	CIS-gel	CIS jelly	Kojic acid
10	0	0	0	13.33
20	5.32	4.21	2.67	30.33
40	15.76	9.88	7.44	58.77
80	30.11	27.43	13.65	87.56
120	66.54	45.23	40.66	93.45
160	87.63	84.56	56.42	98.76
200	93.44	90.14	87.99	99.85
IC_{50}	102 ^b	124 ^c	148 ^a	32 ^d

· $f < 0.01$; significantly different from concentration of test substances.

· Same letters are not significantly different in case of IC_{50} ($p < 0.05$)

다. 멜라닌 함량 측정(Assay of Melanin Content)

멜라닌 함량 측정 실험에서는 율피 추출물 CIS, CIS-gel, CIS jelly와 kojic acid의 농도가 증가함에 따라 멜라닌 생성 억제율(inhibition rate)이 유의하게 증가하였다. 율피 추출물과 kojic acid의 멜라닌 생성 억제율은 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 CIS가 60.18%, CIS jelly가 46.63%, CIS-gel이 14.86%, kojic acid가 3.96%순으로 율피 추출물이 kojic acid에 비해 멜라닌 생성 억제 효과가 높았다. 특히, 율피 추출물중 CIS는 단일 물질인 kojic acid보다 억제율이 15배나 높았는데 이것은 율피 추출물 CIS가 현재 가장 많이 사용되고 효과가 인정되는 미백제인 kojic acid보다 높은 멜라닌 생성 억제능을 나타내어 상당히 높은 미백 효과를 보여주는 것이라 할 수 있다. (Table 2)

Table 2. Inhibition effect of melanin production with chestnut bark ext. and kojic acid

concentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Melanin production inhibition rate (%)			
	CIS	CIS-gel	CIS jelly	Kojic acid
1	24.39	0.50	5.39	0.038
5	51.86	4.35	29.30	3.42
10	60.18 ^a	14.86 ^b	46.63 ^c	3.96 ^d

· $f < 0.01$; significantly different from concentration of test substances.

· Same letters are not significantly different from concentration of 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ($p < 0.05$)

2. 세포 실험

가. 세포 생존률(MTT assay)

B-16 melanoma cell에서 율피 추출물 CIS, CIS-gel, CIS jelly와 kojic acid에 대한 생존률을 조사하였다. 각 실험 물질을 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 투여한 처치군은 정상군에 비해 생존률이 86.55%, 86.10%, 89.88%, 87.92%이었으며, 각 실험 물질별로 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이하의 농도에서는 정상군과 비교했을 때 세포 생존률에 영향이 없었다. 따라서 율피 추출물에 의한 세포 독성은 없는 것으로 나타났다. (Table 3)

Table 3. The effect of chestnut bark ext. and kojic acid on viability of B-16 melanoma cell

concentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Viability rate (%)			
	CIS	CIS-gel	CIS jelly	Kojic acid
2	94.30	95.29	97.37	94.68
4	94.60	92.48	97.13	94.38
6	94.45	92.55	96.04	92.40
8	94.22	92.02	91.23	92.10
10	86.55	86.10	89.88	87.92

나. Tyrosinase 활성 억제 실험

B-16 melanoma cell의 tyrosinase 활성 억제 실험에서는 율피 추출물 CIS, CIS-gel, CIS jelly와 kojic acid는 농도가 증가함에 따라 tyrosinase 활성 억제율이 농도 의존적으로 유의하게 증가하였다. ($f < 0.01$) 율피 추출물과 kojic acid의 tyrosinase 활성 억제율은 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 CIS-gel이 63.41%, CIS가 50.12%, CIS jelly가 49.76%, kojic acid가 80.48%이었다. 또한 tyrosinase 활성도의 IC_{50} 은 CIS가 10 $\mu\text{g/ml}$, CIS jelly가 10 $\mu\text{g/ml}$, CIS-gel이 1.9 $\mu\text{g/ml}$ 으로 kojic acid 1 $\mu\text{g/ml}$ 와 유사한 효과를 나타냈으며($p < 0.05$), 율피 추출물중 CIS-gel이 시험관내 실험에서와 동일하게 tyrosinase의 활성 억제 효과가 가장 높았다.

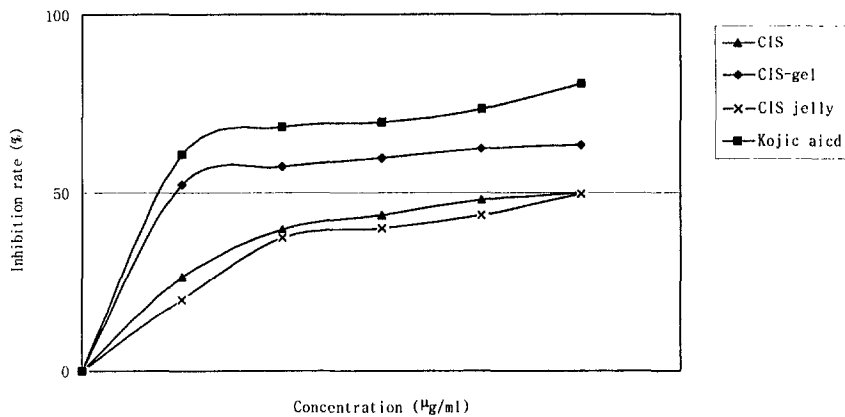


Fig. 2 Inhibition effect of tyrosinase activity with chestnut inner shell ext. and kojic acid on B-16 melanoma cell.

다. 멜라닌 함량 측정(Assay of Melanin Content)

B-16 melanoma cell에서 율피 추출물 CIS, CIS-gel, CIS jelly와 kojic acid에 대한 멜라닌 함량 측정 실험 결과는 Table 4와 같다. 각 실험물질에 대한 멜라닌 생성 억제율은 농도가 증가함에 따라 유의하게 증가하였다.($f < 0.05$) 특히 율피 추출물 CIS-gel, CIS는 $4 \mu\text{g/ml}$ 이하의 농도에서 kojic acid보다 멜라닌 생성 저해 능력이 높았다. 또한 멜라닌 생성 IC_{50} 은 kojic acid의 $5.2 \mu\text{g/ml}$ 와 유사한 결과를 나타낸 CIS-gel이 $6 \mu\text{g/ml}$, CIS가 $7.9 \mu\text{g/ml}$, CIS jelly가 $8 \mu\text{g/ml}$ 순으로 ($p < 0.05$) 율피 추출물중에서 CIS-gel이 억제능이 가장 높았다.

Table 4. Inhibition effect of melanin production with chestnut bark ext. and kojic acid on B-16 melanoma cell

concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Melanin production inhibition rate (%)			
	CIS	CIS-gel	CIS jelly	Kojic acid
2	17.14	31.42	8.10	8.57
4	31.42	45.71	24.32	25.71
6	42.85	51.42	40.54	60
8	51.42	57.14	51.35	71.42
10	68.57	60	55.40	82.85
IC_{50}	7.9^a	6^b	8^a	5.2^c

· $f < 0.01$; significantly different from concentration of test substances.

· Same letters are not significantly different in case of IC_{50} ($p < 0.05$)

본 연구에서는 피부 미백 작용이 있다고 알려진 밤나무(*Castanea mollissima* BL.)의 열매인 밤의 속껍질(율피)로 부터 분리 정제한 율피추출물을 이용하여 시험관내 실험과 B-16 mouse melanoma 세포 실험에서 tyrosinase 활성 억제, 도파 자동산화 억제, 멜라닌 생성 억제 효과를 검증하였으며 비교물질로는 kojic acid를 사용하였으며 그 결과는 다음과 같다.

1. 시험관내 실험과 B-16 세포실험에서 율피 추출물인 CIS, CIS-gel, CIS jelly에 의한 tyrosinase 활성을 측정한 결과 농도가 증가함에 따라 tyrosinase 활성 억제율이 유의하게 증가하였다.
2. 시험관내 실험에서 율피 추출물에 의한 dopa auto-oxidation 억제율은 농도가 증가함에 따라 유의하게 증가하였다.
3. 시험관내 실험과 B-16 세포실험에서 율피 추출물에 의한 멜라닌 생성 억제율은 농도가 증가함에 따라 유의하게 증가하였으며, 특히 시험관내 실험에서 CIS는 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 단일 물질인 kojic acid보다 멜라닌 생성 억제율이 15배나 높게 나타났다.
4. B-16 세포에서 율피 추출물에 대한 생존률을 측정한 결과 정상군에 비교하였을 때 세포생존율에 영향이 없었다.

결론적으로 이러한 결과는 율피 추출물이 tyrosinase 활성 억제, 도파자동산화 억제, 멜라닌 생성 억제 효과를 동시에 가지고 있는 물질로써 저가의 새로운 미백화장품 원료로서 이용될수 있는 가능성이 높음을 보여준다고 할수 있다.

실험 2. 율피 · 솔잎 · 호프 추출물의 피부보호효과

1. 시험관내 tyrosinase 활성 억제 실험

율피 추출물(CIS-gel), 솔잎 추출물(PN), 호프 추출물(HOP) 및 kojic acid의 tyrosinase 활성 억제 실험 결과는 Fig.5 와 같다. 각 실험 물질들의 농도가 증가함에 따라 tyrosinase 활성 억제율이 유의하게 증가하였다($f < 0.01$). 또한 tyrosinase의 활성도의 IC_{50} (Inhibition concentration 50%)은 kojic acid가 11.27 $\mu\text{g/ml}$, CIS-gel이 62 $\mu\text{g/ml}$, PN 82 $\mu\text{g/ml}$, HOP 174 $\mu\text{g/ml}$ 순으로 추출물 중에서 CIS-gel의 억제능이 가장 높았다.

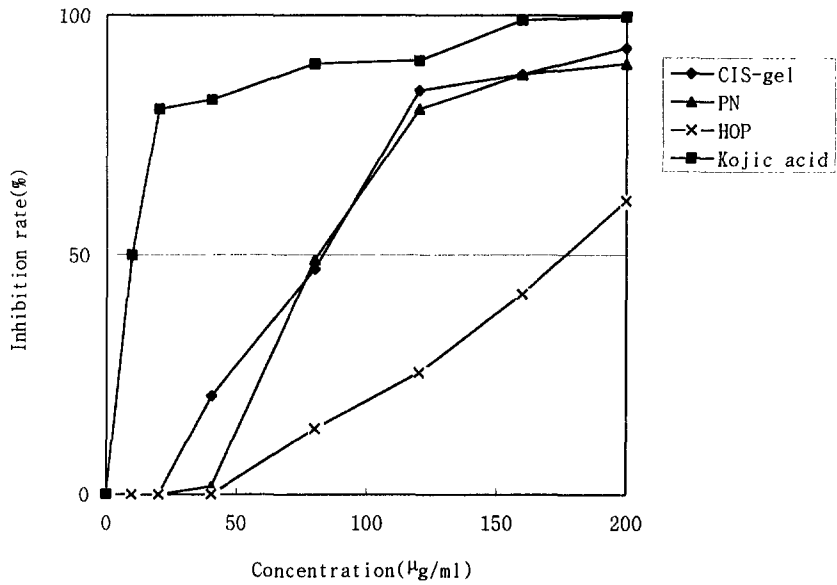


Fig. 3 Inhibitory effects of chestnut inner shell extract, pine tree leaf extract, hop extract and kojic acid on tyrosinase activity.

2) 시험관내 도파 자동산화

울피추출물(CIS-gel), 솔잎추출물(PN), 호프추출물(HOP) 및 kojic acid의 도파 자동산화 억제 실험 결과는 다음과 같다. 각 실험물질의 농도가 증가함에 따라 도파 자동산화 억제율이 유의하게 증가하였으며($f < 0.01$), 울피추출물(CIS-gel)과 호프추출물(HOP)은 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 억제능이 90% 정도로 kojic acid와 비슷한 억제효과를 나타내었다. 또한 도파 자동산화의 IC_{50} 은 kojic acid가 32 $\mu\text{g/ml}$, 울피추출물(CIS-gel)이 124 $\mu\text{g/ml}$, 호프추출물(HOP)가 126 $\mu\text{g/ml}$, 솔잎추출물(PN)이 146 $\mu\text{g/ml}$ 순으로 tyrosinase 활성 억제 실험에서와 마찬가지로 추출물 중에서 CIS-gel의 억제능이 가장 높았다.

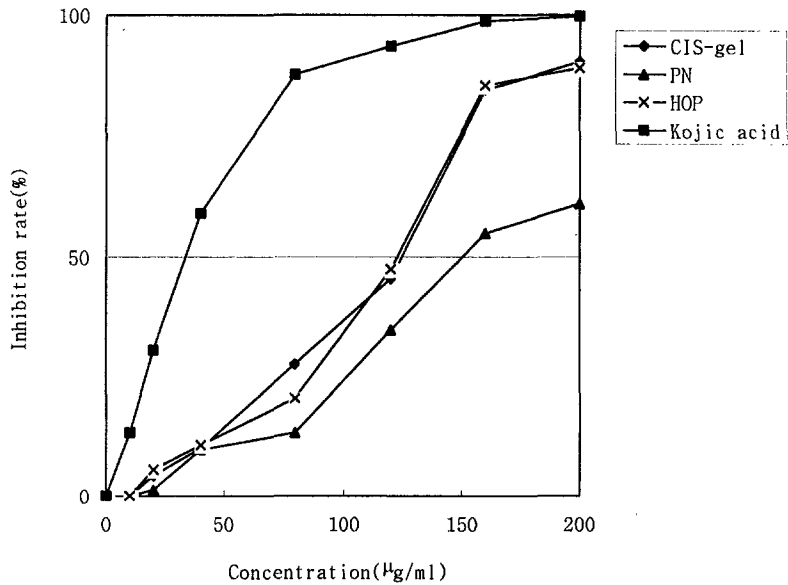


Fig. 4 Inhibitory effects of chestnut inner shell extract, pine tree leaf extract, hop extract and kojic acid on dopa auto-oxidation.

· $f < 0.01$; significantly different from concentration of test substances.

3. 시험관내 멜라닌 생성 억제 실험

울피추출물(CIS-gel), 솔잎추출물(PN), 호프추출물(HOP) 및 kojic acid의 농도가 증가함에 따라 멜라닌 생성 억제율이 유의하게 증가하였다. 각 실험물질의 멜라닌 생성 억제율은 10 µg/ml의 농도에서 HOP이 59.06%, PN 45.13%, CIS-gel이 14.86%, kojic acid가 3.96% 순으로 추출물이 단일물질인 kojic acid에 비해 멜라닌 생성 억제 효과가 높았다. 특히, 추출물중 HOP는 kojic acid보다 억제율이 15

배나 높았는데 이것은 호프 추출물이 현재 가장 많이 사용되고 효과가 인정되는 미백제인 kojic acid보다 높은 멜라닌 생성 억제능을 나타내어 상당히 높은 미백 효과를 보여주는 것이라 할수 있다.

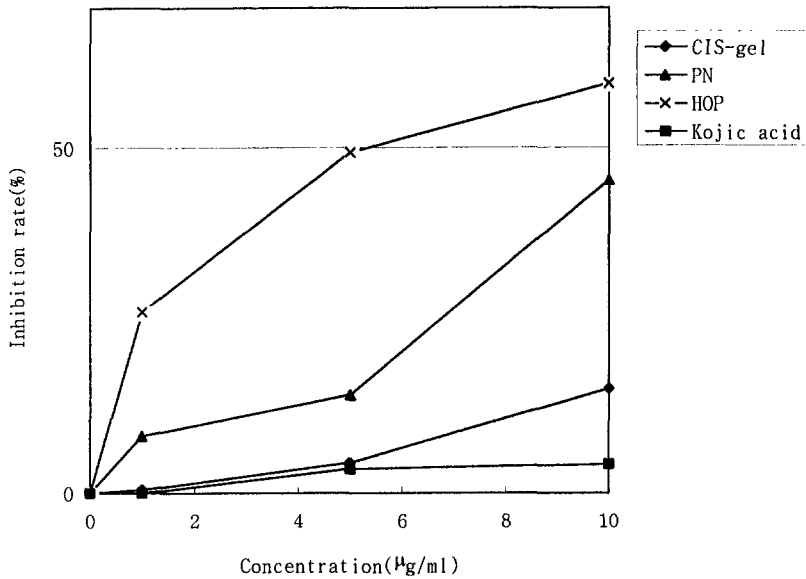


Fig. 5 Inhibitory effects of chestnut inner shell extract, pine tree leaf extract, hop extract and kojic acid on melanin production.

· $f < 0.01$; significantly different from concentration of test substances.

4 . UV 흡수 실험

율피추출물(CIS-gel), 솔잎추출물(PN), 호프추출물(HOP)은 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로, kojic acid는 25 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 200 - 400 nm에서 UV 흡수 실험을 한 결과 CIS-gel, HOP는 200 - 400 nm에서 UV를 흡수하지 않고, PN은 200 - 250 nm

에서 약한 흡수를 보이는데 반해 kojic acid는 200 - 290 nm에서 흡수를 하는 것으로 나타났다.

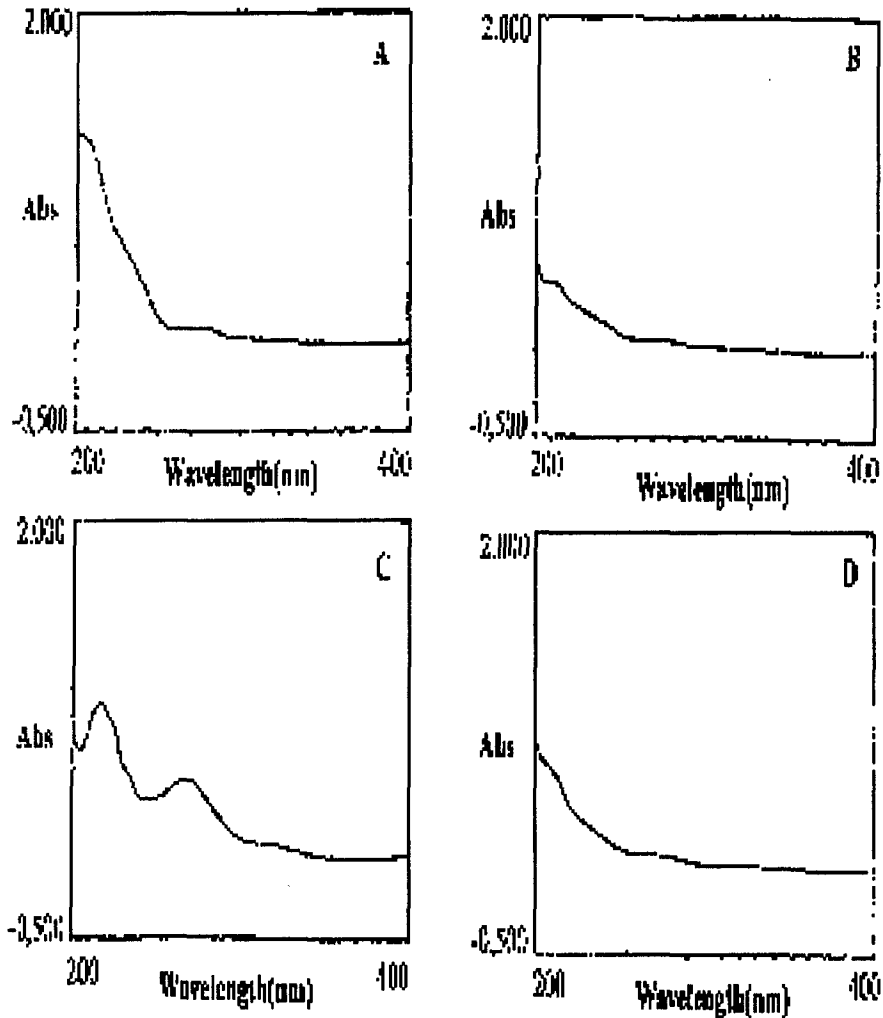


Fig. 6 Skin tissues from hairless mouse (HE stain, *100)

- A. skin tissues without treatment ; The epidermis is approximately 2-3 cell layers thick and loose arranged collagen bundles, sebaceous gland, hair follicle, and keratinized cyst are dermis.
- B. Skin tissues from UVB irradiated hairless mouse; Note the degenerated epithelial cells with 1-2 thick layers, thickened subcutaneous layers with increased collagen bundles and inflammatory cells under the epithelial layer.
- C: Skin tissues with treatment of tannic acid on UVB irradiated skin; Note the regenerated epithelial cell. The epidermis was thickened with 7-9 cell layers.

5. MTT assay

B 16 mouse melanoma cell에서 울피추출물(CIS-gel), 솔잎추출물(PN), 호프추출물(HOP) 및 kojic acid에 대한 생존률을 조사한 결과는 다음과 같다. 각 실험 물질을 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 투여한 처치군은 정상군에 비해 생존률이 86.1%, 89.63%, 89.05%, 87.92%이었으며, 각 실험 물질별로 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이하의 농도에서는 정상군과 비교했을 때 세포 생존률에 영향이 없었다. 따라서 각 실험물질에 의한 세포 독성은 없는 것으로 나타났다.

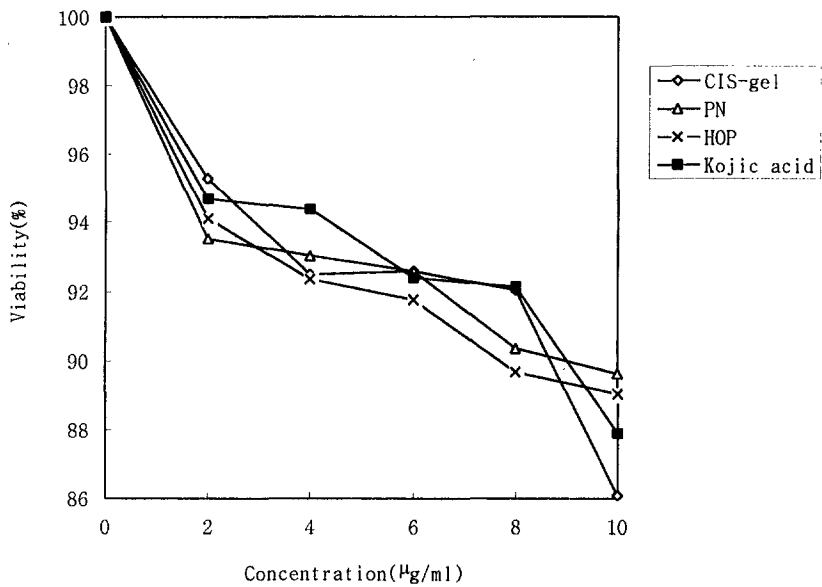


Fig. 7 The effects of chestnut inner shell extract, pine tree leaf extract, hop extract and kojic acid on viability of B 16 melanoma cell.

6. 세포내 tyrosinase 활성 억제 실험

B 16 melanoma cell의 tyrosinase 활성 억제 실험에서는 울피추출물(CIS-gel), 솔잎추출물(PN), 호프추출물(HOP) 및 kojic acid는 농도가 증가함에 따라 tyrosinase 활성 억제율이 농도 의존적으로 유의하게 증가하였다.($f < 0.01$) 각 실험물질들의 tyrosinase 활성 억제율은 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 kojic acid가 80.48%, CIS-gel이 63.41%, PN이 50.71%, HOP가 49.97%이었다. 또한 tyrosinase 활성도의 IC_{50} 은 CIS-gel이 1.9 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 으로 kojic acid 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 와 유사한 효과를 나타냈으며, CIS-gel이 시험관내 실험에서와 동일하게 tyrosinase의 활성 억제 효과가 가장 높았다.

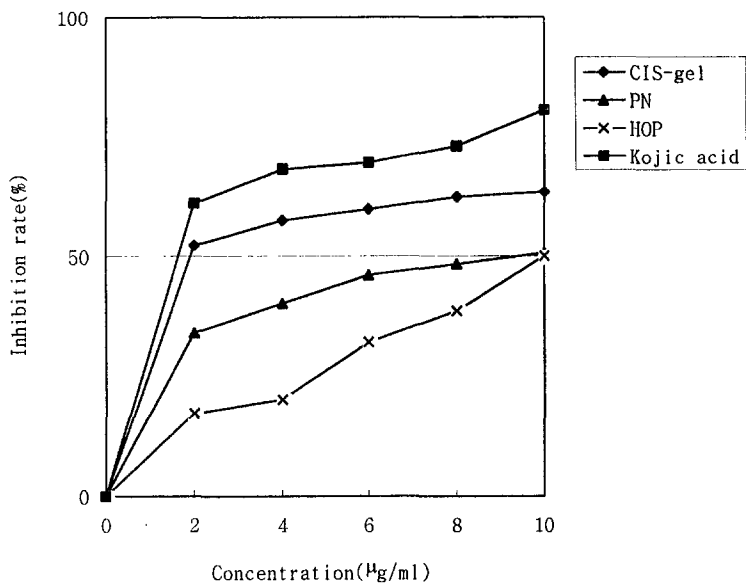


Fig. 8 Inhibitory effects of chestnut inner shell extract, pine tree leaf extract, hop extract and kojic acid on tyrosinase activity in B 16 melanoma cell.

· $f < 0.01$; significantly different from concentration of test substances.

7. 세포내 멜라닌 생성 억제 실험

B 16 melanoma cell에서 울피추출물(CIS-gel), 솔잎추출물(PN), 호프추출물(HOP) 및 kojic acid에 의한 멜라닌 생성억제 실험을 하였다. 각 실험물질에 대한 멜라닌 생성 억제율은 농도가 증가함에 따라 유의하게 증가하였다.($f < 0.01$) 특히 CIS-gel, PN, HOP는 $4 \mu\text{g/ml}$ 이하의 농도에서 kojic acid보다 멜라닌 생성 저해능이 높았다. 또한 멜라닌 생성 IC_{50} (Inhibition concentration 50%)은 kojic acid의 $5.2 \mu\text{g/ml}$ 와 유사한 결과를 나타낸 CIS-gel이 $6 \mu\text{g/ml}$, PN이 $8 \mu\text{g/ml}$, HOP가 $8.1 \mu\text{g/ml}$ 순으로 추출물 중에서 CIS-gel이 억제능이 가장 높았다.

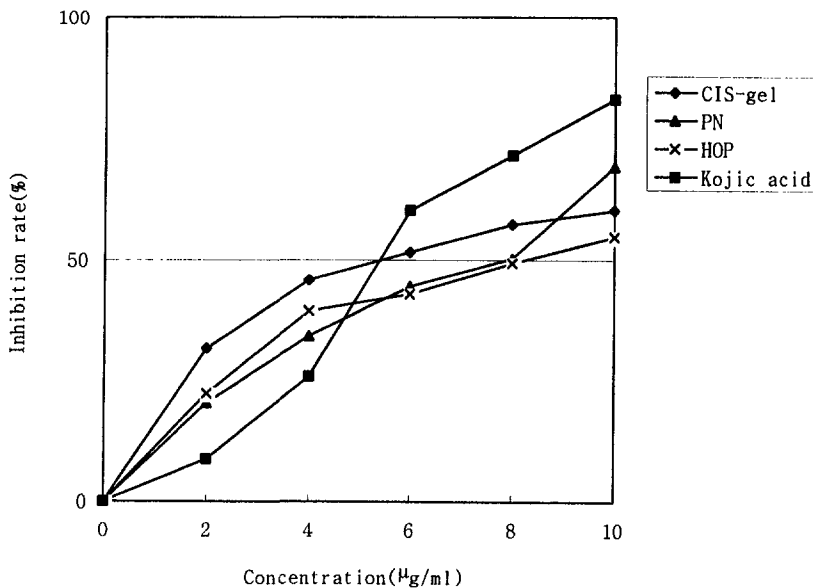


Fig. 9. Inhibitory effects of chestnut inner shell extract, pine tree leaf extract, hop extract and kojic acid on melanin production in B 16 melanoma cell.

· $f < 0.01$; significantly different from concentration of test substances.

본 연구에서는 폴리페놀류인 울피, 솔잎, 호프의 추출물을 이용하여 시험관내 실험과 B 16 mouse melanoma 세포 실험에서 kojic acid를 비교물질로 사용하여 tyrosinase 활성 억제, dopa 자동산화 억제, 멜라닌 생성 억제 효과를 측정 한 결과는 다음과 같다.

1. 시험관내 실험과 B 16 세포실험에서 울피 추출물, 솔잎 추출물, 호프 추출물은 농도가 증가함에 따라 tyrosinase 활성 억제율이 유의하게 증가하였으며, 각각의 IC₅₀은 62 $\mu\text{g/ml}$, 82 $\mu\text{g/ml}$, 174 $\mu\text{g/ml}$ 이었다.
2. 시험관내 실험에서 울피 추출물, 솔잎 추출물, 호프 추출물에 의한 dopa auto-oxidation 억제율은 농도가 증가함에 따라 유의하게 증가하였으며, 각각의 IC₅₀은 124 $\mu\text{g/ml}$, 146 $\mu\text{g/ml}$, 126 $\mu\text{g/ml}$ 이었다.
3. 시험관내 실험과 B 16 세포 실험에서 울피 추출물, 솔잎 추출물, 호프 추출물에 의한 멜라닌 생성 억제율은 농도가 증가함에 따라 유의하게 증가하였으며, 특히 시험관내 실험에서 호프 추출물은 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 단일 물질인 kojic acid보다 멜라닌 생성 억제율이 15배나 높게 나타났다.
4. 각각의 추출물에 대한 B 16 세포의 생존률은 정상군과 유사하게 나타나는 것으로 보아 세포독성이 없는 것으로 고려된다.

실험 3. 울피팩의 계절별 피부보습효과

1. 여대생의 얼굴 볼 부위의 계절별 평균 수분량과 피지량변화

본 실험의 결과 여름철에는 여대생 볼부위의 평균 수분량이 $55.74 \pm 3.58\text{AU}$, 피지량이 $10.00 \pm 2.77\mu\text{g/cm}^2$ 였으며, 가을철에는 평균 수분량이 $36.96 \pm 2.78\text{AU}$, 평균 피지량이 $7.20 \pm 2.24\mu\text{g/cm}^2$ 였다. 본 실험에 의하면 가을철에 비해 여름철의 수분량

은 통계적으로 유의하게 증가하였다. 가을철에 비해 여름철 피지량은 통계적인 차이는 없지만 피지량은 증가하였다. (Table 5)

Table 5. Changes of Moisture and sebum on face (summer and autumn)
(moisture: AU, sebum : $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, N=20, mean \pm SD)

	summer	autumn
temperature, humidity	28 \pm 3 $^{\circ}\text{C}$, 67 \pm 13%	20 \pm 1 $^{\circ}\text{C}$, 66 \pm 4%
moisture	55.74 \pm 3.58 ^a	36.96 \pm 2.78 ^b
sebum	10.00 \pm 2.77 ^A	7.20 \pm 2.24 ^A

1) same letters are not significant

2. 율피 파우더 팩의 함량에 따른 수분량과 피지량의 변화

율피 파우더 함량에 따른 팩실험한 결과, 평균 수분 증가량이 율피 파우더 0%팩은 12.13 \pm 1.78, 율피 파우더 6%팩은 21.60 \pm 4.15, 율피 12%팩은 23.76 \pm 0.84AU였다. 수분은 율피 농도가 12%까지 증가함에 따라 증가하였다. 팩전에 비해 팩후의 볼의 수분 함량은 모두 통계적으로 유의하게 증가하였다.(p<0.05) 또한 율피 파우더 함량에 따른 팩의 수분 증가량은 율피 파우더 12%팩이 율피 파우더 0%팩에 비해 통계적으로 유의하게 증가하였다. (p<0.05)

평균 피지의 증가량은 율피 파우더 0%팩은 2.66 \pm 0.66, 율피 파우더 6%팩은 3.00 \pm 0.57, 율피 파우더 12%팩은 5.66 \pm 0.66 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 였다. 수분 증가량과 마찬가지로 율피 파우더 함량이 12%까지 증가함에 따라 팩후의 볼의 피지량이 증가하였다.

또한 울피 파우더 함량에 따른 팩의 피지 증가량을 보면 울피 파우더 12%팩이 울피 파우더 0%, 울피 파우더 6%팩 비하여 통계적으로 유의하게 증가하였다. (Table 6)

Table 6. Moisturizing effects of pack of chestnut inner shell's powder's content

(moisture : AU, sebum : /cm², N=3, 평균±표준편차)

		0%	6%	12%
moisture	before	29.00±2.04	28.46±2.14	38.33±3.07
	after	37.80±6.35*	50.66±5.43*	62.10±2.92**
	Δ	12.13±1.78 ^{bc}	21.60±4.15 ^{ab}	23.76±0.84 ^a
sebum	before	4.00±1.15	7.33±0.66	8.00±4.04
	after	6.66±0.66	10.33±8.66	13.66±3.48
	Δ	2.66±0.66 ^b	3.00±0.57 ^b	5.66±0.66 ^a

1) same letters are not significant.

2) *p<0.05, **p<0.01 : Significantly different from before the pack.

3. 탄닌함유팩에 의한 수분량과 피지량의 변화

탄닌 성분이 함유된 자연재료들의 팩전과 팩 1시간후의 수분과 피지를 계절별로 측정된 결과는 다음과 같다. 여름철의 탄닌 성분이 함유된 자연재료 별 평균 수분 증가량은 울피 파우더팩, 도토리 파우더팩, 차잎 파우더 팩순이었고, 여름철의 평균 피지의 증가량은 울피 파우더팩, 차잎파우더, 도토리파우더팩, 감잎파우더팩순이었다.

가을철의 탄닌 성분이 함유된 자연재료 별 평균 수분 증가량과 피지증가량도 여름과 마찬가지로 율피 파우더팩이 가장 높았다. (Table 7)

Table 7. Moisturizing of facial pack of Chestnut's powder and commercial.

(summer and autumn)

(moisturizing : AU, sebum : $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, N=3, mean)

			A	B	C	D	E	F
summer	moisture	before	46.90	74.66	71.50	71.36	77.53	47.76
		after	56.96	82.63	75.06	73.36	83.20	57.00
		Δ	10.43 ^a	7.69 ^{ab}	3.56 ^{abc}	2.00 ^{bc}	5.66 ^{abc}	7.23 ^a
	sebum	before	8.66	7.66	9.66	9.33	7.66	11.66
		after	15.00	8.66	12.66	15.00	11.33	14.66
		Δ	6.33 ^A	3.33 ^A	3.33 ^A	5.66 ^A	3.66 ^A	3.00 ^A
fall	moisture	before	33.90	34.63	29.33	31.16	34.86	34.66
		after	49.83 [*]	44.20	39.00	40.33	43.20	45.86
		Δ	15.93 ^a	9.90 ^{ab}	9.66 ^b	9.16 ^b	8.66 ^b	11.20 ^a
	sebum	before	7.00	6.66	7.66	8.33	5.33	6.33
		after	15.66	14.66	12.66	14.33	9.00	13.33
		Δ	8.66 ^A	8.00 ^A	5.00 ^{AB}	6.00 ^{AB}	3.66 ^{AB}	7.00 ^A

1) same letters are not significant.

2) A : pack of chestnut inner shell's powder

B : commercial pack made of potato

C : commercial pack made of honey

D : commercial pack made of vitamin

E : commercial pack made of worm wood (kind of herb)

F : pack of green tea powder

4. 율피 파우더 팩과 시중판매 팩의 효과 비교

팩후의 불의 수분과 피지 증가량이 율피 파우더팩이 가장 높았으므로, 시중에서 판매되고 있는 천연재료를 소재로 한 팩제품 중에서 감자팩, 꿀팩, 비타민팩, 썩팩, 해조팩을 율피 파우더팩과 계절별로 비교해보았다. 율피 파우더팩과 마찬가지로 시중팩의 효과를 비교하기 위하여 팩전과 팩후의 1시간후의 불의 수분과 피지를 측정한 결과는 다음과 같다.

팩전과 팩후 불의 수분 증가량은 율피 파우더팩이 시중판매 팩보다 높게 증가하였으며, 비타민, 해조팩보다는 통계적으로 유의하게 증가하였다.($P < 0.05$) 팩전과 팩후 불의 피지 증가량은 수분량과 마찬가지로 율피 파우더팩이 시중판매 팩보다 높게 증가하였다. (Table 8)

Table 8. Moisturizing of facial pack of Chestnut's powder and commercial.

(summer and autumn)

(moisturizing : AU, sebum : $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, N=3, mean)

			A	B	C	D	E	F
summer	moisture	before	46.90	74.66	71.50	71.36	77.53	47.76
		after	56.96	82.63	75.06	73.36	83.20	57.00
		Δ	10.43 ^a	7.69 ^{ab}	3.56 ^{abc}	2.00 ^{bc}	5.66 ^{abc}	7.23 ^a
	sebum	before	8.66	7.66	9.66	9.33	7.66	11.66
		after	15.00	8.66	12.66	15.00	11.33	14.66
		Δ	6.33 ^A	3.33 ^A	3.33 ^A	5.66 ^A	3.66 ^A	3.00 ^A
fall	moisture	before	33.90	34.63	29.33	31.16	34.86	34.66
		after	49.83 [*]	44.20	39.00	40.33	43.20	45.86
		Δ	15.93 ^a	9.90 ^{ab}	9.66 ^b	9.16 ^b	8.66 ^b	11.20 ^a
	sebum	before	7.00	6.66	7.66	8.33	5.33	6.33
		after	15.66	14.66	12.66	14.33	9.00	13.33
		Δ	8.66 ^A	8.00 ^A	5.00 ^{AB}	6.00 ^{AB}	3.66 ^{AB}	7.00 ^A

1) same letters are not significant.

2) A : pack of chestnut inner shell's powder

B : commercial pack made of potato

C : commercial pack made of honey

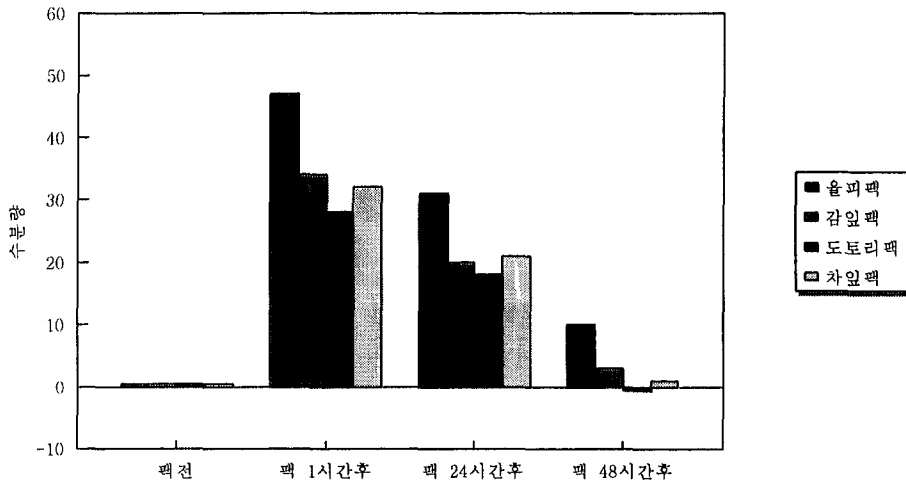
D : commercial pack made of vitamin

E : commercial pack made of worm wood (kind of herb)

F : pack of green tea powder

5. 탄닌 성분이 함유된 자연재료들의 팩후 수분과 피지의 경시별 비교

울피 파우더팩, 감잎팩, 도토리팩, 차잎팩의 팩전, 팩 1시간후, 팩 24시간후, 팩 48시간후의 수분량과 피지량의 변화를 관찰한 결과는 다른 팩은 팩 48시간이 지난 후는 팩 전의 상태와 거의 같은 수분과 피지량을 보였다. 그러나 울피 파우더팩은 팩 48시간 후에도 팩전 상태보다 증가한 수분량과 피지량 남아 있었다.



<Fig.12> Change of time course face's moisture after pack.

바) 각질제거효과

울피 파우더팩 전과 팩 후의 여대생 얼굴의 볼 부위를 Beauty Vision K1을 이용하여 사진을 찍어 비교해 보았다. 팩전의 볼 부위의 각질이 많이 나타나 있지만, 팩 후 볼 부위의 각질이 거의 제거된 것을 알수 있다.

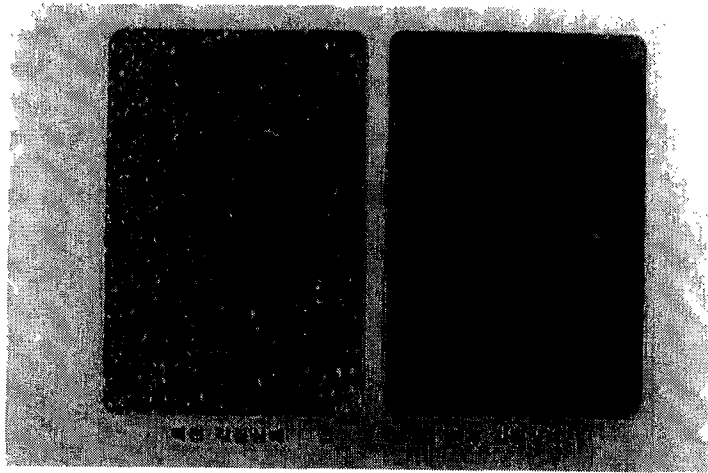


Fig.11 The degree of keratinocyte before and after packing with chestnut inner shell's powder

본연구는 이미 한방과 민간에서 널리 이용되고 있는 탄닌성분을 함유하고 있는 자연재료 중에서 울피 파우더를 팩재료로 이용하여 피부 각질층의 수분과 피지의 증가량을 중심으로 피부보습효과가 있는지 실험하였다. 우선 민간에서 팩재료의 양을 적당히 넣어 사용하고 있는 것을 피부의 보습효과를 최대로 높일수 있는 울피 파우더와 팩의 기본재료(밀가루, 효모, 꿀, 우유)의 양으로 정량화 하였으며 탄닌성분이 함유된 감잎, 도토리, 차잎을 팩재료로 이용하여 울피 파우더팩과 피부의 보습효과를 비교하였고, 시중에서 판매되는 팩중 천연물질을 주성분으로 하고 있는 감자팩, 꿀팩, 쑥팩, 해조팩을 구입하여 울피 파우더팩과 피부보습효과를 비교하였다. 본연구는 in vivo 실험으로 여대생의 얼굴중 볼 부위를 중심으로 팩전과 팩후의 수분량과 피지량의 차이를 비교하였으며 그 결과는 다음과 같다.

1. 여름과 가을철에 여대생을 대상으로 볼 부위의 수분 량과 피지량 측정한 결과

여름철의 평균수분량과 피지 량이 가을철의 평균수분량과 피지량 높았다.

2. 율피 파우더 0%, 율피 파우더 6%, 율피 파우더 12%농도 별로 팩 실험한 결과 율피 파우더 12% 농도의 팩이 팩후의 수분량과 피지량이 가장 높게 증가했다.
3. 탄닌 성분의 자연재료인 율피 파우더, 감잎, 도토리, 차잎을 사용하여 계절별로 팩실험을 해본 결과 여름철의 팩후 볼 부위의 수분량과 피지량의 증가는 율피 파우더가 가장 높았으며, 가을철의 팩후 볼 부위의 수분량과 피지량의 증가에서도 율피 파우더가 가장 효과가 좋았다.
4. 율피 파우더팩과 시중에서 판매팩 중 천연재료를 소재로 한 감자팩, 꿀팩, 비타민팩, 썩팩, 해조팩을 이용하여 계절별로 팩 실험한 결과 여름철의 팩후 볼 부위의 수분량과 피지량의 증가에서 율피 파우더가 가장 높았으며, 가을철의 팩후 볼 부위의 수분량과 피지량의 증가에서도 율피 파우더가 가장 효과가 좋았다.
5. 탄닌성분이 함유된 자연재료(율피 파우더, 감잎, 도토리, 차잎)들로 팩 실험을 한 후, 여대생의 볼 부위의 수분 량과 피지량 경시별 변화를 관찰한 결과, 팩 1시간후의 수분 량과 피지량 가장 높게 나타났으며, 팩 24시간 후는 팩 1시간 후의 수분량과 피지량보다 감소를 보였고, 팩 48시간 후는 팩전의 수분량과 피지량만큼 감소를 보였다. 율피 파우더는 팩 48시간 후에도 팩전 보다 높은 수분량과 피지량을 보였고, 감잎팩은 팩48시간 후에 팩전보다 수분량은 높았지만 피지량은 같았다. 도토리팩과 차잎팩은 팩48시간 후에 팩전보다도 낮은 수분량과 피지량을 보였다.
6. 율피 파우더 팩전과 팩후의 여대생 얼굴 중 볼 부위의 각질상태를 비교해 본 결과 팩후 볼 부위의 각질이 거의 제거되었다.

실험 4. 합성 탄닌 유도체의 미백효과 연구

1. 시험관내실험

가. Tyrosinase 활성 억제 실험

Stearyl gallate, methyl gallate, hexyl gallate의 tyrosinase 활성 억제 실험 결과는 다음과 같다. 각 실험 물질들의 농도가 증가함에 따라 tyrosinase 활성 억제율이 증가하였다. 또한 tyrosinase의 활성도의 IC_{50} (Concentrate at 50% inhibition)은 methyl gallate이 $5.875 \times 10^{-4}M$, stearyl gallate이 $6.31 \times 10^{-4}M$, hexyl gallate가 $6.39 \times 10^{-3}M$ 순으로($p < 0.05$) 실험물질중에서 methyl gallate의 억제능이 가장 높았다.

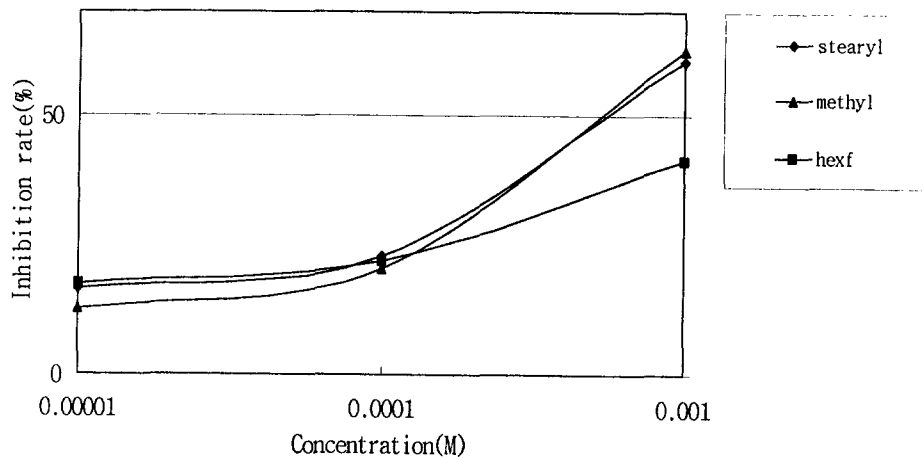


Fig. 12 Inhibiton effect of tyrosinase activity of synthetic gallate derivatives

나. 멜라닌 함량 측정(Assay of melanin content)

Stearyl gallate, methyl gallate, hexyl gallate의 멜라닌 함량을 측정한 결과 stearyl gallate, methyl gallate는 농도가 증가함에 따라 멜라닌 생성 억제율이 증가하였으나 hexyl gallate는 감소하였다.(Table 9)

Table 9. Inhibition effect of melanin production with stearyl gallate, methyl gallate and hexyl gallate in vitro

	$10^{-3}M$	$10^{-4}M$	$10^{-5}M$
Stearyl gallate	9.58%	9.12%	3.64%
Methyl gallate	6.95%	5.19%	4.16%
Hexyl gallate	0.54%	2.39%	7.3%

2. 세포 실험

가. 세포 생존률(MTT assay)

B-16 mouse melanoma cell에서 stearyl gallate, methyl gallate, hexyl gallate, kojic acid에 대한 생존률을 조사한 결과는 다음과 같다. 각 실험 물질을 $10^{-4}M$ 농도로 투여한 처치군은 정상군에 비해 생존률이 90.45%, 88.80%, 84.10%, 82.45%이었으며, 각 실험 물질별로 $10^{-5}M$ 이하의 농도에서는 정상군과 비교했을 때 세포 생존률에 영향이 없었다. 따라서 각 실험물질에 의한 세포 독성은 없는 것으로 나타났다.(Table 10)

Table 10. The effect of stearyl gallate, methyl gallate, hexyl gallate and kojic acid on viability of B 16 melanoma cell

	10^{-4} M	10^{-5} M	10^{-6} M
Stearyl gallate	90.45%	92.37%	98.76%
Methyl gallate	88.80%	94.68%	98.48%
Hexyl gallate	84.10%	94.37%	97.86%
Kojic acid	82.45%	86.13%	90.32%

나. Tyrosinase 활성 억제 실험

B-16 melanoma cell의 tyrosinase 활성 억제 실험에서는 stearyl gallate, methyl gallate, hexyl gallate, kojic acid는 농도가 증가함에 따라 tyrosinase 활성 억제가 농도 의존적으로 증가하였다. 각 실험물질들의 tyrosinase 활성 억제율은 10^{-4} M 농도에서 stearyl gallate가 70.13%, hexyl gallate가 61.95%, methyl gallate가 44.56% kojic acid가 47.94%이었다. 또한 tyrosinase 활성도의 IC_{50} 은 stearyl gallate가 9.6×10^{-8} M, hexyl gallate가 2.028×10^{-5} M, methyl gallate가 3.67×10^{-4} M, kojic acid가 1.26×10^{-4} M 순으로 digallic acid의 유도체가 단일물질인 kojic acid보다 tyrosinase의 활성 억제 효과가 더 높은 것으로 나타났다.(Table 11)

Table 11. Inhibition effect of tyrosinase activity with stearyl, methyl, hexyl and kojic acid on B 16 melanoma cell

	10^{-4} M	10^{-5} M	10^{-6} M	IC ₅₀
Stearyl gallate	70.13%	63.16%	56.90%	9.6×10^{-8} M
Methyl gallate	44.56%	35.83%	25.19%	3.67×10^{-4} M
Hexyl gallate	61.95%	46.73%	25.18%	2.028×10^{-5} M
Kojic acid	47.94%	32.77%	18.89%	1.26×10^{-4} M

다. 멜라닌 함량 측정(Assay of melanin content)

B-16 melanoma cell에서 stearyl gallate, methyl gallate, hexyl gallate, kojic acid에 대한 멜라닌 함량 측정 실험을 하였는데 그 결과는 다음과 같다. 각 실험 물질에 대한 멜라닌 생성 억제율은 농도가 증가함에 따라 증가하였다. 특히 stearyl gallate, methyl gallate, hexyl gallate는 10^{-6} M 이상 농도에서 kojic acid보다 멜라닌 생성 저해능이 높았다. 또한 멜라닌 생성 IC₅₀은 hexyl gallate가 10^{-7} M, kojic acid는 2.45×10^{-7} M, stearyl gallate가 3.65×10^{-7} M, methyl gallate이 4.84×10^{-7} M 순으로 ($p < 0.05$) 실험물질 중에서 hexyl gallate가 억제능이 가장 높았다.(Table 12)

Table 12. Inhibition effect of melanin production with stearyl gallate, methyl gallate, hexyl gallate and kojic acid on B 16 melanoma cell

	10 ⁻⁵ M	10 ⁻⁶ M	10 ⁻⁷ M	10 ⁻⁸ M	IC ₅₀
Stearyl-gallate	74.56%	67.50%	36.42%	18.04%	3.65 × 10 ⁻⁷ M
Methyl-gallate	73.09%	58.38%	34.84%	21.90%	4.84 × 10 ⁻⁷ M
Hexyl-gallate	68.58%	62.16%	50.06%	23.08%	10 ⁻⁷ M
Kojic acid	66.71	52.89%	47.20%	36.77%	2.45 × 10 ⁻⁷ M

합성 탄닌 유도체를 사용하여 시험관내 실험과 멜라닌 세포에서의 미백효과실험 결과 현재 판매중인 kojic acid에 비해 그 효과가 높지 않았다. 그러나 hexyl gallate는 멜라닌 세포를 이용한 멜라닌 색소억제실험에서 kojic acid 보다 멜라닌 색소억제능이 높아 앞으로 지속적인 연구를 통해 보완하면 새로운 미백제로서의 역할이 기대된다.

실험 5 : 율피 추출물과 합성탄닌을 이용한 피부보호효과

1. 율피가루팩과 율피추출물팩의 효과비교

평균 수분 증가량은 율피추출물 2% 팩이 18.10 ± 1.81, 율피추출물 1% 팩이 16.30 ± 1.85, 율피팩이 15.93 ± 2.34AU였으며, 팩전에 비하여 팩후 볼의 수분 증가량은 모두 통계적으로 유의하게 증가하였다.(p < 0.05) 평균 피지 증가량은 율피추출물 2% 팩이 11.33 ± 2.02, 율피추출물 1% 팩이 10.66 ± 2.33, 율피팩이 8.66 ± 0.66 μg/cm²

었다. 팩전과 비교해 팩후의 볼의 피지 증가량은 통계적으로는 의미가 없었지만, 모두 증가하였고 특히 율피추출물 2%팩이 가장 많이 증가하였다. 율피팩, 율피추출물 1% 팩, 율피추출물 2%팩의 농도별로 비교해 보면, 평균 수분 증가량과 평균 피지증가량은 통계적으로는 의미 있게 증가하지는 않았지만, 율피팩의 평균 수분량과 평균 피지량보다도 더 높게 증가하였으며, 시중팩의 평균 수분량과 평균 피지량에 비교하면 월등하게 증가하였다.(Table 13)

Table 13. Moisturizing pack of chestnut inner shell's powder and chestnut inner shell's extract (autumn)

(moisturizing : AU, sebum : $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, N=3, mean \pm SD)

		powder	ext 1 %	ext. 2%
moisture	before	33.90 \pm 1.42	43.13 \pm 5.14	45.10 \pm 2.62
	after	49.83 \pm 3.49*	59.43 \pm 1.94**	63.40 \pm 2.95**
	Δ moisture	15.93 \pm 2.34 ^a	16.30 \pm 1.85 ^a	18.10 \pm 1.81 ^a
sebum	before	7.00 \pm 4.04	8.66 \pm 2.96	9.33 \pm 5.89
	after	15.66 \pm 7.68	19.33 \pm 5.20	20.66 \pm 4.17
	Δ sebum	8.66 \pm 0.66 ^A	10.66 \pm 2.33 ^A	11.33 \pm 2.02 ^A

1) same letters are not significant.

2) *p<0.05, **p<0.01 : Significantly different from before the pack.

2. 율피추출물의 함유농도별 피부보호효과

율피추출물을 시중 팩제품의 기본원료를 사용하여 율피추출물을 1 또는 2%를 넣어 팩을 만들어 팩의 효과를 비교한 결과는 다음과 같다.

평균 수분증가량은 율피추출물 1%팩은 35.43 ± 2.06 , 율피추출물 2%팩은 33.86 ± 1.03 AU였다. 팩후의 볼 부위 수분 증가량은 율피추출물팩 모두 통계적으로 유의하게 증가하였다.($p < 0.05$)

평균 피지증가량은 율피추출물 1%팩이 12.00 ± 2.00 , 율피추출물 2%팩이 12.66 ± 1.85 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 였다.

율피추출물1%팩, 율피추출물 2%팩 모두 팩전과 비교해 팩후 증가한 수분량과 피지량이 통계적으로 유의하게 증가하였지만, ($p < 0.05$) 율피추출물의 농도별 비교를 보면 평균 수분량과 평균 피지량은 통계적 차이는 없었다. 그러나 지금까지 실험해 온 율피팩과 탄닌성분이 함유된 자연 팩과 팩후 증가한 수분과 피지량을 비교하면 매우 효과가 뛰어났으며, 시중 팩과의 팩후 증가한 수분과 피지량을 비교하면 3배이상 효과가 뛰어났다.(Table 14)

Table 14. Moisturizing pack of chestnut inner shell's extract (autumn)

(moisturizing : AU, sebum : $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, N=3, mean \pm SD)

		chestnut inner shell's ext. 1% pack	chestnut inner shell's ext. 2% pack
moisture	before	28.00 ± 2.64	25.76 ± 1.43
	after	$63.43 \pm 2.72^{**}$	$59.63 \pm 1.73^{**}$
	Δ moisture	35.43 ± 2.06^a	33.86 ± 1.03^a
sebum	before	7.66 ± 1.85	3.66 ± 0.88
	after	$19.66 \pm 2.18^*$	$16.33 \pm 1.20^{**}$
	Δ moisture	12.00 ± 2.00^A	12.66 ± 1.85^A

1) same lettres are not significant.

2) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$: Significantly different from before the pack.

3. 합성 탄닌 유도체를 함유한 팩의 효과

합성 탄닌유도체 와 울피 추출물을 0.1 % 첨가하여 팩으로 만들어 얼굴에 도포한 후 , 팩전후의 얼굴의 수분 변화를 관찰한 결과 stearyl gallate 의 수분 증가율이 가장 높았고, 다음이 울피추출물이었으며, hexyl gallate, methyl gallate 순이었다. stearyl gallate 와 울피추출물 은 hexyl gallate 와 methyl gallate 에 비해 통계적으로 유의하게 수분이 증가하였다.($p < 0.05$) (Table 15)

Table 15. Moisturizing pack of chestnut inner shell's extract (CIS) and synthetic tannic acid derivatives (stearyl gallate(SG), methyl gallate(MG), hexyl gallate (HG))

(moisturizing : AU N=10,)

		CIS (0.1%)	SG(0.1%)	MG(0.1%)	HG(0.1%)
moisture	before	27.82	31.28	29.68	27.82
	after	45.95**	51.86**	43.10**	41.46**
Δ moisture		18.13 ^a	18.58 ^a	13.42 ^b	13.64 ^b

1) same letters are not significant.

2) ** $p < 0.01$: Significantly different from before the pack.

2) 연구개발활용방안

(1) 화장품 (팩) 개발 : 자외선 으로 인한 손상을 방어함은 물론 피부생리개선효과가 높은 기능성 팩제의 개발

(2) 의약품으로의 개발 : 자외선으로 인한 일광화상을 예방하고 치료하는 기능을 가진 피부 연고제 개발

3) 기대되는 성과

- (1) 농민수입증가 : 폐자원인 율피의 부가가치를 높여 농가의 수입을 증가시킴.
- (2) 수입대체효과 : 고가의 수입품인 알부틴과 코직산의 수입 대체로 국가 경쟁력 제고

제 5 장 식품 및 식용유의 항산화제 이용기술

확립

제 1 절 서 설

일반적으로 항산화제는 그 기작으로 분류해보면 주로 BHA, BHT와 같은 free radical terminator, ascorbic acid나 glucose oxidase 와 같은 reducing agent, citric acid와 EDTA와 같은 금속제거제가 알려져 있다⁽¹⁾. 유지 또는 유지함유 식품의 산패를 방지하기위해 수많은 합성 또는 천연 항산화 물질이 개발되어 있으나, 가장 널리 이용되고 있는 항산화제는 phenolic compound로서 인공합성물인 butylated hydroxyanisole(BHA), butylatedhydroxytoluene(BHT), 그리고, tertiarybutylhydroquinone(TBHQ) 등이 알려져 있으며⁽²⁾ 이들은 항산화제중의 OH기가 유지의 free radical 수용체로서 유지의 초기단계에서 생성되는 free radical을 안정된 resonance hybrid로 형성되게하여 산화억제 작용을 하는 것으로 보고되고 있다⁽³⁾. 효과와 경제성⁽⁴⁾ 및 안전성을 고려하여 많이 사용되고 있는 것은 합성 항산화제인 BHA, BHT이며, 천연 항산화제로서는 토코페롤정도이다. 그러나 합성항산화제는 간비대, 간장중 microsomal enzyme activity의 증가, 체내 흡수물질의 일부가 독성물 혹은 발암성물질화한다⁽⁵⁻⁷⁾는 연구결과에 따라 천연화합물에 대한 식품첨가물의 요구가 증가함에 따라 항산화제로 천연화합물에 함유되어 있는 페놀류의 항산화작용에 대한 연구가 많이 이루어지고 있으며⁽⁸⁻¹²⁾, 천연으로부터 얻은 항산화제로 대체하려는 시도가 활발히 수행되고 있다⁽⁷⁾. 천연물로서 가장 널리 이용되고 있는 토코페롤은 식물성 기름에 효과가 낮고 가격이 대단히 고가⁽¹³⁾인 단점이 있다. 탁월한 항산화 효과와 경제성 때문에 많이

이용되는 합성항산화제는 안전성과 소비자의 거부감이 날로 심해지고 있기 때문에 근래에는 인간이 안전하게 오랫동안 먹어 왔던 식물로부터 항산화효과가 있는 물질을 분리, 이용하려는 시도가 활발히 이루어지고 있다⁽¹³⁻¹⁵⁾. 식용 또는 약재로 사용하고 있는 천연물 중에는 토코페롤, 향신료 추출물, sesamol, flavonoid, phenol유도체, gallic acid, 차잎 추출물등의 항산화물질이 존재하는데 토코페롤만큼 항산화력이 높고 실용적인 것은 없는 것으로 알려져 있다⁽¹⁶⁾.

페놀성 물질은 종류도 다양하고, 식물계에 널리 존재하는데, 다양한 구조와 분자량을 가지고 있다. 일반적으로 페놀성 물질을 phenolic acid 및 coumarin류, flavonoid류, 그리고 탄닌류(hydrolyzable 및 condensed tannins)의 세 그룹으로 나누며 그 구조에 따라 이화학적 성질 및 생리적 기능이 달리 나타난다⁽¹⁷⁾. 페놀성 물질은 그들의 phenolic hydroxyl그룹때문에 단백질 또는 효소단백질, 기타 거대분자들과 결합하는 성질, 항산화효과, 2가 금속이온과의 결합력을 가진다. 일부 비상용 식품과 동물사료로 사용되는 식물에는 탄닌류가 상당히 높은 농도로 존재하여 떼은 맛을 주어 식이섭취량을 저하시키고 단백질과의 상호작용으로 효소활성의 저해와 단백질 배설을 증가시키며 Fe이용율을 저하시킨다. 또한 어떤 페놀성 물질은 동물체에서 변이원성과 발암성과 같은 심한 독성을 발휘한다⁽¹⁸⁾. 반면 단백질과 결합하는 이러한 성질은 미생물 세포와 작용하여 성장저해를 유발시킴으로써 항미생물 효과를 보여주고 항산화작용에 의한 항암효과가 제안되고 있으며 Pb, Cd과 같은 유해 중금속을 제거시키는 효과를 기대할 수 있다. 그 외에도 어떤 페놀성 물질은 특정한 호르몬과 모세혈관의 유연성에 관계하는 등 다양한 약리효과가 제시되고 있다⁽¹⁹⁾.

폴리페놀류의 식용유지에 대한 항산화효과는 이미 오래전 부터 언급되어 왔으나 각종 유기용매에 따른 폴리페놀류 분획에 대한 항산화성실험은 드물다.

본 연구에서는 폴리페놀 함유 식물을 수증 선발하여 다음과 같은 실험을 행하였

다.

제1단계의 실험에서는 울피, 솔잎, 호프로 부터 폴리페놀성 조추출물을 추출하여 이들에 대한 식용유지에서의 항산화성을 조사하였다. 즉, 이들 추출물들을 동·식물성 유지 및 그 에멀전에 첨가하여 항산화력을 기존의 천연 및 합성항산화제와 비교검토함으로써 우수한 천연항산화제를 발굴하고자 하였다.

제2단계로는 폴리페놀류의 유기용매에 대한 용해성이 항산화력에 어떠한 영향을 미치는가를 알아보기 위하여 울피, 호프, 감, 시료를 각종 유기용매별 분획들을 얻어 이에 대한 항산화력을 천연 및 합성항산화제와 비교하였다.

제3단계에서는 gallic acid에 지방산 ether를 합성하여 지용성을 강화한 합성품과 기타 분해안정성을 높인 합성품들에 대한 자동산화와 열산화 안정성을 보았다.

나아가 항산화력이 우수하거나 실용화 가능성이 크다고 판단된 추출물에 대하여 이용성 시험을 하고자 하였다.

제 2 절 재료 및 방법

실험 1. 폴리페놀류 조추출물의 항산화성

1. 실험 재료

본 실험에서 사용한 울피와 솔잎은 경동시장에서 구입하였으며, 호프는 농촌진흥청을 통해 입수하였다. 대두유와 돈지는 산화방지제가 첨가되지 않은 제품으로 롯데삼강(주)으로부터 공급받아 사용하였다. 유지-물 에멀tus 조제에 사용된 유화제는 Tween 80 (Duksan Pharmaceutical Co., Ltd.)과 Span 80 (Duksan Pharmaceuti-cal Co., Ltd.)을 사용하였다. 비교실험구로서 천연항산화제인 토코

페롤은 DL- α -Tocopherol (Junsei Chemical Co., Ltd.) 를 구입하여 사용하였다.

2. 실험 방법

가. 시료유지의 조제

대두유유탁액과 돈지유탁액은 김⁽²⁰⁾ 등의 방법에 따라 조제하였다. 즉 유지, 물, Tween 80 + Span80 (1:1) 의 혼합유화제를 각각 10:9:1의 비율로 섞어 3,000rpm 에서 30분간 균질화 하여 유지유탁액을 조제하였다. 율피, 솔잎, 호프의 조추출물 (이후 각각 C1, Pn1, H1)과 토코페롤을 methanol에 용해시켜 대두유, 돈지, 대두유유탁액, 돈지유탁액에 각각 0.01%, 0.02% 농도가 되도록 첨가하여 추출물의 항산화력을 토코페롤과 비교하였다. C1, Pn1, H1은 율피, 솔잎, 호프시료를 분쇄하여 70% acetone에 20일간 침지한 후 용매를 휘발시켜 얻었다.

나. 유도기간 측정

산화안정성의 측정에는 Rancimat 617 (Metrohm 社, 스위스) 를 사용하였다. 시료유지 2.5g을 absorption vessel에 넣고 110℃에서 20 l/hr의 속도로 공기를 주입하면서 산화를 가속화시켰다. Absorption vessel 내의 전기전도도를 기록한 그림으로부터 유도기간내의 기울기와 대수적 상승기간의 기울기가 교차하는 시점까지의 거리를 유도기간으로 하였다. 각 추출물별로 이 거리를 측정하여 무처리구 및 토코페롤 첨가구와 항산화력을 비교하였다.

다. 과산화물가 측정

조제된 시료는 45℃로 조절된 항온기에서 산화를 진행시키면서 일정시간마다 시료를 채취하여 과산화물가를 측정하여 산화정도를 비교하였다. 과산화물가는 AOCS 방법⁽²¹⁾을 응용하여 측정하였으며, 유지 1kg당의 과산화물의 밀리당량 (meq/kg)으로 표시하였다. 즉, 시료 1g에 acetic acid : chloroform (3:2)를 30ml 넣은 후 포화요오드화칼륨용액 0.5ml를 첨가하여 1분간 혼돈다. 증류수 30ml를 넣고, 0.1N-Na₂S₂O₃용액으로 노란색이 거의 없어질 때까지 적정한 다음 전분지 시약을 2-3방울 떨어뜨린 후 다시 재적정하였다.

과산화물가의 산출은 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{POV(meq/kg)} = \frac{(S - B) \times N \times 1000}{\text{시료량}}$$

S : sample에 대한 Na₂S₂O₃적정량

B : blank에 대한 Na₂S₂O₃적정량

N : normality of sodium thiosulfate sol.

실험 2. 폴리페놀류 조추출물별 분획들의 항산화성

1. 실험재료

본 실험에서 사용한 울피(C2, C3, C4), 호프(H2, H3, H4), 감(P1, P2)의 분획별 추출물은 동덕여대 약학과에서 입수하였다. 각 시료별 분획들은 Fig 1, 2, 3과 같다. 비교구 실험으로 합성항산화제인 BHA는 Sigma 제품을 사용하였고, 토코페롤은 Tocopherol (Junsei Chemical Co., Ltd.) 를 구입하여 사용하였다. 대두유와 돈지는 산화방지제가 첨가되지 않은 제품으로 (주)롯데삼강으로부터 공급받아 사용하였다.

Table 1. 실험에 사용된 폴리페놀류 조추출물별 분획

재 료 \ 구 분	엑 스	기 호
울 피	조추출물	C1
	에테르엑스	C2
	부탄올 엑스	C3
	수성 엑스	C4
호 프	조추출물	H1
	EtOAC 엑스	H2
	BuOH 엑스	H3
	수성 엑스	H4
감	에테르 엑스	P1
	EtOAC 엑스	P2

BuOH : n-Butanol, EtoAC : Ethylacetate

2. 실험방법

가. 과산화물가 측정

과산화물가는 AOCS방법을 응용하여 앞서 실험한 내용과 동일하게 실행하였다.

나. 산가 측정

추출물들의 항산화정도를 비교하기 위하여 조제 시료를 60℃에서 산화시키면서 일정 시간마다 시료를 채취하여 산가를 측정하였다. 산가는 AOCS⁽²¹⁾방법을 응용하여 측정하였다. 즉 시료 0.05g을 500ml삼각플라스크에 담은 후 에탄올 100ml를 가하여 완전히 용해시킨 다음 지시약 0.5ml를 첨가하여 0.05N-NaOH로 적정하였다. 등진점은 분홍색이 30초간 유지되는 점으로 하였다. 산가의 계산방법은 다음과 같다.

$$\text{A.V.} = \frac{0.05\text{N-NaOH 적정량} \times N \times 56.10}{W(\text{g})}$$

W = 시료량

N = normality of NaOH

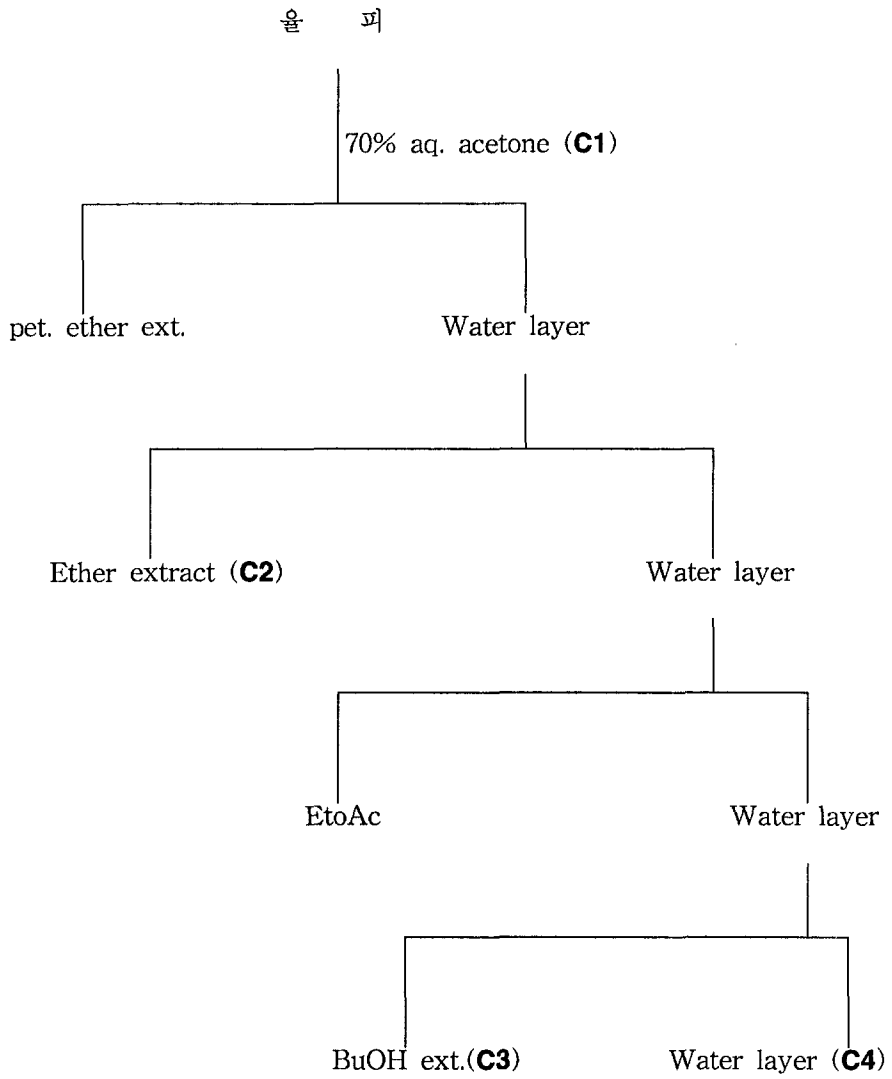


Fig. 1 울피의 체계적인 추출 및 분획법.

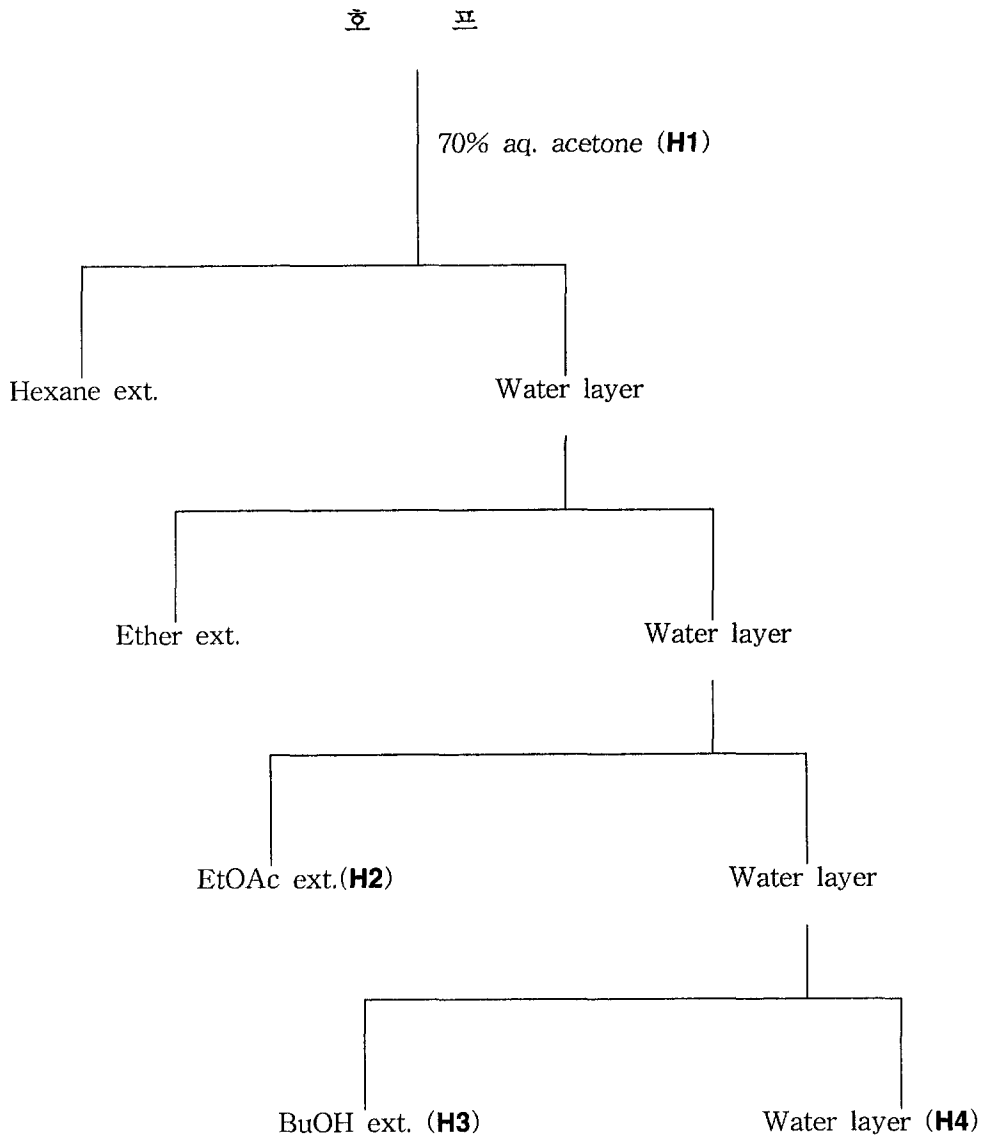


Fig. 2 호프의 체계적인 추출 및 분획법.

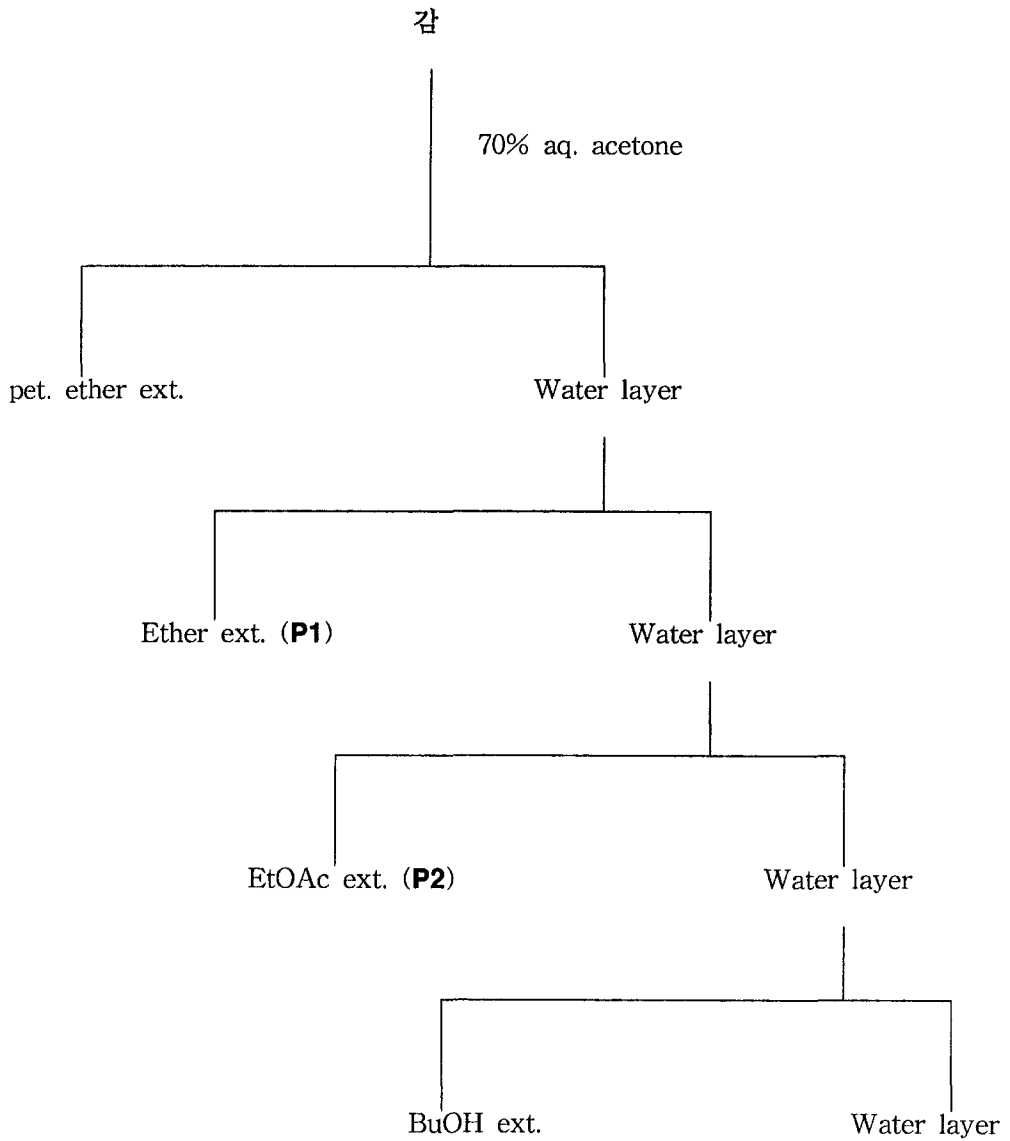


Fig. 3 감의 체계적인 추출 및 분획법.

실험 3. 폴리페놀류 합성품의 항산화성

1. 실험재료

본 실험에 사용한 지용성유도체인 methyl gallate(MG), hexyl gallate(HG), stearyl gallate(SG) 와 합성품1, 2, 3, 4 즉 HHDP benzyl ether, Catechin benzyl ether, 5,6 - O - isopropylidene - 2 - ascorbic acid, 2-O-(3,4,5-tribenzyloxygalloxy)-5,6-isopropylidene-L-ascorbic acid는 동덕여대 약학과에서 제공받았다. 대두유와 돈지는 롯데삼강(주)에서 첨가물이 섞이지 않은 것으로 입수하였다.

Table 2. 실험에 사용된 폴리페놀류 합성품

구분	이름	기호
지용성 탄닌 유도체	Methyl gallate	MG
	Hexyl gallate	HG
	Stearyl gallate	SG
비가수분해형 탄닌유도체	HHDP benzyl ether	합성 1
	Catechin benzyl ether	합성 2
	5,6-O-isopropylidene-2-ascorbic acid	합성 3
	2-O-(3,4,5-tribenzyloxygalloxy)-5,6-isopropylidene-L-ascorbic acid	합성 4

2. 실험방법

가. 시료유지의 조제

대두유와 돈지에 각각 MG, HG, SG, 합성품1, 2, 3, 4를 0.02%씩 첨가하고 토코페롤, BHA와 비교하였다.

나. 과산화물가 측정

AOCS방법을 응용하여 앞의 실험과 동일하게 실행하였다.

다. 산가 측정

AOCS방법을 응용하여 앞의 실험과 동일하게 실행하였다.

실험 4. 항산화성이 우수한 추출물의 실용화 시험

1. 실험재료

본 실험에 사용한 감추출물(P1), 율피조추출물(C1)은 동덕여대 약학과에서 입수하였고, 도너츠 튀김시의 유지는 일반 시중에서 구입한 (주)제일제당제품을 사용하였으며, 도너츠 반죽가루는 일반적으로 구입할 수 있는 mix제품(백설)을 구입하였다. 마요네즈 제조시의 유지는 일반 시중에서 구입한 (주)동방유량의 제품을 사용하였다.

2. 실험방법

가. 시료유지의 조제

실험에 사용하는 유지에 0.02%씩의 율피추출물과 감추출물을 혼합하였다.

나. 도너츠 반죽

예비실험으로 도너츠 반죽은 제품에 적혀있는 내용을 약간 변경하여 도너츠 mix 가루 1kg에 물 30ml를 섞어 반죽한 뒤, 무첨가구 500g과 첨가구 500g에 감 ether 추출물 0.02%인 0.1g을 첨가하였다. 잘 섞은 뒤 180℃ 튀김온도인 유지에 도너츠 반죽을 튀겼다. 본 실험의 도너츠 반죽도 또한 예비실험방법처럼 수행하였으며 첨가물질로 율피추출물을 사용하였다.

다. 마요네즈 제조

대두유 500g과 시중에서 구입한 달걀 중 노른자만을 40g준비하여 혼합하였다. 이때 처음에는 유지의 양을 소량으로하여 노른자와 혼합한 뒤 점차 양을 늘려나갔다.

라. 과산화물가 측정

AOCS방법을 응용하여 앞의 실험과 동일하게 실행하였다.

제 3 절 결과 및 고찰

실험 1. 조추출물의 항산화성

1. 율피조추출물(C1)의 항산화효과

C1과 토코페롤을 각각 0.01%로 첨가했을 때의 유도기간 측정 결과를 Fig. 4에 표시하였다. 대두유의 무첨가구는 유도기간이 4.5hr이고, C1첨가구는 5.9hr으로 1.31배의 산화억제효과가 있었고, 토코페롤 첨가구는 4.65hr로 C1첨가구에 비하여 항산화력이 떨어짐을 보였다. 돈지의 경우 무첨가구는 3.4hr로 C1첨가구는 3.75hr, 토코페롤은 6.65hr로 나타났다. 0.02% 첨가했을 때의 유도기간 측정 결과를 Fig. 5에 표시하였다. 대두유의 무첨가구 유도기간이 5hr이고, C1첨가구는 6.25hr로 1.25배의 산화억제효과가 있었고, 토코페롤 첨가구는 5.3hr로 C1첨가구에 비하여 항산화력이 떨어짐을 보였다. 돈지의 경우 C1첨가구는 3.85hr로 무첨가구 3hr과 비교하여 큰 효과는 없었다.

대두유와 돈지에 C1과 토코페롤을 각각 0.02%를 첨가하고 45℃에서 저장하면서 과산화물가의 변화를 측정한 결과는 Fig. 6과 같다. 대두유를 3주간 저장하였을 때 무첨가구의 33.8 meq/kg에 비하여 C1첨가구는 9.0 meq/kg으로 강한 항산화력을 보였다. 토코페롤은 81.5 meq/kg으로 무첨가구보다 커서 산화가 촉진된 결과를 나타내었다. 한편 3주 경과 후 돈지의 과산화물가는 무첨가구 9.0 meq/kg에 비하여, C1 첨가구는 3.1 meq/kg으로 항산화력이 뛰어났다. 토코페롤 첨가구는 9.2 meq/kg로 낮은 항산화력을 보였다.

대두유유타액 및 돈지유타액에 대한 C1의 항산화효과는 Fig. 7과 같다. 대두유 유타액을 3주간 저장하였을 때 무첨가구의 과산화물가는 66.4 meq/kg으로 C1첨

가구는 17.5 meq/kg인 반면, 토코페롤은 49.3 meq/kg으로 낮은 항산화력을 보였다. 한편 돈지유타액에서 1, 3, 5주 후의 무첨가구의 과산화물가는 각각 6.1, 11.7, 40.0 meq/kg으로 현저하게 증가한 반면, C1첨가구는 각각 3.6, 6.5, 10.1 meq/kg으로 무첨가구와 비교하여 항산화력이 높게 나타났다.

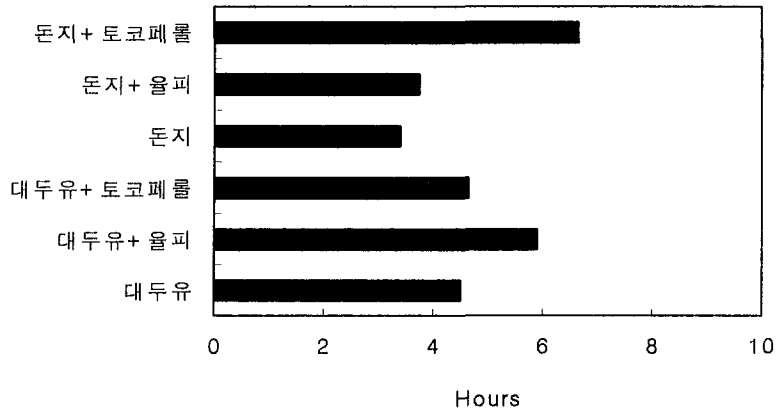


Fig. 4 올피조추출물 C1이 0.01% 첨가된 대두유, 돈지의 rancimat 측정에 따른 유도기간 비교. (110°C)

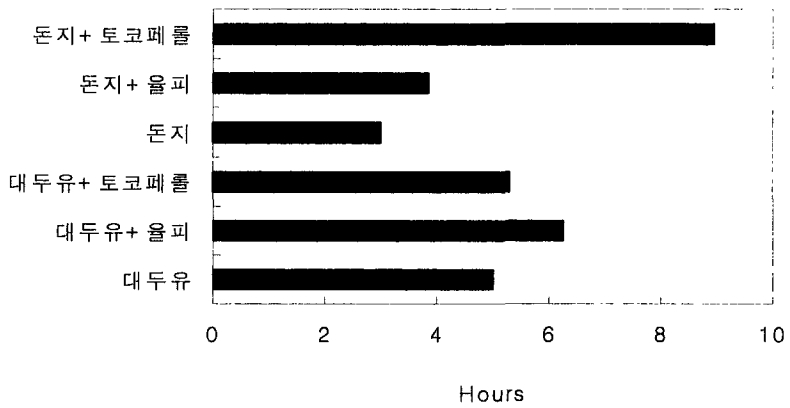


Fig. 5 올피조추출물 C1 0.02% 첨가된 대두유, 돈지의 rancimat 측정에 따른 유도기간 비교. (110°C)

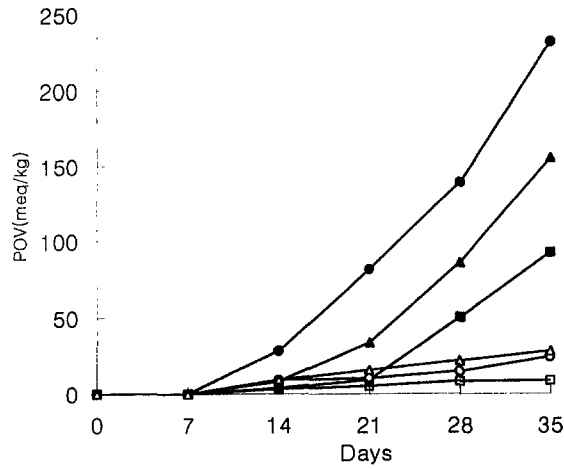


Fig. 6 대두유와 돈지에 울피조추출물 C1을 0.02% 첨가한 후 45°C에서 자동산화시의 과산화물가.

-▲- : 대두유, -■- : 대두유+울피, -●- : 대두유+토코페롤
 -○- : 돈지, -□- : 돈지+울피, -△- : 돈지+토코페롤

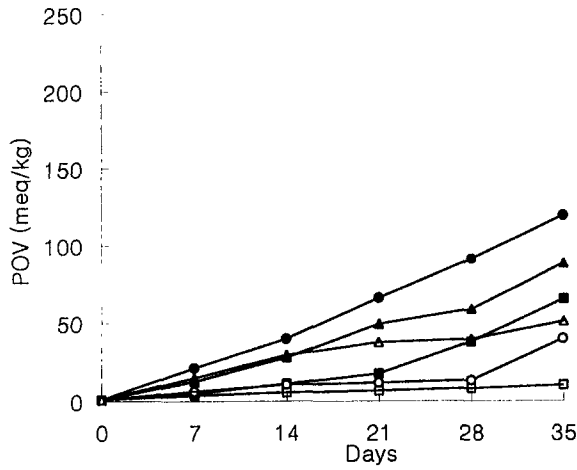


Fig. 7 대두유유탁액과 돈지유탁액에 울피조추출물 C1을 0.02% 첨가한 후 45°C에서 자동산화시의 과산화물가.

-●- : 대두유유탁액, -■- : 대두유유탁액+울피, -▲- : 대두유유탁액+토코페롤,
 -○- : 돈지유탁액, -□- : 돈지유탁액+울피, -△- : 돈지유탁액+토코페롤

2. 솔잎조추출물의 항산화효과

솔잎조추출물과 토코페롤을 각각 0.01%로 첨가했을 때의 유도기간 측정 결과를 Fig. 8에 표시하였다. 대두유의 무첨가구 유도기간이 4.5hr이고, 솔잎조추출물첨가구는 5.6hr으로 1.24배의 산화억제효과가 있었고, 토코페롤 첨가구는 4.65hr으로 솔잎조추출물첨가구에 비하여 항산화력이 떨어짐을 보였다. 돈지의 경우 무첨가구는 3.4hr으로 솔잎조추출물첨가구는 3.6hr, 토코페롤은 6.65hr으로 나타났다. 0.02%를 첨가했을 때의 유도기간 측정 결과는 Fig. 9와 같다. 대두유의 무첨가구 유도기간이 5hr이고, 솔잎조추출물첨가구는 6.3hr, 토코페롤 첨가구는 5.3hr으로 솔잎조추출물첨가구에 비하여 토코페롤과 무첨가구는 낮은 항산화력이 보였다. 돈지의 경우 무첨가구는 3hr으로 솔잎조추출물첨가구는 3.4hr으로 나타났다.

대두유와 돈지에 솔잎조추출물과 토코페롤을 각각 0.02% 첨가하고 45℃에서 5주간 저장하면서 1주간격으로 과산화물가를 측정한 결과는 Fig. 10과 같다. 대두유를 3주 경과 후 무첨가구의 과산화물가는 33.8 meq/kg으로 솔잎조추출물첨가구는 11.2 meq/kg 으로 강한 항산화력을 보였고, 토코페롤은 81.5 meq/kg로 항산화력이 떨어졌다. 한편 5주 경과 후의 돈지의 과산화물가는 무첨가구인 경우 24.4 meq/kg, 솔잎조추출물첨가구는 15.4 meq/kg 으로 항산화력이 무첨가구에 비하여 높게 나타났으며 토코페롤 첨가구는 28.1 meq/kg로 솔잎조추출물첨가구에 비하여 낮은 항산화력을 보였다.

대두유유탕액과 돈지유탕액에 대한 0.02%의 항산화효과는 Fig. 11과 같다. 대두유 유탕액에서는 1, 3, 5주 후의 무첨가구의 과산화물가가 각각 21.2, 66.4, 119.3 meq/kg으로 현저하게 증가하였는데 반해 솔잎조추출물첨가구는 각각 7, 21.9, 70.1 meq/kg으로 무첨가구에 비해 항산화력이 뛰어난 것을 알 수 있었다. 토코페롤 첨가구는 12.5, 49.3, 88.5 meq/kg으로 솔잎조추출물첨가구에 비해 낮은 항산화력

을 보였다. 한편 돈지유타액에서 5주 후의 무침가구의 과산화물가는 40.0meq/kg 인 반면, 솔잎조추출물의 경우 16.9 meq/kg으로 강한 항산화력을 나타냈다. 토코페롤 첨가구는 51.1meq/kg으로 항산화력이 떨어짐을 보여주었다.

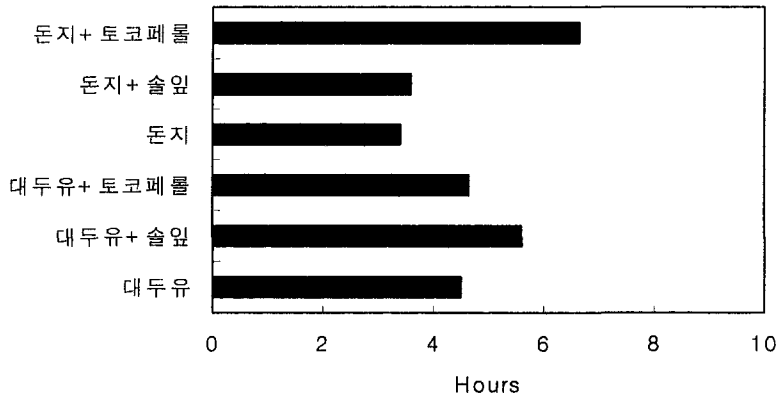


Fig. 8 솔잎조추출물이 0.01% 첨가된 대두유, 돈지의 rancimat 측정에 따른 유도
기간 비교.(110°C)

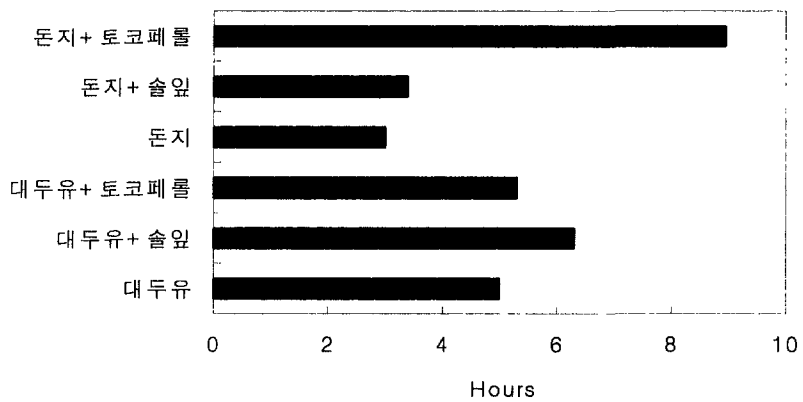


Fig. 9 솔잎조추출물이 0.02% 첨가된 대두유, 돈지의 rancimat 측정에 따른 유도
기간 비교.(110°C)

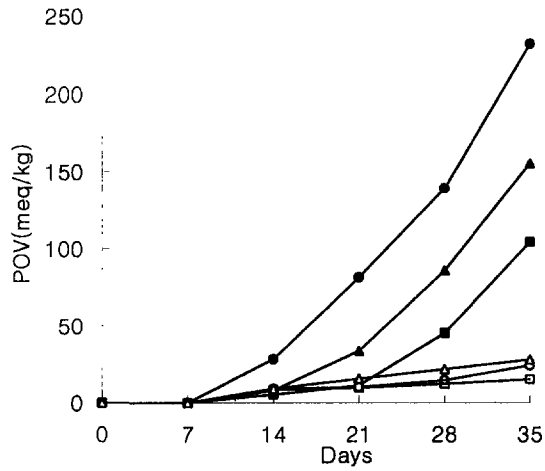


Fig. 10 대두유와 돈지에 솔잎조추출물을 0.02% 첨가한 후 45°C에서 자동산화시의 과산화물가.

-▲- : 대두유, -■- : 대두유+솔잎, -●- : 대두유+토코페롤
 -○- : 돈지, -□- : 돈지+솔잎, -△- : 돈지+토코페롤

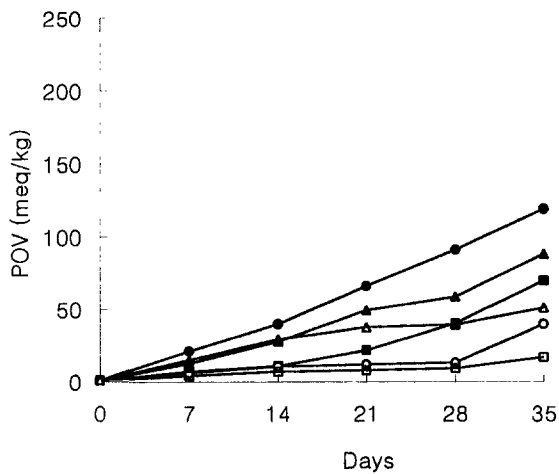


Fig. 11 대두유유탁액과 돈지유탁액에 솔잎조추출물을 0.02% 첨가한 후 45°C에서 자동산화시의 과산화물가.

-●- : 대두유유탁액, -■- : 대두유유탁액+솔잎, -▲- : 대두유유탁액+토코페롤,
 -○- : 돈지유탁액, -□- : 돈지유탁액+솔잎, -△- : 돈지유탁액+토코페롤

3. 호프조추출물의 항산화효과

H1을 0.01%첨가했을 때의 결과를 Fig. 12에 표시하였다. 대두유의 무첨가구 유도기간이 4.5hr이고, H1첨가구는 5.35hr으로 산화억제효과가 있었고, 토코페롤 첨가구는 4.65hr으로 추출물 첨가시 항산화효과가 있는 것으로 보였다. 돈지의 경우 무첨가구는 3.4hr이고, H1첨가구는 3.7hr, 토코페롤은 6.65hr으로 토코페롤 첨가시 추출물 첨가구에 비하여 높은 항산화력을 보였다. 0.02%를 첨가했을 때의 유도기간 측정 결과를 Fig. 13에 표시하였다. 대두유의 무첨가구에 있어서는 유도기간이 5hr이고, H1첨가구가 5.9hr으로 산화억제효과가 크지는 않았다. 토코페롤 첨가구는 5.3hr로 H1첨가구와 비슷한 양상을 보였다. 돈지의 경우, 무첨가구는 3hr로 H1첨가구는 3.25hr, 토코페롤은 8.95hr로 추출물 첨가시와 마찬가지로 토코페롤의 항산화효과가 뛰어났다.

대두유와 돈지에 H1과 토코페롤을 각각 0.02%씩 첨가하고 45℃에 저장하면서 1주간격으로 과산화물가의 변화를 측정한 결과는 Fig. 14와 같다. 3주 경과후 대두유에서 무첨가구의 과산화물가는 33.8 meq/kg으로 H1첨가구는 39.6 meq/kg으로 항산화력은 강하게 나타났으며, 토코페롤은 81.5meq/kg로 항산화력이 떨어졌다. 한편, 5주 경과 후 돈지의 과산화물가는 무첨가구인 경우 24.4 meq/kg, H1첨가구는 28.4 meq/kg으로 항산화력에서 무첨가구와 큰 차이가 없었으나, 저장기간에 비하여 높은 항산화력을 나타냈으며, 토코페롤 첨가구는 28.1 meq/kg으로 비슷한 양상을 보였다.

대두유유타액과 돈지유타액에 대한 항산화력 비교는 Fig. 15와 같다. 대두유 유타액은 1, 3, 5주 후의 무첨가구의 과산화물가는 각각 21.2, 66.4, 119.3 meq/kg으로 현저하게 증가한 반면, H1첨가구는 각각 11.6, 38.2, 78.7 meq/kg으로 무첨가구에 비해 항산화력이 높게 나타났다. 토코페롤 첨가구는 12.5, 49.3, 88.5 meq/

kg으로 H1첨가구와 비슷한 경향을 보였다.한편 돈지유타액에서 1, 3, 5주 후의 무첨가구의 과산화물가는 각각 6.1, 11.7, 40.0 meq/kg으로 완만한 증가를 나타냈으며, H1첨가구는 각각 7.3, 9.0, 17.1 meq/kg으로 항산화력이 뛰어난을 알 수 있었다. 토코페롤 첨가구는 14.8, 37.7, 51.1 meq/kg으로 무첨가구와 H1첨가구에 비하여 낮은 항산화력을 나타냈다.

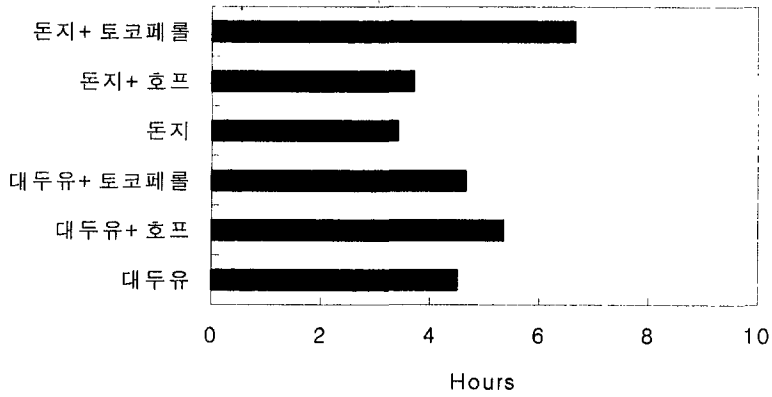


Fig. 12 호프조추출물이 0.01% 첨가된 대두유, 돈지의 rancimat 측정에 따른 유도기간 비교. (110°C)

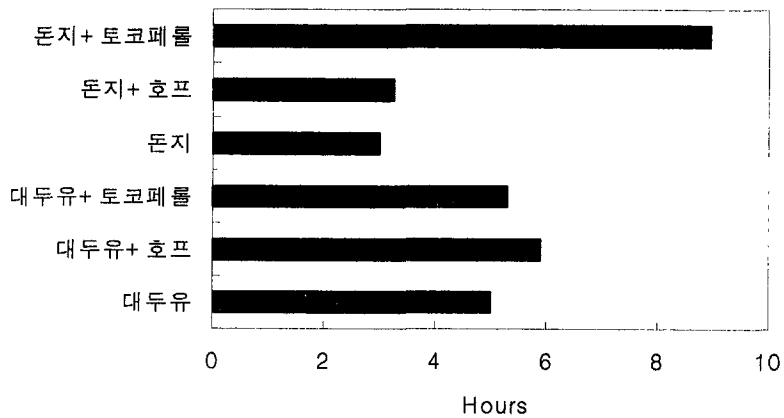


Fig. 13 호프조추출물이 0.02% 첨가된 대두유, 돈지의 rancimat 측정에 따른 유도기간 비교. (110°C)

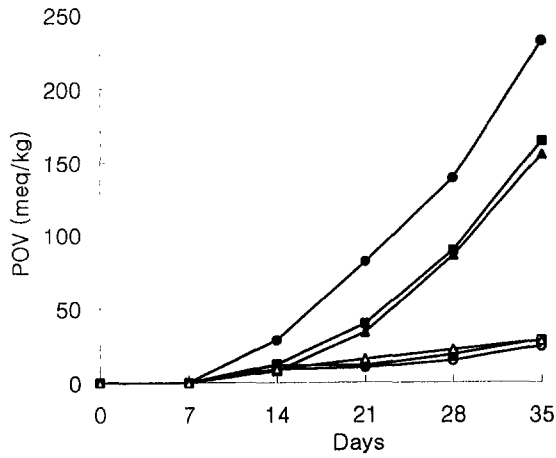


Fig. 14 대두유와 돈지에 호프조추출물을 0.02% 첨가한 후 45°C에서 자동산화시의 과산화물가

-▲- : 대두유, -■- : 대두유+호프, -●- : 대두유+토코페롤
 -○- : 돈지, -□- : 돈지+호프, -△- : 돈지+토코페롤

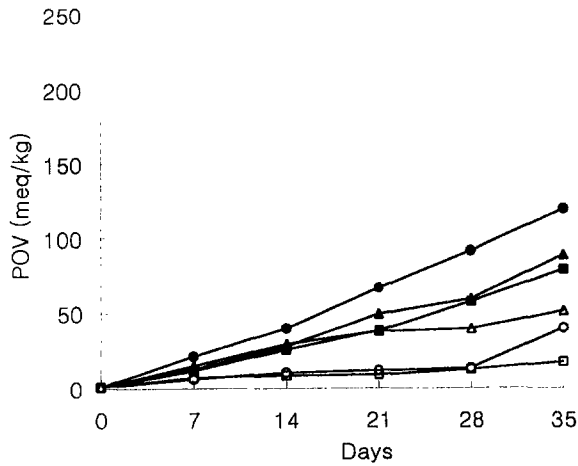


Fig. 15 대두유유탁액과 돈지유탁액에 호프조추출물을 0.02% 첨가한 후 45°C에서 자동산화시의 과산화물가.

-●- : 대두유유탁액, -■- : 대두유유탁액+호프, -▲- : 대두유유탁액+토코페롤,
 -○- : 돈지유탁액, -□- : 돈지유탁액+호프, -△- : 돈지유탁액+토코페롤

실험 2. 조추출물별 분획들의 항산화성

1. 대두유의 자동산화에 대한 율피, 호프, 감의 추출분획별 항산화효과

대두유에 율피, 호프의 분획별 추출물과 α -tocopherol, BHA를 각각 0.02% 첨가하고 45°C에 저장하면서 과산화물가의 변화를 측정한 결과는 Fig. 16과 같다.

대두유를 3주간 저장 하였을 때 무첨가구의 과산화물가는 16.7meq/kg이었으나 C3 첨가구는 8.2meq/kg으로 강한 항산화력을 보였고, C2 첨가구와 H3 첨가구 16.0meq/kg과 15.6meq/kg으로 약간의 항산화력이 나타났다.

토코페롤은 59.8meq/kg, BHA첨가구는 43.3 meq/kg으로 C3 첨가구에 비하여 항산화력이 떨어졌는데, H2첨가구는 24.9meq/kg으로 무첨가구보다 산화가 더 많이 진행되었다. 5주 후의 과산화물가는 무첨가구는 73.0 meq/kg, C2는 69.0 meq/kg, C3는 24.9meq/kg, H3은 65.3 meq/kg으로 항산화력이 있었으나, H2는 85.9 meq/kg으로 산화가 촉진 되었다. 각각의 추출물을 첨가한 후 60°C에 저장 하면서 과산화물가의 변화를 측정한 결과는 Fig. 17, 18과 같다. 대두유를 24일간 저장 하였을 때 무첨가구의 과산화물가는 295.8meq/kg이고, C3 첨가구는 244.5meq/kg으로 항산화력이 뛰어난을 알 수 있었다. 토코페롤과 BHA는 506.3meq/kg, 448.8 meq/kg으로 산화가 촉진 되었는데, H2의 경우도 346.6meq/kg으로 산화가 촉진되었다. C2 첨가구와 H3 첨가구는 293.4meq/kg과 286.2meq/kg으로 무첨가구와 비슷하게 산화되었다. 대두유를 24일간 저장하였을 때 무첨가구의 과산화물가는 668.0meq/kg이었으나, 감추출물솔잎조추출물첨가구는 122.4meq/kg으로 첨가물 중에서 가장 강한 항산화력을 보였고, 감추출물P2와 율피추출물C4은 397.4 meq/kg, 415.2meq/kg으로 항산화력을 갖고 있었다. 호프 H4의 과산화물가는 816.3meq/kg으로 산화를 촉진시킨 것으로 나타났다.

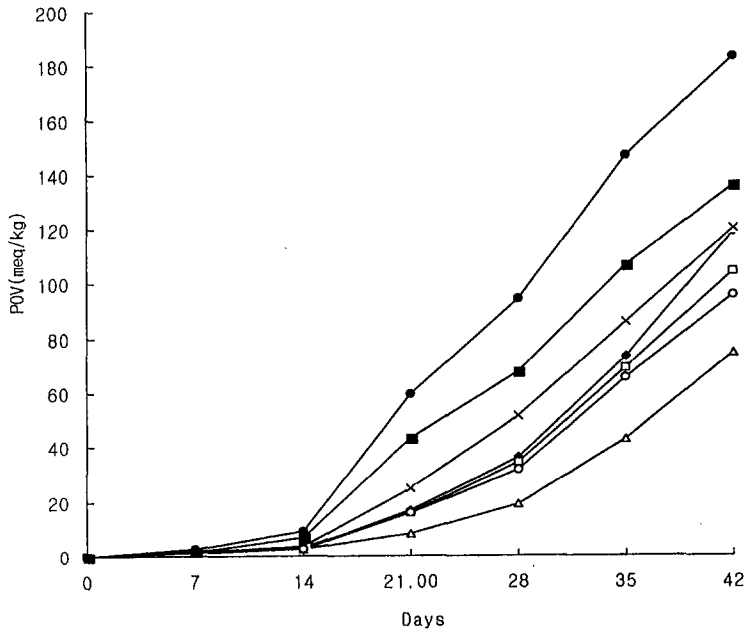


Fig. 16 대두유에 율피 분획별 추출물과 호프의 분획별 추출물을 0.02% 첨가한 후 45°C에서 자동산화시의 과산화물가.

- ◆-: 대두유
- : 대두유+C2(율피 ether ex.)
- △-: 대두유+C3(율피 butanol ex.)
- ×-: 대두유+H2(호프 ethylacetate ex.)
- : 대두유+H3(호프 butanol ex.)
- : 대두유+토코페롤
- : 대두유+BHA

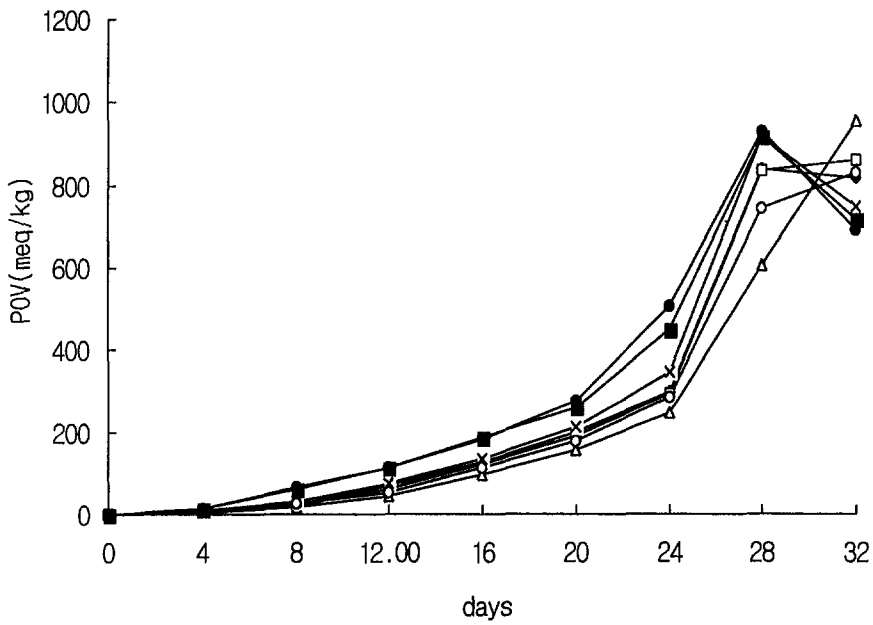


Fig. 17 대두유에 울피 분획별 추출물과 호프의 분획별 추출물을 0.02% 첨가한 후 60℃에서 자동산화시의 과산화물가.

- ◆-: 대두유
- : 대두유+C2(울피 ether ex.),
- △-: 대두유+C3(울피 butanol ex.)
- ×-: 대두유+H2(호프 ethyl acetate ex.)
- : 대두유+H3(호프 butanol ex.)
- : 대두유+토코페롤
- : 대두유+BHA

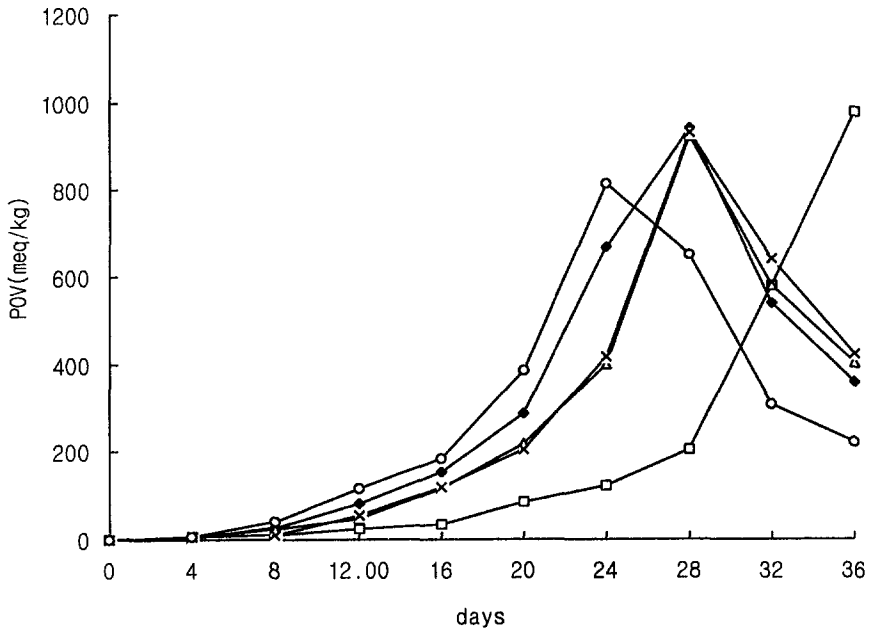


Fig. 18 대두유에 감, 올피, 호프 분획별 추출물을 0.02% 첨가한 후 60°C에서 자동산화시의 과산화물가.

- ◆-: 대두유
- : 대두유+P1(감 ether ex.)
- △-: 대두유+P2(감 ethlyacetate ex.)
- ×-: 대두유+C4(올피 water ex.)
- : 대두유+H3(호프 butanol ex.)

2. 돈지의 자동산화에 대한 율피, 호프, 감의 추출분획별 항산화효과

돈지에 율피, 호프의 분획별 추출물과 α -tocopherol, BHA를 각각 0.02% 첨가하고 45°C에 저장하면서 과산화물가의 변화를 측정한 결과를 Fig. 19에 나타내었다. 돈지를 5주간 저장 하였을 때 무첨가구의 과산화물가는 66.8meq/kg이었고, 토코페롤과 BHA 첨가구는 19.2meq/kg, 7.8 meq/kg으로 강한 항산화력을 나타내었는데, C3 첨가구도 10.6meq/kg으로 항산화력이 BHA, 토코페롤과 비슷하게 나타났다.

C3 첨가구는 75.2meq/kg, H2 첨가구는 89.7meq/kg, H3 첨가구는 77.0meq/kg으로 무첨가구보다 높게 나타나 산화가 촉진 된 것으로 나타났다.

각각의 추출물을 첨가한 후 60°C에 저장하면서 과산화물가의 변화를 측정한 결과는 Fig. 20, 21과 같다. 돈지를 20일 저장하였을 때, 무첨가구의 과산화물가는 342.0 meq/kg, C2은 303.2meq/kg, C3는 110.7 meq/kg, H2은 298.0 meq/kg H3는 323.2 meq/kg, 토코페롤과 BHA는 24.0 meq/kg, 25.0 meq/kg으로 항산화력이 강하였다. 추출물 모두가 항산화력이 있었는데, 특히 C3는 BHA나 토코페롤에 비하여 과산화물가가 높게 나타나기는 했으나 가장 강한 항산화력을 갖고 있었다. 돈지를 16일간 저장하였을 때 무첨가구의 과산화물가는 222.0meq/kg으로 P1 첨가구와 P2 첨가구는 12.3meq/kg, 15.9meq/kg으로 높은 항산화력을 보였는데, C4도 48.6meq/kg으로 항산화력을 강하게 나타내었다. H4는286.1meq/kg으로 무첨가구보다 산화가 촉진되었다. P1과 P2는 36일간의 저장기간 동안 강한 항산화력을 나타내었는데 감추출물P1의 항산화력이 P2보다 높게 유지되었다.

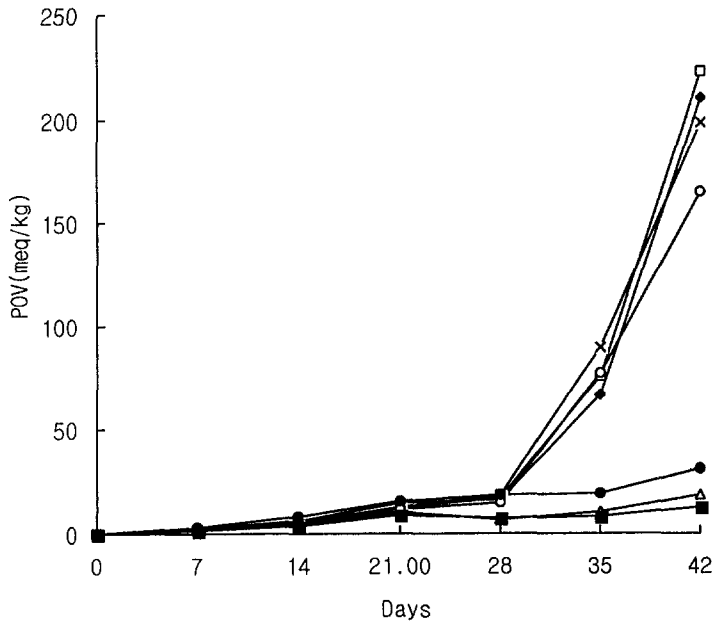


Fig. 19 돈지에 율피 분획별 추출물과 호프의 분획별 추출물을 0.02% 첨가한 후 45°C에서 자동산화시의 과산화물가.

- ◆-: 돈지
- : 돈지+C2(율피 ether ex.)
- △-: 돈지+C3(율피 butanol ex.)
- ×-: 돈지+H2(호프 ethylacetate ex.)
- : 돈지+H3(호프 methanol ex.),
- : 돈지+토코페롤
- : 돈지+BHA

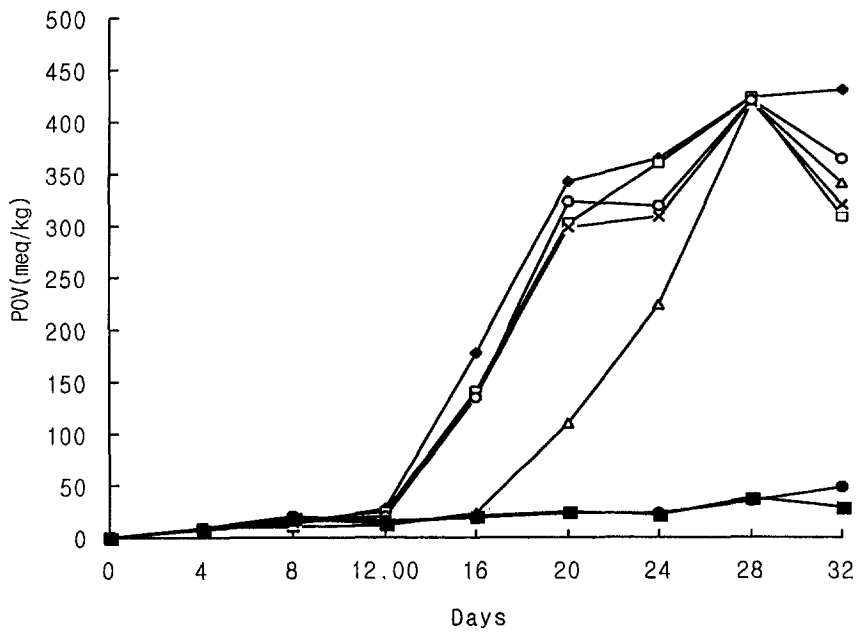


Fig. 20 돈지에 율피 분획별 추출물과 호프의 분획별 추출물을 0.02% 첨가한 후 60°C에서 자동산화시의 과산화물가.

- ◆-: 돈지
- : 돈지+C2(율피 ether ex.)
- △-: 돈지+C3(율피 butanol ex.)
- ×-: 돈지+H2(호프 ethylacetate ex.)
- : 돈지+H3(호프 methanol ex.),
- : 돈지+토코페롤
- : 돈지+BHA

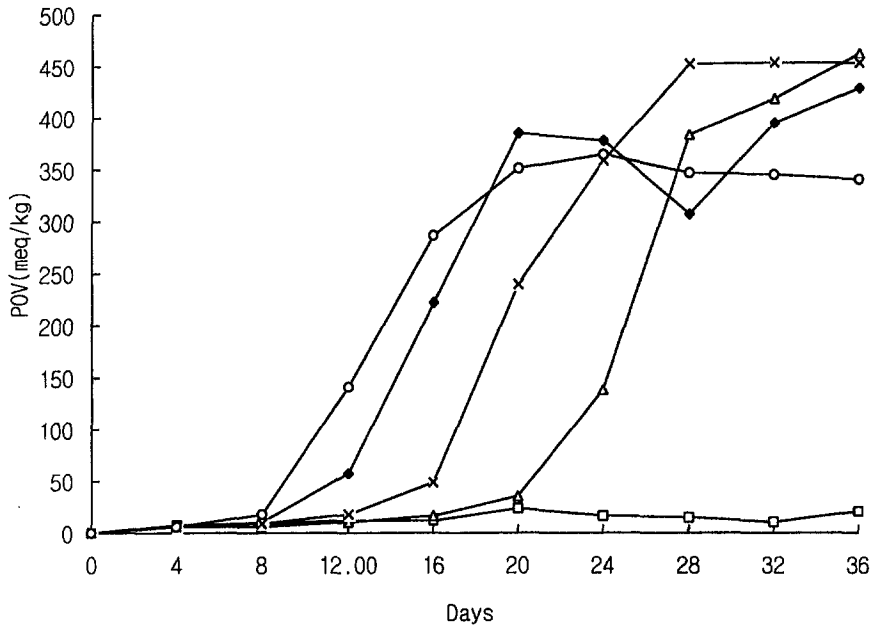


Fig. 21 돈지에 감, 율피, 호프 분획별 추출물을 0.02% 첨가한 후 60°C에서 자동 산화 시의 과산화물가.

- ◆-: 돈지
- : 돈지+P1(감 ether ex.)
- △-: 돈지+P2
- ×-: 돈지+C4(율피 water ex.)
- : 돈지+H4

3. 대두유의 열산화에 대한 감, 율피 추출분획별 항산화효과

대두유에 감, 율피의 분획별 추출물과 토코페롤 BHA를 각각 0.02% 첨가하고 180℃ 튀김조건에서 가열하면서 12시간마다 산가를 측정하였다. 그 결과는 Fig. 22와 같다.

대두유를 72시간 가열하였을 때 무첨가구의 산가는 1.81이고 P1첨가구는 1.85로 항산화력이 비슷하였으며, C3 첨가구는 2.32로 산화 촉진 효과를 보였다. 반면, 무첨가구에 비하여 C2는 1.49로서 경시적인 산가의 증가 경향이 가장 낮은 것으로 나타나 열산화에 대한 항산화력이 있을 것으로 기대된다.

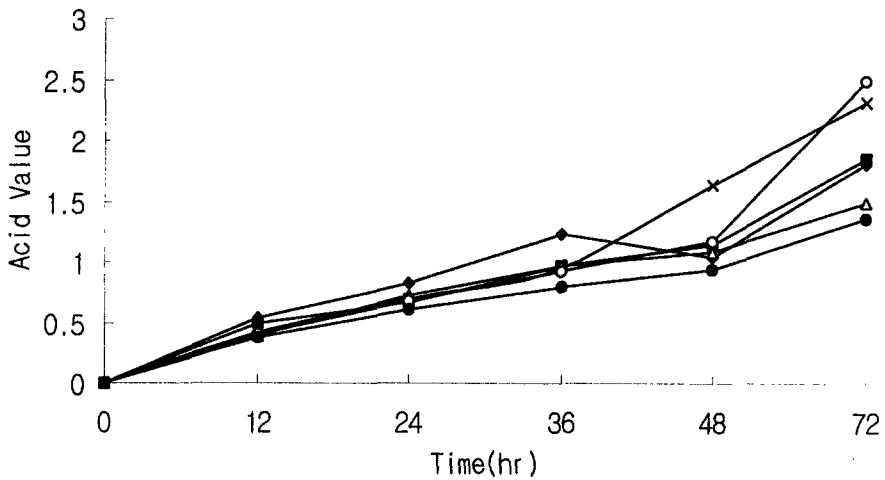


Fig. 22 대두유에 감P1, 율피C2, 율피C3를 0.02% 첨가한 후 180℃에서 가열할 때의 산가변화.

- ◆-: 대두유
- △-: 대두유+C2(율피 ether ex.)
- : 대두유+토코페롤
- : 대두유+ P1(감 ether ex.)
- ×-: 대두유+C3(율피 butanol ex.)
- : 대두유+BHA

4. 돈지의 열산화에 대한 감, 율피 추출분획별 항산화효과

돈지에 감, 율피의 분획별 추출물과 토코페롤, BHA를 각각 0.02% 첨가하고 180°C 튀김조건에서 가열하여, 12시간마다 산가를 측정한 결과는 Fig. 23과 같다.

돈지를 60시간 가열하였을 때 무첨가구의 산가는 2.5이고, P1 첨가구는 1.96, C2는 2.0 으로 항산화력이 좋았으며, C3은 2.78로 산화촉진 효과를 보였다.

토코페롤첨가구와 BHA첨가구는 각각 2.64, 2.43으로 P1과 C2에 비하여 항산화력이 낮았으며, 무첨가구와 별다른 차이가 없는 것으로 나타났다.

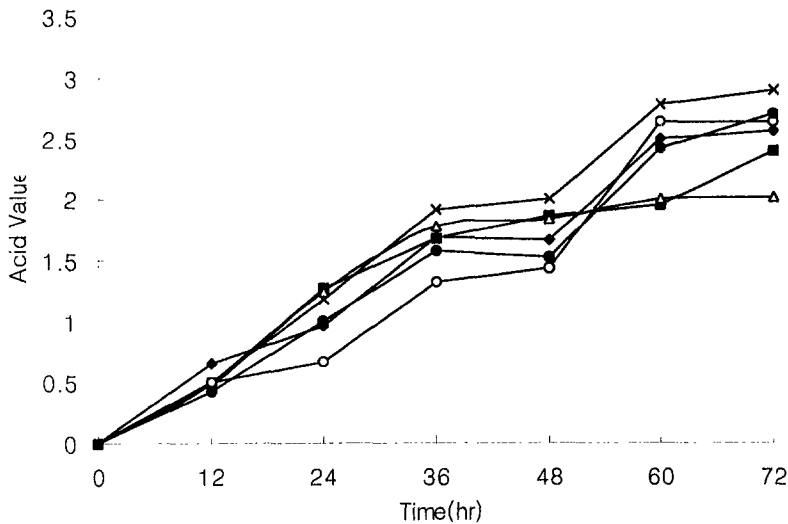


Fig. 23 돈지에 감P1, 율피C2, 율피C3를 0.02% 첨가한 후 180°C에서 가열할 때의 산가변화

- ◆-: 돈지
- △-: 돈지+C2(율피 ether ex.)
- : 돈지+토코페롤
- : 돈지+P1(감 ether ex.)
- ×-: 돈지+C3(율피 butanol ex.)
- : 대두유+BHA

실험 3. 폴리페놀류 합성품의 산화안정성

1. 대두유의 자동산화에서 Gallic acid 합성품의 항산화 효과

MG(Methyl gallate), HG(Hexyl gallate), SG(Stearyl gallate) α -토코페롤, BHA를 각각 0.02% 첨가하고 60°C에 저장하면서 4일 간격으로 과산화물가의 변화를 측정한 결과는 Fig. 24, 25이다.

대두유를 16일간 저장하였을 때 무첨가구의 과산화물가는 334.6meq/kg이었으나, BHA첨가구는 256.6meq/kg, 토코페롤 첨가구는 301.5meq/kg으로 항산화력이 나타났으나 3가지 gallic acid 합성품 모두는 31.6-142.4meq/kg으로 BHA나 토코페롤을 첨가 했을 때보다 항산화효과가 월등히 뛰어났다. 특히, MG와 HG는 아주 우수하였다.

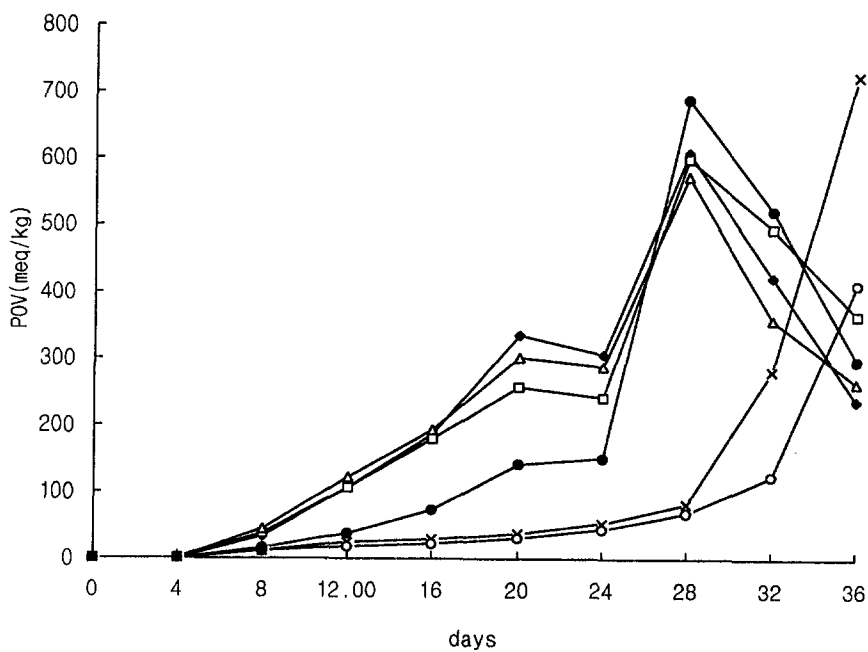


Fig. 24 대두유에 hexyl gallate(HG), methyl gallate(MG), stearyl gallate(SG)를 0.02% 첨가한 후 60°C에서 자동산화시의 과산화물가.

- ◆-: 대두유 -□-: 대두유+BHA -△-: 대두유+토코페롤
- ×-: 대두유+HG -○-: 대두유+MG -●-: 대두유+SG

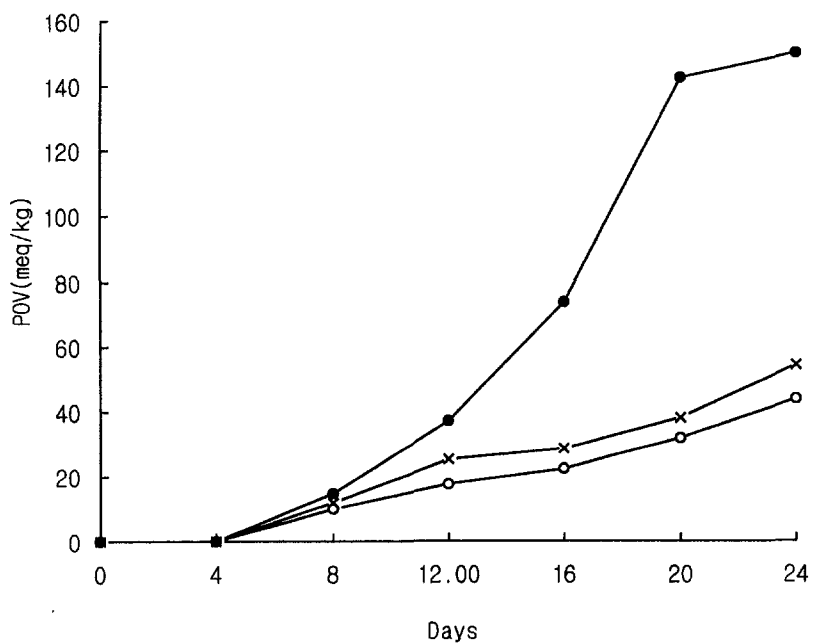


Fig. 25 대두유에 hexyl gallate(HG), methyl gallate(MG), stearyl gallate(SG)를

0.02% 첨가한 후 60℃에서 자동산화시의 과산화물가.

-x-: 대두유+HG

-o-: 대두유+MG

-●-: 대두유+SG

2. 돈지의 자동산화에서 gallic acid 합성품의 항산화 효과

MG, HG, SG와 α -토코페롤, BHA를 각각 0.02% 씩 돈지에 첨가하고 60°C에 저장하면서 과산화물가의 변화를 측정한 결과는 Fig. 26, 27이다. 16일간 저장 후 무첨가구의 과산화물가는 328.5meq/kg이었으나, BHA첨가구는 13.0meq/kg, 토코페롤 첨가구는 33.9meq/kg으로 항산화력이 나타났는데 3가지 gallic acid합성품은 2.2-4.8meq/kg으로 항산화효과가 BHA나 토코페롤보다 큰것으로 나타났는데 36일간의 저장기간 동안 세가지 gallic acid합성품의 항산화력은 강하게 유지되었다. MG, HG, SG간에는 큰 차이를 보이지 않았다.

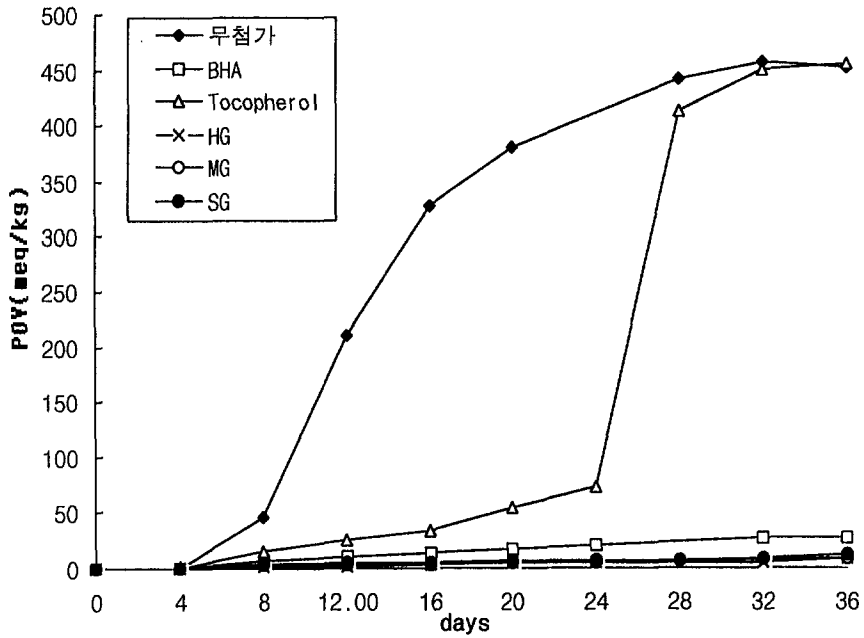


Fig. 26 돈지에 hexyl gallate(HG), methyl gallate(MG), stearyl gallate(SG)를 각각 0.02% 첨가한 후 60°C에서 자동산화시의 과산화물가.

-◆-: 돈지 -□-: 돈지+BHA -△-: 돈지+토코페롤
 -×-: 돈지+HG -○-: 돈지+MG -●-: 돈지+SG

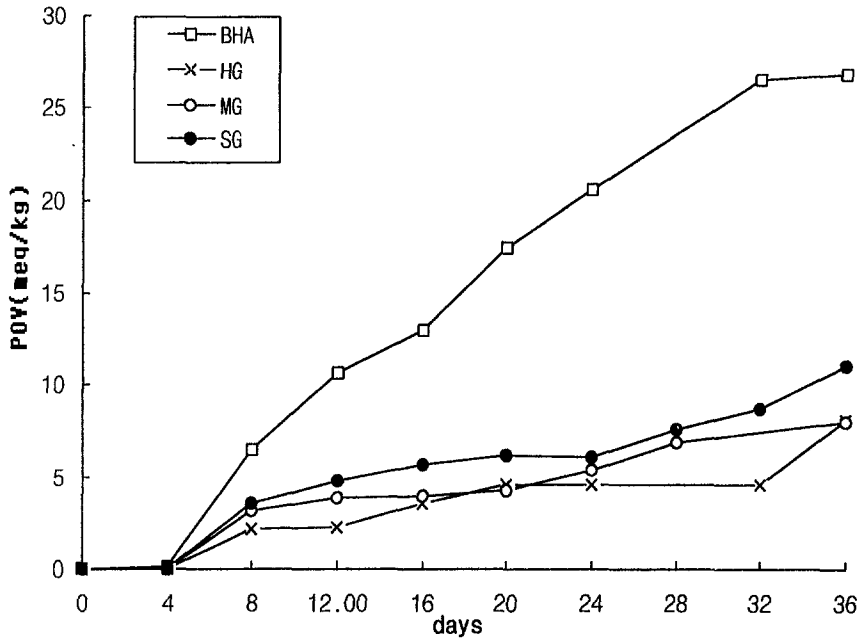


Fig. 27 돈지에 hexyl gallate(HG), methyl gallate(MG), stearyl gallate(SG)를 각
 각 0.02% 첨가한 후 60℃에서 자동산화시의 과산화물가.

-×-: 돈지+HG

-○-: 돈지+MG

-●-: 돈지+SG

3. 대두유의 열산화에 대한 gallic acid합성품의 항산화효과

대두유에 MG, HG, SG를 각각 0.02% 첨가한 후 튀김조건인 180℃에서 가열하면서 12시간마다 산가를 조사하였으며, 천연항산화제인 토코페롤과 합성항산화제인 BHA와 비교하였다(Fig. 28).

세가지 gallic acid합성품은 12-72시간까지의 가열시간동안 24시간 이후에는 무첨가구보다 산가가 높게 나타나 산화촉진제의 역할을 하였으며, 토코페롤 첨가구도 무첨가구보다 산가가 높아 항산화력이 없었다.

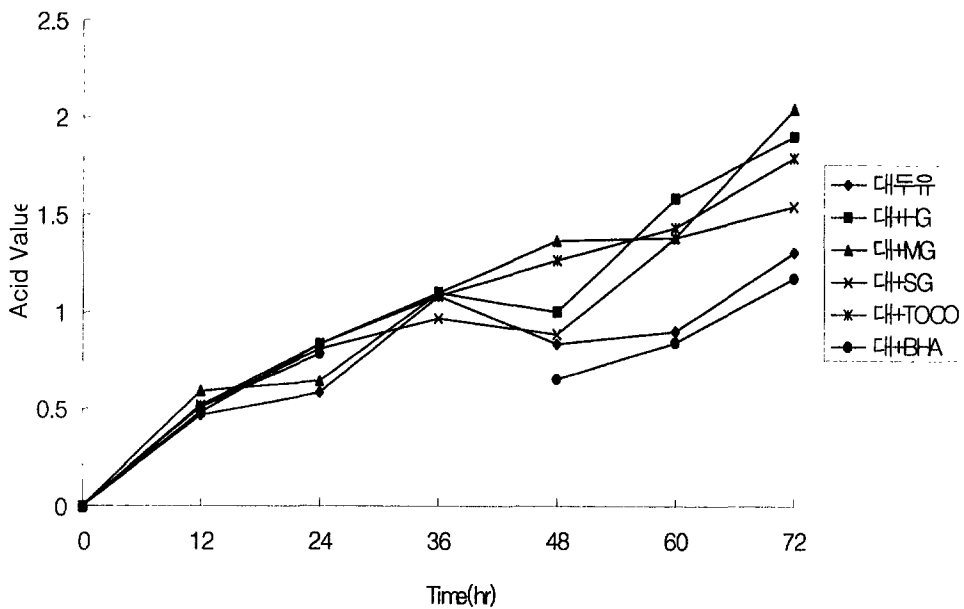


Fig. 28 대두유에 hexyl gallate(HG), methyl gallate(MG), stearyl gallate(SG)를 0.02% 첨가한 후 180℃에서 가열할 때의 산가변화.

4.. 돈지의 열산화에 대한 gallic acid합성품의 항산화효과

돈지에 MG, HG, SG를 각각 0.02% 첨가한 후 180℃의 튀김조건에서 가열하였다. 12시간마다 산가를 측정하였고, 천연항산화제인 토코페롤과 합성항산화제인 BHA와 비교한 결과는 Fig.29와 같다. 무첨가구에 비하여 첨가구들은 모두 효과가 있었는데 가장 산가의 증가속도가 느린 것은 MG와 HG이었다. MG와 HG는 산가의 증가속도가 무첨가구의 약 1/2정도 이었으며, 토코페롤이나 BHA보다도 아주 느린 것으로 나타나 돈지의 열산화에 있어서 항산화력이 큰 것으로 나타났다.

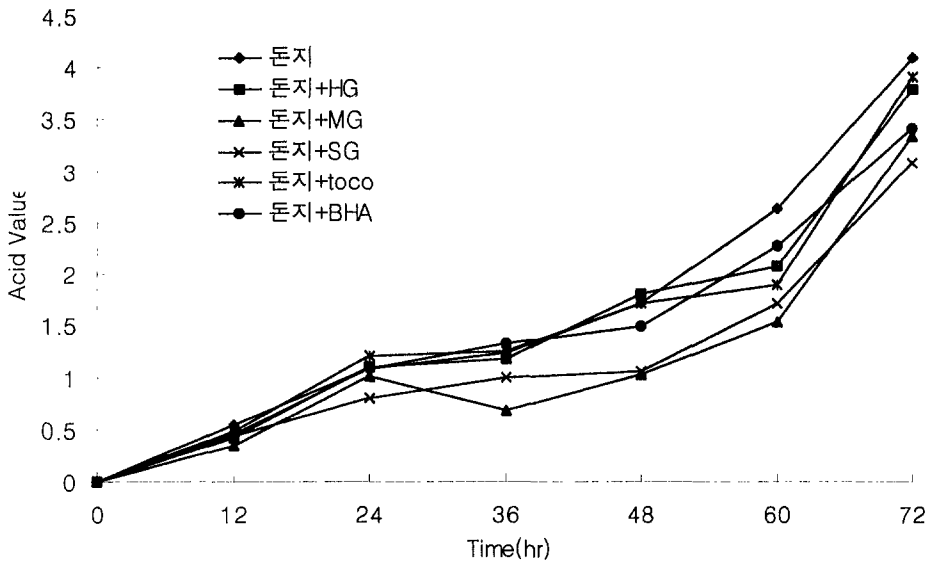


Fig. 29 돈지에 hexyl gallate(HG), methyl gallate(MG), stearyl gallate(SG)를 0.02% 첨가한 후 180℃에서 가열할 때의 산가변화.

5. 대두유에 대한 합성품의 산화안정성

대두유에 합성품 4종류와 토크페롤, BHA를 각각 0.02%씩 첨가하고 60℃에 저장하면서 일주일 간격으로 과산화물가를 측정한 결과는 Fig. 30과 같다.

4주 저장후 무첨가구의 과산화물가는 149.95meq/kg이었으며, 합성품1은 107.33meq/kg, 합성품2는 144.12meq/kg, 합성품3은 144.12meq/kg, 합성품4는 121.06meq/kg으로 합성품1과 4는 높은 항산화력을 나타냈으며, BHA첨가구와 토크페롤 첨가구는 각각 132.68meq/kg, 140.88meq/kg으로 무첨가구에 비하여 항산화력이 좋았다.

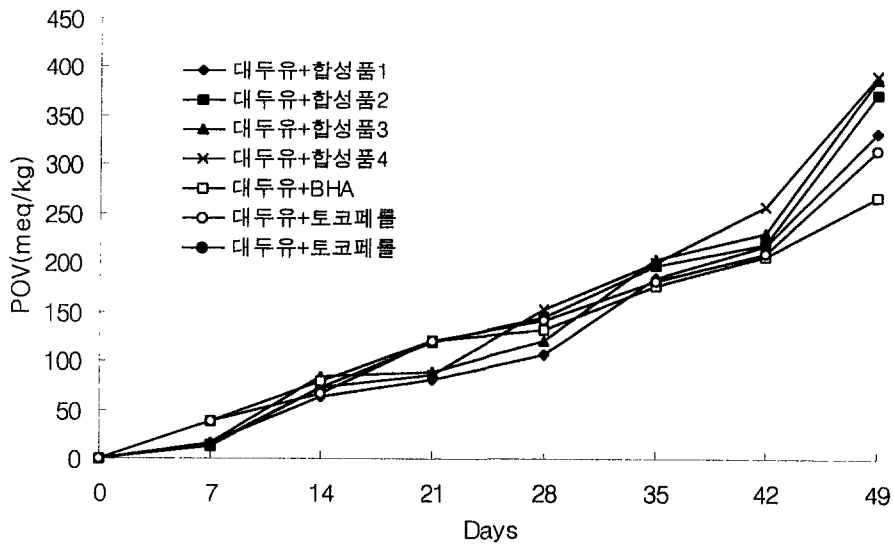


Fig. 30 대두유에 합성품 4종류를 0.02% 첨가한 후 60℃에서 자동산화시의 과산화물가

합성품1 : HHDP benzyl ether

합성품2 : Catechin benzyl ether

합성품3 : 5,6,0-isopropylidene-2-ascorbic acid

합성품4 : 2-O-(3,4,5-tribenzyloxygalloxy)-5,6-isopropylidene-L-ascorbic acid

실험 4. 항산화성이 우수한 추출물의 실용화 시험

1. 도너츠의 저장성에 대한 감, 울피 추출물의 항산화성

대두유와 감에테르추출물(P1)을 0.02% 첨가한 유지에서 도너츠를 제조한 후 60℃오븐에서 저장한 다음 열흘간 항산화효과를 비교한 결과는 Fig. 31과 같다. 5일마다 과산화물가를 측정된 결과 감에테르추출물(P1) 첨가구가 무첨가구에 비하여 높은 항산화력을 나타냈다. 5일과 10일 각각 무첨가구는 22.04, 46.89meq/kg을 나타낸 반면 감에테르추출물(P1) 첨가구는 15.79, 40.0meq/kg으로 항산화력이 좋음을 보였다.

대두유에 울피추출물 C1, 천연항산화제인 토코페롤과 합성항산화제인 BHA를 각각 0.02% 첨가한 후 튀김조건인 180℃에서 도너츠를 제조하여 60℃오븐에서 저장한 결과 항산화효과는 Fig. 32와 같다. 각각의 대조군은 2일마다 시료를 꺼내어 잘게 부순 후 헥산에 담귀 유지를 추출한 다음 과산화물가를 측정하였다. 그 결과 8일째 무첨가구는 90.7meq/kg을 나타내었고, C1 첨가구는 67.41, BHA 첨가구는 62.17meq/kg을 나타내어 높은 항산화력을 보였다. 반면 토코페롤 첨가구는 112.09meq/kg으로 항산화력이 떨어졌다.

10일째는 무첨가구는 104.5meq/kg이었고, C1 첨가구와 BHA 첨가구는 각각 86.47, 87.26meq/kg으로 무첨가구에 비하여 항산화력이 뛰어났으며, 토코페롤 첨가구는 138.59meq/kg으로 낮은 항산화력을 보였다.

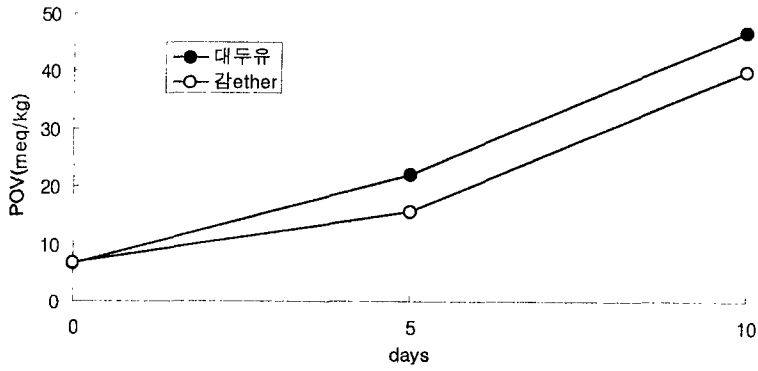


Fig. 31 감에테르추출물 P1 0.02%함유 대두유로 180℃에서 튀긴 도너츠의 60℃ 저장중 과산화물가의 변화.

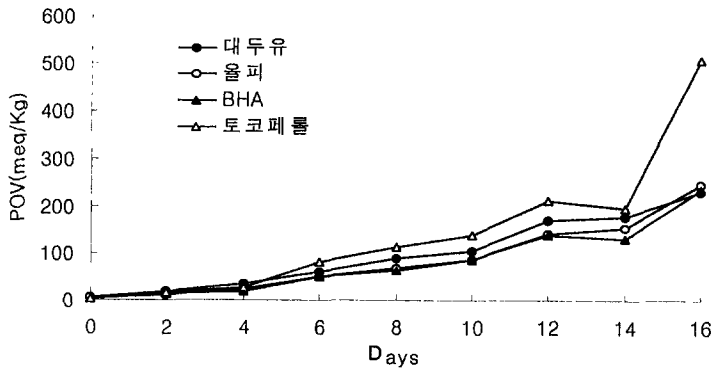


Fig. 32 울피추출물 C1(울피조추출물) 0.02%함유 대두유로 180℃에서 튀긴 도너츠의 60℃저장중 과산화물가의 변화.

2. 마요네즈의 자동산화에 대한 울피, 감 추출물의 항산화성

대두유에 C1, P1과 토코페롤, BHA를 각각 0.02%씩 첨가한 후 마요네즈를 제조하여 60℃에서 자동산화시키면서 과산화물가를 측정하였다. 그 결과는 Fig. 33과 같다. 2주후 무첨가구의 과산화물가는 23.65meq/kg이었으며, P1은 18.88meq/kg이고, C1의 과산화물가는 20.83meq/kg으로 무첨가구에 비하여 항산화력이 좋았다. BHA첨가구는 12.72meq/kg으로 항산화력이 우수했으며, 토코페롤 첨가구는 27.17meq/kg으로 항산화력이 떨어졌다. 초기에는 무첨가구에 비하여 첨가구들이 전반적으로 항산화성이 좋은 것으로 나타났으며, 실험이 진행중이므로 추출물의 항산화성이 좋을 것으로 기대된다.

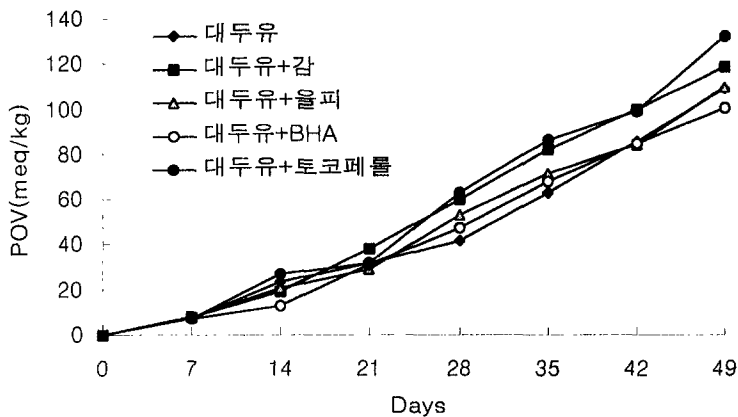


Fig. 33 대두유에 울피(C1), 감(P1), BHA, 토코페롤을 각각 0.02% 첨가한 다음 마요네즈 제조 후 60℃에서 자동산화시의 과산화물가 비교.

참 고 문 헌

제 2 장

1. 安部 茂 ; 最近の 癌の 免疫 療法劑 ; 醫藥 シセ-ナル, 25; 1927 - 1931 (1989)
2. 野本 ? 久雄 ; 免疫 療法劑면 ; 醫藥 シ세-ナル, 21, 231 - 236 (1985)
3. Sharn, N. and Lis, H ; Cell agglutinating and sugar-specific proteins; Science, 177 : 949 - 959 (1972)
4. Barondes, S.H. ; Soluble lectines: A new class of extracellular proteins; Science, 223 : 1259 - 1264 (1984)
5. 정시련, 김장환, 소명숙, 김무경, 현대금, 전경희 ; 미꾸라지 렉틴 성분의 생화학적 특성; 약학회지, 35 : 444 - 455 (1991)
6. Ken'ichi, I. and Ikw, S. ; Induction of nonspecific cell-mediated cytotoxic reactivity from non-immune spleen cells treated with Alectin A.; Int. J. Immunopharmac. 8 : 781 -787 (1986)
7. Ahn, Y. H. and Kim, J. H. ; Effects of squalene on the immune response in mice(I); Humoral immune responses of squalene; Arch. phram. Res. 14 : 370 - 378 (1991)
8. Palacios, R. ; Concanavalin A triggers T lymphocytes by directly interacting with their receptor for activation; J. Immunol. 128 : 337 - 342 (1982)

9. Hiernax, J.R., Baker, P.J., Delishi, C. and Budbach, J.A. ; Modulation of the immune response to lipopolysaccharide.; J. Immunol. 128 : 1054 - 1058 (1982)
10. Isolation of a renal function-facilitating constituent from the Oriental drug, *Slviae Miltiorrhizae Radix* T. Yokozawa, H. Y. Chung, H. Oura, G. I. Nonaka, and I. Nishioka Japanese Journal of nephrology 31, 1091 (1989)
11. T. H. Beasley, H. W. Ziegler, and A. D. Bell Anal. Chem, 49, 238 (1977)
12. M. Nishizawa, T. Yamagishi, G. Nonaka, and I. Nishoka Yakugaku Zasshi, 104, 1244 (1984)
13. L. M. Du Plessis, J. AOCS., 58, 575 (1981)
14. S. H. Yoon, et al., J. AOCS., 62, 1485 (1985)
15. T. Asakawa and S. Matsushita, Lipids, 15, 965 (1980)
16. O. Ohta, "Deterioration of Fried Food and Its Protection", Saiwai Shobo, Tokyo, pp. 224 - 225 (1977)
17. Y. Fujino, "An Introduction to Lipid Analysis", Biochemical Experimental Method Series, No. 9, Gakka; Shuppan Center, Tokyo, pp.51 - 52 (1980)
18. S. Ohta and E. Yuki, "theory and Practice of Fried Food," Saiwai Shobo, Tokyo, pp. 380 - 381 (1976)
19. M. A. Kim, et al., Relationship between the Triacylglycerol Composition and Foaming of Mixed Coconut Oil under Deep-Fat Frying, Agric. Biol. Chem., 52, 693 (1988)

20. Owen R. Fennema, "Food Chemistry" Marcel Dekker, Inc., New York (1985)
21. 김광옥, 이영춘, "식품의 관능검사", 학연사. 서울 (1995)
22. 김명애, 에스터르화라아드가 파이껍질제조에 미치는 영양, 한국식품과학회지, 24(3), 251-255 (1992)
23. 김명애, 이선옥, 반죽의 냉동처리가 chou형성에 미치는 효과, 한국조리과학회지, 10(4), 405 - 411 (1994)
24. Carlberg, I. : Purification and characterization of the favoenzyme glutathione reductase from rat liver. J. Biol. Chem., 250, 5475 - 5480 (1975)
25. Gali hu : Antitumor-promoting effects of gallotannins extracts from various sources in mouse skin in vivo. Anticancer Rex. 1993 Jul-Aug. 13(4). pp. 915-22
26. Habig, W. H. : Glutathione-s-transferase : the first enzyme step in mercaturic acid formation. J. Biol. Chem., 249, 7130 - 7139 (1974)
27. Hirose M : Inhibition of mammary gland carcinogenesis by green tea catechins and other naturally occurring antioxidants. in female SD rats pretested with 7, 12 - dimethylbenz[alpha]anthracene, Cancer lett. 1994 Aug 15. 83(1-2). p149-156
28. Hupkens P : Tannic acid as a topical agents in burns : histological considerrations and implications for new developments. Burns. 1995 Feb. 21(1). p 57 - 61

29. Jamall, IS : Effects of cadmium and glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and lipid peroxidation in the rat heart, a possible mechanism of cadmium cardiotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, Vol. 80, 33 - 42 (1985).
30. Kuppusamy UR : Protective effects of tannic acid and related natural compounds on *Crotalus adamanteus* subcutaneous poisoning in mice, *Pharmacol Toxicol.* 1993 Apr - May 72 (4-5) p 290-295
31. Paglia, D. E. : Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase *J. Lab. Clin. Med.*, 70, 158 - 169 (1967)
32. Upreti KK : Role of antioxidants and scavengers on argemone oil-induced toxicity in rats, *Arch Environ Contam Toxicol.* 1991 May 20(4) p 531-537

제 3 장

1. 김판기 : 카드뮴중독 랫드의 Heat Shock Protein 발현과 Diallyl Disulfide 및 Retinol Acetate의 영향, 서울대학교 박사학위논문, 1996.
2. 土屋健三郎 : 金屬中毒學, 285-307, 醫齒藥出版, 1980.
3. Nordberg, G. F. : Cadmium carcinogenesis and its relationship to other health effects in humans. *Scandinavian Journal of Work Environmental Health* 19: 104-107, 1993.
4. Kawada T., H. Koyama, and S. Suzuki : Cadmium, NAG activity, and β 2-microglobulin in the urine of cadmium pigment workers. *British Journal of Industrial Medicine* 46: 52-55, 1989.
5. 1994-'95 Threshold limit value for chemical substances & physical agents & biological exposure indices, ACGIH, 1994.
6. Waalkes, M. P., A. Peranton, M. R. Bhave, and S. Rehm : Strain dependence in mice of resistance and susceptibility to the testicular effects of cadmium: assessment of the role of testicular cadmium-binding proteins. *Toxicology and Applied Pharmacology* 93: 47-61, 1988.
7. Jin, T., and G. F. Nordberg : Cadmium toxicity in kidney cells. Resistance induced by short term pretreatment in vitro and in vivo. *Acta Pharmacology et Toxicology* 58: 137-143, 1986.
8. Beattie, J. H., M. Marion, J-P. Schmit and F. Denizeau : The cytotoxic effects of cadmium chloride and mercuric chloride mixtures in rat primary hepatocyte cultures. *Toxicology* 62: 161-173, 1990.

9. Shiraishi, N., H. Uno, and M. P. Waalkes : Effect of L-ascorbic acid pretreatment on cadmium toxicity in the male fischer (F344/NCr) rat. *Toxicology* 85: 85-100, 1993.
10. Shiraishi, N., R. A. Barter, H. Uno, and M. P. Waalkes : Effect of progesterone pretreatment on cadmium toxicity in the male fischer (F344/NCr) rat. *Toxicology and Applied Pharmacology* 118: 113-118, 1993.
11. 안령미, 김완태, 이희성 : 카드뮴독성에 대한 부추 (*Allium OdorrumL.*)의 방어효과, *한국환경위생학회지* 17(2), 102-113, 1991.
12. Ong KC, Khoo HE, Das NP : Tannic acid inhibits insulin-stimulated lipogenesis in rat adipose tissue and insulin receptor function in vitro. *Experimentia* 51(6) : 577-584, 1995.
13. Yu H, Oho T, Xu LX : Effects of several tea components on acid resistance of human tooth enamel. *Journal of Dentistry* 23(2) : 101-105, 1995.
14. Onodera H, Kitaura K, Mitsumori K, Yoshida J. : Study on the carcinogenicity of tannic acid in F344 rats. *Food Chemical Toxicology* 32(12) : 1101-1106, 1994.
15. Ogasawara H, Todate A, Onodera H. : Subchronic oral toxicity study of tannic acid in F344 rats. *Eisei Shikenjo Hokoku* 108 : 84-89, 1990.
16. Bhat R., Ha di SM : DNA breakage by tannic acid and Cu(II) : generation of active oxygen species and biological activity of the reaction. *Mutation Research* 313(1) : 49-55, 1994.

제 4 장

1. Athar M, Khan W.A and Mukhtar H. (1989) : Effect of Dietary Tannic Acid on Epidermal, Lung, and Forestmoach Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Metabolism and Tumorigenicity in Sencar Mice. *Cancer Res.* 49 : 5784-5788.
2. Bender M.A, Griggs H.G. and Walker P.L. (1973) : Mechanisms of chromosomal aberration production 1. Aberration induction by ultraviolet light. *Mutation Res.* 20 : 387-402.
3. Hasegawa T. : Changes in lipid peroxide levels and activity of reative oxygen scavenging enzymes in skin, serum and liver following UVB irradiation in mice. *Life Sci.* 50, 1893, 1992 .
4. Pence B. C., : Effects of single-dose ultraviolet radiation on skin superoxide dismutase, catalase, and xanthine oxidase in hairless mice, *J. Invest. Dermatol.*, 95, 213, 1990.
5. Gensler, H.L., Gerrish, K.E., Williams, T., Rao, G.: Prevention of photocarcinogenesis and UV-induce immunosuppression in mice by topical tannic acid. *Nutr. Cancer.*, 22, 121, 1994.
6. Andrija, K., Wayne, W., and Albert, G. Jr. (1987): Light-induced dermal toxicity:effects on the cellular and molecular level, *Dermatotoxicology*. 3rd edited by Francis, N. M. and Howard, I. M. pp 377-412, Hemisphere Publishing Cor, New york .

7. Jimbow, K. and Uesugi, T. (1982): New melanogenesis and photobiological processes in activation and proliferation of precursor melanocytes after UV exposure : Ultrastructural differentiation of precursor melanocytes from langerhans cell, *J. Invest. Dermatol.*, 78, 108-115 .
8. Kameyama K., Takemura T., Hamada Y., Sakai C., Kondoh S. Nishiyama S. : Pigment production in murine melanoma cells is regulated by tyrosinase, tyrosinase-related protein 1 (TRP 1), dopachrome tautomerase (TRP 2) and a melanogenic inhibitor. *J. Invest. Dermatol.*, 100, 126-131, 1993
9. Maeda K., Fukuda M. : In vitro effectiveness of several whitening cosmetic components in human melanocyte. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 42, 361-368, 1991
10. Mosmann T. : Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival ; Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* 65, 55 (1983).
11. Maeda K., Tomita Y., Fukuda M. and Tagami H. : Effects of staurosporine, PMA and A23187 on human melanocyte cultures with dibutyryl cyclic AMP. *British journal of dermatology.* 126, 118 (1992).
12. Tagami H. MD : Electrical measurement of the Water content of the skin surface, *Cosmetics & Toiletries.* 92: 39-47, 1982.
13. Yoshie Muramatsu, Kunio Kinoshita : 水と皮膚とNMF, 皮膚科學的評價と新NMFの可能性, *Frag J.* 51: 8-13, 1981.
14. Reuben Lotan and Dafna Lotan : Stimulation of melanogenesis in human melanoma cell line by retinoids. *Cancer research.* 40, 3345 (1980).

제 5 장

1. 신동화, 이연재, 장영상, 강우석 : 붉나물 추출물과 상승제의 항산화 효과. 한국식품과학회지, 24, 547(1992)
2. Giese, J : Antioxidants: Tools for preventing lipid oxidation. Food Tech, 50(11), 73(1996)
3. Buck, D.F. : Antioxidants in Soya Oil, JAOCS, March : 275(1981)
4. Humann, B.F. : Antioxidants; Firms seeking products they can label as 'natural'. Inform, 1, 1002(1990)
5. Farag, R.S., Badei, A.Z.M.A. and Baroty, G.S.A.: Influence of thyme and clove essential oils in cotten seed oil oxidation. JAOCS, 66, 800(1989)
6. Farag, R.S., Ali, M.N. and Taka, H.S.: Use of some essential oils as natural preservatives for butter. JAOCS, 68, 188(1990)
7. Osawa, T. and Namiki, M.: A novel type of antioxidant isolated from leaf wax of Eucalyptes leaves. Agric. Biol. Chem., 45, 735(1981)
8. Hudson, B.J.F. and Ghavami, M.: Stabilising Factors in Soybea Oil-Natual Components with Antioxidant Activity, Lebensm-Wiss. U. Technol., 17(2) : 82(1984)
9. Hudson, B.J.F. and Lewis, J.I.: Polyhydroxy Flavonoid Antioxidants for Edible Oils. Phospholipid as Synergists, Food Chem., 10 : 111(1983)
10. Pratt, D.E. and Birac, P.M. : Source of Antioxidant Activity of Soy-beans and Soy Products: J. Food Sci., 44: 1720(1979)

11. Hudson, B.J.F. and Ghavami, M. : Phospholipids as Antioxidants synergists for Tocopherols in the Autoxidation of Edible Oils, *Lebensm-Wiss. U. Technol.*, 17(4) : 191(1984)
12. Hudson, B.J.F. and Mahgaub, S. E. O. : Naturally-Occurring Antioxidants in Leaf Lipids, *J. Sci. Food Agric.*, 31 : 646(1980)
13. 최 응, 신동화, 장영상, 신재익 : 식물성 천연 항산화물질의 항산화력. *한국식품과학회지*, 24, 142(1992)
14. Larson, R.A.:The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry*, 27, 969(1988)
15. Pratt, D.E. and Hudson, B. J. F.: natural antioxidant not exploited commercially. In:Food Antioxidants. Hudson, B.J.F. (ed), Elsevier, p171(1990)
16. 이미현, 정재홍, 오만진 : 도토리 Gallic Acid의 항산화성. *한국영양식량학회지*, 1(6), 693(1992)
17. 이정희, 이서래: 국내산 식물성 식품중 페놀성 물질의 함량분석. *한국식품과학회지*, 26(3), 310(1994)
18. Kumar,R.and Singh,M.: Tannins: Their adverse role in ruminant nutrition. *J. Agric. Food Chem.*, 32, 447(1984)
19. Salunkhe, D.K., Chavan, J.K. and Kadam, S.S.: Dietary Tannins: Consequences and Remedies. CRC Press, Inc., Boca Raton(1990)
20. 김영희 : 대두유 및 대두유-물 에멀젼기질에서의 각종 페놀화합물의 항산화 작용. 고려대학교 식품공학과 석사학위논문(1982)
21. AOCS: Official Method. American Oil Chemists' Society, Champaign, IL (1978)

부 표

- 부표 1. 식물 추출물 및 갈릭산 유도체의 항산화제로의 용도 (특허출원 사본)
- 부표 2. 식물로부터 분리한 탄닌 및 그 유도체 제조방법 (특허출원 사본)
- 부표 3. 감의 체계적인 추출 및 분획법
- 부표 4. 솔잎의 체계적인 추출 및 분획법
- 부표 5. 호프의 체계적인 추출 및 분획법
- 부표 6. 울피 아세톤 추출물의 HPLC chromatogram
- 부표 7. 울피에 함유된 탄닌 및 폴리페놀화합물의 양
- 부표 8. 감의 아세톤 추출물의 HPLC chromatogram
- 부표 9. 감에 함유된 탄닌 및 폴리페놀화합물의 양
- 부표 10. 솔잎에 아세톤 추출물의 HPLC chromatogram
- 부표 11. 솔잎에 함유된 탄닌 및 폴리페놀화합물의 양
- 부표 12. 호프 아세톤 추출물의 HPLC chromatogram
- 부표 13. 호프의 아세톤 추출물에 함유된 탄닌 및 폴리페놀 화합물의 양

부표 1. 식물 추출물 및 갈릭산 유도체의 항산화제로서의 용도(특허출원사본)



사 본
C O P Y

방식 심사 사리	답 당	심 사 관

- 【서류명】 출원서
 【권리구분】 특허
 【수신처】 특허청장
 【참조번호】 4
 【제출일자】 1999.02.12
 【발명의 국문명칭】 식물 추출물 및 갈릭산 유도체의 항산화제로서의 용도
 【발명의 영문명칭】 The use of plant extract and gallic acid derivative asantioxidant
 【출원인】
 【성명】 김용욱
 【출원인코드】 4-1999-001967-1
 【출원인】
 【성명】 임세진
 【출원인코드】 4-1999-001966-5
 【출원인】
 【성명】 김명애
 【출원인코드】 4-1999-001964-2
 【대리인】
 【성명】 이덕록
 【대리인코드】 9-1998-000461-7
 【포괄위임등록번호】 1999-002863-1
 【포괄위임등록번호】 1999-002861-7
 【포괄위임등록번호】 1999-002858-0
 【발명자】
 【성명】 김용욱

【출원인코드】 4-1999-001967-1

【발명자】

【성명】 임세진

【출원인코드】 4-1999-001966-5

【발명자】

【성명】 김명애

【출원인코드】 4-1999-001964-2

【취지】 특허법 제42조의 규정에 의하여 위와 같이 출원합니다.

대리인

이덕복



【수수료】

【기본출원료】	20	면	29,000	원
【가산출원료】	21	면	21,000	원
【우선권주장료】	0	건	0	원
【심사청구료】	0	항	0	원
【합계】			50,000	원

【감면사유】 개인

【감면후 수수료】 25,000 원

【첨부서류】 1.요약서·명세서(도면)-1통

부표 2. 식물로부터 분리한 탄닌 및 그 유도체 제조방법 (특허출원 사본)



방식 심사관	답	답	심사관

- 【서류명】 출원서
- 【권리구분】 특허
- 【수신처】 특허청장
- 【참조번호】 1
- 【제출일자】 1999.02.09
- 【발명의 국문영칭】 식물로부터 분리한 탄닌 및 그 유도체 제조방법
- 【발명의 영문영칭】 Tannin isolated from plant and process for making the derivative thereof
- 【출원인】
 - 【성명】 김용욱
 - 【출원인코드】 4-1999-001967-1
- 【출원인】
 - 【성명】 임세진
 - 【출원인코드】 4-1999-001966-5
- 【출원인】
 - 【성명】 김명애
 - 【출원인코드】 4-1999-001964-2
- 【대리인】
 - 【성명】 이덕복
 - 【대리인코드】 9-1998-000461-7
 - 【포괄위임등록번호】 1999-002863-1
 - 【포괄위임등록번호】 1999-002861-7
 - 【포괄위임등록번호】 1999-002858-0
- 【발명자】
 - 【성명】 김용욱

【출원인코드】 4-1999-001967-1

【발명자】

【성명】 임세진

【출원인코드】 4-1999-001966-5

【발명자】

【성명】 김명애

【출원인코드】 4-1999-001964-2

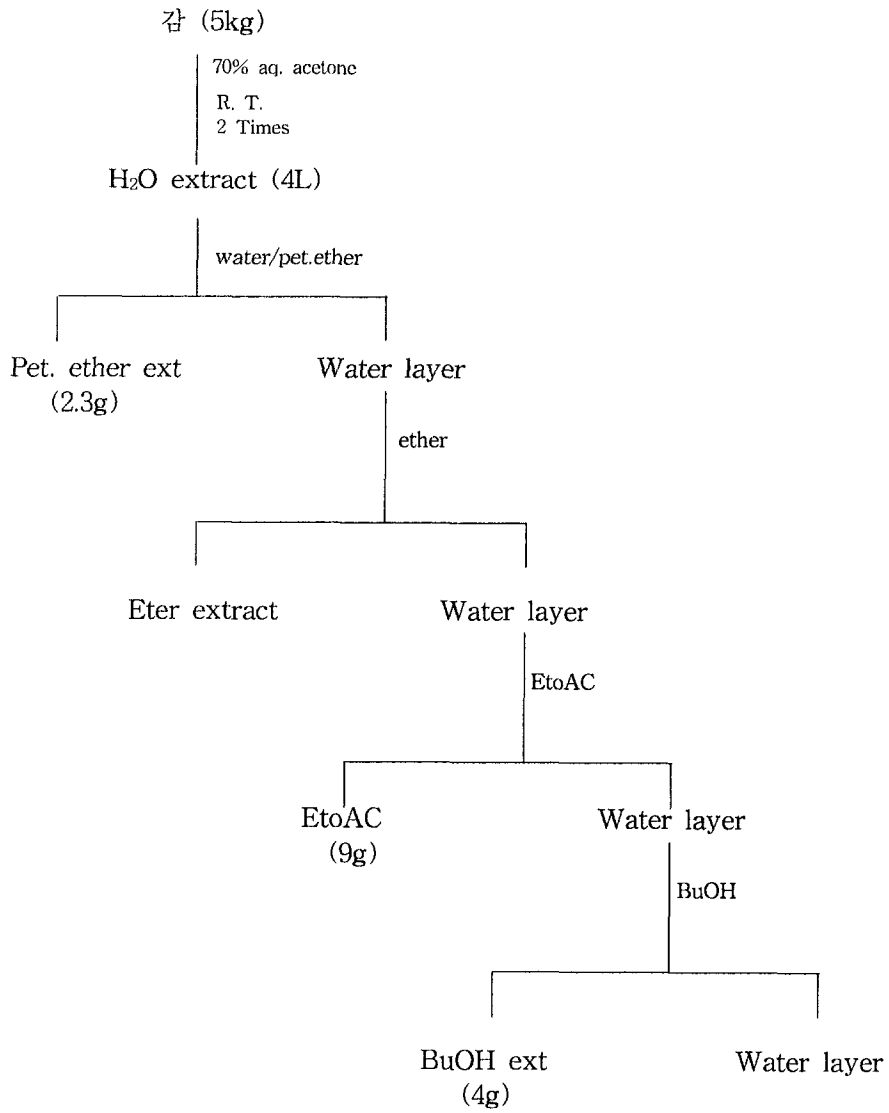
【취지】 특허법 제42조의 규정에 의하여 위와 같이 출원합니다.

대리인

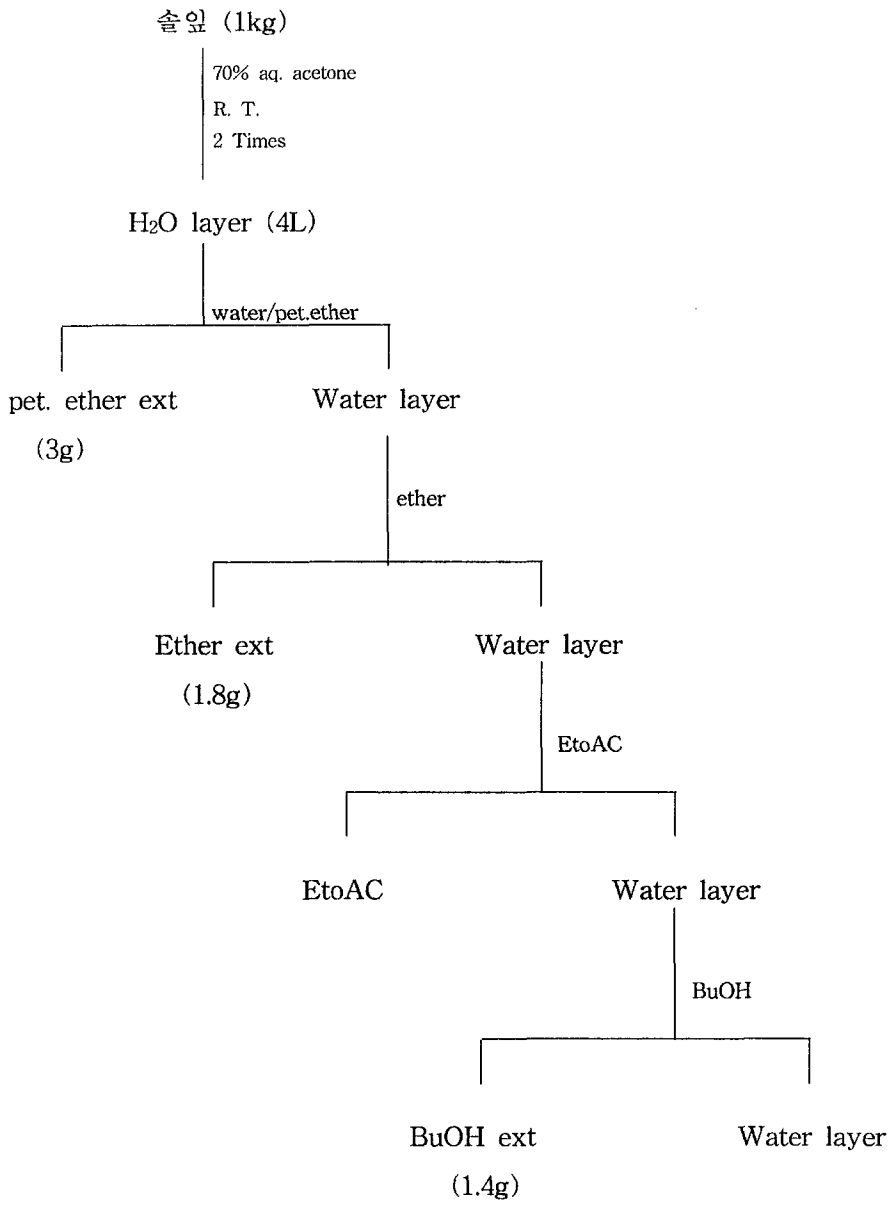
이덕록 (인)

【수수료】

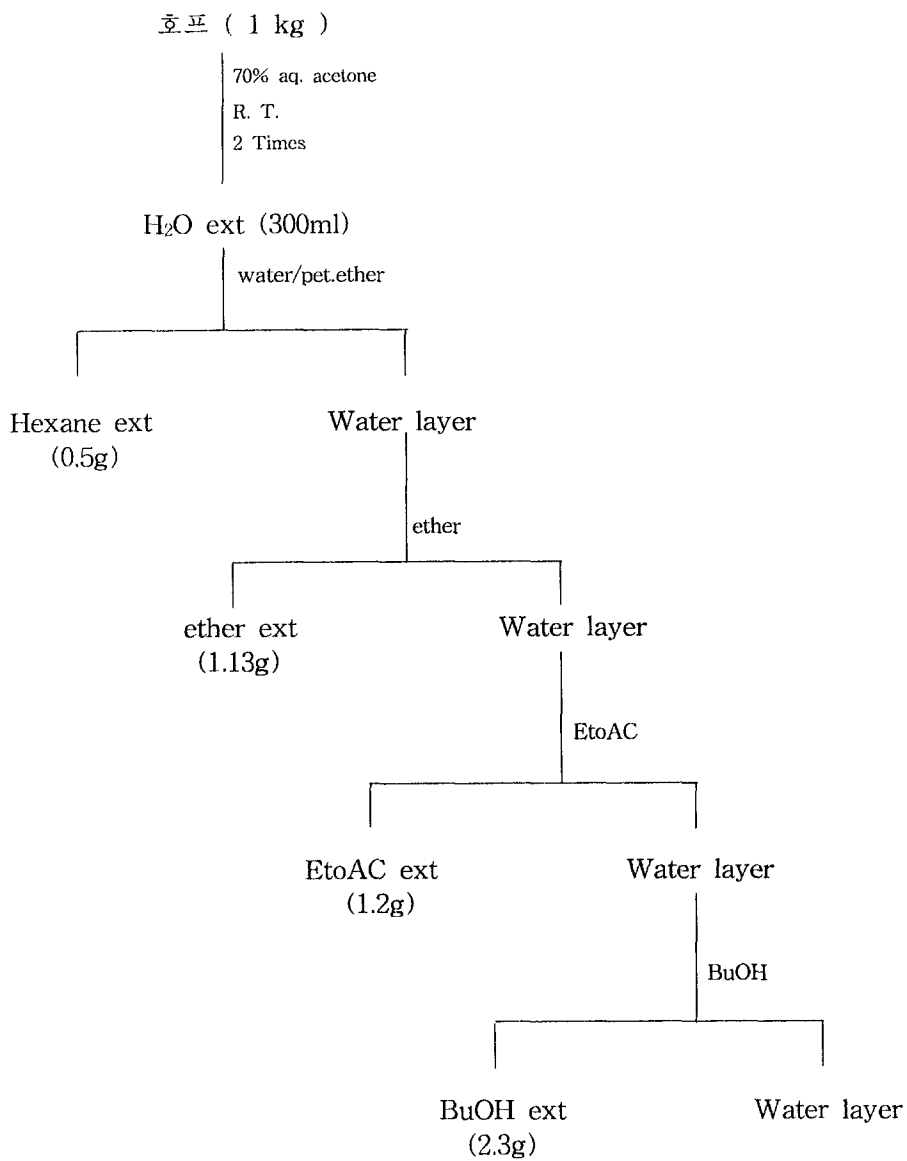
【기본출원료】	20	면	29,000	원
【가산출원료】	16	면	16,000	원
【우선권주장료】	0	건	0	원
【심사청구료】	0	항	0	원
【합계】			45,000	원
【감면사유】	개인			
【감면후 수수료】			22,500	원



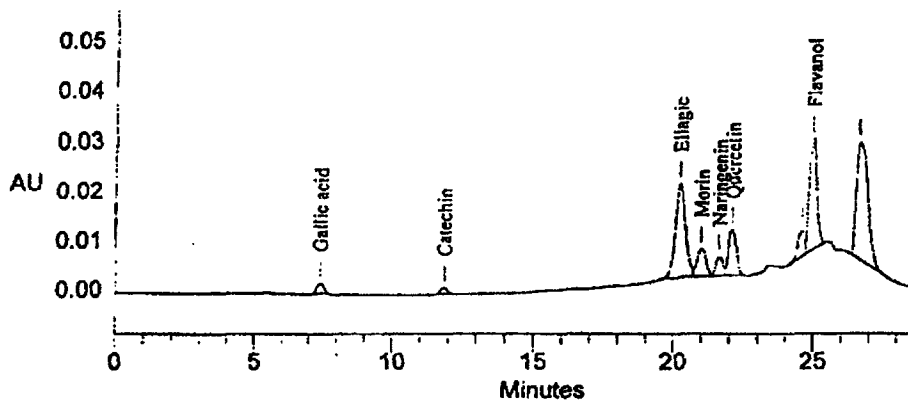
부표 3. 감의 체계적인 추출 및 분획법



부표 4. 솔잎의 체계적인 추출 및 분획법



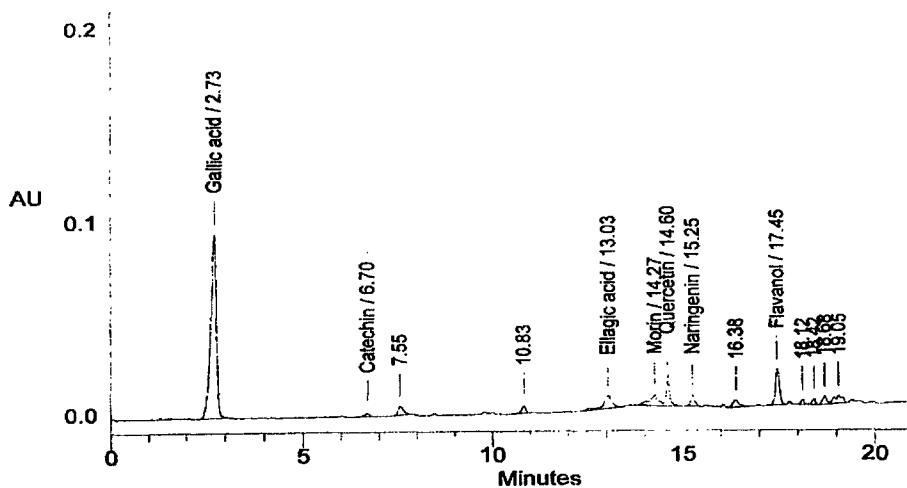
부표 5. 호프의 체계적인 추출 및 분획법



부표 6. 울피 아세톤 추출물의 HPLC chromatogram.

부표 7. 울피에 함유된 탄닌 및 폴리페놀 화합물의 양.

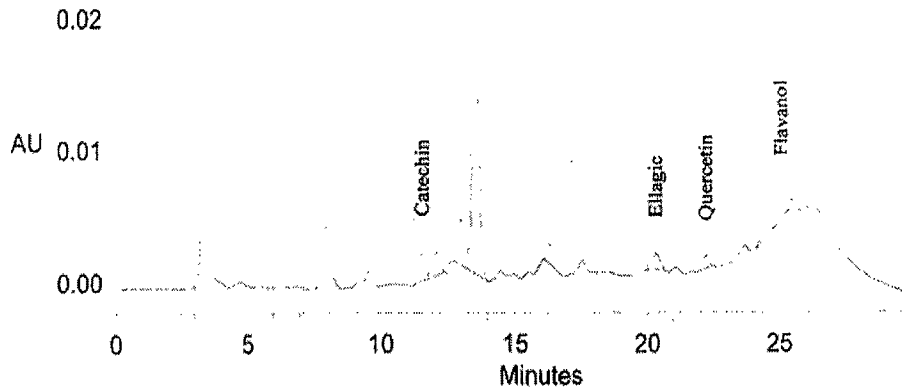
함유성분	함유량 (g/500g)
Ellagic acid	82.50
Quercetin	32.50
Morin	21.30
Narigenin	13.80
Gallic acid	5.00
Catechin	3.80



부표 8. 감의 아세톤 추출물의 HPLC chromatogram

부표 9. 감에 함유된 탄닌 및 폴리페놀 화합물의 양

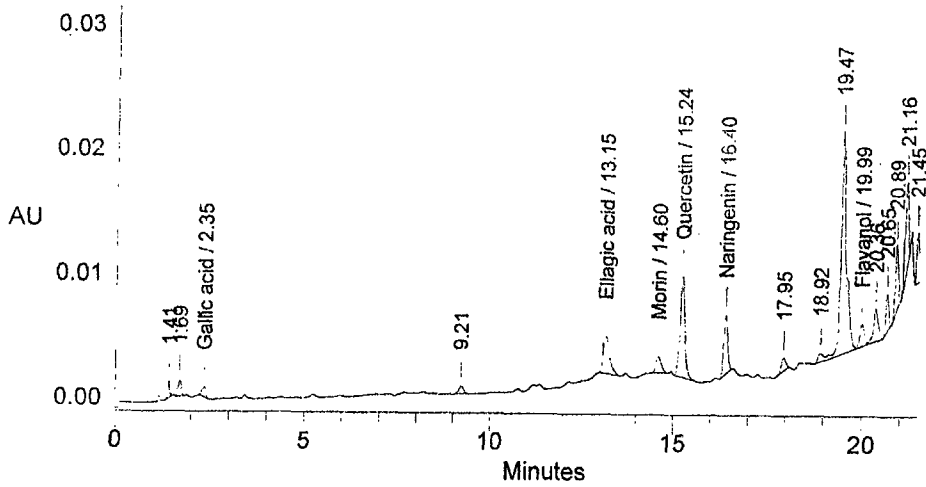
함유성분	함유량 (g/500g)
Gallic acid	7.60
Morin	4.50
Flavanol	3.72
Narigenin	2.84
Ellagic acid	2.44
Quercetin	2.40
Catechin	1.12



부표 10. 솔잎 아세톤 추출물의 HPLC chromatogram.

부표 11. 솔잎에 함유된 탄닌 및 폴리페놀 화합물의 양

함유성분	함유량 (g/kg)
Flavonol	12.40
Ellagic acid	3.20
Catechin	1.80
Quercetin	1.70
Morin	0.65



부표 12. 호프 아세톤 추출물의 HPLC chromatogram.

부표 13. 호프에 함유된 탄닌 및 폴리페놀 화합물의 양.

함유성분	함유량 (g/kg)
Ellagic acid	3.21
Narigenin	2.90
Quercetin	2.63
Morin	1.63
Flavonol	1.56
Gallic acid	1.12