

615.89
L2932

GOVP 12009256

최 종
연구보고서

전통한방처방의 감기 억제 약리 작용에 기초한 기능성 음료 및 전통 식품의 개발

Study on the Functional Food and Drink
Preparation based on Anti-influenza Virus
Activity of Korean Traditional Prescriptions

한국한의학연구원(풍한식품)

농림부



최 종 보 고 서

1996년도 농림기술특정연구사업에 의하여 완료한 “전통한방처방의 감기억제 약리 작용에 기초한 기능성 음료 및 전통 식품의 개발”에 관한 연구의 최종보고서를 별첨과 같이 제출합니다.

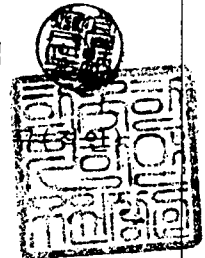
- 첨부 : 1. 최종보고서 10부
2. 최종보고서 디스켓 1매

1999. 10. 30.

주관연구기관 : 한국한의학연구원

총괄연구책임자 : 고 병 섭

주관연구기관장 : 신 민



농 립 부 장 관 귀 하

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “전통한방처방의 감기억제 약리작용에 기초한 기능성 음료 및 전통 식품의 개발에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

1999. 10. 30.

주관연구기관명 : 한국한의학연구원
총괄연구책임자 : 고 병 섭
세 부 책 임 자 : 김 호 경
연 구 원 : 마 진 열
연 구 원 : 이 미 영
연 구 원 : 전 원 경
연 구 원 : 박 갑 주
연 구 원 : 정 재 득
연 구 원 : 강 은 정
협동연구기관명 : 풍 한 식 품
협동연구책임자 : 손 준 구
위탁연구기관명 : 경 기 대 학 교
위탁연구책임자 : 김 명 희
위탁연구기관명 : 공 주 대 학 교
위탁연구책임자 : 오 남 순

요 약 문

I. 제 목

전통한방처방의 감기억제 약리작용에 기초한 기능성 음료 및 전통 식품의 개발에 관한 연구

II. 연구개발의 목적 및 중요성

- 감기 한방 처방에 원료 한약재로부터 항호흡기 바이러스 물질을 탐색하여 새로운 처방을 창출한다.
- 감기예방 효능을 가진 새로운 한방처방의 보완실험을 통해 용도특허를 출원하고, 이를 이용하여 고부가가치가 있는 기능성상품을 창출한다.
- 신처방의 경험을 응용하여 더욱 강한 항 인플루엔자바이러스 활성을 갖는 기능성 식품개발의 기반연구를 조성한다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 감기예방 및 치료보조의 효과를 가진 기능성 한방식품을 개발하기 위해 아래와 같이 연구개발 내용 및 범위를 설정하였다.

- 전통 한방감기처방과 사상방을 이용하여 신처방을 개발하고, 이를 이용하여 현재 시중에서 시판되고있는 쌍화탕류 및 갈근탕류의 효과를 훨씬 능가하는 감기예방 및 치료목적에 갖는 기능성음료를 드링크제로 개발한다.
- NP-97-1을 이용하여 특히 노약자 및 어린이의 감기예방을 목적으로하는 떡제품을 개발하고 상품화한다.

IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구결과

본 연구에서는 한의학의 특성을 이용하면 인체 면역기능을 보강하는 효과를 가지고 있는 새로운 기능성 물질이 탐색될 수 있다는 점에 착안하여, 한의학적으로 감기 치료에 사용되고 있는 비·처방과 민간방 63종의 구성 한약재로부터 항호흡기 바이러스 물질의 탐색을 위한 기반연구로서 항인플루엔자 활성을 조사하고 국내외에서 시판하고 있는 9종의 감기 한방 엑기스제제 및 인플루엔자 바이러스 Type A 저해제 2종(amantadine · HCl과 Mw. 5000 Dextran sulfate)과 비교 검토하였고, 한의방제론에 입각한 조합에 의해 신처방을 창출하여 감기예방과 치료보조의 기능성 한방제품을 개발하는 방안을 제시하였다.

항인플루엔자 바이러스 활성 검사 방법인 Haemagglutination inhibition test(HIT)가 가지고 있는 결점을 보완할 수 있는 새로운 in situ ELISA에 의한 항바이러스 활성검사 방법을 확립하였다.

유자에서 분리·정제한 4종류의 flavonoid 배당체 중, Compound I은 자연에서 처음으로 발견된 flavonoid물질이며, 항바이러스 활성을 측정한 결과 Compound II는 IC₅₀ 값이 918.46 μ l/ml으로 항바이러스 효과가 있었다.

한방 방제의 원리인 군신좌사와 칠정합화의 이론에 근간한 신처방 중 NP-97-1을 응용하여 기능성 한방음료 및 케이크화한 떡제품을 개발하였고, 실용화하기 위해 공장 규모와 상업성에 입각한 제작공정을 확립하였다.

2. 활용에 대한 건의

1. 유자에서 분리·정제한 4종류의 flavonoid 배당체 중, Compound II는 IC₅₀ 값이 918.46 μ l/ml으로 항바이러스 효과가 있어 물질특허를 출원할 필요성이 있으며, 이 화합물에 대한 지속적인 연구로 새로운 부가가치가 있는 물질 창출의 연구

가 필요하다.

2. 본 연구에서 호흡기성 바이러스예방 또는 억제 기능을 가진 한방음료 및 떡제품의 연구 결과는 현단계에서 산업화를 위한 기술이전이 가능하므로 산업화를 할 수 있는 제정 등 프로그램의 지원이 필요하다.

S U M M A R Y

In order to search for anti-influenza virus type A agents from oriental herbs on the basis of the kammo(感冒) traditional prescriptions, we selected 100 species of oriental herbs, based on a review of the traditional medicine books. Both methanol extracts and boiling-water extracts were tested by means of the Haemagglutination Inhibition Test(HIT). New prescriptions of active oriental herbs, based on traditional medicine theory, also were tested by means of HIT.

These results of HIT indicated that oriental herbs and new prescriptions might be inhibit either attachment of virus to cell surface receptor or penetration of virus into cell during the initial stage of infection. The 21 species of oriental herbs from kammo(感冒) traditional prescriptions are considered as being useful for the development of antiviral drug and funtional food against influenza virus type A. The desired new screening test for anti-influenza virus was established by in situ ELISA method.

Antiviral effect of NP-97-1 against influenza virus [A/Taiwan/1/86/(H₁N₁)] was stuided. Chaenomeles Fructus and Junoris Fructus had antiviral activity but Zizyphi Fructus had not. By HIT and in situ ELISA method, fractions of Junoris Fructus was detected activity but Chaenomeles Fructus was not because of potent cytotoxicity to MDCK cell.

Water extract of Junoris Fructus was fractionated by chromatographic separation using Amberlite XAD-4, 40% MeOH and 60% MeOH layer had efficacy by HIT method. By in situ ELISA method, 60% MeOH fraction was detected activity but 40% MeOH was not because of potent cytotoxicity.

From the active 60% MeOH fraction of Junoris Fructus, two flavonoid triglycoside, naringenin 7-*O* (2", 6"-di-*O*- α -L-rhamnopyranosyl)- β -D-glucoside

-pyranoside(Compound I) and hesperetin 7-*O* (2", 6" -di-*O*- α -L-rhamno-pyranosyl)- β -D-glucopyranoside(Compound II) along with known hesperidin(Compound III) and narirutin(Compound IV) were isolated and elucidated by spectroscopic methods (IR, FAB(-)MS, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, $^1\text{H-}^1\text{H COSY}$, $^{13}\text{C-}^1\text{H COSY}$, HMBC). Especially, Compound I is new flavonoid glycoside and Compound II is reported in this plant for the first time.

Compound II showed antiviral effect with the 50% virus-inhibitory concentration of $918.46\mu\text{l/ml}$ but Compound I, Compound III and Compound IV did not inhibit influenza virus (IC_{50} : $>1,000\mu\text{l/ml}$). Structure-activity comparison revealed that flavonoid molecule with a methoxyl group at C-2' of ring B and a rhamnose moiety at C-2' of glucose would exhibit antiviral properties.

Development of functional products with protection effect against influenza virus was successful. On the basis of traditional medicine theory, the new prescription for anti-influenza virus from oriental herbs was NP-97-1. The major components of NP-97-1 were *Junoris Fructus*, *Chaenomeles Fructus* and *Zingiberis Rhizoma*.

The process of functional kampo drink and cake were developed. And, their quality was evaluated to be satisfactory. The results obtained from this research can also furnish basic information for the research and product development in this area. Development of new type kampo drink containing NP-97-1 is now in progress.

Contents

Chapter 1. Introduction	1
Section 1. Background of research development	2
Section 2. Necessary of research	3
Section 3. Objections and region of research	8
Section 4. References	9
Chapter 2. Research of biological activity for screening agent against anti-influenza virus	11
Section 1. Introduction	12
Section 2. Materials and methods	16
Section 3. Results and discussion	26
Section 4. References	73

Chapter 3. Isolation and identification of anti-influenza active compound	75
Section 1. Introduction	76
Section 2. Materials and Methods	82
Section 3. Contents of research and results	90
Section 4. Summary	103
Section 5. References	104
Chapter 4. Development of functional kampo products for influenza virus protection	139
Section 1. Introduction	140
Section 2. Development of new prescriptions from oriental herbs for influenza virus	141
Section 3. Studies on development of functional kampo drink	154
Section 4. Studies on development of functional cakes from oriental herbs	182
Chapter 5. Studies on process for functional kampo drink and expectation of industrial development	209

Section 1. Introduction	210
Section 2. Strategy and substance of studies	211
Section 3. Materials and Methods	213
Section 4. Contents of research and results	223
Section 5. References	251
Chapter 6. Scope of application and Recommendation	253
Section 1. Summary	254
Section 2. Scope of application	257
Section 3. Recommendation	258

■ Appendix

목 차

제 1 장 서론	1
제 1 절 연구 개발의 배경	2
제 2 절 연구의 필요성	3
제 3 절 연구의 목적 및 범위	8
제 4 절 참고문헌	9
제 2 장 항인플루엔자 바이러스 소재 탐색을 위한 생리활성 연구	11
제 1 절 서설	12
제 2 절 재료 및 방법	16
제 3 절 결과 및 고찰	26
제 4 절 참고문헌	73
제 3 장 항influenza 활성 성분 분리 및 구조 결정	75

제 1 절 서설	76
제 2 절 재료 및 방법	82
제 3 절 연구 내용 및 결과	90
제 4 절 요약	103
제 5 절 참고문헌	104
제 4 장 감기예방 및 치료보조 기능을 가지는 한방제품개발	139
제 1 절 서설	140
제 2 절 항인플루엔자 바이러스 활성을 가지는 한약재를 이용한 새로운 감기 예방 및 치료보조 기능을 가지는 처방의 개발	141
제 3 절 전통 한방처방의 감기억제 약리작용에 기초한 음료의 제품화 연구	154
제 4 절 감기예방 및 치료보조 기능을 가지는 보조식으로 떡제품 개발재료 및 방법	182
제 5 장 한방음료 공정 연구 및 산업적 전망 예측	209
제 1 절 서설	210

제 2 절 연구내용 및 전략	211
제 3 절 연구방법	213
제 4 절 결과 및 고찰	223
제 5 절 참고문헌	251
제 6 장 활용방안 및 기대성과	253
제 1 절 연구요약	254
제 2 절 활용방안	257
제 3 절 기대성과	258

■ 부록 - 【 연구성과물 】

제 1 장 서 론

제 1 절 연구 개발의 배경

우리 나라에 있어서 건강에 대한 관심은 시대의 상황에 따라 커다란 변화를 보여주고 있는데, 60년대처럼 식량난시대에는 균형있는 영양의 섭취에 역점을 두었지만 고령화 사회를 지향하는 오늘날은 노화, 성인병예방 등 자기 건강관리에 사회적 관심이 모아지고 있다. 고도경제 성장시대인 오늘날 우리의 신체는 전반적인 환경유해물질로부터 노출위험과 식생활양식이 인스턴트 경향으로 인체면역기능이 과거에 비해 상당히 약화되어 있고, 산업화에 따른 주거환경과 경제성장에 의한 서구문화의 수용으로 생활의 패턴이 다양하게 변화하고 있지만 50년 전이나 지금도 건강은 우리 모두의 관심 중 하나이다. 우리의 식생활과 관련하여 발생하는 질병의 비중이 높아지고 있어 식품의 생체능력 해석과 분자설계가 1984년부터 관심을 갖게 되었다.

작년, 중국과 홍콩에서는 변형된 감기 바이러스로 사회적, 국가적인 문제로 대두되어 국제적 관심이 고조되었고, 지리적으로 가깝게 위치한 우리도 상당한 관심을 표명하였는데, 감기는 발병되기 전 예방하는 것이 가장 중요하다. 감기는 고령자, 체질 허약자, 소아 등 신체의 저항력이 떨어진 상태나 정신적 육체적 활동으로 체력이 저하된 상태, 질병을 앓고 있는 사람에게는 합병증 혹은 질병의 악화 등을 유발하므로 만병의 요인이 된다.

우리의 건강은 생체의 항상성 유지이며, 항상성의 유지는 호르몬계, 신경계, 생체방어계 및 각종 대사계 등의 다양한 신체시스템이 적절히 작용하고 또한 서로 밀접하게 영향을 주고받아 연동하므로써 이루어지는데, 이러한 생체조절 인자(기능성인자)에 관한 계통적 해석연구는 일본 문부성에서 특정 혹은 중점연구로 처음 조직적으로 시작했으며, 이들 연구의 소재중 한약재가 많은 관심이 대상이 되고 있다.

우리가 일상생활에서 경험하는 질환 중 가장 흔한 감기는 1년 중 거의 2~3회

정도 경험할 정도로 쉽게 감염되는 질환이다. 전에는 환절기나 가을 겨울에 심하였는데 지금은 사시사철 감기 증상을 호소하는 것을 볼 수 있다. 이것은 과거보다 지구의 온난화 등 대기환경의 악화로 체내의 생체리듬이 떨어지면서 나타나는 현상으로 보아진다.

한의학에서는 음식과 의약은 같은 뿌리로 보았고, 의식동원(醫食同源)이라 하여 음식물을 통해서 질병을 예방하고 치료한다는 의미가 내포되어 있는데, 생체의 항상성 유지에 역점을 두고 있는 특징을 가지고 있다.

중국의 변형된 감기가 올해는 우리 나라에 상륙할 가능성이 높다는 예측으로 호흡기바이러스성 질환에 대한 외국의 특허약품이 다량 수입 될 것으로 추측되는데, 감기의 예방면에서 전통한방 약재를 소재로 한 호흡기바이러스성 질환에 대한 기능성음료 및 식품은 외국에서 아직 개발되어 있지 않은 상태이다. 한약재는 그 종류가 굉장히 많고 구성성분들이 prodrug로서 기능이 풍부하기 때문에 감기에 방과 치료의 소재 개발을 위한 연구가 다양하게 진행될 수 있다.

한약재를 소재로 한 기능성 제품은 근래 많이 나와 있으나 일부를 제외하고는 대부분이 한의학적 이론이나 과학적인 근거와 관계없이 상업적인 시판을 목적으로 과대 선전되어지고 있는 실정이므로 소비자들이 많은 혼란을 겪고 있기 때문에 전문가의 고증과 실제 효능에 대한 실험적 증명이 요구되고 있다.

제2절 연구의 필요성

산업화에 따른 주거환경의 오염과 노령인구의 증가와 경제성장에 의한 서구문화의 수용으로 생활양식의 서구화 경향으로 인체면역기능이 과거에 비해 상당히

약화되어 있는 현실에서 만병의 근원이 되는 사계절 질환인 호흡기 바이러스성 질환에 대해 관심이 고조되고 있다. 선진국에서는 최근 수년 전부터 자연계에 무궁무진하게 존재하는 동, 식물자원을 이용한 새로운 개념을 토대로 한 항바이러스 물질 및 기능성 식품 개발 전략을 추진하고 있는데, 다행히도 우리 나라는 생리활성이 뛰어난 우수한 한약재들을 많이 보유하고 있다.

우리의 선조들은 서구와는 다른 한의학이라는 독특한 영역을 구축하였으며, 한약재는 한약을 구성하는 천연소재로서 식품적인 측면도 가지고 있다. 한약재를 이용한 질병의 예방과 치료의 효과를 수 천년에 걸쳐 임상적으로 입증하였는데, 그 우수성이 의학, 약학, 영양학 등 각분야에서 증명되고 있다. 한의학에서 전래로 내려오는 처방 또는 비방에 의한 감기예방과 치료에 대한 한약재의 이용은 다양하며, 이러한 한의학적 특성을 과학적으로 연구하여 효능을 검증하고 이를 이용하여 고부가가치가 있는 한방제품을 전략적 브랜드로 개발한다면 한약재 재배농가의 소득 증대 및 산업적 파급효과로 국가 경제의 활성화에 이바지하리라 생각된다.

1. 한의학적 측면

우리가 일상생활에서 경험하는 질환 중 가장 흔한 것이 호흡기질환이며, 특히 감기는 1년 중 거의 2~3회 정도 경험할 정도로 쉽게 감염되는 질환이다. 전에는 환절기나 가을 겨울에 심하였는데 지금은 온난화 현상으로 계절의 변화가 명확하지 않아 사시사철 감기 증상을 호소하는 것을 볼 수 있다. 감기는 쉽게 발병되기도 하지만 또한 자연적으로 치유되는 경향이 높아 병으로조차 인식되지 않아 무심히 넘기는 경우가 많은데, 소아와 노인 등과 같이 저항력이 떨어진 상태나 정신적 육체적 활동으로 체력이 저하된 상태, 질병을 앓고 있는 사람에게는 합병증 혹은 질병의 악화 등을 유발하므로 만병의 요인으로 볼 수가 있다.

한의학에서 감기는 감모(感冒), 감한(感寒), 상풍(傷風), 모풍(冒風) 등으로 불리고 있고, 감기는 상기도 점막의 Virus성 감염으로 인한 증상으로 하나의 독립된 질환이기보다는 여러 가지 요소가 복합적으로 작용한 증후군으로 보고 있으며, 한방에서 “正氣内存 邪不可干”라는 감기의 예방 원칙이 있다. 즉, 우리의 실생활에 비유하여 간단히 설명하면 공기를 소독하는 것과 음차(飲茶)하는 것인데, 일반적으로 허약한 사람은 전자를 위주로 하고 건강한 사람은 후자를 위주로 하지만 양방법을 융통성 있게 이용하여 신체를 면역력을 증진시켜서 감기의 발병을 예방하고있다.

한방에서는 전래로 내려오는 처방 또는 비방들에 의해 수많은 바이러스성 질병을 치료 또는 예방을 하고 있으며, 특히 우리의 전통궁중식품 중 「구선왕도고」 등은 동의보감의 잡병편에 나오는 처방으로 옛부터 왕실의 감기예방 및 원기회복을 위해 먹던 떡제품이며 와병환자들에게는 미음으로 내려서 먹었던 기능식이다.

또한, 민간방으로 지금도 이용하고 있는 유자, 생강 등을 원료로 한 전통차들도 한의학의 음차라는 감기 예방법이다.

한방처방을 이용하여 감기예방 및 억제를 목적으로 하는 드링크 제제로는 쌍화탕제제류나 갈근탕제제류 및 이를 약간 변형한 드링크제제가 유일하게 국내에서 시판되고 있을 뿐 상기 목적으로 개발된 기능성 음료는 전무한 실정이다. 또한 이웃한 일본에서 몇몇 한방 감기약 드링크제제가 개발되어 시판되고 있으나 상한론 중심의 처방을 응용한 수준을 넘지 못하는 상태이다.

감기는 “만병의 근본”이라고 보고 있으며, 치료에 있어서는 개인의 신체적, 면역기능에 따라 적절히 처방하는데, 한약의 원료 약재인 한약재는 자연상태에서 생산되는 천연물이어서 부작용이 적고 아직도 밝혀지지 않은 생리활성 물질의 보고라고 할 수 있다. 한방 감기 처방에서 한약재들 상호간의 역할에 대한 과학적 실험 검증연구는 아직 미미한 상태이므로, 감기 예방 및 치료보조를 위한 기능성 식품의 창출을 위해 한방의 중요원리인10) 섭생(攝生)과 보기(補氣), 보양(補養)인 인체 면역증강작용을 이용하면 한방 기능성 제품으로 개발할 수 있는 성공 가능성이 높다.

2. 기술 · 사회적 측면

수천, 수백년 전부터 인류는 건강과 장수에 대해 많은 관심을 보여 왔으며, 특히 만병의 근원인 감기는 일생에 걸쳐 수없이 감염되어서 이를 예방하고 치료하는 지혜가 다양한 각도에서 탄생되었다지만, 아직도 해결하는 데는 여러 가지 숙제를 가지고 있다. 보통 성인의 경우 1년에 한, 두 차례 또는 두, 세 차례 감기 바이러스의 공격을 받는데, 감기에 감염될 경우 야기되는 노약자나 면역력이 상대적으로 떨어지는 소아, 질병을 앓고 있는 사람에게 질환을 악화시켰고 합병증에 의해 많은 사망자가 발생하는 피해를 주었다. 이와 같은 사실은 1918-1919년에 있었던 유행으로 세계적으로 2천만명 이상이 희생된 “스페인 인플루엔자”의 피해에서 너무나 잘 인식되어 왔던 것이다. 인플루엔자 유행의 크기는 범세계적 유행, 일시적 유행, 국지적 유행, 산발적 발생 등으로 구분할 수 있으며 과거 90년간 범세계적 대유행은 5회에 이르고 이때마다 바이러스의 항원변이가 크게 일어났었다. 통상 바이러스의 소변이(Antigenic Drift)시 집단인구의 10-20%, 대변이(Antigenic Shift)시 40-50% 이상 감염을 일으키기도 한다.

감기 혹은 독감환자의 호흡기에서 발견되는 호흡기성 바이러스는 influenza virus, respiratory syncytial virus (RSV), rhinovirus 등이며 이 바이러스들은 사람의 비강, 구강에서 흔히 발견되며 드물게 분변에서도 발견되는 바이러스로 일반적인 감기 또는 독감, 소아성 호흡기 질환의 원인이 된다.

미국, 일본 등 선진국에서는 오래 전부터 감기에 대한 연구에 많은 투자를 해 화학요법제 및 항생물질들을 개발하였으나 약리작용으로 일어나는 독성과 항원성 획득으로 유발되는 과민반응 등 여러 가지 부작용과 바이러스 자체가 가지는 다양한 내성 기작으로 사용에 제한을 받고 있고 많은 경우 효능이 만족할만 한 수준이 아닌 결점을 가지고 있다. 천연물로부터 항바이러스 활성물질을 탐색 개발하는 연구는 선진국도 비교적 근래에 시작되었다.

한약재는 양약에 비해 상대적으로 부작용이 적어서 항바이러스 물질의 개발에 좋은 소재가 되고 있으며, 미국의 국립암센터(NIH)에서 항바이러스성 스크린으로

조사한 물질 중 한약재가 약 47%를 차지하고 있으며, 선진 각국은 WTO출범으로 생물 다양성의 우위를 확보하여 지적 재산을 확보하려는 움직임으로 한약재로부터 다양한 생물활성이 탐색되고 있다.

우리의 인체 면역기능이 과거에 비해 상당히 약화되어 있는 현실에서 만병의 근원이 되는 호흡기 바이러스성 질환에 대한 기능성 음료의 개발은 작년 중국에서 변이성 호흡기 바이러스에 의해 발생한 감기의 영향으로 기대되는 시장성과 파급효과가 상당히 크다고 전망되어 지고 있다. 중국과 지리적으로 가까운 우리도 방심할 수 없는 상황이라서 호흡기바이러스성 질환에 대한 외국의 특허약품이 다량 수입 될 것으로 추측되는데, 한약재를 소재로 한 호흡기바이러스성 질환에 대한 기능성 음료 및 식품은 외국에서 아직 개발되어 있지 않은 상태라서 경쟁력이 충분히 있는 것으로 사료된다. 또한, 건강음료 시장도 우유, 탄산음료에서 과즙음료로 넘어 왔고 이제는 한방음료 개발로 추세가 변화되고 있어 국내외의 한방을 이용한 약제 개발 및 기능성음료, 식품개발 연구 환경은 상당히 좋아지고 있다고 사료된다.

한약재의 재배는 농촌진흥청 자료와 한국수출입협회의 통계에 의하면 계속 신장되고 있었는데 지난해 IMF의 영향으로 감소하는 추세를 보였고, 수입은 1990년 이후 계속 증가하는 경향이나 수출은 오히려 감소하고 있다. 한약재 재배 농가의 사기를 진작시키고 소득을 증대하기 위해서는 가공되어 있지 않은 약초에서 가공된 제품을 창출할 수 있는 브랜드화된 제품 개발의 필요성이 요구되고 있다.

한의학은 질병의 예방에 있어서 음식의 섭생을 중요시하고 치료도 지역과 문화 관습에 따라 여러 가지 형태로 발전되어 왔다. 우리의 한방 처방은 동의보감에서 집대성되어 발전되어 중국과 일본과는 다른 사상방이라는 새로운 이론을 정립하였다. 즉, 개개인의 면역 저항력에 따른 체질론으로 제2차 질환을 억제시켰다. 이처럼 우리의 한의학은 기능성 식품과 일맥상통한 관계에 있는데, 이러한 한의학의 특성을 이용하면 호흡기 바이러스성 질환을 억제하는 신기능성 식품제제가 개발될 수 있고 부가적으로 약초 재배농가의 수익증대와 관련산업의 육성효과를 가져다 줄 것이며 또한 우리 나라의 전통궁중식품으로써 대표적인 관광상품의 개발도 가능할 것이다.

제 3 절 연구의 목적 및 범위

1. 연구목표

- 감기 한방 처방에 원료 한약재로부터 항호흡기 바이러스 물질을 탐색하여 새로운 처방을 창출한다.
- 감기예방 효능을 가진 새로운 한방처방의 보완실험을 통해 용도특허를 출원하고, 이를 이용하여 감기예방 및 치료보조의 기능을 가진 기능성 음료 및 떡제품을 개발하여 고부가가치가 있는 기능성상품을 창출한다.
- 신처방의 경험을 응용하여 더욱 강한 항 인플루엔자바이러스 활성을 갖는 기능성 식품개발의 기반연구를 조성한다.

2. 연구개발의 범위

- 전통 한방감기처방과 사상방을 이용하여 신처방을 개발하고, 이를 이용하여 현재 시중에서 시판되고있는 쌍화탕류 및 갈근탕류의 효과를 훨씬 능가하는 감기예방 및 치료목적을 갖는 기능성음료를 드링크제로 개발한다.
- NP-97-1을 이용하여 특히 노약자 및 어린이의 감기예방을 목적으로하는 떡제품을 개발하고 상품화한다.

제 4 절 참고문헌

張仲景 : 景岳全書, 서울, 医道韓國社, p. 65, 383, 1976

劉完素 : 劉河間傷寒三六書, 서울, 교육주보사, pp. 83, 84, 369, 370, 1976

李杲 : 東垣十種医書, 서울, 대성문화사, pp. 164-168, 1983

孫思邈 : 備急千金要方(中国医学大系), 서울, 여강출판사, pp. 735, 651-661, 1987

尹吉榮:東醫方劑學,미네르사,1964

李尙仁,康舜洙:方劑學,癸丑文化社,1977

朱榮丞외:方劑學,永林社,1998

許浚:東醫寶鑑.兩山堂.1989

鄭普燮.辛民教:鄉藥(生藥)大事典.永林社.1990

정재득, 고병섭, 이형환, 최환수, 박갑주. 한약처방(복합제)의 influenza virus type I 에 대한 항바이러스 활성 효과. 대한바이러스학회지 제26권 제2호 273-283, (1996)

Tyeryar, F.J. Jr., Richardson, L.S. and Belshe, R.B. Report of a workshop on respiratory syncytial virus and para influenza viruses. *J. Infect Dis.* 137 : 835 (1978).

김명희. 수리취 첨가물을 달리한 수리취 절편의 특성, 한국조리과학회지, 10(2), 94(1994)

川岸舜朗. 食品中の生體機能調節物質研究法, 學生出版社, 東京(1996)

芒井綜一. 機能性食品の研究, 學生出版社, 東京(1995)

제 2 장 항호흡기 바이러스 소재 탐색을 위한
 생리활성연구

제 1 절 서설

1. 연구의 필요성

바이러스로 인한 호흡기질환은 감염경로상 가장 이환율이 높은 질병이며 미국의 통계 및 우리 나라 발생 추정치는 모든 감염질환 발생의 절반정도를 차지하는 것으로 파악되고 있다. 사람의 호흡기질환에는 많은 종류의 바이러스가 직접 또는 간접적으로 관련되어 있으며 바이러스로 인한 호흡기 질환의 대표적인 인플루엔자 바이러스는 A, B, C형이 있고 잦은 변이의 발생으로 인하여 많은 아형이 존재한다. 인플루엔자는 우리 나라를 비롯한 세계 여러 지역에서 호흡기 질환의 주요 원인 바이러스의 하나로 감염되면 건강한 성인에서는 경미한 상기도 감염증 정도로 그치지만 만성 질환자, 유아, 노약자 등의 고위험 군에서는 생명을 위협할 정도의 심한 급성 호흡기 질환을 유발시키기도 한다(Kelbourne, 1987). 미국의 경우 인플루엔자 유행시기에는 약 30,000명이 더 사망하는 것으로 추정하고 있다(Lui *et al.*, 1985). 인플루엔자는 대단히 전염성이 강한 질병으로 유행이 시작되면 2~3주 내에 환자 발생 지역 주민의 10% 이상이 감염되고 환자의 50~70%가 어린이들이며 특히 인플루엔자 A형의 주로 겨울과 봄 사이에 발병하며 2~3년 주기로 유행하고 전염성이 매우 높아 환자와 접촉된 사람은 쉽게 감염된다(대한바이러스학회, 1992).

한의학에서는 감기를 증상에 따라 상풍(傷風), 시감(時感)등으로 구분하고 있는데, 감기는 대부분 외부의 영향에 의한 질병으로 일단 감기에 걸리면 호흡기에 직접 손상을 주며 간접적으로 건강, 발육에 일정한 영향을 주며, 더 나아가 장기의 질병을 초래하게 되어 「백병의 근원」이 된다고 보았고, 인체 면역기능의 약화와 밀접한 관계를 가지고 있다고 보고 있다. 한방에서의 감기의 처방은 섭생(攝

生)과 보기(補氣), 보양(補養)에 역점을 둔 삼소음가미방(蔘蘇飲加味方), 쌍화탕가미방(雙和湯加味方), 사물탕가미방(四物湯加味方), 사군자탕가미방(四君子湯加味方), 이음전가미방(理陰煎加味方) 등을 사용하는데, 이러한 대부분 처방들은 우리 생체의 면역 항상성에 관여하는 치료제로서 수천 수백년에 걸쳐 경험적으로 효과가 있다 것을 입증하고 있다. 민간방으로는 발한법(發汗法)과 음차법(飲茶法)을 중심으로 다양한 한약재들이 응용되고 있다.

감기 한방 처방이나 민간방에서 한약재들의 역할에 대한 기전이 과학적으로 완전히 실험 검증되지 않고 있어 각각의 한약재들의 역할에 대한 과학적 규명한 후 이를 기능성 한방제품으로 개발한다면 관련기술의 파급효과는 막대하리라 예상된다. 우리의 선조들이 경험으로 쌓아온 노하우인 한방 비·처방과 민간방들을 응용한다면 감기 예방 및 치료보조뿐만 아니라 생체의 항상성 유지나 생리기능의 조절 작용의 개선에 효과가 있는 기능성 한방건강음료 또는 신한방약으로 개발될 가능성이 높다.

2. 호흡기 바이러스의 연구 동향

인플루엔자 바이러스의 분리는 1920년대의 후반에 Richard E. Shope에 의해 돼지 인플루엔자 바이러스가 여과성이라는 것을 확인하여 병원체가 바이러스라는 것을 암시하였으며, 1933년에 Wilson Smith와 Christopher Andrew 등에 의해 사람의 비강분비물에서 분리되었고 B형은 1940년, C형 바이러스는 1951년에 분리되었다 (Frank *et al*, 1979; Smith *et al*, 1974; Palese *et al*, 1982).

인플루엔자 바이러스의 잠복기는 1~2일이며 질환의 시작은 38~40℃의 갑작스런 고열, 두통, 근육통, 비염, 기관지염, 기침 등의 증세로 시작된다. 인플루엔자에 감염된 환자는 대체로 1주일 전후에 회복하게 되나 합병증이 발생하는 경우 인플루엔자로 인한 폐렴이 진행되고 세균감염으로 발전된다. 특히 심장혈관과 폐에 질환을 가진 어린이 연령층에 심하며 이 경우 기침의 시작과 화농성 가래, 고열,

흉통, 짧은 호흡으로 알 수 있게 되며 세균에 의한 중감염은 *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus*와 *Haemophilus influenzae*가 일반적인 경우들이다. 이런 경우 적당한 항생제 투여가 빨리 시도되어야 하며 사망은 인플루엔자 폐렴에서 일반적으로 일어나고 특히 고위험군에서 일반적이다(Gwaltney et al, 1964).

인플루엔자 감염 후의 능동면역은 대체로 6~12개월 이내에 항체의 여가가 급격히 감소한다고 알려져 있으며 인플루엔자에 대한 면역은 항체와 숙주의 저항성 및 바이러스의 생물학적 및 항원상의 변이 등이 복합되어 표현된다고 한다. 환자의 관리방법으로 일반적인 환자 격리나 건강자 격리는 질병의 잠복기가 극히 짧고 불현성 감염환자가 많으며 바이러스의 동시 다지역 오염 등의 이유로 거의 효과가 없다. 인플루엔자에 특이적인 저항력을 높이기 위한 시도로서 현재 개발되어 있는 인플루엔자 백신은 활성형 및 불활형의 두가지가 있다. 백신의 제조와 역가는 매년 세계보건기구에 의해 검정을 받고 있으며 각국에 특이한 strain을 포함한 백신을 사용하도록 하고 있다. 그러나 활성형 및 불활성 백신이 현재까지 결정적인 예방효과를 거둘 수 있다고 말하기는 어려우며 일부 대상군에서는 부작용의 우려가 크다는 문제도 있다(최삼열, 1991).

인플루엔자의 예방과 치료약으로 Amantadine(1-adamantanamine hydrochloride, Symmetrel), Rimantactine 등은 인플루엔자 A 바이러스에만 효과적이며 치료기작은 세포에 인플루엔자바이러스의 부착을 방지하는 방법으로 작용하기 때문에 사람이 감염되기 전이나 직후에 투약을 시작해야하고 복용량은 한 번에 100mg을 매일 2회 복용하면 된다. 또한 인터페론 등 약물에 의한 치료가 시도되고 있으나 역시 백신과 마찬가지로 충분히 효능을 인정하기 어렵다. 인플루엔자 바이러스로부터 사람을 보호하기 위하여 투약해야할 적절한 시기를 잘 선택해야 하며 이것은 인플루엔자를 치료하고 질병을 가볍게 하는데 사용되고 있다(Douglas, 1990). 인플루엔자를 예방하고 치료하기 위해 인류는 오래 동안 노력해왔는데 부작용이 최소화되고 사용상 안전성이 보장되는 새로운 항인플루엔자 바이러스제의 탐색 및 개발에 박차를 가하고 있으나 화학 합성제나 항생제가 가지고 있는 한계성으로 큰 효과를 보지 못하고 있는 실정(WHO, 1979)으로 효능이 우수한 제품 개발이 절실히 요구되고 있다.

3. 항호흡기 바이러스 물질의 탐색 전략

항바이러스 화학요법제의 개발에 어려움을 주는 문제점들은 첫째, 숙주세포에 는 영향을 주지 않으며 바이러스 증식만을 저해하여 부작용을 줄일 수 있는 선택 성이 낮고, 둘째, 광범위한 약효를 나타내는 약물 발견이 어렵고, 셋째, 치료 중 약물 내성 바이러스의 출현으로 인한 약효 감소, 넷째, 바이러스 감염세포만으로 약물전달 및 세포내 활성화 방법, 다섯째, 약효를 나타내는 물질이 장기간 체내에 남을 수 있는 약물의 대사 등이 있다(Walker *et al*, 1988; Prusoff *et al*, 1986; Lee, 1992; De, 1990; Hu *et al*, 1989)

선진국에서는 최근 수년 전부터 동물, 식물자원과 생약재를 이용한 천연화합물 의 개발을 추진하고 있는바 한의학은 고대로부터 한방 및 민간요법을 통해 많은 지식을 축적하고 있어 보다 경쟁력이 있다고 할 수 있다. 가장 최근에 천연물을 이용한 항바이러스제제 검색 개발 연구로는 처방을 중심으로 항바이러스 활성을 일본에서 활발히 연구 중에 있는데, 한약재로 구성된 한방처방이 동물실험에서 효 능이 검색된 보고가 있다(Takayuki *et al*, 1994; Nagai *et al*, 1996; Haruki *et al*, 1998). 화학합성제와 한약재에서 분리한 물질을 병용하여 상승효과를 연구한 예로는 항인플루엔자 약제로 사용하고 있는 rimantadine과 *Geranium sanguineum* L.에서 분리한 polyphenolic 복합체에 대한 활성 보고(Gegova *et al*, 1993)가 있 다. 한약재에 대한 항바이러스 활성 연구는 *Sanicula europaea* L.에서 추출하여 *in vitro*에서 활성을 측정한 보고(Kadir *et al*, 1996)가 있고, *Pinus parviflora* S.에서 분리한 polysaccharide와 고분자 분획에 대한 보고(Kyosuke *et al*, 1990) 와 lignin 분획에 대한 활성 보고(Hiroshi *et al*, 1991; Hiroshi *et al*, 1992)가 있다. Takayuki 등(1992)은 *Scutellaria baicalensis*에서 분리한 isoscutellarein 에 대한 항 influenza 활성을 보고하였다.

한약재를 이용한 항인플루엔자 활성에 대한 연구는 최근 활발히 이루어지고 있 기는 하지만 아직까지 초기단계에 있는 실정이라고 할 수 있다. 또한 국내에서도 연구가 많이 이루어지고 있지 않아 향후 무한한 가능성이 있다라고 할 수 있다.

한의학의 특징은 생체의 항상성 유지이다. 항상성의 유지는 호르몬계, 신경계, 생체방어계 및 각종 대사계 등의 다양한 신체 시스템이 적절히 작용하고 또한 서로 밀접하게 영향을 주고받아 연동하므로써 이루어지는데, 한방 처방의 원료 약재인 한약재가 항상성을 유지하기 위한 다양한 생리활성을 가지고 있다는 사실이 알려져 많은 관심의 대상이 되고 있다.

본 연구에서는 한의학의 특성을 이용하면 인체 면역기능을 보강하는 효과를 가지고 있는 새로운 기능성 물질이 탐색될 수 있다는 점에 착안하여, 한의학적으로 감기 치료에 사용되고 있는 비·처방과 민간방의 구성 한약재로부터 항호흡기 바이러스 물질의 탐색을 위한 기반연구로서 항인플루엔자 활성을 조사하고, 한의방제론에 입각한 조합에 의해 신처방을 창출하여 감기예방과 치료보조의 기능성 한방제품을 개발하는 방안을 제시하고자 한다.

제 2 절 재 료 및 방 법

1. 재 료 및 시 약

가. 시 약

한약재에서 항바이러스 활성물질을 탐색하기 위한 대조구로 Sigma-Ardrich Co.에서 시판하고 있는 항생물질인 amantadine·HCl과 Mw. 5000인 Dextran sulfate를 사용하였다. 그리고, 한국, 중국, 일본에서 시판하고 있는 한방 감기 엑기스제

를 비교대조구로 사용하였다(Table 1).

Table 1. 각국에서 시판하고 있는 한방 감기 엑기스제

국명	번호	엑기스제명	활성시험 No.	제조회사
한 국	1	쌍화탕	k-1	동화약품
	2	갈근탕	k-2	삼영제약
	3	쌍감탕	k-3	조선무약
	4	인삼사물탕	k-4	해동제약
일 본	1	葛根湯カネボウ	J-1	カネボウ
	2	カコナル	J-2	Yamanouchi
중 국	1	抗病毒錠劑	C-1	四川城中藥
	2	板監根錠劑	C-2	北京長城製藥
	3	感冒清熱錠劑	C-3	北京同人大堂製藥

나. 한약재

생리활성 실험에 사용한 한약재는 경동시장에 위치한 이화당 한약국과 생약협회 국산한약재전시판매장에서 구입한 후 한국한의학연구원에서 감별하여 엄격히 선정하였고, 각각의 한약재들에 일련 번호를 붙이고 100g씩 보관하고 있다(Table 2).

다. 한약재로부터 시료의 조제

한약재에서 시료의 추출은 전탕에 의한 열수와 80% 메탄올을 사용하여 추출한 후, 감압농축하고 동결건조하여 분말로 조제하여 냉동고에 보관하면서 실험에 사용하였다.

Table 2. 한약재 목록

활성시험No.	한약재명	활성시험No.	한약재명
1	구인 蚯蚓	31	총두 葱頭
2	구등 鉤藤	32	맥문동 麥門冬
3	울금 鬱金	33	건강 乾薑
4	대청엽 大靑葉	34	방기 防己
7	마치현 馬齒莧	36	세신 細辛
8	지정초 地丁草	37	곽향 藿香
9	천련자 川楝子	38	승마 升摩
11	갱미 粳米	39	오가피 五加皮
12	백지 白芷	40	모과 木瓜
13	용골 龍骨	41	청송절
14	갈근 葛根	43	노근 盧根
15	반변련 半邊蓮	45	고맥미
17	자초 紫草	46	계지 桂枝
18	용담 龍膽	48	독활 獨活
19	삼백초 三白草	49	형개 荊芥
20	인삼 人蔘	51	지골피 地骨皮
21	자소엽 紫蘇葉	52	숙지황 熟地黃
22	전호 前胡	53	의이인 薏苡仁
23	반하 半夏	54	건을 乾栗
24	지각 枳殼	55	나복자 羅蔔子
26	대조 大棗	56	석창포 石菖蒲
27	소목 蘇木	57	마황 麻黃
28	박하 薄荷	58	행인 杏仁
29	시호 柴胡	59	상백피 桑白皮
30	길경 桔梗	60	관동화 款冬花

활성시험No.	한약재명	활성시험No.	한약재명
61	백자 伯子	88	덜익은유자 柚子
62	상엽 桑葉	89	익은유자 柚子
63	우방자 牛蒡子	90	감초 甘草
65	두시 豆豉	91	황금 黃芩
66	인진 茵陳	92	생지황 生地黃
67	천패모 川貝母	93	금은화 金銀花
68	사간 射干	94	진피 陳皮
69	초호마인 抄胡麻仁	95	방풍 防風
70	아교 阿膠	96	연교 連翹
71	비파엽 枇杷葉	97	강활 羌活
72	빈랑 檳榔	98	지모 知母
73	초과 草果	99	선복화 旋覆花
74	지실 枳實	100	생강 生薑
75	대복피 大腹皮	101	목통 木通
76	백복령 白茯苓	102	백출 白朮
78	교홍 交紅	103	인동등 忍冬藤
79	육계 肉桂	104	작약 芍藥
80	진교 秦膠	105	천궁 川芎
81	만형자 蔓荊子	106	천련 川連
82	건갈 乾葛	107	생부자 生附子
83	마저 麻子	108	향부자 香附子
84	백편두 白扁豆	109	택사 澤瀉
85	향유 香薷	110	후박 厚朴
86	축사 縮砂	111	오미자 五味子
87	백두구 白荳蔻	112	차전자 車前子
		113	죽엽 竹葉

1) 열수추출(MW) 시료

한약재 30g에 증류수 1,300ml 을 넣어 2시간 30분 동안 끓인 후 가제를 이용하여 1차 여과하고 8,000xg에서 15분간 원심분리한 후 2차 여과하여 evaporator로 농축하고 동결건조하여 검액으로 사용하였다.

2) 메탄올추출(MM) 시료

한약재 50g에 각각 500ml의 80% MeOH를 넣은 후 60℃ 수조에서 18시간 침적하여 추출하였고, No.2 여과지에 celite를 깔고 여과하여 evaporator로 농축하고 동결건조하여 검액으로 사용하였다.

3) 항 influenza virus 활성 측정용 시료의 조제

동결건조하여 가루상태가 된 한약추출원액 및 단미제에서 분리한 분획과 단일 물질에 대한 시료는 10% DMSO 용액에 완전히 녹인 후 mambrane filter(pore size 0.45 μ m)로 여과하여 항바이러스 활성 측정용으로 사용하였다.

3. 인플루엔자 바이러스의 계대 배양 조건 확립

가. 감수성 세포와 배지

항바이러스 활성을 in vitro에서 검색하기 위해 influenza virus에 대한 감수성 숙주세포인 Madin-Darby Canine Kidney(MDCK) 세포주를 한국세포주은행에서 분양 받아 계대배양하여 사용하였다. MDCK 세포는 influenza virus에 의해 감염되

어 세포병변을 일으키는 특징을 가지는 세포주로 배양용 배지는 Dulbecco's modified eagle medium(DMEM)에 2% fetal bovine serum(FBS, Gibco, Grand Island, NY)을 첨가하여 사용하였고, 배양조건은 37°C, 5% CO₂로 유지된 보습배양기에서 배양하였다.

나. 계대배양

세포의 생존은 trypan blue dye exclusion 방법으로 확인하였고 3~4일에 한번씩 계대하여 $2.0 \sim 3.0 \times 10^5$ 개의 세포분포도로 유지하며 사용하였다.

다. 바이러스 증식 및 보관

본 연구에서는 influenza virus[A/Taiwan/1/86/(H1N1)]형을 국립보건원 호흡기 바이러스과로부터 분양 받아 사용하였다. 바이러스를 증식시키기 위하여 SPF 수정란(specific pathogen free embryonated hen's egg)을 37°C 부란기에서 10일간 부화시킨 후 오염된 수정란과 무정란을 제외한 수정란을 사용하였다. 수정란의 장노액(allantoic fluid)에 바이러스를 0.2ml씩 접종시킨 후 파라핀 왁스로 접종입구를 막고, 37°C에서 2일간 증식시키고 4°C에서 18시간 동안 방치시킨 다음 수정란 한 개 당 10ml의 장노액을 추출하였다. 바이러스가 증식된 장노액을 4°C, 8000g에서 10분간 3회에 걸쳐 원심분리한 후 상층액을 manbrane filter(0.45 μ m)로 여과하여 사용하였다. 바이러스 농축액은 장노액 상태로 분주하여 -70°C deep freezer에 보관하였다가 필요시마다 꺼내어 37°C 항온수조에서 녹인 다음 실험에 사용하였다.

MDCK 세포에서 바이러스를 증식하기 위해 사용한 바이러스 배양용 배지는 Dulbecco's modified eagle medium(DMEM, Gibco, USA)에 2% fetal bovine serum(FBS, Gibco, Grand Island, NY), 비타민, trypsin을 첨가하여 사용하였고, 37°C, 5% CO₂ 보습배양기에서 배양하였다.

4. 적혈구 응집 시험(haemagglutination inhibition test, HIT)

가. 닭 적혈구 세포

닭의 익하 정맥에서 혈액을 채취하여 혈액응고를 방지하기 위해 Alsever 용액을 모은 후 1800g에서 5분간 원심분리하여 적혈구만을 모은 후 phosphate buffered saline(PBS, pH 7.4)로 현탁시키고 4℃에서 5일간 보관하면서 적혈구 응집 시험(haemagglutination inhibition test, HIT)에 이용하였다.

나. 바이러스 역가 측정

장노액에서 증식된 바이러스의 역가를 haemagglutination assay를 실시하였다. 장노액에서 분리된 바이러스 배양액을 PBS로 2배 계단 희석하여 96well plate에 0.025ml씩 분주하고, PBS를 이용하여 0.5%로 희석된 RBC용액을 0.05ml씩 각 well에 넣고 흔든 후 25℃에서 반응시키고 음성 대조군과 비교하여 응집 역가를 측정하였다.

다. HIT에 의한 항바이러스 활성 검색

메탄올과 열수 추출한 한약재 시료에 대한 항인플루엔자 바이러스 활성을 측정하기 위해 HIT 시험을 시행하였다. 원액 시료(100mg/ml)를 희석한 후 이것을 원액으로하여 이후 각각 2배 계단 희석하여 각 well에 0.025ml씩 분주하였다. 적혈구 응집 역가 시험에서 측정된 바이러스 용액을 4HA units/0.025ml로 희석시켜 각 well에 0.025ml씩 넣어 잘 섞어준 후 상온에서 30분 동안 반응시킨 후, 0.5%로 희석된 RBC용액을 각 well에 0.05ml 씩 분주하고 가볍게 흔들어준 후 양성 대조군과 음성 대조군을 비교하여 추출된 한약재 시료가 바이러스와 RBC의 흡착정도에 의해 활성효과를 검색하였다.

라. 적혈구에 대한 세포독성 시험

증류수와 메탄올 추출한 한약재 시료 100mg/ml를 10배 희석한 후, 다시 2배 계단 희석하여 각 well에 0.025ml씩 분주한 후, PBS(pH 7.4)를 0.025ml씩 넣어 잘 섞어준 후 0.5%로 희석된 RBC 용액을 각 well에 0.025ml씩 분주하고 60분 동안 25℃에서 반응시켰다. 양성 대조군과 음성 대조군을 비교하여 추출된 한약재 시료가 RBC에 미치는 세포독성을 조사하였다.

5. MTT 방법을 이용한 바이러스 역가(TCID₅₀) 측정

가. 세포 접종, 바이러스 투여 및 배양

2×10^3 개로 결정된 적정세포수의 MDCK 세포가 포함된 100 μ l의 배지를 96well plate의 각 well에 첨가하고 마지막 한 컬럼에는 세포 부유액 대신 배지만을 가해 흡광도 측정시 blank로 사용하였다. 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 1일간 배양한 다음 상층액은 제거하였고 바이러스 농축액을 infection media로 계단희석하여 100 μ l씩 분주하고 마지막 컬럼에는 바이러스액 대신 배지만을 넣어주었고 배양기에서 바이러스가 세포에 흡착할 수 있도록 한시간 동안 방치한 후 상층액을 제거하였다. 여기에 2% infection media를 100 μ l 가한 후 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 3일간 배양하였다.

나. MTT 염색 및 흡광도 측정

바이러스에 의한 세포병변 정도를 현미경으로 육안으로 관찰하여 확인한 다음 2mg/ml MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide,

Sigma) 50 μ l를 가한 후 37 $^{\circ}$ C 배양기에 4시간 동안 방치하여 MTT가 환원되도록 하였다. 배양 종료시 상층액을 제거한 후 DMSO(Sigma) 용액을 150 μ l씩 각 well에 가하여 formazan 결정을 잘 녹여내어 균일하게 만든 다음 ELISA 판독기(Molecular Device, E max)로 540nm 파장에서 흡광도값을 측정하였다.

다. 결과 분석

바이러스 역가는 감염된 세포군과 비감염 대조 세포군의 흡광도를 기준으로 역가 정도를 측정하였는데 감염군에서 각 well로부터 한 컬럼의 평균 OD 540값을 구하여 대조군의 평균 OD 540값에 대한 백분율을 산출한다. 이 백분율은 대조군과 비교한 감염군의 세포생존율에 해당하는 값으로 TCID₅₀을 바이러스역가의 지표로 사용하였으며 TCID₅₀값은 Reed-Muench 공식을 이용하여 계산하였다.

$$TCID_{50} = \text{Dilution where } \frac{(\% \text{positive above } 50\%) - 50\%}{(\% \text{positive above } 50\%) - (\% \text{positive below } 50\%)} \times \log_{10} 10$$

CPE > 50%

7. 신규 항바이러스제의 탐색법 확립

: *in situ* cellular ELISA 방법을 이용한 항바이러스 활성 측정

가. 세포배양, 바이러스 및 검체 접종

96well plate를 0.5% gelatin으로 도포한 다음 하룻밤 냉장고에서 방치하고 DMEM으로 세척하였다. 여기에 MDCK 세포를 2 \times 10⁴cells/well 농도로 접종하고 마지

막 칼럼에는 세포 부유액 대신 배지만을 가해 흡광도 측정시 blank로 사용하였다. 세포가 접종된 plate는 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 동안 배양한 다음 각 well에 접종된 세포의 성장 정도와 분포도를 현미경으로 관찰하였다. DMEM 배지를 이용하여 부착되지 않은 세포를 세척하여 제거한 다음 인플루엔자 바이러스액을 50 TCID₅₀농도로 감염용 배지에 희석하여 한 well당 100 μ l씩 접종하고 blank와 세포가 접종된 마지막 칼럼에는 감염용 배지만을 가한 후 한시간 동안 바이러스가 세포에 흡착되도록 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 방치하였다. 상층액을 제거한 다음 2% FBS가 포함된 감염용 배지 90 μ l씩 분주하고 시료는 농도별로 희석하여 10 μ l씩 첨가하여 37℃, 5% CO₂ 보습배양기에서 48시간동안 배양하였다.

나. 세포 및 바이러스 고정

배양된 96well plate는 현미경을 이용하여 시료에 의한 세포독성을 관찰한 다음 세포독성이 없는 시료에 대해서만 ELISA 실험을 하였는데 이는 정확한 바이러스 생존율을 측정하기 위해서였다. 배양된 96well plate는 PBS(Phosphate buffered saline, Gibco)로 1회 세척하고 세포와 바이러스를 고정하기 위해 에탄올과 아세톤을 동량으로 혼합한 고정액을 -20℃에 보관하여 준비하였다가 각 well에 100 μ l 가하여 15분간 -20℃에서 방치하여 고정시켰다. 세포가 떨어지지 않도록 고정액을 제거한 다음 PBS로 1회 세척하여 남아있는 고정액을 완전히 제거하였다.

다. *in situ* ELISA에 의한 항바이러스 활성 측정

1% dry milk(Difco) 용액 100 μ l를 분주하여 30분간 37℃ 배양기에서 배양한 다음 여기에 goat anti-influenza A virus polyclonal 항체를 100 μ l씩 첨가하여 한시간 동안 37℃ 배양기에서 다시 배양하였다. 자동 96well plate 세척기를 이용하여 세척액으로 4회 반복하여 세척하고 상층액을 완전히 제거한 후 goat anti-goat peroxidase가 접합된 항체를 100 μ l씩 분주한 다음 30분간 37℃ 배양기에서 배양한 후 위와 같은 방법으로 4회 세척하였다. 상층액을 충분히 제거하고 기질액인 TMB

를 100 μ l씩 분주한 다음 실온의 어두운 장소에서 30분간 반응시키고 1 N sulfuric acid로 반응을 정지시켰다. ELISA 판독기(Molecular Device, E max)를 이용하여 450nm에서 흡광도를 측정하였는데 흡광도의 값은 생존하는 바이러스의 양으로 항 바이러스 활성 효과를 측정할 수 있다. 시료를 처리하지 않은 바이러스 생존군에서 세포 접종군의 흡광도 값을 제한 값으로 시료를 처리한 바이러스 생존군에서 순수세포접종군의 흡광도 값을 제한 값을 나누어 계산한 다음 백분율값을 산출하였는데 이는 바이러스 생존율에 해당하는 것으로 Sigma plot 프로그램을 이용하여 IC₅₀ 값을 계산하였다. 50% 억제농도(IC₅₀)는 바이러스 생존율이 50%가 되도록 하는 약물의 농도로 정의하였고 IC₅₀ 값을 항바이러스 효과의 지표로 사용하였다.

제 3 절 결과 및 고찰

한의학의 감기처방은 인체의 면역기능의 저하에 의해 발생하는 정기(正氣)의 허약으로 신체의 개개인의 특성에 맞게 부족해진 기(氣), 혈(血), 양기(陽氣), 음기(陰氣)를 보충하면서 동시에 사기(邪氣)를 없애는 것에 근본을 두고 있어 소아나 노인들의 원기회복에 관련된 처방들이 많다. 본 연구에서는 사상방 처방 및 동의임상 방제학을 기초로 하여 63종의 처방을 검색하여, 1차로 이들 처방을 구성하는 77종의 한약재와 2차로 23종의 한약재에 대해 항바이러스 활성 스크리닝을 실시하였다. 그리고, 국내에서 시판하고 있는 4종의 한약 엑기스제제, 일본에서 시판하고 있는 2종의 한약 엑기스제제와 중국에서 시판중인 3종의 한약 엑기스제제, 인플루엔자 바이러스 Type A 저해제인 amantadine·HCl과 Mw. 5000인 Dextran sulfate을 비교 대조구로 사용하였고, 각 시료들에 대한 세포독성을 조사하였다.

1. 한약재의 항인플루엔자 바이러스 활성 및 세포독성

가. 인플루엔자 바이러스 증식

1) MDCK세포에 감염된 인플루엔자 바이러스의 증식

MDCK세포에 장노액에서 분리한 바이러스를 감염시켜 72시간 배양하면서 현미경으로 증식과정을 관찰한 결과, 감염시킨 후 8시간부터 섬유아세포의 모양이 변형되기 시작하였다. MDCK세포는 24시간 후 부분적으로 분리되어 배양액위에 주유하기 시작하였고, 48시간 후에는 대부분 분리된 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 1).



Fig. 1. Micrographs of MDCK cells infected with influenza virus type A
A: Normal MDCK, B: 24hrs post-infection($\times 200$),
C: 48hrs post-infection($\times 200$)

2) 인플루엔자 바이러스의 역가측정

수정란에서 증식시킨 바이러스를 항인플루엔자 바이러스 활성물질의 탐색에 이용하기 위해서 역가를 측정한 결과, 역가는 256 HA units/0.025ml이었고 적혈구 응집시험 및 적혈구응집억제시험에는 4 HA units/0.025ml로 희석하여 사용하였다.

나. 국내외 한방 엑기스제제에 대한 항바이러스 활성 및 세포독성

국내외 시판중인 한방 엑기스제제 9종은 비교대조구로서 선정하였고 이에 대한 항바이러스 활성을 측정한 결과, 화학요법제인 amantadine·HCl은 12.5mg/ml만 활성을 보였고, 국내에서 시판중인 한방 엑기스제제는 3.13~100mg/ml에서 활성이 있었고, 중국에서 시판하고 있는 한방 엑기스제제 중 C-3은 6.25~100mg/ml에서 활성이 나타났지만, C-1은 6.25~100mg/ml 농도구간에서 약한 활성을 보여주었다. 일본에서 시판하고 있는 2종의 한방 엑기스제제 J-1은 6.25~100mg/ml 사이에서 강한 활성을 보여주었다(Table 3).

이들 제품들의 세포독성은 조사한 결과, amantadine·HCl은 25~200mg/ml의 농도 구간에서 세포독성을 보였는데 반하여 국내외에서 시판되고 있는 한방 엑기스제제는 세포독성이 전혀 나타나지 않았다(Table 4).

감기 한방 처방이나 민간방을 응용한 국내외 한방 엑기스제제들에 대한 항바이러스 활성은 일부 제제들은 효능에 의문을 제기할 수 있는 결과가 나왔지만, 일본에서 시판하고 있는 제제들은 바이러스 치료제로 사용하고 있는 항생물질 amantadine·HCl보다 그 효과가 우수함을 보여 주었는데, J-2(カコナル^{kakonaru})은 일본의 Kitasato(北里)동양의학연구소에서 수년간에 걸쳐 연구하여 개발한 복합제제이다. 이들 결과에서 화학요법제에 비해 한약재를 소재로 한 제품들이 보다 세포에 대해서 안전하다는 것과 효과가 있음을 입증해 주었고, 한방 소재를 이용한 감기 예방 및 치료보조제로서 복합제제가 개발 가능성이 높다는 것을 예견할 수 있었다.

Table 3. Inhibitory effects of control drugs against Influenza virus type A.

Con. No.	-1 100mg	-2 50	-3 25	-4 12.5	-5 6.25	-6 3.13	-7 1.56	-8 780 μ g	-9 390	-10 195	-11 97.5	-12 48.7
A	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-
K-1	-	+	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-
K-2	-	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
K-3	++	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
K-4	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C-1	++	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
C-2	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C-3	++	++	++	+	+	-	-	-	-	-	-	-
J-1	++	++	++	++	++	+	-	-	-	-	-	-
J-2	++	++	++	++	++	+	-	-	-	-	-	-

Note. Anti-Influenza virus effects of each control drug determined by hemagglutination inhibition test. A: amantadine·HCl, K-1:control drug 1 which was made in Korea, K-2:control drug 2 which was made in Korea, K-3:control drug 3 which was made in Korea, K-4:control drug 4 which was made in Korea, J-1:control drug 1 which was made in Japan, J-2:control drug 2 which was made in Japan, Con.:concentration of each extract, ++, + and -:strong positive, weak positive and negative, respectively.

Table 4. Cytopathic effects of control drugs against RBC.

Con. No.	-1 100mg	-2 50	-3 25	-4 12.5	-5 6.25	-6 3.13	-7 1.56	-8 780 μ g	-9 390	-10 195	-11 97.5	-12 48.7
A	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
K-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
J-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
J-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Note. Cytotoxicity to red blood cells determined by hemagglutination inhibition tests with each control drug. A:amantadine, K-1:control drug 1 which was made in Korea, K-2:control drug 2 which was made in Korea, K-3:control drug 3 which was made in Korea, K-4:control drug 4 which was made in Korea, J-1:control drug 1 which was made in Japan, J-2:control drug 2 which was made in Japan, Con.:concentration of each extract, + and -:positive and negative, respectively.

라. 한약재 시료의 1차 스크리닝

1) 열수 추출 시료

열수 추출한 한약재 시료에 대한 항인플루엔자 바이러스 활성과 세포독성을 측정한 결과는 table 5와 6으로 정리하였다. 1차로 스크린한 77종의 한약재중에서 38종은 항인플루엔자 바이러스활성과 RBC에 대한 세포독성이 없었다. MW-1, MW-9, MW-12, MW-40, MW-55, MW-63, MW-74, MW-84 그리고 MW-88은 화학요법제로 사용하고 있는 항생물질 amantadine·HCl보다 효과가 강한 3.13mg/ml이하의 농도에서 강한 항바이러스 활성을 보였고 RBC에 대한 세포독성은 나타나지 않았다. 이들 중 MW-1은 48.7 μ g/ml~100mg/ml 농도 범위에서, MW-9은 780 μ g/ml~100mg/ml 농도 범위에서, MW-40은 195 μ g/ml~100mg/ml 농도 범위에서, MW-63은 780 μ g/ml~100mg/ml 농도 범위에서 그리고 MW-88의 경우 48.7 μ g/ml~100mg/ml 농도 범위에서 항바이러스 활성을 나타냈는데, 이들 범위는 항인플루엔자 바이러스 활성물질의 탐색 소재로서 개발 가능성이 높음을 보여준 것으로 주목된다. MW-57, MW-65, MW-72 그리고 MW-79은 강한 항바이러스 활성을 보이지만 세포독성이 나타났고, MW-7, MW-24, MW-26 MW-56, MW-59, MW-78, MW-80 그리고 MW-89는 세포독성은 없지만 6.25 μ g/ml~12.5mg/ml의 농도 범위에서 약한 항바이러스 활성을 보였다. MW-46과 MW-75는 세포 독성과 함께 각각 6.25mg/ml~25mg/ml와 1.56mg/ml~12.5mg/ml에서 약한 항바이러스 활성을 보였으며, 그외의 나머지 열수 추출물들은 12.5mg/ml이상의 농도에서 항바이러스 활성을 보였다.

1차 스크린에서 흥미로운 사실은 한방 감기 처방에 흔히 쓰이는 갈근의 경우 항인플루엔자 바이러스 활성이 나타나지 않았다는 것이다. 한방에서 갈근은 발한, 해열, 근육통 등에 효과가 있으며 감기예방 및 억제를 목적으로 하는 한방제품에 주원료로 사용하고 있고, 본 시험에서 비교대조구로 사용한 카코날 (J-2)은 갈근탕을 변형한 것으로 갈근과는 상반된 결과를 보이고 있다. 그리고, 유자(MW-88, 89), 지각(MW-24) 그리고 지실(MW-74)은 Citrus 성분이 공통적으로 함유되어 있는 과실인데 항인플루엔자 바이러스 활성이 나타났다. 특히, 유자인 경우 덜 익은 유

자(MW-88)가 익은 유자(MW-89)보다 항바이러스 활성이 강했다.

Table 5. Inhibitory effects of herbs on Influenza virus type A

Con. No.	-1 100mg	-2 50	-3 25	-4 12.5	-5 6.25	-6 3.13	-7 1.56	-8 780 μ g	-9 390	-10 195	-11 97.5	-12 48.7
MW-	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+	-
2	-	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	++	++	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	++	++	++	++	++	++	++	+	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	++	++	++	++	++	+	+	+	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	-	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	++	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	+	++	++	++	++	+	-	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26	+	++	++	+	+	+	-	-	-	-	-	-
27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Con. No.	-1 100mg	-2 50	-3 25	-4 12.5	-5 6.25	-6 3.13	-7 1.56	-8 780 μ g	-9 390	-10 195	-11 97.5	-12 48.7
MW-3	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32	+	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
33	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
36	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
38	+	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
39	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
40	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	-	-
41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
43	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
46	-	-	+	++	+	-	-	-	-	-	-	-
48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
49	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
51	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
52	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
53	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
54	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
55	++	++	++	++	++	++	+	-	-	-	-	-
56	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
57	-	-	-	-	+	++	++	-	-	-	-	-
58	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
59	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
61	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
62	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
63	++	++	++	++	++	++	++	+	-	-	-	-
65	++	++	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-

Con. No.	-1 100mg	-2 50	-3 25	-4 12.5	-5 6.25	-6 3.13	-7 1.56	-8 780 μ g	-9 390	-10 195	-11 97.5	-12 48.7
MW-6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
67	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
68	+	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
69	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
70	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
71	+	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
72	-	-	-	-	-	++	++	++	-	-	-	-
73	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
74	-	+	++	++	++	+	+	-	-	-	-	-
75	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
76	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
78	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
79	-	-	-	-	++	++	+	-	-	-	-	-
80	++	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
81	++	++	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-
82	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
83	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
84	++	++	++	++	++	+	-	-	-	-	-	-
85	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
86	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
88	++	++	++	++	++	+	+	+	+	+	+	+
89	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Note. Anti-Influenza virus effects determined by haemagglutination inhibition test with hot water extracts of herbs(MW), Con.:concentration of each extract, ++, +, and -: strong positive, positive and negative, respectively.

Table 6. Cytotoxicity of herbs against RBC.

Con. No.	-1 100mg	-2 50	-3 25	-4 12.5	-5 6.25	-6 3.13	-7 1.56	-8 780 μ g	-9 390	-10 195	-11 97.5	-12 48.7
MW-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Con. No	-1 100mg	-2 50	-3 25	-4 12.5	-5 6.25	-6 3.13	-7 1.56	-8 780 μ g	-9 390	-10 195	-11 97.5	-12 48.7
MW-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
43	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
46	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
49	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
51	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
52	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
53	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
54	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
55	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
56	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
57	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
58	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
59	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
61	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
62	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
63	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
65	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Con. No.	-1 100mg	-2 50	-3 25	-4 12.5	-5 6.25	-6 3.13	-7 1.56	-8 780 μ g	-9 390	-10 195	-11 97.5	-12 48.7
MW-6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
67	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
68	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
69	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
70	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
71	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
72	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
73	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
74	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
75	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
76	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
78	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
79	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
81	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
82	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
83	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
84	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
85	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
86	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
88	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
89	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Note. Cytotoxicity to red blood cells determined by haemagglutination inhibition test with hot water extracts of herb(MW), Con.:concentration of each extract, + and -:positive and negative, respectively.

2) 메탄을 추출 시료

메탄을 추출 한약 단미제의 항바이러스 활성 검색과 세포독성의 결과는 Table 7과 8로 정리하였다. 일반적으로 메탄을 추출물은 열수 추출물보다 세포독성이 강하게 나타나고 항바이러스 활성도 낮았다. 77종의 한약재에 대해 HIT의 결과는 MM-2, MM-40, MM-57, MM-71, MM-72, 그리고 MM-79에서 각각 6.25mg/ml~25mg/ml, 3.13mg/ml~12.5mg/ml, 780µg/ml~6.25mg/ml, 6.25mg/ml~12.5mg/ml, 780µg/ml~3.13mg/ml 그리고 12.5mg/ml~25mg/ml의 농도 범위에서 항바이러스 활성을 보였지만 세포독성이 모두 나타났다. 그리고, MM-86인 경우는 항바이러스 활성을 보이지 않았지만 세포독성이 나타났다.

모과(MM-40), 마황(MM-57), 빈랑(MM-72)과 육계(MM-79)는 열수 추출과 메탄을 추출에서 모두 항바이러스 활성을 보였지만 메탄을 추출의 경우에는 세포독성이 나타났고 활성의 정도도 비교적 약한 활성을 보여, 메탄을 추출보다는 열수 추출이 보다 항바이러스 활성 물질을 탐색하는 방법으로 효과적이라는 사실을 보여주었다.

Table 7. Inhibitory effects of herbs on Influenza virus type A

Con. No.	-1 100mg	-2 50	-3 25	-4 12.5	-5 6.25	-6 3.13	-7 1.56	-8 780µg	-9 390	-10 195	-11 97.5	-12 48.7
MM-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	+	++	+	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Con. No.	-1 100mg	-2 50	-3 25	-4 12.5	-5 6.25	-6 3.13	-7 1.56	-8 780 μ g	-9 390	-10 195	-11 97.5	-12 48.7
MM-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
40	-	-	-	++	++	++	-	-	-	-	-	-
41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Con. No.	-1 100mg	-2 50	-3 25	-4 12.5	-5 6.25	-6 3.13	-7 1.56	-8 780 μ g	-9 390	-10 195	-11 97.5	-12 48.7
MM-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
46	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
49	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
51	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
52	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
53	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
54	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
55	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
56	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
57	-	-	-	-	++	++	++	+	-	-	-	-
58	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
59	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
61	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
62	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
63	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
65	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
66	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
67	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
68	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
69	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
70	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
71	-	-	-	++	++	-	-	-	-	-	-	-

Con. No.	-1 100mg	-2 50	-3 25	-4 12.5	-5 6.25	-6 3.13	-7 1.56	-8 780 μ g	-9 390	-10 195	-11 97.5	-12 48.7
MM-7	-	-	-	-	-	++	++	+	-	-	-	-
73	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
74	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
75	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
76	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
78	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
79	-	-	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-
80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
81	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
82	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
83	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
84	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
85	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
86	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
88	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
89	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Note. Anti-Influenza virus effects determined by hemagglutination inhibition test with methanol extracts of herbs(MM), Con.:concentration of each extract. ++, +, and -: strong positive, positive and negative, respectively.

Table 8. Cytotoxicity of herbs against RBC.

Con. No.	-1 100mg	-2 50	-3 25	-4 12.5	-5 6.25	-6 3.13	-7 1.56	-8 780 μ g	-9 390	-10 195	-11 97.5	-12 48.7
MM-]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Con. No	-1 100mg	-2 50	-3 25	-4 12.5	-5 6.25	-6 3.13	-7 1.56	-8 780 μ g	-9 390	-10 195	-11 97.5	-12 48.7
MM-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
40	-	-	-	++	++	++	-	-	-	-	-	-
41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
43	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
46	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
49	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
51	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
52	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
53	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
54	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
55	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
56	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
57	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
58	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
59	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
61	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
62	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
63	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
65	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Con. No.	-1 100mg	-2 50	-3 25	-4 12.5	-5 6.25	-6 3.13	-7 1.56	-8 780 μ g	-9 390	-10 195	-11 97.5	-12 48.7
MW-6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
67	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
68	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
69	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
70	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
71	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
72	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
73	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
74	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
75	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
76	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
78	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
79	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
81	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
82	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
83	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
84	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
85	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
86	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
88	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
89	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Note. Cytotoxicity to red blood cells determined by haemagglutination inhibition test with methanol extracts of herbs(MM), Con.:concentration of each extract, + and -:positive and negative, respectively.

마. 한약재 시료의 2차 스크리닝

동의임상방제학에 수재된 감기 처방을 구성하고 있는 한약재중 1차에서 실시하지 않은 한약재 23종에 대해 2차 항바이러스 활성 스크리닝을 실시하였다.

1) 열수 추출 시료

열수 추출 한약재 시료의 2차 항바이러스 활성 스크리닝 결과와 RBC에 대한 세포독성의 결과는 Table 9와 10으로 정리하였다. 한약재 23종중 7종의 한약재는 항바이러스 활성이 없었고, RBC에 대한 세포독성은 MW-92 1종만 없었다. MW-95, MW-97, MW-100, MW-103 그리고 MW-109는 화학요법제로 사용하고 있는 항생물질 amantadine·HCl보다 효과가 강한 3.13mg/ml이하의 농도에서 강한 항바이러스 활성을 보였고, RBC에 대한 세포독성도 나타나지 않았다. 이들 중 MW-95과 MW-97은 390 μ g/ml~100mg/ml 농도 범위에서, MW-103은 3.13mg/ml~100mg/ml 농도 범위에서, MW-109는 780 μ g/ml~100mg/ml 농도 범위에서 정도의 차이는 있으나 강한 항바이러스 활성을 나타냈는데, 이들 범위는 항인플루엔자 바이러스 활성물질의 탐색 소재로서 개발 가능성이 높음을 보여준 것으로 주목된다. 그리고, MW-100은 780 μ g/ml~100mg/ml 농도 범위에서 국내외에서 시판하고 있는 감기 한방 엑기스제를 능가하는 강한 활성이 나타나 새로운 한방감기약의 개발 가능성을 보여준 것으로 흥미로운 결과였다.

2차 스크린에서 흥미로운 사실은 한방 감기 처방에 흔히 쓰이는 생강(780 μ g/ml~100mg/ml)은 건강(100mg/ml)보다 강한 활성을 가지고 있었다. 생강은 한의학의 최고의 경서인 「신농본초경」에 중품으로 기재되어 있는데 법제(수치; 한의학 적 원리를 바탕으로 가공한 것)하여 백강, 건생강, 건강, 생강피의 형태로 이용되고 있으며 각각의 치료효과도 다르다. 건강은 종이에 싸서 불에 구운 것인데 HIT의 결과는 생강하고 다른 약리활성을 보여준 한 예로서 법제하여 사용할 때는 원료가 같은 약재이지만 주의를 해야한다.

Table 9. Inhibitory effects of herbs on Influenza virus type A

Con. No.	-1 100mg	-2 50	-3 25	-4 12.5	-5 6.25	-6 3.13	-7 1.56	-8 780 μ g	-9 390	-10 195	-11 97.5	-12 48.7
MW-90	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
91	++	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
92	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
93	-	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
94	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
95	++	++	++	++	+	+	+	+	+	-	-	-
96	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
97	++	++	++	++	++	++	++	+	+	-	-	-
98	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
99	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
100	+	+	+	+	+	++	++	++	++	++	+	+
101	-	-	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-
102	++	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
103	++	++	++	++	+	+	-	-	-	-	-	-
104	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
105	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
106	+	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
107	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
108	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
109	++	++	++	++	++	++	++	+	-	-	-	-
110	-	-	-	-	-	-	-	++	+	-	-	-
111	-	-	-	-	++	++	+	-	-	-	-	-
112	-	△	△	△	△	△	△	△	△	△	△	△
113	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Note. Anti-Influenza virus effects determined by hemagglutination inhibition test with hot water extracts of herbs(MW), Con.:concentration of each extract, ++, +, △ and -: strong positive, positive, very weak and negative, respectively.

Table 10. Cytotoxicity effects of herbs on RBC.

Con. No.	-1 100mg	-2 50	-3 25	-4 12.5	-5 6.25	-6 3.13	-7 1.56	-8 780 μ g	-9 390	-10 195	-11 97.5	-12 48.7
MW-90	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
91	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
92	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
93	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
94	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
95	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
96	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
97	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
98	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
99	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
101	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
102	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
103	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
104	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
105	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
106	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
107	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
108	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
109	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
110	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
111	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
112	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
113	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-

Note. Cytotoxicity to red blood cells determined by haemagglutination inhibition test with hot water extracts of herbs(MW), Con.:concentration of each extract, + and -:positive and negative, respectively.

2) 메탄을 추출 시료

메탄을 추출 한약재 시료의 2차 항바이러스 활성 스크리닝 결과와 RBC에 대한 세포독성의 결과는 Table 11과 12로 정리하였다. 한약재 23종 중 10종의 한약재가 항바이러스 활성이 있었는데, 대부분 RBC에 대한 세포독성을 보여 주었다. 특히, MM-95, MM-104, MM-107 그리고 MM-110에서 195 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~25mg/ml의 농도 범위에서 정도의 차이는 있었으나 모두 세포독성을 보여 주었다.

모과(MM-40), 마황(MM-57), 빈랑(MM-72)과 육계(MM-79)는 열수 추출과 메탄을 추출에서 모두 항바이러스 활성을 보였지만 메탄을 추출의 경우에는 세포독성이 나타났고 활성의 정도도 비교적 약한 활성을 보여, 메탄을 추출보다는 열수 추출이 보다 항바이러스 활성 물질을 탐색하는 방법으로 효과적이라는 사실을 보여주었다.

Table 11. Inhibitory effects of herbs on Influenza virus type A

Con. No.	-1 100mg	-2 50	-3 25	-4 12.5	-5 6.25	-6 3.13	-7 1.56	-8 780 μg	-9 390	-10 195	-11 97.5	-12 48.7
MM-90	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
91	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
92	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
93	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
94	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
95	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
96	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
97	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
98	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
99	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Con. No.	-1 100mg	-2 50	-3 25	-4 12.5	-5 6.25	-6 3.13	-7 1.56	-8 780 μ g	-9 390	-10 195	-11 97.5	-12 48.7
MM-103	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
102	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
103	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
104	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
105	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
106	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
107	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
108	-	-	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
109	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
110	-	-	-	-	-	-	-	-	++	++	+	-
111	-	-	-	-	+	++	-	-	-	-	-	-
112	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
113	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Note. Anti-Influenza virus effects determined by hemagglutination inhibition test with methanol extracts, Con.:concentration of each extract, ++, + and -: strong positive, positive and negative, respectively.

Table 12. Cytotoxicity of herbs against RBC

Con. No	-1 100mg	-2 50	-3 25	-4 12.5	-5 6.25	-6 3.13	-7 1.56	-8 780 μ g	-9 390	-10 195	-11 97.5	-12 48.7
MM-90	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
91	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
92	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
93	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
94	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
95	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
96	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
97	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
98	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
99	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
100	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
101	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
102	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
103	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
104	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
105	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
106	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
107	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
108	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
109	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
110	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
111	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
112	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
113	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Note. Cytotoxicity to red blood cells determined by hemagglutination inhibition test with methanol extracts of herbs(MM), Con.:concentration of each extract, ++, + and -: strong positive, positive and negative, respectively.

2. 1,2차 스크리닝에서 활성 한약재 간의 조합과 항인플루엔자 바이러스 활성 및 세포 독성

감기 복합처방에서 사용되는 한약재들 가운데 1차, 2차 검색에서 강한 활성과 중간 활성을 갖는 한약재들을 한방의 군신좌사(君臣佐使) 및 칠정합화(七情合和) 이론에 근거하여 3가지 유형으로 조합하고(Table 13), HIT를 이용하여 항바이러스 활성 및 세포 독성에 관한 검색을 실시하였다.

가. 3가지 유형의 조합

Group I 은 1차, 2차 검색에서 강한 활성을 보여준 모과(40), 덜 익은 유자(88)와 생강(100)을 근간으로 한 것이다. 옛부터 모과, 유자, 생강은 한방의 음차(飲茶)법을 응용하여 겨울철에 감기의 예방 목적으로 전통차의 형태로 민간에서 널리 이용하고 민간방이다. 한약재를 소재로 한 기능성 한방음료를 개발에는 약용과 식용을 구분하여야 하며, 법률에 접촉되는 약재는 식품으로 허가 받을 경우 부적격하다는 문제의 소지가 발생하므로 가능한 식품 원료로 사용할 수 있는 한약재로 조합을 구성 하였다.

Group II와 III는 1차, 2차 검색에서 중간 정도의 활성을 보여준 한약재를 한의학의 기본 방제원리를 변형한 것으로, Group II는 나복자, 천련자, 금은화, 작약 그리고 천궁을 기본 한약재로 하였고, Group III은 상백피, 자소엽, 대조(대추) 그리고 황금을 기본 한약재로 구성하였다.

나. 항인플루엔자 바이러스 활성 및 세포 독성

강한 활성을 지닌 한약재들을 조합한 group I 은 일반적으로 1.56mg/ml~100mg/ml 농도 구간에서 강한 활성을 보였고(Table 14), 세포독성이 전혀 나타나지 않았다(Table 17). 특히 Table 14에서 조합 6은 390µg/ml-100mg/ml 농도 구간에서 매우 강한 활성을 보였다. 중간 정도의 활성을 지닌 한약재들을 조합하여 구성된

group II, III에 대한 HIT를 시행한 결과 일반적으로 6.25mg/ml~100mg/ml 농도 구간에서 활성을 보였고(Table 15,16) 세포독성은 전혀 나타나지 않았고(Table 18,19), 전 농도구간에서 상품으로 개발할수 있는 항바이러스 활성을 보인 것은 약재상호간의 작용에 의해서 상승 효과를 나타내고 있다고 생각되어 진다.

Table 13. specific combinations of herbal on influenza virus A

Combination group	Composition
Group I	1: MW40+MW88+MW100 2: MW40+MW88+MW100+MW63 3: MW40+MW88+MW100+MW1 4: MW40+MW88+MW100+MW97 5: MW40+MW88+MW100+MW110 6: MW40+MW88+MW100+MW63+MW1+ MW97+MW110
Group II	1: MW55+MW9+MW93+MW104+MW105 2: MW55+MW9+MW93+MW104+MW105+MW84+MW7 3: MW55+MW9+MW93+MW104+MW105+MW12+MW95 4: MW55+MW9+MW93+MW104+MW105+MW103 5: MW55+MW9+MW93+MW104+MW105+MW84+MW7+ MW12
Group III	1: MW59+MW21+MW26+MW91 2: MW59+MW21+MW26+MW91+MW74+MW80 3: MW59+MW21+MW26+MW91+MW81+MW24 4: MW59+MW21+MW26+MW91+MW74+MW80+MW81 5: MW59+MW21+MW26+MW91+MW24

Table 14. Inhibitory Effects of combinations of group I on influenza virus type A

Con. No.	-1 100mg	-2 50	-3 25	-4 12.5	-5 6.25	-6 3.13	-7 1.56	-8 780 μ g	-9 390	-10 195	-11 97.5	-12 48.7
1	++	++	++	++	++	++	+	-	-	-	-	-
2	++	++	++	++	++	++	++	-	-	-	-	-
3	++	++	++	++	++	++	+	-	-	-	-	-
4	++	++	++	++	++	+	-	-	-	-	-	-
5	+	++	++	++	++	++	+	-	-	-	-	-
6	++	++	++	++	++	++	++	++	++	-	-	-

Note. Anti-Influenza virus effects determined by hemagglutination inhibition test with methanol extracts of Korean medicinal herb(MM), Con.:concentration of each extract, ++, + and -: strong positive, positive and negative, respectively.

Table 15. Inhibitory Effects of combinations of group II on influenza virus type A

Con. No.	-1 100mg	-2 50	-3 25	-4 12.5	-5 6.25	-6 3.13	-7 1.56	-8 780 μ g	-9 390	-10 195	-11 97.5	-12 48.7
1	++	++	++	++	++	+	-	-	-	-	-	-
2	++	++	++	++	++	++	+	-	-	-	-	-
3	++	++	++	++	++	++	-	-	-	-	-	-
4	++	++	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-
5	++	++	++	++	++	++	-	-	-	-	-	-
6	++	++	++	++	++	++	+	-	-	-	-	-

Note. Anti-Influenza virus effects determined by hemagglutination inhibition test with methanol extracts of Korean medicinal herb(MM), Con.:concentration of each extract, ++, + and -: strong positive, positive and negative, respectively.

Table 16. Inhibitory effects of combinations of group III on influenza virus type A

Con. No.	-1 100mg	-2 50	-3 25	-4 12.5	-5 6.25	-6 3.13	-7 1.56	-8 780 μ g	-9 390	-10 195	-11 97.5	-12 48.7
1	++	++	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-
2	++	++	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-
3	++	++	++	++	++	+	-	-	-	-	-	-
4	++	++	++	++	++	-	-	-	-	-	-	-
5	++	++	++	++	++	+	-	-	-	-	-	-

Note. Anti-Influenza virus effects determined by hemagglutination inhibition test with methanol extracts of Korean medicinal herb(MM), Con.:concentration of each extract, ++, + and -: strong positive, positive and negative, respectively.

Table 17. Cytotoxicity of combinations of group I against RBC

Con. No.	-1 100mg	-2 50	-3 25	-4 12.5	-5 6.25	-6 3.13	-7 1.56	-8 780 μ g	-9 390	-10 195	-11 97.5	-12 48.7
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Note. Cytotoxicity to red blood cells determined by hemagglutination inhibition test with methanol extracts of herbs(MM), Con.:concentration of each extract, ++, + and -: strong positive, positive and negative, respectively.

Table 18. Cytotoxicity of combinations of groupII against RBC

Con. No.	-1 100mg	-2 50	-3 25	-4 12.5	-5 6.25	-6 3.13	-7 1.56	-8 780 μ g	-9 390	-10 195	-11 97.5	-12 48.7
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Note. Cytotoxicity to red blood cells determined by hemagglutination inhibition test with methanol extracts of herbs(MM), Con.:concentration of each extract, ++, + and -: strong positive, positive and negative, respectively.

Table 19. Cytotoxicity of combinations of groupIII against RBC

Con. No.	-1 100mg	-2 50	-3 25	-4 12.5	-5 6.25	-6 3.13	-7 1.56	-8 780 μ g	-9 390	-10 195	-11 97.5	-12 48.7
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Note. Cytotoxicity to red blood cells determined by hemagglutination inhibition test with methanol extracts of herbs(MM), Con.:concentration of each extract, ++, + and -: strong positive, positive and negative, respectively.

3. 분획에 의한 열수 추출 시료의 항인플루엔자 바이러스 활성 및 세포독성

1와 2차 스크리닝을 통해 항인플루엔자 바이러스 활성과 RBC에 대한 세포독성을 검색한 100종의 한약재 중에서 효과가 탁월하여 기능성 소재 또는 한방약제로 개발 가능성이 높은 모과(40), 나복자(55), 우방자(63), 덜익은 유자(88) 그리고 후박(110)을 각종 크로마토그래피로 분획하여 항인플루엔자 바이러스 활성을 검색하였다. 항인플루엔자 바이러스 활성 검색은 1차와 2차로 나누어 검색하였는데, 1차 활성검색은 Amberlite XAD-4에 의해 분리된 분획구를 HIT와 RBC에 대한 세포독성을 검색하였고, 2차 활성 검색은 모과와 유자에서 생리활성 물질을 탐색·추적하는 과정에서 생성된 정제 분획구를 *in situ* ELISA법에 의해 검사한 것이다.

가. Amberlite XAD-4에 의한 1차 분획

열수 추출한 시료는 ether를 이용하여 극성과 비극성 분획으로 나누고, 극성분획구를 Amberlite XAD-4를 흡착제를 사용한 크로마토그래피에 의해 H₂O, 20% MeOH, 40% MeOH, 60% MeOH, 80% MeOH, 100% MeOH로 분획하여 항바이러스 활성 시험과 RBC에 대한 세포독성을 검색하였다.

모과의 결과들은 Table 20으로 정리하였는데, H₂O 분획구는 5mg/ml ~ 100mg/ml, 20% MeOH 분획구는 6.25mg/ml ~ 3.13mg/ml, 40% MeOH 분획구는 780µg/ml ~ 1.56mg/ml의 농도구간에서 항바이러스 활성이 나타났고, RBC에 대한 세포독성은 Amberlite XAD-4 크로마토그래피의 전 분획구에서 나타났다(Table 21).

나복자의 경우 H₂O 분획구는 1.56mg/ml ~ 100mg/ml, 20% MeOH 분획구는 100mg/ml, ether 분획구는 12.5mg/ml ~ 100mg/ml 농도구간에서 각각의 항바이러스 활성이 있었고(Table 22), Amberlite XAD-4에 의한 분획구에서는 세포독성이 발현되지 않았지만 ether 분획구에서 세포독성(50mg/ml ~ 100mg/ml)이 있었다(Table 23).

우방자의 경우 H₂O 분획구는 25mg/ml ~ 100mg/ml, 60%과 40% MeOH 분획구는 100mg/ml, 20% MeOH 분획구는 6.25mg/ml ~ 50mg/ml 농도구간에서 각각의 항바이러스

활성이 있었고(Table 24), 세포독성은 발현되지 않았지만, 20% MeOH와 ether 분획구에서 세포독성이라고 의심이 가는 경향성을 보였다(Table 25).

후박의 경우 H₂O 분획구는 48.7 μ g/ml~780 μ g/ml, 60% MeOH 분획구는 1.56mg/ml~6.25mg/ml, 40% MeOH 분획구는 1.56mg/ml~3.13mg/ml 농도구간에서 각각의 항바이러스 활성이 있었고(Table 26), 세포독성은 20% MeOH 분획구의 경우(50mg/ml~100mg/ml)만 약한 세포독성을 보였고 0.195mg/ml~100mg/ml 농도구간에서 정도의 차이는 있었지만 강하게 발현되었다.(Table 27).

항인플루엔자 바이러스 활성이 탁월한 덜익은 유자(MW-88)는 상술의 Amberlite XAD-4를 흡착제를 사용한 크로마토그래피에 의해 H₂O, 20% MeOH, 40% MeOH, 60% MeOH, 80% MeOH, 100% MeOH로 분획하여 항바이러스 활성 시험과 RBC에 대한 세포독성을 검색을 실시하였으나 적혈구 응집 시험(HIT)에 있어서 재현성이 결여되는 다소의 문제점을 가지고 있었다. MW-88의 분획물들은 분획과정에서 다량이 용매에 녹아 있을 때는 침전이 생기지 않지만 농축하여 일정량을 소량의 용매에 녹이면 젤화 현상과 유사한 층이 생기고 시간이 지남에 따라 침전물이 발생하여 동일한 HIT결과를 기대할 수 없었다.

Table 20. Inhibitory effects of fractions MW-40 on influenza virus type A

Layer	-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8	-9	-10	-11	-12
	100mg	50	25	12.5	6.25	3.13	1.56	780 μ g	390	195	97.5	48.7
H ₂ O	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MeOH 60%	-	-	-	+	++	+	-	-	-	-	-	-
MeOH 40%	-	-	-	-	-	-	++	++	-	-	-	-
MeOH 20%	-	-	-	-	-	++	++	-	-	-	-	-
Ether	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Note. Anti-Influenza virus effects of Korean medicinal herbs determined by hemagglutination inhibition test with fractions of herb MW-40, Con.:concentration of each extract, ++, +, and -: strong positive, positive, and negative, respectively.

Table 21. Cytotoxicity of fractions MW-40 on RBC

Layer	-1 100mg	-2 50	-3 25	-4 12.5	-5 6.25	-6 3.13	-7 1.56	-8 780 μ g	-9 390	-10 195	-11 97.5	-12 48.7
H ₂ O	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MeOH 60%	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
MeOH 40%	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
MeOH 20%	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Ether	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Note. Cytotoxicity to red blood cells determined by haemagglutination test with fractions of herb MW-40, Con.:concentration of each extract, + and -:positive and negative, respectively.

Table 22. Inhibitory effects of fractions MW-55 on influenza virus type A

Layer	-1 100mg	-2 50	-3 25	-4 12.5	-5 6.25	-6 3.13	-7 1.56	-8 780 μ g	-9 390	-10 195	-11 97.5	-12 48.7
H ₂ O	++	++	++	++	++	++	+	-	-	-	-	-
MeOH 60%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MeOH 40%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MeOH 20%	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ether	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Note. Anti-Influenza virus effects of Korean medicinal herbs determined by hemagglutination inhibition test with fractions of herb MW-55, Con.:concentration of each extract, ++, +, and -: strong positive, positive, and negative, respectively.

Table 23. Cytotoxicity fractions MW-55 on RBC

Layer	-1 100mg	-2 50	-3 25	-4 12.5	-5 6.25	-6 3.13	-7 1.56	-8 780 μ g	-9 390	-10 195	-11 97.5	-12 48.7
MeOH 60%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MeOH 40%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MeOH 20%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ether	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ether	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Note. Cytotoxicity to red blood cells determined by haemagglutination inhibition test with fractions of herb MW-55, Con.:concentration of each extract, + and -:positive and negative, respectively.

Table 24. Inhibitory effects of fractions MW-63 on influenza virus type A

Layer	-1 100mg	-2 50	-3 25	-4 12.5	-5 6.25	-6 3.13	-7 1.56	-8 780 μ g	-9 390	-10 195	-11 97.5	-12 48.7
H ₂ O	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MeOH 60%	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MeOH 40%	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MeOH 20%	-	+	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-
Ether	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Note. Anti-Influenza virus effects of Korean medicinal herbs determined by hemagglutination inhibition test with fractions of herb MW-63, Con.:concentration of each extract, ++, +, and -: strong positive, positive, and negative, respectively.

Table 25. Cytotoxicity of fractions MW-63 on RBC

Layer	-1 100mg	-2 50	-3 25	-4 12.5	-5 6.25	-6 3.13	-7 1.56	-8 780 μ g	-9 390	-10 195	-11 97.5	-12 48.7
H ₂ O	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MeOH 60%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MeOH 40%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MeOH 20%	△	△	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ether	△	△	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Note. Cytotoxicity to red blood cells determined by haemagglutination inhibition test with fractions of herb MW-63, Con.:concentration of each extract, +, △ and -:positive and negative, respectively.

Table 26. Inhibitory effects of fractions MW-110 on influenza virus type A

Layer	-1 100mg	-2 50	-3 25	-4 12.5	-5 6.25	-6 3.13	-7 1.56	-8 780 μ g	-9 390	-10 195	-11 97.5	-12 48.7
H ₂ O	-	-	-	-	-	-	-	+	++	++	+	+
MeOH 60%	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
MeOH 40%	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
MeOH 20%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ether	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Note. Anti-Influenza virus effects of Korean medicinal herbs determined by hemagglutination inhibition test with fractions of herb MW-110, Con.:concentration of each extract, ++, +, and -: strong positive, positive, and negative, respectively.

Table 27. Cytotoxicity of fractions MW-110 on RBC

Layer	-1 100mg	-2 50	-3 25	-4 12.5	-5 6.25	-6 3.13	-7 1.56	-8 780 μ g	-9 390	-10 195	-11 97.5	-12 48.7
H ₂ O	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
MeOH 60%	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
MeOH 40%	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
MeOH 20%	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ether	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-

Note. Cytotoxicity to red blood cells determined by haemagglutination inhibition test with fractions of herb MW-110, Con.:concentration of each extract, + and -:positive and negative, respectively.

나. *in situ* ELISA법에 의한 2차 검색

적혈구 응집 시험(HIT)은 신속하게 다량의 시료를 간편히 시험할 수 있다는 장점을 가지고 있으나, 실험자간의 주관적인 관점으로 인한 결과 해석에 있어서 오차가 일어날 수 있는 단점을 가지고 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위해 항인플루엔자 바이러스 활성 검사는 3회 반복하여 동일한 재현성을 확인하고 결과를 도출하였지만 다소 문제점을 가지고 있다고 생각되어 생리활성 검사의 방법을 개선하는 연구도 병행하였다. 육안에 의한 판정과정에서 주관적 결과 도출로 인해 발생할 수 있는 오차를 최대한 줄이기 위해 수치화 할 수 있는 방법으로 ELISA을 이용하였다(Fig 2). 2차 스크리닝을 한방약제로 개발 가능성이 높은 모과(40)와 덜익은 유자(88)에서 생리활성 물질을 탐색·추적하는 과정에서 생성된 정제 분획구를 새롭게 확립된 *in situ* ELISA법에 의해 검사하였다.

구분	in situ ELISA
특징	MDCK cell 내에서 증식하는 Virus를 직접 검출하는 direct method
virus titer	50TCID ₅₀ MTT assay로 측정
응용	1. 항바이러스 물질 검색 2. 바이러스 진단
검색과정	<pre> virus in MDCK cell ↓ ←약제 투입 배양 (2days) ↓ fixation ↓ anti-influenza polyclonal antibody ↓ conjugate binding ↓ TMB ↓ 450nm reading </pre>
참고문헌	Journal of Virological Methods 77(1999) 165-177

Fig. 2 Virus 진단 감도가 높은 최신 실험 방법 구축

1) 항 바이러스 활성 측정을 위한 바이러스 농도 결정

수정란의 장노액에서 증식된 바이러스 역가를 측정하기 위하여 MTT assay를 이용하였고 바이러스 역가는 TCID₅₀값으로 정하였다. 생존 세포의 미토콘드리아 내에 있는 succinate dehydrogenase 활성에 의해 3-[4, 5-Dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyl-tetrazolium bromide(MTT)가 환원되어 formazan 결정으로 침전되는 정도를 흡광도로 측정하는 MTT 검색법을 응용하여 바이러스에 의한 세포병변 정도를 측정함으로써 바이러스 역가를 계산하는 방법으로 사용하였다.

항바이러스 활성 측정을 위한 바이러스 농도를 결정하기 위해 바이러스 증식액을 10배로 계단희석하여 MTT법으로 측정한 결과 희석농도에 따른 바이러스 역가의 표준곡선은 Fig. 3과 같았고 실험에 사용될 바이러스 농축액의 농도는 TCID₅₀값으로 정하였는데 Reed-Muench 공식을 이용하여 계산한 결과 바이러스 농축액의 역가는 5×10^4 TCID₅₀으로 정해졌다.

2) 바이러스 접종 적정농도 결정

본 실험은 현재까지 알려진 항 influenza virus 활성 검색법을 보완하여 개발한 가장 최근에 발표된 측정법으로 Andrzej 등(1999)의 방법을 응용하여 사용하였다. 기존의 검색법은 바이러스를 직접 측정하는 방법이 아니고 바이러스에 의해 세포가 감염됨으로써 세포병변을 보이는 세포 내에 존재하는 succinate dehydrogenase 또는 lactate dehydrogenase(LDH) 등의 효소를 측정함으로써 시료에 대한 항바이러스 효과를 간접적으로 측정하는 방법이었다. 그러나 *in situ* ELISA 검색법은 바이러스의 생존율을 측정하는 방법으로 항바이러스 활성 효과를 직접적으로 측정하는 방법이라 할 수 있다.

5×10^4 TCID₅₀값이 결정된 바이러스 배양농축액을 이용하여 항바이러스 활성을 측정하기 위해 바이러스 접종 적정농도를 ELISA 방법을 응용하여 측정한 결과 표준곡선은 Fig. 4와 같았고, 항바이러스 활성 측정을 위한 바이러스 접종 적정농도는 50 TCID₅₀으로 결정하였다.

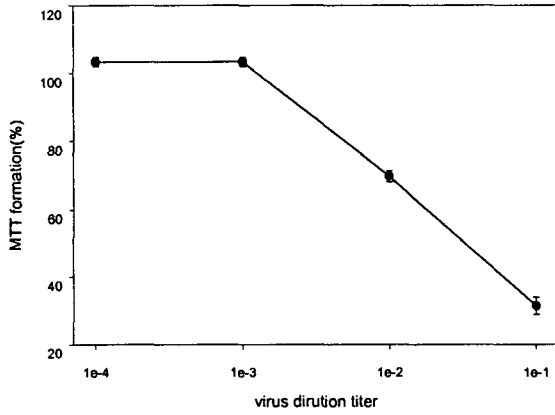


Fig 3. Standard curve for influenza virus titers by MTT assay

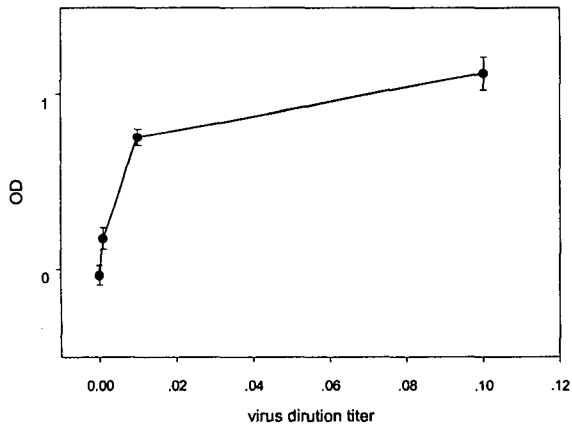


Fig 4. Standard curve for influenza virus titers by *in situ* ELISA

3) 항인플루엔자 바이러스 활성 효과

가) 대조군 약제 Amantadine Hydrochloride에 대한 항바이러스 활성

Influenza virus type A에 대한 저해제인 Amantadine Hydrochloride를 대조군 약제로 사용하기 위해 *in situ* ELISA 방법으로 항바이러스 활성을 측정한 결과는 Fig. 5와 같았다. 화학합성약제인 Amantadin-HCl의 IC₅₀ 값은 20.54 μ g/ml로 바이러스 대조군에 대한 생존율을 측정한 결과 50%의 생존율을 나타내는 농도를 나타내는 것으로 낮은 농도에서 항바이러스 활성을 나타내었다.

나) 모과에서 분리된 분획 및 단일 물질에 대한 항바이러스 활성

모과에서 분리된 분획과 단일 물질에 대한 항바이러스 활성은 *in situ* ELISA 방법을 응용하였는데 활성결과는 생존하는 바이러스의 양을 백분율로 환산하여 IC₅₀ 값으로 측정하였다. 모과에서 분리된 1차 분획에 대한 항바이러스 효과를 적혈구응집억제법(Haemagglutination inhibition test, HIT)으로 1차 검색한 결과 40% MeOH와 60% MeOH 분획에서 활성이 측정되었는바 이 분획들에 대하여 ELISA 방법을 이용하여 항 influenza virus 활성을 측정한 결과 40% MeOH 분획에서는 MDCK 세포에 대한 세포독성이 강하게 측정되어 바이러스에 대한 직접적인 항바이러스 효과를 측정하기가 불가능하였다. 60% MeOH 분획에서 분리된 S6-1, S6-2, S6-3, S6-4 등의 각 분획에 대하여 적혈구응집억제법(HIT)으로 검색한 결과 S6-3과 S6-4 분획에서 항바이러스 활성이 측정되어 이 분획들에 대하여 *in situ* ELISA를 이용하여 항 influenza virus 활성을 측정한 결과 S6-4 분획에서는 세포독성이 강하게 측정되어 바이러스에 대한 직접적인 항바이러스 효과를 측정하기가 불가능하였고, S6-3 분획에서 단일물질로 분리된 모과-compound II에 대하여 활성을 측정한 결과 IC₅₀ 값은 >1,000 μ l/ml로 측정되었다. S6-2 분획에서 분리된 모과-compound I은 세포독성이 강하게 측정되어 바이러스에 대한 직접적인 항바이러스 효과를 측정하기가 불가능하였다.

다) 유자에서 분리된 분획 및 단일 물질에 대한 항바이러스 활성

유자에서 분리된 분획과 단일 물질에 대한 항바이러스 활성은 *in situ* ELISA 방법을 응용하였는데 활성결과는 생존하는 바이러스의 양을 백분율로 환산하여 IC₅₀ 값으로 측정하였다. 유자에서 분리된 각 분획에 대한 항바이러스 효과를 적혈구응집억제법(HIT)으로 1차 검색한 결과 40% MeOH와 60% MeOH 분획에서 활성이 측정되었으며 이 분획들에서 분리된 분획 및 단일물질에 대해 *in situ* ELISA를 이용하여 항 influenza virus 활성 효과를 측정한 결과는 Table 28과 Table 29와 같았다. 유자에 대한 40% MeOH 분획에서는 세포독성이 강하게 측정되어 바이러스에 대한 직접적인 항바이러스 효과를 측정하기가 불가능하였다. 유자에 대한 60% MeOH 분획에 대한 결과는 IC₅₀ 값이 676.08 μ l/ml로 Fig. 6. 과 같았다. 유자 60% MeOH에서 분리된 분획 중에 J6-5의 IC₅₀ 값은 454.6 μ l/ml로 Fig. 7. 과 같이 측정되어 60% MeOH 분획보다 항바이러스 활성이 높았으나 J6-5에서 분리된 유자-compound IV의 IC₅₀ 값이 >1,000 μ l/ml로 단일물질에서 항바이러스 활성이 내려간 것으로 측정되었다. J6-4 분획에서 분리된 유자-compound III는 IC₅₀ 값이 >1,000 μ l/ml로 60% MeOH 분획보다 항바이러스 활성이 낮아진 것으로 측정되었다. 유자 J6-3 분획에서 분리된 J6-31의 IC₅₀값은 962.6 μ l/ml로 Fig. 8. 과 같았고 60% MeOH 분획에서 보다는 항바이러스 활성이 낮은 것으로 측정되었으며 J6-3에서 분리된 유자-compound I의 IC₅₀ 값이 >1,000 μ l/ml로 항바이러스 활성이 내려간 것으로 측정되었으나 유자-compound II의 IC₅₀ 값이 918.46 μ l/ml로 Fig. 9. 와 같았고 J6-31 분획과 비교해 보면 항바이러스 활성이 높아진 것으로 측정되었다.

Table 28. Inhibitory effect of fractions from *Citrus junos* against Influenza A virus by *in situ* ELISA.

Fraction	IC ₅₀ ^a (μl/ml)
fr. 40%MeOH	n. d.
fr. J4-1	n. d.
fr. J4-2	n. d.
fr. J4-4	n. d.
fr. 60%MeOH	676.08
fr. J6-5	454.6
fr. J6-3	962.6

^a 50% virus concentration determined by ELISA

n. d. = not determined

Table 29. Inhibition of influenza A virus infectivity by compounds from *Citrus junos* as measured using cellular ELISA

Compound	IC ₅₀ ^a (μl/ml)
com. I	>1,000
com. II	918.46
com. III	>1,000
com. IV	>1,000

^a 50% virus concentration determined by ELISA

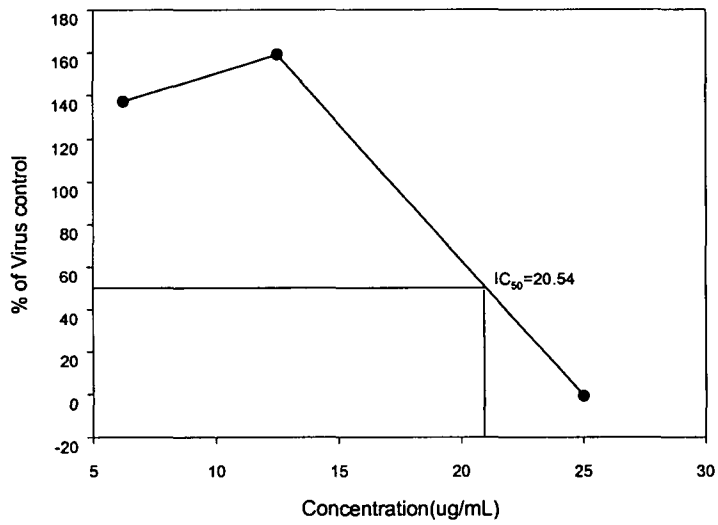


Fig. 5. Inhibitory effect of Amantadine Hydrochloride against influenza A virus by ELISA

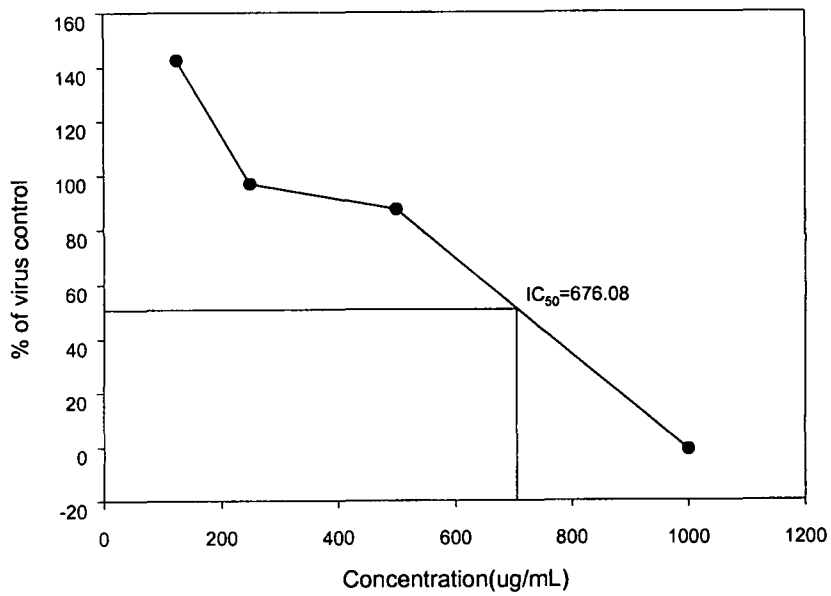


Fig. 6. Inhibitory effect of 60% MeOH fraction from *Citrus junos* against influenza A virus by ELISA.

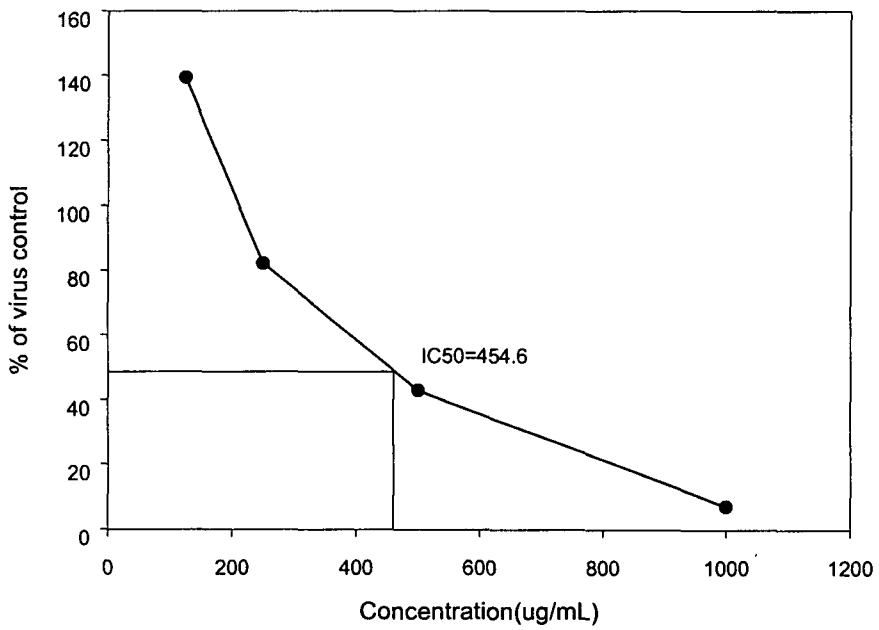


Fig. 7. Inhibitory effect of J6-5 fraction Citrus junos against influenza A virus by ELISA.

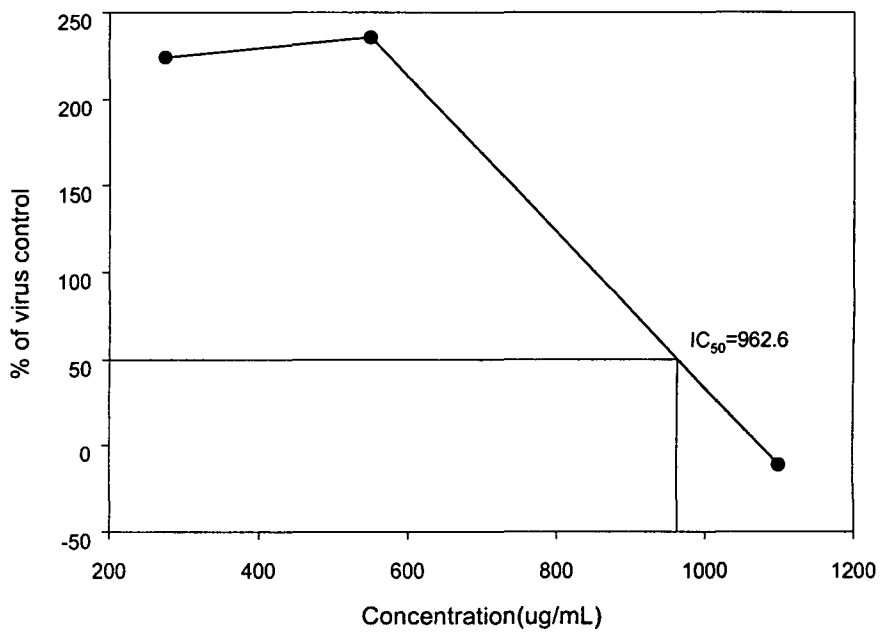


Fig. 8. Inhibitory effect of J6-31 fraction *Citrus junos* against influenza A virus by ELISA.

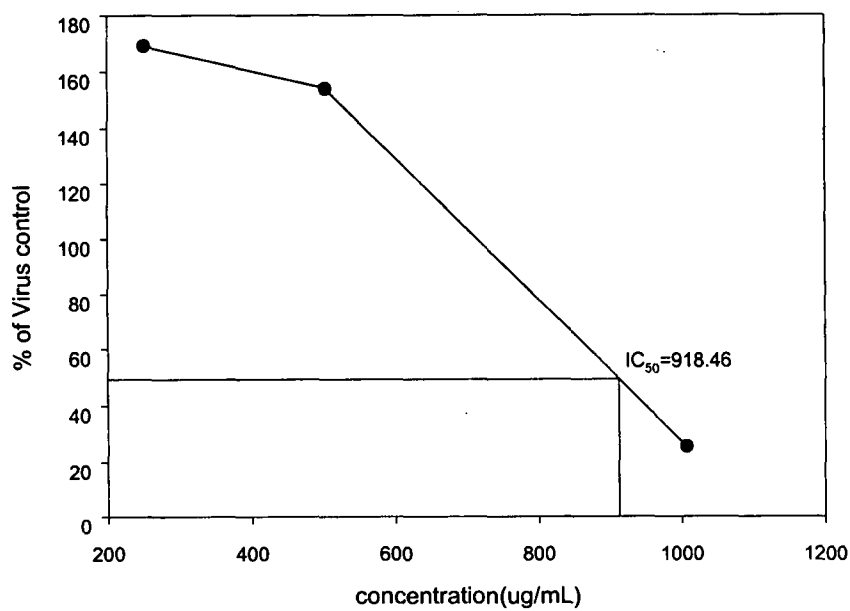


Fig. 9. Inhibitory effect of compound II isolated form *Citrus junos* against influenza A virus by ELISA.

제 4 절 참고문헌

- Carmichael, J., DeGraff, W. G., Gazdar, A. F., Minna, J. D., Mitchell, J. B./ Evaluation of tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: Assesment of chemosensitivity testing. *Cnacer Res.* 47: 9368. 1987.
- De Clercq E. 1990. New acquisitions in the chemotherapy of viral infections. *Verhandelingen Koninklijke Academie voor Geneeskunde van Belgie* 52: 69.
- Douglas R. G. (1990) Prophylaxis and treatment of influenza. *N. Engl. J. Med.* 322: 443.
- Frank A. L., Couchm R. B., Griffis C. A., Baxter B. D. (1979) Comparison of different tissue cultures for isolation and quantitation of influenza and parainfluenza viruses. *J Clin Microbiol.* 10:32~36.
- Gwaltney J. M., Jordan W. S. (1964) Rhinoviruses and respiratory disease. *Bacteriol Rev* 28:409~422.
- Haruki Yamata, Takayuki Nagai. 1998. In vivo antiinfluenza virus activity of kampo medicine Sho-Seiryu-to through mucosal immune system. *Meth Find Exp Clin Phamacol.* 20(3): 185-192.
- Hiroshi S., Minoru T., Yutaka K., Kyosuke N., Akira I., Masahiro U., Shoji Y. 1992. Anti-influenza virus activity of a lignin fraction from cone of *Pinus paraviflora* Sieb. et Zucc. *in vivo* 6: 491-496.
- Hu JM., Hsiung GD. 1989. Evaluation of new antiviral agents: I. *in vitro* perspectives. *Antiviral Res.* 11: 217.
- Kadir T., Kyosuke N., Avni K. 1996. Antiviral effect of *Sanicula europaea* L. Leaves extract on influenza virus-infected cells. *Biochem Biophy Re com.* 225, 22-26.
- Kilbourne, E. D. 1987. *Influenza*. New York : Plenum Medical Book Co.
- Kyosuke N., Hiroshi S., Hiroshi H., Meihan N., Akira I., Kunio K. 1990. Inhibition of influenza virus infection by pine cone antitumor substances. *Antiviral Res.* 13. 11-22.
- Lee CK. 1992. Present trends in the development of antiviral agents. *Pharma News* 2(1): 2.

- Lui, K. J., and Kendal, A. P. 1985. Impact of influenza epidemics on mortality in the United States from October 1972 to May 1985. *Am. J. Public Health*. 77: 712~716.
- Nagai T., Urata M., Yamada. 1996. In vivo antiinfluenza virus activity of kampo(japanese herbal) medicine "Sho-Seiryu-to" - effects on aged mice, against subtype of A viruses and B virus, and therapeutic effect. *Immuno Phama Immunotoxi*. 18(2), 193-208.
- Palese P., Young, J. F. (1982) Variation of influenza A, B and C viruses. *Science*, 215 : 1468
- Prusoff WH, Lin T-S, Zucker M. 1986. Potential targets for antiviral chemotherapy. *Antiviral Res* 6: 311.
- Smith T. F, Reichrath L(1974) Comparative recovery of 1972-1973 influenza virus isolates in embryonated eggs and primary rhesus monkey kidney cell cultures after one freeze-thaw cycle. *Am J Clin Pathol* 61: 579~584.
- Takayuki N., Yukiori M., Tsuyoshi T., Yujiro S., Haruki Y. 1992. Invivo anti-influenza virus activity of plant flavonoids possessing inhibitory activity for influenza virus sialidase. *Antiviral Res*, 19. 207-217
- Takayuki N., Haruki Y. 1994. In vivo antiinfluenza virus activity of kampo(japanese herbal) medicine "Sho-Seiryu-to" and its mode of action. *Int. J. immunopharmac*. 16(8) 605-613.
- Walker RT. 1988. Antiviral chemotherapy: an introduction and reasons for the slow progress, particularly toward rational design. In "Antiviral drug development" ed by De Clercq E and Walker RT. Pleum Press, New York and London: 1.
- WHO. Manual for rapid laboratory viral diagnosis. WHO offset publication No. 47. WHO Geneva. 1979.
- 대한바이러스 학회. 필수바이러스학. 1992.
- 국립보건원. 감염병실험실진단지침. 1996.
- 정재득, 고병섭, 이형환, 최환수, 박갑주. 한약처방(복합제)의 influenza virus type I 에 대한 항바이러스 활성 효과. *대한바이러스학회지* 26(2): 273-283. 1996.
- 최삼열 외 편집위원회. 예방의학과 공중보건, 계축문화사. 394. 1991.

제 3 장 항influenza 활성 성분 분리 및 구조 결정

제 1 절 서 설

influenza virus [A/Taiwan/1/86/(H1N1)] 에 대한 NP-97-1의 구성 한약재를 HIT법(적혈구응집억제법)에 의해서 항바이러스 활성을 측정한 결과 대추는 항바이러스 활성이 측정되지 않았고 유자(柚子)와 모과(木瓜)는 항바이러스 활성이 측정되어 유자와 모과에서 분리된 각 분획에 대한 항바이러스 효과를 적혈구응집억제법(HIT)으로 1차 검색한 후 in situ ELISA를 이용하여 생존하는 바이러스의 양을 백분율로 환산하여 측정한 결과 모과는 세포 독성이 강하게 측정되어 바이러스에 대한 직접적인 항바이러스 효과를 측정하기가 불가능하였고 유자에서 분리된 각 분획은 항바이러스 활성이 측정되어 활성지향적으로 분획을 하면서 활성 성분을 분리하였다.

유자나무 (*Citrus junos*, Rutaceae)는 중국원산이며 일본에도 분포하고 과수용(果樹用)으로 들여와 우리나라 제주도 및 남부지방 경상남도와 전라남도·남해·다도해 섬지방에서 해안지(海岸地) 및 인가부근(人家附近)에서 재식(栽殖)하는 귀화식물(歸化植物)이다. 상록관목으로서 높이가 4m에 달하며 가지가 길고 뾰족한 가시가 있다. 잎은 호생(互生)하고 긴 난상 타원형으로서 위로 올라갈수록 좁아지다가 끝이 다소 오목해지며 밑부분이 둔저(鈍底)이고 가장자리에 둔한 톱니가 있으며 엽병(葉柄)에 넓은 날개가 있다. 꽃은 엽액(葉腋)에 1대씩 달리고 때로는 밑으로 처지며 꽃받침과 꽃잎은 각각 5개이고 20개 정도의 수술은 5체(體) 또는 밑부분에서 통상(筒狀)으로 합쳐지며 환상의 화반(花盤)이 있다. 9~10월에 열매가 성숙되며 장과는 편구형(扁球形)이고 외피는 울퉁불퉁하며 황색으로 익으면 지름 4~7cm로 되고 향기가 있는 외피와 신맛이 강한 내부가 잘 떨어지고 중심부가 비어 있고 본속(本屬) 중 가장 추위에 강하다. 열매를 조미료로 사용하고 미숙과는 탕자(枳實)의 대용품으로서 약용한다. 유자의 성분에는 hesperidin, narirutin, naringin, neohesperidin, junosmarin, lutein, synephrine, terpinen-4-ol, α -terpineol, 7-O- [α -L-rhamnopyranosyl-(1-2)- α -L-rhamnopyranosyl-(1-6)- β

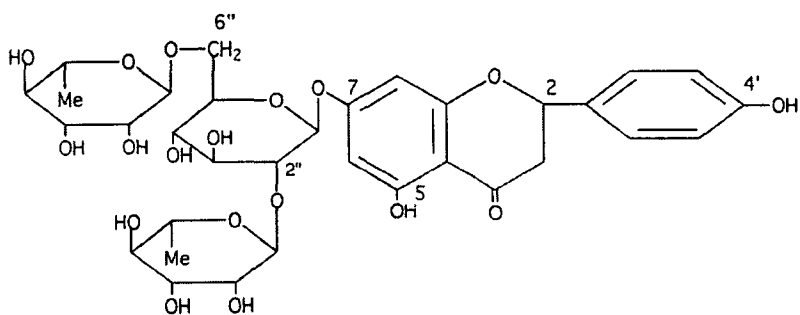
-D-glucopyranosyl] naringenin, violaxanthin, neoxanthin, α -pinene, β -pinene, germacrene D, geraniol, citronellal, linalool, ocimene, terpinolene, spathulenol, p-cymene, γ -terpinene, 1,3,11-elematriene 등이 있으며 약명은 유자(柚子), 산유자(山柚子)이며 속명은 향등(香橙), 해등(蟹橙), 감자(柑子), 산유자목(山柚子木), 향등유(香橙油)이고 식용·관상용에 쓰이고 열매를 음료용, 식용 및 제과용과 관상수로 심으며 한방과 민간에서 과피·과실·수피를 모세혈관강화·고미건위·지갈·진통·곽난·소화·활식·실성·교미·교취·화장·유방통·통유·진해·거담 등에 약재로 쓴다(이창복, 1980 ; 김태정, 1996 ; 이영노, 1996).

Citrus 속식물에 대한 연구에는 1974년 Jung은 유자에서 formic acid, acetic acid, propionic acid, n-valeric acid와 같은 nonvolatile acid 및 α -pinene, d-limonene, p-cymene의 3가지 aroma성분을 확인하였으며(Jung *et al*, 1974) 1987년 Lee 등은 유자와 유자차의 이화학적 특성, 향기성분, 유자씨의 지방산 조성을 분석하였다(Lee *et al*, 1987). 1989년 Ito 등은 *Citrus tamurana*와 *Citrus kinokuni*로부터 flavanone 신물질인 hiravanone과 yukovanol을 분리, 보고하였으며(Ito *et al*, 1989) 1991년 Matsuda 등은 *Citrus unshu*로부터 분리한 hesperidin이 type 1에 항알러지 작용이 있다고 보고하였고(Matsuda *et al*, 1991), 1994년 Emim 등은 Citrus 세포배양에서 얻은 hesperidin이 항염효과가 있다고 보고하였다(Emim *et al*, 1994). Citrus 속식물의 주성분인 hesperetin의 항바이러스 효과, hesperidin의 항염, 진통, 항산화, 콜레스테롤저하 작용, hesperetin과 naringenin의 *Helicobacter pylori*의 억제 효과를 비롯한 flavonoid의 활성화에 대한 많은 연구가 보고되고 있다. 1985년 Kaul 등은 flavonoid(quercetin, naringin, hesperetin, catechin)의 Herpes simplex virus type 1(HSV-1), polio-virus type 1, parainfluenza virus type 3(pf-3) 및 respiratory syncytial virus(RSV)에 대한 항바이러스 활성을 검색한 결과 quercetin은 바이러스의 감염과 복제를 억제시키며 hesperetin은 바이러스의 복제만 억제시키고 catechin은 바이러스의 감염만을 억제시키며 naringin은 바이러스의 감염과 복제 둘다 억제시키지 못한다고 보고하였다(Kaul *et al*, 1985). 1985년 Mucsi 등은

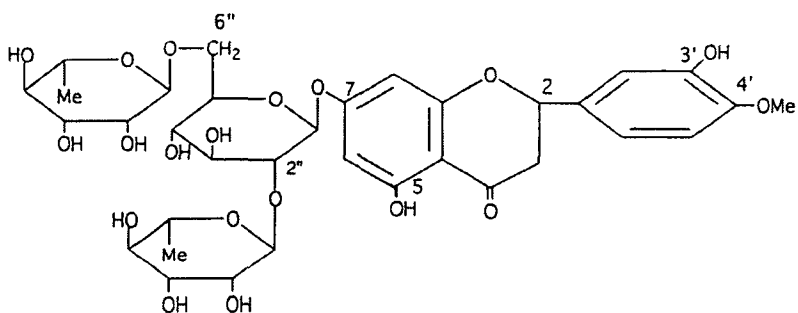
flavonoid가 바이러스의 증식과 cyclic AMP의 증가에 미치는 영향을 연구하였는데 quercetin과 quercitrin은 Human(alpha)herpesvirus 1(HSV-1)과 suid(alpha)herpesvirus 1(pseudo-rabies)의 증식을 억제시키고 cyclic AMP를 증가시켰지만 hesperidin과 rutin은 아무 영향이 없었으며 이런 결과를 통하여 항바이러스 효과는 cyclic AMP의 증가와 연관이 있다고 보고하였으며(Mucsi *et al*, 1985). 1988년 Ratty 등은 flavonoid의 구조에 따른 비효소성 지방 산화의 활성을 검색하였는데 aglycone이 배당체보다 항산화 활성이 강하였고 A, B ring의 hydroxyl기 치환, C-2,3의 이중결합, C-3의 hydroxyl기 치환 및 C-4의 keto체는 항산화 활성을 증가시킨다고 보고하였다(Ratty *et al*, 1988). 1994년 Okamura 등은 hesperidin이 항산화 효과가 강하다고 보고하였다(Okamura *et al*, 1994). 1994년 Galati 등은 hesperidin이 항염과 진통효과가 있다고 보고하였으며 1995년 Monforte 등은 hesperidin이 HDL cholesterol을 증가시키고 LDL cholesterol을 감소시키는 효과가 있다고 보고하였고(Monforte *et al*, 1995) Nagai 등은 1990년 *Scutellaia baicalenensis*의 뿌리로부터 분리한 5,7,4'-trihydroxy-8-methoxyflavone이 influenza virus의 sialidase를 억제하여 바이러스 감염을 억제한다고 보고하였으며 1992년에는 *Scutellaia baicalenensis*의 잎으로부터 분리한 isoscutellarein(5,7,8,4'-tetrahydroxyflavone)이 MDBK cell과 embryonated egg의 allantonic sac에 5,7,4'-trihydroxy-8-methoxyflavone보다 강력하게 influenza virus의 sialidase를 억제하여 항influenza 효과가 있다고 보고하였다(Nagai *et al*, 1990 ; 1992). 1990년 Nagata 등은 amantadine은 virus plaque 형성을 억제하지만 RNA polymerase의 활성을 억제시키지는 못하는데 *Pinus parviflora*의 산성 polysaccharide와 고분자 물질이 MDCK cell의 바이러스의 단백질 합성을 저해하고 RNA-dependent RNA polymerase의 활성을 억제함으로써 항암활성 뿐만 아니라 항influenza 효과가 있다고 보고하였으며(Nagata *et al*, 1990) 1991년 Harada 등은 *Pinus parviflora*의 고분자물질과 alkali-lignin이 항influenza A 활성을 나타낸다고 보고하였고(Harada *et al*, 1991) 1997년 Hammad 등은 rat에서 분리된 회장에 대해 11가지의 flavonoid의 활성을 검색하여 구조와 활성과의 관계를 밝혀 보고하였다(Hammad *et al*, 1997). 1998년 Berkarda 등은 hesperidin이

hesperidin이 7,12-dimethylbenz(a)anthracene에 의한 tumor의 유발은 억제시키지 못하지만 12-O-tetradecanoyl-13-phorbol에 의해서 tumor가 유발되는 것을 억제시킨다고 보고하였으며(Berkarda *et al*, 1998) 1999년 Bae 등은 hesperetin과 naringenin이 *Helicobacter pylori*를 억제한다고 보고하였다(Bae *et al*, 1999).

본 연구에서는 우수한 항influenza 활성이 확인된 유자(柚子)를 열수로 추출하고 감압 농축하여 얻은 엑스를 단계적으로 분획한 다음 각 분획의 항influenza 활성을 추적하면서 활성 지향적으로 각종 chromatography를 수행함으로써 4종류의 flavonoid 배당체를 분리하고 이들의 물리화학적 및 분광학적 분석 방법에 의하여 구조를 결정하였다. Compound I - IV의 물리 화학적 성상과 IR, FAB(-)MS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, ¹H-¹H COSY, ¹³C-¹H COSY, HMBC 등의 기기분석과 물리 화학적 소견을 종합하여 Compound I은 naringenin 7-O (2'', 6''-di-O- α -L-rhamnopyranosyl)- β -D-glucopyranoside, Compound II는 hesperetin 7-O (2'', 6''-di-O- α -L-rhamnopyranosyl)- β -D-glucopyranoside, Compound III는 hesperidin (hesperetin 7-O-rutinoside), Compound IV는 narirutin(naringenin 7-O-rutinoside)로 확인, 동정하였으며 이상의 flavonoid배당체 중에서 Compound I과 Compound II는 Citrus속에서 처음 분리한 물질이고, 특히 Compound I은 자연에서 처음으로 발견된 flavonoid물질이다. *In situ* ELISA의 방법으로 유자에서 분리한 flavonoid 배당체인 naringenin glycoside와 hesperetin glycoside의 influenza virus [A/Taiwan/1/86/(H1N1)]에 대한 항바이러스 활성을 측정한 결과 Compound II는 IC₅₀ 값이 918.46 μ l/ml으로 항바이러스 효과가 있었으며 Compound I, Compound III 및 Compound IV는 IC₅₀ 값이 >1,000 μ l/ml으로 항바이러스 활성이 측정되지 않았다. hesperetin triglycoside인 Compound II는 항바이러스 활성이 있었으나 hesperetin diglycoside(hesperidin)인 Compound III는 활성이 측정되지 않아 glucose 2번에 결합되어 있는 rhamnose가 항바이러스 효과를 증가시킨다는 것을 알 수 있었고 또한, naringenin triglycoside인 Compound II는 활성이 측정되지 않아 hesperetin B ring의 C-4'에 결합되어 있는 methoxy기가 항바이러스 효과를 증가시킨다는 것을 확인 할 수 있어 항바이러스 활성과 flavonoid 배당체구조와의 상관관계를 알 수 있었다.

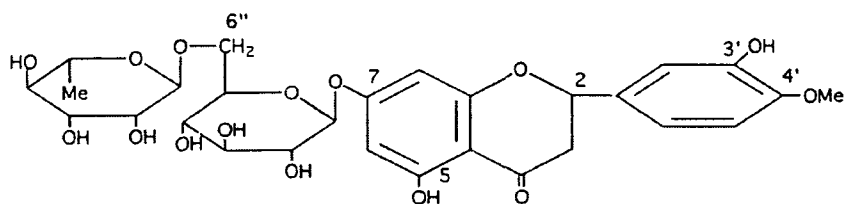


Compound I :
Naringenin 7-O(2'', 6''-di-O- α -L-rhamnopyranosyl)- β -D-glucopyranoside

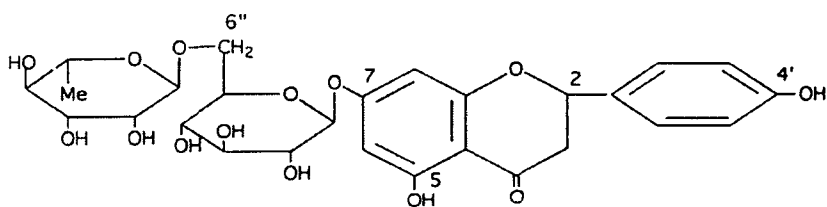


Compound II :
Hesperetin 7-O(2'', 6''-di-O- α -L-rhamnopyranosyl)- β -D-glucopyranoside

Fig. 1 The structures of compound I-II



Compound III : Hesperidin(hesperetin 7-*O*-rutinoside)



Compound IV : Narirutin(naringenin 7-*O*-rutinoside)

Fig. II The structures of compound III-IV

제 2 절 재료 및 방법

HIT법(적혈구응집억제법)에 의해서 influenza virus [A/Taiwan/1/86/(H1N1)] 에 대한 97-NP-1의 항바이러스 활성을 측정한 결과 유자(柚子)에서 항바이러스 활성이 측정되어 유자에서 분리된 각 분획에 대한 항바이러스 효과를 적혈구응집억제법(HIT)으로 1차 검색한 후 in situ ELISA를 이용하여 생존하는 바이러스의 양을 백분율로 환산하여 측정한 결과를 바탕으로 그 유효 성분 분리 및 구조 결정을 하였다.

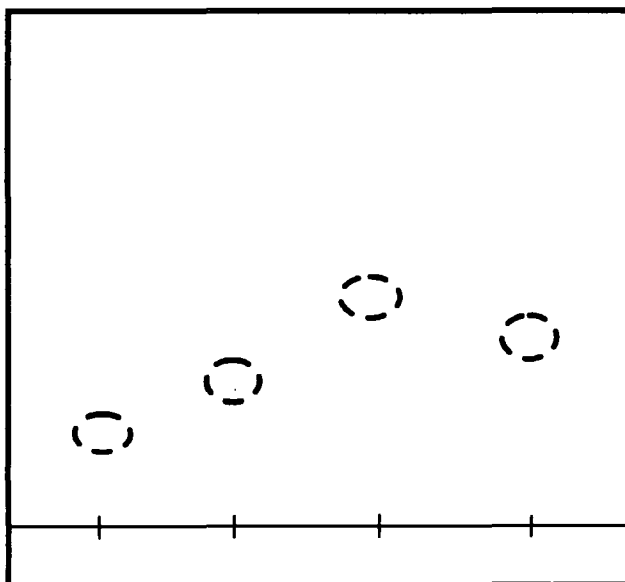
1. 시료의 채집

실험재료로 사용한 유자(柚子)는 전남 고흥 유자시험장에서 채취한 후 절단하여 신선한 상태로 사용하였다.

2. 추출, 분획 및 성분 분리

유자나무의 열매, 유자(柚子)를 실험재료로 사용하였다. 유자(柚子)를 열수로 2회 반복 추출한 후 저온에서 감압농축하여 엑스 279.8g을 얻은 후 활성을 검색한 결과 항 influenza 효과가 있었다. Scheme 1의 방법에 따라 유자 열수 엑스를 물에 현탁시킨 후 MeOH을 증량시켜 극성을 변화시키면서 Amberlite XAD-4 gel을 사용한 column chromatography를 실시하여 H₂O, 20% MeOH, 40% MeOH, 60% MeOH, 80% MeOH 및 100% MeOH fraction으로 나누어 각 분획에 대한 항바이러스 효과를 적혈구응집억제법(HIT)

으로 1차 검색한 결과 40% MeOH과 60% MeOH 분획에서 활성이 측정되었으며 이 분획들에 대하여 in situ ELISA를 이용하여 활성을 측정한 결과 40% MeOH 분획에서는 세포독성이 강하게 측정되어 바이러스에 대한 직접적인 항바이러스 효과를 측정하기가 불가능하였다. 60% MeOH 분획(7.8 mg)은 항바이러스 활성이 강하게 나타나 Sephadex LH-20과 50% MeOH를 이용한 column chromatography를 실시하여 J6-1에서 J6-6까지 6개의 분획으로 나누었으며 이 분획들 중에서 활성이 있는 J6-3 분획(824.8 mg)을 ODS column chromatography(50% MeOH)를 실시하여 J6-31에서 J6-32까지 2개의 분획으로 나누었고 다시 활성이 있는 J6-31 분획(693.0 mg)을 ODS column chromatography(40% MeOH)를 실시하여 J6-311에서 J6-315까지 5개의 분획으로 나누었으며 이들 분획 중에서 J6-313 분획(284.4 mg)과 J6-315 분획(192.2 mg)을 Silica gel column chromatography(C:M:W=70:30:4)를 실시하여 각각에서 Compound I(134.1 mg) 및 Compound II(162.0 mg)를 분리하였다. 또한, J6-4 분획(108.0 mg)은 Sephadex LH-20과 60% MeOH를 이용한 column chromatography를 실시하여 Compound III(92.0 mg)를 분리하였고, J6-5 분획(1.2 g)은 Sephadex LH-20과 60% MeOH를 이용한 column chromatography를 실시하여 J6-51과 J6-52 분획으로 나눈후 J6-52 분획(1.1g)을 ODS column chromatography(50% MeOH)를 실시하여 Compound IV(727.2 mg)를 분리하였다.



Compound I Compound II Compound III Compound IV

* TLC solvent

$\text{CHCl}_3 : \text{MeOH} : \text{H}_2\text{O} = 70 : 30 : 4$

* Spray reagent : 10% H_2SO_4

* Compound I : $R_f = 0.24$

Compound II : $R_f = 0.38$

Compound III : $R_f = 0.46$

Compound IV : $R_f = 0.4$

Fig.I Thin layer chromatogram of Compound I-IV

3. 기기

- ① IR Spectropotometer : Bruker IFS 48, KBr(Germany)
- ② FAB(-)MS Spectrometer : VG70-VSEQ(England)
 - FAB Source : ionized by 35keV Cs⁺ ion beam
 - Matrix : Glycerol
- ③ ¹H-NMR Spectrometer : Bruker AM-500, 500 MHz(Germany)
 - Bruker AM-200, 200 MHz(Germany)
 - Spectral width : 3,500 Hz
 - Internal standard : TMS
 - Room temperature
- ④ ¹³C-NMR Spectrometer : Bruker AM-500, 125 MHz(Germany)
 - Bruker AM-200, 50 MHz(Germany)
 - Spectral width : 3,500 Hz
 - Internal standard : TMS
 - Room temperature

4. 단일물질의 기기 분석

가. Compound I의 기기 분석

IR ν^{KBr} cm^{-1} : 3362(OH), 2917(C-H), 1636(C=O), 1576, 1456(C=C), 1519(C-C),
max 1179, 1136(C-O), 1064 (glycosidic O), 835 (aromatic ring) cm^{-1}

(Fig. 1-1)

FAB(-)Mass(m/z) : 725[M-H]⁻, 579[M-(rha+H)]⁻, 271[M-(glc+rha+rha+H)]⁻ :

(Fig. 1-2)

¹H-NMR(CD₃OD) : δ 1.19 (3H, *d*, *J* = 6.2 Hz, H-6'''''), 1.29 (3H, *d*, *J* = 6.2 Hz, H-6'''), 2.75 (1H, *dd*, *J* = 17.2, 3.0 Hz, H-3), 3.15 (1H, *dd*, *J* = 17.2, 12.6 Hz, H-3), 4.69 (1H, *s*, rha1 anomeric-H), 5.06 (1H, *dd*, *J* = 10.5, 7.5 Hz, glc anomeric-H), 5.25 (1H, *dd*, *J* = 4.7, 1.5 Hz, rha2 anomeric-H), 5.37 (1H, *dd*, *J* = 12.5, 2.9 Hz, H-2), 6.14 (1H, *d*, *J* = 2.1 Hz, H-6), 6.17 (1H, *d*, *J* = 1.9 Hz, H-8), 6.83 (2H, *d*, *J* = 8.6 Hz, H-3', 5'), 7.32 (2H, *d*, *J* = 8.6 Hz, H-2', 6') : (Fig. 1-3)

¹³C-NMR(CD₃OD) : (Fig. 1-4)

나. Compound II의 기기 분석

IR ν^{KBr}cm⁻¹ : 3308(OH), 2917(C-H), 1644(C=O), 1606, 1445(C=C), 1519(C-C)

max 1273, 1134(C-O), 1070 (glycosidic O), 810 (aromatic ring)cm⁻¹ ;

(Fig. 2-1)

FAB(-)Mass(m/z) : 755[M-H]⁻, 725[M-(MeO+H)]⁻, 609[M-(rha+H)]⁻,

301[M-(glc+rha+rha+H)]⁻ : (Fig. 2-2)

¹H-NMR(CD₃OD) : δ 1.19 (3H, *d*, *J* = 6.2 Hz, H-6'''''), 1.29 (3H, *d*, *J* = 6.2 Hz, H-6'''), 2.78 (1H, *dd*, *J* = 17.6, 3.2 Hz, H-3), 3.11 (1H, *dd*, *J* = 17.2, 12.4 Hz, H-3), 3.86 (3H, *s*, MeO), 4.69 (1H, *dd*, *J* = 3.3, 1.5 Hz, rha1 anomeric-H), 5.06 (1H, *t*, *J* = 8.5 Hz, glc anomeric-H), 5.25 (1H, *dd*, *J* = 4.2, 1.6 Hz, rha2 anomeric-H), 5.37 (1H, *dd*, *J* = 13.3, 3.0 Hz, H-2), 6.15 (1H, *d*, *J* = 2.3 Hz,

H-6), 6.17 (1H, *d*, *J* = 2.3 Hz, H-8), 6.92 (1H, *d*, *J* = 8.6 Hz, H-5'), 6.93 (1H, *dd*, *J* = 8.6, 1.7 Hz, H-6'), 6.98 (1H, *dd*, *J* = 1.8 Hz, H-2') ; (Fig. 2-3)

$^{13}\text{C-NMR}(\text{CD}_3\text{OD})$: (Fig. 2-4)

다. Compound III의 기기 분석

IR $\nu^{\text{KBr}}\text{cm}^{-1}$: 3474(OH), 2917(C-H), 1647(C=O), 1606, 1444(C=C), 1519(C-C),
max 1183, 1132(C-O), 1069 (glycosidic O), 972, 815 (aromatic ring)
 cm^{-1} : (Fig. 3-1)

FAB(-)Mass(*m/z*) : 609[M-H]⁻, 571[M-(MeO+H)]⁻, 301[M-(glc+rha+H)]⁻; (Fig. 3-2)

$^1\text{H-NMR}(\text{CD}_3\text{OD})$: δ 1.02 (3H, *dd*, *J* = 6.2, 2.8 Hz, H-6'''), 3.71 (3H, *s*, MeO),
4.46 (1H, *s*, rha anomeric - H), 4.91 (1H, *t*, *J* = 7.2 Hz, glc anomeric-H),
5.42 (1H, *dd*, *J* = 8.4, 13.1 Hz, H-2), 6.05 (1H, *s*, H-8), 6.08 (1H, *s*, H-6),
6.85 (1H, *dd*, *J* = 8.5, 2.2 Hz, H-6'), 6.87 (1H, *d*, *J* = 2.2 Hz, H-2'),
6.88 (1H, *d*, *J* = 8.3 Hz, H-5') : (Fig. 3-3)

$^{13}\text{C-NMR}(\text{CD}_3\text{OD})$: (Fig. 3-4)

라. Compound IV의 기기 분석

IR $\nu^{\text{KBr}}\text{cm}^{-1}$: 3393(OH), 2917(C-H), 1644(C=O), 1575, 1444(C=C), 1519(C-C),
max 1176, 1136(C-O), 1064 (glycosidic O), 835 (aromatic ring) cm^{-1} :
(Fig. 4-1)

FAB(-)Mass(m/z) : 579[M-H]⁻, 271[M-(glc+rha+H)]⁻; (Fig. 4-2)

¹H-NMR(CD₃OD) : δ 1.29 (3H, *d*, *J* = 6.2 Hz, H-6'''), 2.73 (1H, *dd*, *J* = 17.2, 3.0 Hz, H-3), 3.42 (1H, *dd*, *J* = 17.2, 12.7 Hz, H-3), 4.70 (1H, *s*, rha anomeric-H), 5.35 (1H, *dd*, *J* = 12.7, 3.2 Hz, H-2), 6.15 (1H, *d*, *J* = 2.2 Hz, H-6), 6.20 (1H, *d*, *J* = 1.9 Hz, H-8), 6.82 (2H, *d*, *J* = 8.6 Hz, H-3', 5'), 7.28 (1H, *t*, *J* = 7.3 Hz, glc anomeric-H), 7.31 (2H, *d*, *J* = 8.4 Hz, H-2', 6') ; (Fig. 4-3)

¹³C-NMR(CD₃OD) : (Fig. 4-4)

제 3 절 연구 내용 및 결과

1. 연구 내용

가. Compound I의 구조결정

Compound I는 담황색 분말상 결정으로 FeCl_3 반응과 $\text{Mg}+\text{HCl}$ 반응에 양성이며, IR spectrum에서 3362(OH), 2917(C-H), 1636(C=O), 1576, 1456(C=C), 1519(C-C), 1179, 1136(C-O), 1064 (glycosidic O), 835 (aromatic ring) cm^{-1} 등의 강한 흡수대를 관찰할 수 있어 flavonoid계 배당체임을 추정할 수 있었다.

FAB(-)MS spectrum에서는 m/z 725에서 $[\text{M}-\text{H}]^-$ molecular ion peak를, m/z 579에서 rhamnose가 탈락된 fragment ion peak, m/z 271에서 rhamnose와 glucose가 탈락된 fragment ion peak를 관찰할 수 있었다.

$^1\text{H-NMR}$ spectrum에서 δ 1.19, 1.29 ppm에서 rhamnose의 angular methyl signal이 doublet($J=6.2$ Hz)으로 관찰되며 δ 4.69 및 δ 5.25 ppm에서 rhamnose의 anomer proton에 기인하는 signal이 각각 singlet과 double doublet($J=4.7, 1.5$ Hz)으로 관찰되고 있고, glucose의 anomeric proton에 해당하는 signal이 δ 5.06 ppm에서 double doublet($J=10.5, 7.5$ Hz)으로 나타나고 있음을 알 수 있었다.

또한, aglycone A ring의 H-6, H-8에 해당하는 signal이 δ 6.14, δ 6.17 ppm에서 각각 doublet($J=2.1$ Hz, $J=1.9$ Hz)으로 나타나 meta coupling하는 것을 관찰할 수 있었고 B ring의 H-3', H-5' 와 H-2', H-6'에 해당하는 signal이 각각 δ 6.83, 및 δ 7.32 ppm에서 doublet($J=8.6$ Hz)으로 관찰되고 있어 ortho coupling하는 것을 확인할 수 있었다.

$^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서는 naringenin과 비교했을 때 C-6, C-8 carbon이 각각 저자장 shift되고 C-7이 고자장 shift하는 것으로 보아 C-7에 당이 치환되어 glycosylation shift가 일어난 것을 확인할 수 있었고, δ 158.9 ppm에서 B ring의

C-4' signal이 관찰되어 proton이 치환되어 있음을 알 수 있었다.

또한, δ 116.4(2C), δ 129.1(2C) ppm에서 B ring의 C-3', C-5' 와 C-2', C-6' signal이 관찰되었고, δ 99.4, 102.0 및 δ 102.5 ppm에서 glucose와 rhamnose의 anomeric carbon에 해당하는 signal을 관찰할 수 있었으며 δ 1.19 및 1.29 ppm에서는 rhamnose의 C-6에 해당하는 signal을 확인할 수 있었다. 한편, δ 67.3 ppm에서 δ 79.1 ppm에 이르는 당으로부터 기인하는 signal들을 관찰할 수 있었으며, 특히 저자장 shift된 δ 67.3 ppm signal을 관찰할 수 있어 glucose C-6에 rhamnose가 결합되어 있음을 추정할 수 있었고, δ 79.1 ppm으로 저자장 shift되어 나타나는 당에서 기인하는 signal로 보아 또 하나의 rhamnose가 결합되어 있음을 추정할 수 있었다.

그리고, ^{13}C - ^1H COSY spectrum, ^1H - ^1H COSY spectrum으로 당의 anomeric carbon 및 proton을 각각 귀속시켰으며, HMBC(^1H -Detected Multiple-bond Heteronuclear Multiple Quantum Coherence Spectrum)의 NMR기법을 이용하여 분석한 결과 δ 5.06 ppm의 glucose anomer proton이 δ 166.4 ppm signal과 coupling하고 있어 C-7에 glucose가 결합되어 있음을 알 수 있었고 δ 4.69 ppm의 rhamnose anomer proton이 δ 67.3 ppm signal과 coupling하고 있어 C-6"에 rhamnose가 결합되어 있음을 확인할 수 있었다. 또한, δ 5.25 ppm의 rhamnose anomer proton이 δ 79.1 ppm signal과 coupling하고 있어 C-2"에 rhamnose가 결합되어 있음을 확인할 수 있어 Compound I을 naringenin의 C-7의 OH에 glucose가, glucose C-2에 rhamnose가 그리고 glucose C-6에 rhamnose가 결합되어 있는 naringenin triglycoside로 추정하였다.

이상의 기기분석 결과로 Compound I은 분자식 $\text{C}_{33}\text{H}_{42}\text{O}_{18}$ 인 naringenin 7-O (2", 6"-di-O- α -L-rhamnopyranosyl)- β -D-glucopyranoside로 확인, 동정하였으며 자연에서 처음으로 발견된 flavonoid물질이다.

Table 1. ^{13}C -NMR data of Compound I

Carbon No.	Compound I (CD_3OD)
Aglycone	
2	80.5
3	44.0
4	198.5
5	164.9
6	97.9
7	166.4
8	97.0
9	164.5
10	105.0
1'	130.8
2'	129.1
3'	116.4
4'	158.9
5'	116.4
6'	129.1
Glucose	
1''	99.4
2''	79.1
3''	76.9
4''	72.3
5''	79.0
6''	67.3
rhamnose 1	
1'''	102.0
2'''	72.1
3'''	72.0
4'''	74.1
5'''	69.7
6'''	18.2
rhamnose 2	
1''''	102.5
2''''	72.1
3''''	71.4
4''''	73.9
5''''	69.9
6''''	17.9

나. Compound II의 구조결정

Compound II는 담황색 분말상 결정으로 FeCl_3 반응과 $\text{Mg}+\text{HCl}$ 반응에 양성이며, IR spectrum에서 3308(OH), 2917(C-H), 1644(C=O), 1606, 1445(C=C), 1273, 1134(C-O), 1070 (glycosidic O), 810 (aromatic ring) cm^{-1} 등의 강한 흡수대를 나타내는 것으로 보아 flavonoid계 화합물로 추정되었다.

또한, FAB(-)MS spectrum에서는 m/z 755에서 $[\text{M}-\text{H}]^-$ molecular ion peak, m/z 725에서 methoxyl기가 탈락된 fragment ion peak를 관찰할 수 있었고 m/z 609에서 rhamnose가 탈락된 fragment ion peak, m/z 301에서 rhamnose와 glucose가 탈락된 fragment ion peak를 관찰할 수 있었다.

$^1\text{H-NMR}$ spectrum에서 δ 1.19, δ 1.29 ppm에서 rhamnose의 angular methyl signal이 doublet($J=6.2$ Hz)으로 관찰되며 δ 3.86 ppm에서 methoxyl기에 기인하는 signal이 singlet으로 관찰되었다. δ 4.69 및 δ 5.25 ppm에서 rhamnose의 anomer proton에 기인하는 signal이 각각 double doublet($J=3.3, 1.5$ Hz, $J=4.2, 1.6$ Hz)으로 관찰되고 있고, glucose의 anomeric proton에 해당하는 signal이 δ 5.06 ppm에서 triplet($J=8.5$ Hz)으로 나타나고 있음을 알 수 있었다.

또한, aglycone A ring의 H-6, H-8에 해당하는 proton signal이 δ 6.15, δ 6.17 ppm에서 doublet($J=2.3$ Hz)으로 나타나 meta coupling하는 것을 관찰할 수 있었고 B ring의 H-5'에 해당하는 signal이 δ 6.92 ppm에서 doublet($J=8.6$ Hz)으로 나타나며 H-6'에 해당하는 signal이 δ 6.93 ppm에서 double doublet($J=8.6, 1.7$ Hz)으로 관찰되고 H-2'에 해당하는 signal이 δ 6.98 ppm에서 doublet($J=8.6, 1.8$ Hz)으로 관찰되었다.

$^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서는 hesperetin과 비교했을 때 C-6, C-8 carbon이 각각 저자장 shift되고 C-7이 고자장 shif하는 것으로 보아 C-7에 당이 치환되어 glycosylation shift가 일어난 것을 확인할 수 있었고, δ 147.7 및 149.4 ppm에서 B ring의 C-3'와 C-4' signal이 관찰되어 proton이 치환되어 있음을 알 수 있었다.

또한, δ 56.5 ppm에서 methoxyl carbon이 관찰되었으며 δ 112.8, δ 119.1 ppm

및 δ 114.7 ppm에서 B ring의 C5', C-6' 와 C-2' signal이 관찰되었고, δ 99.4, 102.1 및 δ 102.5 ppm에서 glucose와 rhamnose의 anomeric carbon에 해당하는 signal을 관찰할 수 있었으며 δ 1.19 및 1.29 ppm에서는 rhamnose의 C-6에 해당하는 signal을 확인할 수 있었다. 한편, δ 67.4 ppm에서 δ 79.1 ppm에 이르는 당으로부터 기인하는 signal들을 관찰할 수 있었으며, 특히 저자장 shift된 δ 67.4 ppm signal을 관찰할 수 있어 glucose C-6에 rhamnose가 결합되어 있음을 추정할 수 있었고, δ 79.1 ppm으로 저자장 shift되어 나타나는 당에서 기인하는 signal로 보아 또 하나의 rhamnose가 결합되어 있음을 추정할 수 있었다.

그리고, ^{13}C - ^1H COSY spectrum, ^1H - ^1H COSY spectrum으로 당의 anomeric carbon 및 proton을 각각 귀속시켰으며, HMBC(^1H -Detected Multiple-bond Heteronuclear Multiple Quantum Coherence Spectrum)의 NMR기법을 이용하여 분석한 결과 δ 5.06 ppm의 glucose anomer proton이 δ 166.4 ppm signal과 coupling하고 있어 C-7에 glucose가 결합되어 있음을 알 수 있었고 δ 4.69 ppm의 rhamnose anomer proton이 δ 67.4 ppm signal과 coupling하고 있어 C-6"에 rhamnose가 결합되어 있음을 확인할 수 있었다. 또한, δ 5.25 ppm의 rhamnose anomer proton이 δ 79.1 ppm signal과 coupling하고 있어 C-2"에 rhamnose가 결합되어 있음을 확인할 수 있었다. 또한, Aromatic field의 HMBC spectrum에서 δ 3.86 ppm의 methoxyl proton이 δ 149.4 ppm signal과 coupling하고 있어 methoxyl이 C-4'에 결합되어 있음을 확인할 수 있어 Compound I을 hesperetin의 C-7의 OH에 glucose가, glucose C-2에 rhamnose가 그리고 glucose C-6에 rhamnose가 결합되어 있는 hesperetin triglycoside로 추정하였다.

이상의 기기분석 결과와 문헌(Emam *et al*, 1998)과의 비교로 Compound II는 분자식 $\text{C}_{34}\text{H}_{44}\text{O}_{19}$ 인 hesperetin 7-O (2", 6"-di-O- α -L-rhamnopyranosyl)- β -D-gluco-pyranoside로 확인, 동정하였으며 Citrus속에서 처음 분리한 flavonoid 물질이다.

Table 2. ¹³C-NMR data of Compound II

Carbon No.	Hesperetin-7-O(2'',6''-di-O- α -L-rhamnopyranosyl)- β -D-glucopyranoside (CD ₃ OD) (Emam <i>et al.</i> , 1998)	Compound II (CD ₃ OD)
Aglycone		
2	80.36	80.4
3	44.07	44.1
4	198.26	198.2
5	164.38	164.9
6	96.91	97.9
7	166.48	166.4
8	97.92	96.9
9	165.19	164.4
10	105.06	105.0
1'	132.91	132.8
2'	114.68	114.7
3'	147.79	174.7
4'	149.42	149.4
5'	112.63	112.8
6'	119.13	119.1
OCH ₃	56.45	56.5
Glucose		
1''	99.38	99.4
2''	78.97	79.1
3''	77.01	77.0
4''	72.37	72.4
5''	79.04	79.0
6''	67.35	67.4
rhamnose 1		
1'''	102.13	102.1
2'''	72.18	72.1
3'''	72.04	72.0
4'''	74.14	74.1
5'''	69.98	69.7
6'''	18.24	18.2
rhamnose 2		
1''''	102.51	102.5
2''''	72.18	72.1
3''''	71.45	71.4
4''''	73.93	73.9
5''''	69.78	69.9
6''''	17.91	17.8

다. Compound III의 구조결정

Compound III는 담황색 분말상 결정으로 FeCl₃ 반응과 Mg+HCl 반응에 양성이며, IR spectrum에서 3474(OH), 2917(C-H), 1647(C=O), 1606, 1444(C=C), 1519(C-C), 1183, 1132(C-O), 1069 (glycosidic O), 972, 815 (aromatic ring) cm⁻¹ 등의 흡수대를 나타내는 것으로 보아 flavonoid계 화합물로 추정되었다.

또한, FAB(-)MS spectrum에서는 *m/z* 609에서 [M-H]⁻ molecular ion peak, *m/z* 579에서 methoxyl기가 탈락된 fragment ion peak, *m/z* 301에서 rhamnose와 glucose가 탈락된 fragment ion peak를 관찰할 수 있었다.

¹H-NMR spectrum에서 δ 1.02 ppm에서 rhamnose의 angular methyl signal이 double doublet(*J*=6.2 Hz)으로 관찰되며 δ 3.71 ppm에서 methoxyl기에 기인하는 signal이 singlet으로 관찰되었고 δ 4.46 ppm에서 rhamnose의 anomer proton에 기인하는 signal이 singlet으로 나타나고 δ 4.91 ppm에서 glucose의 anomeric proton signal이 triplet(*J*=7.2 Hz)으로 관찰되었다.

또한, aglycone A ring의 H-6, H-8에 해당하는 proton signal이 δ 6.05, δ 6.08 ppm에서 각각 singlet으로 관찰되며 B ring의 H-6'에 해당하는 signal이 δ 6.85 ppm에서 double doublet(*J*=8.5, 2.2 Hz)으로 나타나며 H-2'에 해당하는 signal이 δ 6.87 ppm에서 doublet(*J*= 2.2 Hz)으로 관찰되고 H-5'에 해당하는 signal이 δ 6.88 ppm에서 doublet(*J*=8.3 Hz)으로 관찰되었다.

¹³C-NMR spectrum에서는 hesperetin과 비교했을 때 C-6, C-8 carbon이 각각 저자장 shift되고 C-7이 고자장 shif하는 것으로 보아 C-7에 당이 치환되어 glycosylation shift가 일어난 것을 확인할 수 있었고, δ 146.6 및 148.1 ppm에서 B ring의 C-3'와 C-4' signal이 관찰되어 proton이 치환되어 있음을 알 수 있었다.

또한, δ 55.8 ppm에서 methoxyl carbon이 관찰되었으며 δ 112.2, δ 118.0 ppm 및 δ 114.2 ppm에서 B ring의 C5', C-6'와 C-2' signal이 관찰되었고, δ 99.6 및 δ 100.7 ppm에서 glucose와 rhamnose의 anomeric carbon에 해당하는 signal을 관찰할 수 있었으며 δ 1.02 ppm에서는 rhamnose의 C-6에 해당하는 signal을 확인

할 수 있었다. 한편, δ 66.1 ppm에서 δ 76.4 ppm에 이르는 당으로부터 기인하는 signal들을 관찰할 수 있었으며, 특히 저자장 shift된 δ 66.1 ppm signal을 관찰할 수 있어 glucose C-6에 rhamnose가 결합되어 있음을 추정할 수 있었다.

그리고, ^{13}C - ^1H COSY spectrum, ^1H - ^1H COSY spectrum으로 당의 anomeric carbon 및 proton을 각각 귀속시켰으며, HMBC(^1H -Detected Multiple-bond Heteronuclear Multiple Quantum Coherence Spectrum)의 NMR기법을 이용하여 분석한 결과 δ 4.91 ppm의 glucose anomer proton이 δ 165.2 ppm signal과 coupling하고 있어 C-7에 glucose가 결합되어 있음을 알 수 있었고 δ 4.46 ppm의 rhamnose anomer proton이 δ 66.1 ppm signal과 coupling하고 있어 C-6"에 rhamnose가 결합되어 있음을 확인할 수 있었다. 또한, Aromatic field의 HMBC spectrum에서 δ 3.71 ppm의 methoxyl proton이 δ 148.1 ppm signal과 coupling하고 있어 methoxyl이 C-4'에 결합되어 있음을 확인할 수 있어 Compound III를 hesperetin의 C-7의 OH에 glucose가 결합되어 있고 그리고 glucose C-6에 rhamnose가 결합되어 있는 hesperetin diglycoside로 추정하였다.

이상의 기기분석 결과와 문헌(Agrawal, 1989 ; Harborne, 1982)과의 비교로 Compound III는 분자식 $\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{O}_{15}$ 인 heperidin (hesperetin 7-*O*-rutinoside)로 확인, 동정하였다.

Table 3. ^{13}C -NMR data of Compound III

Carbon No.	Hesperidin (hesperetin-7-0-rutinoside) (DNSO- d_6) (Agrawal, 1989 ; Harborne, 1982)	Compound III (DNSO- d_6)
Aglycone		
2	78.1	78.4
3	42.0	42.1
4	196.4	197.0
5	162.3	163.1
6	96.1	96.5
7	164.6	165.2
8	95.4	95.6
9	162.0	162.6
10	103.0	103.4
1'	130.4	131.0
2'	113.6	114.2
3'	145.8	146.6
4'	147.6	148.1
5'	111.7	112.2
6'	117.9	118.0
OCH ₃	55.5	55.8
Glucose		
1''	99.2	99.6
2''	72.6	73.1
3''	75.7	76.4
4''	70.3	69.7
5''	75.2	75.6
6''	65.7	66.1
rhamnose		
1'''	100.2	100.7
2'''	69.9	70.4
3'''	69.3	70.8
4'''	71.7	72.2
5'''	75.2	68.4
6'''	17.9	17.9

라. Compound IV의 구조결정

Compound IV는 담황색 분말상 결정으로 FeCl₃ 반응과 Mg+HCl 반응에 양성이며, IR spectrum에서 3393(OH), 2917(C-H), 1644(C=O), 1575, 1455(C=C), 1519(C-C), 1176, 1136(C-O), 1064 (glycosidic O), 835 (aromatic ring)cm⁻¹ 등의 강한 흡수대를 나타내는 것으로 보아 flavonoid계 화합물로 추정되었다.

또한, FAB(-)MS spectrum에서는 *m/z* 579에서 [M-H]⁻ molecular ion peak, *m/z* 433에서 rhamnose가 탈락된 fragment ion peak, *m/z* 271에서 glucose가 탈락된 fragment ion peak를 관찰할 수 있었다.

¹H-NMR spectrum에서 δ 1.29 ppm에서 rhamnose의 angular methyl signal이 doublet(*J*=6.2 Hz)으로 관찰되며 δ 4.70 ppm에서 rhamnose의 anomer proton에 해당하는 signal이 singlet으로 관찰되고 있고, glucose의 anomeric proton에 해당하는 signal이 δ 4.94 ppm에서 double doublet(*J*=10.5, 7.5 Hz)으로 나타나고 있음을 알 수 있었다.

또한, aglcone A ring의 H-6, H-8에 해당하는 signal이 δ 6.15, 과 δ 6.20 ppm에서 각각 doublet(*J*=2.2 Hz, *J*=1.9 Hz)으로 나타나 meta coupling하는 것을 관찰할 수 있었고 B ring의 H-3', H-5' 와 H-2', H-6'에 해당하는 signal이 각각 δ 6.82 및 δ 7.31 ppm에서 각각 doublet(*J*=8.6 Hz, *J*=8.4 Hz)으로 관찰되고 있어 ortho coupling하는 것을 확인할 수 있었다.

¹³C-NMR spectrum에서는 naringenin과 비교했을 때 C-6, C-8 carbon이 각각 저자장 shift되고 C-7이 고자장 shift하는 것으로 보아 C-7에 당이 치환되어 glycosylation shift가 일어난 것을 확인할 수 있었고, δ 158.9 ppm에서 B ring의 C-4' signal이 관찰되어 proton이 치환되어 있음을 알 수 있었으며 δ 99.4, 102.0 및 δ 102.5 ppm에서 glucose와 rhamnose의 anomeric carbon에 해당하는 signal을 관찰할 수 있었다.

또한, δ 116.4(2C), δ 129.1(2C) ppm에서 B ring의 C-3', C-5' 와 C-2', C-6' signal이 관찰되었고, δ 101.1 및 δ 102.1 ppm에서 glucose와 rhamnose의 anomeric carbon에 해당하는 signal을 관찰할 수 있었으며 δ 1.29 ppm에서는

rhamnose의 C-6에 해당하는 signal을 확인할 수 있었다. 한편, δ 67.4 ppm에서 δ 77.8 ppm에 이르는 당으로부터 기인하는 signal들을 관찰할 수 있었으며, 특히 저자장 shift된 δ 67.4 ppm signal을 관찰할 수 있어 glucose C-6에 rhamnose가 결합되어 있음을 추정할 수 있었다.

그리고, ^{13}C - ^1H COSY spectrum, ^1H - ^1H COSY spectrum으로 당의 anomeric carbon 및 proton을 각각 귀속시켰으며, HMBC(^1H -Detected Multiple-bond Heteronuclear Multiple Quantum Coherence Spectrum)의 NMR기법을 이용하여 분석한 결과 δ 4.94 ppm의 glucose anomer proton이 δ 166.8 ppm signal과 coupling하고 있어 C-7에 glucose가 결합되어 있음을 알 수 있었고 δ 4.70 ppm의 rhamnose anomer proton이 δ 67.4 ppm signal과 coupling하고 있어 C-6"에 rhamnose가 결합되어 있음을 확인할 수 있어 Compound IV를 naringenin C-7의 OH에 glucose가 결합되어 있고 glucose C-6에 rhamnose가 결합되어 있는 naringenin diglycoside로 추정하였다.

이상의 기기분석 결과와 문헌(Agrawal, 1989 ; Harborne, 1982)과의 비교로 Compound IV는 분자식 $\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{O}_{14}$ 인 narirutin(naringenin 7-O-rutinoside)로 확인, 동정하였다.

Table 4. ¹³C-NMR data of Compound IV

Carbon No.	Narirutin (naringenin 7-O-rutinoside) (DMSO- <i>d</i> ₆) (Agrawal, 1989 ; Harborne, 1982)	Compound IV (CD ₃ OD)
Aglycone		
2	79.0	80.5
3	42.2	44.0
4	197.5	198.5
5	163.6	164.9
6	97.1	98.0
7	165.6	166.8
8	96.0	97.2
9	163.1	164.4
10	103.2	105.0
1'	129.1	130.8
2'	128.9	129.1
3'	115.8	116.4
4'	158.1	159.0
5'	115.8	116.4
6'	128.9	129.1
Glucose		
1''	101.0	101.1
2''	73.4	74.6
3''	76.8	77.8
4''	70.2	72.4
5''	76.1	77.1
6''	66.5	67.4
rhamnose		
1'''	100.2	102.1
2'''	70.8	72.0
3'''	71.3	71.2
4'''	72.7	74.1
5'''	68.8	69.7
6'''	18.2	17.9

2. 결과

HIT법(적혈구응집억제법)에 의해서 influenza virus [A/Taiwan/1/86/(H1N1)]에 대한 97-NP-1의 항바이러스 활성을 측정한 결과 대추는 항바이러스 활성이 측정되지 않았고 유자(柚子)와 모과(木瓜)는 항바이러스 활성이 측정되어 유자와 모과에서 분리된 각 분획에 대한 항바이러스 효과를 적혈구응집억제법(HIT)으로 1차 검색한 후 in situ ELISA를 이용하여 생존하는 바이러스의 양을 백분율로 환산하여 측정한 결과 모과는 세포 독성이 강하게 측정되어 바이러스에 대한 직접적인 항바이러스 효과를 측정하기가 불가능하였고 유자에서 분리된 각 분획은 항바이러스 활성이 측정되어 활성지향적으로 분획을 하면서 활성 성분을 분리하였다.

본 연구에서는 우수한 항influenza 활성이 확인된 유자(柚子)를 열수로 추출하고 감압 농축하여 얻은 엑스를 단계적으로 분획한 다음 각 분획의 항influenza 활성을 추적하면서 활성 지향적으로 각종 chromatography를 수행함으로써 4종류의 flavonoid 배당체를 분리하고 이들의 물리화학적 및 분광학적 분석 방법에 의하여 구조를 결정하였다. Compound I - IV의 IR, FAB(-)MS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, ¹H-¹H COSY, ¹³C-¹H COSY, HMBC 등의 기기분석과 물리 화학적 소견을 종합하여 Compound I은 naringenin 7-*O* (2'', 6''-di-*O*- α -L-rhamnopyranosyl)- β -D-glucopyranoside, Compound II는 hesperetin 7-*O* (2'', 6''-di-*O*- α -L-rhamnopyranosyl)- β -D-glucopyranoside, Compound III는 hesperidin(hesperetin 7-*O*-rutinoside), Compound IV는 narirutin(naringenin 7-*O*-rutinoside)로 확인, 동정하였으며 이상의 flavonoid배당체 중에서 Compound I과 Compound II는 Citrus속에서 처음 분리한 물질이고, 특히 Compound I은 자연에서 처음으로 발견된 flavonoid물질이다.

In situ ELISA의 방법으로 유자에서 분리한 flavonoid 배당체인 naringenin glycoside와 hesperetin glycoside의 influenza virus [A/Taiwan/1/86/(H1N1)]에 대한 항바이러스 활성을 측정한 결과 Compound II는 IC₅₀ 값이 918.46 μ l/ml으로 항바이러스 효과가 있었으며 Compound I, Compound III 및 Compound IV는 IC₅₀ 값이 >1,000 μ l/ml으로 항바이러스 활성이 측정되지 않았다.

hesperetin triglycoside인 Compound II는 항바이러스 활성이 있었으나 hesperetin diglycoside(hesperidin)인 Compound III는 활성이 측정되지 않아 glucose 2번에 결합되어 있는 rhamnose가 항바이러스 효과를 증가시킨다는 것을 알 수 있었고 또한, naringenin triglycoside인 Compound II는 활성이 측정되지 않아 hesperetin B ring의 C-4'에 결합되어 있는 methoxyl기가 항바이러스 효과를 증가시킨다는 것을 확인 할 수 있어 항바이러스 활성과 flavonoid 배당체구조와의 상관관계를 알 수 있었다.

제 4 절 요약

항influenza 활성이 확인된 유자 (柚子)를 분석한 다음 각 분석의 항influenza 활성을 추적하면서 활성 지향적으로 각종 chromatography를 수행함으로써 4종류의 flavonoid 배당체를 분리하고 이들의 물리화학적 및 분광학적 분석 방법에 의하여 구조를 결정하였다. Compound I - IV의 물리 화학적 성상과 IR, FAB(-)MS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, ¹H-¹H COSY, ¹³C-¹H COSY, HMBC 등의 기기 분석과 물리화학적 소견을 종합하여 다음과 같이 확인, 동정하였다.

Compound I

: naringenin 7-O (2'', 6'' -di-O- α -L-rhamnopyranosyl)- β -D-glucopyranoside

Compound II

: hesperetin 7-O (2'', 6'' -di-O- α -L-rhamnopyranosyl)- β -D-glucopyranoside

Compound III : hesperidin (hesperetin 7-O-rutinoside)

Compound IV : narirutin (naringenin 7-O-rutinoside)

이상의 flavonoid배당체 중에서 Compound I 과 Compound II는 Citrus속에서 처음 분리한 물질이고, 특히 Compound I은 자연에서 처음으로 발견된 flavonoid물질이다.

In situ ELISA의 방법으로 유자에서 분리한 flavonoid 배당체인 naringenin glycoside와 hesperetin glycoside의 influenza virus [A/Taiwan/1/86/(H1N1)]에 대한 항바이러스 활성을 측정한 결과 Compound II는 IC₅₀ 값이 918.46 μ l/ml으로 항바이러스 효과가 있었으며 Compound I, Compound III 및 Compound IV는 IC₅₀ 값이 >1,000 μ l/ml으로 항바이러스 활성이 측정되지 않았다.

Hesperetin triglycoside인 Compound II는 항바이러스 활성이 있었으나 hesperetin diglycoside(hesperidin)인 Compound III는 활성이 측정되지 않아 glucose 2번에 결합되어 있는 rhamnose가 항바이러스 효과를 증가시킨다는 것을 알 수 있었고 또한, naringenin triglycoside인 Compound II는 활성이 측정되지 않아 hesperetin B ring의 C-4'에 결합되어 있는 methoxyl기가 항바이러스 효과를 증가시킨다는 것을 확인 할 수 있어 항바이러스 활성과 flavonoid 배당체구조와의 상관관계를 알 수 있었다.

제 5 절 참고문헌

- 1) Agrawal, P. K., Carbon-13 NMR of flavonoids. Elsevier science publishing company Inc, 316-317 (1989).
- 2) Bae, E. A., Han, M. J., Kim, D. H. : In vitro anti-Helicobacter pylori activity of some flavonoids and their metabolites. *Planta Med* 65(5), 442-443 (1999).
- 3) Berkarda, B., Koyuncu, H., Soybir, G., Baykut, F. : INhibitory effect of Hesperidin on tumour initiation and prootion in mouse skin. *Res Exp Med*

- (Berl) 198(2), 93-99 (1998).
- 4) Emam, A. M., Elias, R., Moussa, A. M., Faure, R., Debrauwer, L., Balansard, G. : Two flavonoid triglycosides from buddeja madagascariensis. *Phytochemistry* 48(4), 739-742 (1998).
 - 5) Emim, J. A., Oliveira, A. B., Lapa, A. J. : Pharmacological evaluation of the anti-inflammatory activity of a citrus bioflavonoid, hesperidin, and the isoflavonoids, dauricin and claussequinone, in rats and mice. *J Pharm Pharmacol* 46(2), 118-122 (1994).
 - 6) Hammad, H. M., Abdalla, S. S. : Pharmacological effects of selected flavonoids on rat isolated ileum : structure-activity relationship. *Gen Pharmacol* 28(5), 767-771 (1997).
 - 7) Harada, H., Sakagami, H., Nagata, K., Oh-hara, T., Kawazoe, Y., Ishihama, A., Hata, N., Hisawa, Y., Terada, H., Konno, K. : Possible involvement of lignin structure in anti-influenza virus activity. *Antiviral Research* 15, 41-50 (1991).
 - 8) Harborne, J. B., Mabry, T. J., *The Flavonoids : Advances in Research*, Chapman and Hall (1982).
 - 9) Ito, C., Sato, K., Oka, T., Inoue, M., Ju-Ichi, M., Omura, M., Furukawa, H. : Two flavanones from citrus species. *Phytochemistry* 20(12), 3562-3564 (1989).
 - 10) Jung, J. H. : Studies on the Chemical Compositions of Citrus junos in Korea. *J. Korean Agriculture Chemical Society* 17(1), 63-80 (1974).
 - 11) Kaul, T. N., Middleton, E. Jr., Ogra, P.L. : Antiviral effect of flavonoids on human viruses. *J Med Virol* 15(1), 71-79 (1985).
 - 12) Lee, H. Y., Kim, Y. M., Shin, D. H., Sun, B. K. : Aroma Components in Korean Citron (*Citrus medica*). *Korean J. Food Sci. Technol* 19(4), 361-365 (1987).
 - 13) Matsuda, H., Yano, M., Kubo, M., Linuma, M., Oyama, M., Mizuno, M. :

- [Pharmacological study on citrus fruits of Citrus unshiu MARKOVICH(2). On flavonoid components.]. *Yakugaku Zasshi* 111(3), 193-198 (1991).
- 14) Monforte, M. T., Trovato, A., Kirjavainen, S., Forestieri, A. M., Galati, E. M., Lo Curto, R.B. : Biological effect of hesperidin, a Citrus flavonoid.(note 11) : hypolipidemic activity on experimental hypercholesterolemia in rat. *Farmaco* 50(9), 595-599 (1995).
- 15) Mucsi, I., Pragai, B. M. : Inhibition of virus multiplication and alteration of cyclic AMP level in cell cultures by flavonoids. *Experientia* 15:41(7), 930-931 (1985).
- 16) Nagai, T., Miyachi, Y., Tomimori, T., Suzuki, Y., Yamada, H. : In vivo anti-influenza virus activity of plant flavonoids possessing inhibitory activity for influenza sialidase. *Antiviral Reserch* 19, 207-217 (1992).
- 17) Nagai, T., Miyaichi, Y., Tomimori, T., Suzuki, Y., Yamada, H. : Inhibition of influenza virus sialidase and anti-influenza virus anctivity by plant flavonoids. *Chem. Pharm. Bull.* 38, 1329-1322 (1990).
- 18) Nagata, K., Sakagami, H., Harada, H., Nonoyama, M., Ishihama, A., Konno, K. : Inhibition of influenza virus infection by pine cone antitumor substances. *Antiviral Research* 13, 11-12 (1990).
- 19) Okamura, N., Haraguchi, H., Hachimoto, K., Yagi, A. : Flavonoids in *Rosemarinus officinalis* leaves. *Phytochemistry* 37(5), 1463-1466 (1994).
- 20) Okamura, N., Haraguchi, H., Hashimoto, K., Yagi, A. : Flavonoids in *rosmarinus officinalis* leaves. *Phytochemistry* 37(5), 1463-1466 (1994).
- 21) Ratty, A. K., Das, N. P. : Effects of flavonoids on nonenzymetic lipid peroxidation : structure-activity relationship. *Biochem Med Metab Biol* 39(1), 69-79 (1988).
- 22) 김태정 : 한국의 자원식물II. 서울대학교 출판부, 271 (1996).
- 23) 이영노 : 원색한국식물도감. 교학사, 440 (1996).
- 24) 이창복 : 대한식물도감. 향문사, 504 (1980).

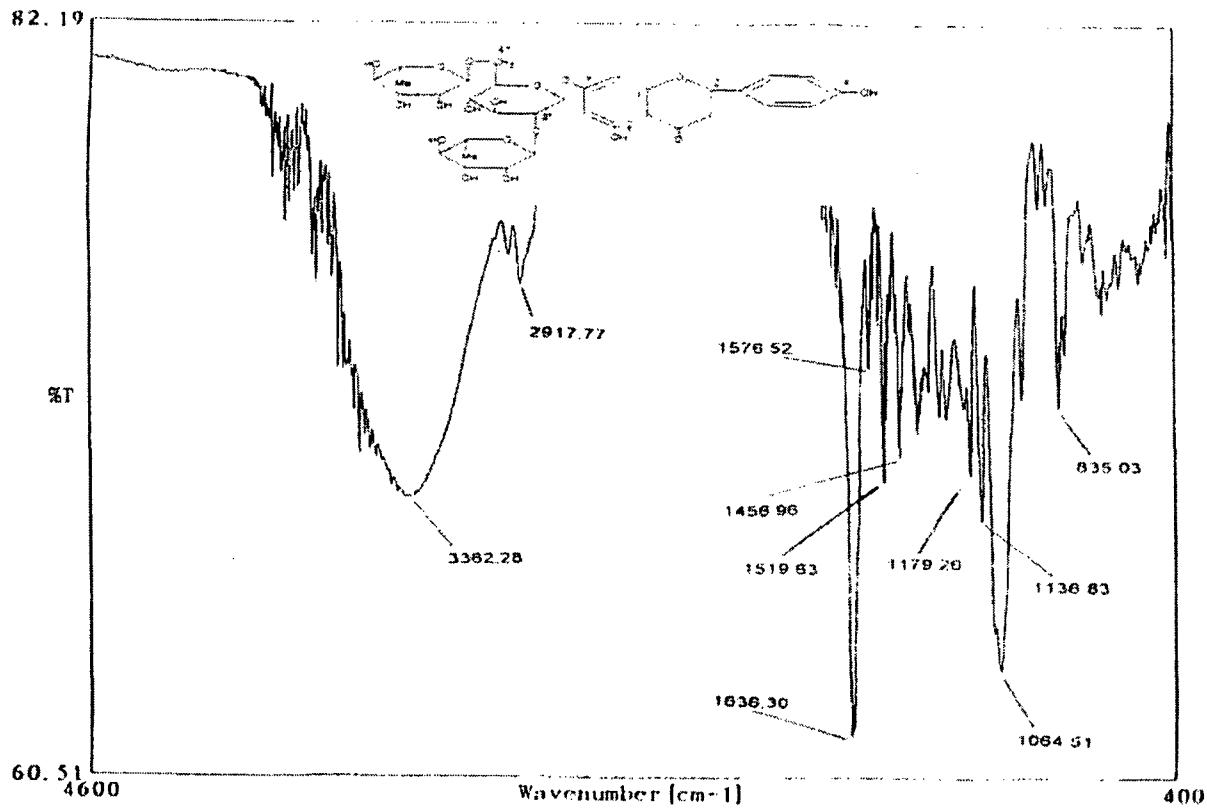


Fig. 1-1 IR Spectrum of Compound 1

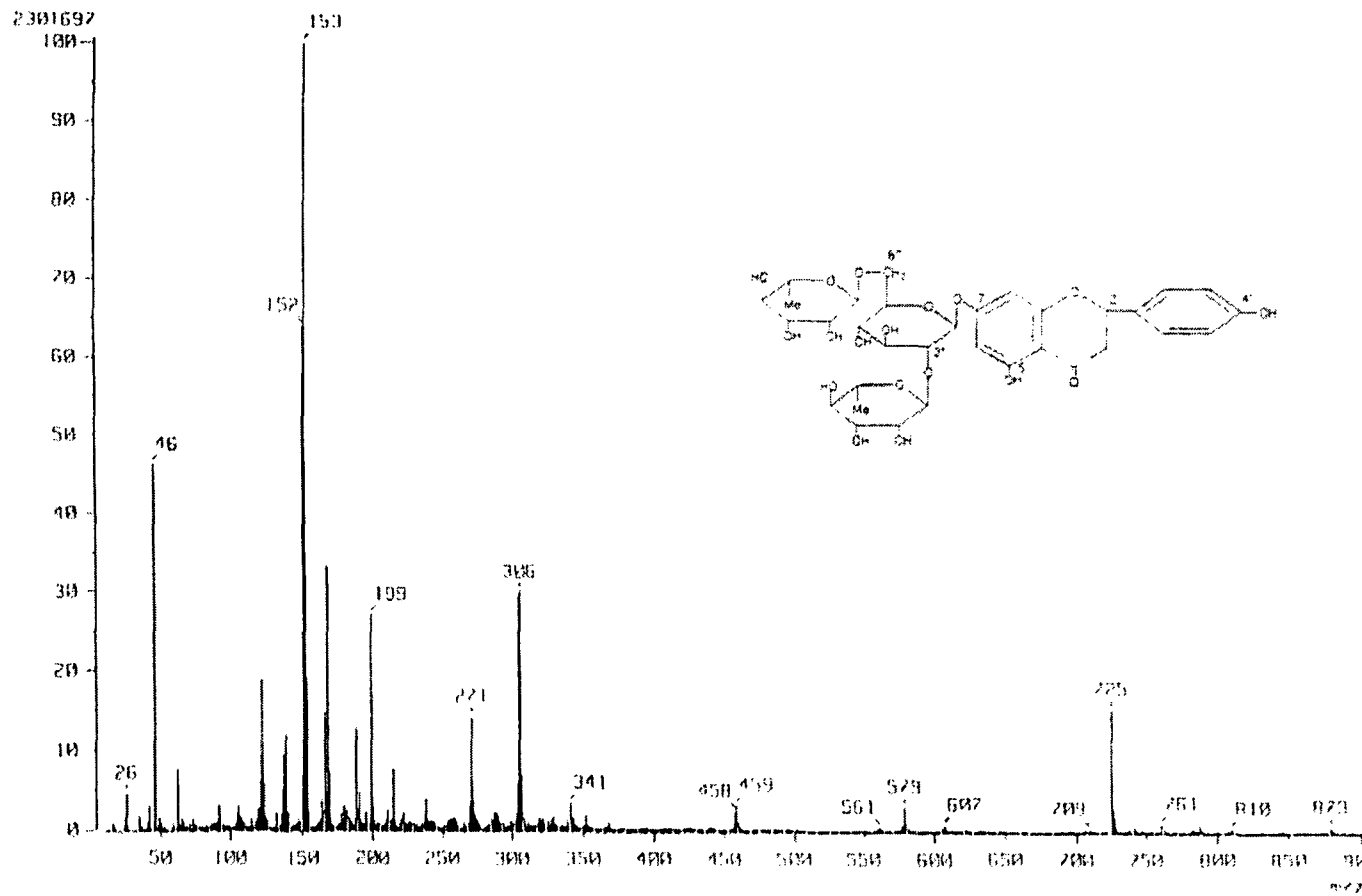


Fig. 1 2 FAB(-)Mass Spectrum of Compound 1

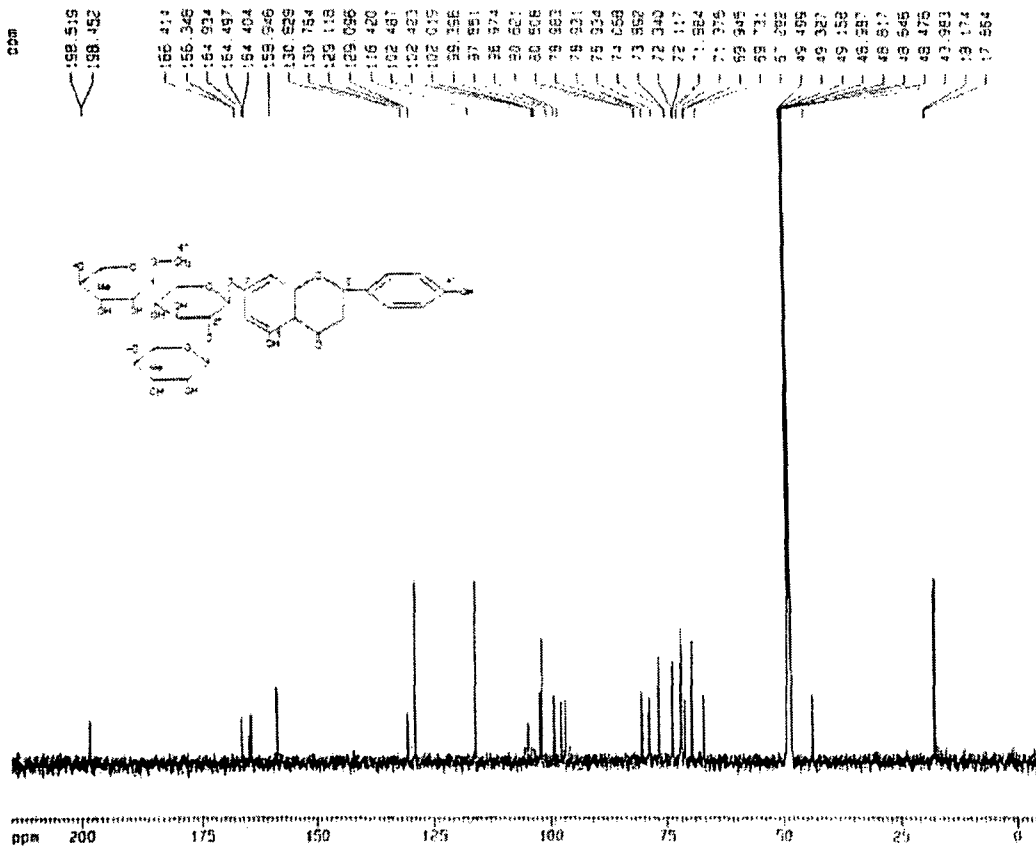


Fig. 1-4 ¹³C-NMR Spectrum of Compound I (125MHz, CD₃OD)

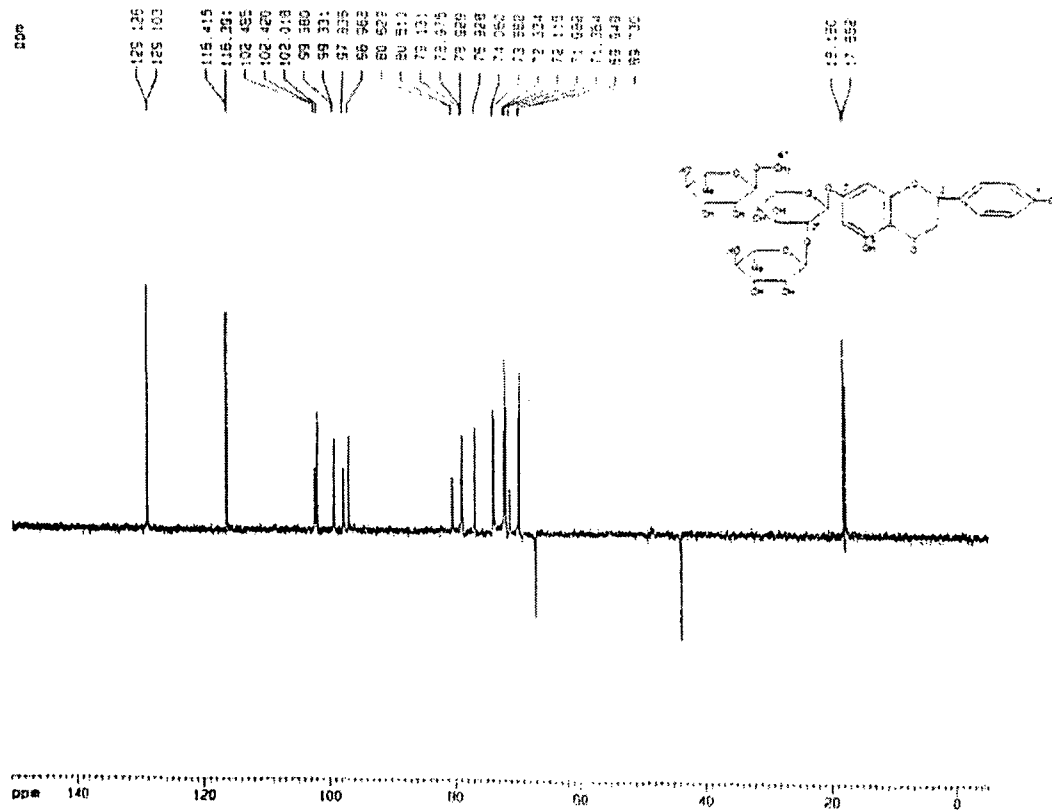


Fig. 1-5 DEPT 135° Spectrum of Compound 1 (125MHz, CD₃OD)

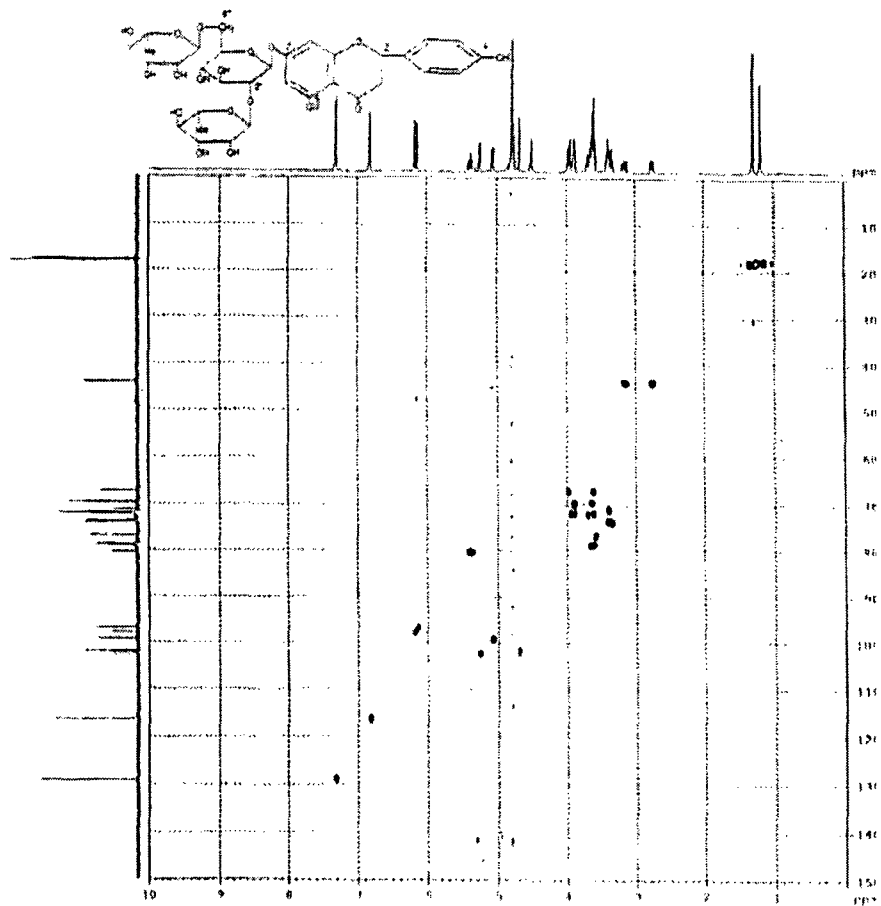


Fig. 1-6 ^{13}C - ^1H COSY Spectrum of Compound 1 (500MHz, CD_3OD)

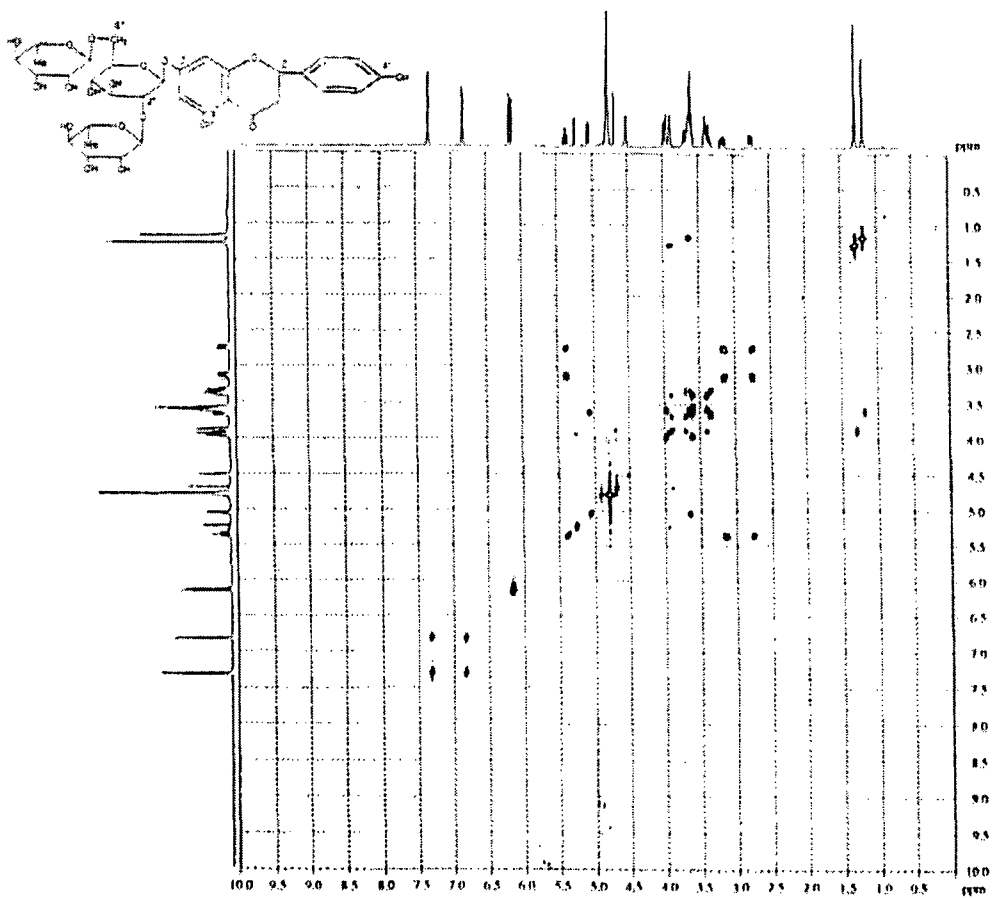


Fig. 1-7 ¹H-¹H COSY Spectrum of Compound 1 (500MHz, CD₃OD)

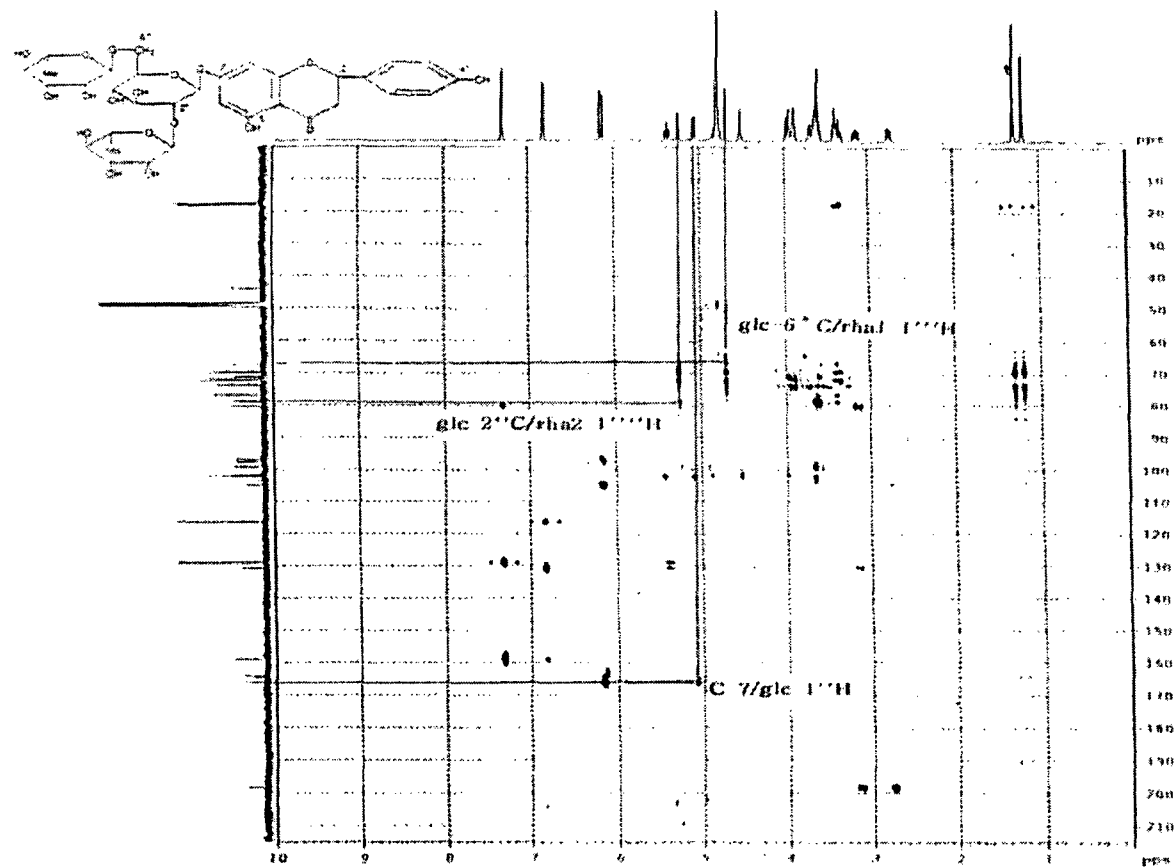


Fig. I-8 HMBC Spectrum of Compound 1 (500MHz, CD₃OD)

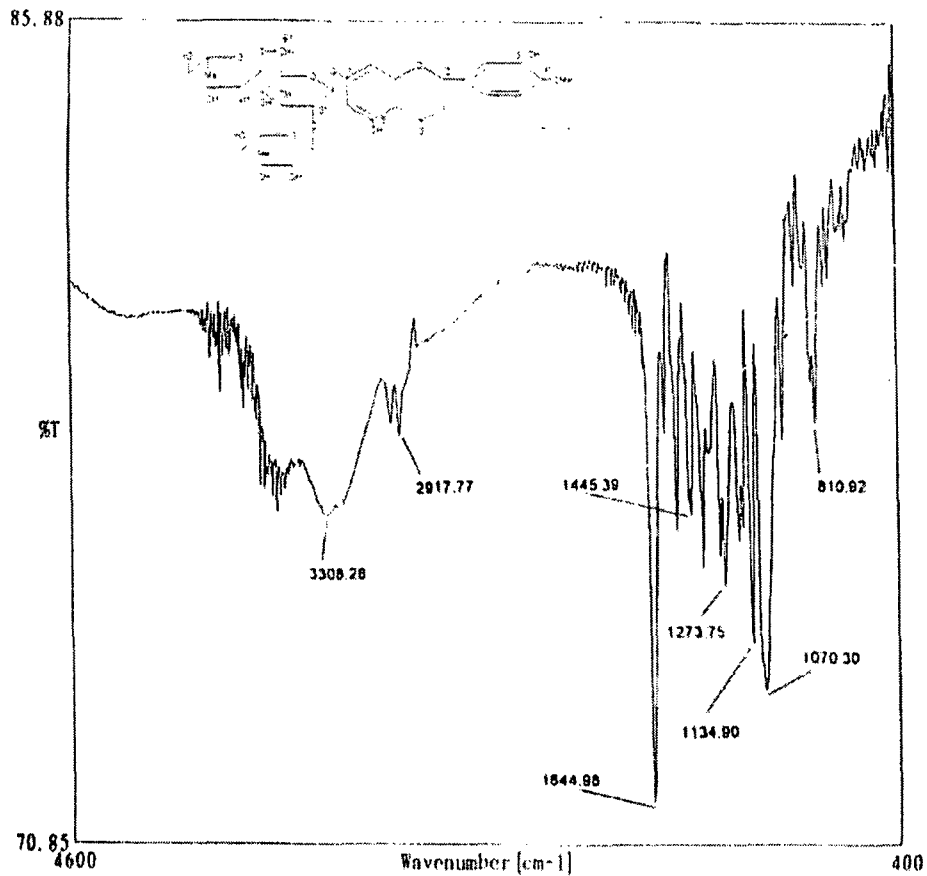


Fig. 2-1 IR Spectrum of Compound II

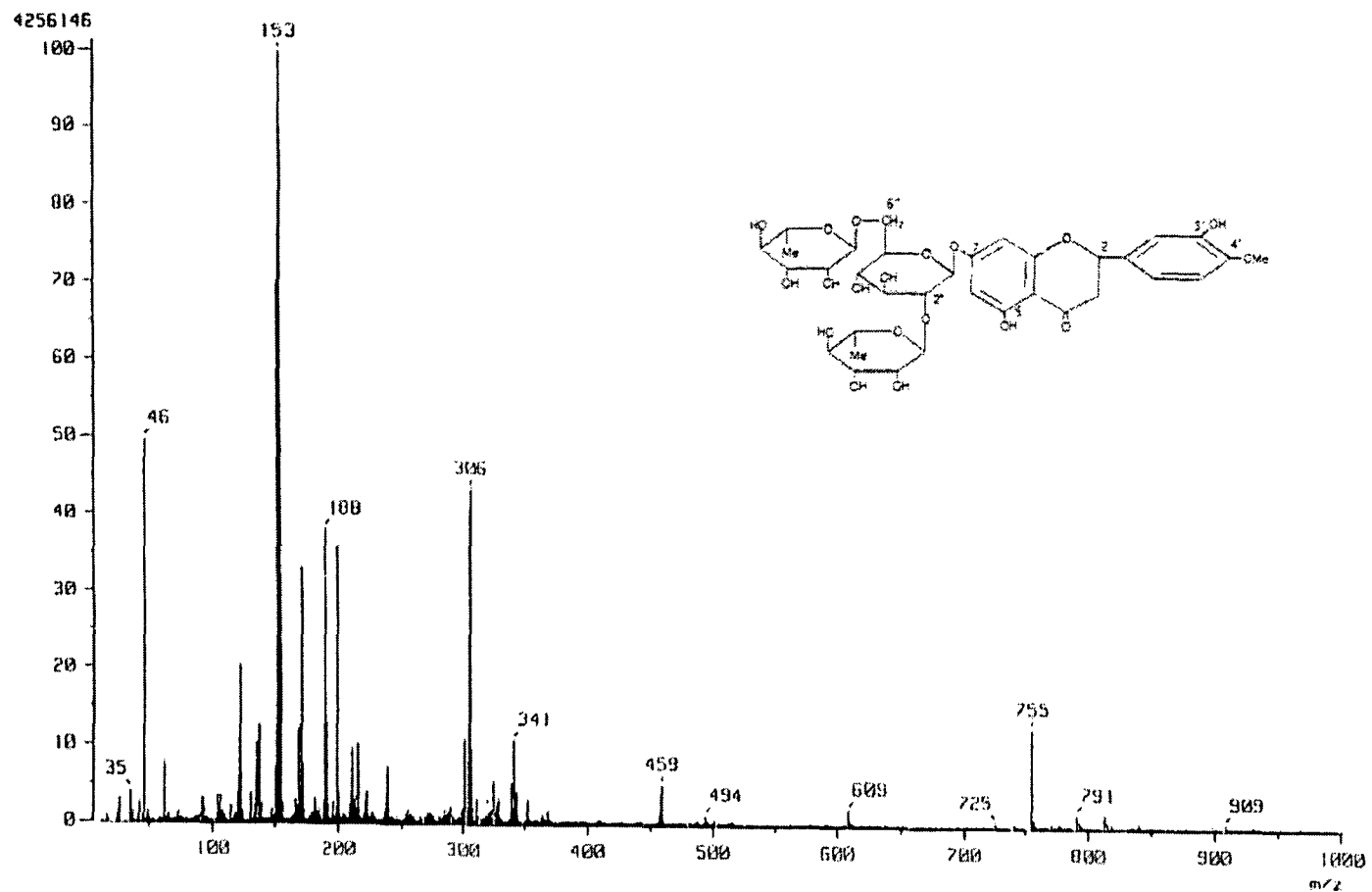


Fig. 2-2 FAB(-) Mass Spectrum of Compound II

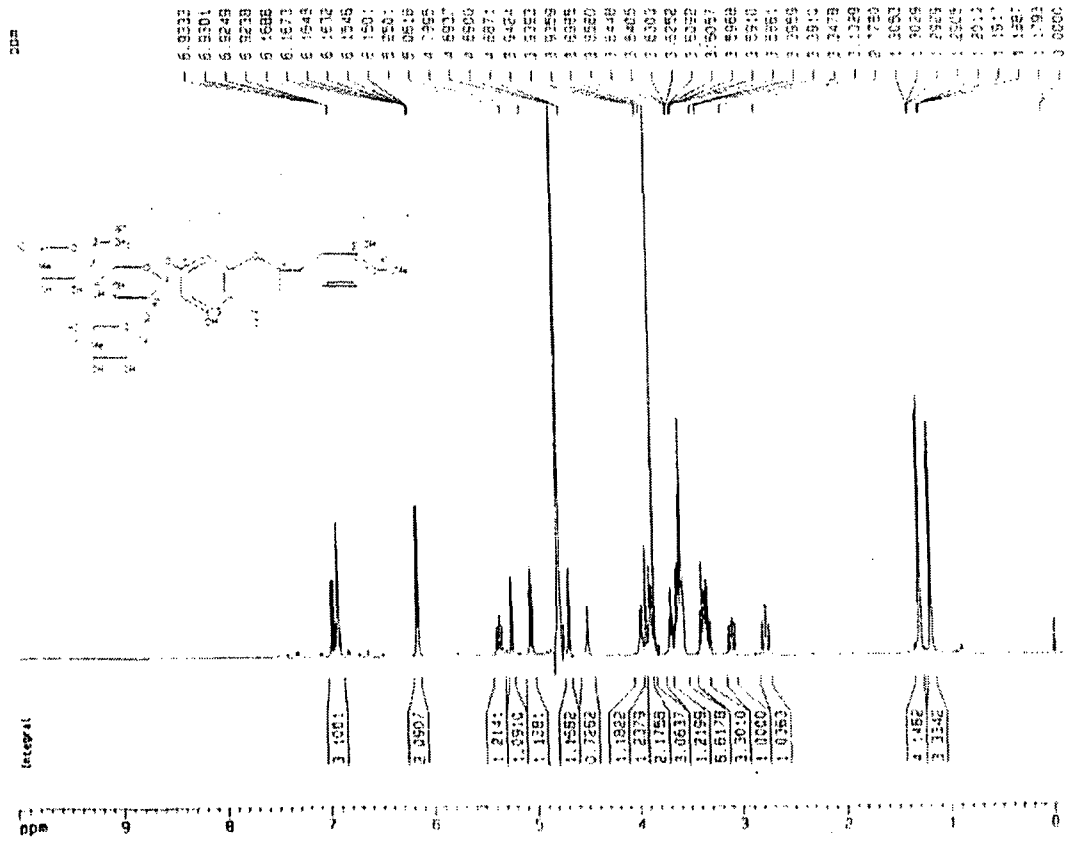


Fig. 2 3 ¹H-NMR Spectrum of Compound II (500MHz, CD₃OD)

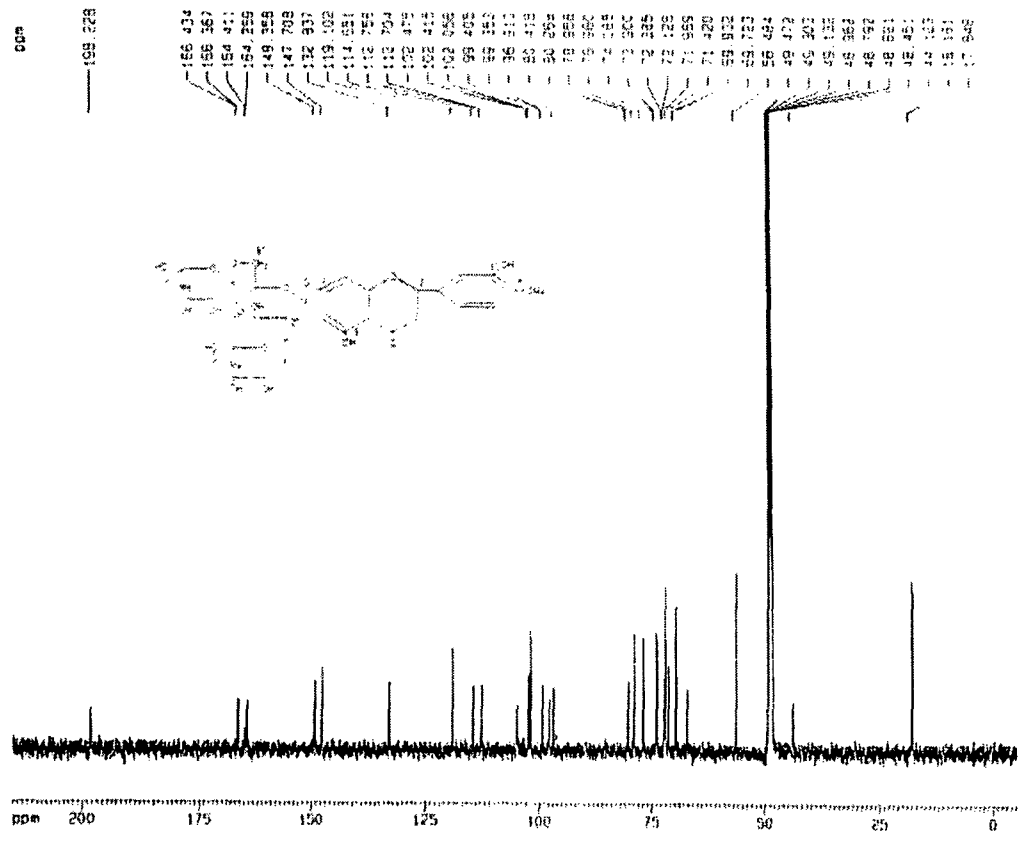


Fig. 2 4 ¹³C-NMR Spectrum of Compound II (125MHz, CD₃OD)

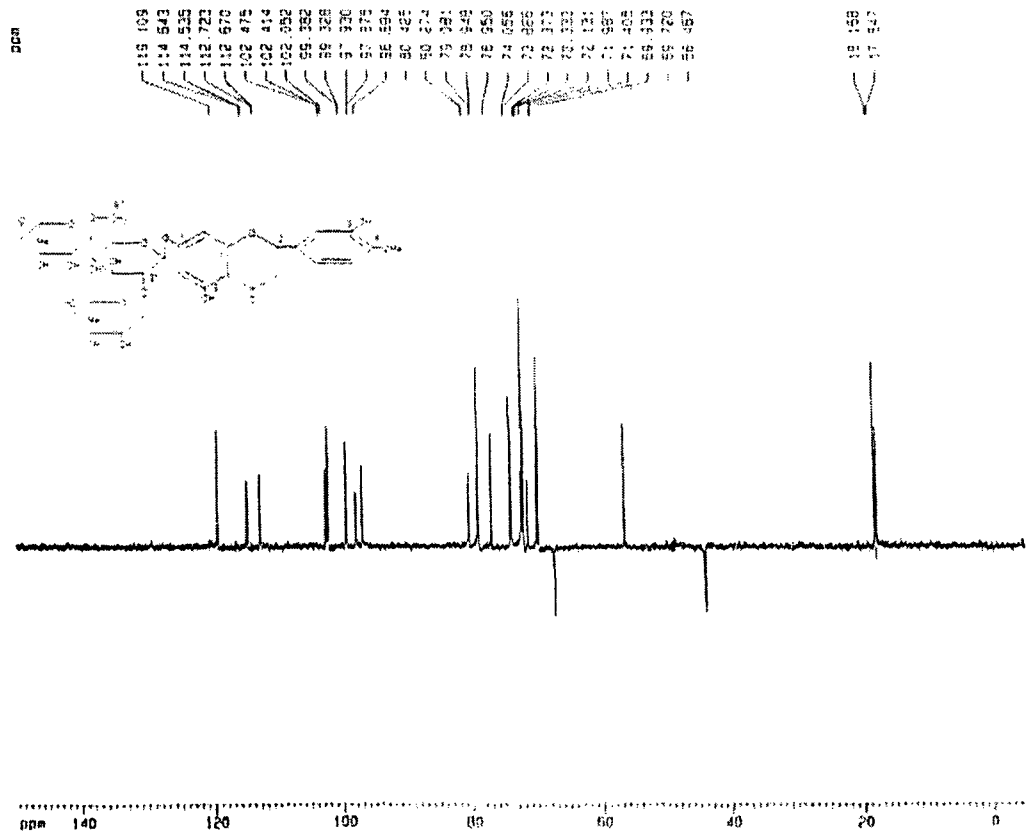


Fig. 2-5 DEPT 135° Spectrum of Compound II (125MHz, CD₃OD)

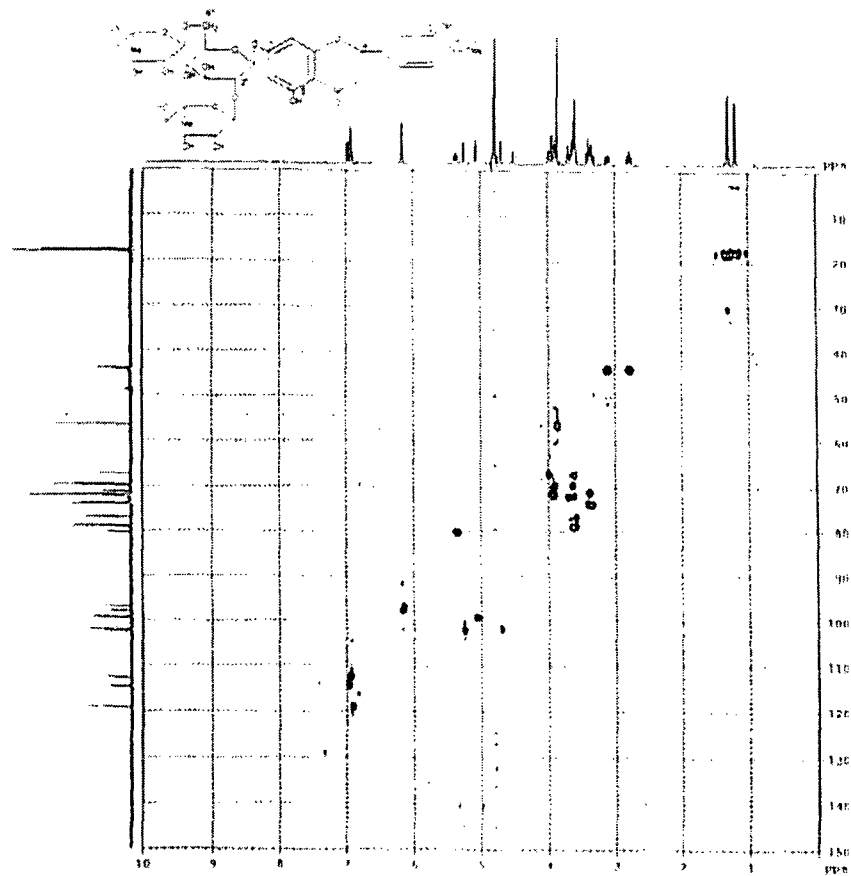


Fig. 2-6 ^{13}C - ^1H COSY Spectrum of Compound II (500MHz, CD_3OD)

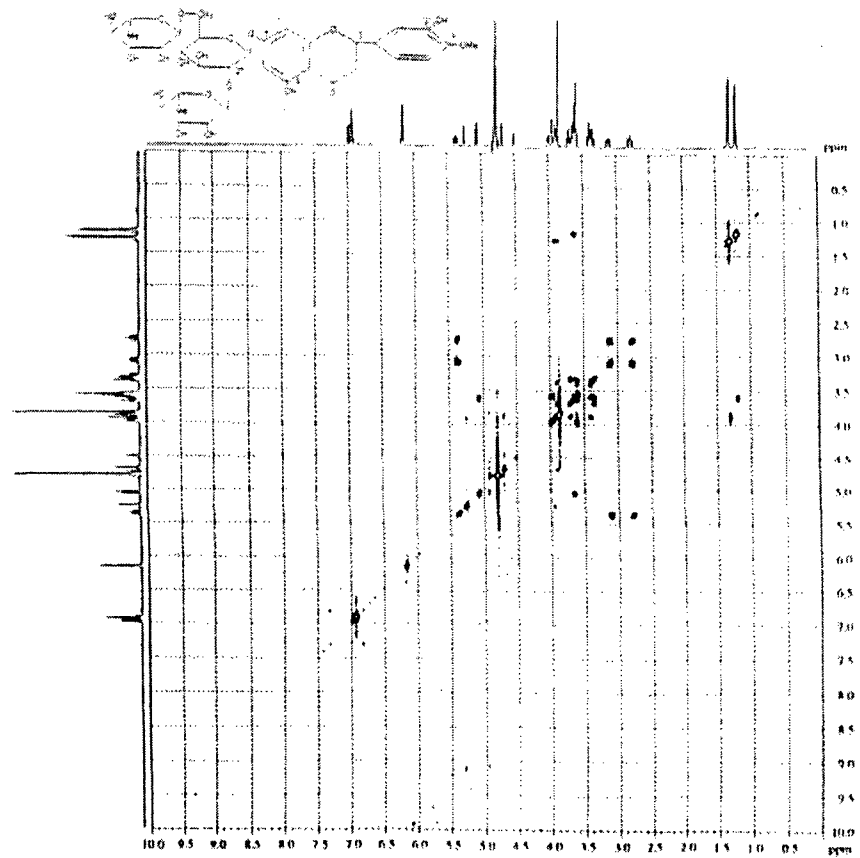


Fig. 2-7 ^1H - ^1H COSY Spectrum of Compound II (500MHz, CD_3OD)

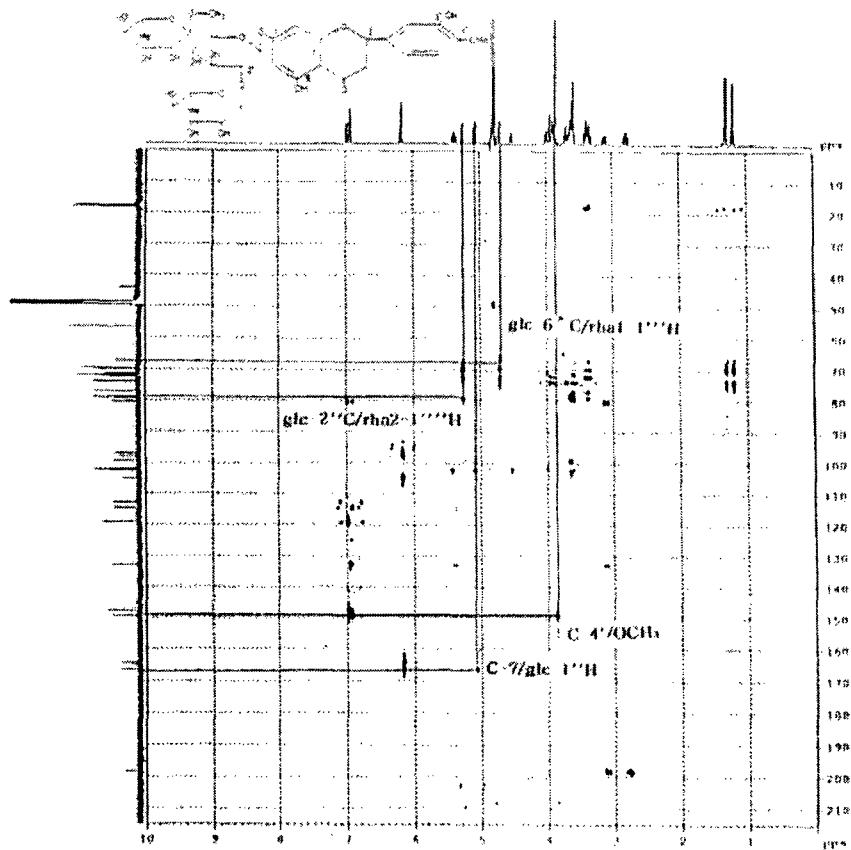


Fig. 2-8 HMBC Spectrum of Compound II (500MHz, CD_3OD)

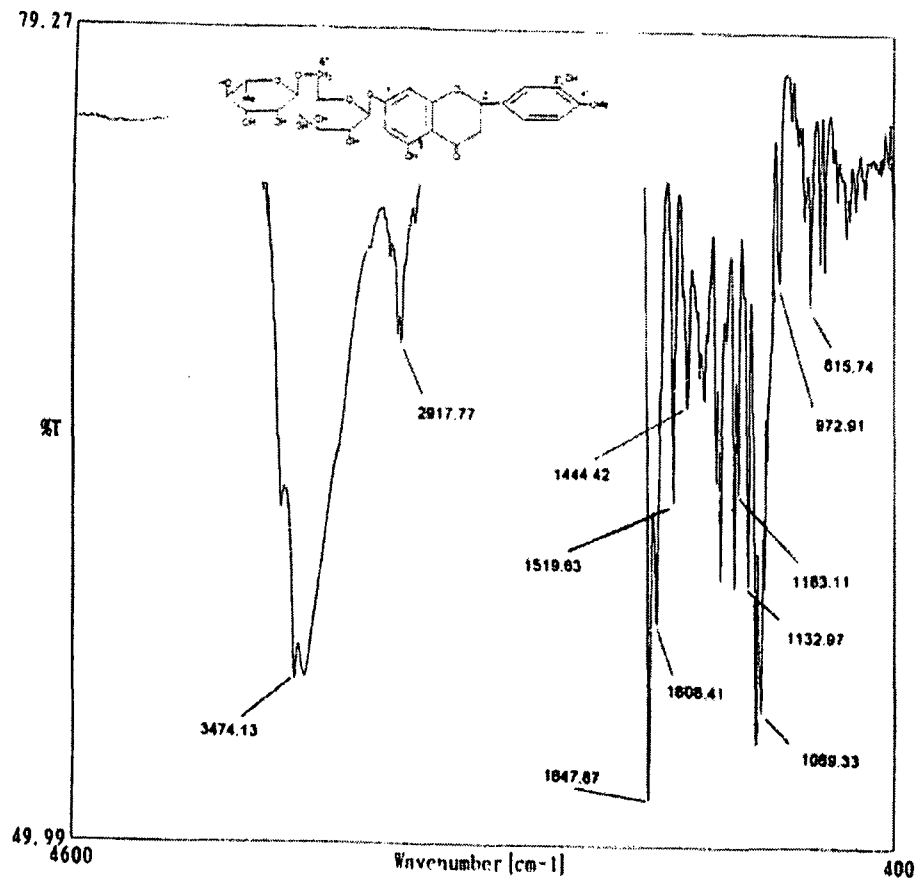


Fig. 3-1 IR Spectrum of Compound III

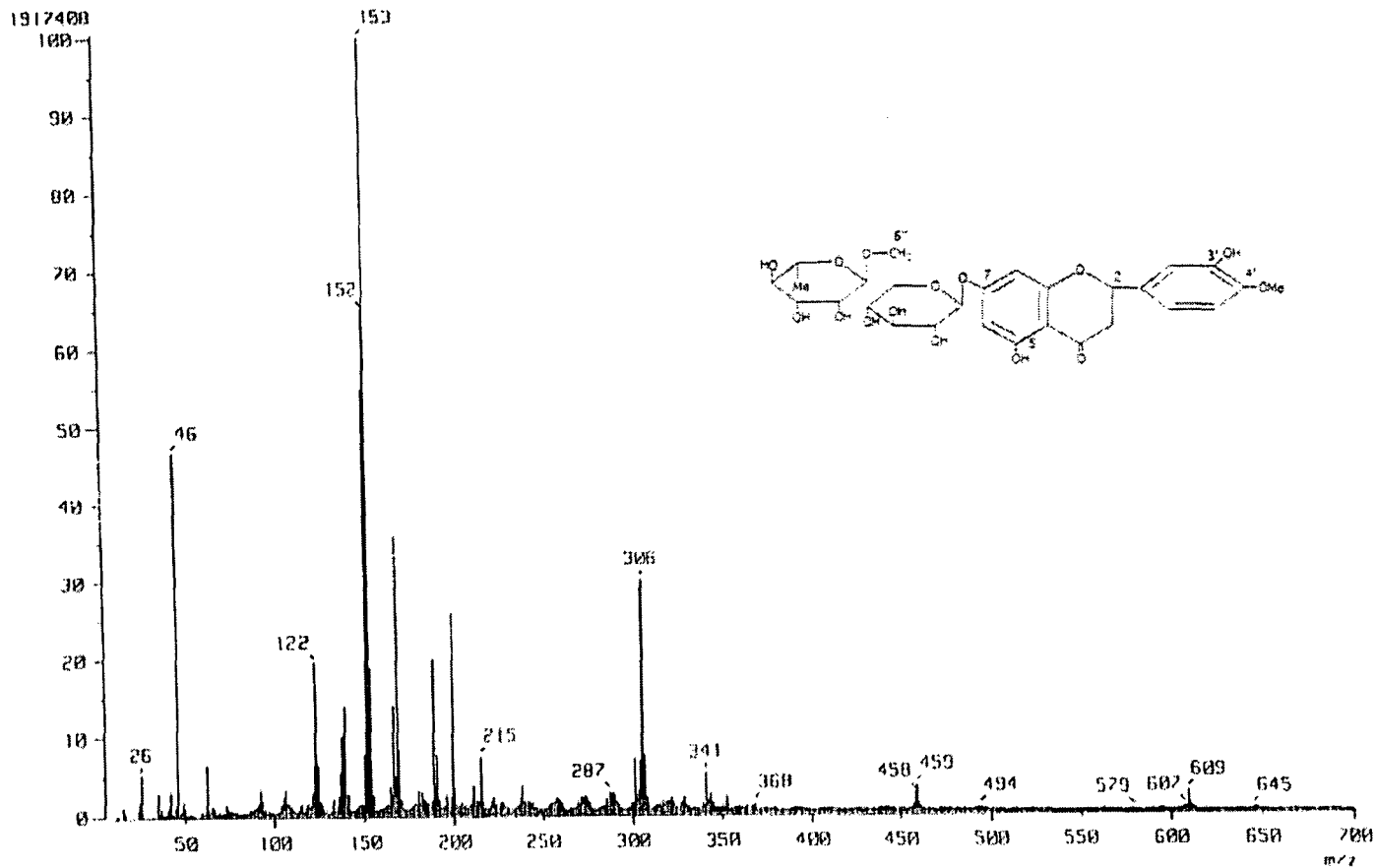


Fig. 3-2 FAB(-)Mass Spectrum of Compound III

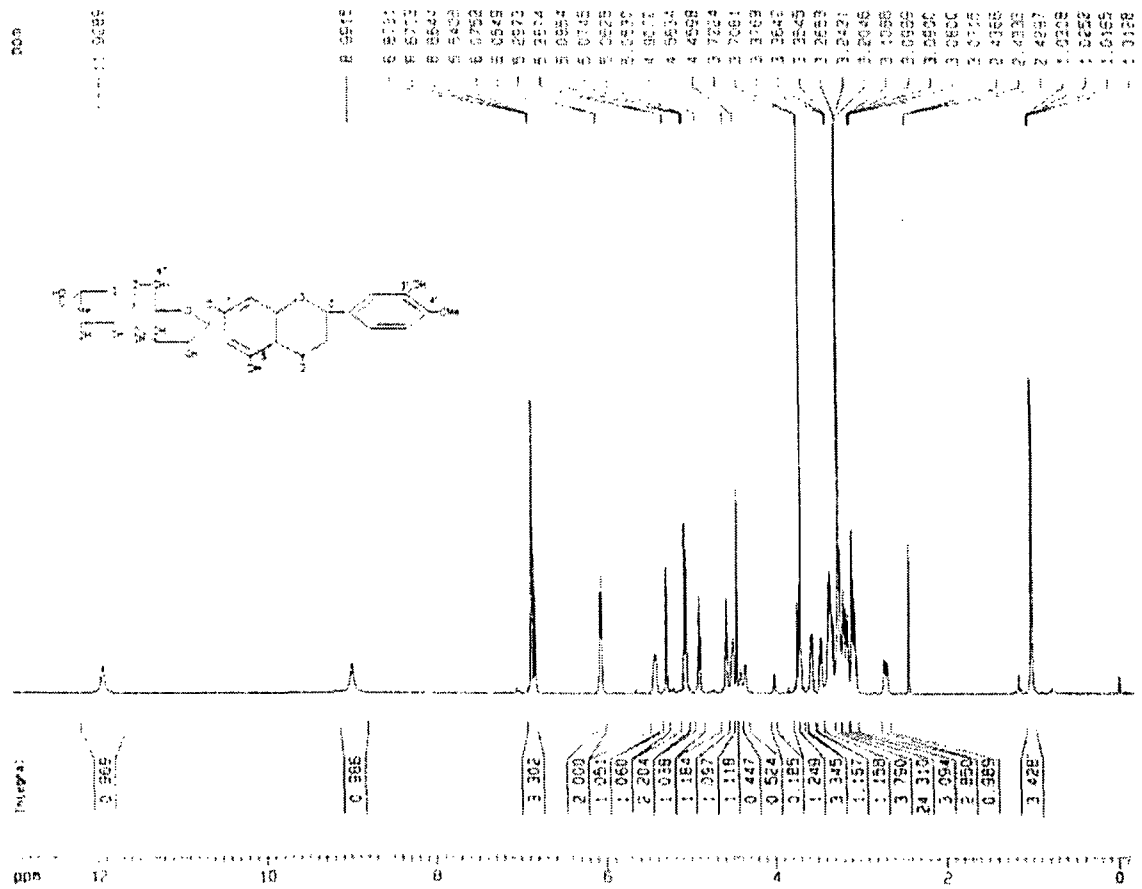


Fig. 3-3 ¹H-NMR Spectrum of Compound III (500MHz, CD₃OD)

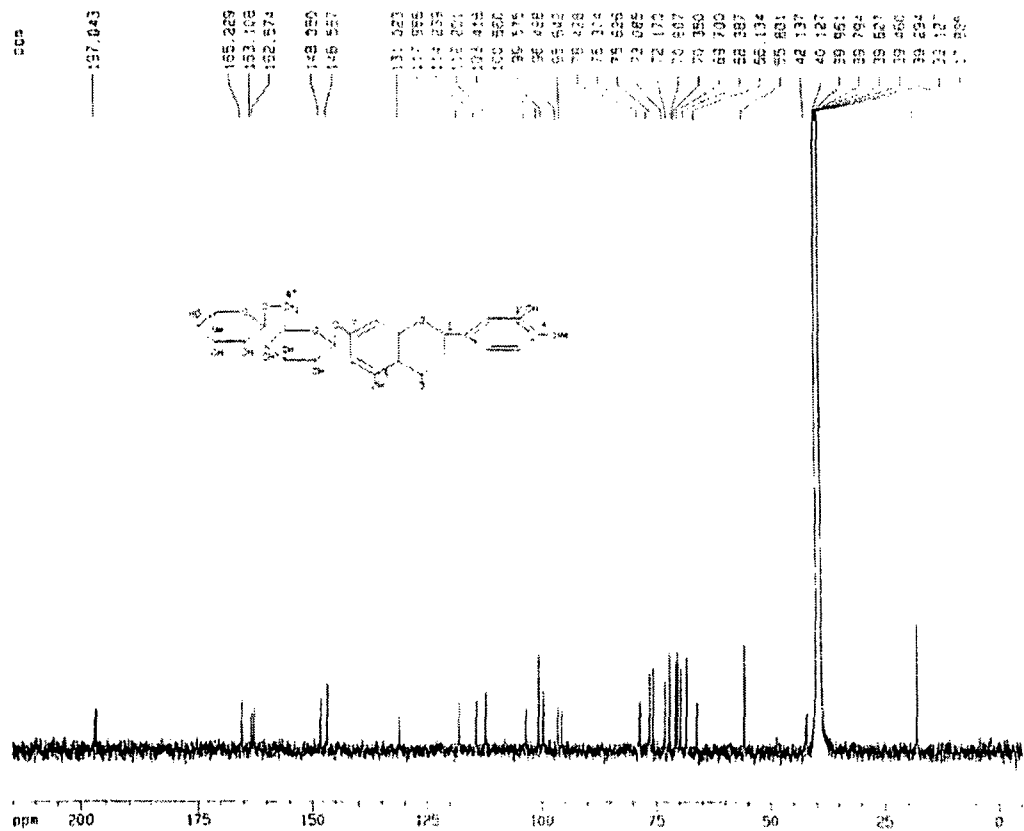


Fig. 3-4 ¹³C-NMR Spectrum of Compound III (125MHz, CD₃OD)

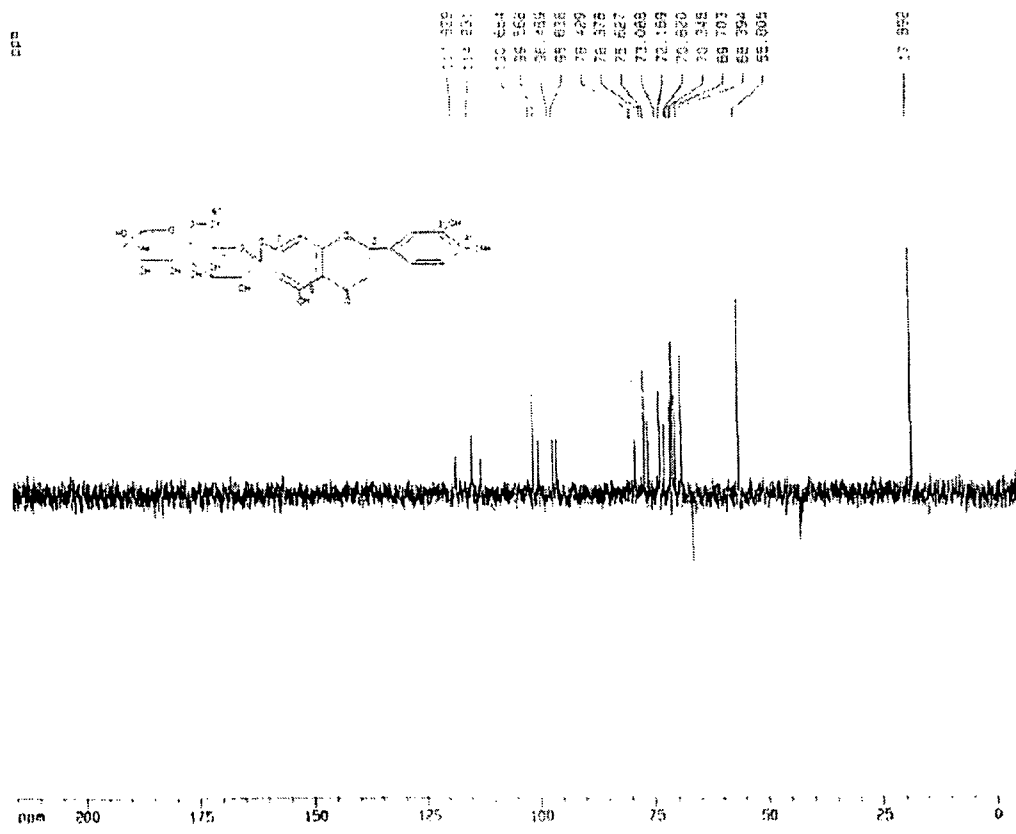


Fig. 3-5 DEPT 135" Spectrum of Compound III (125MHz, CD₃OD)

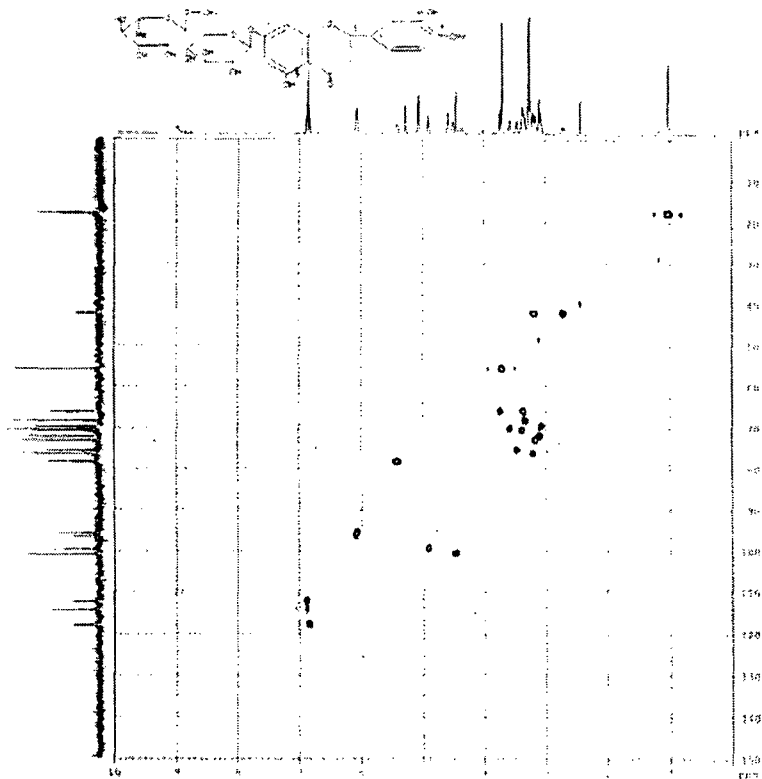


Fig. 3-6 ^{13}C - ^1H COSY Spectrum of Compound III (500MHz, CD_3OD)

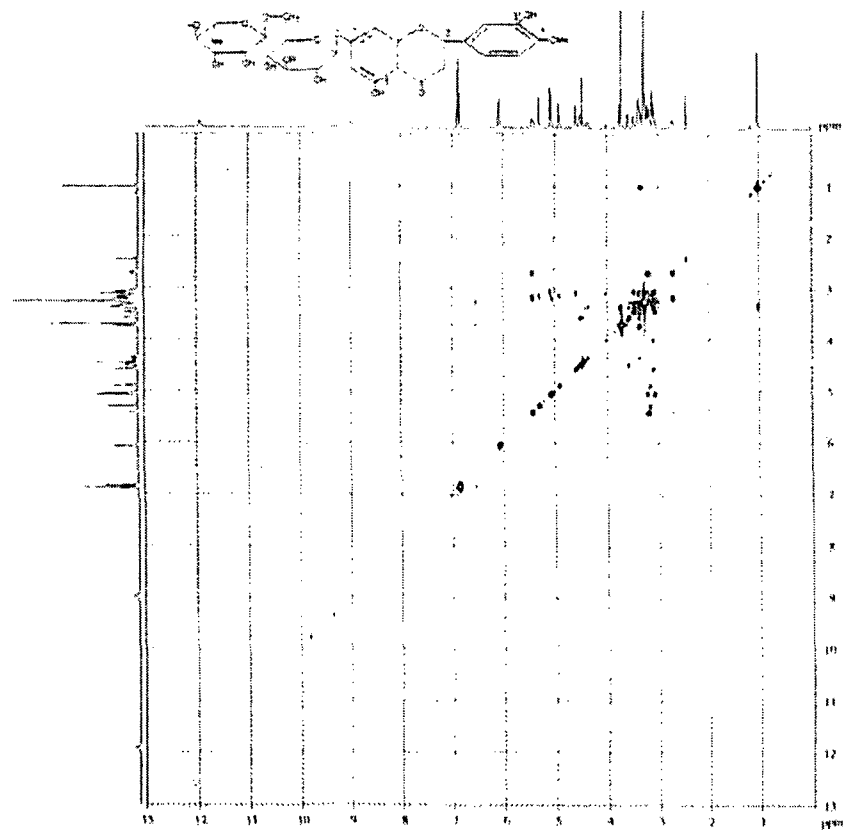


Fig. 3-7 ^1H - ^1H COSY Spectrum of Compound III (500MHz, CD_3OD)

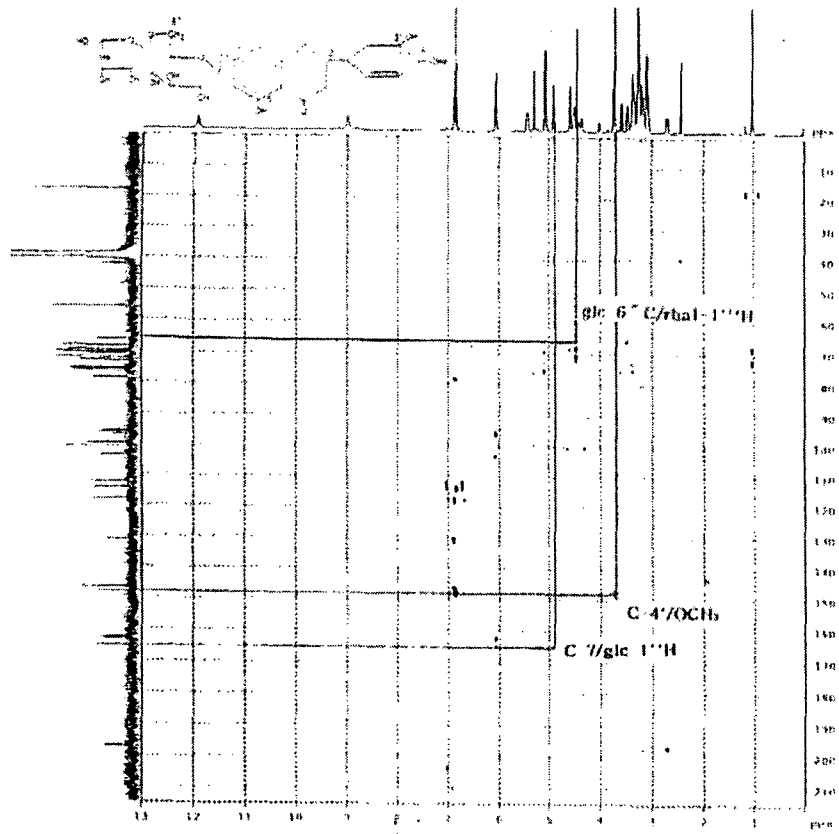


Fig. 3-8 HMBC Spectrum of Compound III (500MHz, CD₃OD)

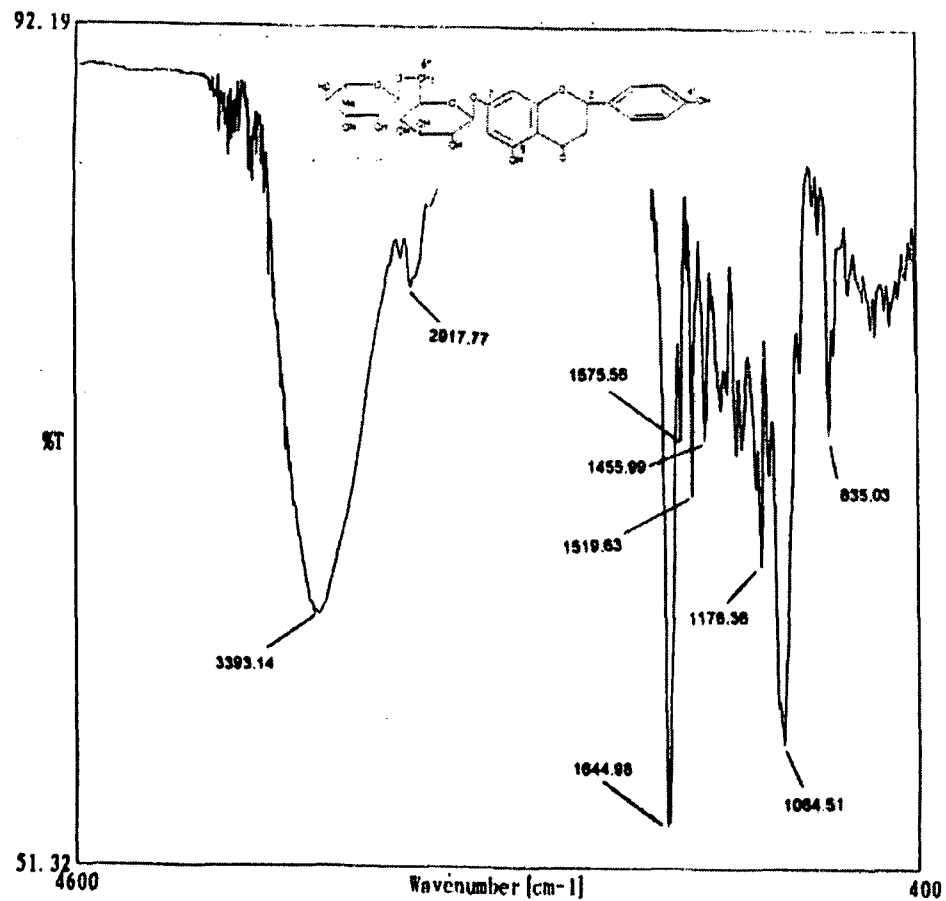


Fig. 4-1 IR Spectrum of Compound IV

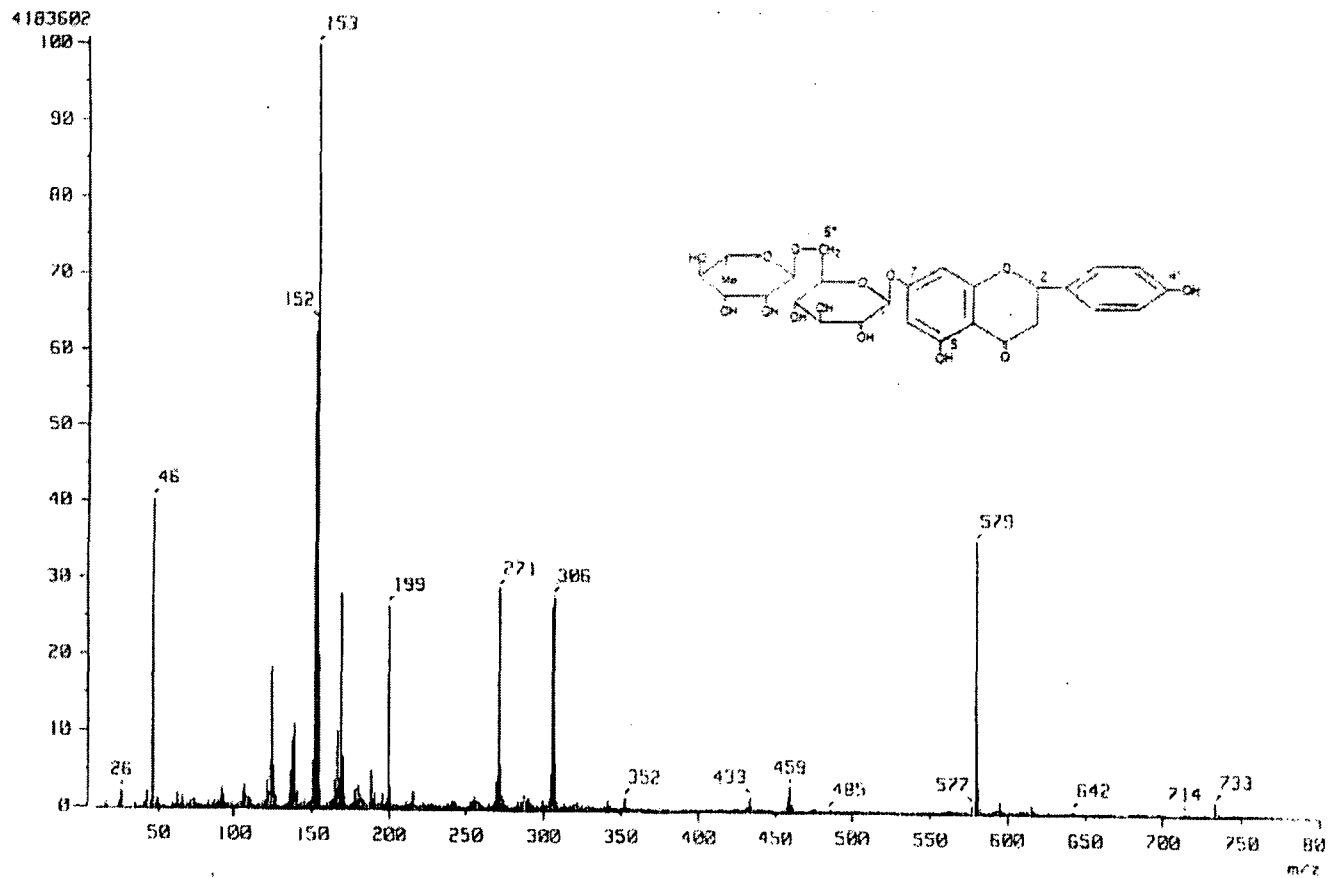


Fig. 4-2 FAB(-)Mass Spectrum of Compound IV

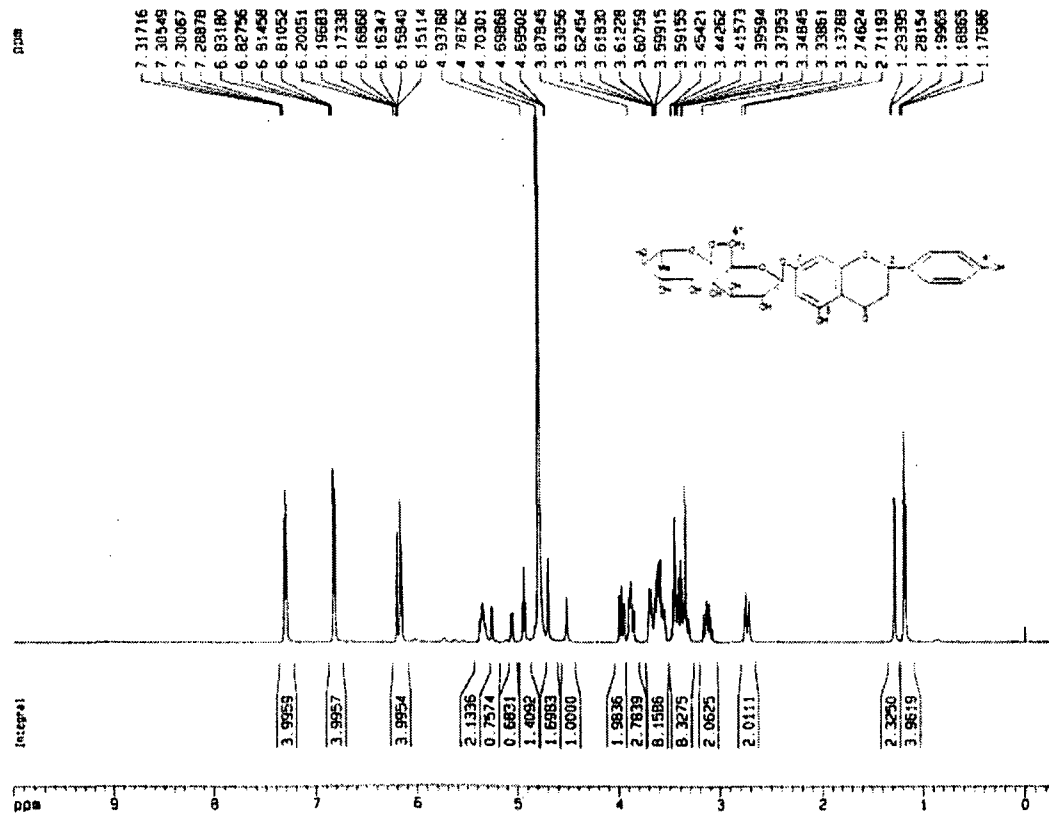


Fig. 4-3 ¹H-NMR Spectrum of Compound IV (500MHz, CD₃OD)

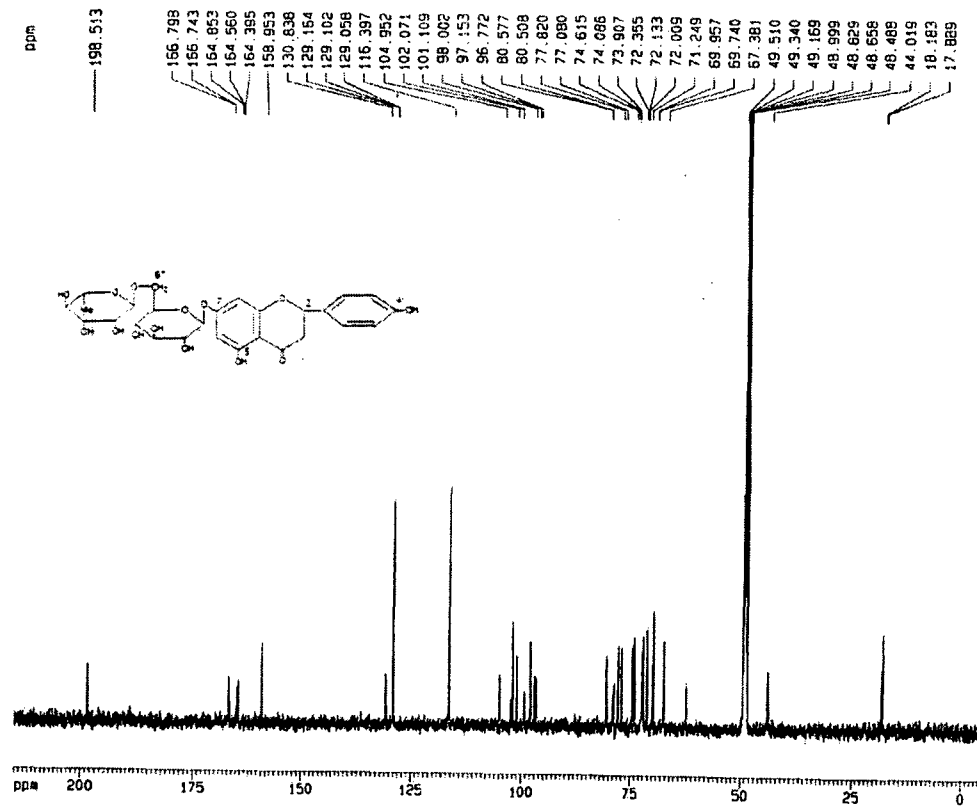


Fig. 4-4 ¹³C-NMR Spectrum of Compound IV (125MHz, CD₃OD)

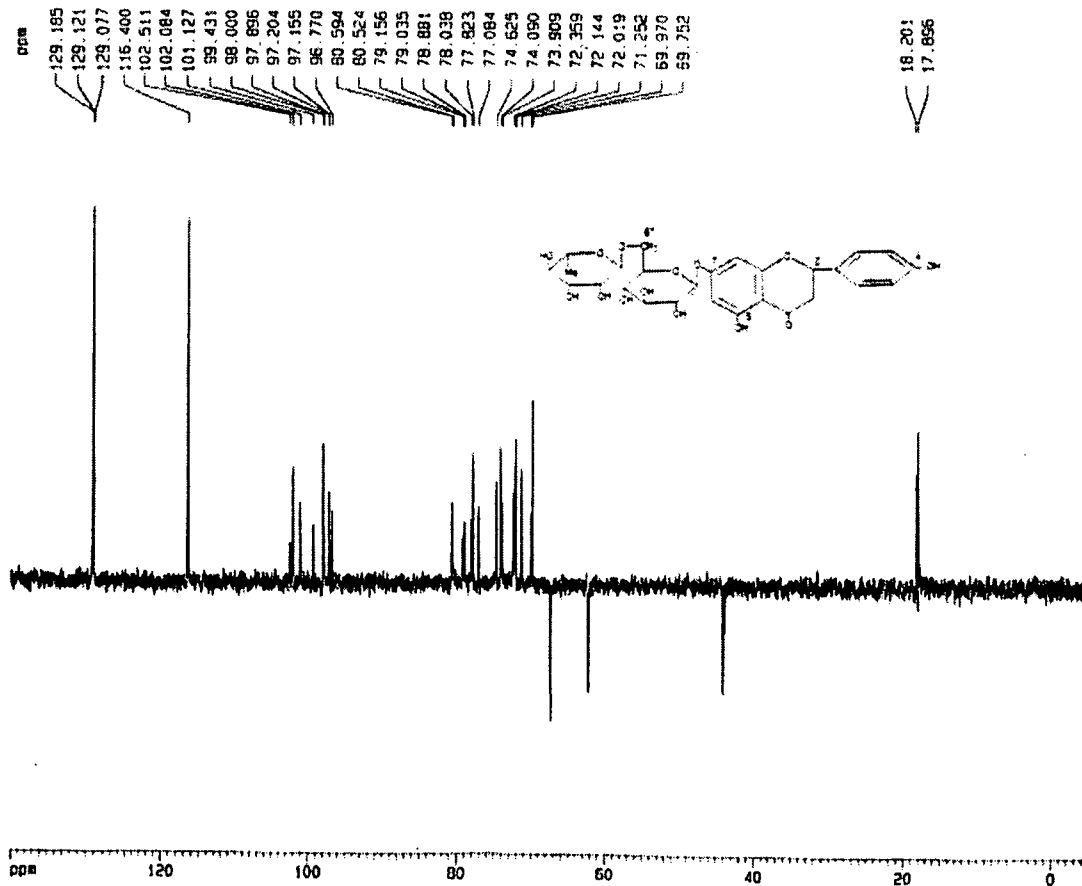


Fig. 4-5 DEPT 135° Spectrum of Compound IV (125MHz, CD₃OD)

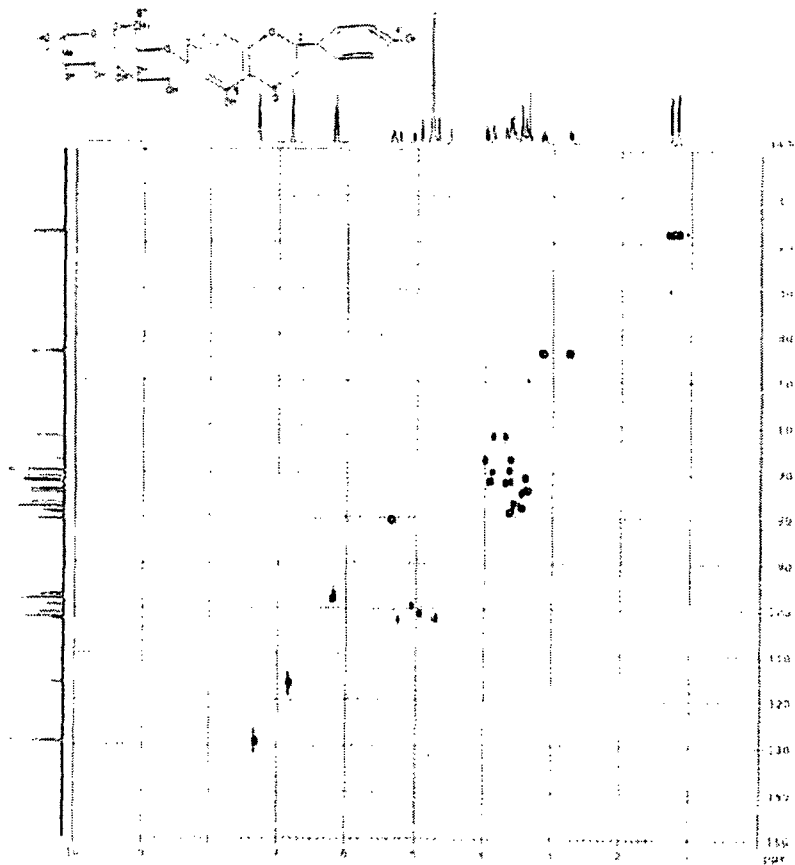


Fig. 4-6 ^{13}C - ^1H COSY Spectrum of Compound IV (500MHz, CD_3OD)

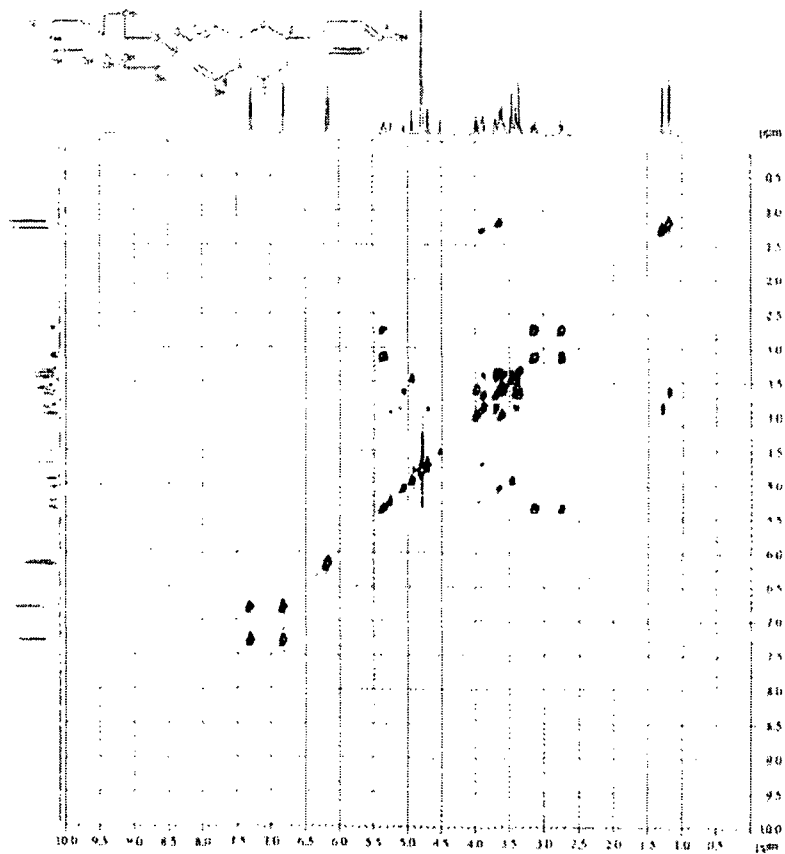


Fig. 4-7 ^1H - ^{13}C COSY Spectrum of Compound IV (500MHz, CD_3OD)

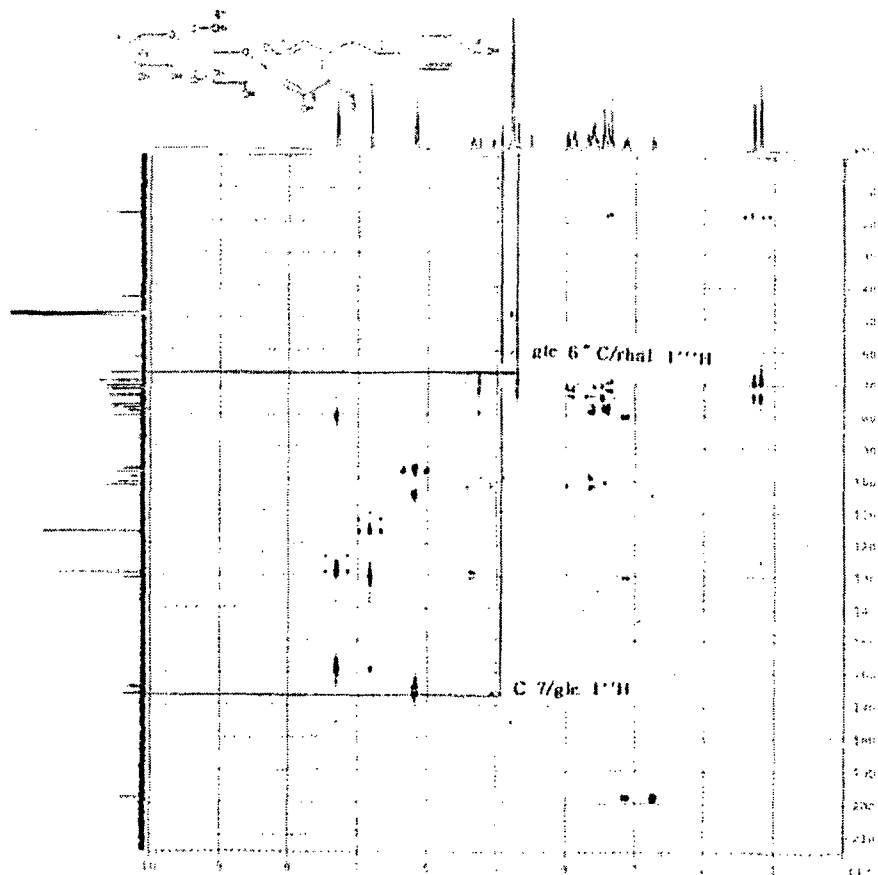


Fig. 4-8 HMBC Spectrum of Compound IV (500MHz, CD₃OD)

제 4 장 감기예방 및 치료보조 기능을 가지는 한방제품 개발

제 1 절 서설

감기의 예방원칙은 《素問·生氣通天論》에서 “正氣内存 邪不可干”라 하여 부정(扶正)과 거사(祛邪) 두 개 방면을 벗어나지 않는다는 예방원칙을 말하고 있는데, 식(食)醋(醋)黑(黑)蒸(蒸)으로 공기를 소독하는 것과 대청엽전수(大靑葉煎水)를 차처럼 마시는 등은 거사(祛邪)에 중점을 둔 것이다. 부정(扶正)은 사(邪)를 막을 수 있고 거사(祛邪)는 또한 정기(正氣)를 도울 수 있다. 일반적으로 허약한 사람은 부정(扶正)을 위주로 하고 건강한 사람은 거사(祛邪)를 위주로 하지만 구체적인 운용시에는 반드시 천시(天時), 지역 등의 요소와 결합시킨다.

감기예방 및 치료보조 기능을 가지는 한방제품의 개발은 본 연구의 세부로 참여하는 풍한식품의 노하우를 최대한 살리면서 제2장과 제3장에서 연구된 결과를 기초로 하여 한방의 감기 예방과 치료 원리를 응용하여 기능성을 부여한 한방음료 및 떡제품으로 개발할 수 있는 기반 연구를 연구의 전략으로 정했다.

한방 감기 처방을 구성하고 있는 99종의 한약재에 대해 항인플루엔자 바이러스 활성을 조사하여 한방 기능성 제품으로 개발 가능한 21종의 한약재가 탐색되었고, 이 들을 한방방제의 기본원리인 군신좌사 및 칠정합화에 입각하여 새로운 감기예방 및 치료 보조효과가 있는 복합처방을 조사하였는데, NP-97-1이 기능성 식품으로 개발 가능성이 높다고 판단되었다.

본연구에서는 음료시장의 틈새제품으로 한의학의 감기 예방원리인 거사(祛邪)에 중점을 둔 음차법을 응용한 한방 음료제품과 인체의 항상성에 관련을 두어 감기 치료 보조식으로 떡제품을 전략적 브랜드화 할 수 있는 연구하였다.

제2절 항인플루엔자 바이러스 활성을 가지는 한약재를 이용한 새로운 감기예방 및 치료보조 기능을 가지는 처방의 개발

1. 개발전략

고도경제 성장시대인 오늘날 우리의 신체는 전반적인 환경 유해물질로부터 노출위험과 식생활 양식이 인스턴트 경향으로 인체면역기능이 과거에 비해 상당히 약화되어 있는 현실에서 감기는 계절에 관계없이 인체에 침습하여 발생하는 외감 질병으로 면역력의 저하를 초래하여 건강유지에 유해요인으로 작용하는 질병이다.

한방에서는 감기를 감모(感冒), 감한(感寒), 상풍(傷風)등의 범주에 속하는 처방을 사용하며, 발병의 원인으로는 정기(正氣)가 약해진 틈을 타서 풍(風), 한(寒), 서(暑), 습(濕)의 사기(邪氣)가 침입하여 생긴다고 본다. 감기의 1차 예방은 인체의 방어능력에 관계되기 때문에 감기는 발병되기 전 예방하는 것이 가장 중요하다. 한방에서 감기의 예방법으로 음식예방법을 중시여기고 있고, 반드시 휴식하는 데에 주의해야 하고 음식조양과 조기치료에 주의하여 감기를 방지하여 「만병의 근원을 사전에 차단해야 한다」고 음식의 섭생을 강조하고 있다.

최근 건강에 관련된 식·약품 시장이 급속히 성장되고 있고 한약재를 소재로 한 한방제품들이 시판되고 있는데, 신농본초경이나 동의보감의 수준을 벗어나지 못하고 있으며, 이의 실효성에 대한 과학적 데이터가 전무한 실정이고 실제로 가미되는 한약제도 과학적인 실험 검증을 거치지 못한 문제점을 지니고 있다. 감기 예방 또는 치료보조의 효과를 가지는 기능성한방제품은 아직 시판되거나 개발되고 있지 않으므로 기능성을 부여한 한방제품이 개발된다면 상업적 성공 가능성이 높다는 예측을 하고 있다.

본 연구에서 1차년과 2차년에 걸쳐 한방 감기 처방에 사용되고 있는 63종의 처방

을 검색하여 100종의 한약재에 대해 항바이러스 활성 스크리닝을 실시하였고, 국내외에서 시판하고 있는 한방제제에 대한 비교 실험도 병행하여 기초적인 데이터를 확보할 수 있었는데, 수종의 한약재가 감기 바이러스를 억제하는 활성이 있는 것을 확인하였다. 그리고 활성의 강·약의 정도에 따라 선정된 한약재를 3그룹으로 나누어 복합처방으로 조합하여 예비 지견을 얻었다.

본 연구에서는 얻어진 복합처방의 예비지견을 활용하여 감기 바이러스에 대해 활성을 가지고 있는 한약재중 항인플루엔자 활성이 탁월한 한약재 3종을 중심으로 한방 방제의 원리인 군신좌사와 칠정합화의 이론에 근간하여 신처방을 만들었고, 이들 처방중 NP-97-1을 응용하여 기능성 한방제품을 만들려고 한다.

2. 재료 및 연구방법

가. 한약재

유자는 전남 고흥농협을 통하여 구입하였는데, 덜익은 유자는 10월중순경에 계약채집한 것을 사용하였고, 그 외의 한약재는 경동시장에 위치한 이화당 한약국과 생약협회 국산 한약재 전시판매장에서 구입한 후 한국한의약연구원에서 감별하여 엄격히 선정하였고, 구입시기 별로 각각의 한약재들에 일련 번호를 붙이고 100g씩 보관하고 있다(제2장 참조).

나. 한약재들의 새로운 조합에 의한 신처방의 구성

1, 2차년에 항인플루엔자 바이러스 활성을 가지고 있는 한약재들이 검색되어서, 감기 바이러스에 대해 활성을 가지고 있는 탁월한 한약재중 5종을 중심으로 한방 방제의 원리인 군신좌사와 칠정합화의 이론에 근간하여 복합처방의 유형을 새로이 조합하였고, 또한 유자를 부위별로 준비한 후 이에 대한 항바이러스 활성 및 세포독성에 관

한 검색을 실시하였다. 개발전략도는 Fig. 1과 같다.

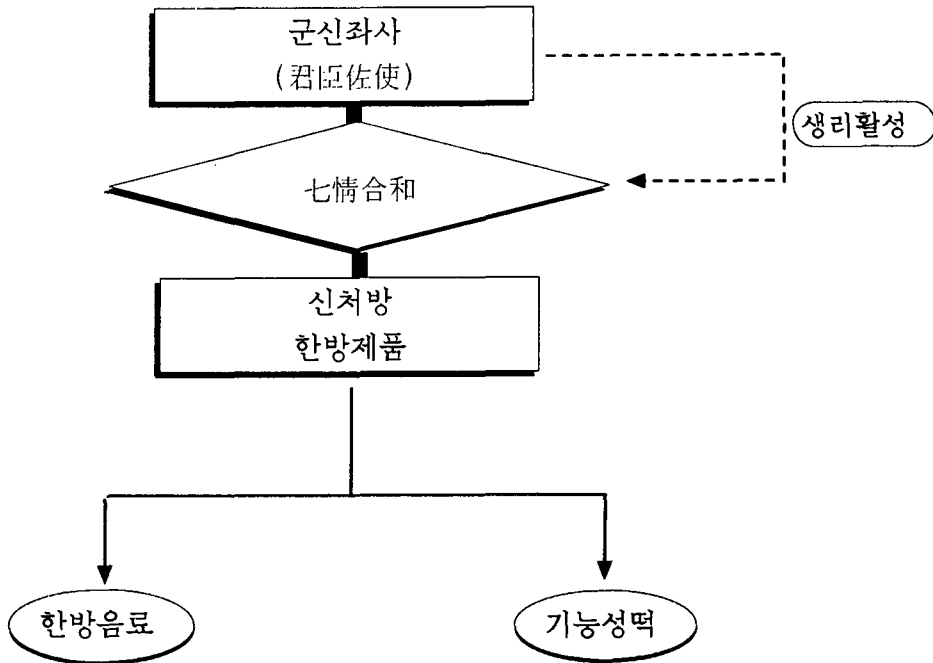


Fig. 1 신처방 개발 전략도

나. 항인플루엔자 바이러스 활성 검사 및 RBC에 대한 세포독성

제2장의 제2절 연구방법에 기재된 적혈구응집검사(HIT)에 의해 항바이러스 활성을 조사하였고 RRBC에 대한 세포독성을 검사하였다. 조합처방의 시료는 열수 추출하였다.

다. 약미(藥味)에 대한 관능검사

20세에서 30세까지의 담배를 피지 않은 여성을 무작위로 10명을 패널요원으로 선정하여 Sensory Score Sheet법으로 관능검사를 하였다. 관능검사에 사용한 Sensory Score Sheet은 아래와 같다. 관능검사 대상 시료는 한방제품으로 개발 가능한 NP-97-1을 4가지 유형으로 선정하여 실시하였다.

- 관능검사 대상 시료의 구성

◇시료1: MW40+MW89+MW100 ◇시료2: MW40+MW89+MW100+MW110

◇시료3: MW40+MW88+MW100 ◇시료4: MW40+MW88+MW100+MW110

Sensory Score Shee

◇ 다음 시료의 맛을 평가하고 전체적인 느낌을 7점 평점법으로 평가해 주십시오.

평가자 이름 :

평점방법 :								
(1) 색	:	1. 진한녹색	2. 연녹색	3. 녹색	4. 황색	5. 황갈색	6. 갈색	7. 자색
(2) 단맛	:	1. 매우 싱겁다	2. 싱겁다	3. 조금 싱겁다	4. 보통이다	5. 조금 달다	6. 달다	7. 매우 달다
(3) 쓴맛	:	1. 매우 약하다	2. 약하다	3. 조금 약하다	4. 보통이다	5. 조금 쓰다	6. 쓰다	7. 매우 쓰다
(4) 신맛	:	1. 매우 약하다	2. 약하다	3. 조금 약하다	4. 보통이다	5. 조금 시다	6. 시다	7. 매우 시다
(5) 향	:	1. 매우 나쁘다	2. 나쁘다	3. 조금 나쁘다	4. 보통이다	5. 조금 좋다	6. 좋다	7. 매우 좋다
(6) 전체적인 특성	:	1. 매우 나쁘다	2. 나쁘다	3. 조금 나쁘다	4. 보통이다	5. 좋은편이다	6. 좋다	7. 매우 좋다

◇ 평점방법을 읽고 1번~5번 시료에 대해 평가하여 주십시오

시료번호	-----	-----	-----	-----
1. 색	-----	-----	-----	-----
2. 단맛	-----	-----	-----	-----
3. 쓴맛	-----	-----	-----	-----
4. 신맛	-----	-----	-----	-----
5. 향	-----	-----	-----	-----
6. 전체특성	-----	-----	-----	-----
◆ 전체적인 느낌을 적어 주십시오(3줄정도)				

3. 결과 및 고찰

가. 한약재 간의 새로운 조합과 항인플루엔자 바이러스 활성 및 세포 독성

1, 2차년에 항인플루엔자 바이러스 활성이 탁월한 한약재중 5종을 중심으로 한방 방제의 원리인 군신좌사와 칠정합화의 이론에 근간하여 복합처방의 유형을 새로이 조합하고(Table 1), HIT를 이용하여 항바이러스 활성 및 세포 독성에 관한 검색을 실시한 결과는 다음과 같다.

Table 1. 신처방의 새로운 조합유형

◇조합 I	
1 :	MW 59 + MW 65 + MW 21 + MW 26 + MW 91
2 :	MW 59 + MW 65 + MW 21 + MW 26 + MW 91 + MW 74 + MW 80
3 :	MW 59 + MW 65 + MW 21 + MW 26 + MW 91 + MW 81 + MW 24
4 :	MW 59 + MW 65 + MW 21 + MW 26 + MW 91 + MW 74 + MW 80 + MW 81
5 :	MW 59 + MW 65 + MW 21 + MW 26 + MW 91 + MW 24
◇조합 II	
1 :	MW 40 + MW 89 + MW 100 + MW 90
2 :	MW 40 + MW 89 + MW 100 + MW 90
3 :	MW 40 + MW 89 + MW 100 + MW 90 + 3MW 26
4 :	MW 40 + MW 89 + MW 100 + MW 63 + MW 90
5 :	MW 40 + MW 89 + MW 100 + MW 63 + MW 26
6 :	MW 40 + MW 89 + MW 100 + MW 63 + MW 90 + MW 26
7 :	MW 40 + MW 89 + MW 100 + MW 110 + MW 90
8 :	MW 40 + MW 89 + MW 100 + MW 110 + MW 26
9 :	MW 40 + MW 89 + MW 100 + MW 110 + MW 90 + MW 26
10 :	MW 55 + MW 9 + MW 93 + MW 104 + MW 105 + MW 90
11 :	MW 55 + MW 9 + MW 93 + MW 104 + MW 105 + MW 26
12 :	MW 55 + MW 9 + MW 93 + MW 104 + MW 105 + MW 90 + MW 26
13 :	MW 40 + MW 89 + MW 90
14 :	MW 40 + MW 89 + MW 26
15 :	MW 40 + MW 89 + MW 90 + MW 26

1) 한약재의 조합에 의한 새로운 처방의 구성

한약재의 조합은 연구방법의 『Fig. 1 신처방 개발 전략도』에 의해 Table 1과 같이 구성하였다. 처방의 특징은 조합 I은 기능성 식품으로 응용할 때 치료보조의 성격을 강조하기 위해 화담지핵약(化痰止咳藥)으로 조합하였고, 조합 II는 민간에서 널리 이용하고 전통차를 한의학적 처방 원리에 입각하여 인체의 항상성을 높여 한방적 개념의 면역력을 증강시키는 것에 초점을 두어 이기약으로서 보기제의 범주에 속하도록 조합하였다.

조합 I에 대한 결과는 Table 2로 정리하였다. 항인플루엔자 바이러스 활성은 대부분의 조합처방에서 항바이러스 활성을 보였으며 특히 5번 처방에서 3.13mg/ml~100mg/ml 농도 구간에서 가장 강한 활성을 나타내었으나 제2장에서 검색한 NP-97-1과 NP-97-2에는 미치지 못해서 RBC에 대한 세포독성은 조사하지 않았다.

Table 2. Inhibitory effect of specific combinations on influenza virus Type A

Con. No.	1 100mg	2 50	3 25	4 12.5	5 6.25	6 3.13	7 1.56	8 780 μ g	9 390	10 195	11 97.5	12 48.7
1	++	++	++	++	++	+	-	-	-	-	-	-
2	++	++	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-
3	++	++	++	++	++	+	-	-	-	-	-	-
4	++	++	++	++	++	-	-	-	-	-	-	-
5	++	++	++	++	++	++	-	-	-	-	-	-
NP-1	++	++	++	++	++	++	++	++	++	-	-	-
NP-2	++	++	++	++	++	++	++	++	-	-	-	-

Note : Anti-influenza virus effects of each materials by heamagglutination test.

Con : concentration of each extract, ++ : Strong positive, + : Weak positive,

- : negative

조합 II에 대한 결과는 대부분의 조합처방에서 항바이러스 활성을 보였으며(Table 3), 특히 8, 9, 그리고 14번 처방에서 광범위한 범위에서 강한 활성을 보여 주었으며, 세포독성은 전혀 나타나지 않았다(Table 4). 처방 8, 9, 그리고 14번은 NP-97-1 과 NP-97-2와 비슷한 효과를 나타냈다. 배합조성이 NP-97-1 과 NP-97-2와 거의 유사하나 특이한 것은 유자의 사용에 있어 덜 익은 유자 대신 익은 유자를 사용하였는데 약재 상호간에 있어 상승작용이 나타났다. 즉, 처방 7, 8, 그리고 9번에서 보면, 기본 한약재가 모과, 유자, 생강, 후박인데 대추를 추가한 처방 8번은 390 μ g/ml~100mg/ml 농도 범위에서 항바이러스 활성을 나타냈는데 비해 감초를 추가한 처방 7번은 3.13mg/ml~100mg/ml 농도 구간에서 활성을 나타냈고 대추와 감초를 추가한 처방 9번은 780 μ g/ml~100mg/ml 농도 범위에서 항바이러스 활성을 나타냈다. 또한, 기본 한약재가 모과, 유자인 처방 13, 14, 그리고 15번에서 대추만을 추가한 처방 14번이 390 μ g/ml~100mg/ml 농도 범위에서 항바이러스 활성을 나타냈다. 대추를 추가한 처방이 항바이러스에 대한 활성이 감초를 가한 처방보다 강한 결과를 얻었다.

이 결과에서 대추는 처방에서 약재간의 항바이러스 활성을 상승시키고, 감초는 억제시키고 있다고 생각되어지며, 대추를 사용하면 덜 익은 유자와 익은 유자를 모두 사용할 수 있어 제품 생산시 이러한 특성을 이용하면 유자의 수급조절을 원활히 할 수 있으리라 생각된다.

2) 유자의 부위별 생리활성

본 연구에서 100여종의 한약재에 대한 생리활성을 조사한 결과 유자가 가장 활성이 강했다. 유자의 구성 부위는 크게 세부분으로 나눌 수 있고 장기 저장하기가 힘들다. 한방에서는 일반적으로 건조하여 사용하는데, 유자의 부위에 따라서 약성이 달라진다는 것이 한의학적 사고이다. 본 연구에서 유자의 부위에 따른 항바이러스 활성을 조사한 결과 피와 종자를 분리하지 않은 유자 전부분을 사용한 것이 가장 강한 항바이러스 활성을 나타내었고 세포독성은 25mg/ml~100mg/ml 농도 구간에서 나타났으며 그 중 표피부분에서 가장 높게 나타났다(Table 5, 6).

Table 3. Inhibitory effect of specific combinations on influenza virus type A.

Con. No.	1 100mg	2 50	3 25	4 12.5	5 6.25	6 3.13	7 1.56	8 780 μ g	9 390	10 195	11 97.5	12 48.7
1	++	++	++	++	++	-	-	-	-	-	-	-
2	++	++	++	++	++	++	++	-	-	-	-	-
3	++	++	++	++	++	++	+	-	-	-	-	-
4	++	++	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-
5	++	++	++	++	++	++	++	-	-	-	-	-
6	++	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
7	++	++	++	++	++	+	-	-	-	-	-	-
8	++	++	++	++	++	++	++	++	+	-	-	-
9	++	++	++	++	++	++	++	+	-	-	-	-
10	++	++	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
11	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	++	++	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
13	++	++	++	++	++	++	+	-	-	-	-	-
14	++	++	++	++	++	++	++	++	+	-	-	-
15	++	++	++	++	++	+	-	-	-	-	-	-
NP-1	++	++	++	++	++	++	++	++	++	-	-	-
NP-2	++	++	++	++	++	++	++	++	-	-	-	-

Note : Anti-influenza virus effects of each materials by heamagglutination test.

Con : concentration of each extract, ++ : Strong positive, + : Weak positive,

- : negative

Table 4. Cytotoxicity of specific combinations against RBC

Con. No.	1 100mg	2 50	3 25	4 12.5	5 6.25	6 3.13	7 1.56	8 780 μ g	9 390	10 195	11 97.5	12 48.7
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NP-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NP-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Note : Cytotoxicity to red blood cells determined by heamagglutination test with control drug. , Con : concentration of each extract, + : positive, - : negative

Table 4. Inhibitory effect of part Of a citron on influenza virus type A.

Con. / No.	1 100mg	2 50	3 25	4 12.5	5 6.25	6 3.13	7 1.56	8 780 μ g	9 390	10 195	11 97.5	12 48.7
1	-	-	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++
2	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	+	++	++	++	++	++	+	-	-	-
NP-1	++	++	++	++	++	++	++	++	++	-	-	-
NP-2	++	++	++	++	++	++	++	++	-	-	-	-

Note : Anti-influenza virus effects of each materials by heamagglutination test.

Con : concentration of each extract, ++ : Strong positive, + : Weak positive,

- : negative

1 : No. 89 the whole of a citron, 2 : No. 89 the skin of a citron ,

3 : No. 89 peel a citron

Table 5. Cytotoxicity of part Of a citron against RBC

Con. / No.	1 100mg	2 50	3 25	4 12.5	5 6.25	6 3.13	7 1.56	8 780 μ g	9 390	10 195	11 97.5	12 48.7
MW-1	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MW-2	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MW-3	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NP-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NP-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Note : Anti-influenza virus effects of each materials by heamagglutination test.

Con : concentration of each extract, ++ : Strong positive, + : Weak positive,

- : negative

1 : No. 89 the whole of a citron, 2 : No. 89 the skin of a citron ,

3 : No. 89 peel a citron

나. 약미(藥味)에 대한 관능검사

관능평가에 대한 결과는 냄새는 4가지 시료 모두 보통이하의 약한 향을 지니는 것으로 나타났으며, 색은 시료 1과 4가 보통 보다는 진한 것으로, 다른 시료의 경우는 거의 비슷하게 나타났다. 단맛의 경우는 모든 시료에서 보통이하의 약한 맛으로, 시료 2, 4는 매우 약한 단맛을 지녔다. 쓴맛은 시료 3는 쓴맛이 매우 약하였으나, 다른 시료들은 매우 강한 쓴맛을 나타냈다. 신맛의 경우는 시료 2가 가장 신맛을 가진 것으로 나타났다. 그리고 전체적인 기호도 평가에서는 시료 2가 매우 나쁜 것으로 평가되었고, 시료 3와 4만이 겨우 보통이라는 평가를 받았다. 그러나 전체적으로 볼 때, 향은 매우 약하였으나 색은 적당했으며, 단맛보다는 신맛을, 신맛 보다는 쓴맛을 강하게 느끼는 것으로 평가할 수 있었다(Table 6).

Table 6. 관능검사 결과

	시료 1	시료 2	시료 3	시료 4
냄새	4.94±2.19	3.71±4.08	3.27±2.50	4.76±2.73
색	6.60±1.78	4.29±1.61	5.26±1.73	6.10±2.26
단맛	3.46±3.18	1.40±1.90	5.33±2.34	1.80±1.71
쓴맛	6.77±3.05	8.90±1.67	3.27±2.79	7.76±2.53
신맛	4.01±2.00	5.57±3.37	3.94±3.15	3.26±1.99
전체적인 평가	4.09±2.47	1.81±2.41	5.33±1.00	2.87±1.87

시료1: MW40+MW89+MW100 시료2: MW40+MW89+MW100+MW110

시료3: MW40+MW88+MW100 시료4: MW40+MW88+MW100+MW110

4. 참고문헌

- 1) Alan, P.K., and Margaret, S.P. W.H.O. Concepts and procedures for laboratory-based Influenza surveillance. Center for disease control. U.S. Public health Service. Atlanta. GA (1982).
- 2) W.H.O. The role of genetic characterization of viruses in relation to Influenza surveillance and epidemiology. Bull. W.H.O. 59:875 (1981).
- 3) Tyeryar, F.J. Jr., Richardson, L.S. and Belshe, R.B. Report of a workshop on respiratory syncytial virus and para influenza viruses. J. Infect Dis. 137 : 835 (1978).
- 4) 川岸舜朗. 食品中の生體機能調節物質研究法, 學生出版社, 東京(1996)
- 5) 芒井綜一. 機能性食品の研究, 學生出版社, 東京(1995)
- 6) 정장현. 감기에 대한 한의학과 서양의학의 인식 비교 (1995).
- 7) 尹吉榮: 東醫方劑學, 미네르사, 1964
- 8) 李尙仁, 康舜洙: 方劑學, 癸丑文化社, 1977
- 9) 朱榮丞외: 方劑學, 永林社, 1998
- 10) 許浚: 東醫寶鑑. 南山堂. 1989

제3절 전통 한방처방의 감기억제 약리작용에 기초한 음료의 제품화 연구

1. 개발전략

경제성장에 따른 식생활의 변화와 함께 건강에 관한 관심이 높게 되게 되는 것은 지극히 자연스러운 현상이다. 식품에 대한 요구 성향도 단순기능에 머무르는 것이 아니라 새로운 형태의 생리적 기능을 갖는 기능성 식품을 사회적으로 요구되고 있다. 이러한 식품에 기능성을 부여하기 위한 노력들은 많이 있어 왔으나 소재의 탐색과 분명하고 과학적인 기능성을 확증하는 면에서는 극히 한정적이었다. 이러한 사회적 요구에 부합시키기 위한 식품 개발의 일환으로 최근 한방 및 한약제를 소재로 한 건강식, 음용식 등이 제품화되어 시판되고 있다. 그러나 그들 중 많은 수의 제품들은 과학적 검증이 생략된 상태로 구전되어오거나, 한방에서 약용으로의 기능을 갖는다는 이유로 시판에 직접 돌입하는 실정이다.

본 연구에서 기능성 확인 한가지 방법으로 항산화 활성을 중요하게 조사하고 있는데 이는 산화 생성물들의 체내 생리적 작용에 영향을 크게 미치기 때문이다. 지방질의 과산화반응은 비교적 균질 상태인 유지는 물론, 각종 식품이나 micelle, liposome, membrane 등과 같은 불균질 상태의 체계에서도 일어나고 있다. 이 반응은 내재 인자들과 radicals 그리고 외적 인자들로 인하여 개시된다. 체내에서 일어나는 산화반응에서 생성되는 각종 radical이나 2차 산물들은 주변에 공존하고 있는 단백질과 비타민 등의 생체성분과 다양하게 반응하게 되고, 따라서 영양가 저하, 생체 활성 및 생화학적 기능 손상 현상이 일어나게 된다. 그리고 바람직하지 않은 냄새 성분이 생기게 되고 독성학적 문제까지 야기된다. 특히 이들에 의한 생체 단백질 변화 및 효소의 활성저하, 비타민의 co-oxidation, DNA 손상, 노화 및 발암, 생체내 방어 시스템 저하 등에

대한 많은 연구보고들과 이에 관련된 천연 항산화제에 관련된 연구결과들이 오늘날 크게 주목되고 있다.

항산화제는 미국의 경우 1947년에 유지의 안정을 위하여 사용하기 시작하였고, 이들의 주기능은 free radical을 함유한 유지에 전자 혹은 수소를 공여하여 복합체를 만들게 하는 과정이다.

천연 항산화제는 대체로 BHA, BHT 등의 합성 항산화제보다 가격이 비싸고 효율 역시 합성 항산화제보다 낮으므로 합성항산화제 만큼 널리 사용되지는 않았다. 그러나 합성 항산화제의 안정성에 관한 우려와 소비자의 거부감이 날로 심해짐에 따라 미국, 일본 등 선진 각국에서 합성 항산화제에 대한 규격이 엄격해지고 합성 항산화제의 발암성, 안정성 등에 의문이 제기되면서 식품 산업 등의 이용면에서 새로운 관심을 크게 얻고 있다.

근래에 식품에서 항산화기작에 대한 연구로는 문등의 우육지방질의 산화에 미치는 간장의 항산화작용에 관한 연구, 김등의 야생초 추출물에 의한 간장내 활성산소 생성과 항산화 효소계 조절에 관한 연구 등이 있으며 특히 한방 처방에 사용되는 물질을 이용한 연구로는 김등의 국내산 생약추출물의 항산화 효과 및 생리활성, 박등의 결명자 추출물의 아질산염 소거인자의 특성, 임등의 옷나무 에탄올 추출물의 쥐 뇌세포에 대한 항산화효과 등이 있다. 이외에도 항산화기작에 대해 많은 연구가 이루어지고 있지만 우리 농산물을 비롯한 다양한 식품원료에서, 특히 대추, 모과, 유자에 대한 항산화기작이나 식품에서 중요한 의미를 갖는 미생물들에 미치는 영향이 어느 정도인지는 알려져 있지 않다.

한국한의학연구원에서는 이미 몇 가지 천연소재(한약재)를 혼합하여 추출한 추출물이 항바이러스 활성을 갖는다는 사실을 발견하였으며, 본 연구실에서는 혼합 추출물의 성분확인, 항산화 활성, 미생물에 대한 억제 효과 등을 확인한 바 있다. 그러나 여기에 사용된 천연소재 각각에 관한 연구가 없는 상태이다. 이들 소재 각각에 관한 기능성 확인 및 배합비율 선정, 실험실적 배합과 제조공정에 관한 연구가 선행되어야 하리라 사료된다. 천연소재들의 혼합된 한방처방에서 그 기능성이 확인되었더라도 사용된 천연소재들 각각의 기능을 확인할 필요가 대두되며 이들의 배합비율에 관한 사항 등도 연구되어야 한다.

따라서 본 연구의 목적은 NP-97-1의 혼합 열수추출물에서 조사된 기능성을 근거로 기능성 한방음료제품으로 산업화하는데 있다. 결국 개발된 한방처방에 근거한 기능성 식품으로의 용도 확대(예, 기능성 음료)를 위하여 제품의 특징과 산업적 제품화 공정에 관한 연구의 필요성이 대두된다. 특히 실험실 규모에서 제품 제조공정의 전체적 개념을 구성하고 제조공정에서 중요한 추출과 여과공정을 중심으로 연구되어야 하며 산업화하는 경우 제품에 영향을 미치는 중요 인자들을 어떻게 통제 가능한 범위에 들 것인가에 관한 연구가 필요하다.

본 연구는 제품화(음료제품) 공정연구에 중점을 두어 각 단위공정의 운전 조건설정의 기초 자료를 확보하는데 목적이 있으며 제품에서의 안정성, 관능성, 기능성에 요구되는 주요성분(무기질, 유기 화합물)에 관한 관능 및 성분 등에 관한 규격을 정하여 제품을 규격화(Standardization)하고 실제 제품화 공정에 적용 가능한 제품화 연구를 진행하고자 한다.

2. 재료 및 방법

1) 재료

본 연구에서 사용된 유자는 고품의 생산 농가로부터 구입했으며 대추와 모과 등은 서울 경동시장의 한약 재료상으로 구입하여 한구한의학연구원에서 등급을 판정한 한 재료를 사용하였다.

2) 성분 분석

무기 성분은 원자흡광광도법으로 측정하였다. pH, Aw(수분활성도 측정기, Hygroscop BT-RS1, rotronic AG, Swiss)를 측정하고 당, 산도 등 유기성분은 HPLC(HP-1050, USA)와 기타의 적합한 방법을 이용하여 분석하였다. 항산화물질로 알려진 화합물들(protein, aromatic amine 및 phenol 등)의 용출정도를 측정하기 위하여 spectrophotometer (JASCO V-570, Japan)로 285nm에서 각 시료들의 흡광도를 측정한다.

다. 시료의 갈색화 반응 생성물질의 농도를 나타내는 갈색도는 500nm에서, 혼탁정도는 700nm에서 흡광도를 측정하였다.

3) 제품 제조공정의 확립 방법

한약재의 혼합추출조건은 처리온도와 시간을 달리하여 성분의 변화를 조사한 후 설정하였다. 침전의 생성은 천연 소재를 추출하여 사용하기 때문에 불가피 할 것으로 사료되므로 여과공정의 설정은 추출공정과 동일한 방법으로 성분의 변화를 조사한 후 그 기준을 설정하되 최종적으로는 particle size를 분석하여 제품제조에 합당한 filter pore size를 제시하여 현장화 가능한 설비의 규격을 제시하였다.

다음의 추출조건(추출방법, 추출온도, 추출시간)에 따라서 여과방법(filter pore size)별 각 항목을 분석하였다.

(1) 실험방법을 간략히 기술하면 다음과 같다.

- 시료를 각각 50g씩(기 설정된 배합비) 5-7조각으로 분할한다.
- 상기 시료들을 혼합하고 여기에 증류수를 1.5 l 첨가한다.
- 각 추출조건별(하기 참조)로 추출한다.
- 영성한 거즈로 1차 불용물을 거른다.
- 상기 1차 거즈 여과물을 filter의 pore size 순으로 상압 또는 감압 여과한다.

(2) 추출조건

추출 기기는 증부고압기와 순환식 약탕기를 사용하였으며, 온도는 100℃, 110℃, 121℃에서 시행했으며, 추출시간은 10분, 30분, 60분, 180분으로 하였다.

(3) 여과조건

거즈 여과를 거친 후 filter pore size를 다음과 같이 하여 순차적으로 여과하고 몇 가지 항목을 분석하였다. (1) 거즈 여과, (2) 20-25 μ m, (3) 8 μ m, (4) 2.5 μ m, (5) 0.45 μ m의 pore size를 갖는 Whatman filter paper를 사용하였다.

(4) 입자크기의 분석

재료로 사용되는 한약재를 독립적으로 또는 혼합 추출한 후 다음과 같이 분석한다. 각 시료를 121℃에서 30분간 고압 증부 추출 한 후 영성한 가재(4겹)로 1차 불용물을

불용물을 거르고 Whatman filter paper No. 2(8 μ m)로 감압 여과한 시료를 Coulter Multisizer II(Coulter Co., ltd, USA)로 분석한다.

4) 관능검사

공주대 식품공학과 남녀학생을 선발하여 미리 교육을 시킨 후 패널요원으로 이용하여 제품의 주요 항목인 맛, 향, 색깔, 전체적 기호도를 항목으로 하여 관능과 기호성을 조사하였다.

관능검사는 실험실에서 준비한 한약제 혼합 추출시료를 기본으로 제작하여 실시하였으며 다음과 같은 방법으로 실시하였다.

- 관능항목 : 신맛, 단맛, 쓴맛, 떫은맛, 한약향, 색깔 및 전체 기호도를 조사하였다.
- 관능 평가법 : 7점 분석법
- 관능검사 요원 : 21 명(예비 훈련을 받은 식품공학과 학생)
- 평가방법 : 평가된 각 항목의 총점을 평균한 점수를 비교하였다.
- 관능검사표 : 아래 표와 같다.

	1점(약)	2점	3점	4점(중)	5점	6점	7점(강)
신맛							
단맛							
쓴맛							
떫은맛							
한약향							
색깔							
전체기 호도							

5) 보존 중 품질 변화

제품의 보존성과 안정성을 조사하기 위하여 두 가지 온도(30도, 50도)에서 10일 동안 보존하면서 제품의 pH와 흡광도(285nm, 500nm, 700nm)의 변화를 분석하고 상기 온도에서 25일 보존 후 관능을 비교, 조사하였다.

3. 결과 및 고찰

본 연구의 결과를 항목별로 세분하여 보면 다음과 같다.

1. 추출 및 여과 방법 설정을 위한 조건별 실험

pH는 전 추출조건에서 대략 4.1 - 4.4의 범위에 있으나, 약탕기의 경우 고압추출보다 높게 나타났다.

환원당은 추출시간과 추출시간, 추출방법에 따라 용출 정도가 영향을 받았으며, 증부고압의 121℃, 30분 추출과 순환 약탕기 180분 추출인 경우 각각 1.9%, 2.9%가 용출되었다.

항산화성 물질과 관련이 있는 물질인 aromatic amine류, phenol성 물질의 용출정도를 보기 위하여 285nm에서 조사한 흡광도를 보면 동일온도에서는 추출시간에 따라 증가하는 경향을 보여 110도 180분 동안 추출할 경우 0.784, 순환식 약탕기인 경우 180분 추출에서 0.722로 유사한 수준의 흡광도를 보였다. 갈색화 반응 생성물의 용출정도를 나타내는 500nm에서의 경향과 추출물의 혼탁 정도를 보기 위하여 700nm에서 측정된 흡광도인 경우도 동일 온도에서 추출시간에 따라 285nm에서의 흡광도와 유사한 경향을 보였다.

추출과 여과조건을 달리했을 경우의 시료의 성분 변화를 보면 다음 [표 1], [표 2], [표 3], [표 4], [표 5]와 같았다.

[표 1] 거즈 여과시 추출조건에 따른 성분의 분석

추출방법	증부고압 110℃*10분	증부고압 110℃*60분	증부고압 110℃*180분	증부고압 121℃*30분	순환식약탕기 100℃*60분	순환식약탕기 100℃*180분
pH	4.33	4.05	4.13	4.18	4.36	4.41
환원당(g/l)	0.11	0.13	2.16	19.1	1.09	29.2
흡광도(285nm, 50배 희석)	0.411	0.511	0.784	0.582	0.382	0.561
흡광도 (원액, 500nm)	0.941	0.943	2.037	1.211	0.559	0.506
혼탁도 (원액, 700nm)	0.499	0.397	0.890	0.512	0.212	0.075
수분(%)	97.3	97.4	97	97.4	97.8	96.5
가용성고형분 (Brix)	2.8	3.0	3.1	3.0	2.3	4.2
총산도 (%, pH 8.3)	0.11	1.24	1.31	1.36	0.97	0.17
수분활성도	0.983	0.984	0.988	0.988	0.988	0.991

[표 2] pore size가 20-25um인 filter 여과 후 성분의 변화

추출방법	증부고압 110℃*10분	증부고압 110℃*60분	증부고압 110℃*180분	증부고압 121℃*30분	순환식약탕기 100℃*60분	순환식약탕기 100℃*180분
흡광도(285nm, 50배 희석)	0.414	0.474	0.762	0.553	0.375	0.741
흡광도 (원액, 500nm)	0.744	0.758	1.604	1.139	0.529	1.836
혼탁도 (원액, 700nm)	0.339	0.255	0.568	0.429	0.179	0.807
수분 (%)	97.4	97.4	97.1	97.4	97.8	96.5
가용성고형분 (Brix)	2.8	3.0	3.1	3.0	2.3	4.0
총산도 (%, pH 8.3)	0.11	1.19	1.30	1.29	0.95	0.17

[표 3] pore size가 8um인 filter 여과 후 성분의 변화

추출방법	증부고압	증부고압	증부고압	증부고압	순환식약탕기	순환식약탕기
	110℃*10분	110℃*60분	110℃*180분	121℃*30분	100℃*60분	100℃*180분
흡광도(285nm, 50배 희석)	0.402	0.490	0.755	0.569	0.375	0.717
흡광도 (원액, 500nm)	0.640	0.710	1.566	1.145	0.490	1.676
혼탁도 (원액, 700nm)	0.263	0.222	0.559	0.438	0.166	0.694
수분 (%)	97.4	97.3	98	97.3	98.7	96.5
가용성고형분 (Brix)	2.8	3.0	3.1	3.0	2.2	4.0
총산도 (%, pH 8.3)	0.11	1.17	1.35	1.31	0.96	0.17

[표 4] pore size가 2.5um인 filter 여과 후 성분의 변화

추출방법	증부고압	증부고압	증부고압	증부고압	순환식약탕기	순환식약탕기
	110℃*10분	110℃*60분	110℃*180분	121℃*30분	100℃*60분	100℃*180분
흡광도(285nm, 50배 희석)	0.381	0.487	0.739	0.556	0.360	0.673
흡광도 (원액, 500nm)	0.471	0.616	1.405	0.967	0.433	1.472
혼탁도 (원액, 700nm)	0.147	0.164	0.437	0.302	0.132	0.579
수분 (%)	98.1	97.4	97.0	97.5	97.8	96.6
가용성고형분 (Brix)	2.8	3.0	3.1	3.0	2.2	4.0
총산도 (%, pH 8.3)	0.12	1.18	1.33	1.31	0.95	0.16

[표 5] pore size가 0.45um인 filter 여과 후 성분의 변화

추출방법	증부고압 110℃*10분	증부고압 110℃*60분	증부고압 110℃*180분	증부고압 121℃*30분	순환식약탕기 100℃*60분	순환식약탕기 100℃*180분
흡광도(285nm, 50배 희석)	0.386	0.457	0.686	0.527	0.363	0.561
흡광도 (원액, 500nm)	0.244	0.423	0.848	0.576	0.533	0.506
혼탁도 (원액, 700nm)	0.029	0.070	0.199	0.114	0.208	0.075
수분 (%)	97.3	97.4	97.1	97.4	97.9	96.6
가용성고형분 (Brix)	2.8	3.0	3.1	3.0	2.2	4.0
총산도 (%, pH 8.3)	0.12	1.19	1.35	1.33	0.95	0.16

2. 추출방법 및 여과조건

상기의 조건별 실험 결과로부터 추출 및 여과 방법을 고찰해 보면 다음과 같다.

각 추출조건에 따른 기능성(항바이러스성 실험)조사 연구가 본 연구와 병행하여 실시되어야하나, 본 연구가 현장화를 목적으로 한다는 점에서 상기 추출조건 중 121℃, 30분의 조건이 제품화를 위한 현장화의 실현 가능성이 높다고 하겠다(참여업체의 설명을 근거로 함).

따라서 상기 추출조건들 중에서 증부고압 조건(121℃, 30분간)에서 추출한 시료를 여러 가지(pore size별) filter로 여과를 행했을 경우 성분의 변화를 보면 표6과 같았다.

[표 6] 증부고압(121℃, 30분) 추출조건에서 여과조건별 성분의 변화

filter pore size	거즈	20-25um	8um	2.5um	0.45um
흡광도(285nm, 50배 희석)	0.582	0.553	0.569	0.556	0.527
흡광도(원액, 500nm)	1.211	1.139	1.145	0.967	0.576
혼탁도(원액, 700nm)	0.512	0.429	0.438	0.302	0.114
수분(%)	97.4	97.4	97.3	97.5	97.4
가용성고형분(Brix)	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
총산도(% , pH 8.3)	1.36	1.29	1.31	1.31	1.33

filter pore size에 따른 성분변화를 보면 항산화성 물질과 관련이 있는 물질의 용출 정도를 나타내는 285nm에서 조사한 흡광도는 약 0.53~0.58 사이이며, 갈색화 반응 생성물의 용출정도를 나타내는 500nm에서의 흡광도는 0.58~1.21로 여과지의 pore size에 따라 차이가 많이 났으며, 추출물의 혼탁 정도를 나타내는 700nm에서 측정된 흡광도인 경우도 0.11~0.51로 차이가 많이 났으나 가용성 고형분, 총산도에서는 차이가 없었다.

이러한 본 연구의 결과와 현장의 여과 능력 등 현장화가 가능한 조건으로 추출방법은 121℃에서 30분의 고압 증부 추출 조건을 선정하고, 여과는 Whatman No. 2(8μm) 여과지와 유사한 능력의 여과기를 사용하는 것으로 제조 조건을 정하였다.

따라서 본 연구에서 진행된 추출과 여과조건을 다시 한번 정리하면 다음과 같다.

연구의 재료로 사용되는 한약재를 추출, 여과하는 방법은 다음과 같다.

- (1) 추출방법은 상기 실험 1의 결과와 생산공정에 대한 적합성을 고려하여 121℃에서 30분간 고압 증부 추출 조건을 선정하고, 여과는 Whatman No. 2(8 μ m) 여과지를 사용하여 여과하였다.
- (2) 시료 각 16.7g과 NP-97-1(66.8g)를 5-7조각으로 분할하여 실험목적에 맞도록 독립적으로 또는 혼합하여 추출한다.
- (3) 상기 시료들을 혼합하고 여기에 증류수를 0.5 ℓ 첨가한다.
- (4) 121℃에서 30분간 고압멸균한다.
- (5) 영성한 가재로 1차 불용물을 거른다.
- (6) Whatman filter paper No. 2(8 μ m)로 감압 여과한다.
- (7) 각 여과물들은 다음 항목을 분석한다.

본 연구에서 설정된 조건은 협력업체가 실질적으로 제품을 생산할 경우 제조조건이 될 것이며 공정의 개선 활동은 현장화 이후 지속적으로 진행되어야 할 것으로 사료된다.

3. 각 한약재료별 추출시료의 일반적 성질

[표 7] 추출시료의 흡광도 및 일반 분석

	혼합물	유 자	모 과	대 추
거즈여과 후 액량(ml)	415	480	435	450
pH	4.26	3.5	4.15	4.86
환원당(당도) mg/ml	11.18	2.64	1.44	11.18
흡광도 285nm	원액: 2.701	2.695	2.676	2.602
	10배희석액: 2.315	0.580	1.576	1.040
	50배희석액: 0.538	0.121	0.325	0.220
흡광도 500nm	원액: 0.991	0.086	0.509	0.315
	10배희석액: 0.090	0.007	0.046	0.029
	50배희석액: 0.023	0.002	0.009	0.005
혼탁도 700nm	원액: 0.355	0.034	0.077	0.060
	10배희석액: 0.029	0.004	0.007	0.004
	50배희석액: 0.005	0.002	0.002	0.001
Aw	0.968	0.968	0.971	0.976
수분함량	97.3	99.5	99.1	98.7
건물량(105/24h)	2.7	0.5	0.9	1.3
가용성고형분 (brix)	3.6	1.6	1.0	1.4
총산도(pH8.3)	0.12	0.06	0.04	0.04
TN (mg/ml)	1.4	1.4	0	0

4. 각 한약재료별 추출시료의 무기성분

주재료로 사용되는 유자, 대추, 모과를 독립적으로 또는 혼합 추출하는데 다음과 같은 조건이다.

- (1) 추출방법은 121℃에서 30분간 고압 증부 추출 하고,
- (2) 영성한 가재로 1차 불용물을 거른다.
- (3) Whatman filter paper No. 2(8μm)로 감압 여과한다.
- (4) 각 시료에 대한 분석결과는 표9와 같다.

[표 8] 추출시료의 무기성분

분석항목(%)	혼합물	유 자	모 과	대 추
고형분(TS)(%)	2.662	0.410	0.653	1.173
회분(Ash)(%)	0.279	0.135	0.152	0.140
P(ppm)	24	2	16	14
Ca(ppm)	37	14	20	6
Mg(ppm)	33	5	13	7
K(ppm)	521	70	255	237
Fe(ppm)	1	trace	trace	trace

*고형분과 회분은 %(w/w)이며, 그외 무기이온은 ppm(w/v)단위임.

5. 추출 시료의 입자분포

주재료로 사용되는 유자, 대추, 모과를 독립적으로 또는 혼합 추출하는데 다음과 같은 조건이다.

- (1) 추출방법은 121℃에서 30분간 고압 증부 추출하고,
- (2) 영성한 가재(4겹)로 1차 불용물을 거른다.
- (3) Whatman filter paper No. 2(8 μm)로 감압 여과한다.
- (4) 각 시료에 대한 입자 분포의 결과는 다음과 같다.

[표 9] 추출시료의 입자 분포(단위, 입자직경, μm)

시료분율(%)	혼합물	유 자	목 과	대 추
10	3.80	3.58	10.47	2.98
25	4.76	4.19	14.11	3.48
50	6.24	4.98	18.15	4.16
75	8.69	6.36	22.93	4.94
90	11.24	8.12	30.66	5.87
입자평균직경 (μm)	7.00	5.52	19.32	4.40

본 실험에 사용된 시료는 전술된 바와 같이 정성적으로 사용되는 Whatman filter paper No. 2(8 μm)를 사용하여 여과된 시료이다. 따라서 대략적인 pore size만을 나타내어 본 실험의 비교 실험에는 사용 가능하나 정확한 입자의 size를 표현해주지는 못한다.

particle size analyser로 분석한 상기 표 9에서 보는 것처럼 유자, 모과, 대추 혼합 추출물에서는 평균 입자크기가 7.00 μm 로 본 실험에서 사용된 filter size와 유사

하였다.

유자와 대추를 독립적으로 추출할 경우 시료의 90%가 각각 $8.12\mu\text{m}$, $5.87\mu\text{m}$ 에 분포되고 있으나 모과의 경우는 $30.66\mu\text{m}$ 로 본 실험에서 사용된 filter에 의하여 여과가 되었음에도 입자직경이 크게 나타났다. 이는 아마도 여과 후 모과 입자의 엉김에 의해 나타난 결과로 생각된다. 결국, 혼합 추출물의 입자 분포에 모과가 큰 영향을 미칠 것으로 판단된다.

6. 한약재 혼합추출액의 관능검사

설정된 제조방법에 의해 제조된 “한약재 혼합추출 여과액” 시료의 기호성을 향상시키기 위하여 3종류의 시료들을 대상으로 관능검사를 시행하고 이 결과를 근거로 본 연구에 의한 제품의 기호성을 보강하고자 한다.

1) 시료 : 관능검사에 사용된 시료는 다음과 같다.

- (1) 시료1 : 혼합추출원액(본 실험실 제조, 거즈여과)
- (2) 시료2 : 혼합추출원액(시료1의 Whatman filter paper No. 2($8\mu\text{m}$)여과시료)
- (3) 시료3 : 캔시료(풍한식품 제조)
- (4) 시료4 : 파우치(한국 한의학 연구원 제조)

2) 관능검사의 결과

관능 결과는 관능 요인들이 부여한 점수를 평균으로 표현하였으며 표 10과 같다.

[표 10] 각 시료별 관능검사 결과 (평균점수, 7점 만점)

	시료1	시료2	시료3	시료4
신미도	4.75	4.25	5.42	6.08
단맛	2.08	2.92	2.25	3.33
쓴맛	4.92	4.17	3.75	3.92
한약향	3.92	3.92	4.08	3.83
뽀은맛	4.08	3.67	2.25	6.17
색감	5.25	5.58	2.58	3.42
전체기호도	3.75	3.42	3.17	3.92

- (1) 신미도 : 신맛은 전 시료에서 중간(4점) 이상으로 느끼고 있으며, 시료2에서 가장 덜 느끼고 시료4에서 강하게 나타내고 있다.
- (2) 단맛 : 단맛은 주로 대추에 함유된 환원당에 기인되는데 전시료 모두가 약하다는 느낌을 갖고 있어 단맛 보강이 필요하다.
- (3) 쓴맛, 한약향 : 쓴맛도 중간 이상으로 느끼고 있으며, 특히, 쓴맛은 masking이 필요하다.
- (4) 뽀은맛 : 시료3과 시료 2에서 비교적 덜 느끼고 시료4에서 비교적 강하게 느끼고 있다.
- (5) 색감 : 색감에 대한 선호도는 시료2번이 좋게 나타났으며 진한 색을 보였던 시료 3,4번은 강하다는 평가를 보였다.
- (6) 전체기호도 : 전체적인 기호도면에 보통 정도로 그저 그렇다는 평가가 많았다.

3) 결론

상기 결과로부터 “실험 2”에서 이미 확립된 제조방법으로 제조된 시료 2는 전체적인 기호성을 높이기 위하여 단맛을 보강하고, 신맛과 쓴맛을 감추기(masking) 작업을

할 필요가 있다.

이를 위하여 한약재 혼합추출 여과액(시료2)에 올리고당과 벌꿀을 가미하여 관능검사를 다시 시행하여 제품화 방향을 정하기로 하였다.

7. 제품화

상기 관능검사 결과로부터 "한약재 혼합추출 여과액"의 신맛과 쓴맛을 보완(masking)하기 위하여 올리고당과 벌꿀을 가미하여 관능검사를 시행한 결과는 다음과 같다.

1) 시료

- (1) 시료(I) : "한약재 혼합추출 여과액"(실험 2의 제조방법에 의한 추출여과액)
- (2) 시료(II) : 시료(I) + 올리고당 2%
- (3) 시료(III) : 시료(I) + 벌꿀 2%
- (4) 시료(IV) : 시료(I) + 올리고당 1% + 벌꿀 1%

2) 관능검사 결과

[표 11] 각 시료별 관능검사 결과 (평균점수, 7점 만점)

	시료(I)	시료(II)	시료(III)	시료(IV)
신미도	4.6	4.2	5.3	4.2
단맛	2.8	5.3	4.4	3.6
쓴맛	3.6	2.4	2.9	2.8
한약향	3.9	4.3	4.5	4.6
뽀은맛	3.7	3.1	3.6	2.8
색감	4.1	4.4	5.1	5.2
전체기호도	3.4	4.9	4.4	4.7

3) 결론

상기의 표에서 보는 바와 같이 초기 혼합 추출시료의 관능검사시 보완 사항으로 평가된 신미도와 쓴맛 등이 개량되었으며 전체적인 기호도에서 비교적 양호하게 평가된 혼합 추출시료에 올리고당이 2% 첨가된 시료 II를 본 연구의 시제품으로 선정하였다.

8. 보존성

보존성 실험은 온도별(30도, 50도)로 하고 인자는 pH와 흡광도(285nm, 500nm, 700nm)로 하여 보존 중 성분의 변화를 측정하였다. 보존 기간의 예측은 관능검사 결과를 바탕으로 대략적으로 계산하였다.

본 실험에 이용된 흡광파장 285nm는 항산화 물질의 변화를 나타내며, 시료의 갈색화반응 생성물질의 농도를 나타내는 갈색도는 500nm서, 혼탁정도는 700nm에서 흡광도로 나타내었다. 시료는 전체적인 기호도에서 양호하게 평가된 한약제 혼합추출 여과액에 올리고당이 2% 첨가된 시료 사용하였다.

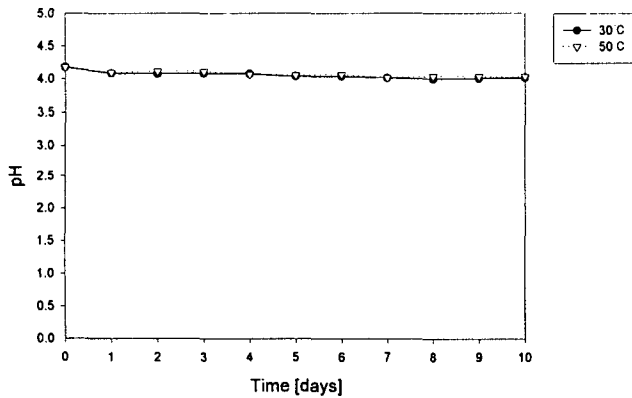
온도별(30도, 50도)로 10일 동안 보존하면서 1일 간격으로 pH와 흡광도(285nm, 500nm, 700nm)의 변화를 측정한 결과와 보존기간의 예측은 다음과 같다.

1) 보존온도에 따른 pH 변화

온도에 따른 pH변화의 차이는 없었으며 실험기간 동안 pH가 약 4.2에서 4.0에서 안정적 변화를 보였다.

[표 12] 보존온도별 pH 변화

	0일	1일	2일	3일	4일	5일	6일	7일	8일	9일	10일
30℃	4.18	4.09	4.08	4.09	4.08	4.04	4.04	4.02	4.00	4.01	4.02
50℃	4.18	4.10	4.12	4.12	4.07	4.06	4.07	4.02	4.04	4.04	4.04



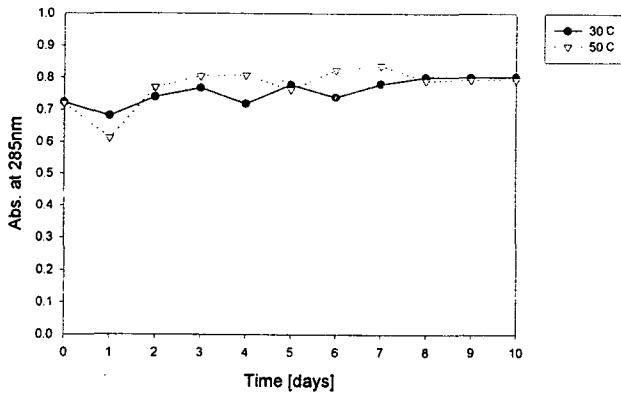
[그림 1] 보존온도별 pH 변화

2) 보존온도에 따른 항산화물질군의 변화

보존중 285nm에서의 흡광도 변화는 특징적 경향을 발견하기 어려웠으나 시험 전 온도구간에서 대략 0.723에서 시작하여 10일 후에는 0.8 정도로 증가되었으나 285nm에서 측정되는 항산화 물질군들의 변화는 현저하지 않는 것으로 생각된다.

[표 13] 보존온도별 285nm에서의 흡광도 변화

	0일	1일	2일	3일	4일	5일	6일	7일	8일	9일	10일
30°C	0.723	0.681	0.740	0.767	0.719	0.778	0.739	0.780	0.802	0.802	0.803
50°C	0.723	0.612	0.769	0.804	0.807	0.762	0.823	0.838	0.790	0.794	0.794



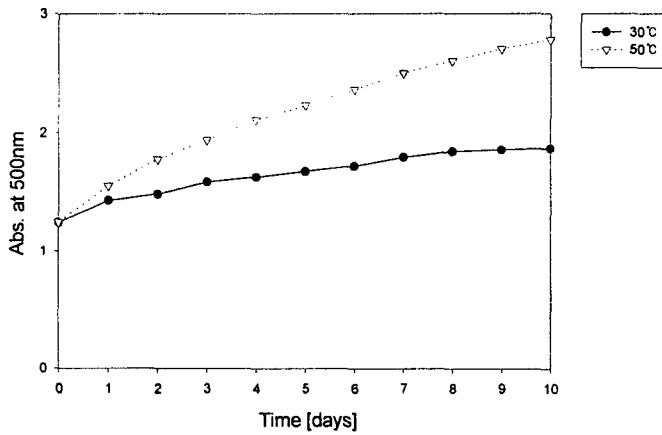
[그림 2] 보존온도별 285nm에서의 흡광도 변화

3) 보존온도에 따른 갈색화 반응물질의 변화

본항은 시료의 갈색화반응 생성물질의 농도 변화를 500nm에서 측정하였는데 온도에 따라서 거의 직선적인 증가를 하여 30도에서 초기 1.247에서 1.870으로 50도에서는 초기 1.247에서 2.782로 거의 직선적 증가를 하였다.

[표 14] 보존온도별 500nm에서의 흡광도 변화

	0일	1일	2일	3일	4일	5일	6일	7일	8일	9일	10일
30°C	1.247	1.431	1.486	1.589	1.629	1.678	1.722	1.797	1.847	1.859	1.870
50°C	1.247	1.554	1.779	1.940	2.108	2.228	2.362	2.498	2.601	2.702	2.782



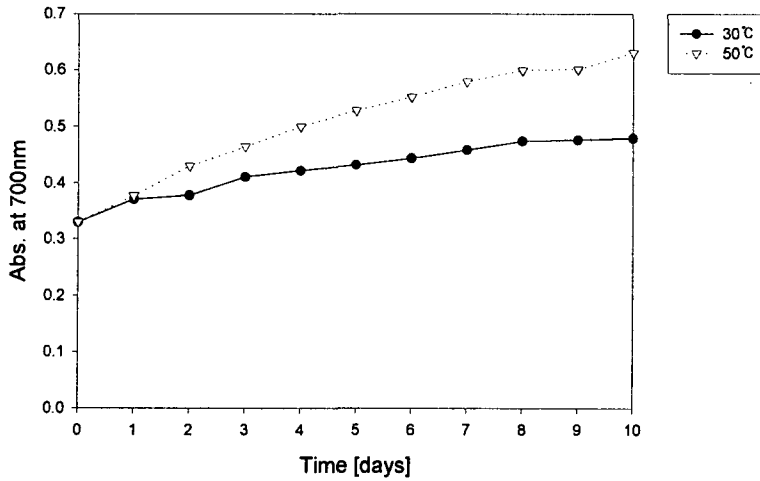
[그림 3] 보존온도별 500nm에서의 흡광도 변화

4) 보존온도에 따른 혼탁도의 변화

혼탁화를 비교하기 위하여 700nm에서 흡광도를 측정하였으나 본 결과에서 나타난 값은 혼탁에 의한 증가 보다는 오히려 갈색화의 증가에 기인된 증가로 보아야 할 것이다

[표 15] 보존온도별 700nm에서의 흡광도 변화

	0일	1일	2일	3일	4일	5일	6일	7일	8일	9일	10일
30°C	0.330	0.371	0.378	0.411	0.422	0.432	0.444	0.458	0.474	0.476	0.479
50°C	0.330	0.377	0.430	0.464	0.500	0.528	0.552	0.579	0.599	0.601	0.630



[그림 4] 보존온도별 700nm에서의 흡광도 변화

5) 보존온도에 따른 관능변화

30도와 50도에서 25일간 보존한 후 시행한 각 항목별 관능검사 결과로부터 일률적인 평가가 곤란하였으나 신미도의 경우 50도 보존인 경우 30도 보존보다 높게 나타났으나, 전체적인 기호도면에서는 4.3-4.4점으로 보통 정도의 기호성을 보였다.

색감에 대한 기호도 측면에서는 500nm에서 측정된 갈색도의 증가는 부정적 측면이 있다고 볼 수 없었다. 이는 한약제를 사용하는 제품의 특징으로 간주되기 때문인 것으로 생각된다. 실험 결과로부터 보존기간을 객관적으로 정하는데 상당한 무리가 있는 것으로 판단되었으며 본 제품의 항바이러스성에 대한 조사를 근거로 시행되어야 할 것으로 생각된다.

[표 16] 각 시료별 관능검사 결과 (평균점수, 7점 만점)

	30도/25일 보존시료	50도/25일 보존시료
신미도	3.3	5.1
단맛	2.6	3.3
쓴맛	2.3	2.6
한약향	2.6	3.0
뽀은맛	4.2	4.2
색감	3.6	4.1
전체기호도	4.3	4.4

9. 제품의 배합조성

본 연구의 결과에서 잠정적으로 설계된 시제품의 특징과 배합비율은 다음과 같으며 본 시제품의 생물학적 활성은 한국한의학 연구원에서 분석될 것이다.

상기 실험들을 근거로 실험실적으로 제조된 시제품은 생약취를 가진 약간 혼탁한 갈색의 액체이며 생약제제이므로 침전물이 생길 수 있다.

또한 시제품은 대추, 유자, 모과를 기본 한약재로 하며 관능 및 기호성 향상을 위하여 올리고당이 배합되었다.

본 연구의 시험 제품의 배합비를 보면 혼합 추출물을 기준으로 NP-97-1의 한약재가 각각 동량으로 3.34%씩을 함유하고 있으며, 프락토올리고당이 2% 첨가되었다.

4. 결론

몇 가지 한약재료를 원료로 기능성 한방 음료를 제품화 하기 위하여 시행된 본 연구 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 추출조건: 추출조건은 121℃, 30분에서 고압 증부기로 약제를 혼합하여 시행하는 것이 바람직하며 현장화의 실현 가능성이 높다고 하겠다.
2. 여과조건: 현장의 여과 능력등 현장화가 가능한 조건을 선정하되 8 μm 내외의 공극을 가지거나 이와 유사한 능력의 여과기를 사용하는 것이 바람직하다.
3. 입자 분포: 유자, 모과, 대추 혼합 추출물에서는 평균 입자크기가 7.00 μm 로 실험에서 사용된 filter(8 μm)의 pore size와 유사한 분포를 가진다.
4. 관능: 전체적인 기호성을 높이기 위하여 단맛을 보강하고, 신맛과 쓴맛을 감추기(masking) 작업을 할 필요가 있었다.
5. 제품화: 상기 4항의 보완으로 올리고당과 벌꿀을 가미하여 관능검사를 시행하여 올리고당을 2% 첨가한 제품을 시제품으로 정하였다. 이 시제품은 초기 혼합 추출시료의 관능검사시 보완 사항으로 평가된 신미도와 쓴맛 등이 개량되었으며 전체적인 기호도에서 비교적 양호하게 평가되었다.

6. 보존성

- 1)pH :온도에 따른 pH변화의 차이는 없었으며 실험기간 동안 pH가 약 4.2에서 4.0에서 안정적 변화를 보였다.
- 2)항산화물질의 변화 : 온도별로 보존하는 동안 285nm에서 측정되는 항산화 물질군들의 변화는 현저하지 않는 것으로 생각된다.
- 3)갈색화반응 : 갈색화반응 생성물질의 농도 변화는 온도에 따라 증가를 하며 갈색화반응은 진행될 것으로 생각되나 제품의 기호성에는 큰 영향을 미치지 않는 것으로 생각된다.
- 4)혼탁도 : 혼탁화를 비교하기 위하여 700nm에서 흡광도를 측정하였으나 본 결과에서

나타난 값은 혼탁에 의한 증가보다는 오히려 갈색화의 증가에 기인된 증가로 보아야 할 것이다.

5)보존관능 : 온도변화에 따른 항목별 관능검사 결과로부터 일률적인 평가는 곤란하였으나, 전체적인 기호도면에서는 보통 정도로 유사한 기호성을 보였다. 색깔에 대한 기호도 측면에서 갈색도의 증가는 부정적 측면이 있다고 볼 수 없었으며 이는 한약제를 사용하는 제품의 특징으로 간주되기 때문인 것으로 생각되었다.

7. 시험 제품의 조성 : 혼합 추출물을 기준으로 NP-97-1의 한약재가 각각 동량으로 3.34%씩을 함유하고 있으며, 올리고당으로 단맛, 신맛, 쓴맛을 보완하였다.

5. 참고문헌

1. 최홍식, 황정희 : 식품 지방질의 과산화 반응 억제와 천연 항산화제의 활용. 식품과학과 산업, 30(3), 18-30(1997)
2. 신동화 : 천연 항산화제의 연구동향과 방향. 식품과학과 산업, 30(3), 14-21(1997)
3. 지옥화, 양차범 : 방아 추출물의 항산화 효과. 한국식품과학회지, 28(6), 1157-1163(1996)
4. 문갑순, 최홍식 : 우육지방질의 산화에 미치는 간장의 항산화작용에 관한 연구. 한국식품과학회지, 18(4), 313-318(1986)
5. 김종대, 이상영, 김성완 : 야생초 추출물에 의한 간장내 활성산소 생성과 항산화 효소계 조절에 관한 연구. 생약학회지, 28(1), 48-53(1997)
6. 김현구, 김영언, 도정룡, 이영철, 이부용 : 국내산 생약추출물의 항산화 효과 및 생리활성. 한국식품과학회지, 27(1), 80-85(1995)
7. 박영범, 이태기, 김외경, 도정룡, 여생규, 박영호, 김선봉 : 결명자 추출물의 아질 산염 소거인자의 특성. 한국식품과학회지, 27(1), 124-128(1995)
8. 임계택, 심재한 : 옷나무 에탄올 추출물의 쥐 뇌세포에 대한 항산화 효과. 한국식품과학회지, 29(6), 1248-1254(1997)
9. Jong-Tai Won, Dong-Hoon Kim : Antioxidant Activity of Various Solvent Extracts Obtained from A Maillard-type Browning Reaction Mixture. 한국식품과학회지, 12(4), 235-241(1980)
10. Shin-Kyo Chung, Toshihiko Osawa, Shunro Kawakishi : Hydroxyl Radical-scavenging Effects of Spices and Scavengers from Brown Mustard(*Brassica nigra*). Biosci. Biotech. Biochem., 61(1), 118-123(1997)
11. Reiko Inatani, Nobuji Nakatani, Hidetsugu Fuwa : Antioxidative Effect of the Constituents of Rosemary(*Rosmarinus officinalis* L.) and Their Derivatives. Agric. Biol. Chem., 47(3), 521-528(1983)
12. Hisateru Mitsuda, Kyoden Yasumoto, Kimikazu Iwami : Antioxidative Action of Indole Compounds during the Autoxidation of Linoleic Acid. Eiyo to Shoduryo, 19, 60-64(1966)

13. Tae Yung Chung, Mi Ae Kim, A. Daniel Jones : Antioxidative Activity of Phenolic Acids Isolated from Jindalrae Flower(*Rhododendron mucronulatum* Turzaninow). *한국농화학회지*, 39(6), 506-511(1996)
14. Sang-Won Choi, Seok-Hyun Nam, Hae-Chune Choi : Antioxidative Activity of Ethanolic Extracts of Rice Brans. *Foods and Biotechnology*, 5(4), 305-309(1996)
15. Woo-Sik Jeong, Seung-Woo Park, Shin-Kyo Chung : The Antioxidative Activity of Korean Citrus unshiu Peels. *Foods and Biotechnology*, 6(4), 292-296(1997)
16. Stephen S. Chang, Biserka Ostric-Matijasevic, Oliver A. L. Hsi도, Cheng-Li Huang : Natural Antioxidants from Rosemary and Sage. *Journal of Food Science*, 42(4), 1102-1106(1977)
17. U. Bracco, J. Loliger, J. L. Viret : Production and Use of Natural Antioxidan. *J. Am. Oil Chemist's Society*, 58, 686-690(1981)
18. 정인창, 박 신, 박경숙, 하효철, 김선희, 권용일, 이재성 : 느타리버섯 자실체 및 균사체 추출물의 항산화효과. *한국식품과학회지*, 28(3), 464-469(1996)
19. 이백천, 정영기, 류병호 : 영경퀴로부터 분리한 Silymarin 및 Silybin이 Macrophage에 의한 사람 Low Density Lipoprotein의 산화에 대한 항산화 효과. *산업미생물학회지*, 25(3), 286-292(1997)
20. 류병호, 박춘옥 : 녹차추출물에 의한 쥐표피의 효소에 대한 항산화 효과. *한국식품과학회지*, 29(2), 355-361(1997)
21. 김미림, 최경호 : Paraquat에 의한 *Escherichia coli*의 Superoxide Dismutase 활성저해. *한국영양식량학회지*, 23(5), 849-855(1994)
22. 최용규, 지원대, 정현채, 최동환, 정영건 : 반응표면 분석에 의한 *Bacillus subtilis* DC-2의 색소생성 및 그 생성물의 항산화성에 대한 최적조건. *한국식품영양과학회지*, 26(4), 620-624(1997)
23. 안찬영, 현규환, 박근형 : 검은깨의 항산화 활성물질. *한국식품과학회지*, 24(1), 31-36(1992)

24. 문갑순, 최홍식 : 양조간장의 항산화작용 및 항산화성 물질에 관한 연구.
한국식품과학회지, 19(6), 538-542(1987)
25. 한용봉, 김미라, 한병훈, 한용남 : 갓과 겨자의 항산화 활성성분에 관한 연구.
생약학회지, 18(1), 41-49(1987)
26. 문갑순 : 간장제품의 종류에 따른 항산화능의 비교.
한국영양식량학회지, 20(6), 582-589(1991)
27. 최홍식, 이정수, 문갑순, 박건영 : 지방산의 산화에 대한 양조간장의 항산화 특성. 한국식품과학회지, 22(3), 332-336(1990)
28. 양덕조, 이성중, 윤길영, 강영희 : 人蔘葉의 Photobleaching과 항산화효소 활성.
고려인삼학회지, 15(2), 139-143(1991)
29. 한용남, 오희경, 황금희, 이미순 : 치자의 항산화 활성성분에 관한 연구.
생약학회지, 25(3), 226-232(1994)
30. 차배천, 박희준, 이 은, 최무영, 임태진 : 대두와 들콩의 항산화 활성 및 성분비교. 생약학회지, 27(3), 190-195(1996)
31. 김지영, 맹영선, 이기영 : 다양한 용매를 이용한 대두 추출물의 항산화효과.
한국식품과학회지, 27(5), 635-639(1995)

제4절 감기예방 및 치료보조 기능을 가지는 보조식으로 떡제품 개발

1. 개발전략

서구문화의 수용으로 식생활의 패턴도 다양하게 변화함에 따라 소화기질환, 대장질환, 고혈압증 그리고 당뇨병 등의 만성 퇴행성질환이 증가하는 추세에 있으며, 이러한 식생활 변화에 따라 나타나는 문제들을 해결하기 위해서 식품이 가지고 있는 영양의 기능 외에 제3의 기능으로서 생명활동의 조절기능을 가진 식품에 대한 연구가 활발히 진행되어지고 있으나, 국내에서는 그 대상이나 방향에 있어서 극히 한정적이었다.

최근, 한방 및 한약재를 소재로 한 식품, 건강식, 자연식 및 음용식 등을 포함하여 실로 많은 제품들이 시판되고 있지만 여러 가지 면에서 재고되어야 할 문제가 존재하고 있다. 물론, 이들 제품들은 과거에 비해서 선택의 범위가 넓어진 것은 사실이나 내용면에서는 중복되어진 것도 많고 검증되지 않은 사례를 과학적인 근거와 관계없이 상업적인 시판을 목적으로 과대 포장되어지고 있는 실정이므로 소비자들이 많은 혼란을 겪고 있기 때문에 전문가의 고증과 실제 효능에 대한 실험적 증명이 필요하다. 또한 경제성장에 따른 식생활의 변화, 건강유지와 질병의 치료에 대한 관심, 그리고 의학의 진보 등에 의해 질병예방과 직결되는 생리학적 기능을 가진 새로운 형태의 기능성 식품이 사회적으로 요구되고 있는 시점이다.

감기는 소아성 호흡기 질환 뿐 만 아니라 체내의 면역에도 가장 큰 문제중의 하나로 예방 및 치료가 문제시되는 것으로 보통 성인의 경우 1년에 한, 두 차례 감기바이러스의 공격을 받는다. 이들 바이러스에 감염될 경우 상부 호흡기의 동통, 콧물, 두통, 오한, 불쾌감, 기침 등 호흡기 질환 증상이 나타나며 열은 대개 3~7일간 지속된다. 특히, RSV는 어린아이들의 호흡기성 질환에 관여하며 기관지염이나 폐염의 원인

이 되기도 한다.

한방처방 또는 비방에 의해 수많은 바이러스성 질병을 치료하고 있는데, 이 처방들은 기능성음료 및 전통 식품의 개발에 응용한다면 고부가가치와 국제 경쟁력을 함께 지닌 식품제제를 개발할 수 있을 것으로 생각된다. 특히 우리의 전통궁중식품중 “구선왕도고, 삼출조원고, 보진고, 비전삼전고’ 등은 옛부터 제왕들의 감기에방을 위해 궁중궁궐에서 제작해 먹던 떡 또는 미음으로 이러한 전통식품을 현대적 감각에 맞게 재구성한다면 현대인의 아침식사 대용으로도 적당할 것으로 생각된다. 이를 위해 그 우수성이 세계적으로 널리 알려진 우리의 전통한약처방 및 한약재를 이용하여 새로운 기능성을 가진 식품을 개발할 필요성이 있다.

그리고, 한의학에서는 “약식동원(藥食同源)”이라 하여 음식물을 통해서 질병을 예방하고 치료한다는 의미가 내포되어 있어 기능성식품과 일맥상통한 관계에 있는데, 이러한 특성을 이용하면 호흡기 바이러스성 질환을 억제하는 신기능성 식품제제가 개발될 수 있고 또한 우리 나라의 전통궁중식품으로써 대표적인 관광상품으로의 개발도 가능할 것이다.

선진국에서는 최근 동, 식물자원이나 생약재를 이용한 천연화합물의 개발 및 탐색에 새로운 개념을 토대로 한 기능성 식품 개발 전략을 추진하고 있는데, 우리 나라는 특히 우수한 생약재를 많이 보유하고 있을 뿐 만 아니라 한방이 전래로부터 감기치료의 치료제로 각광을 받고 있고, 현재도 이들 처방을 이용하여 병원이나 약국에서 감기 또는 유행성 독감들을 효과적으로 치료하고 있다. 이 처방들을 현대 과학의 집약적 기술을 도입하여 잘 규명한다면 새롭고 고부가가치가 있는 호흡기성 바이러스예방 또는 억제 식품을 개발할 수 있을 것으로 사료되며 이를 기능성음료 및 전통한방 한과나 유과 및 떡제품으로 개발한다면 그 경제성은 막대하리라 사료된다.

경제성장과 아울러 의료기술의 발달에 따른 평균수명의 연장은 노령 인구층을 급격히 증대시켰고 이로 인한 전반적인 사회의 노령화 경향은 사회문제로 대두되고 있고, 노령자의 영양대사 상태를 고려하여 설계된 기능성 식품이나 건강보조식품들이 요구되고 있다. 감기의 예방과 치료에서 영양보급은 중요한 국가적 과제인데, 본 연구에서 감기예방 또는 억제뿐만 아니라 영양적 균형의 잡힌 기능성 식품이 개발된다면 그 파급효과와 활용도는 경제적, 학문적으로 높을 것으로 판단된다.

2. 연구개발 목표

- NP-97-1을 이용하여 특히 노약자 및 어린이의 감기예방을 목적으로 하는 떡제품을 개발
- 현대적 감각에 맞는 떡제형의 케이크화

3. 연구방법

가. 제품의 유형 설정

NP-97-1을 구성하는 한약재를 각각 건조 분말하여 만든 것과 엑기스로하여 만든 두 종류를 사용하여, 전통 시루떡과 카스테라의 특징을 변형하여 시험제작하기로 설정하였다.

나. 시료의 조제

1) 건조분말의 제작

NP-97-1을 구성하고 있는 한약재를 각각 3kg을 열풍건조기를 이용하여 40℃에서 풍건하여 분쇄기로 잘게 갈아서 가루 입자크기를 100mesh가 되게 하였다.

2) 엑기스의 제작

NP-97-1을 구성하고 있는 각각의 한약재 3kg에 증류수 6ℓ를 넣고 한약추출기에서

열수추출(3회 반복)하고 비등과 감압에 의해 농축하여 엑기스상태로 만들었다.

3) 시제품의 제작

백미(평택산 아끼바리)를 4회 씻고, 10분 동안 큰 체에 걸러서 물기를 제거한 후 소금(쌀kg당 11.0g)을 넣는다. 강력분쇄기로 물을 넣지 않고 건조된 쌀을 찜은 후, 고운 가루를 얻기 위하여 18메쉬(1.0mm)체로 체를 쳤다.

제1법	제2법
쌀가루 2300g에 설탕과 물을 1:1(v/v)한 설탕시럽 1000ml와 쌀가루의 3%의 엑기스(DJ, MK, UJ 각 69g)를 넣고 잘 섞은 후, 1.0mm체에 걸러서 고운 가루로 만든다. 찜통 용기에 고루게 가루를 넣은 후 뚜껑을 닫고 45분 동안 찌고, 완성된 떡은 적당히(15-20분) 식은 후 냉동보관하여 시료로 사용하였다.	쌀가루 2300g에 꿀과 물을 1:3(v/v)한 혼합액을 1000ml와 쌀가루의 3.48%의 DJ와 MK의 건조분말 및 쌀가루의 1.74%의 UJ의 건조분말을 넣고 잘 섞은 후, 1.0mm체에 걸러서 고운 가루로 만든다. 찜통 용기에 고루게 가루를 넣은 후 뚜껑을 닫고 45분 동안 찌고, 완성된 떡은 적당히(15-20분) 식은 후 냉동보관하여 시료로 사용하였다.

다. NP-97-1를 이용한 떡 제품의 품질기준에 대한 실험

1) 관능 품위 기준 실험

패널의 크기는 15~20명으로 하여, [표1]과 [표2]의 채점 기준에 따라 평가하였다. 실험에 사용된 떡은 제1법에 의해 한약재의 농축 extract를 쌀가루에 혼합하여 만들어 사용하였다. 조직감 실험은 떡을 제조하여 시료로 하였고, 선택 실험은 개봉 직후의 제품을 시료로 하였다.

[표 1] 채점기준

항목	기 준
관능품위	고유의 색택과 조직감을 가지고 이미, 이취 및 이물이 없어야하며 표 2의 채점기준에 따라 채점한 결과 전 항목 모두 3점 이상이어야 한다.
수분(%)	45이하
회분(%)	0.5이하
곰팡이(g당)	음성
대장균군(g당)	음성

* [표 1] 이외의 위생 요구사항은 식품위생법에 따른다.

[표 2] 관능품위기준

색 택	<ol style="list-style-type: none"> 1. 떡 색이 선명하며, 색택이 균일한 것은 5점 2. 떡 색이 대체로 선명하며, 색택이 대체로 균일한 것을 그 정도에 따라 4점 또는 3점 3. 떡 색이 퇴색되어 있고, 색택이 이물혼입등으로 검은 빛이 도는 것은 2점 4. 떡 색이 매우 퇴색되어 있고, 색택이 이물혼입등으로 검은 빛이 많이 도는 것은 1점으로 한다.
조직감	<ol style="list-style-type: none"> 1. 떡의 부드러운 조직감과 탄력성이 매우 강한 것을 5점으로 한다. 2. 떡의 고유의 부드러운 조직감과 탄력성이 보통인 것을 그 정도에 따라 4점 또는 3점으로 한다. 3. 떡의 고유의 부드러운 조직감과 탄력성이 약한 것을 2점으로 한다. 4. 떡의 고유의 부드러운 조직감과 탄력성이 매우 약한 것을 1점으로 한다.

2) 수분

세절한 떡 5g을 평량한 후 Infrared moisture balance(MA40, Sartorius)를 이용하여 105℃에서 항량이 될 때까지 건조시켜 수분함량(%)을 구하였다. 이 실험은 3회 반복하여 실시하였다.

수분은 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{수분(\%)} = \frac{W_1 - W_2}{W_1 - W_0} \times 100$$

W0 : 수분 측정용 수기의 무게(g)

W1 : 수분 측정용 수기와 시료의 무게

W2 : 수분 측정용 수기와 건조의 무게

3) 회분

분쇄한 시료 액 5g을 취하여 함량을 알고 있는 도가니에 취하고 회화로에서 200℃에서 2시간 동안 예비회화한 후 600℃에서 완전 회화될 때까지 회화시킨 후 방냉하여 항량이 될 때까지 측정하여 회분함량을 구하였다. 이 실험은 4회 반복하였다.

다음 식에 의하여 회분 함량을 계산하였다.

$$\text{회분(\%)} = \frac{W_1 - W_2}{W_1 - W_0} \times 100$$

W0 : 회분 측정용 수기의 무게(g)

W1 : 회분 측정용 수기와 시료의 무게

W2 : 회분 측정용 수기와 건조의 무게

4) 곰팡이 검사

무균적으로 분쇄한 시료 11g을 무균적으로 채취하여 99ml 멸균인산 완충 희석액에 넣고 7초 동안 30cm간격으로 25회 세계 흔들어 주었다. 희석비율은 10배 단계 희석법에 따른다. 3개의 희석액 1ml 씩을 멸균 페트리접시 2매 이상에 무균적으로 취하여 포테이토 덱스트로스 한천 배지를 사용하여 25℃에서 5~7일 배양한 후 발생한 집락 수를 계산하고, 그 평균 집락 수에 희석배수를 곱하여 산정하였다. 보존기간 중 시료(떡)를 3일, 6일, 9일, 12일째 되는 날에 꺼내서 배지에 배양시켜 곰팡이의 유무를 확인하였다.

포테이토 덱스트로스 한천 배지 조성	
potato, infusion from	200.0g
dextrose	20.0
agar	15.0

위의 성분에 증류수를 가하여 1,000ml로 만들어 가열 용해한 다음, pH를 5.6 ± 0.2 로 맞추고, 121℃에서 15분 동안 고압증기 멸균시킨 후, 사용직전에 멸균된 10% 타르타르산을 무균적으로 가하여 pH를 3.5 ± 0.1 로 맞추었다.

5) 미생물 검사

(데속시콜레이트 유당한천 배지법)

멸균유리봉관 멸균스파테르 등으로 잘 혼합한 검체 일정량(10g)을 멸균용기에 취하여 9배량의 멸균생리 식염수와 혼합한 것을 실험용액으로 하여, 시험용액 1ml와 단계별 희석용액 1ml 씩을 2매 이상의 멸균페트리 접시에 취하고, 미리 가온 용해하여 50℃에 보존한 데속시콜레이트 유당한천 배지(배지 8) 약 15ml를 무균적으로 분주하고 페트리 접시 뚜껑에 부착하지 않도록 주의하면서 조용히 회전하여 좌우로 기울이면서 검체와 배지 또는 보통 한천 배지를 3~5ml 가하여 증척시켰다. 이것을 35 ± 3 시간 배양하여 전형적인 암적색의 집락을 인정하였을 때에는 1개 이상의 집락을 의심스러운

집락일 경우에는 2개 이상을 EMB평판배지 또는 Endo 평판배지에서 $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ 에서 24 ± 3 시간동안 분리 배양하였다. 이하의 조작은 유당부이온의 확정시험 및 완전시험법에 따라 실시하고 대장균군의 유무를 결정하였다.

라. NP-97-1를 이용한 떡 제품의 저장방법에 대한 실험

1) 저장방법

떡을 제조하여 완전히 식기 전($40\sim 45^{\circ}\text{C}$)에 일정한 크기(가로 3cm, 세로 4cm)로 자른 다음, 진공 포장하여 가정용 냉장고의 냉동실($-18\sim -20^{\circ}\text{C}$), 냉장실($0\sim 8^{\circ}\text{C}$), 실온($20\sim 23^{\circ}\text{C}$)에 보존하면서 일정기간마다 시료를 꺼내어 시험하였다.

2) 저장기간별 실험방법

가) 수분

세절한 떡 5g을 평량한 후 Infrared moisture balance(MA40, Sartorius)를 이용하여 105°C 에서 항량이 될 때까지 건조시켜 수분함량(%)을 구하였다. 이 실험은 3회 반복하여 실시하였다.

나) 관능검사 - 텍스처 평가

관능검사는 20~25세의 경기대학교 조리학과 학생을 대상으로 triangle difference test 결과와 신뢰성, 건강, 성격, 실험에 대한 관심도 등을 고려하여 17명을 선정하였다. 관능검사는 세 자리 수로 된 날수로 시료기호를 표기한 흰색 접시에 관능 요원별로 각각의 시료를 먹고 나면 반드시 물로 입안을 2번 헹구도록 하였고 1~2분 후 다른 시료를 시식하고 평가하도록 하였다.

평가내용은 씹으면서 축축한 정도(moistness), 부드러운 정도(tenderness), 자르는데 드는 힘(firmness), 부서지는 정도(Crumbliness)를 평가하였으며 실험은 냉장, 냉동, 당일의 것을(3, 6, 9, 12, 15일) 실시하였는데 냉장, 냉동, 보관 후 해동한 후 Steam convection oven(HRS)에 재 스팀(20분)하여 관능검사에 사용하였다.

다) 품질변화

보존기간별 (3, 6, 9, 12)일 떡의 변패상태와 곰팡이 발생상황과 균 총수(Colong number), 균사의 상태와 색깔을 조사하였다.

라) 떡의 경도

시료(떡)는 떡을 제조하여 완전히 식기 전(40~45℃)에 일정한 크기(가로 3cm, 세로 4cm)로 자른 다음, 진공 포장하여 가정용 냉장고의 냉동실(-18~-20℃), 냉장실(0~8℃), 실온(20~23℃)에 보존하면서 일정기간마다 시료를 꺼내어 시험하였다.

보존기간별 떡의 경도를 Rheometer(CR-100D, Sun Scientific Co., Ltd.)를 이용하여 측정하였다. 이때 냉동실에 보관하였던 시료는 완전해동 후 측정하였다. 경도용(20mm - diameter) adaptor를 사용하였고 최대하중 10kg 하에서 시료내로 최대 10mm까지 진입하도록 조건을 설정하였다.

마) α 화도

저장기간을 같이한 떡시료의 호화도는 Rapid Visco Analyser(RVA-3D, Newport Scientific)를 이용하여 다음과 같은 측정조건 하에서 실험하였다.

50℃	→	95℃	→	50℃
(0-1min)		(1-8.5min)		(8.5-12.5min) (12.5-20min) (20-21min)

4. 결과 및 고찰

우리 나라의 고유의 전통음식인 떡은 각 지역, 각 가정마다 만드는 방법이 차이가 나고 매우 복잡한데, 식생활이 점점 서구화되고 있고 시간에 쫓기는 현대인에게는 새로운 제형의 떡의 개발이 필요하다.

본 연구에서는 한방 감기처방에 사용되고 있는 63종의 처방을 검색하여 100종의 한약재에 대해 항바이러스 활성 스크리닝을 실시한 결과 수종의 한약재가 강한 활성을 보였는데, 그 중 떡의 소재로 개발할 수 있는 한약재를 3종(모과, 유자, 대추)선택하였고, 감기치료 보조식 혹은 예방식으로 개발하기 위해서 항바이러스 활성이 강한 NP-97-1을 이용한 떡 제품을 케이크형태로 개발하였다. 한방소재의 떡 개발은 한약재의 물성등의 특징을 고려하여야 한다. NP-97-1를 이용한 한방소재의 케이크의 조리공정은 아래와 같다.

◆기능성 떡→(케익떡 + NP-97-1기능성추출물)

1. 떡의 공정

NO. 1-a	*실험날짜 :
1. 실험제목 : 쌀가루	
2. 재료 및 분량	
쌀	2말(16kg) → 쌀가루 20kg으로 늘어남(+2kg)
소금량	220g(쌀kg당 소금11.0g)
3. 만드는 방법	
① 쌀을 2시간을 물에 불려 채에 밭쳐 물기를 뺀다.	
② ①의 쌀을 계량한 소금량을 넣고 곱게 간다.(분쇄기까지)	
③ ②의 쌀가루를 고운체에 다시 내려 분량만큼 봉지에 담아 냉동고에 보관.	
4. 평가 및 분석	
* 쌀과 쌀가루의 무게는 8kg당 2kg가 늘어난다.	
* 쌀가루로 갈때에는 물을 넣지 않는다.	
(다시말해서 물을 내리지 않는다고 한다.)	

NO. 1-b	*실험날짜 :
1. 실험제목 : 대 추 고	
대추고는 케익떡의 반죽의 역할을하는 가장 중요한 재료라 할 수 있다. 대추의 원액자체의 단맛이 케익떡의 맛을 한층 높여준다.	
2. 재료 및 분량	
대추	3kg
황설탕	1kg
물	대추부피의 3배
3. 만드는 방법	
①대추 3kg을 큰통에 넣고 대추 부피의 3배의 물을 넣고 중불에서 하루 동안 고와야 한다.	
②대추의 원래 부피가 될 때까지 고와지면 증체에 걸러 고은 원액만 뽑아낸다.	
③②의 원액에 황설탕 1kg을 넣고 다시 약한 불에서 1시간정도 조린다.	
④완성이 되면 분량만큼 진공팩에 담아 냉동을 시켜 쓸 분량만큼 꺼내어 쓴다.	
4. 평가 및 분석	

NO. 1-c	*실험날짜 :
1. 실험제목 : 거피팔 가루	
2. 재료 및 분량	
거피팔	7c
간장	1T
황설탕	1/8c
흰설탕	1/2c
계피가루	1T
3. 만드는 방법	
①팔을 미지근한 물에 2시간 불겨 껍질을 깐다.	
②찜통에서 1시간 찜다.	
③증체에 내려 위 분량만의 부재료를 넣고 양념을 해준다.	
④팬에 가루가 될 때까지 볶아준다.(약간의 수분끼는 있어야 함.)	
4. 평가 및 분석	

NO. 1-d	*실험날짜 :
1. 실험제목 : 호도, 꽃감(준비)	
맛을 한층 더 높이기 위해 들어가는 부수적인 재료로써 하나하나 손질을 한다.	
2. 재료 및 분량	
호 도	
꽃 감	
3. 만드는 방법	
*호도 속껍질 까기	
① 끓는 물에 호도를 살짝 넣어 꺼내어 속껍질을 깬다.	
*꽃감 자르기	
① 꽃감의 씨를 빼어 원형 그대로 저민다.	
4. 평가 및 분석	

NO. 1-e	*실험날짜 :
1. 실험제목 : 케익 떡(12.7cm기준)	
준비된 재료로 보기 좋게 순서에 맞게 세팅을 한다.	
2. 재료 및 분량	
* 쌀	4c - 400g
* 대추고	½c (계량컵)
* 잣	20g
* 꽃감	60g
* 호도	20g
* 거피팔	40g
*함황물질: 대추, 유자, 모과, 엑기스 1½T(계량스픈)	
3. 만드는 방법	
① 쌀을 증체에 내려 대추고를 넣고 섞은 다음 다시 증체에 내림.	
② 대나무 찜기 (12.7cm의 size) 위에 면보를 깬다.	
③ 거피팔을 깔아줌 → ①을 2c을 깔아줌 → 꽃감, 호도, 잣을 깔아줌 → 다시 ①을 2c을 깔아줌 → 마지막으로 거피팔을 전체적으로 뿌려줌.	
④ 대나무 찜기 뚜껑을 덮고 면보를 덮어준다.	
⑤ 찜기에 50분정도 찜.	
4. 평가 및 분석	

가. 제품의 품질기준

1) 관능품위

품질기준에 대한 관능품위의 결과는 제품의 품질기준은 떡 시료의 색이 선명도와 색택의 균일한 정도를 측정한 결과 4.2의 수치가 나왔다. 떡의 케익처럼 부드러운 조직감과 탄력성의 정도를 측정한 결과 4.5의 수치가 나왔다. 떡의 맛에 대한 정도의 측정 결과 4.3의 수치가 나왔다. 떡의 색택이 대체로 균일하며 이미, 이취 및 이 물질이 없어야 하며 표 2의 채점 기준에 따라 채점한 결과 전 항목 모두 3점 이상의 좋은 결과를 얻었다 .

2) 수분, 회분

수분의 측정은 3회에 걸쳐 실시하였으며, 평균값이 $44.49 \pm 0.33\%$ 로 채점기준 45% 이하 였다. 떡시료의 회분은 $0.54 \pm 0.09\%$ 로 채점기준을 초과했으나 조리공정의 검토로 충분히 해결할 수 있다고 생각된다.

[표3] 떡시료의 수분함량(%)

Ash content(%)	
1회	45.10
2회	44.55
3회	43.84
44.49 ± 0.33	

[표4] 떡시료의 회분함량(%)

Ash content(%)	
1회	0.44
2회	0.09(×)
3회	0.62
4회	0.56
0.54 ± 0.09	

3) 곰팡이 검사

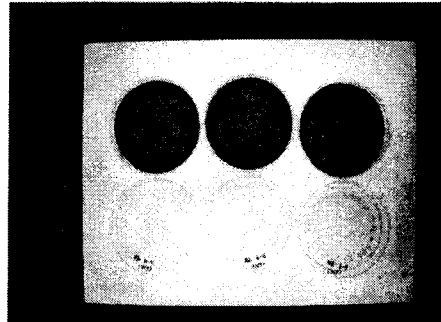
곰팡이의 발생여부의 검사는 시료를 진공포장 후, 각 온도별로 냉동, 냉장, 실온에 보관하여 보관기간 3, 6, 9, 12일에 실시하여 곰팡이의 발생여부를 육안과 평판배양으로 균사의 발생여부를 확인하였다. 냉동에서 보관한 시료에서는 보관 기간이 12일에서 균사가 발생하는 것을 육안으로는 관찰할 수 없으나 현미경으로 관찰되었고, 냉장보관에서는 6일에 2~3개의 진공포장군에서 균사가 현미경으로 관찰되었고 9일부터는 전시료군에서 균사가 육안으로도 관찰할 수 있었다. 실온보관에서는 3일 이후에 균사가 현미경으로 관찰되었고 6일경에는 육안으로도 곰팡이를 관찰할 수 있었다(표 5). 저장 기간별 곰팡이의 발육상태를 사진 촬영하였다(그림 1).

[표 5] 보존방법에 따른 곰팡이 발생여부

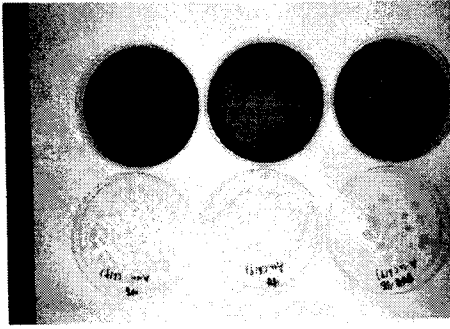
보존장소	보 존 기 간(일)			
	3	6	9	12
냉동실(-18~-20℃)	-	-	-	+
냉장실(0~-8℃)	-	±	+	+
실 온(20~23℃)	-	+	+	+



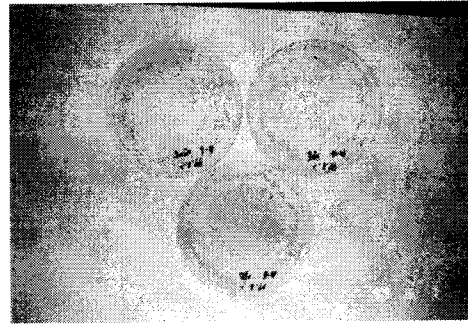
3일 저장



6일 저장



9일 저장



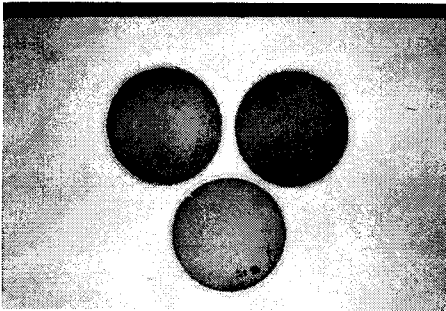
12일 저장

[그림1] 저장기간별 곰팡이 발육상태

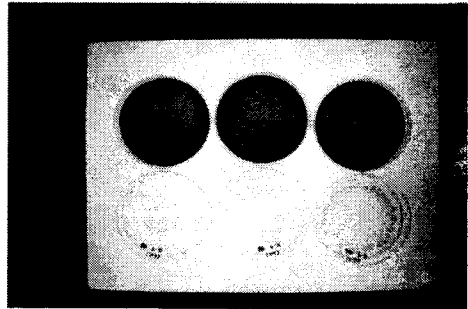
4) 미생물 검사

데속시클레이트 유당한천 배지법으로 미생물을 검사하였고(표 6), 시료를 진공포장 후, 각 온도별로 냉동(-18~-20℃), 냉장(0~-8℃), 실온(20~23℃)에 보관하여 보관기간 3, 6, 9, 12일에 실시하여 미생물의 발생여부를 육안과 평판배양으로 콜로니의 발생여부를 확인하였다. 냉동, 냉장보관의 시료에서는 미생물의 콜로니가 발생하지 않았다. 실온보관에서는 9일에 콜로니가 관찰되었다(그림 2).

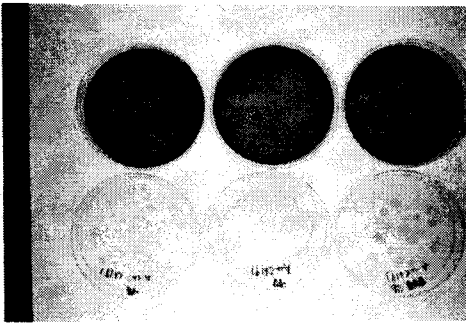
미생물은 발생하지 않았지만 냉장보관 9일, 실온보관 6일부터 제품의 상태가 떨어지는 경향성을 보였는데, 이것은 수분의 감소와 곰팡이가 발생하는 관계로 떡의 고유의 쫄깃쫄깃한 조직감과 탄력성이 저하가 일어난다고 생각하고 있다.



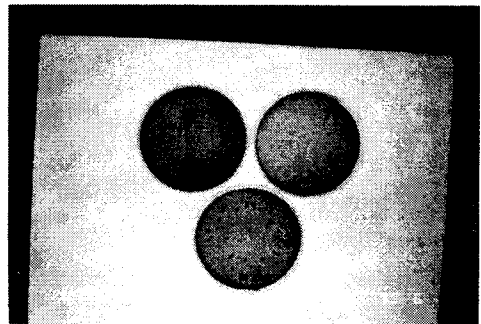
3일 저장



6일 저장



9일 저장



12일 저장

[그림2] 저장기간별 미생물 상태

나. NP-97-1를 이용한 떡 제품의 저장방법에 대한 실험

1) 수분

실험결과는 [표 6]과 같다. 떡시료의 저장 중 수분함량의 감소 정도가 거의 비슷하였으며 수분함량의 차이에 따라 미생물의 발생상황이나 Texture의 변화 및 기호성에 차이가 나타날 것으로 생각된다.

[표 6] 떡시료의 보존 중 수분함량(%)

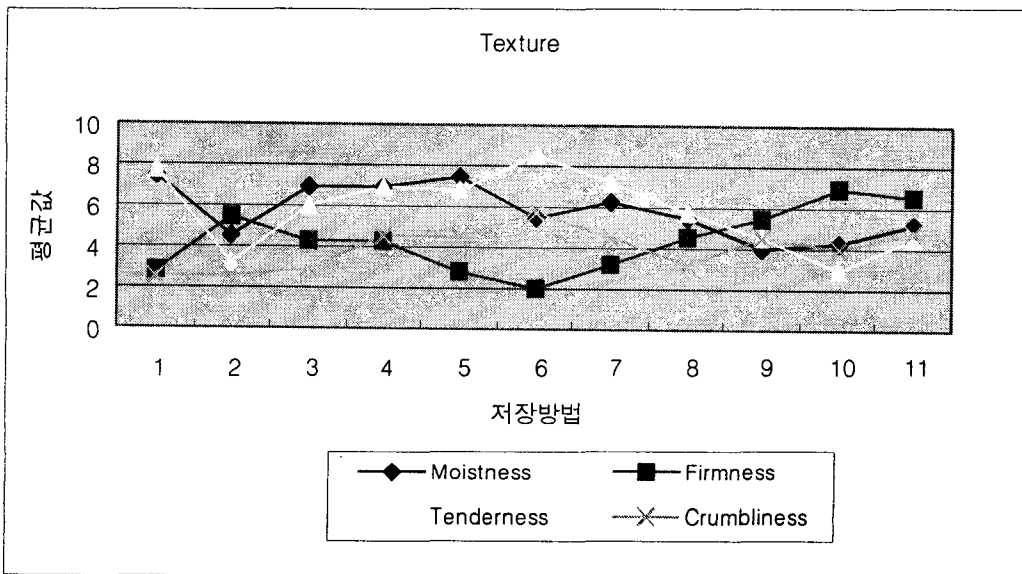
	Moisture content(%)	
	Mean	SD
실온 3일	42.37	43.08±0.75
	43.86	
	43.01	
실온 6일	42.93	43.47±0.47
	43.67	
	43.81	
실온 9일	44.74	45.13±0.46
	45.63	
	45.02	
냉장 3일	44.97	45.22±0.04
	45.69	
	45.01	
냉장 6일	44.55	44.39±0.63
	44.92	
	43.70	
냉장 9일	44.93	44.38±0.65
	44.55	
	43.66	
냉동 3일	44.58	44.14±0.56
	44.34	
	43.51	
냉동 6일	44.37	43.95±0.41
	44.93	
	43.56	
냉동 9일	45.10	44.10±0.42
	44.13	
	43.07	

2) 관능검사

시료를 보존하면서 먹을 때의 기호성 여부를 9등급 평가법에 의하여 관능 검사한 결과는 [표 7]과 같다. 본 실험 결과에서 관능검사치의 평균이 4.5이상인 경우는 일반적으로 그대로 먹을만한 상태라고 할 수 있다.

[표7] 저장 기간별 관능검사 평균값

	냉동					냉장					당일
	15	12	9	6	3	15	12	9	6	3	
Moisteness	7.5	7.5	5.5	6.25	5.5	4.0	4.25	5.25	7.0	7.0	4.5
Fimness	2.75	2.75	2.0	3.25	4.5	5.5	7.0	6.5	4.25	4.25	5.5
Tenderness	7.75	6.75	8.5	7.25	5.75	4.5	3.0	4.5	7.0	6.0	3.25
Crumbliness	2.5	4.5	5.75	4.5	3.25	4.5	4.0	4.75	4.5	3.0	2.5



[그림3] 저장 기간별 관능검사

3) 품질변화

보존기간별(3, 6, 9, 12일) 떡의 변패상태와 곰팡이 발생상황과 균총수(Colony number), 균사의 상태와 색깔을 조사한 결과 표 8과 그림 4와 같다.

실온에서 보존 할 때는 3일째부터 곰팡이의 균사가 발육되기 시작하였고, 6일째는 떡에 균사로 부분적으로 덮여 있었고 고유한 색깔을 가지는 곰팡이의 균총이 관찰되었다. 쉰 냄새는 6일째부터 심하게 인지되었다. 냉장에 보존 할 때는 거의 변화가 없었다. 실온에서 보존한 시료와의 차이는 균사의 발육이 아주 느리다. 떡에서 발육한 곰팡이의 종류를 확인하지는 않았으나 참고로 그들의 색택을 표시하였다. 떡에서는 여러 가지 종류의 곰팡이가 분리되었다는 보고가 있고 이들 곰팡이의 발육은 우리의 기호성을 해치는 것은 물론 사람에게 유해한 mycotoxin을 생성할 우려가 있으므로 곰팡이가 일단 발생한 떡은 섭취를 금해야 한다.

본 실험에서 곰팡이의 색깔이 청색으로 기록 된 것은 *Penicillium*속과 *Aspergillus*속에 속하는 미생물로 간주되며 이들 두 속의 곰팡이가 떡에 분포되어 있는 곰팡이의 대부분을 차지한다는 보고와 매우 비슷하다. 이러한 점으로 보아 떡을 실온에서 3일이 상 보존할 수 없음을 알 수 있었다.

[표9] 떡시료의 보존 중 곰팡이의 발육상태

	시료	상태
3일	균사 발생시작.	
6일	균사 부분적으로 덮음.	청색4, 등색4, 흑색5
9일	균사 전면덮음.	청색11, 흑색7, 연두색6
12일	균사가 전면덮음.	청색25, 흑색9, 백색9

* 숫자는 상자당 Colony수

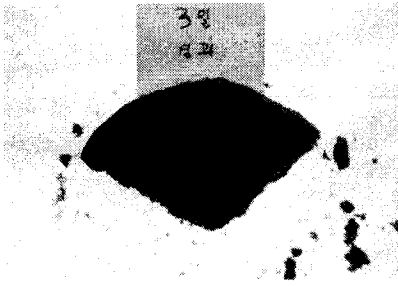
4) 떡의 경도

그림에서 보는바와 같이 떡의 경도는 실온에서 약간씩 증가함을 보였고, 냉장 보존의 경우 계속적으로 Hardness가 증가하다가 감소하였다. 냉동은 서서히 증가하는 경향을 보였는데 6일에서만 증가하다가 감소하였다. 떡을 보존 장소별로 경도의 변화를 보면 냉동실, 실온, 냉장실 순으로 경도가 낮았다. 이는 전분의 노화(Retrogradation)가 일어나는 정도가 온도에 따라 달라지는데 0~5℃의 저온에서 노화가 가장 빠르게 진행되고 온도가 높아짐에 따라 노화는 감소한다. 따라서 전분식품인 떡을 냉장실에 보존하는 경우는 노화를 촉진시키는 결과가 되며, 실온에 두는 것보다 경도가 높아지게 된다.

떡의 보존 중 Hardness의 증가는 α 화도의 감소, 또는 노화도의 증가와 상관성이 있을 것으로 생각되며 본 실험의 결과에서도 매우 비슷한 변화과정을 보여 주었다(표 10).

[표10] <떡시료 저장 중 hardness 변화>

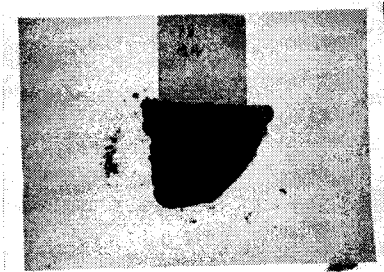
보관유형	기간	Hardness(dyne/cm ²)
실온	3일	14661.55
	6일	31897.21
	9일	22075.21
냉장	3일	52886.18
	6일	68657.95
	9일	71228.77
냉동	3일	12549.87
	6일	27895.58
	9일	27672.46



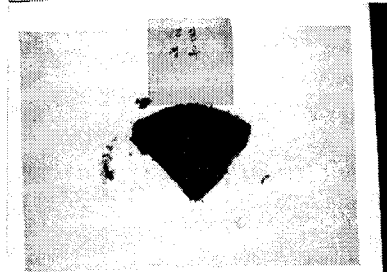
3일 경과



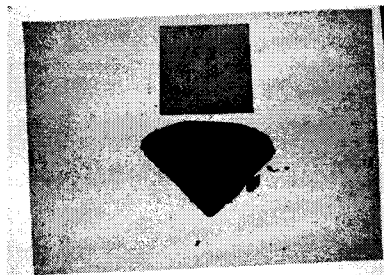
6일 경과



9일 경과



12일 경과



15일 경과

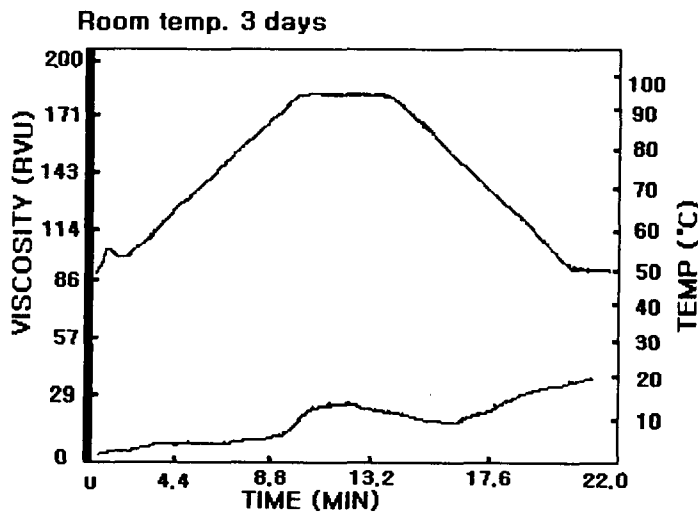
[그림4] 저장 기간별 품질변화

6) α 화도

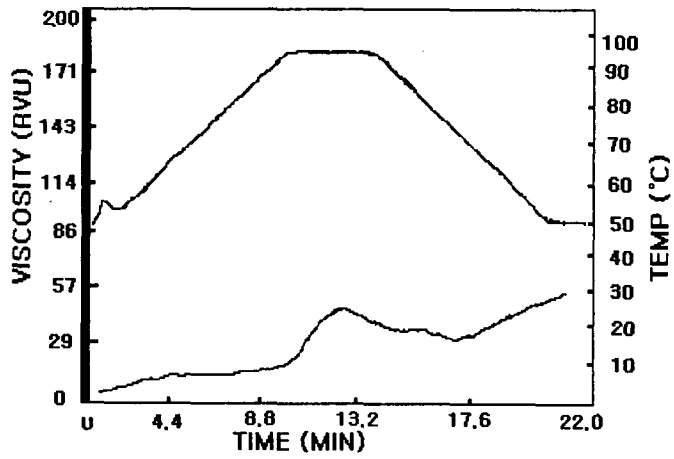
저장기간을 달리한 떡 시료의 호화도는 Rapid Visco Analyser(RVA-3D, Newport Scientific)를 이용하여 50℃(0~1min) → 95℃(1-8.5min, 8.5-12.5min) → 50℃(12.5-20min, 20-21min)의 측정조건 하에서 실험하였는데, 그림 5에서 보여 주듯이, 실온에 저장한 시료구는 냉장과 냉동 보관한 두 시료구에 비하여 저장기간별로 노화의 진행정도 차이를 보였다.

실온에 저장한 시료는 3일보다 저장 6일째 시료가 Viscosity값이 더 높아 노화가 더 많이 진행되었음을 나타내었으나 저장 9일째 시료는 미생물 등에 의한 품질변화(부패)로 측정이 불가능하였다. 냉장시료는 실온에 비하여 저장 3일째에 이미 노화가 많이 진행되었음을 알 수 있고 저장 6일과 9일 모두 저장 3일째와 비슷한 경향을 보였다. 다만 냉동시료는 냉장저장이나 실온 저장에 비하여 노화 진행이 늦게 일어남을 보여주었다.

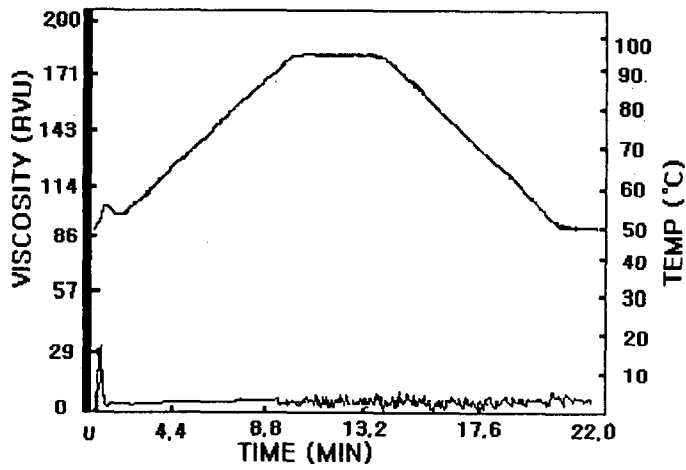
Room temp



Room temp. 6 days

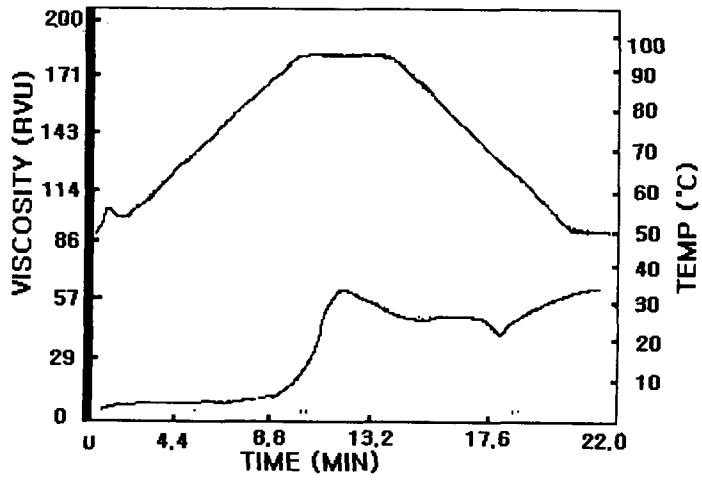


Room temp. 9 days

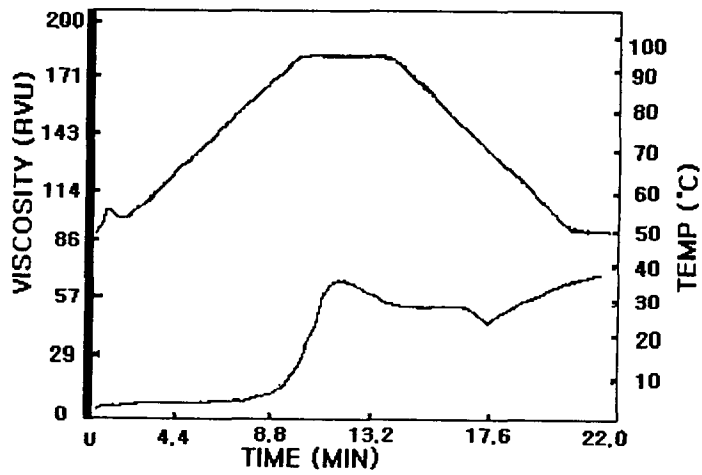


Refrigeration

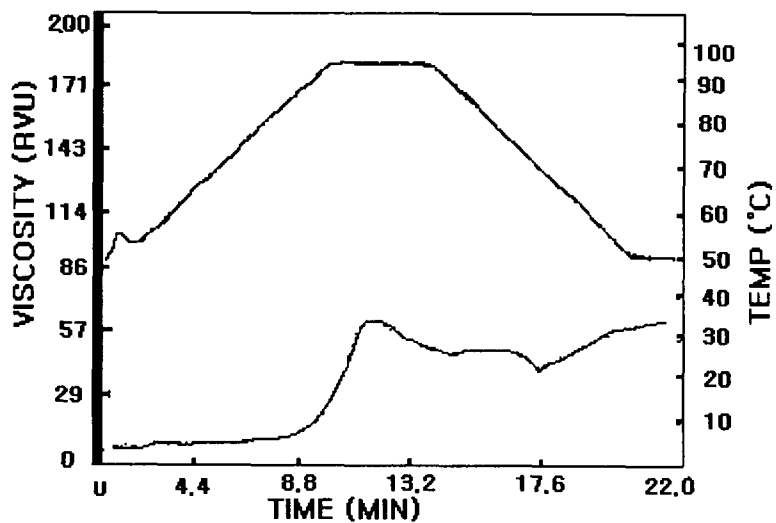
Refrigeration 3 days



Refrigeration 6 days

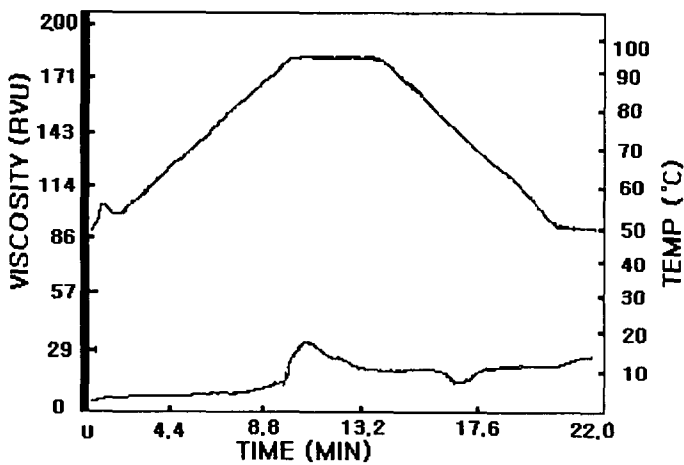


Refrigeration 9 days

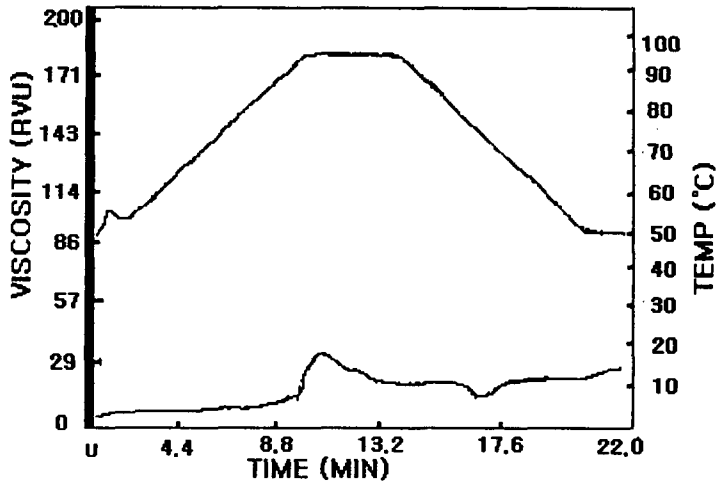


Freezing

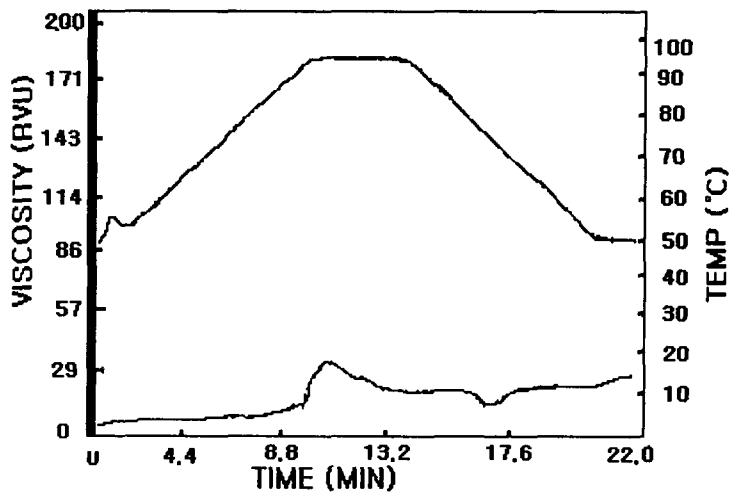
Freezing 3 days



Freezing 6 days



Freezing 9 days



[그림6] <저장별 α 화도의 변화>

5. 참고문헌

- 1) 임국이, 김선효 : 떡의 이용실태와 시판제품에 대한 평가, 한국식문화회지, 3(2) 163(1988)
- 2) 맹혜열, 이효지 : 떡류의 문헌적 고찰, 한국식문화회지, 3(2), 153(1988)
- 3) 이철호, 맹영선 : 한국 떡에 관한 문헌적 고찰, 2(2), 117(1987)
- 4) 한억, 이창호, 정강현, 금준석, 백경혁 : 떡국용 흰 떡의 품질특성 연구, 한국식품개발연구원, 13(1994)
- 5) 한국식품공업협회 : 식품공전, 98(1995)
- 6) 김종균 : 한국 고유 떡류의 보존성에 관한 연구, 대한가정학회지, 14(14), 149(1976)
- 7) 신선영 : 떡의 장기 저장방법, 식품과 영양, 8(3), (1987)

제 5 장 한방음료 공정 연구 및 산업적 전망 예측

제 1 절 서설

현대는 서구문화의 수용으로 식생활의 패턴도 다양하게 변화함에 따라 소화기질환, 대장질환, 고혈압증 그리고 당뇨병 등의 만성 퇴행성질환이 증가하는 추세에 있으며, 이러한 식생활 변화에 따라 나타나는 문제들을 해결하기 위해 식품의 영양적 기능 외에 제 3의 기능으로서 생명활동의 조절기능을 가진 식품에 대한 연구가 활발히 진행되어지고 있으나, 국내에서는 그 대상이나 방향에 있어서 극히 한정적이었다.

최근, 한방 및 한약재를 소재로 한 식품, 건강식, 자연식 및 음용식 등을 포함하여 실로 많은 제품들이 시판되고 있지만 여러 가지 면에서 개선되어야 할 부분이 존재하고 있다. 또한 경제성장에 따른 식생활의 변화, 건강유지와 질병치료에 대한 관심, 그리고 의학의 진보 등에 의해 질병예방과 직결되는 생리학적 기능을 가진 새로운 형태의 기능성 식품이 사회적으로 요구되고 있는 시점이다.

한방처방 또는 비방에 의해 수많은 바이러스성 질병을 치료하고 있는데, 이 처방들은 기능성음료 및 전통 식품의 개발에 응용한다면 고부가가치와 국제 경쟁력을 함께 지닌 식품제제를 개발할 수 있을 것으로 생각된다. 이를 위해 그 우수성이 세계적으로 널리 알려진 우리의 전통한약처방 및 한약재를 이용하여 새로운 기능성을 가진 식품을 개발할 필요성이 있다. 그리고, 한의학에서는 “의식동원(醫食同源)”이라 하여 음식물을 통해서 질병을 예방하고 치료한다는 의미가 내포되어 있어 기능성식품과 일맥상통한 관계에 있는데, 이러한 특성을 이용하면 호흡기 바이러스성 질환을 억제하는 신기능성 식품제제가 개발될 수 있다.

선진국에서는 최근 동, 식물자원이나 생약재를 이용한 천연화합물의 개발 및 탐색에 새로운 개념을 토대로 한 기능성 식품 개발전략을 추진하고 있는데, 우리 나라는 특히 우수한 생약재를 많이 보유하고 있을 뿐만 아니라 한방이 전래로부터 감기치료의 치료제로 각광을 받고 있고, 현재도 이들 처방을 이용하여 병원이나 약국에서 감기 또는 유행성 독감들을 효과적으로 치료하고 있다. 이 처방들을 현대 과학의 집약적 기술

을 도입하여 잘 규명한다면 새롭고 고부가가치가 있는 호흡기성 바이러스예방 또는 억제 기능을 가진 식품을 개발할 수 있을 것으로 사료되며 이를 기능성음료로 개발·생산한다면 그 파급효과와 활용도는 학문적 가치뿐만 아니라 경제적으로도 매우 높을 것으로 판단된다.

본 연구에서는 실험실에서 개발된 NP-97-1의 음료에 대해 실용화하기 위해 공장 규모와 상업성에 입각한 제작공정의 검토하고 시험생산을 하는 것을 목적으로 한다.

제2절 연구내용 및 전략

1. 연구내용

- ◆ 음료를 실용화하기 위해 실험실에서 개발된 NP-97-1에 대해 공장 규모와 상업성에 입각한 제작공정의 연구

- ◆ 음료 시제품의 효능평가
 - 동물실험

 - 맹검검사

 - 항산화활성검사

 - 보존성을 위한 미생물 활성 검사

2. 연구개발 전략

식품이 가지고 있는 영양기능 외에 제3의 기능으로서 생체내 생명활동의 조절기능을 가진 기능성 식품에 대해 제약회사를 중심으로 새바람이 불고 있다. 기능성 식품(건강보조식품)은 IMF의 영향에서 판매가 부진했는데, 올해는 전년대비 13.2%신장을 예측할 정도이다. 올해의 음료시장은 지난해 같은 기간에 비해 2% 증가한 1조 5백억원 규모인데, 좀처럼 활성화될 기미가 보이지 않던 기능성음료 시장에 일양약품, 동화제약 등 국내 우수 제약업체들이 올 들어 기능성 음료 신제품을 차별화 된 마케팅전략으로 불황 돌파구를 찾고 있다.

기능성음료 시장은 식이섬유 및 감식초, 알로에, 뽕잎 등 특정성분의 기능을 강조한 제품이 많았으나, 일부 식이섬유 음료만을 제외하고 겨우 명맥만 유지하고 있는 실정이다. 최근 환경호르몬 문제가 사회적 문제로 대두되고 있는 점에 착안하여 국내의 제약·식품회사들이 「위풍당당 동충하초」 등 한방소재로 한 기능성 음료들이 건강지향적 전략상품으로 시판 또는 준비하고 있다.

한방소재를 이용한 기능성 음료는 전통음료와 그 맥을 같이 하고 있고, 예로부터 전해 내려오는 우리 고유의 음료 중 산업화가 되어 있는 품목에는 식혜, 수정과, 미수가루음료 등이 있으며 음료 전체 시장규모 확대와 더불어 전통음료의 시장규모 확대와 더불어 전통음료의 시장규모도 꾸준히 확대되어 왔고, 한 예로 식혜의 시장규모는 '93년 65억원 수준에서 '94년 300억원, '95년 2,000억원으로 급성장을 하였다. 또한, 식혜수요의 증가에 따라 생산업체가 크게 증가하여 약 '95년 하반기에는 80여개소에 이르고 있다.

본 연구에 세부로 참여하고 있는 풍한식품은 영지차를 주력으로 생산하여 특유의 통신판매망을 이용하여 한방음료의 시장에서 꾸준히 성장하고 있지만 개별품목 수는 그다지 많지 않아 사업의 확장을 꾀하려고 계획 중인데, 【한국한의학연구원과 공동으로 감기예방 및 치료보조의 효과를 가지는 음료 NP-97-1를 개발하여 본 연구가 종료되는 시점에서 제품을 생산하여 통신판매를 위주로 시판】 할 예정이며, 제품의 호응도에 따라 양산 체제를 구축할 것이다.

제3절 연구방법

1. 시제품 제작

가. 캔 음료의 제작

NP-97-1을 구성하고 있는 유자, 모과, 후박, 대추 그리고 정제수를 각기 일정한 비율로 혼합한 후, 약탕기로 4시간동안 가압 또는 열처리를 하여 액을 추출하여 120ml 캔에 담아 진공 밀봉하였다.

나. 파우치 음료의 제작

NP-97-1을 구성하고 있는 한약재 각각 200g에 물 6L를 넣고 2시간 열수추출하여 진공 비닐팩(용량 100ml)으로 40개를 제작하였다.

다. 일반성분의 분석

수분은 상압가열건조법으로 분석하였고, AN은 Formol 적정법, TN, TCAN(trichloro-acetic acid soluble Nitrogen)은 Kjeldahl 질소정량법, 회분은 강열감량법, 고형분은 상압가열건조법, 인(P)은 습식시험법, K, Ca, Mg, Fe등은 원자흡광광도법으로 측정하였다. TCAN의 분석은 시료와 27.2%의 TCA 용액을 1:1로 섞어 30분 방치 후 원심분리(9000rpm, 20min, 5℃)하여 Kjeldahl 질소정량법으로 분석하였다. Aw는 수분활성도 측정기(Hygroscop BT-RS1, rotronic AG, SWISS)로 측정하였고 시료의 환원당은 Somogyi-Nelson법에 따라 분석하였다. pH는 pH meter로 측정하였고 당, 아미노산, 유기산의 분석은 HPLC(HP-1050, USA)를 이용하여 분석하였다.

2. 제품 생산공정 연구

가. 재료 및 기구

지하수, 증류수, 역삼투정제수, 일반수돗물, N.A(Nutrient Argar), Smear Lode, Filter, Auto-clave, Incubator, Spectrophotometer, Auto-pipette, Clean-bench, Auto-balance, 레토르트 파우치 포장기, 캔포장기,

나. 실험 방법

1) 추출온도 및 시간, 사용되는 물의 상태에 따른 비교

가) 깨끗이 세척한 NP-97-1을 구성하는 각각의 한약재를 지하수와 일정한 비율로 추출기에 넣고 혼합하여, 90℃, 100℃, 110℃와 120℃에서 30분, 60분, 90분, 120분으로 각각 추출하였다.

나) 지하수를 이용하여 유자와 대추, 모과의 농축액을 추출해낸 것과 같이 증류수와 역삼투 정제수, 일반 수돗물로도 90℃, 100℃, 110℃, 120℃에서 각각 30분, 60분, 90분, 120분의 시간으로 추출하였다.

다) 이와 같이 물의 종류와 온도, 시간에 따라 추출된 내용물들을 각각 filtering하여, 각각의 OD 값을 기록하였다.

2) 살균기의 온도에 따른 살균정도 비교 검토

가) NP-97-1을 구성하는 각각의 한약재를 각각 10g씩 넣고 정제수를 100ml 넣은 뒤 110℃에서 90분간 추출하여, 추출된 Sample을 filtering 하였다.

나) 살균 과정에서 온도를 80℃, 90℃, 100℃, 110℃로 다르게 20분씩 가온하여 각각을 Sampling 하였다.

다) 살균된 추출물을 각각 영양배지(N.A)에 도말하여 Overnight 시킨 후 Colony의 수를 확인하였다.

3) 완제품의 유통기한 설정 테스트

가) NP-97-1을 구성하는 각각의 한약재를 각각 10g씩 넣고 정제수를 100ml 넣은 뒤 110℃에서 90분간 추출하여, 추출된 Sample을 filtering 하고, 100℃에서 20분간 살균하였다. 살균된 추출물을 캔과 레토르트 파우치에 포장하고, 포장된 완제품을 30℃, 40℃, 50℃ Incubator에 넣었다.

나) 1개월 후, 2개월 후, 3개월 후 30℃, 40℃, 50℃ Incubator에서 각각의 Sample을 영양배지(N.A)에 접종하여 Overnight 시킨 후 Colony의 수를 확인하였다.

4) 생산원가 및 판매전망과 관련한 사업성 분석

사업성 분석은 설문지법과 재료의 원가 및 수급 현황 그리고 상품 판매시의 파급 효과를 종합적으로 평가하여 타당성을 검토하였다. 설문지는 통신 판매망을 이용하였다. 대상은 20대 이상의 남녀를 동등한 비율로 조사하였다.

3. 제품의 항균활성 및 항산화 활성 연구

가. 항균 및 미생물 생육에 미치는 영향평가

1) 각 분획물들의 전처리

건조된 시료 1g에 0.6ml의 200mM phosphate buffer(pH 7.0)에 녹여 원액으로 하고 이 원액의 2배, 5배 희석물을 제조하여 시험에 사용하였다. Fig. 1에 의한 각 fraction 중 염기성, 강산성, 약산성, 중성 분획은 1ml의 200mM phosphate buffer(pH

7.0)에 녹였고 양성 분획은 1g을 취해 1ml의 200mM phosphate buffer(pH 7.0)에 녹여서 시료로 사용하였다.

2) 사용균주 및 배지

항균활성 측정에 사용된 균주로는 Gram positive 균주로서 *Staphylococcus aureus* KCTC 1621, *Bacillus subtilis* KCTC 1021 및 *Enterococcus faecalis* KCTC 3512, Gram negative 균주로서 *Escherichia coli* KCTC 2571, *Enterobacter aerogenes* KCTC 2190를 사용하였다. 순수분리한 균주는 Nutrient Agar(Difco)배지에 접종, 배양하여 냉장고에 보관하면서 사용하였다. Nutrient agar slant에서 활성화된 균주를 1 loop 취하여 Nutrient Broth(Difco)에 접종하고 33℃에서 15시간 동안 배양한 후 항균성 검색에 사용하였다.

3) 항균활성의 측정

각 획분의 항균성 검색은 Bauer 등의 disc diffusion method를 이용하여 실시하였다. 즉 상기에서 활성화된 각 균주의 배양액 0.2ml를 Mueller-Hinton Medium(Difco)으로 제조한 plate에 균일하게 도말하고 멸균된 0.6mm filter paper disc(Advantec, Toyo Roshi Kaisha, Std., Japan)를 plate의 중앙에 올려놓은 후 이 disc에 각 획분을 20 μ l 적하하여 33℃에서 24~48시간 동안 배양 후 disc 주위의 clear zone의 직경(mm)을 비교하였다. 대조구로서 현재 식품 보존료로 사용하고 있는 benzoic acid와 sorbic acid를 사용하였다.

나. 항산화 활성

1) DPPH Method : 전자공여능의 측정은 위에서 얻은 각 fraction의 시료에 대해 Blois의 방법을 이용하여 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)에 대한 전자 공여능(electron donating activity)으로 측정하였다. 즉 각 시료 0.2ml에 1.4ml의 MeOH을

첨가하고 여기에 DPPH 용액(80 μ g/ml in 99.9% MeOH) 0.4ml을 가하여 vortex mixer로 진탕하여 실온에서 분광광도계를 이용하여 흡광도를 측정하였고, 10분간의 흡광도 변화로 전자 공여능을 나타내었다.

활성의 비교를 위해 대조구로 BHA, α -tocopherol를 반응총량(2ml)의 100ppm이 되도록 첨가하여 비교시험을 하였다.

2) Thiocyanate method : Takao 등과 Nakatani의 방법을 변형하여 각 fraction에 대해서 측정하였다. 즉 각 시료 2ml에 2.5% linoleic acid 용액 2ml를 첨가하여 혼합한 후 50mM Phosphate buffer(pH7.0)용액 6ml을 첨가, 혼합하였다. 상기액을 brown screw cap test tube에 넣고 40 $^{\circ}$ C에서 incubation하면서 7일간 매일 분석하였으며, 분석방법은 매 24시간마다 반응액 0.1ml을 취하여 75% MeOH 3ml, 30% NH₄SCN 용액 0.1ml을 첨가 혼합하고 이어서 20 mM FeCl₂ 용액(2.54mg/ml in 3.5% HCl) 0.1ml을 넣어 혼합한 후 정확히 3분 후(Timer 사용)에 500nm에서 흡광도를 측정하였다.

활성의 비교를 위해 BHA, α -tocopherol을 최종반응액량(10ml)에 대해 100ppm이 되도록 첨가하여 실험하였다.

3) Thiobarbituric acid method : Nakatani 방법에 따라 상기 Thiocyanate method에서 incubation된 반응액 2ml에 20% trichloroacetic acid(CCl₃COOH) 2ml과 0.67% 2-thiobarbituric acid 용액 1ml을 첨가하고 boiling water bath에 10분간 정치시킨 후 냉각시켜 15000rpm에서 20분간 원심분리한 후 532nm에서 Absorbance를 측정하였다. 분석은 Thiocyanate method의 반응액에 대해 1일, 7일 측정하였고, 항산화능은 7일 동안의 흡광도의 변화로 나타내었다.

4. 항인플루엔자 바이러스에 대한 활성

한방추출원액 및 한방추출원액+올리고당을 첨가하여 제조한 제품에 대하여 제2장에서 기술한 in situ ELISA를 이용하여 항influenza virus 활성을 측정하였다.

5. *In vivo*에서 항 influenza virus 활성

1) 마우스를 이용한 항바이러스 활성 평가

수정란에서 증식한 인플루엔자 바이러스를 초원심분리기로 25,000rpm에서 2시간 원심분리하여 농축시킨 후, heamagglutination test를 통하여 역가를 확인하고 농축된 바이러스를 20 μ l씩 5~6 주령의 Balb/C 마우스에 비강을 통해 감염시키고, 감염된 마우스를 3일, 5일, 7일 간격으로 폐와 기관지를 적출하여 homogenizer와 sonication를 이용하여 적출액을 만들고, 3,000rpm에서 15분간 원심분리한 후 상층액을 0.45 μ m filter로 여과하여 heamagglutination test를 통하여 역가를 평가하였다.

2) 수정란을 이용한 항바이러스 활성 평가(EID₅₀)

가) 수정란에서 바이러스 증식

부란기에서 10~11일간 수정란을 배양한 후 0.5 HA unit농도의 인플루엔자 바이러스를 100 μ l씩 마우스에 접종하고 파라핀으로 밀봉한 다음 2일간 34 $^{\circ}$ C에서 배양하고 4 $^{\circ}$ C에서 18시간 이상 방치시킨 후, 주사기를 이용하여 10 μ l 정도의 장노액을 모았다. 이와 같은 과정을 수 차례 반복하여 수정란에 적응된 인플루엔자 바이러스를 생산하여 초원심분리기를 이용하여 농축보관한 후 EID₅₀을 구하기 위하여 사용하였다.

나) EID₅₀의 계산

인플루엔자 바이러스에 대한 EID₅₀은 수정란의 장노액에 heamagglutination test에 의해 EID₅₀값을 얻었다. 초원심분리기를 사용하여 농축한 13HA의 바이러스를 PBS에 10배 계단 희석하여 준비하고 10일 정도 37 $^{\circ}$ C에서 배양한 수정란에 각각의 농도를 가진 바이러스 및 준비된 시료를 100 μ l씩 수정란의 장노액에 접종하고 접종부위는 파라

핀으로 봉입하였다. 2일간 34℃에서 배양한 후 배양된 수정란을 4℃에서 18시간 이상 방치 후 수정란의 장노액을 주사기로 적출하고 적출된 장노액에서의 바이러스 증식 여부를 확인하기 위하여 heamagglutination test를 실시하여 EID₅₀값을 구하였다.

6. 제품에 대한 맹검시험

경기대학교 수원캠퍼스에서 맹검시험에 응한 교직원과 학생 45명을 상대로 1998년 10월 19일~12월 12일(54일간) 복용시킨 후 14항목에 대한 설문을 조사한 후 이항검정으로 통계처리하여 맹검결과를 평가하였다.

【설문지】

이름		나이	만	세	성별	남, 여	대상번호	
----	--	----	---	---	----	------	------	--

다음은 귀하께서 1998년 10월 19일에서 1998년 12월 12일까지 약 54일 동안 복용하신 약제에 관한 질문들입니다. 조사 목적은 귀하께서 복용하신 약제의 항감기 효능성 여부를 판단하고 관능적인 특성에 관한 자료를 얻는 데에 있습니다. 다음의 설문에 대하여 해당하는 내용에 빠짐없이 답하여 주시면 감사하겠습니다. 답하여 주신 내용은 과학적 목적에만 사용합니다. 감사합니다.

◆ 1999년 . 월 일

전화번호 :

주 소 :

1. 약제를 섭취하지 않은 평상시 귀하께서 1년간 감기를 앓은 빈도를 다음 중에서 골라 주십시오.

- ① 감기를 경험한 적이 없다.
- ② 1-2회
- ③ 3-4회
- ④ 5회 이상

2. 약제를 섭취하지 않은 평상시 1년간 감기를 앓을 때 회복까지 걸린 평균 기간은 어느 정도입니까?

- ① 1-2일
- ② 2-3일
- ③ 4-5일
- ④ 6-7일
- ⑤ 일주일 이상

3. 귀하께서 약제를 복용하는 동안 타년도와 같은 기간에 비교하여 감기에 걸린 빈도를 표시하여 주십시오.

- ① 타년도에 비해 감기에 훨씬 덜 걸린 편이다.
- ② 타년도에 비해 감기에 약간 덜 걸린 편이다.
- ③ 타년도와 다르지 않다.
- ④ 타년도에 비해 감기에 약간 더 걸린 편이다.
- ⑤ 타년도에 비해 감기에 훨씬 더 걸린 편이다.

4. 귀하께서 약제를 복용하는 동안 감기를 앓으셨다면 타년도에 앓은 감기와 비교하여 심한 정도가 어떤 편입니까?

- ① 타년도의 감기에 비해 훨씬 쉽게 나았다.
- ② 타년도의 감기에 비해 약간 쉽게 나았다.
- ③ 타년도의 감기와 동일한 정도로 앓았다.
- ④ 타년도의 감기보다 약간 심하게 앓았다.

⑤ 신맛이 대단히 약했다.

9. 귀하께서 약 54일간 음용하신 약제의 쓴맛에 대한 평가를 아래에서 골라주십시오.

① 쓴맛이 대단히 강했다.

② 쓴맛이 약간 강했다.

③ 쓴맛이 적당했다.

④ 쓴맛이 약간 약했다.

⑤ 쓴맛이 대단히 약했다.

10. 귀하께서 약 54일간 음용하신 약제의 떫은 맛에 대한 평가를 아래에서 골라주십시오.

① 떫은맛이 대단히 강했다.

② 떫은맛이 약간 강했다.

③ 떫은맛이 적당했다.

④ 떫은맛이 약간 약했다.

⑤ 떫은맛이 대단히 약했다.

11. 귀하께서 약 54일간 음용하신 약제의 구수한 맛에 대한 평가를 아래에서 골라 주십시오.

① 구수한 맛이 대단히 강했다.

② 구수한 맛이 약간 강했다.

③ 구수한 맛이 적당했다.

④ 구수한 맛이 약간 약했다.

⑤ 구수한 맛이 대단히 약했다.

12. 귀하께서 약 54일간 음용하신 약제의 냄새에 대한 평가를 아래에서 골라주십시오.

① 음용하기에 대단히 좋은 향이 있었다.

② 음용하기에 약간 좋은 향이 있었다.

③ 냄새가 거의 느껴지지 않았다.

④ 음용하기에 약간 부적절한 향이 있었다.

⑤ 음용하기에 대단히 부적절한 향이 있었다.

13. 귀하께서 약 54일간 음용하신 약제에서 일반 한약에서 나는 냄새나 맛을 느낄 수 있었습니까?

① 많이 느낄 수 있었다. ② 약간 느낄 수 있었다. ③ 느낄 수 없었다.

▶ 귀하께서 음용하신 약제의 맛, 냄새, 색깔에 관한 개선점이나 지적할 사항이 있으면 아래 난에 기록하여 주십시오.

제 4절 결과 및 고찰

1. 일반성분 분석

Food labelling의 기초자료를 확보하기 위해서 시료의 일반성분은 표 1.과 표 2.에 나타낸 바와 같다.

NP-97-1의 주원료 한약재인 대추, 모과, 유자의 농축 extract의 일반성분 분석 결과를 보면, 고형분 함량이 대추가 72%로 제일 높고 유자는 약 34%로 제일 낮았다. 환원당은 대추가 7.02%, 모과와 유자는 1.3~1.7%로 낮게 나타났다. 이러한 결과는 동일

량을 열수추출하여 얻은 시료이나 농축효율이 다른데서 기인된다고 생각되며, 이는 향후 공장 제조시 각 시료의 혼합 비율과 농축조건 설정에 대한 자료로 이용될 수 있다. pH는 대추가 4.40, 모과가 3.64, 유자가 3.87로 유자가 가장 낮게 나타났다. 흡광도와 갈색도는 대추가 각각 4.201, 3.753으로 가장 높게 나타났다(Table 1).

Table 1. 대추, 모과, 유자 시료의 일반성분

분석항목	대추	모과	유자	실험방법
수 분(%)	27.76	45.65	66.04	상압가열건조법
회 분(%)	1.64	2.94	2.33	강열감량법
고형분(%)	72.24	54.35	33.96	상압가열건조법
P (%)	0.09	0.063	0.047	비색법
K (%)	0.64	1.29	1.08	원자흡광광도법
Ca (%)	0.004	0.035	0.067	원자흡광광도법
Mg (%)	0.038	0.080	0.064	원자흡광광도법
Fe (ppm)	26	46	36	원자흡광광도법
환원당	7.02	1.67	1.31	Somogyi-Nelson법
pH	4.40	3.64	3.87	Digital pH meter
Abs. 285	4.201	3.983	4.084	Spectrophotometer
Abs. 490	3.573	1.246	0.857	Spectrophotometer

NP-97-1은 실험실에서 제조된 pouch시료가 공장에서 제조된 can시료에 비해 더 농축된 것으로 나타나 향후 공장제조시 세심한 공정관리가 필요로 되어 할 것이다. pouch시료에서 수분은 94.6%, 고형분 5.36%, 환원당 2.33%로 나타났으며 칼륨함량이 0.12%가 되었다. 대추 농축액에서 높은 환원당 함량을 보여 pouch의 환원당은 많은 부분이 대추에서 기인됨을 알 수 있다. pouch시료의 pH가 3.8로 산성을 띠어 산도 조절에 대한 고려가 요구된다. 또 pouch시료의 AN 함량은 0.59mg/g이었고 TN 함량은 0.28mg/g, TCAN 함량은 0.14mg/g이었다(Table 2.).

Table 2. NP-97-1의 pouch시료와 can시료의 일반성분

분석항목	pouch	캔	실험방법
수 분(%)	94.64	97.61	상압가열건조법
Aw (27.5℃)	0.991	-	수분활성도 측정기
회 분(%)	0.19	0.11	강열감량법
고형분(%)	5.36	2.39	상압가열건조법
P (%)	0.007	0.003	비색법
K (%)	0.12	0.02	원자흡광광도법
Ca (%)	0.004	0.003	원자흡광광도법
Mg (%)	0.006	0.003	원자흡광광도법
Fe (ppm)	6	6	원자흡광광도법
환원당(%)	2.33	0.66	Somogyi-Nelson법
pH	3.80	3.79	Digital pH meter
AN (mg/g)	0.59	-	Formol 적저법
TN (mg/g)	0.28	-	Kjeldahl 질소정량법
TCAN(mg/g)	0.14	-	Kjeldahl 질소정량법
Abs. 285	4.098	3.959	Spectrophotometer
Abs. 490	1.496	0.348	Spectrophotometer

2. 제품 생산 공정 연구

호흡기성 바이러스 예방 또는 억제 식품을 개발, 생산하기 위하여 실험실에서 개발된 NP-97-1 음료를 공장규모와 상업성에 입각해 추출 온도 및 시간, 추출에 사용되는 물의 상태와 용량, 침전물 제거를 위한 filtering조건, 살균기의 온도에 따라 살균정도 등의 제작공정을 연구하였다.

가. 추출온도 및 시간, 사용되는 물의 상태에 따른 비교

추출온도 및 시간, 추출에 사용되는 물의 상태에 따라서 두 차례 반복 실험을 했다(Table 3). 두 번의 실험 평균 흡광도를 구하여 본 결과 역삼투정제수를 사용하여 110℃의 온도에서 120분간 추출한 것의 흡광도값이 가장 높게 나왔고, 지하수를 사용하여 90℃의 온도에서 30분간 추출한 것의 흡광도값이 가장 낮게 나왔다.

각각의 온도에 따른 흡광도값의 증가비율을 보면 평균적으로 110℃ 가장 높게 관찰되었다. 그리고, 추출시간에 따른 흡광도값의 증가 비율을 보면 평균적으로 60분이 가장 높게 관찰되었다.

추출온도에 따른 흡광도값을 살펴보면 추출하는 물에 관계없이 120℃대에서 가장 높게 나타났다. 그러나 역삼투정제수로 60분간 추출한 sample을 예를 들면 90℃와 100℃의 흡광도값 차이는 0.002, 100℃와 110℃의 흡광도값의 차이는 0.099, 110℃와 120℃의 흡광도값의 차이는 0.004로 증가율이 110℃에서 120℃로 올려 추출했을 때 그 증가율이 떨어지는 것으로 보아 추출 온도대는 110℃가 가장 좋을 것으로 생각된다. 추출시간을 살펴보면 역삼투정제수에서 110℃의 온도로 30분, 60분, 90분, 120분씩 추출해낸 경우에서 30분간 추출해냈을 때의 흡광도값은 2.237, 60분 추출한 것의 흡광도값은 3.006, 90분 추출한 것은 3.018, 120분간 추출한 액의 흡광도값은 3.021로 나타났다. 120분 동안 추출한 액의 흡광도값이 높지만 30분과 60분 추출한 액의 흡광도값의 차이는 0.769이나 60분 추출한 것과 90분 추출한 것의 차이는 0.012, 90분 추출한 액의 흡광도값과 120분 추출한 액의 흡광도값 차이는 0.003이었다. 이것으로 보아 60분간 추출하였을 때의 증가율이 가장 높으므로 60분간 추출하는 것이 가장 이상적이라 생각된다.

추출에 사용되는 물의 종류를 알아보기 위해 지하수, 증류수, 역삼투정제수, 일반수돗물을 선정하였으며 110℃의 온도에서 60분간 추출해낸 경우를 보면 지하수를 이용하였을 때에는 2.101의 흡광도값이 나왔고, 역삼투정제수일 때는 3.006의 흡광도값이 증류수의 흡광도값은 2.707, 일반수돗물의 흡광도값은 2.398이 나왔다. 추출능력이 좋은 것은 증류수로 나타났으나 증류수의 제조 가격이 비싸므로 경제적인 측면을 고려한다면 역삼투정제수를 이용하여서 추출하는 것이 이상적이라 생각되며, 추출하는 물의

용량과 관련해서는 시제품 생산을 통해 실험하기로 하였다.

나. 살균기의 온도에 따른 살균정도 비교

살균 온도에 따른 일반세균 수를 보면 살균온도가 110℃일 때 가장 적게 나타났고 80℃일 때 가장 많이 나타났다(Table 4). 완제품의 시간 경과에 따른 내용물의 일반 세균 수를 측정한 결과 시간이 경과함에 따라 세균 수의 증가 비율이 약간씩 증가되었으며 캔보다 레토르트 파우치 포장이 다소 많은 것으로 관찰되었다.

살균기 온도에 따른 살균정도의 관찰은 역삼투정제수를 사용하여 110℃로 60분간 가열해서 얻은 추출물을 80℃, 90℃, 100℃, 110℃로 살균한 것을 보면 80℃로 살균한 추출액 1ml에 형성된 colony수는 10개, 90℃로 살균한 추출액에 형성된 colony수는 8개, 100℃에서는 6개의 colony가 형성되었으며, 110℃에서는 5개의 colony가 형성되었다. 결과적으로는 110℃에서 colony의수가 가장 적지만 80℃와 90℃로 살균한 액의 colony수 차이는 2개, 90℃와 100℃로 살균한 액의 colony수 차이도 2개, 100℃와 110℃로 살균한 colony수 차이는 1개로 100℃로 살균하였을 때까지 감소율을 유지하다가 110℃에서는 감소율이 낮아지는 것으로 보아 100℃에서 살균하는 것이 효과적이라 생각된다.

다. 완제품의 유통기한 설정 테스트

포장된 완제품의 유통기한 설정 테스트는 각각 30℃, 40℃, 50℃의 Incubator에서 일정기간 보관한 결과 30℃에서 보관된 완제품에서 일반 세균수가 가장 많이 나타났고 전체적으로 보관 온도에 관계없이 시간이 경과함에 따라 일반 세균수가 증가하는 것으로 확인되었다. 실험결과로 미루어 볼 때 보관 시간이 최소 10개월이 되어도 일반 세균수는 100colony/ml이하가 될 것으로 생각된다(Table 5). 보관은 냉장시 1~3개월까지는 가능하다고 생각되나, 안전성을 고려한다면 1개월 정도가 적당하다고 판단되었다.

Table 3. 추출하는 물의 종류, 추출온도 및 추출시간에 따른 추출물의 혼탁도 조사

물 종류	추출온도	시간	1차 O.D값	2차 O.D값	평균 O.D 값
지	90℃	30분	1.017	1.084	1.050
		60분	1.750	1.772	1.761
		90분	1.775	1.780	1.777
		120분	1.781	1.789	1.785
하	100℃	30분	1.151	1.155	1.153
		60분	1.872	1.895	1.883
		90분	1.886	1.899	1.892
		120분	1.910	1.901	1.905
수	110℃	30분	1.387	1.405	1.396
		60분	2.100	2.102	2.101
		90분	2.103	2.105	2.104
		120분	2.111	2.108	2.109
수	120℃	30분	1.410	1.413	1.411
		60분	2.091	2.187	2.139
		90분	2.196	2.205	2.200
		120분	2.198	2.204	2.201
역	90℃	30분	1.975	2.001	1.988
		60분	2.900	2.910	2.905
		90분	2.908	2.911	2.909
		120분	3.002	3.006	3.004
삼	100℃	30분	2.011	2.113	2.062
		60분	2.900	2.914	2.907
		90분	2.925	2.919	2.922
		120분	3.001	3.010	3.005
투	110℃	30분	2.240	2.234	2.237
		60분	3.000	3.012	3.006
		90분	3.018	3.019	3.018
		120분	3.021	3.022	3.021
정	120℃	30분	2.290	2.198	2.244
		60분	3.010	3.011	3.010
		90분	3.012	3.020	3.016
		120분	3.017	3.021	3.019

물종류	추출온도	시간	1차 O.D 값	2차 O.D 값	평균 O.D 값
중 류 수	90℃	30분	1.612	1.590	1.601
		60분	2.360	2.371	2.365
		90분	2.421	2.380	2.400
		120분	2.431	2.381	2.406
	100℃	30분	1.670	1.689	1.679
		60분	2.442	2.461	2.451
		90분	2.460	2.470	2.465
		120분	2.625	2.477	2.551
	110℃	30분	2.005	2.010	2.007
		60분	2.700	2.714	2.707
		90분	2.731	2.725	2.728
		120분	2.801	2.759	2.780
	120℃	30분	2.012	2.016	2.014
		60분	2.733	2.727	2.730
		90분	2.752	2.757	2.754
		120분	2.788	2.781	2.784
일 반 수 돗 물	90℃	30분	1.607	1.579	1.593
		60분	2.060	2.055	2.057
		90분	2.107	2.100	2.103
		120분	2.109	2.113	2.111
	100℃	30분	1.700	1.734	1.717
		60분	2.108	2.110	2.109
		90분	2.111	2.113	2.112
		120분	2.117	2.115	2.116
	110℃	30분	1.956	1.960	1.958
		60분	2.400	2.397	2.398
		90분	2.407	2.414	2.410
		120분	2.410	2.410	2.410
	120℃	30분	2.109	2.110	2.109
		60분	2.410	2.419	2.414
		90분	2.417	2.420	2.418
		120분	2.421	2.421	2.421

Table 4. 살균온도에 따른 추출액의 일반 세균수

(colony수/ml)

조건	중류수를 110℃에서 60분간 추출한 액			
살균온도	80℃	90℃	100℃	110℃
Colony수	10개	8개	6개	5개

Table 5. 시간의 경과 및 외부 온도에 따른 일반 세균수

(colony수/ml)

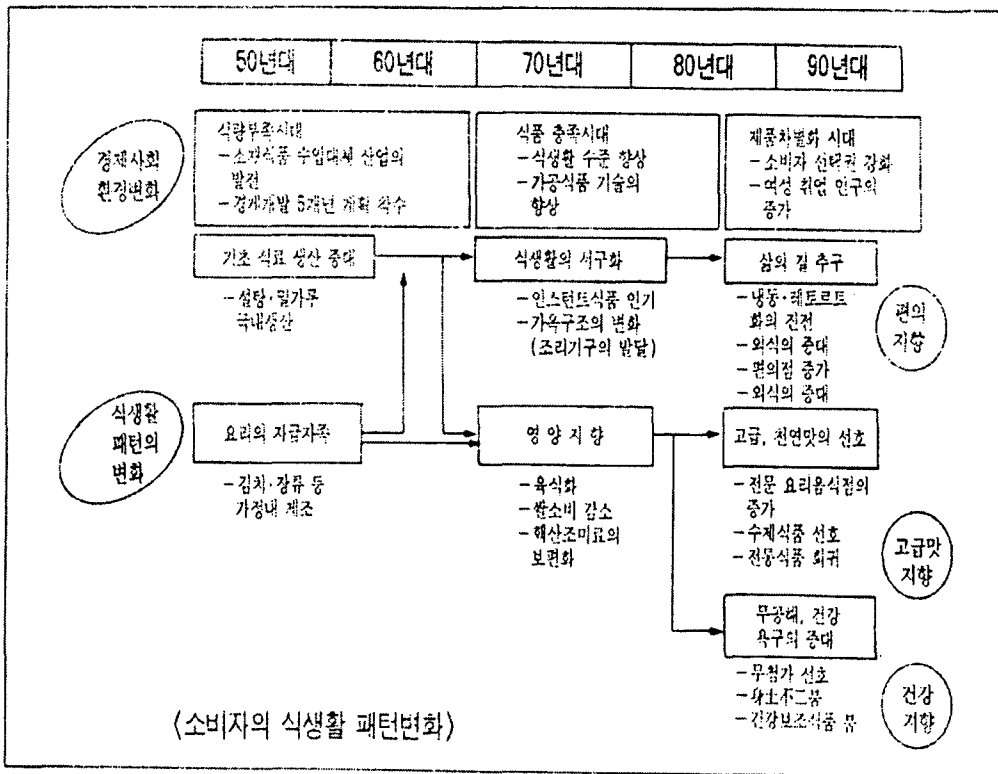
	30℃		40℃		50℃	
	캔포장	파우치 포장	캔포장	파우치 포장	캔포장	파우치 포장
1개월 후	5개	7개	3개	5개	3개	4개
2개월 후	7개	10개	5개	7개	4개	5개
3개월 후	10개	14개	8개	10개	6개	8개

라. 생산원가 및 판매전망과 관련한 사업성 분석

1) 소비자의 패턴 분석

70~80년대에는 경제성장과도기와 국민소득을 저하로 인하여 소비자들이 섭취하거나 음용하는 식품들은 단순한 기호식품의 영역을 담당하고 있는 실정이었다. 그러나 경제성장과 국민소득을 증가로 인하여 현재의 식품회사들은 국민건강에 이바지하는 건강음료 및 건강식품을 개발·생산하므로써 새로운 식품영역을 창출할 뿐만 아니라 국내외의 시장을 점유하여 세계적으로 각광받고 있는 실정이다. 그리고 소비자들의 식생

활 패턴 변화도 경제성장과 국민소득증가로 인하여 아래의 그림처럼 다양해지고 있고, 근래에는 옛날처럼 단순한 기호식품에서 벗어나 제품의 고급화, 건강지향적으로 변화고 있는 추세다. 이러한 관점에서 볼 때 전통 한방처방을 이용한 감기억제 기능성 음료 및 식품의 개발은 그 가치와 의의가 매우 크다고 할 수 있으며, 소비여부도 매우 희망적이라 사료된다.

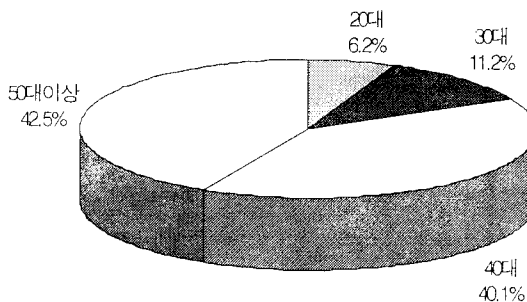


전통 한방처방의 감기억제 기능성 음료에 대한 시장성조사는 연령층별, 성별, 소득 수준별로 조사하였다.

가) 연령층별 시장성 조사

본 기능성 음료는 한약재를 그 주성분으로 한 것이기 때문에 한약재 특유의 냄새로 인해 각 연령층별 수요에 있어 많은 차이를 보였는데(그림1), 20~30대의 젊은 층의 경우 선호도가 낮았다. 이것은 식생활 패턴이 서구화됨에 따라 한약재의 냄새를 기피하는 경향성을 보여준다고 판단된다. 30대 이후의 장년, 고령층은 일반적으로 선호하는 경향을 보였다. 연령층별 시장성은 노화·면역에 관련된 제품으로 전략화할 필요가 있다. 그러나 현재에 이르러 건강에 대한 관심이 매우 급증하고 있는 추세임을 감안할 때 본 기능성 음료의 감기예방 효과에 대한 확실한 실험결과를 앞세워 제품을 홍보할 경우 이러한 연령층별 수요의 차이는 어느 정도 극복할 수 있는 문제라 사료된다.

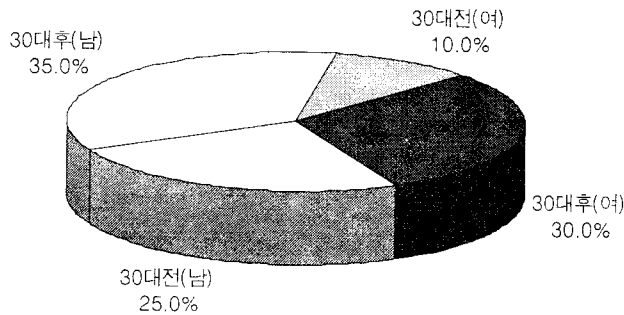
그림1) 연령별 조사 결과



나) 성별 시장성 조사

남녀 성별에 관한 시장성은 30대 전후로 나누어 조사하였는데(그림 2), 수요는 여성보다는 남성쪽이 월등하였다. 여성의 경우 기능성 음료로 다이어트를 목적으로 한 음료들을 선호했으며, 앞으로도 이러한 추세가 계속될 것으로 전망되나 남성의 경우 여성보다 더욱 건강에 관한 문제를 중요시하는 경향이 있어 본 기능성 음료에 대해 선호했다고 예상된다. 이러한 문제는 기능성 음료의 색이나 맛을 현대여성의 취향에 맞게 보완함으로써 어느 정도 극복될 수 있으리라 예상된다.

그림2) 성별 조사 결과

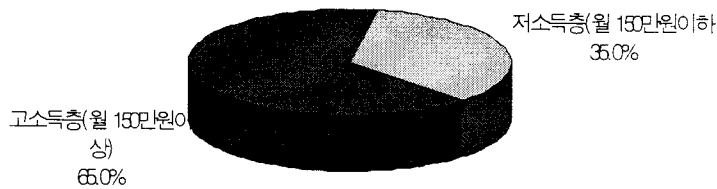


다) 소득 수준별 시장성 조사

소득 수준별 시장성 조사는 한달 평균 지출액이 150만원이상과 이하의 그룹으로 나누어 조사했다(그림 3) 각 개인의 지출수준은 본 기능성 음료의 수요에 큰 영향을 미치고 있는데, 이러한 문제점은 기능성 음료의 제품성분의 grade를 몇 단계로 조

정하여 음료의 가격을 다양화함으로써 각 개인의 소득수준에 따라 적당한 grade의 음료를 선택할 수 있도록 배려하는 것이 필요하리라 생각된다.

그림3) 소득별 조사 결과



이상의 조사결과를 토대로 하여볼 때 본 기능성 음료의 상품으로의 가치는 매우 높은 것으로 생각되며 기능성 음료의 효능에 대한 실험적인 결과와 색과 감미의 향상, grade의 다양화 등을 통해 본 제품을 개발, 보완한다면 새로운 기능성 음료로 성장할 수 있으리라 사료된다.

2) 생산공정 및 원가분석

시제품을 생산하여 실제 생산공정에서 생길 수 있는 문제점을 미리 예측하고 대비하는데 주안점을 두었다. 시제품으로 생산된 한방처방의 감기억제 기능성음료의 경우 약제의 신맛이 있어 기호도가 떨어질 문제점이 있었으며, 원료로 사용되는 한약제 중 특히 생유자는 10월에서 12월 사이에만 구할 수가 있었으며, 또한 보존기간이 짧은 단점이 있었다. 각 한약원료는 계절별에 따라 가격에 차이가 많아 구입시기와 가격적

인 면에 많은 신경을 써야 할 것으로 보인다. 유자의 경우는 구입할 수 있는 시기가 한정되어 있으며, 또한 생유자를 사용하는 관계로 보존성이 떨어지는 문제점이 있다. 출시가 시작되는 10월초에 가장 비싼 가격을 보이며 11월 중순 이후가 되면 어느 정도 가격이 안정되는 것을 볼 수가 있으며, 이때가 유자의 구입에 가장 적합한 시기로 판단된다.

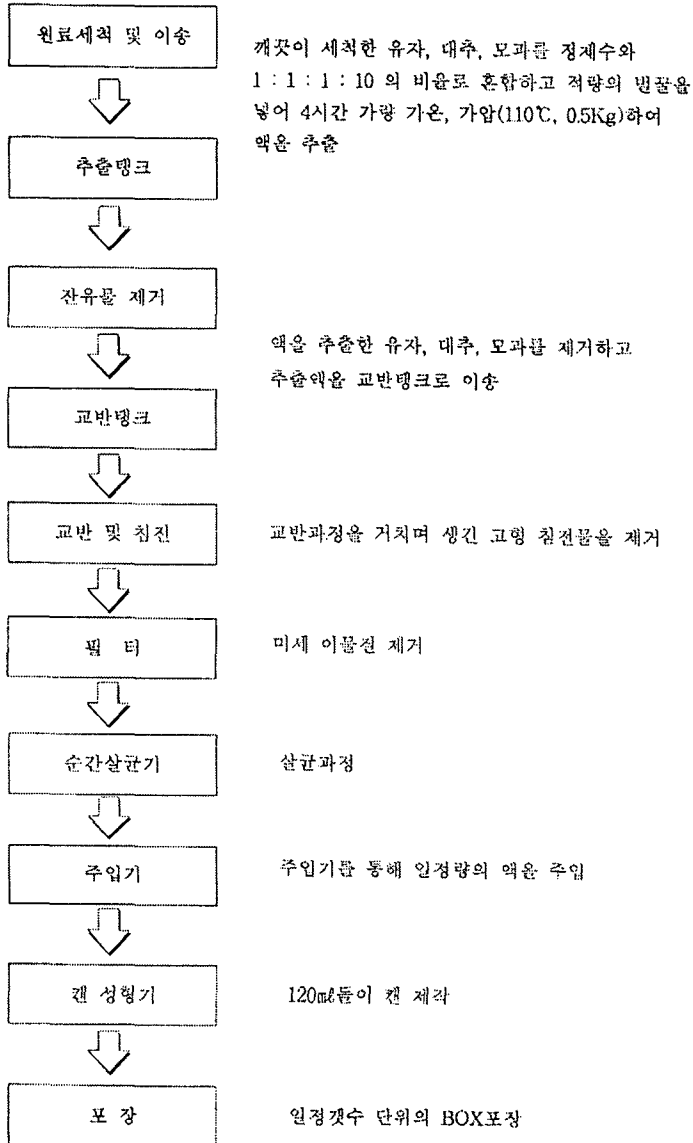
□ 제품 생산비 예상내역(1,000 can 기준생산)

내역	금액 (원)	1캔 소요비용 (원)	비고
원료비	732,500	732.5	원료의 계절적 특성으로 보관 방법 및 수급조절에 대한 방안이 필요함
포장비 (120ml Can)	87,200	87.2	생산 수량이 증가하면 경비 절감이 가능한 비용임
인건비	400,000	400.0	"
감가상각비	157,000	157.0	"
소모품비	160,200	160.2	"
광고비	100,000	100.0	시판 초기에는 많은 비용이 필요하나 일정 수준에 도달하면 감소가 예상됨
총액	1,536,900	1,536.9	원가절감을 위한 공정 개선이 필요함

제품의 생산공정은 아래의 그림과 같이 요약할 수 있는데, 제품생산시 예상되는 문제점은 1. 원료의 확보, 2. 원료의 저장, 3. 가동율, 4. 제작공정 중의 손실율을 들 수 있는데 이러한 문제들은 브랜드화 전략, 마케팅 전략 등이 지역의 특산물과 연계하여 계절적 요인을 극복할 수 있다면 시장경쟁력이 가능하다고 생각되며, 제약회사와 연계하여 OEM방식이 생산 전략도 고려해 볼 만 하다. 그리고 전통식품과 연계된 제품을 현

대적 감각에 맞게 재구성한다면 경쟁력확보에 일조 할 수 있으리라 생각된다

생산공정



3. 제품의 항균 활성 및 항산화 활성

가. 항균 활성

NP-97-1의 pouch 건조시료와 이 원액의 2배 희석물, 5배 희석물의 항균활성을 살펴보면 건조시료 원액이 배양시간 48시간에 *Enterococcus faecalis* KCTC 3512에 대하여 clear zone diameter가 11.58mm로 항균 활성이 가장 높았고 *Staphylococcus aureus* KCTC 1621에 대해서도 48시간에 diameter가 8.96mm로 항균활성을 보였다. 이 원액의 2배희석물은 *Enterococcus faecalis* KCTC 3512에 대하여 배양시간 48시간에 10.49mm로 높은 항균활성을 보였다. 5배 희석물은 *Enterococcus faecalis* KCTC 3512에 대하여 48시간에 diameter가 7.69mm로 약간의 항균활성을 보였다(Table 6).

NP-97-1의 pouch 시료를 pH의 특성을 이용하여 분획하였고(Fig. 5), 각 분획물들의 항균 활성은 Table 7에서 보는 바와 같다. 중성 분획은 *Enterobacter aerogenes* KCTC 2190에 대하여 48시간에 clear zone diameter가 11.35mm로서 가장 강한 항균 활성을 보였다. 그 다음으로 *Enterococcus faecalis* KCTC 3512에 대하여 48시간에 11.31mm로 항균 활성을 보였으며 이 균에 대해서 약산성 분획도 배양시간 48시간에 diameter가 10.05mm로 항균활성을 보였다. 양성 분획이나 강산성 분획은 대체로 항균활성이 없거나 미약하였다(Table 7).

Table 6. Growth inhibiting activity of dried pouch sample

Strain		clear zone diameter (mm)		
		Dilution		
		×1	×2	×5
Escherichia coli KCTC 2571	24hr			
	48hr	7.69	6.58	6.20
Enterobacter aerogenes KCTC 2190	24hr	6.44	-	6.39
	48hr	6.47	6.44	6.53
Enterococcus faecalis KCTC 3512	24hr	11.15	-	7.17
	48hr	11.58	10.49	7.69
Staphylococcus aureus KCTC 1621	24hr	8.21	8.60	-
	48hr	8.96	8.69	6.58
Bacillus subtilis KCTC 1021	24hr	8.21	-	-
	48hr	8.24	6.25	6.62

Table 7. Growth inhibiting activity of each fractions by pH

Strain		clear zone diameter (mm)					
		I-1	I-2	II	III	IV	V
Escherichia coli KCTC 2571	24hr	-	-	-	7.05	6.81	6.55
	48hr	6.17	-	-	7.32	7.01	6.77
Enterobacter aerogenes KCTC 2190	24hr	-	-	-	6.38	6.92	11.32
	48hr	6.23	-	6.17	-	6.93	11.35
Enterococcus faecalis KCTC 3512	24hr	-	6.85	-	-	9.34	11.16
	48hr	-	7.10	-	-	10.05	11.31
Staphylococcus aureus KCTC 1621	24hr	-	-	-	-	-	-
	48hr	-	-	-	-	8.19	6.58
Bacillus subtilis KCTC 1021	24hr	-	-	-	7.79	-	9.24
	48hr	-	-	-	7.94	9.01	9.48

I-1: Amphoteric compound(upper), I-2: Amphoteric compound(lower),

II: Basic compound, III: Strong acidic compound, IV : Weak acidic compound,

V : Neutral compound

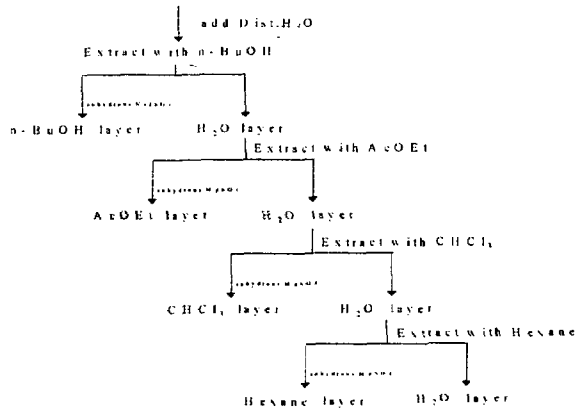


Fig. 4 Extraction methods of pouch by solubility

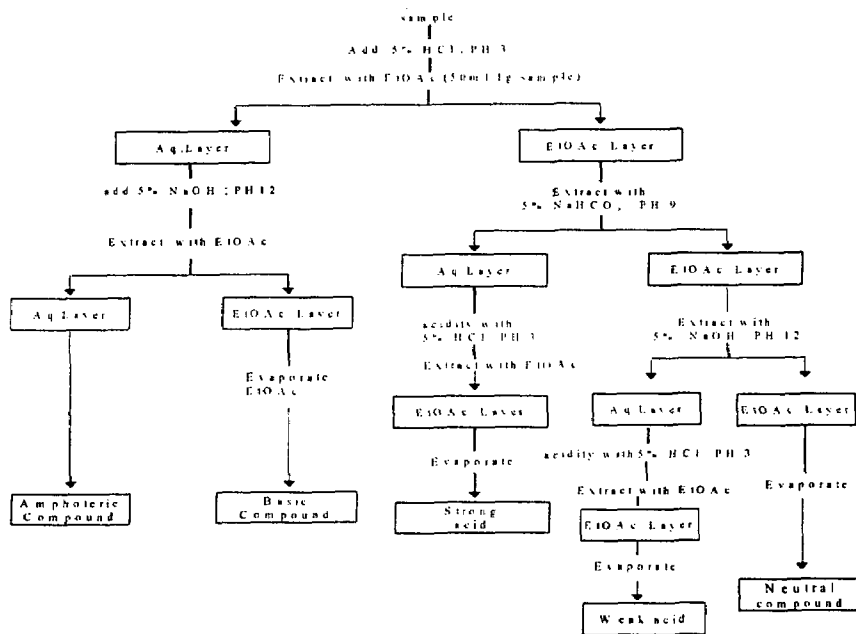


Fig. 5 Extraction methods of pouch by pH

나. 항산화 활성

1) DPPH method에 의한 항산화 활성

항산화 활성을 조사하기 위하여 DPPH에 대한 전자공여능을 Fig. 4와 5의 각분획에서 조사하였다. 그 결과는 Fig. 6의 a, b와 같다. pouch시료의 CHCl₃ fraction과 EtOAc fraction에서 강한 전자공여능을 보였고, Hexane fraction과 n-BuOH fraction은 전자공여능이 BHA나 α -Tocopherol에 비하여 낮은 전자공여능을 보였으며 H₂O fraction은 전자공여능이 없었다(Fig. 6a).

Fig. 5와 같은 방법으로 분획한 pouch시료의 강산 fraction, 약산 fraction, 염기성 분획은 BHA에 비해서는 낮으나 α -Tocopherol보다는 강한 전자공여능을 보였으며, 중성 분획에서는 전자공여능이 약하게 나타났다. 반면 양성 분획은 전자공여능이 확인되지 않았다(Fig. 6b). Fig. 4의 수용성 분획과 Fig. 5의 양성 분획을 제외한 나머지 분획에 대하여 thiocyanate 법과 thiobabituric acid 법으로 항산화 활성을 조사하였다.

2) Thiocyanate method

각 분획물들에 대한 항산화능을 Thiocyanate method로 검정한 결과는 Fig. 7, Fig. 8과 같았다. CHCl₃ 분획과 EtOAc 분획은 BHA의 항산화능과 거의 유사하여 강한 항산화능을 보였다. CHCl₃ 와 EtOAc 분획 모두 α -Tocopherol에 비해서는 훨씬 강한 항산화능을 보였다(Fig. 7).

염기성 분획과 중성 분획은 BHA보다 강한 항산화능을 보였고, 약산성 분획은 BHA 100ppm과 유사한 항산화능을 보였다. 이들 염기성, 중성, 약산성 분획은 모두 α -Tocopherol에 비해서는 훨씬 강한 항산화능을 보였다. 한편, 강산성 분획은 BHA보다 항산화능이 약하게 나타났고, α -Tocopherol에 대해서는 반응초기(0~5day)에는 항산화능이 약하였다가 5일 이후에는 α -Tocopherol에 보다 항산화능이 높게 나타났다. 염기성 분획과 중성 분획은 BHA보다 강한 항산화능을 보였고, 약산성 분획은 BHA와 유사한 항산화능을 보였다. 이들 염기성, 중성, 약산성 분획은 모두 α -Tocopherol에 비해

훨씬 강한 항산화능을 보였다. 강산성 획분은 BHA보다 항산화능이 약하게 나타났으나 α -Tocopherol과 비교할 때는 반응초기(0~5일)에는 항산화능이 약하였다가 5일 이후에는 α -Tocopherol에서 보다는 항산화능이 높게 나타났다.

3) Thiobabitoric acid method

각 fractions의 항산화 활성을 Thiobabitoric acid method로 검정한 결과는 Fig. 9의 (a), (b)와 같이 나타났다. Hexane fraction은 α -Tocopherol 100ppm보다 항산화능이 높게 나타났고 BHA 100ppm과는 동일한 항산화능을 보였다(Fig. 9a). 염기성, 강산성, 중성 획분은 모두 BHA 100ppm이나 α -Tocopherol 100ppm보다 항산화능이 높게 나타났고 이중에서 염기성 획분이 항산화능이 가장 높게 나타났다.

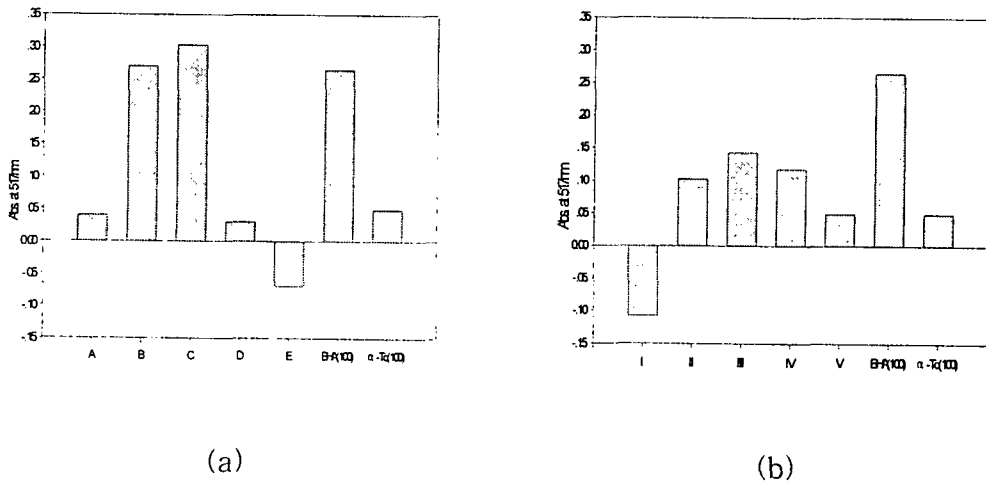


Fig. 6. Electron donating activity of each fractions

A: Hexane fraction, B: CHCl_3 fraction, C: BtOAc fraction, D: n-BtOH fraction, E: H_2O fraction, I: Amphoteric compound, II: Basic compound, III: Strong acidic compound, IV: Weak acidic compound, V: Neutral compound

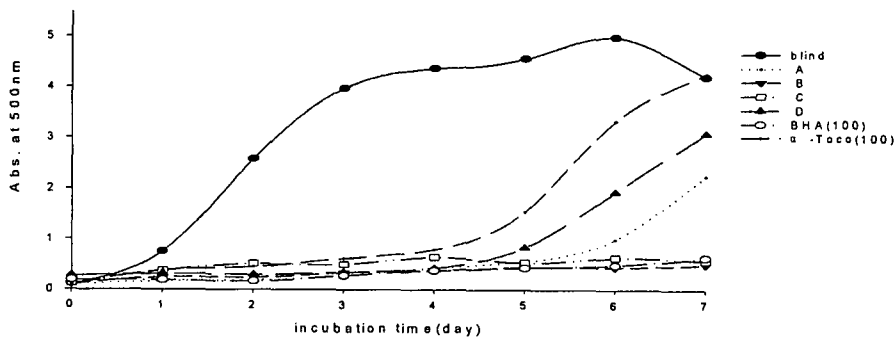


Fig. 7. Antioxdative activity of fractions of extraction method I by Thiocyanate method

A: Hexane fraction, B: CHCl₃ fraction, C: BtOAc fraction, D: n-BtOH fraction,

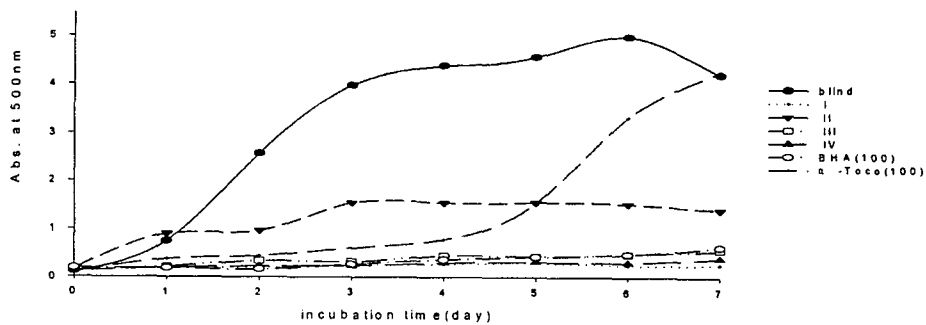
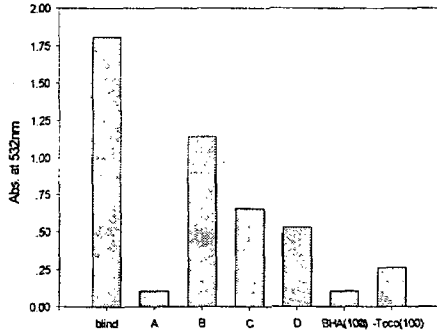
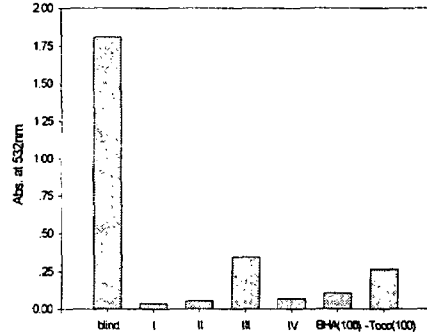


Fig. 8. Antioxdative activity of fractions of extraction method II by Thiocyanate method

I: Basic compound, II: Strong acidic compound, III: Weak acidic compound, IV Neutral compound



(a)



(b)

Fig. 9. Antioxidative activity after 7days by TBA method

A: Hexane fraction, B: CHCl₃ fraction, C: BtOAc fraction, D: n-BtOH fraction,
 I: Basic compound, II: Strong acidic compound, III: Weak acidic compound,
 IV: Neutral compound

4. 항인플루엔자 바이러스에 대한 활성

한방추출원액(NP-97-1) 및 한방추출원액+올리고당에 대한 항바이러스 활성처방 및 단방에 대한 1차 항바이러스 검색 결과 활성을 나타내는 단미제를 중심으로 한방추출원액 및 한방추출원액+올리고당을 첨가하여 제조한 제품에 대하여 *in situ* ELISA를 이용하여 항 influenza virus 활성을 측정한 결과는 Fig. 10.와 Fig. 11.와 같았다. 한방추출원액은 IC₅₀ 값이 1,374.95 μ g/ml였고 한방추출원액+올리고당은 IC₅₀ 값이 1,746.6 μ g/ml으로 한방추출원액의 항바이러스 활성이 높은 것으로 측정되었으나 한방

추출원액은 세포독성이 관찰되었지만 올리고당을 첨가한 제품에서는 항바이러스 활성이 낮아진 반면에 세포독성이 관찰되지 않아 올리고당을 첨가함으로써 시료에 의한 세포독성 영향이 보완된 것으로 생각된다.

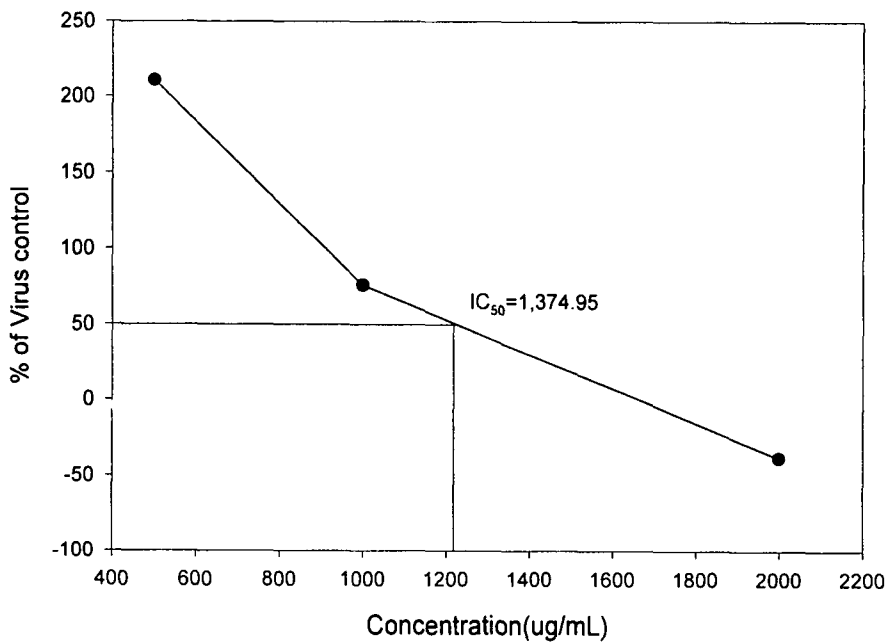


Fig. 10. Inhibitory effect of extract from medicinal herbs against influenza A virus by ELISA .

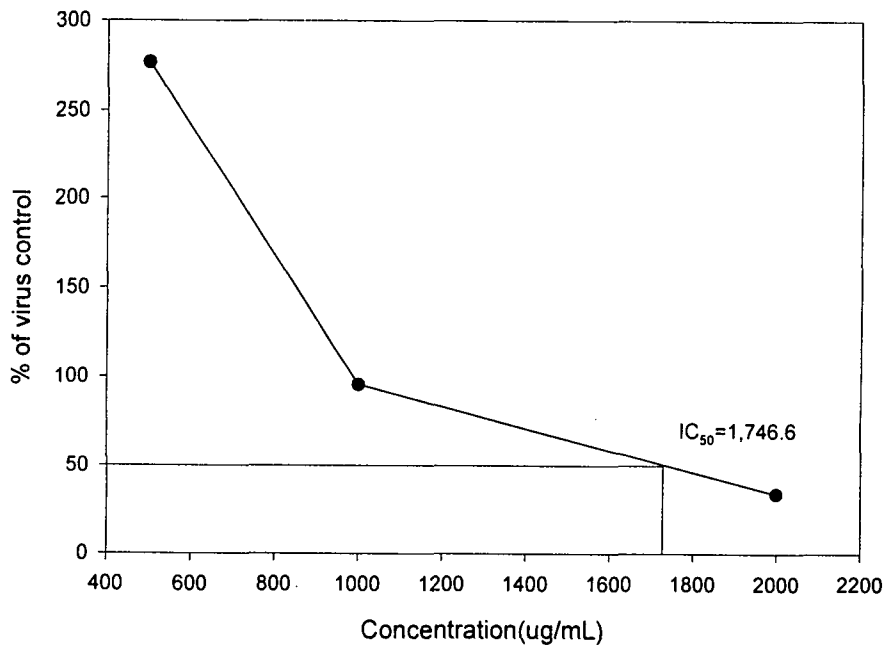


Fig. 11. Inhibitory effect of add oligosaccharide to extract form medicinal herbs against influenza A virus by ELISA.

5. *In vivo*에서 항 influenza virus 활성

가. Egg 이용한 항바이러스 활성 측정

1) EID₅₀값의 측정

수정란 실험을 하기 위한 Influenza virus의 EID₅₀값을 구한 결과는 다음과 같다. 결과 EID₅₀값은 8.8×10^7 EID₅₀으로 NP-97-1과 NP-97-2 그리고 양성대조군으로 amantadine과 dextran sulfate를 사용하였다. 약제활성 평가를 위해서는 필요한 virus titer는 2×10^6 EID₅₀ 이상이어야 한다.

Table 8. Calculation of EID₅₀

Dilution	Dose	Log[dose]	No. of eggs infected	Proportion of eggs infected	Moving average (P)
10-9	$Y \times 10^{-10}$	$-10 + \log[y]$	0/10	0	
10-8	$Y \times 10^{-9}$	$-9 + \log[y]$	0/10	0	0.22(=p0)
10-7	$Y \times 10^{-8}$	$-8 + \log[y]$	6/9	0.66	0.52(=p1)
10-6	$Y \times 10^{-7}$	$-7 + \log[y]$	9/10	0.9	0.853(=p2)
10-5	$Y \times 10^{-6}$	$-6 + \log[y]$	10/10	1	0.96(=p3)
10-4	$Y \times 10^{-5}$	$-5 + \log[y]$	10/10	1	

* In this test, an average infectivity of $p_1=0.52$ corresponds to a log[dose] of $-8 + [\log Y]$. The log[dose] giving an average infectivity of 0.5 will be a proportionate distance

$$\frac{0.5 - 0.52}{0.853 - 0.52} = \frac{0.02}{0.333} = 0.06$$

between the values $-8 + [\log Y]$ and $-7 + [\log Y]$: i.e.

$$-8 + \log[Y] + 0.06[\log 10] = -8.3 + \log[Y] = 1\text{EID}_{50}$$

$$\text{therefor } \log[Y] = 7.94, Y = 8.8 \times 10^7$$

2) 수정란실험

수정란 실험 결과는 Table 9와 같다. 1, 2차 실험 결과를 종합한 결과 양성대조군으로 사용한 amantadine은 10000 μ g에서만 강한 활성을 보였으며, NP-97-1, NP-97-2는 dextran sulfate와 비슷한 항 Influenza virus활성을 보였으나 저농도로 갈수록 NP-97-1, NP-97-2가 좀더 나은 항바이러스 활성을 보였다. 이 실험을 통해 NP-97-1과 NP-97-2가 현재 시중에서 감기약으로 실용화되어 있는 화학합성 약제인 기존의 amantadine과 dextran sulfate보다 in vivo에서도 더욱 강한 항 Influenza virus활성을 나타낸다는 것을 알 수 있으며 보다 깊은 연구를 위해 앞으로 수정란에서의 독성실험에 대한 상세한 연구가 요구된다.

Table 9. Inhibitory effects of NP-97-1, NP-97-2 and positive controls against influenza virus type A

No \ Con (μ g)	No. of positive effect				
	10000	1000	100	10	1
amantadine · HCl	6/6	0/6	1/6	0/6	1/6
dextran sulfate	6/6	5/6	3/6	4/6	3/6
NP-97-1	6/6	6/6	4/6	4/6	2/6
NP-97-2	4/6	6/6	4/6	2/6	1/6

나. Balb/C 마우스를 이용한 항바이러스 활성 측정

인플루엔자 바이러스를 마우스에 감염시켜 3, 5, 7일 간격으로 폐와 기관지를 적출하였다. 각각 적출된 상층액을 4회에 걸쳐 homogenizer와 sonication을 분쇄한 후 원심분리하고 상등액을 heamagglutination test를 실시하여 바이러스에 적응된 감기 병태 마우스를 제작하였다. 기관지에서 적출된 바이러스의 역가는 4HA unit이었다.

Fig. 12는 인플루엔자 감염된 Balb/C 마우스의 기관지를 적출하여 단면으로 찢은 사진이며, Fig. 13은 HIT를 실시한 것이다.

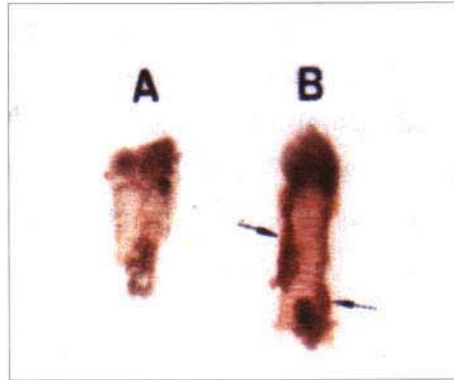


Fig. 12 Morphology of bronchi from mouse infected by influenza virus type A for 7day : * A. Normal control, B. Bronchus and pharynx from influenza virus. Arrows indicate conogested bronchia of infected mouse.

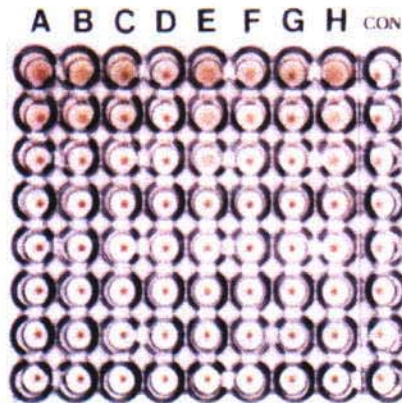


Fig. 13 Haemagglutination assay of bronchial fluid of mouse which was adapted with influenza virus type A. E, H : 4HA unit of virus which separated from bronchi of mouse infected by influenza virus type A.

Fig. 12는 인플루엔자 감염된 Balb/C 마우스의 기관지를 적출하여 단면으로 찢은 사진이며, Fig. 13은 HIT를 실시한 것이다.

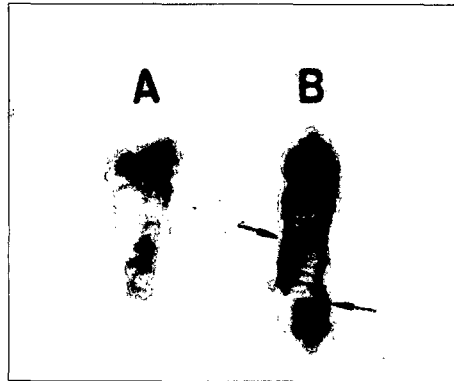


Fig. 12 Morphology of bronchi from mouse infected by influenza virus type A for 7day : * A. Normal control, B. Bronchus and pharynx from influenza virus. Arrows indicate conogested bronchia of infected mouse.

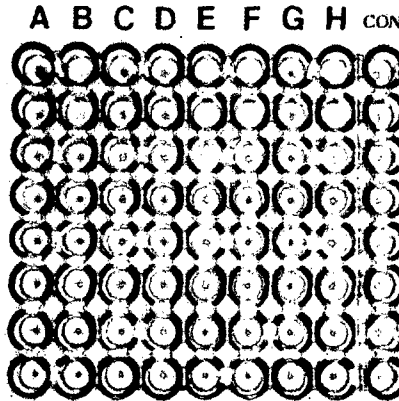


Fig. 13 Haemagglutination assay of bronchial fluid of mouse which was adapted with influenza virus type A, E, H : 4HA unit of virus which separated from bronchi of mouse infected by influenza virus type A.

Balb/C 마우스를 이용한 NP-97-1과 2의 항바이러스 활성 측정결과는 Table 10과 같다. 양성대조군으로 사용한 amantadine은 10000 μ g에서만 강한 활성을 보였으며, NP-97-1과 NP-97-2는 dextran sulfate와 비슷한 항 Influenza virus활성을 보였으나 저농도로 갈수록 NP-97-1과 NP-97-2가 좀더 나은 항바이러스 활성을 보였다.

Table 10. Inhibitory effects of NP-97-1, NP-97-2 and positive controls against influenza virus type A

No \ Con (μ g)	No. of positive effect				
	10000	1000	100	10	1
amantadine · HCl	6/6	1/6	1/6	0/6	1/6
dextran sulfate	6/6	5/6	3/6	2/6	2/6
NP-97-1	6/6	6/6	4/6	4/6	3/6
NP-97-2	5/6	5/6	3/6	3/6	1/6

6. 제품에 대한 맹검시험

경기대학교 수원캠퍼스에서 맹검실험에 응한 교직원과 학생 45명을 상대로 1998년 10월 19일~12월 12일(54일간) 복용시킨 후 14항목에 대한 설문을 조사한 후 이항검정으로 통계처리하여 맹검결과를 평가하였다.

유효성해석 대상인 45명의 배경인자를 Table 11에 정리하였는데, 맹검전에 이상소견이 있거나 투여 중에 이상소견을 호소하는 경우에는 투여를 중지한다고 사전에 교육을 실시 후 시험을 하였다. 유효성해석 대상 45명을 3군으로 나누고 1군은 20대로 여성이 10명으로 흡연하지 않는 그룹이고, 2군은 20대 남성이 7명으로 흡연하는 그룹이

었다. 3군은 30대 이상으로 여성이 4명으로 흡연여부도 규제하지 않았다. 맹검시험에 서는 복용시 감기빈도와 정도가 개선되는 유의성을 보였고, 부작용이 각 군간에 대부분 없었다.

【Table 11.】 유효성 해석대상 배경인자

배 경 인 자		1군	2군	3군	검정
전 중 예 수		16	16	12	
감기빈도	경험있다	2	1	0	p=0.636
	1-2회	6	10	5	
	2-4회이하	4	3	3	
	5회이상	4	2	4	
감기회복기간	2일이하	1	3	0	p=0.101
	3일이하	2	1	6	
	5일이하	6	4	4	
	7일이하	3	5	1	
	7일이상	4	3	1	
약제복용시 감기빈도	훨씬덜걸림	7	3	2	p=0.123
	약간 걸림	4	11	6	
	보통	4	2	4	
	약간더 걸림	1			
	훨씬더 걸림				
약제복용시 감기정도	쉽게 회복	8	2	1	p=0.311
	약간 쉽게 회복	3	6	5	
	보통	4	6	4	
	심하게 앓음	1	1	1	
	훨씬 심하게 앓음		1	1	
약제복용시 감기기운 느끼다 회복	수회	4	2	3	p=0.738
	1-2회	8	7	6	
	없다	4	7	3	
부작용	있다	2	3	2	p=0.887
	없다	14	13	10	

제 5절 참고문헌

W.H.O. The role of genetic characterization of viruses in relation to Influenza surveillance and epidemiology. *Bull. W.H.O.* 59:875 (1981).

Tyeryar, F.J. Jr., Richardson, L.S. and Belshe, R.B. Report of a workshop on respiratory syncytial virus and para influenza viruses. *J. Infect Dis.* 137 : 835 (1978).

김명희. 수리취 첨가물을 달리한 수리취 절편의 특성, 한국조리과학회지, 10(2), 94(1994)

川岸舜朗. 食品中の生體機能調節物質研究法, 學生出版社, 東京(1996)

芒井綜一. 機能性食品の研究, 學生出版社, 東京(1995)

신동화 , 천연 항산화제의 연구동향과 방향. 식품과학과 산업, 30(3), 14-21(1997)

김종대, 이상영, 김성완 : 야생초 추출물에 의한 간장내 활성산소 생성과 항산화 효소계 조절에 관한 연구, 생약학회지, 28(1), 48-53(1997)

임계택, 심재한 , 율나무 에탄올 추출물의 쥐 뇌세포에 대한 항산화 효과, 한국식품과학회지, 29(6), 1248-1254(1997)

Jong-Tai Won, Dong-Hoon Kim , Antioxidant Activity of Various Solvent Extracts Obtained from A Maillard-type Browning Reaction Mixture, 한국식품과학회지, 12(4), 235-241(1980)

문갑순, 간장제품의 종류에 따른 항산화능의 비교. 한국영양식량학회지, 20(6), 582-589(1991)

李時珍: 本草綱目. 宏業書局. 1982

신민교, 임상본초학, p.254, 남산당 (1986)

정재득, 고병섭, 이형환, 최환수, 박갑주. 한약처방(복합제)의 influenza virus type I 에 대한 항바이러스 활성 효과. 대한바이러스학회지 제26권 제2호 273-283, (1996)

張仲景 : 景岳全書, 서울, 医道韓國社, p. 65, 383, 1976

劉完素 : 劉河間傷寒三六書, 서울, 교육주보사, pp. 83, 84, 369, 370, 1976

李杲 : 東垣十種医書, 서울, 대성문화사, pp. 164-168, 1983

朱震亨 : 丹溪心法附余, 서울, 대성문화사, pp. 503-509, 1982

巢元方 : 巢氏諸病源候論, 대북, 集門書局, pp. 54-55, 1976

孫思邈 : 備急千金要方(中国医学大系), 서울, 여강출판사, pp. 735, 651-661, 1987

尹吉榮: 東醫方劑學, 미네르사, 1964

李尙仁, 康舜洙: 方劑學, 癸丑文化社, 1977

朱榮丞외: 方劑學, 永林社, 1998

許浚: 東醫寶鑑. 南山堂. 1989

鄭普燮. 辛民教: 鄉藥(生藥)大事典. 永林社. 1990

제6장 활용방안 및 기대성과

제1절 연구요약

본 연구에서는 한의학의 특성을 이용하면 인체 면역기능을 보강하는 효과를 가지고 있는 새로운 기능성 물질이 탐색될 수 있다는 점에 착안하여, 한의학적으로 감기 치료에 사용되고 있는 비·처방과 민간방 63종의 구성 한약재로부터 항호흡기 바이러스 물질의 탐색을 위한 기반연구로서 항인플루엔자 활성을 조사하고 국내외에서 시판하고 있는 9종의 감기 한방 엑기스제제 및 인플루엔자 바이러스 Type A 저해제 2종 (amantadine ·HCl과 Mw. 5000 Dextran sulfate)과 비교 검토하였고, 한의방제론에 입각한 조합에 의해 신처방을 창출하여 감기예방과 치료보조의 기능성 한방제품을 개발하는 방안을 제시하였다.

제2장 「항호흡기 바이러스 소재 탐색을 위한 생리활성 연구」에서는 사상방 처방 및 동의임상 방제학을 기초로 하여 99종의 한약재에 대해 항인플루엔자 바이러스 활성을 조사하여 한방 기능성 제품으로 개발 가능한 21종의 한약재가 탐색되었다. 추출방법은 메탄올 추출보다는 열수 추출이 보다 효과적이었고, 열수추출인 경우에는 구인, 마치현, 천련자, 백지, 지각, 대조, 모과, 나복자, 우방자, 지실, 백편두, 유자, 방풍, 강활, 생강, 인동등, 천궁, 그리고 택사에서 활성이 나타났고, 메탄올 추출인 경우에는 모과, 마황, 빈랑, 후박에서 활성이 있었다. 이 들을 한방방제의 기본원리인 군신좌사 및 철정합화에 입각하여 새로운 감기예방 및 치료 보조효과가 있는 복합처방의 개발 가능성을 제시하였다. 또한, 항인플루엔자 바이러스 활성 검사 방법인 Haemagglutination inhibition test(HIT)가 가지고 있는 결점을 보완할 수 있는 새로운 in situ ELISA에 의한 항바이러스 활성검사 방법을 확립하였다.

제3장 「항influenza 활성 성분 분리 및 구조 결정」에서는 제2장에서 기능성 한방 제제로 개발 가능성을 제시한 복합처방중 NP-97-1의 구성약재인 유자를 각종 크로마토 크래피로 분획하여 4종류의 flavonoid 배당체를 분리하였다. Compound I은

naringenin 7-O (2", 6"-di-O- α -L-rhamnopyranosyl)- β -D-glucopyranoside, Compound II는 hesperetin 7-O (2", 6"-di-O- α -L-rhamno-pyranosyl)- β -D-glucopyranoside, Compound III는 hesperidin (hesperetin 7-O-rutinoside), Compound IV는 narirutin(naringenin 7-O-rutinoside)로 확인, 동정하였다. Compound I 과 Compound II는 Citrus속에서 처음 분리한 물질이고, 특히 Compound I은 자연에서 처음으로 발견된 flavonoid물질이다. In situ ELISA의 방법으로 유자에서 분리한 flavonoid 배당체에 대한 항바이러스 활성을 측정한 결과 Compound II는 IC50 값이 918.46 μ l/ml으로 항바이러스 효과가 있었으며 Compound I, Compound III 및 Compound IV는 IC50 값이 >1,000 μ l/ml으로 항바이러스 활성이 측정되지 않았다. Hesperetin triglycoside인 Compound II는 항바이러스 활성이 있었으나 hesperetin diglycoside(hesperidin)인 Compound III는 활성이 측정되지 않아 glucose 2번에 결합되어 있는 rhamnose가 항바이러스 효과를 증가시킨다는 것을 알 수 있었고 또한, naringenin triglycoside인 Compound II는 활성이 측정되지 않아 hesperetin B ring의 C-4'에 결합되어 있는 methoxy기가 항바이러스 효과를 증가시킨다는 것을 확인 할 수 있어 항바이러스 활성과 flavonoid 배당체구조와의 상관관계를 알 수 있었다.

제4장 「감기예방 및 치료보조 기능을 가지는 한방제품 개발」에서는 제2장, 제3장에서 얻어진 복합처방의 예비지견을 활용하여 감기 바이러스에 대해 활성을 가지고 있는 한약재중 항인플루엔자 활성이 탁월한 한약재 3종을 중심으로 한방 방제의 원리인 군신좌사와 철정합화의 이론에 근간한 신처방 중 NP-97-1을 응용하여 기능성 한방제품을 만들었다. 한방음료제품 연구는 각 단위공정의 운전 조건설정의 기초 자료를 확보하는데 목적을 두고, 제품의 안정성, 관능성, 기능성에 요구되는 주요성분(무기질, 유기 화합물)에 관한 관능 및 성분 등에 관한 규격을 정하고 제품을 규격화(Standardization)하였고, 떡제품은 전통 시루떡을 현대적 감각으로 변형한 카스테라 형태의 제품으로 개발하였다.

시제품 제작

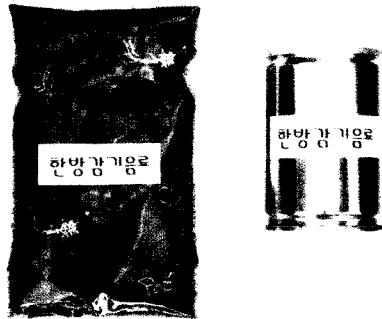


사진 1. 한방음료 시제품(파우치 및 캔 Type)

특허출원 : 1998년 제18464호

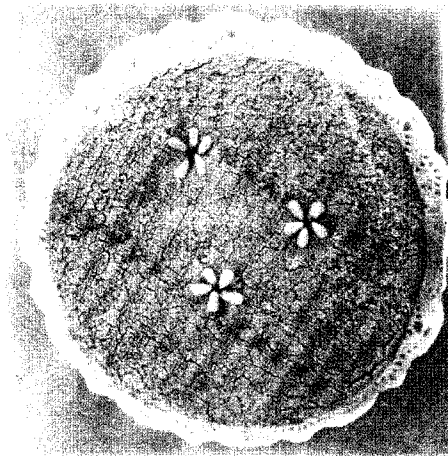


사진 2. 케이크화한 떡 제품(특허출원 : 1998년 제47902호)

제 5 장 「한방음료 공정 연구 및 산업적 전망 예측」에서는 실험실에서 개발된 NP-97-1의 한방음료에 대해 실용화하기 위해 공장 규모와 상업성에 입각한 제작공정의 연구와 음료 시제품의 효능평가를 위해 항산화 및 미생물 활성 검사, 항인플루엔자 바이러스 활성 검사(*in vitro*, *in vivo*), 그리고 맹검시험을 실시하였다. 또한, 생산원가 및 판매전망과 사업성을 분석하였다.

본 연구에서 개발된 한방음료와 케이크화한 떡제품은 생산원가의 절감과 홍보기능의 활성화를 기한다면 경쟁력이 충분히 있는 것으로 판단된다.

제2절 활용방안

본 연구 성과의 활용방안은 다음과 같다.

1. 한방방제의 기본원리인 군신좌사 및 칠정합화에 입각하여 개발한 새로운 감기에방 및 치료 보조효과가 있는 복합처방의 2건을 특허를 출원하였다.

◆특허출원 : 1998년 제18464호, 제18465호

2. 특허출원한 1998년 제18464호 1건(NP-97-1)을 이용하여 한방음료를 개발하였다.

3. 한방 감기 처방을 구성하는 99종의 한약재에 대해 항인플루엔자 바이러스 활성을 조사하여 항인플루엔자 활성이 탁월한 한약재를 응용하여 전통떡을 케이크화하여 떡제품을 개발하였고, 이에 대한 제조특허를 출원하였다.

◆특허출원 : 1998년 제47902호

4. 유자에서 분리·정제한 4종류의 flavonoid 배당체 중, Compound I과 Compound II

는 Citrus속에서 처음 분리한 물질이고, 특히 Compound I은 자연에서 처음으로 발견된 flavonoid물질이며; 항바이러스 활성을 측정한 결과 「Compound II는 IC50 값이 918.46 μ l/ml으로 항바이러스 효과가 있어 물질특허를 출원할 예정」이다.

5. 항인플루엔자 바이러스 활성 검사 방법인 Haemagglutination inhibition test(HIT)가 가지고 있는 결점을 보완할 수 있는 새로운 in situ ELISA에 의한 항바이러스 활성 검사 방법을 확립하였다.

제3절 기대성과

본 연구에서 감기예방과 치료보조를 목적으로 개발한 한방음료와 케이크화한 떡제품은 원가절감과 홍보를 통해 시장성이 확보된다면 제품으로 생산할 수 있으므로, 「연구에 참여한 증한식품은 우선 2000년 초에 한방음료를 제작 판매할 예정」이다.

본연구에서 한방 비·처방을 이용한 고부가가치가 있는 호흡기성 바이러스예방 또는 억제 기능을 가진 한방음료 및 떡제품의 연구 결과는 현단계에서 산업화를 위한 기술이전이 가능하여, 그 파급효과와 활용도는 학문적 가치뿐만 아니라 경제적으로도 매우 높다.

■ 부록

【연구성과물】

특허신청

논문발표

신문보도

대한민국 특허청
KOREAN INDUSTRIAL
PROPERTY OFFICE

별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Industrial Property Office.

출원번호 : 1998년 특허출원 제18465호
Application Number

출원년월일 : 1998년 5월 22일
Date of Application

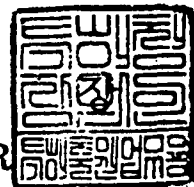
출원인 : 한국한의학연구원
Applicant(s)



1998년 6월 5일

특허청

COMMISSIONER



대한민국 특허청
KOREAN INDUSTRIAL
PROPERTY OFFICE

별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Industrial
Property Office.

출원 번호 : 1998년 특허출원 제18464호
Application Number

출원 년 월 일 : 1998년 5월 22일
Date of Application

출원 인 : 한국한의학연구원
Applicant(s)



1998년 6월 5일

특

허

청

COMMISSIONER



대한민국 특허청
KOREAN INDUSTRIAL
PROPERTY OFFICE

별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Industrial
Property Office.

출원 번호 : 1998년 특허출원 제47902호
Application Number

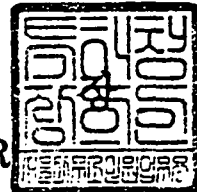
출원 년 월 일 : 1998년 11월 6일
Date of Application

출원 인 : 김 명 희 외2인
Applicant(s)



199 8 년 11 월 21 일

특 허 청
COMMISSIONER



Korea Traditional Medicine and Viral disease

(International Symposium of the KIOM)

1997년 한국한의학연구소 국제 심포지움

장소: 한국한의학연구소 회의실. 일시: 1997년 4월 10일 10:00

주최: 한국한의학연구소 후원: 농림수산부, 보건복지부

- 진행순서 -

오전

좌장 : 양기상박사

10:00 개회선언 (홍원식 소장)

10:00 ~ 10:40 Prof. G. H. Neil Towers (University of British Columbia)

10:40 ~ 10:50 질문

10:50 ~ 11:10 조황성박사(한국한의학연구소)

11:10 ~ 11:20 질문

11:20 ~ 11:40 정홍근교수(서울대학교 의과대학)

11:40 ~ 11:50 질문

11:50 ~ 12:10 박갑주, 고병섭박사(한국한의학연구소)

12:10 ~ 12:20 질문

12:20 ~ 13:30 점심시간

오후

좌장 : 성현제박사

13:30 ~ 14:10 難波恒雄교수(일본 富山医科薬科大学 和漢研究所)

14:10 ~ 14:20 질문

14:20 ~ 14:40 이형환교수(건국대학교 이과대학)

14:40 ~ 14:50 질문

14:50 ~ 15:10 신순식박사(한국한의학연구소)

15:10 ~ 15:20 질문

15:20 폐회(양기상박사)

15:20 ~ 15:30 휴식

15:30 ~ 다과회

1997' INTERNATIONAL SYMPOSIUM of KIOM

(Korea Traditional Medicine and Viral Disease)

Place : Conference Room of KIOM Date : April 10th 1997 AM 10:00

Sponsorship : KIOM

Supporter : Korea Ministry of Agriculture

Korea Ministry of Health & Welfare

-Program-

Chairman : Dr. Yang, Ki-Sang

10:00 Opening Address(Dr. Hong, Won-Sik. Director of KIOM)

10:00 ~ 10:40 Prof. G. H. Neil Towers(University of British Columbia)

10:40 ~ 10:50 Question

10:50 ~ 11:10 Dr. Cho, Hwang-Sung(KIOM)

11:10 ~ 11:20 Question

11:20 ~ 11:40 Dr. Jung, Hong-Keun(Seoul National University)

11:40 ~ 11:50 Question

11:50 ~ 12:10 Dr. Park, Kap-Joo, Dr. Ko Byung-Seob(KIOM)

12:10 ~ 12:20 Question

12:20 ~ 13:30 Lunch

Chairman : Dr. Sung, Hyun-Jae

13:30 ~ 14:10 Dr. Namba Tsuneo(Toyama Medical & Pharmaceutical University)

14:10 ~ 14:20 Question

14:20 ~ 14:40 Dr. Lee, Hyung-Hoan(Konkuk University)

14:40 ~ 14:50 Question

14:50 ~ 15:10 Dr. Shin, Soon-Shik(KIOM)

15:10 ~ 15:20 Question

15:20 Closing Address(Dr. Yang, Ki-Sang)

15:30 ~ Coffee Break

Development of Anti-Influenza virus Agent by using Korean Traditional Prescriptions and Herbs

Kap Joo Park, Jae Deuk Jung, Bong Joo Kang, In Ho Park, Hwang Sung Cho¹,
Byoung Seob Ko², Ki Sang Yang

Department of Basic research, ¹Department of Clinical research, ²Department of Herbal medicine, Korea Institute of Oriental Medicine, Seoul 135-100, Korea

In order to search for anti-influenza virus type A agents from Korean traditional prescriptions(herb complexes) and Korean medicinal herbs, we selected 63 traditional prescriptions and 73 medicinal herbs, based on a review of the Korean traditional medicine books. Both methanol extracts and boiling-water extracts were tested, by means of the Haemagglutination Inhibition Test(HIT).

Three of the 63 traditional prescriptions and three of 73 medicinal herbs, which were extracted by methanol, CM-22, CM-26, CM-48, MM-40, MM-57 and MM-72 (see explanation of nomenclature below) showed efficacy against influenza virus type A. CM-22, CM-26 and CM-48 showed anti-influenza virus type A activity at the range of 313 μ g/ml to 9.75 μ g/ml, 156 μ g/ml to 4.87 μ g/ml and 625 μ g/ml to 19.5 μ g/ml, respectively. MM-40, MM-57 and MM-72 showed antiviral activity at the range of 156 μ g/ml to 9.75 μ g/ml, 156 μ g/ml to 4.87 μ g/ml and 78 μ g/ml to 4.87 μ g/ml, respectively. Three of the 63 traditional prescriptions and four of 73 medicinal herbs, which were extracted by water, CW-14, CW-34, CW-61, MW-1 and MW-55, MW-40, MW-63 were strongly active. CW-14, CW-34 and CW-61 showed anti-influenza virus type A activity at the range of 10mg/ml to 78 μ g/ml, 10mg/ml to 625 μ g/ml and 10mg/ml to 313 μ g/ml, respectively. MW-1, MW-55, MW-40, MW-55 and MW-63 showed antiviral activity at the range of 10mg/ml to 78 μ g/ml, 2.5mg/ml to 4.87 μ g/ml, 10mg/ml to 156 μ g/ml and 10mg/ml to 78 μ g/ml, respectively. In order to determine cytotoxicity of each extracts, chicken red blood cells were incubated with the various concentration of extracts of Korean traditional prescriptions and Korean medicinal herbs. Only MW-40 of water extracts showed cytotoxic effect against red blood cells at the range of 10mg/ml to 5mg/ml whereas CW-14, CW-34 and CW-61, MW-1, MW-55, MW-63 did not show cytotoxic effect against red blood cells. CM-22 and CM-48, CM-26, MM-40, MM-57 and MM-72 showed cytotoxic effect against red blood cells

at the range of 10mg/ml to 625µg/ml, 10mg/ml to 313µg/ml, 10mg/ml to 625µg/ml and 10mg/ml to 156µg/ml, respectively. These results of HIT indicated that Korean traditional prescriptions and Korean medicinal herbs may be inhibit either attachment of virus to cell surface receptor or penetration of virus into cell during the initial stage of infection. CW-14, CW-34, CW-61, MW-1, MW-40, MW-55, MW-63, CM-22, CM-26, CM-48, MM-40, MM-57 and MM-72 are considered as being useful for the development of antiviral drug against influenza virus type A

Keywords □ Influenza virus type A, Haemagglutination Inhibition Test (HIT), Korean traditional prescriptions, Korean medicinal herbs.

Abbreviations: CM-methanol extracts of traditional prescriptions; CW-water extracts of traditional prescriptions; MM-methanol extracts of individual herbs; MW-water extracts of individual herbs.

한약 단미제 분획의 Influenza virus type A 활성에 관한 연구

정재득* 박인호* 이광희** 김호경*** 고병섭*** 박갑주*

『韓國韓醫學研究院論文集』第3卷 第1號 : 67~83, 1997
Korean J Ori Med 3 : 67~83, 1997

별 책

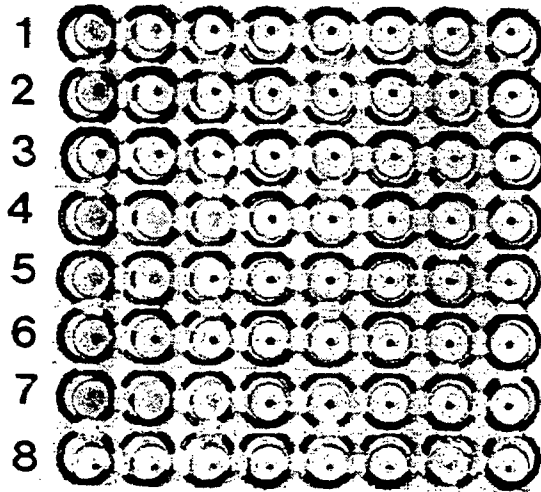


Figure 2. Haemagglutination assay of bronchial fluid of mouse which was adapted with influenza virus type A.

= ABSTRACT =

Study on the Influenza Type A Activity of Fractions of Korean Medicinal Herbs

Jung Jae-Deuk, PhD* Park In-Ho* Park Kap-Joo, PhD* Lee Kwang-Hee**
Kim Ho-Kyoung, PhD*** Ko Byung-Seob, PhD***

In order to search for anti-influenza virus type A agents from Korean medicinal herbs,

* Dept. of Basic Research, KIOM, 135-100 Seoul, Korea

** Dept. of Otorhinolaryngology, Medical school, Konkuk University

*** Dept. of Herbal Medicine, KIOM

정재득·박인호·이광희·김호경·고병섭·박갑주 : 한약 단미제 분획의 Influenza virus type A 활성화
관한 연구

we selected 100 medicinal herbs, based on a review of the Korean traditional medicine books. Four of 100 Korean medicinal herbs, MM-40, MM-55, MM-63, MM-110, exhibited very strong anti-influenza virus activity. The fractions of four medicinal herbs, which had very strong anti-influenza virus activity, were tested for antiviral activity by means of Haemagglutination inhibition test(HIT), 40% MeOH fraction of MM-40, H₂O fraction of MM-55, 20% fraction of MM-63 and H₂O fraction of MM-110 had strong anti-influenza virus activity at the range of 78 μ g/ml to 156 μ g/ml, 1.56mg/ml to 100mg/ml, 6.25mg/ml to 50 mg/ml and 48.7 μ g/ml to 780 μ g/ml, respectively. These results of HIT indicated that fractions of Korean medicinal herbs might inhibit either attachment of virus to cell surface receptor or penetration of virus into cell during the initial stage of infection. In the cytotoxicity of fractions against red blood cells, 40% MeOH fraction of MM-40, 20% fraction of MM-63 and H₂O fraction of MM-110 showed cytotoxicity at the range of 78 μ g/ml to 10mg/ml, 50mg/ml to 100mg/ml and 195 μ g/ml to 100mg/ml, respectively, whereas H₂O fraction of MM-55 did not show cytotoxicity. In order to establish influenza virus adapted animal model, influenza virus type A were passaged 3 and 4 times successively in Balb/c mouse. As a result, we had 4 HA unit titers on the 5 days of 3rd passages and 7 days of 4th passages after infection, respectively.

【Key words】 Influenza virus type A, Haemagglutination inhibition test(HIT), Haemagglutination assay(HA), Korean medicinal herbs.

Abbreviations: MM-methanol extracts of Korean medicinal herbs; MW-water extracts of Korean medicinal herbs.

한약 처방 (복합제)의 Influenza Virus Type A에 대한 항바이러스 활성 효과

한국한의학연구소 기초연구부, ¹한약연구부 및 ²건국대학교 생물학과
정재득 · 고병섭¹ · 이형환² · 최환수 · 박갑주

Antiviral Activity of Korean Traditional Prescriptions against Influenza Virus Type A

Jae Deuk Jung, Byoung Seob Ko¹, Hyung Hoan Lee², Hwan Soo Choi, and Kap Joo Park

*Department of Basic research, Korea Institute of Oriental Medicine, 129-11,
Chung-dam Dong, Kang-nam Gu, Seoul 135-100, Korea*

*¹Department of Herbal medicine, Korea Institute of Oriental Medicine, 129-11,
Chung-dam Dong, Kang-nam Gu, Seoul 135-100, Korea*

²Department of Biology, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea

대한바이러스학회지 제26권 제2호 (1996) 별책

Reprinted from

The Journal of the Korean Society of Virology, Vol. 26, No. 2, 1996

한약 처방 (복합제)의 Influenza Virus Type A에 대한 항바이러스 활성 효과

한국한의학연구소 기초연구부, ¹한약연구부 및 ²건국대학교 생물학과
정재득 · 고병섭¹ · 이형환² · 최환수 · 박갑주

=Abstract=

Antiviral Activity of Korean Traditional Prescriptions against Influenza Virus Type A

Jae Deuk Jung, Byoung Seob Ko¹, Hyung Hoan Lee², Hwan Soo Choi, and Kap Joo Park

*Department of Basic research, Korea Institute of Oriental Medicine, 129-11,
Chung-dam Dong, Kang-nam Gu, Seoul 135-100, Korea*

*¹Department of Herbal medicine, Korea Institute of Oriental Medicine, 129-11,
Chung-dam Dong, Kang-nam Gu, Seoul 135-100, Korea*

²Department of Biology, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea

In order to search for anti-influenza virus type A agents from Korean traditional prescriptions (herb complexes), we selected 63 traditional prescriptions, based on a review of the Korean traditional medicine books. Both methanol extracts and boiling-water extracts were tested, by means of the Haemagglutination Inhibition Test (HIT).

Three of the 63 methanol extracts: CM-22, CM-26, CM-48 (see explanation of nomenclature below), showed efficacy against influenza virus type A. CM-22 showed anti-influenza virus type A activity at the range of 313 μ g/ml to 9.75 μ g/ml, CM-26 showed antiviral activity at the range of 156 μ l/ml to 4.87 μ g/ml, CM-48 showed anti-influenza virus type A activity at the range of 625 μ g/ml to 19.5 μ g/ml, respectively. Three of the water extracts: CW-14, CW-34, CW-61 were active. CW-14 showed anti-influenza virus type A activity at the range of 10mg/ml to 78 μ g/ml. CW-34 showed antiviral activity at the range of 10mg/ml to 625 μ g/ml and CW-61 showed anti-influenza virus type A activity at the range of 10mg/ml to 313 μ g/ml, respectively. In order to determine cytotoxicity of each extracts, chicken red blood cells were incubated with the various concentration of extracts of Korean traditional prescriptions. CW-14, CW-34 and CW-61 did not show cytotoxic effect against red blood cells whereas CM-22, CM-26 and CM-48 showed cytotoxic effect against red blood cells at the range of 10mg/ml to 625 μ g/ml, 10mg/ml to 313 μ g/ml and 10mg/ml to 313 μ g/ml, respectively. These results indicated that Korean traditional prescriptions may be inhibit either attachment of virus to cell surface receptor or penetration of the virus into cell during the initial stage of infection.

Key Words: Influenza virus type A, Haemagglutination Inhibition Test (HIT), Korean traditional prescriptions.

Abbreviations: CM (methanol extracts of traditional prescriptions), CW (water extracts of traditional prescriptions)

Fortified rice cakes satisfy more than just taste buds

By Samuel Len

When it comes to promoting Korean products to an international audience in the name of improving economic competitiveness, airplanes, automobiles and ships immediately come to mind. But an academic at Kyonggi University sees things differently.

"Currently, there is no scientific literature devoted to the disease-fighting and nutritional values of rice cakes and other kinds of Korean food," says Kim Myung-hee, professor of culinary arts at Kyonggi University, who has been researching different ways to develop Korean rice cakes, or "ttok," into healthy desserts that are capable of boosting immune levels and fighting infections.

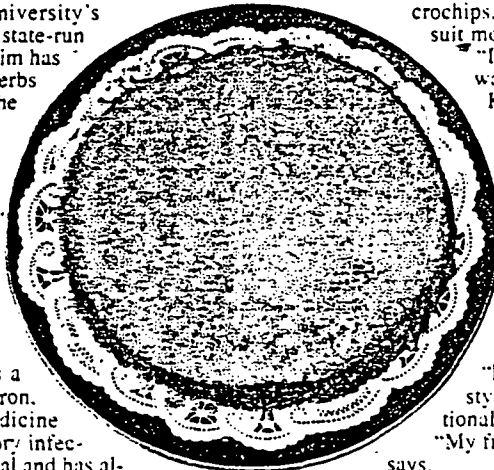
Inside the professional-style kitchens of the culinary department at Kyonggi University's tourism college and the laboratories of state-run Korea Institute of Oriental Medicine, Kim has been mixing a variety of medicinal herbs and other traditional ingredients into the delicacies.

The results are rice cakes that are not only delicious, but capable of suppressing viral infections such as the common cold, says Kim. Currently, she is playing a leading role in a three-year government research aimed at modifying traditional rice cakes and even drinks into marketable products for health-conscious customers around the world.

One of her current projects involves a type of rice cake fortified with citron, which the institute of oriental medicine believed can help cure viral and respiratory infections. She is waiting for a patent approval and has al-



Very "cake-looking" Korean rice cakes, the creation of Kim Myung-hee, professor of culinary arts at Kyonggi University



ready been approached by several companies interested in marketing them.

Most Koreans buy rice cakes at stores because making them takes hours. After grinding the rice, steaming it inside a wooden vat, layers of other ingredients must be placed on top and that's one process for one type of rice cake.

In addition to a host of recipes and traditional ingredients that she plans to market, Kim has developed a faster and easier way to make rice cakes at home. She grinds the grains and herbs using kitchen appliances and keeps the mixtures in cups inside her refrigerator. When she needs to make a batch, she mixes them with water and steams them in her own kitchen.

"The whole process takes less than an hour," Kim says.

If her speed-cooking method can satisfy the attention span of people living in the age of microwaves, Kim says her fortified rice cakes also suit modern tastes.

"In the past, eating lots and lots of red meat was considered to be the best diet among Koreans," says Kim. "But now, perceptions of food have changed dramatically, focusing on healthier alternatives, such as grains and vegetables." Even the concept of culinary art in Korea is changing from just better tasting food to healthier ones, she says.

Her modernized rice cakes seem to resemble her own lifestyle. While rice cakes usually bring to mind images of obedient Korean housewives clad in neatly-pressed traditional dresses, or "hanbok," Kim's functionally-short hair style and love of sports shatter any traditional stereotypes.

"My friends say I don't even look Korean," she says.

감기억제 효과 '수퍼 떡' 개발

경기대 金明姬교수

국제특허 출원도 준비

『우리의 전통떡으로 감기를 잡습니다.』

우리 고유의 음식으로 명절이나 잔치때면 빼놓지 않고 상에 오르는 떡이 면역효과까지 담긴 세계적인 기호식품으로 다시 태어난다. 경기대 관광학부 조리전공 김명희(金明姬·36) 교수가 농림부의 「감기억제 기능성 식품개발」 프로젝트의 연구용역을 받아 2년간 연구끝에 최근 개발한 것이 바로 「수퍼 떡」.

김 교수는 양약과 한약의 감기억제능력을 세밀히 비교해 유자, 모과, 대추 등에서 감기에 방 성분을 추출, 적절히 배합해 「NP-97-1」로 이름붙인 점액성의 원액 추출물을 개발했다. 이 원액을 맵쌀, 찹쌀 등과 적절히

섞어 팥가루와 호두, 말린 꽃감 등을 가미해 찌면 파이모양의 황갈색 떡이 된다.

『처음에는 1백20종에 이르는 우리 떡의 과학성을 세계에 알릴 생각에서 연구를 시작했어요. 그런데 차츰 욕심이 생기더군요.』 김 교수는 세계 어느 곳에 내놔도 손색이 없는 맛을 위해 설탕시럽 등을 적절히 배합, 떡 고유의 점성을 없애고 부드러운 핫케이크 맛으로 떡을 가공하는 데에도 성공했다.

특히 이번엔 개발한 원액 추출물은 항바이러스 활성물질들 갖고 있어 감기치료 및 예방에 효과가 있다. 『이미 동물실험을 통해 효과가 있음이 입증됐습니다.』 김 교수는 옛 문헌의 「한약재를 넣어 만든 구선왕도고(九仙王道糕)라는 떡이 있었다」는 데 착상을 얻어 연구를 시작하게 됐다고 한다. 이 떡의 공



◇ 경기대 김명희 교수가 자신이 개발한 떡을 선보이고 있다. 이 떡은 감기 치료에 탁월한 효과가 있고, 케이크처럼 부드러운 게 특징이다. <朱完中기자·wjoo@chosun.com>

식 범청은 아직 정해지지 않았지만, 이미 제조방법 및 기술은 국내특허를 취득했으며, 현재

국제시장에도 특허를 출원하기 위해 준비중이다. <金印象기자·iskim@chosun.com>

[한방] 한방독감 치료제 개발

한겨레신문 [] 1997. 4. 3. 木

유행성독감(인플루엔자)은 어린이와 노약자에게는 때론 치명적인 무서운 바이러스 전염병이지만 아직 이렇다할 치료약이 없다.

한국한의학연구소(소장 홍원식)가 지난해부터 선조들이 전통적으로 감기치료에 쓰던 한약재를 이용한 유행성독감 치료제 개발에 나서 최근 좋은 연구결과를 얻었다.

이 연구소 고병섭 한약연구부장팀은 3일 옛날부터 감기치료에 사용해오던 한방처방 63종과 이 처방에 쓰인 73개 한약재를 끓는 물이나 메탄올로 우려내 항바이러스 효과를 검증한 결과 13종이 A형 인플루엔자바이러스 억제력이 뛰어난 것으로 나타났다고 밝혔다.

고 박사팀의 복합한약재 진액(CW-14 등)은 우리나라와 일본에서 시판중인 한방감기진액제 6종과 견주어 항바이러스 효과가 2~10 배 높았다.

특히 이 진액은 독감치료제로 쓰이고 있는 양약인 염산아만타딘 제제보다 항바이러스 효과가 뛰어나면서도 독성은 전혀 없는 것으로 나타났다.

염산아만타딘은 mL 당 6.25mg의 농도에서부터 항바이러스 효과가 나타나기 시작하지만 고 박사팀의 한방진액은 이보다 훨씬 낮은 1천분 1 또는 10분의 1 수준인 4.87~6백2 5마이크로g일 때부터 항 바이러스 활성이 나타났다.

고 박사팀은 또 아만타딘은 12.5mg일 때부터 적혈구에 대한 세포 독성 등의 부작용이 있지만 이 진액은 전혀 독성을 보이지 않았다고 밝혔다.

그는 “우리 고유의 한약재를 이용해 부작용이 없으면서도 치료 효과가 뛰어난 독감치료제를 상품화할 수 있다”며 “현재 진행중인 실험동물을 이용한 생체내 약효 검증작업이 순조롭게 이루어질 경우 몇년안으로 세계적인 독감치료제를 개발할 수 있게 될 것” 이라고 말했다.

안종주 기자

Copyright 1997-99 © NAVER.COM All Rights Reserved.

“藥業新聞”

내용 : 전통한약서 감기치료제 개발

전통한약서 감기치료제 개발 한의학연구소, 학술대회서 발표

전통한의학을 통해서 바이러스 질환을 치료하고, 치료물질 개발할 수 있는 가능성이 제기돼 난치병의 하나인 감기약 개발이 주목을 받고 있다.

한국의학연구소가 지난 10일 연구소 회의실에서 한국, 일본, 캐나다 3국 학자를 초청해 개최한 국제학술대회에서 이 연구소 박갑주박사팀은 한약처방 및 단일한약재 시료 2백80종을 뜨거운 물이나 메탄올로 추출하여 인플루엔자 바이러스에 투여한 결과 13종의

처방 및 단일한약재에서 감기 바이러스 억제효과가 있는 것을 확인했다고 밝혔다.

대조실험을 위해 국내, 중국, 일본에서 시판중인 한방진액제제인 삼화탕, 갈근탕종류와 감방감기치료제인 영산아만티란의 인플루엔자바이러스 효과검색결과에서도, 3종의 한약감기처방은 이들에 비해서 2~10배의 바이러스억제효과가 있었다고 말했다.

또 단일 한약재 중 4종은 10배이상의 바이러스억제효과

가 있었으며, 이들 4종의 단일한약재를 기초로 하여 새로 조건제된 약제의 효과를 검색했을 때도 강한 감기바이러스 억제효과가 있었다고 주장했다.

박갑주박사는 이 연구결과를 토대로 우리한약재를 이용해 부작용이 없으면서 치료효과가 뛰어난 특강치료제를 상용화 할 수 있다며, 현재 실험동물을 이용한 생체내 약효검증작업이 순조롭게 진행된다면 1,2년안에 특강치료제의 개발 가능성이 있다고 예상했다.

1997년 4월 11일 (금요일)

“제일경제신문”

내용 : 감기바이러스 치료 한방처방 효과가 크다

허피스와 감기 등 양방에 의존해온 난치성 바이러스 질환 치료에 한약처방이 더 뛰어난 효과가 있다는 실험 결과가 나왔다.

한국한의학연구소 차박성 박사는 10일 청담동 연구소내 대회의실에서 열린 국제학술 세미나에서 전통 한약을 이용한 난치성 바이러스 질환의 치료제 개발에 대한 실험성과를 발표했다.

차박사는 전통적으로 감기에 사용되는 한방처방과 단일 한약재 2백80종을

감기등바이러스치료 한방처방효과 커

열탕과 메탄올로 추출해 인플루엔자 바이러스에 부여한 결과 13종의 처방과 단일 한약재에서 바이러스 억제효과가 탁월했다고 확인했다.

특히 국내외에서 시판중인 쌍화탕·갈근탕과 양약인 염산아만타딘의 감기 바이러스 억제효과를 검색한 결과 단일 한약재 4종은 이들 기준의 한·양방 제제보다 10배이상 바이러스 억제효과가 나타났다는 것이다.

특히 이들 4종의 한약재를 복합조제해 CC-4로 새로 명명한 탕제의 경우, 바이러스 억제효과가 7.5배를 초과했다고 차박사는 밝혔다.

“스포츠조선”

내용 : 한약으로 난치성 바이러스질환 잡는다

스포츠조선

4/11

종합뉴스

허피스·감기등 난치성 바이러스 질환 “한약처방이 더 효과적”

박갑주박사팀 발표

허피스와 감기 등 약방에 귀
급해 온 난치성 바이러스질환
치료에 한약처방이 더 뛰어난
효과가 있다는 실험결과가 나
왔다.

한국한의학연구소 박갑주 박
사팀은 10일 국제학술 세미나
에서 집중 한약을 이용한 난치
성 바이러스 질환의 치료제 개
발에 대한 실험성고를 발표했
다.

박 박사팀은 전통적으로 감
기에 사용되는 한약처방과 단
일 한약재 280종을 열탕과 메
탄올로 추출해 인플루엔자 바
이러스에 투여한 결과, 13종의
처방과 단일 한약재에서 바이
러스 억제효과가 탁월했다고
확인했다.

특히 국내외에서 시판중인
쌍화탕, 갈근탕과 양약인 임산
아만타딘의 감기 바이러스 억

제효과를 검색한 결과, 단일
한약재 1종은 이들 기존의 한
약방 제제보다 10배이상 바이
러스 억제효과가 나타났다는
것이다.

“朝鮮日報”에 발표

내용: “소청룡탕 등 한약 감기억제 효과에 대한 연구”에 관하여

西紀 1996年 11月 20日 水曜日

조

‘소청룡탕 등 한약 감기억제’ 입증

일부 추출물 독감바이러스 90% 이상 퇴치
오가피장척탕-마황탕... 직접 달여 복용도



◇기온이 내려가면서 감기 등 호흡기질환 치료를 위해 한약재 시장을 찾는 사람들이 많다.
<송봉炳기자>

林昊俊기자

우리 조상들이 오래전부터 복용해 오던 한약 처방들이 감기 바이러스에 효과적이라는 실험 결과가 나왔다.

정부출연기관인 한국한의학연구원 수석 차부추박사팀(박갑주·바이러스연구팀장)은 한약 처방 63종의 추출물을 독감 바이러스에 공격당하고 있는 적혈구 세포에 투입한 뒤 이 바이러스의 활동성을 조사하는 실험을 했다.

그 결과 소청룡탕, 마황탕 등 일부 한약 처방은 독감 바이러스의 활동을 90% 이상 억제하는 등 효과가 뛰어났다고 최근 개최된 대한바이러스학회에 발표했다.

차박사는 『기초과학적, 면역학적 검토없이 복용돼 오던 한약 처방의 약효가 처음으로 과학적으로 증명됐다는 점에서 의의가 크다』며 『동물실험을 거쳐 인체 재료 개발할 예정』이라고 말했다.

다.

5가지 한약 처방 1첩을 짓는 데 들어가는 약재는 다음과 같다.

▶오가피장척탕: 오가피 15g, 도파 7.5g, 청승질 7.5g, 느릅 3.75g, 고반미 3.75g.

▶소청룡탕: 마황 5.6g, 백작약 5.6g, 오미자 5.6g, 반하 5.6g, 세신 3.75g, 건강 3.75g, 계지 3.75g, 감초 3.75g.

▶마황탕: 마황 28.1g, 감초 9.4g, 계지 18.7g, 행인 6.6g.

▶청주구폐탕: 상엽 5.6g, 단삼 4.7g, 행인 13.1g, 인삼 13.1g, 감초 1.9g, 초호마인 1.9g, 아교 1.5g, 백문동 2.25g, 비파엽 1.9g.

▶이향산: 향부자 7.5g, 향유 7.5g, 소엽 3.75g, 진피 3.75g, 참출 3.75g, 후박 1.9g, 백편두 1.9g, 감초 1.9g, 도파 7.5g, 생강 11.25g, 총 7.5g.

차박사는 『오래전부터 내려온 처방이기 때문에 약재를 구입해 집에서 직접 달여 먹어도 효과가 좋을 것으로 생각되나, 이 처방의 부작용은 독성실험이 아직 끝나지 않아 뭐라 말할 수 없다』고 말했다.

문의 02(3445)4773.

1997년 4월 12일 (토요일)

“문화일보”

내용 : 유행성독감 한방제제로 막는다.

...도 치료되지 않는
... 대한 유행성독감 치료
...로 곧 개발될 전망이다

...연구소(소장 홍원식)가
...바이러스성 질환'을 주제
...제학술대회에서 차미현
...들은 "전통적으로 감기
...한방처방 및 단일 한약
...뜨거운 물이나 메탄올
...인플루엔자 바이러스에

유행성독감 한방製劑로 막는다

한의학연구소 곧 개발... 바이러스 억제 탁월

투여한 결과 13종의 단일 한약제에서
감기바이러스 억제효과가 탁월한 것
으로 확인됐다"고 밝혔다.

특히 우리나라와 중국 일본 등지에
서 감기 치료제로 시판중인 한방 진

억제제인 생화탕 및 갈근탕과 양약인
염산이만타딘의 인플루엔자 바이러스
억제 효과를 검색한 결과, 이들 치
료제보다 옛날부터 감기 처방제로 쓰
이던 약재 3종의 경우 인플루엔자 바

이러스 억제 효과가 2~10배 더 큰
것으로 나타났다. 더구나 열산이만
타딘의 경우 포혈구에 대한 "포독성
등의 부작용이 있지만 한방의 전통적
인 감기 치료제는 독성이 전혀 보이
지 않은 것으로 밝혀졌다.

차박사는 "현재 실험동물을 이용한
상처내 약효 검증작업이 진행중이며
이 실험이 순조롭게 될 경우 1,2년
안에 새로운 특감 치료제가 나올 것"
이라고 전망했다. <金娟秀기자>

“民族醫學신문”에 발표

내용: “감기바이러스에 대한 한방치료의 우수성”에 관하여

후

1996년 11월 25일 (월요일) [9]

감기바이러스 한방치료 더 우수

한약처방의 기전 밝히는 것이 남은 과제

한약처방이 양방에 비해 감기 바이러스에 대한 면역 및 치료 효과가 높은 것으로 밝혀졌다. 대한바이러스학회가 15일 1차 춘학 학술발표회에서 한의협은 두스 박갑주 박사(바이러스 연구책임자)는 “한약 처방 복합제”의 Influenza Virus Type A에 대한 항바이러스 활성 효과를 발표하고 한약 처방은 지금까지 나와 있는 양방 처방에 비해 우수한 바이러스 면역 및 치료 효과가 있다고 발표했다.

박갑주 박사 팀의 연구 결과에 따르면 “전통 한약처방 추출물을 인플루엔자 바이러스에 노출시키는 모노클로날 항체 실험 결과 인플루엔자 바이러스를 최고 90% 이상 억제하는 효과가 나타났다”고 밝혀 지금까지 양약에 의존해온 감기바이러스 질환의 예방과 치료에 수천 년간 내려온 전통한약 처방이 의미라 더 뛰어난 것으로 밝혀졌다.

이번에 연구팀이 실험한 목적은 전통 한방처방 63종의 추출

물인 이들 중 오가과장청탕, 청조구폐탕, 이황산, 소청룡탕, 가황탕 등은 인플루엔자 바이러스를 세포 초기감염 단계에서 30% 이상 억제하는 것으로 나타났다.

특히, 현재 국내에서 시판 중인 한방감기 약기스제 4종 및 일본에서 시판 중인 한방감기 약기스제 2종에 비해 효과가 훨씬 우수한 것으로 나타났고 세포에 대한 투여가 없거나 아주 낮은 결과를 나타내 새로운 한방감기 약기스제의 개발로 이어질 것으로 기대되고 있다.

박갑주 박사 팀은 현재 동물 실험 단계에 진입 중이다. 이번 실험으로 그동안 서양의학에서 부정적이었던 약초나 생약재를 모사하여 바이러스나 세균감염 치료제를 개발하는 것보다 수천 년 동안 실제 뛰어난 효과를 보이고 사람을 치료해 온 전통 한방처방이 더욱 뛰어난 바이러스 억제 효과를 보일지 따라 한의약 발전에 획기적 발전을 가져올 수 있을 것으로 기대된다.

내용 : 한약으로 독감 잡는다

1997年 4月 10日 (星期三) 木曜日 ① (日刊)

國民日報

최고의 건강지킴이 신 10배

신약의 개발은 인류의 건강을 지키는 데 있어 가장 중요한 역할을 합니다. 신약은 기존의 약보다 더 효과적이고 부작용이 적어 건강을 지키는 데 있어 최고의 선택입니다.

한약으로 독감 잡는다

바이러스 억제효과 양약의 10배나 부작용도 없어 - 1·2년내 新藥개발

신약의 개발은 인류의 건강을 지키는 데 있어 가장 중요한 역할을 합니다. 신약은 기존의 약보다 더 효과적이고 부작용이 적어 건강을 지키는 데 있어 최고의 선택입니다.

신약의 개발은 인류의 건강을 지키는 데 있어 가장 중요한 역할을 합니다. 신약은 기존의 약보다 더 효과적이고 부작용이 적어 건강을 지키는 데 있어 최고의 선택입니다.

신약의 개발은 인류의 건강을 지키는 데 있어 가장 중요한 역할을 합니다. 신약은 기존의 약보다 더 효과적이고 부작용이 적어 건강을 지키는 데 있어 최고의 선택입니다.

신약의 개발은 인류의 건강을 지키는 데 있어 가장 중요한 역할을 합니다. 신약은 기존의 약보다 더 효과적이고 부작용이 적어 건강을 지키는 데 있어 최고의 선택입니다.

신약의 개발은 인류의 건강을 지키는 데 있어 가장 중요한 역할을 합니다. 신약은 기존의 약보다 더 효과적이고 부작용이 적어 건강을 지키는 데 있어 최고의 선택입니다.

“世界日報”

내용 : 감기치료 한방이 효과적

“감기치료 韓方이 효과적”

한의학계 국제심포지엄

한의학으로 바이러스질환을 치료하려는 연구가 한창이다.

보건복지부 산하 정부중앙연구소인 한국과학기술연구소(소장 朴元植)는 한의학을 이용해 바이러스질환을 치료할 수 있는 가능성에 대한 국제심포지엄을 10일 개최했다. 이번 심포지엄에서 특히 관심을 모은 내용은 세계적인 독감치료제를 국내에서 개발할 가능성이 높다는 연구결과였다.

이번 심포지엄에는 10여개국에서 100여명의 전문가가 참가했다. 특히 한방을 국내와 일본 등 동지에서 시판중인 생파탕, 살근탕 그리고 양방감기치료제인 염산아만타딘과 약효를 비교한 결과 한방 처방의 인플루엔자 바이러스

전래돼온 한방처방이 독감바이러스에 대해 강력한 약리효과가 있는 것으로 나타났다.



13종 한약처방 바이러스 억제효과 확인 洋方보다 약효 10배 높고 부작용도 없어

한의학연구소 차甲柱박사팀은 전통적으로 감기에 사용되는 한약 처방 및 단일 한약제제로 2백80종을 인플루엔자 바이러스에 투여한 결과 13종의 처방 및 한약제에서 탁월한 감기바이러스 억제효과가 확인됐다고 밝혔다.

억제효과가 10배 이상 높았다고 밝혔다. 특히 한방처방은 여타 약종과는 달리 적혈구에 대한 세포 독성 부작용이 전혀 없는 것으로 나타났다고 강조했다.

이번 심포지엄에서 캐나다 브리티시콜롬비아대학 닐 타이스코우

는 중국 내장 북아메리카의 전통 약물로부터 바이러스에 의한 난치 병을 치료하는 임상결과를 발표했다.

또 일본 도야마의대 난바즈네오 교수는 이미 일본에서 개발완료된 전통약물을 이용한 바이러스질환 치료제의 치료효과를 공개했다. 한편 한의학연구소 연구팀은 사상 체질이론에 따른 감기치료제의 약리작용 메커니즘을 발표해 주목받았다. (朱泰亨기자)